



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM
DALI**

**ULTRASON DESTEKLİ EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE
EREMURUS SPECTABILIS (ÇİRİŞ) BİTKİSİNDEN
PREBİYOTİK EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU,
PREBİYOTİK VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hakan YÜCEDAĞ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ**

AKSARAY, 2024

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 212330408 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Hakan YÜCEDAĞ tarafından hazırlanan “**ULTRASON DESTEKLİ EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE *EREMURUS SPECTABILIS* (ÇİRİŞ) BİTKİSİNDEN PREBİYOTİK EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU, PREBİYOTİK VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Doç Dr. Lalehan AKYÜZ

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Tez Savunma Tarihi: 07/06/2024

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Prof. Dr. Mehmet Ali HINIS

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinalliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Hakan YÜCEDAĞ

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve gerek deney aşamasında gerekse tez yazımı aşamasında bilgi, tecrübe ve anlayışlarıyla akademik alanda bana daima yol gösteren ve destek olan, kendimi geliştirmemde büyük katkıları olan danışmanım Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ'a ve eş danışmanım olan Doç. Dr. Tülden İNANAN'a, tezimde prebiyotik ekstraksiyon veriminin optimizasyon çalışmasında yardımlarından dolayı Ege üniversitesi, Tarım Makineleri ve Teknolojileri Mühendisliği bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Arzu YAZGI hocama, *Eremurus spectabilis* (Çiriş) bitkisinin teşhis ve lokasyonunun tespitinde yardımcı olan Fen edebiyat fakültesi Biyoloji bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Mehtap TEKSEN'e, çalışmalarımı gerçekleştirmeme olanak sağlayan Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne (ASÜBTAM) ve yöneticilerine, teşekkür ederim.

Çalışmamın gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Abdulkerim KOCAOĞLU, Mehmet CAMBAZ, Hilal ERDEN, Yaren DOĞRUL, İlayda DOĞAN, Muhammet Mustafa CANBOLAT, Abdülkadir DİKİCİ ve desteklerini benden esirgemeyen anneme, babama ve kardeşime teşekkür ederim.

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) KBAG 223Z079 kodlu proje tarafından desteklenmiştir. Ayrıca TÜBİTAK'a yüksek lisans çalışmalarım sırasında sağladığı burs desteğinden dolayı teşekkür ederim.

Hakan YÜCEDAĞ

AKSARAY, 2024

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Çiriş Bitkisi	4
2.2 Probiyotik	5
2.3 Prebiyotik	6
2.3.1 Prebiyotiklerin sınıflandırılması ve kaynakları	6
2.4 İnülin	9
2.4.1 Fruktooligosakkaritler (FOS)	10
2.4.2 FOS'un fonksiyonel özellikleri ve gıda sanayisinde kullanımı	11
2.4.3 Bitkisel prebiyotiklerin elde edilmesi	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM	14
3.1 Materyal	14
3.1.1 Çalışmada kullanılan prebiyotik kaynağı	14
3.1.2 Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri	15
3.1.3 Bakterilerin aktifleştirilmesi ve geliştirilme ortamları	15
3.1.4 Çalışmalarda kullanılan besiyerler	16
3.2 Yöntem	18
3.2.1 <i>Eremurus spectabilis</i> 'in muhafazası	18
3.2.2 Bakteri kültürlerinin muhafazası	18
3.2.3 Bitkiden inulin tipi fruktan ekstraksiyonu ve optimizasyonu	18
3.2.3.1 Deneysel tasarım	18
3.2.3.2 İnülin tipi fruktanın ultrason destekli ekstraksiyonu	19
3.2.3.3 İnülin tipi fruktan ekstraksiyon verimi	20
3.2.3.4 İnülin tipi fruktan ES ekstrelerinin liyofilizasyonu	21
3.2.4 İnülin tipi fruktan ES'nin kimyasal karakterizasyonu	23
3.2.4.1 Toplam karbonhidrat tayini	23
3.2.4.2 İndirgeyici şeker analizi	25
3.2.4.3 Polimerizasyon derecesi	27
3.2.4.4 Suda çözünürlük	27
3.2.4.5 İnülin tipi fruktan ES'nin su tutma kapasitesi (STK) ve yağ tutma (YTK) kapasitesi	27
3.2.4.6 İnülin tipi fruktan ES'nin nem içeriğinin belirlenmesi	28
3.2.4.7 İnülin tipi fruktan ES'nin şişme kapasitesinin belirlenmesi	28
3.2.4.8 Fourier dönüşümlü kızılmtesi spektroskopisi (FTIR) analizi	29
3.2.4.9 Nükleer manyetik rezonans (NMR) analizi	29
3.2.4.10 Termogravimetrik analiz (TGA)	29
3.2.4.11 Ultraviyole görünür (UV-VIS) analizi	29
3.2.4.12 İnülin içeriğinin belirlenmesi (monomer analizi)	30
3.2.4.13 Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi	30
3.2.5 İnülin tipi fruktan ES'nin prebiyotik özelliklerinin belirlenmesi	30

3.2.5.1 İnülin tipi fruktan ES'nin prebiyotik aktivitesinin belirlenmesi	30
3.2.5.2 İnülin tipi fruktan ES'nin prebiyotik aktivite skoru testi.....	33
3.2.5.3 İnülin tipi fruktan ES'nin mide asidine direncinin belirlenmesi.....	34
3.2.6 Antioksidan biyolojik aktivitenin değerlendirilmesi.....	35
3.2.7 İstatistiksel analiz	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	40
4.1 İnülin Tipi Fruktan ES'nin Ekstraksiyon Veriminin Belirlenmesi	40
4.2 Tepki Yüzeyi Metadolojisi ile Ekstraksiyon Optimizasyonu	41
4.2.1 Sıcaklık, süre ve çözücü konsantrasyonunun ekstraksiyon üzerine etkisi	41
4.2.2 Box Bhenken tasarımı ile inülin tipi fruktan ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu	45
4.3 İnülin Tipi Fruktan ES'nin Kimyasal Karakterizasyonu	53
4.3.1 Polimerizasyon derecesinin belirlenmesi.....	53
4.3.2 İnülin tipi fruktan ES'nin suda çözünürlüğünün belirlenmesi	54
4.3.3 İnülin tipi fruktan ES'nin su tutma kapasitesi (STK) ve yağ tutma kapasitesi (YTK)'nin belirlenmesi	55
4.3.4 İnülin tipi fruktan ES'nin nem içeriğinin belirlenmesi	57
4.3.5 İnülin tipi fruktan ES'nin şişme kapasitesinin belirlenmesi	58
4.3.6 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi	58
4.3.7 Nükleer manyetik rezonans (NMR) analizi	61
4.3.8 Termal gravimetrik analizi (TGA)	63
4.3.9 Ultraviyole görünür (UV-VİS) analizi	65
4.3.10 İnülin içeriğinin belirlenmesi (monomer analizi)	66
4.3.11 Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi	67
4.4 İnülin Tipi Fruktan ES'nin Prebiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	69
4.4.1 İnülin tipi fruktan ES'nin <i>in vitro</i> fermentasyonu ve prebiyotik indeks değeri.....	69
4.4.1.1 İnülin tipi fruktan ES'nin potansiyel probiyotikler tarafından fermentasyonu	69
4.4.2 Liyofilize inülin tipi fruktan ES'nin bağırsak patojen mikroorganizmaları tarafından fermentasyonun belirlenmesi.....	78
4.4.3 İnülin tipi fruktan ES'nin prebiyotik skorunun belirlenmesi	83
4.4.4 İnülin tipi fruktan ES'nin mide asidine direncinin belirlenmesi.....	89
4.5 Antioksidan Biyolojik Aktivitenin Değerlendirilmesi	93
4.5.1 İnülin tipi fruktan ES'nin DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürücü aktivitenin belirlenmesi.....	93
4.5.2 İnülin tipi fruktan ES'nin ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbentiazolin-6 sülfonik asit) radikal süpürücü aktivitesinin belirlenmesi	95
4.5.3 İnülin tipi fruktan ES'nin hidroksil radikalleri süpürücü aktivitesi	97
4.5.4 İnülin tipi fruktan ES'nin süperoksit anyonu süpürücü aktivitesi.....	99
4.5.5 İnülin tipi fruktan ES'nin demir indirgeme antioksidan gücü (Ferric reducing antioxidant power-FRAP).....	100
4.5.6 Total antioksidan kapasite analizi	102
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	105
KAYNAKLAR.....	111
EKLER.....	125
EK A. Bitki toplama izni.....	126
ÖZGEÇMİŞ.....	127

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ULTRASON DESTEKLİ EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE *EREMURUS SPECTABILIS* (ÇİRİŞ) BİTKİSİNDEN PREBİYOTİK EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU, PREBİYOTİK VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hakan YÜCEDAĞ

**Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

ÖZET

Tez çalışmasında Çiriş (*Eremurus spectabilis*) bitkisinin kök ve yaprak kısımlarından ultrason destekli ekstraksiyonundan elde edilen inülin tipi fruktanın ekstraksiyonun optimizasyonu, fizikokimyasal karakterizasyonu, prebiyotik ve biyolojik aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İnülin tipi fruktanın ekstraksiyonu tepki yüzey metodu kullanılarak optimize edilmiştir. Bu metoda göre optimum ekstraksiyon 60°C, 1:12 (g/mL), 20 dk koşulları altında gerçekleşmiş olup %44,94 verim tespit edilmiş ve ekstrakte edilen inülin tipi fruktan ES'nin polimerizasyon derecesi 57 ± 1 , suda çözünürlük değeri $89,8 \pm 1,18$, su tutma kapasitesi $6,71 \pm 0,12$ g/g, yağ tutma kapasitesi $4,80 \pm 0,01$ g/g, nem miktarı $6,18 \pm 0,12$, şişme kapasitesi 2,6 mL/g, olduğu tespit edilmiştir. İnülin tipi fruktan ES'nin yapısında %39,39 fruktoz ve %60,61 glukoz bulunduğu ve monomerlerin beta konfigürasyonunda bağlandığı belirlenmiştir. Ayrıca ekstrakte edilen inülin tipi fruktan ES'nin 205°C'ye kadar çıkan endüstriyel işlemlerde kullanılabileceği öngörülmektedir. Mide pH ortamına dayanıklı olduğu tespit edilen inülin tipi fruktan ES, *Lactocaseibacillus rhamnosus* ACS5, *Pediococcus acidilactici* 5008 ile *Saccharomyces cerevisiae* BD21 suşlarının gelişimini pozitif yönde etkilediği ve 24 saatlik fermantasyon sonrası canlılıkları sırasıyla; 9,58- 9,95- 9,62 log (kob/mL) olduğu gözlenmiştir. En yüksek prebiyotik skor aktivitesinin *Escherichia coli* 11229'ye karşı *Lactocaseibacillus rhamnosus* suşunda (PS 1,07) olduğu tespit edilmiştir. İnülin tipi fruktan ES düşük konsantrasyonlarda yüksek antioksidan aktivite göstermekle beraber konsantrasyonun artmasıyla antioksidan aktivite değerlerinde kademeli olarak artış gözlenmiştir. İnülin tipi fruktan ES'nin; minimum maliyetlerde yüksek verimde elde edilebilmesi, fiziksel özelliklerinin gıda uygulamaları ve tüketici sağlığı üzerindeki olumlu etkileri, potansiyel probiyotik suşlar tarafından fermente edilip patojen mikroorganizmalar tarafından düşük seviyede kullanılabilmesi, mide asit hidrolizine dayanıklı olması ve yüksek antioksidan süpürücü aktiviteye sahip olması *E. spectabilis* köklerinin endüstriyel uygulamalar için doğal, güvenilir bir kaynak olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Çiriş, İnülin-tipi fruktan, Prebiyotik, Antioksidan.

Mayıs, 2024; 127 sayfa

M.SC. THESIS

OPTIMIZATION OF PREBIOTIC EXTRACTION FROM *EREMURUS SPECTABILIS* (Serish) PLANT USING ULTRASONIC ASSISTED EXTRACTION METHOD AND INVESTIGATION OF PREBIOTIC AND BIOLOGICAL ACTIVITIES

Hakan YÜCEDAĞ

Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biotechnology and Molecular Biology

Supervisor: Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

ABSTRACT

The aim of the thesis study was to optimize the extraction of inulin-type fructan obtained from the roots and leaf parts of the Serish (*Eremurus spectabilis*) plant through ultrasonically assisted extraction, to characterize its physicochemical properties, and to determine its prebiotic and biological activities. The extraction of inulin type fructan was optimized according to the response surface methodology, with the optimum extraction taking place under the conditions of 60°C, 1:12 g/mL, for 20 minutes, resulting in a yield of 44.94%, and the extracts were lyophilized. The polymerization degree of inulin type fructan ES was found to be 57 ± 1 , with a water solubility value of $89.8 \pm 1.18\%$, water holding capacity of 6.71 ± 0.12 g/g, oil holding capacity of 4.80 ± 0.01 g/g, moisture content of $6.18 \pm 0.12\%$, and swelling capacity of 2.6 mL/g. It was determined that inulin type fructan ES contains 39.39% fructose and 60.61% glucose in its structure, with monomers bound in the beta configuration. Additionally, it is anticipated that the extracted inulin type fructan ES can be used in industrial processes up to 205°C. Inulin type fructan ES, which was found to be resistant to gastric pH conditions, positively influenced the growth of *Lactocaseibacillus rhamnosus* ACS5, *Pediococcus acidilactici* 5008, and *Saccharomyces cerevisiae* BD21 strains, with their viabilities observed to be 9.58-9.95-9.62 log (CFU/mL) after 24 hours of fermentation, respectively. The highest prebiotic score activity was found to be 1.07 for the *Lactocaseibacillus rhamnosus* strain against *Escherichia coli* 11229. Inulin type fructan ES showed high antioxidant activity at low concentrations, with a gradual increase in antioxidant activity values as the concentration increased. It is believed that the ability to obtain high yield at minimum costs, positive effects on food applications and consumer health, fermentation by potential probiotic strains and low utilization by pathogenic microorganisms, resistance to stomach acid hydrolysis, and high antioxidant scavenging activity make *E. spectabilis* roots a natural, reliable source for industrial applications.

Keywords: Serish, Inulin-type fructan, Prebiotic, Antioxidant.

May, 2024; 127 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Probiyotikler ve Prebiyotikler İçin Uluslararası Bilim Derneğine (ISAPP) göre prebiyotiklerin sınıflandırılması.	7
Şekil 2.2. İnülin moleküler yapısı	10
Şekil 3.1. Hasat edilen çiriş bitkisi.....	14
Şekil 3.2. Ultrason destekli ekstraksiyon sonrası ekstraktların görünümü.	21
Şekil 3.3. Christ alpha, 2-4 LDplus cihazında liyofilizasyon işleminin görüntüsü.	22
Şekil 3.4. Liyofilizasyon sonrası inülin tipi fruktan ES görüntüsü.....	22
Şekil 3.5. Fenol sülfirik asit eklenmiş fruktoz standart görüntüsü.	23
Şekil 3.6. Ekstre edilen çiriş ekstraktlarının fenol sülfirik asit eklenmiş görüntüsü.	24
Şekil 3.7. Total karbonhidrat tayini için hazırlanan fruktoz standart grafiği.....	24
Şekil 3.8. DNSA metodu uygulanmış fruktoz standart görüntüsü.	25
Şekil 3.9. DNSA metodu uygulanmış inülin tipi fruktan ES görüntüsü.....	26
Şekil 3.10. DNSA metodu için hazırlanan fruktoz standart grafiği.	26
Şekil 3.11. Demir indirgeme antioksidan gücü için Askorbik Asit (AA) kalibrasyon grafiği.....	38
Şekil 3.12. Total antioksidan kapasite için AA kalibrasyon grafiği.	39
Şekil 4.1. Sıcaklığın inülin tipi fruktan ES ekstraksiyonu üzerine etkisi.....	42
Şekil 4.2. Çözücü miktarının (mL) % ekstraksiyon verimi üzerine etkisi.....	44
Şekil 4.3. Sürenin % ekstraksiyon verimi üzerine etkisi.	45
Şekil 4.4. İkili faktörler arasındaki etkileşimlerin 3 boyutlu tepki yüzey grafikleri,.	48
Şekil 4.5. İkili faktörler arasındaki etkileşimlerin contour plot grafikleri	50
Şekil 4.6. İnülin tipi fruktan ES'nin FTIR kromatogramları.	60
Şekil 4.7. İnülin tipi fruktan ES'nin 1H-NMR spektrumu.	62
Şekil 4.8. İnülin tipi fruktan ES'ye ait 13C-NMR spektrumu	63
Şekil 4.9. İnülin tipi fruktan ES'nin TGA kromatografi.	65
Şekil 4.10. İnülin tipi fruktan ES'nin UV spektrumu.	65
Şekil 4.11. Fruktoz ve glukoz standartları için HPLC-RID kromatogramları.....	66
Şekil 4.12. İnülin tipi fruktan ES'nin taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri (A)1000X, (B) 2500X, (C) 5000X, (D) 10.000X, (E) 20.000X.	68
Şekil 4.13. <i>L. rhamnosus</i> ACS5 suşunun %2 oranında ES, glikoz, inülin ve glikozsuz-MRS besi ortamlarındaki fermentasyon sonrası canlılıklarının karşılaştırılması.	71
Şekil 4.14. <i>L. rhamnosus</i> ACS5 suşunun %2 ES-MRS besi ortamında fermentasyon sonrası 10^{-7} (A), 10^{-6} (B) ve 10^{-5} (C) dilisyonlarındaki kolonilerinin görüntüsü.	72
Şekil 4.15. <i>P. acidilactici</i> 5008 suşunun %2 oranında ES, glikoz, inülin ve glikozsuz-MRS besi ortamlarındaki fermentasyon sonrası canlılıkların karşılaştırılması.	74
Şekil 4.16. <i>P. acidilactici</i> 5008 suşunun %2 ES-MRS besi ortamında fermentasyon sonrası 10^{-5} (A), 10^{-6} (B) ve 10^{-7} (C) dilüsyonlarındaki kolonilerinin görüntüsü.	75

Şekil 4.17. <i>S. cerevisiae</i> BD21 suşunun %2 oranında ES, glikoz, inülin ve glikozsuz-YEPD besi ortamlarındaki fermentasyon sonrası canlılıklarının karşılaştırılması.....	77
Şekil 4.18. İnülin tipi fruktan ES'nin bağırsak patojenleri tarafından fermentasyon (24.saat) grafiği.....	81
Şekil 4.19. İnülin tipi fruktan ES'nin prebiyotik skor aktivitesi.....	85
Şekil 4.20. Ticari inülinin prebiyotik skor aktivitesi.	86
Şekil 4.21. İnülin tipi fruktan ES'nin farklı pH' lardaki mide sıvısında farklı inkübasyon sürelerindeki % hidrolizi.....	91
Şekil 4.22. Ticari inülinin farklı pH' lardaki mide sıvısında farklı inkübasyon sürelerindeki % hidrolizi.	92
Şekil 4.23. İnülin tipi fruktan ES ve askorbik asit DPPH radikal süpürücü aktivitesi.	95
Şekil 4.24. İnülin tipi fruktan ES'nin %ABTS ⁺ radikal süpürücü aktivitesi.	97
Şekil 4.25. İnülin tipi fruktan ES'nin hidroksil radikal süpürücü aktivitesi.	98
Şekil 4.26. İnülin tipi fruktan ES'nin süperoksit anyonu süpürücü aktivitesi.	100
Şekil 4.27. İnülin tipi fruktan ES'nin demir indirgeme antioksidan gücü.	102
Şekil 4.28. İnülin tipi fruktan ES'nin demir indirgeme antioksidan deneyi görüntüsü.....	102
Şekil 4.29. İnülin tipi fruktan ES'nin total antioksidan kapasitesi (askorbik asit eşleniği, µg).....	103
Şekil 4.30. İnülin tipi fruktan ES'nin total antioksidan kapasitesi deneyi görüntüsü.....	104

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>Eremurus spectabilis</i> 'in kimyasal bileşimi.....	4
Çizelge 2.2. Yaygın olarak kullanılan oligosakkarit kaynakları ve türleri.	8
Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan bakteriler ve suş kodları.....	15
Çizelge 3.2. Man Rogosa Sharpe (MRS) besiyerinin içeriği.....	16
Çizelge 3.3. Yeast Extract Pepton Dextrose (YEPD).	17
Çizelge 3.4. M9 minimal besiyeri.....	17
Çizelge 3.5. Box behnken tasarımında kullanılan değişkenler ve seviyeleri.....	19
Çizelge 3.6. Box Bhenken deney tasarımı.	20
Çizelge 4.1. İnülin tipi fruktan ES'nin farklı koşullardaekstraksiyon verimi.....	41
Çizelge 4.2. İnülin ekstraksiyonu için kuadratik modele göre oluşturulan ANOVA verileri.	46
Çizelge 4.3. Maksimum ekstraksiyon koşulları ve % ekstraksiyon verimi.	52
Çizelge 4.4. Minitab çoklu yanıt tahminine göre ekstraksiyon koşulları ve % ekstraksiyon verimi.....	52
Çizelge 4.5. Liyofilize inulin tipi fruktan ES'nin STK ve YTK değerleri.	56
Çizelge 4.6. İnülin tipi fruktan ES'nin karakteristik FTIR pikleri.....	60
Çizelge 4.7. İnülin tipi fruktan ES'nin yapısında bulunan monosakkaritlerin H1 protonlarına ait kimyasal kayma değerleri.....	61
Çizelge 4.8. İnülin tipi fruktan ES'nin yapısında bulunan monosakkaritlerin C13 protonlarına ait kimyasal kayma değerleri.	63
Çizelge 4.9. <i>L. rhamnosus</i> ACS5 suşunun %2 oranında inulin tipi fruktan ES, glikoz, inülin ve glikozsuz-MRS besi ortamlarındaki fermentasyon sonrası canlılıkları.	70
Çizelge 4.10. <i>P. acidilactici</i> 5008 suşunun %2 oranında inulin tipi fruktan ES, glikoz, inülin ve glikozsuz-MRS besi ortamlarındaki fermentasyon sonrası canlılıkları.....	73
Çizelge 4.11. <i>S. cerevisiae</i> BD21 suşunun %2 oranında ES, glikoz, inülin ve glikozsuz-YEPD besi ortamlarındaki fermentasyon sonrası canlılıkları.....	76
Çizelge 4.12. ES'nin bağırsak patojenleri tarafından fermentasyonu.....	80
Çizelge 4.13. Ticari inülin ve inülin tipi fruktan ES'nin prebiyotik skor aktivite değerleri.....	87
Çizelge 4.14. ES ve inülinin farklı pH' daki mide sıvısında farklı inkübasyon sürelerindeki % hidrolizi.	90
Çizelge 4.15. İnülin tipi fruktan ES ve askorbik asit DPPH radikal süpürücü aktivitesi.	95
Çizelge 4.16. İnülin tipi fruktan ES ve askorbik asidin ABTS radikal süpürücü aktivitesi.	96
Çizelge 4.17. İnülin tipi fruktan ES'nin hidroksil radikal süpürücü aktivitesi.	98
Çizelge 4.18. İnülin tipi fruktan ES'nin süperoksit anyonu süpürücü aktivitesi.	100
Çizelge 4.19. İnülin tipi fruktan ES'nin ferrik indirgeyici antioksidan güç sonuçları (ortalama±standart sapma).....	101
Çizelge 4.20. İnülin tipi fruktan ES'nin total antioksidan süpürücü aktivitesi (µg).	103

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	Askorbik Asit
AAE	Askorbik Asit Eşdeğeri
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
atm	Atmosferik Basınç
a/h	Alan / hacim
dk	Dakika
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
Eş.	Eşitlik
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
FOS	Fruktooligosakkaritler
g	Gram
GI	Gastrointestinal
GOS	Galaktooligosakkaritler
GRAS	Genel Olarak Güvenli
HCl	Hidroklorik Asit
IMO	İzomaltooligosakkaritler
kob	Koloni Oluşturan Birim
L	Litre
LAB	Laktik Asit Bakterileri
log	Logaritma
mL	Mililitre
MRS	Man Rogosa ve Sharpe
Mw	Moleküler ağırlık
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
OD	Optik Dansite
PD	Polimerizasyon derecesi
pH	Asitlik Bazlık Birimi
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SCFA	Kısa Zincirli Yağ Asitleri
SF	Serum fizyolojik
sp.	Species (türleri)
TCA	Trikloroasetik Asit
XOS	Ksilooligosakkaritler
YEPD	Yeast Extract Pepton Dextrose
K₂S₂O₈	Potasyum persülfat
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
H₂SO₄	Sülfürik Asit
%	Yüzde
°C	Derece santigrat
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
δ	ppm

1. GİRİŞ

Günümüzde tüketicilerin doğal gıda katkı maddeleri barındıran, güvenilir ve sağlık yararı olan ürünlere talebi artmaktadır. Birçok gıda ürünü içeriğinde tuz, şeker, doymuş yağ ve katkı maddeleri açısından zengin olması, lif ve biyoaktif bileşen açısından zayıf olmasından dolayı sağlıklı beslenme üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır. Bu artan talepler, özellikle diyet lifi ve polifenoller gibi biyoaktif bileşikler açısından zengin yeni fonksiyonel gıda bileşenlerinin geliştirilmesi üzerinde araştırmacıların ilgisini çekmektedir.

Son dönemlerde, bitkilerden elde edilen prebiyotik bileşenlerin gıda katkı maddesi ve terapötik ajan olarak kullanımı üzerine yapılan çalışmalar artmaktadır. Prebiyotikler, sindirilemeyen bileşiklerdir ve bağırsak mikrobiyotasındaki yararlı mikroorganizmaların büyümesini veya biyoaktivitesini seçici olarak uyararak tüketici üzerinde çeşitli fizyolojik etkilere sahip olabilmektedirler. Gıda ürünlerinin prebiyotik oligosakkaritler ile zenginleştirilmesi, tüketicide sağlığı teşvik edici etki, gıda kalite ve güvenliği dahil olmak üzere birçok önemli potansiyele sahiptir.

Bazı bitki prebiyotiklerinin biyolojik aktiviteleri son zamanlarda detaylı bir şekilde incelenmiş olsa da bu bileşiklerin insan sağlığına faydaları olan nutrasötikler olarak kullanımı henüz sınırlıdır. Bitki prebiyotiklerine olan ilgi, bağırsak mikrobiyota kompozisyonu üzerindeki olumlu modülatör etkileri nedeniyle artmaktadır. Bu bağlamda, Çiriş (*Eremurus spectabilis*) bitkisinden elde edilen prebiyotik özelliklere sahip inülin tipi fruktanları izole edilerek saflaştırılması, insan tüketimi için faydalı gıda bileşenleri olarak belirlenmesi ve bu bileşenlerin biyolojik özelliklerinin araştırılması, tez çalışmasının odak noktasını oluşturmaktadır.

Prebiyotik karbonhidrat olan fruktooligosakkaritler (FOS) bitki köklerinde yüksek miktarda bulunmaktadır. FOS'ların elde edilmesinde geleneksel ekstraksiyon, enzim destekli ekstraksiyon ve kimyasal ekstraksiyon yöntemi gibi kullanılan çeşitli ekstraksiyon yöntemleri birtakım kısıtlamalara sahiptir. Araştırmacılar bu kısıtlamaları minimuma indirmek için son çalışmalarda Ultrason Destekli Ekstraksiyon metodunu (UDE) kullanmaktadır. Bu tez çalışmasında Türkiye Kayseri Yeşilhisar bölgesinden toplanan *Eremurus spectabilis* bitkisinin kök ile yaprak

kısımları ultrason destekli prebiyotik ekstraksiyonu yöntemi kullanılarak minimum maliyetle maksimum prebiyotik verimini elde ederek, prebiyotik ve biyolojik aktivitelerinin tespit edilmesi hedeflenmiştir.

Tez çalışması kapsamında *E. spectabilis* bitki kök ve/veya yaprak kısımlarından ultrason destekli ekstraksiyon aracılığıyla elde edilen ve liyofilize hale getirilen inülin tipi fruktan ES'lerin

✓ Bitkilerden elde edilen prebiyotiklerin, prebiyotik ya da biyolojik ajan olarak kullanılabilmesi için yüksek saflıkta ve verimde elde edilmesi önemlidir. Prebiyotik ekstraksiyonunda kullanılan geleneksel ve kimyasal yöntemler bulunmakla birlikte tercih edilen yöntemde kullanılan çözücü konsantrasyonu, süre ve enerjiye bağlı olarak elde edilen verim, aktivite ve maliyet değişiklik göstermektedir. Minimum maliyet ve kısa zamanda yüksek prebiyotik ekstraksiyon verimi elde etmek için ultrason destekli ekstraksiyon yönteminin tepki yüzey metodolojisi ile optimizasyonu,

✓ İnülin tipi fruktan ES'nin yapısal özelliklerinin Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopik (FT-IR), ^1H ve ^{13}C NMR analizleri, Termogravimetrik analiz (TGA), Ultraviyole görünür (UV-VIS) analizi, Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi ve Moleküler ağırlık analizi ile karakterize edilmesi,

✓ Gıda uygulamalarında kullanılacak prebiyotik bileşenlerin hidrasyon ve fiziksel özellikleri gıda kalitesini, raf ömrünü, tadını ve rengini etkilemektedir. Bu nedenle inülin tipi fruktan ES tozlarının suda çözünürlük değeri, nem oranı, şişme kapasitesi, su ve yağ tutma kapasitelerinin tespit edilmesi,

✓ Prebiyotik bileşikler bağırsak mikrobiotasında bulunan yararlı mikroorganizmaların gelişimlerini desteklerken, patojen mikroorganizmalar tarafından kullanılamamaları gerekmektedir. Bu nedenle *E. spectabilis*'den elde edilen inülin tipi fruktan ES'lerin bağırsak biotasında bulunan mikroorganizmalar tarafından fermente edilebilirliğinin belirlenmesi,

✓ İnülin tipi fruktan ES'nin bağırsakta bulunan yararlı mikroorganizmalar tarafından kullanılabilmeleri için öncelikle mide asidine dirençli olup bağırsağa ulaşmaları gerekmektedir. Bu nedenle değişen pH ve sürelerde inülin tipi fruktan ES'nin % hidroliz değerlerinin araştırılması,

✓ Prebiyotikler bağırsak mikrobiotasında bulunan yararlı mikroorganizmaların gelişiminin düzenlenmesine katkı sağlamaktadır. Bu nedenle inülin tipi fruktanların test edilen potansiyel probiyotik mikroorganizmaların *Lactocaseibacillus rhamnosus* ACS5, *Pediococcus acidilactici* 5008 ve *Saccharomyces cerevisiae* BD21) gelişimini düzenleyici etkilerinin tespit edilmesi,

✓ Prebiyotiklerin probiyotik ve bağırsak patojenleri tarafından kullanılabilirliğinin belirlenmesi için prebiyotik indeks ve aktivite skor değeri önemlidir. İnülin tipi fruktan ES'lerin kontrol grubu ile karşılaştırılarak probiyotik ve bağırsak patojenleri (*Esheria coli* ATCC 11229, *Esheria coli* ATCC 35218 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) tarafından fermentasyon özelliklerinin belirlenmesi.

✓ Serbest radikaller, hücre hasarına, yaşlanmaya ve kansere yol açabilen moleküllerdir. Antioksidan özellik gösteren prebiyotik bileşikler, serbest radikalleri nötralize ederek hücreleri korur ve sağlıklı hücre fonksiyonunu destekler. Bu nedenle, inülin tipi fruktan ES'lerin antioksidan özellikleri; DPPH (2,2,-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürücü aktivite, ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbentiazolin-6-sülfonik asit) radikal süpürücü aktivite, hidroksil radikalleri süpürücü aktivitesi, süperoksit anyonu süpürücü aktivitesi, demir indirgeme antioksidan gücü (Ferric Reducing Antioxidant Power-FRAP), total antioksidan kapasite analizi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Çiriş Bitkisi

Çiriş olarak da bilinen *Eremurus spectabilis*, *Liliaceae* familyasına aittir. Yapısında önemli miktarda protein, diyet lifi ve karbonhidratı barındıran çiriş vitamin ve mineral içeriği açısından da zengin bir bitkidir. Çiriş (*E. spectabilis*) lezzetli tadı ve tedavi edici etkisi nedeniyle yüzyıllardır gıda ve geleneksel tedavi yöntemlerinde kullanılmaktadır. *E. spectabilis*, kozmopolit dağılıma sahip yenilebilir tıbbi bir bitki türüdür. Farmakolojik araştırmalar sonucu, antimikrobiyal, antioksidan aktivite ve antitümöral etki gibi biyolojik fonksiyonlara sahip olduğu kanıtlanmıştır (Karaoğlu vd., 2018; Tuzcu vd., 2017). *E. spectabilis*, coğrafi olarak İran, Batı Pakistan, Afganistan, Irak, Türkiye, Filistin, Lübnan, Suriye ve Kafkasya'yı kapsayan Güney Asya ile Orta Asya bölgesinde dağılım göstermektedir (Cınar vd., 2017). Yüksek rakım ve soğuk iklim koşullarında yetişen *E. spectabilis* bitkisinin soğuk gibi stres koşulları altında köklerinin yüksek düzeyde fruktan biriktirdiği bildirilmiştir (Dashti vd., 2005; Khorasani vd., 2006; Rubin, 2002). Kökleri geleneksel olarak sarılık, karaciğer bozuklukları, mide tahrişi, sivilce ve kemik kırıklarını tedavi etmek için kullanılmıştır. Ayrıca endüstriyel uygulamalarda yapıştırıcı olarak da kullanılmaktadır (Brickell, 1989; Crockett, 1971).

E. spectabilis; fenolik, flavonoidler, hidroksibenzoik asit türevleri, organik asitler gibi antioksidan bileşikler bakımından zengindir (Tegin vd., 2024). Mineral içeriği açısından da zengin bir besin kaynağı olan *E. spectabilis* yapısında potasyum (K), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), demir (Fe), ve bakır (Cu) içermektedir. *E. spectabilis*'in kimyasal içeriği Çizelge 2.1'de verilmiştir (Akdag ve Tuncer, 2020).

Çizelge 2.1. *Eremurus spectabilis*'in kimyasal bileşimi.

Bileşen	Miktar (%)
Su içeriği	89,13
Kül	0,87
Protein	1,20

2.2 Probiyotik

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü ile Dünya Sağlık Örgütü, probiyotiklerin konakçıya sağlık yararları sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlamıştır (FAO/WHO, 2006). Bu sağlık yararları düzenli ve uygun miktarlarda tüketildiğinde ortaya çıkmaktadır. Probiyotikler “Genellikle Güvenli Olarak Kabul Edilen (GRAS)” kapsamına girer ve istenmeyen bakterilerin neden olabileceği mikrobiyal enfeksiyonları önlemede doğal destek sunmaktadırlar (Barclay vd., 2016).

Probiyotikler ve Prebiyotikler Derneği (ISAPP)’ın 2018 yılında gerçekleştirdikleri panele göre; bir mikroorganizmanın probiyotik olarak tanımlanabilmesi için minimum 7 kriteri sağlaması gerekmektedir (Binda vd., 2020).

- Uygulanan mikroorganizma canlı formda olmalıdır.
- Konakçı üzerinde olumlu sağlık etkileri olmalıdır.
- Mikroorganizma suş seviyesine kadar ayrıntılı tanımlama yapılmalıdır.
- Tüketimi güvenli olmalıdır.
- Depolama ve tüketimi esnasında canlı kalabilmelidir.
- Midenin asidik ortamına ve ince bağırsakta safra asitlerinin varlığında hayatta kalabilmelidir.
- Konakçının bağırsak mikrobiyotası ile etkileşime girerek olumlu sağlık yararı sağlamalıdır.

Probiyotikler için önerilen kullanım miktarı, immünolojik, nörolojik ve endokrinolojik etkileri suşa özgü olduğundan dolayı kullanım amacına göre değişiklik göstermektedir (Hill vd., 2014). Probiyotik mikroorganizmaların kullanım amaçlarının başında gastrointestinal sistemdeki bozuklukları düzenlemek yer almaktadır (Dodoo vd., 2017).

Lactobacillus sp. ve *Bifidobacterium* sp. probiyotik olarak en sık kullanılan mikroorganizmalardır; bulaşıcı hastalıklara karşı direncin artması, ishal süresinin kısalması ve bağırsak sağlığının iyileşmesi gibi potansiyel faydaları kanıtlanmıştır (Huang vd., 2021; Liao ve Nyachoti, 2017). Bu faydalar, probiyotiklerin bağırsak

mikrobiyotasını normalleştirme ve bağışıklık fonksiyonunu iyileştirme yeteneklerine atfedilmektedir (Fontana vd., 2013).

2.3 Prebiyotik

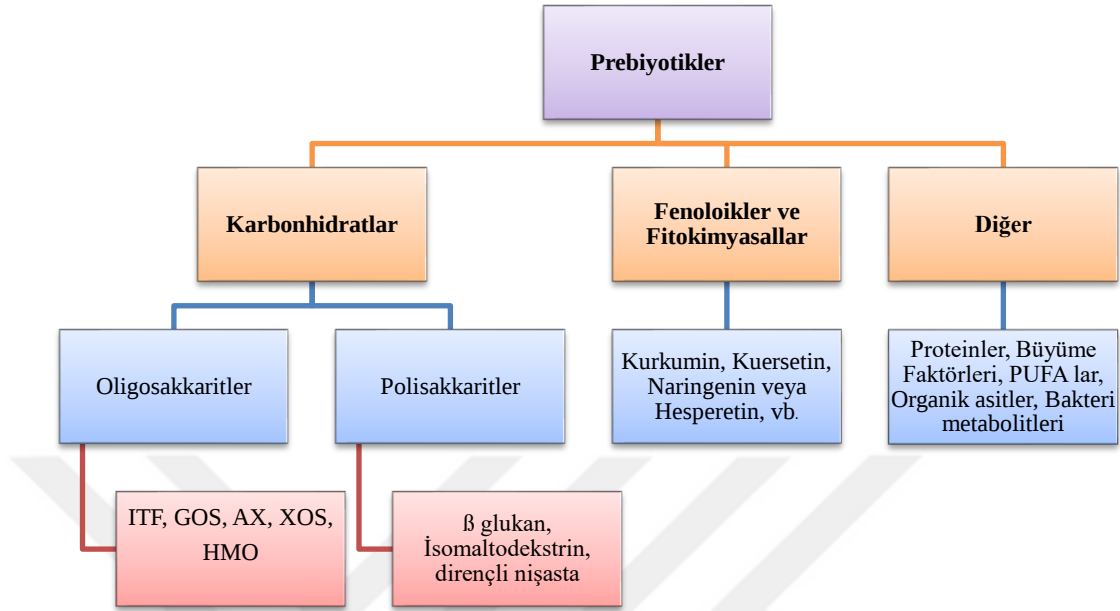
Uluslararası Probiyotikler ve Prebiyotikler Bilimsel Birliği (ISAPP) tarafından önerilen en güncel prebiyotik tanımı, "sağlığa fayda sağlayan konakçı mikroorganizmalar tarafından seçici olarak kullanılan substrattır" (Gibson vd., 2017). Bu tanım, prebiyotik kavramını genişleterek karbonhidrat olmayan maddeleri de dahil etmektedir (bitki polifenoller ve bakteri kaynaklı ekzopolisakkaritler). Prebiyotiklerin monomerik bileşenlerinde β -1,4 glikozidik bağları bulunur. Bu bağlar, prebiyotik liflerin yapı taşlarını oluşturan glikoz moleküllerini bir araya getirmektedir (Davani-Davari vd., 2019; Hernández-Hernández vd., 2012). İnsan sindirim enzimleri, probiyotik bakterilerin aksine prebiyotiklerin yapısında bulunan α - ve β -glikozidik bağları parçalayabilecek glikozidaz ve hidrolaz enzimlerini içermediğinden prebiyotik bileşenleri sindirilemezler (Rawi vd., 2020; Sam-on vd., 2023). Bir bileşiğin prebiyotik olarak sınıflandırılabilmesi için;

- i. Asidik mide pH koşullarına dayanıklı olmalı.
- ii. Sindirim enzimleri tarafından hidrolize uğramamalı ve gastrointestinal kanallarda emilmemeli.
- iii. Bağırsak mikrobiyotası ile etkileşime geçerek fermentasyon ve büyümenin seçici uyarılması aracılığıyla konakçının sağlığı ile ilişkili potansiyel olarak faydalı bağırsak bakterilerinin aktivitesini artırmalıdır (Davani-Davari vd., 2019; Gibson, 2004; Xu vd., 2009).

2.3.1 Prebiyotiklerin sınıflandırılması ve kaynakları

Prebiyotik bileşenler, içerdikleri monosakkaritlerin dizilimine, türüne ve miktarına göre değişiklik göstermektedir (Angelin ve Kavitha, 2020; King vd., 2019). Potansiyel sağlık faydaları kanıtlanmış olan prebiyotik oligosakkaritler arasında; inülin, galaktooligosakkaritler, fruktooligosakkaritler ve laktuloz bulunur (Bamigbade vd., 2022). Rafinoz, neoagaro-oligosakkaritler ve epilaktoz araştırılma aşamasında olan diğer oligosakkaritler arasındadır (Cardoso vd., 2021). Prebiyotik oligosakkaritler sınıflandırılırken, polimerizasyon derecesi (DP) ve içerdiği

oligosakkaritlerin monomerik bileşimleri gibi spesifik özelliklere dayanmaktadır (Mano vd., 2018). Prebiyotikler üç grupta incelebilir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Probiyotikler ve Prebiyotikler İçin Uluslararası Bilim Derneğine (ISAPP) göre prebiyotiklerin sınıflandırılması. ITF: inülin tipi fruktanlar; GOS: Galaktooligosakkaritler; AX: arabinoksilanlar; XOS: ksilooligosakkaritler; HMO: insan sütü oligosakkaritler; PUFA: çoklu doymamış yağ asitleri (Davani-Davari vd., 2019; Kocot vd., 2022’ den uyarlanmıştır).

Fonksiyonel oligosakkaritler; süt, şeker kamışı, soya fasulyesi, bal, soğan, pırasa, hindiba kökü gibi meyve ve sebzelerde değişen konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Son zamanlarda özellikle *Lactiplantibacillus plantarum* ve *Lactocaseibacillus paracasei* gibi suşlardan elde edilen EPS’lerin de prebiyotik bileşen olarak kullanılabildikleri bildirilmiştir (Lee vd., 2022; Yu vd., 2023). Sindirilemeyen oligosakkaritlerden olan fruktooligosakkaritler (FOS) ve galaktooligosakkaritler (GOS), günümüzde yaygın olarak kullanılan prebiyotikleridir (Zhao vd., 2017). Sindirilmeyen oligosakkaritler dışında insan sütü oligosakkaritleri (HMO’lar), polifenoller ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA’lar) gibi diğer bileşenler de prebiyotik kriterlerini karşılamaktadır (Gibson vd., 2017). Yaygın olarak kullanılan oligosakkarit türleri ve kaynakları Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Yaygın olarak kullanılan oligosakkarit kaynakları ve türleri.

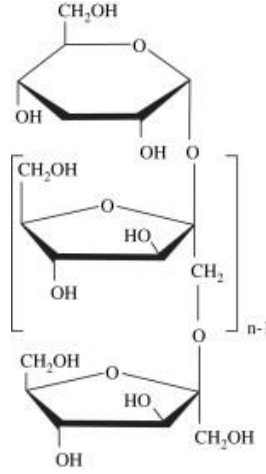
Oligosakkaritler	Kaynaklar	Referanslar
İzomaltooligosakkarit (IMO)	<i>Bacillus circulans</i> T-3040	(Funane vd., 2007)
Soya fasulyesi oligosakkaritleri (SMO)	Soya fasulyesi tohumu	(Chen vd., 2000)
Fruktooligosakkaritler (FOS)	<i>Aspergillus</i> , <i>fusarium</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Gluconacetobacter</i> ve hindiba kökü	(Okada vd., 2010; Sánchez vd., 2008)
Mannan oligosakkaritler (MOS)	Maya hücre duvarı parçacıkları	(Dimitroglou vd., 2010; Eseceli vd., 2010)
Glukooligosakkaritler (GOS)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-1299	(Iliev vd., 2008)
Gentiooligosakkaritler	<i>Penicillium multicolor</i>	(Fujimoto vd., 2009)
Laktozükrat	<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	(Roberfroid ve Buddington, 2007)
Arabino oligosakkaritler	Şeker pancarı arabinanı	(T. Li vd., 2010)
Gentiooligosakkaritler (GeOS)	Nişasta sindirimi yoluyla	(Côté, 2009)
β-Glukan oligosakkarit	Yulaf bazlı diyet ürünleri	(Mitsou vd., 2009)
İnsan sütü oligosakkaritleri (HMO)	İnsan anne sütü	(Quigley, 2010)

Çizelge 2.2. (devam) Yaygın olarak kullanılan oligosakkarit kaynakları ve türleri.

Ksilooligosakkaritler (XOS)	<i>Aspergillus</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Streptomyces</i> , buğday kepeği ve saman, akça ağaç, arpa kabukları, bira harcanmış tahıllar, badem kabukları, bambu, mısır koçanı	(Katapodis ve Christakopoulos, 2008; Madhukumar ve Muralikrishna, 2010; Moure vd., 2006)
Kitosan oligosakkaritler (COS)	Kitosanın depolimerize ürünleri	(H.-T. Liu vd., 2010)

2.4 İnülin

Bitki kaynaklı doğal bir polisakkarit olan inulin genellikle bitki köklerinde depolanır. İnülin tekrar eden fruktoz birimlerinin ucuna bağlı bir adet glukoz molekülü içermektedir (Şekil 2.2) (Cui ve Roberts, 2009). Moleküler yapısı genellikle $(C_6H_{10}O_5)_n$ şeklinde gösterilir, burada 'n' inülinin polimerizasyon derecesini temsil etmektedir. Polimerizasyon derecesi ve fruktan uzunluğu bitkinin hasat zamanına, depolama süresine ve ekstre edildiği yöntemle ilgili olarak 2 ila 60 arasında değişiklik göstermektedir (Judprasong vd., 2011; Stanley ve Stephen, 2007). Gıda ve ilaç endüstrilerinde geniş bir uygulama alanına sahip olan inülin gıda ürünlerinde çözünebilir diyet lifi, yağ veya şeker ikamesi ve stabilizatör olarak kullanılmaktadır (Barclay vd., 2016).



Şekil 2.2. İnülin moleküler yapısı (Cui ve Roberts, 2009).

2.4.1 Fruktooligosakkaritler (FOS)

Fruktooligosakkaritler genel olarak fruktoz birimlerinden oluşur ve ucunda bir glukoz kalıntısı içermektedir. Fruktanlar bazı bakteri ve mantarların yapısında bulunmakla beraber çiçekli bitkilerin yaklaşık %15’inde bulundukları bildirilmiştir (Sorour vd., 2017). Bitkiler genellikle aşırı tuzlu ve soğuk iklim koşullarında fruktanları gövdelerinde ve köklerinde depolanmaktadır (Benkeblia, 2022; del Pozo vd., 2019). Bitkisel kaynaklı FOS’lar 10 ila 200 fruktozil birimi arasında, polimerizasyon dereceleri ise 2 ila 10 arası değişmektedir (Kawakami ve Yoshida, 2005). FOS’lar içerdikleri zincir uzunlukları ve bağlara göre üç sınıfta incelenebilir;

1. **Levan tipi fruktanlar:** β -(2→6) bağlantılı fruktoz birimlerinden oluşmaktadır. Monokot bitki türlerinde yaygın olarak bulunmaktadır (Eggleston vd., 2022).
2. **Neo serisi fruktanlar:** (Neo-FOS): Glikoz kalıntısının C1 ve C6 pozisyonlarında β -(2→1) zincir birimlerinden oluşan fruktan tipidir. Enzimatik işlemler aracılığıyla sentezlenmektedir (Zaninette vd., 2019).
3. **İnulin tipi fruktanlar:** β -(2→1) bağlantılı fruktoz birimlerinden oluşmaktadır. Çiçekli bitkilerin bir sınıfı olan dikot bitkiler çoğunlukla inülin tipi fruktan içermektedir (Jackson vd., 2023; Z. Tang vd., 2023).

2.4.2 FOS'un fonksiyonel özellikleri ve gıda sanayisinde kullanımı

FOS, sakkarozla kıyasla düşük bir tatlılık seviyesine sahiptir, yaklaşık 0-3 kcal/g enerji içermektedir. Bu özelliği ile yüksek tatlılık sebebiyle sakkarozun kullanımının sınırlı olduğu çeşitli gıda ürünlerinin yerine kullanılabilir. FOS, sindirim enzimleri tarafından hidrolize edilemediği ve vücut tarafından enerji kaynağı olarak kullanılmadığı için kalorisizdir (Kumar vd., 2018). Fruktooligosakkaritler tüketimleri sonucunda mide ve ince bağırsaktaki enzimler tarafından sindirilemediğinden kolona bozulmadan ulaşabilmektedir. Kolona ulaşan fruktooligosakkaritler kısa zincirli yağ asitleri üreten kolonik bakteriler tarafından anaerobik fermentasyona uğrayarak fermentasyon sonrası oluşan laktat, asetat, bütirat ve propiyonat olarak adlandırılan kısa zincirli yağ asitleri (SCFA) bağırsak kolonundaki patojen mikroorganizmanın üremesini baskılamaktadır (Maryati vd., 2021). SCFA'lardaki artış kolonik ortamın ve dışkının pH'sında azalmaya, dolayısıyla patojen bakterilerin enzimatik aktivitelerinde azalmaya sebep olmaktadır (O'Bryan vd., 2013; Sangeetha vd., 2005). Yapılan insan ve hayvan deneyleri yüksek seviyedeki laktat ve SCFA konsantrasyonunun lokal bağışıklık sistemi efektörlerini uyardığını, magnezyum emilimini artırdığını ve kolon tümörlerinin oluşma sıklıklarının azalttığını göstermiştir (Bornet vd., 2002; Rivera-Huerta vd., 2017). İnülin tipi fruktooligosakkaritlerin düzenli olarak kullanılmasının insan sağlığı üzerindeki diğer olumlu etkilerinden bazıları ise;

- i. Fermentasyon sonucu bütirat ve propiyonat konsantrasyonunu artırarak kolon kanserine karşı koruma (Munjel vd., 2009; Scheppach ve Weiler, 2004),
- ii. Trigliserit ve kolesterol düzeylerini azaltarak kardiyometabolik riski azaltma (Lopes vd., 2017),
- iii. Kolonik pH'ın düşmesi, kolon bariyerinin fonksiyonunun desteklenmesi, mukus üretiminin iyileştirilmesi, SCFA'ların üretilmesi ve sitokin üretiminin uyarılması aracılığıyla immünomodülatör etki göstermesi (Korzenik ve Podolsky, 2006; Saad vd., 2013),
- iv. Glisemik kontrole destek olarak obezite ve diyabetin iyileştirilmesi (Tulp vd., 2022) olarak bildirilmiştir.

2.4.3 Bitkisel prebiyotiklerin elde edilmesi

Çeşitli bitki kökenli prebiyotiklerin biyolojik özelliklerine ilişkin çalışmalar artmış ve tüketici sağlığı için olumlu uygulamalara ilişkin bilgi literatüre sunulmuştur. Ayrıca günümüzde tüketicilerin doğal, güvenli, yararlı ve sağlığı geliştirici özelliklere sahip gıda ürünlerine yönelik talepleri de artmıştır. Artan talepler özellikle diyet lifi ve polifenoller olmak üzere biyoaktif bileşikler açısından zengin yeni fonksiyonel gıda bileşenlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalara araştırmacıların ilgisini yönlendirmiştir. Son zamanlarda, bazı bitki kaynaklı prebiyotiklerinin biyolojik etkinlikleri detaylı şekilde belirlenmiştir. Ancak, bu maddelerin insan sağlığı ve refahına olan faydalarını içeren nutrasötik olarak kullanımı henüz kısıtlıdır (Gómez-García vd., 2022).

Bitkisel kaynaklı prebiyotik ekstraksiyonunda, yüksek verim ve aktiviteye sahip yöntemi tespit etmek en temel basamaktır (Mirzadeh vd., 2021). Son zamanlarda, araştırmacıların dikkati bitkilerden fruktan ekstraksiyonuna odaklanmış ve fruktan ekstraksiyonu için aralarında sıcak su ekstraksiyonun da bulunduğu çeşitli yöntemler (kritik altı su ekstraksiyonu, kimyasal hidroliz) önerilmiştir (Hurtado-Romero vd., 2020). Ayrıca bitkisel prebiyotikler (inülin tipi fruktan) enzim destekli ekstraksiyon (EAE), su ekstraksiyonu, mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE), ultrason destekli ekstraksiyon, geleneksel ekstraksiyon vb. yöntemler aracılığıyla da elde edilebilirler (Hurtado-Romero vd., 2020; Machado vd., 2015; Wichienchot vd., 2010). Fruktanların ekstraksiyonunda, fruktanların çöktürülmesi için etanol kullanımının endüstriyel ölçekte pahalı ve uygunsuz olduğu düşünülmektedir (Lingyun vd., 2007). Etanolün ekstraksiyon sırasında kullanılması; düşük seçicilik, düşük verim ve toksik etki yaratabilmektedir (Streimikyte vd., 2022). Sıcak su ekstraksiyonu işlemi yüksek enerji tüketimi gerektirir, kimyasal hidroliz ile enzim destekli ekstraksiyon da yüksek maliyet gerektirmektedir ve işlem süreleri uzun olarak değerlendirilmiştir (Das vd., 2022; Streimikyte vd., 2022). Ekstraksiyon yöntemlerindeki bu dezavantajlar, ultrason destekli ekstraksiyonda olduğu gibi enerji ve zaman tüketiminde azalmaya yol açan alternatif ekstraksiyon yöntemlerine araştırmacıların ilgisini artırmıştır (Gómez-García vd., 2022). Ultrason destekli ekstraksiyon, bitki dokularını etkili bir şekilde parçalamak için ultrasonik dalgalar sonucu oluşan kavitasyon kabarcıklarını kullanarak biyoaktif bileşenlerin salınımını artırmaktadır (Rahim vd., 2022). Bu

yöntem, çevre dostu olan su gibi çözücülerin kullanımına uyumlu olup toksik etki göstermemektedir. Ayrıca, ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi daha kısa ekstraksiyon süreleri, yüksek ekstraksiyon verimleri ve düşük çözücü tüketimi sağlayarak, doğal kaynaklardan değerli prebiyotiklerin düşük maliyetle çıkarılmasında etkili yöntem olarak bildirilmiştir (Jambrak vd., 2022; S. Zheng vd., 2021).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada kullanılan prebiyotik kaynağı

Tez çalışmasında kullanılan Çiriş bitkisi, Kayseri Çevre, Şehircilik ve İklim Değişikliği İl Müdürlüğünden alınan izinle (E-27684489-250-6506471 sayılı yazı) Türkiye'nin Kayseri-Yeşilhisar bölgesinden (N 38°14'45.4208'' E 35°04'35.0364'') 30 Mayıs-15 Haziran 2023'te vejetasyon döneminde toplanmıştır (Şekil 3.1). 1428 m'den toplanan *Eremurus spectabilis* (Çiriş) bitkisi toprak altı (kök) ile toprak üstü kısmı olmak üzere iki parçaya ayrılarak toprak ve kirlilikten arındırmak için distile su ile yıkanmıştır. Temizlenen bitki bölümleri kurutma kağıtlarına alınarak oda sıcaklığında kurutulmuş ve kurutulan bitki bölümleri ayrı ayrı blender (Waring, commercial blender) ile toz haline getirilerek 4°C'de muhafaza edilmiştir



Şekil 3.1. Hasat edilen çiriş bitkisi.

3.1.2 Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri

Eremurus spectabilis köklerinden izole edilen inülin tipi fruktanın, prebiyotik aktivite ve skor değerlerinin tespitinde kullanılan test bakterileri Aksaray Üniveristesi Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesinde bulunan Mikrobiyoloji Laboratuvarı Stok Kültür Koleksiyonu'ndan alınmıştır. Tez çalışmasında kullanılan bakteriler ve suş kodları Çizelge 3.1'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan bakteriler ve suş kodları.

Suşlar	Kodları
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	ACS5
<i>Pediococcus acidilactici</i>	5008
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BD21
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11229
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218

3.1.3 Bakterilerin aktifleştirilmesi ve geliştirilme ortamları

Tez çalışmasında test bakterisi olarak kullanılan bakterilerin geliştirilmesi ve aktifleştirilmesinde; *E. coli* ATCC 11229, *E. coli* ATCC 35218, *E. faecalis* ATCC 29212 bakterileri için Nutrient Broth (NB, Merck) besiyeri, *L. rhamnosus* ACS5, *P. acidilactici* 5008 bakterileri için Man Rogosa ve Sharpe (MRS) besiyeri veya MRS Agar besi ortamı ve *S. cerevisiae* BD21 mayası için Yeast Extract Pepton Dextrose (YEPD) kullanılmıştır.

Prebiyotik skor ve aktivite çalışmalarında kullanılan mikroorganizmaların aktifleştirilmesi, MRS Broth ve NB Broth besiyerlerinde %2 oranında bakteri ekimleri yapılmış ve 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. *S. cerevisiae* BD21 mayası için YEPD besiyerinde %2 oranında ekim yapılmış ve 30°C de inkübasyona bırakılmıştır. Geliştirilen kültürler, en az iki kez aktifleştirildikten sonra çalışmalarda kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan bakterilerin saflıkları Gram boyama yapılarak mikroskopik olarak incelenerek kontrol edilmiştir.

3.1.4 Çalışmalarda kullanılan besiyerler

L. rhamnosus ACS5 ve *P. acidilactici* 5008 bakterilerinin geliştirilmesinde Çizelge 3.2.'de içeriği belirtilen Man Rogosa ve Sharpe (MRS) besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri içerisindeki bileşenler tartılarak üzeri 1000 mL distile suya tamamlanmış ve manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen homojen hale getirilmiştir. Besiyerlerinin pH'ı 1 M HCl ve 1 M NaOH kullanılarak $6,8 \pm 0,2$ ayarlanarak otoklavda 121°C 'de 1 atm'de 15 dk steril edilerek çalışmalarda kullanılmıştır. MRS katı besiyeri hazırlamak için %1,5 oranında agar ilave edilmiştir. MRS besiyeri hazırlanırken %1'lik $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ solüsyonundan 20 mL ve %1'lik $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ solüsyonundan 5 mL eklenmiştir (de Man vd., 1960).

Çizelge 3.2. Man Rogosa Sharpe (MRS) besiyerinin içeriği.

Bileşenler	Miktar (g/L)
Pepton	10
Et ekstraktı	8
Maya ekstraktı	4
Glikoz	20
Tween 80	1
Dipotasyum hidrojen ortofosfat	2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
Amonyum sitrat	2

S. cerevisiae BD21 mayasının geliştirilmesinde içeriği Çizelge 3.3'te verilen YEPD besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri içerisindeki bileşenler tartılarak üzerlerine 1000 mL distile su eklenmiş ve manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen homojen hale getirilmiştir. Besiyerinin pH'ı 1 M HCL ve 1 M NaOH kullanılarak $6,8 \pm 0,2$ ayarlanarak otoklavda 121°C 'de 15 dk steril edilerek çalışmalarda kullanılmıştır. YEPD katı besiyeri hazırlamak için %1,5 oranında agar ilave edilmiştir.

Çizelge 3.3. Yeast Extract Pepton Dextrose (YEPD).

Bileşenler	Miktar (g/L)
Pepton	20
Maya ekstraktı	10
Dekstroz	20

İnülin tipi fruktan ES'nin bağırsak patojen mikroorganizmaları tarafından fermente edilmesini belirlemek için yapılan çalışmalarda patojen mikroorganizmaların gelişmesi için Çizelge 3.4.'de içeriği belirtilen M9 minimal besiyeri kullanılmıştır (Song ve Wei, 2010). Çizelgedeki maddeler belirtilen miktarlarda tartılıp, bir miktar distile su ile manyetik karıştırıcıda homojen hale gelinceye kadar karıştırılmış ve son hacim 1000 mL olmak üzere pH $6,2 \pm 0,02$ 'ye ayarlanmıştır. Besiyeri otoklavda 121°C 'de 15 dk steril edilerek hazırlanmıştır.

Çizelge 3.4. M9 minimal besiyeri.

Bileşenler	Miktar g/L
K_2HPO_4	3,0
Na_2HPO_4	6,0
NH_4Cl	1
NaCl	0,5
CaCl_2	0,003

Çalışmalarda kullanılan serum fizyolojik çözeltisi (SF) ise %0,875 oranında NaCl tartılarak saf su içerisinde çözündürülerek ve otoklavda 121°C 'de 15 dk steril edilerek hazırlanmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 *Eremurus spectabilis*'in muhafazası

Toplanan *E. spectabilis* (Çiriş) bitkisi toprak altı (kök) kısımları ve toprak üstü kısımları (yaprak) toprak ve kirlilikten arındırmak için distile su ile yıkanmıştır. Temizlenen bitki bölümleri kurutma kağıtlarına alınarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulan bitki bölümleri ayrı ayrı blender (Waring, commercial blender) ile toz haline getirilip 4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2 Bakteri kültürlerinin muhafazası

Tez çalışmasında kullanılan suşlar uygun besiyerlerinde iki kez aktifleştirilmiştir. Kryo tüpler içerisine 0,4 mL gliserol eklenmiş ve otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilmiştir. Saflık kontrolü yapılan aktif kültürlerden 0,6±0,02 mL alınarak içerisinde steril gliserol bulunan tüplere aktararak, -40°C'de muhafaza edilmiş ve bütün stokların 6 ayda bir saflık kontrolü yapılmıştır.

3.2.3 Bitkiden inulin tipi fruktan ekstraksiyonu ve optimizasyonu

3.2.3.1 Deneysel tasarım

E. spectabilis (Çiriş) bitkisinden en yüksek verimle inulin tipi fruktan ekstraksiyonun yapılabilmesi için Minitab (deneme sürümü) yazılımı kullanılarak ve Tepki Yüzey Metodolojisi (TYM) ile Box Bhenken tasarımı oluşturulmuştur. Deney parametrelerindeki bağımsız değişkenler (Çizelge 3.5) ekstraksiyon verimi (%) üzerindeki etkilerini tespit etmek için kullanılmıştır. Ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi için çalışmada kullanılan üç ekstraksiyon değişkeni; X_1 (sıcaklık), X_2 çiriş:su oranı (a/h) ve X_3 (süre) olarak belirlenmiştir. Tasarıma her bir değişken için yüksek, merkezi ve düşük olmak üzere üç seviye atfedilmiştir. Ayrıca 3 tekrarlı merkez noktası bulunmaktadır (20°C, 1:12, 20 dk). Çalışmada kullanılan bağımsız değişken değerleri ön tarama testleri ve literatür araştırmaları ile belirlenmiştir. Seçilen bağımsız değişkenler Box Bhenken tasarımına yüklenmiş ve 15 set deney tasarımı oluşturulmuştur (Çizelge 3.6.)

Çizelge 3.5. Box behnken tasarımında kullanılan değişkenler ve seviyeleri.

Değişkenler	Sembol	Seviyeler		
		-1	0	1
Sonikasyon süresi (dakika)	X ₁	10	20	30
Çiriş:su oranı (a/h)	X ₂	1:12	1:24	1:36
Sonikasyon sıcaklığı (°C)	X ₃	20	40	60

3.2.3.2 İnülin tipi fruktanın ultrason destekli ekstraksiyonu

Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş 1 gram *E. spectabilis* bitki kök ve yapraklarından, Minitab19 (Deneme sürümü) Box Bhenken deney dizaynı aracılığıyla belirlenen konsantrasyonlarda (Çizelge 3.5) iki tekrarlı olarak ekstarksiyon gerçekleştirilmiştir.

Örnekler distile su içerisinde hazırlanan çiriş:su oranı (1/12, 1/24 ve 1/36 a/h), seçilen ortam sıcaklıklarında (20, 40 ve 60°C) ve belirlenen sürelerde (10, 20 ve 30 dk.) ultrason destekli sonikasyona (doğrudan sonikasyon) tabi tutulmuştur. Doğrudan sonikasyon için, ucu çözücüye batırılmış olan numune tüpüne sonikatör probu yerleştirilmiştir. Doğrudan sonikasyon işlemi, sonikatör probu (1 mm çapında), 30 kHz frekansa ve 100 W giriş gücüne sahip ultrasonik işlemci (UP100H, Dr. Hielscher GmbH,) aracılığıyla yapılmıştır. Sonikasyon sırasında uygun sıcaklık koşulları termokupl (Life Net Medikal , KT-600) ile kontrol edilmiştir. Sonikasyon işleminden sonra asılı partilülleri çıkarmak için 4500 g'de 15 dk. santrifüj (Gyrozen, 1848R) edilmiştir. Çözünmeyen kalıntılardan uzaklaştırmak için müslin kumaştan süzölmüştür ve deney gününe kadar -20°C de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.6. Box Bhenken deney tasarımı.

Ekstraksiyon	X ₁	X ₂	X ₃
1	20°C	1:24	30 dk
2	40°C	1:24	20 dk
3	20°C	1:36	20 dk
4	40°C	1:12	30 dk
5	40°C	1:36	30 dk
6	60°C	1:36	20 dk
7	60°C	1:12	20 dk
8	60°C	1:24	10 dk
9	60°C	1:24	30 dk
10	40°C	1:36	10 dk
11	40°C	1:24	20 dk
12	40°C	1:12	10 dk
13	20°C	1:24	10 dk
14	20°C	1:12	20 dk
15	40°C	1:24	20 dk

X₁: Sıcaklık, X₂: Çişiş:su oranı X₃: Süre

3.2.3.3 İnülin tipi fruktan ekstraksiyon verimi

Ultrason destekli ekstraksiyon sonucu yaprak ve kökten elde edilen ekstrelerdeki yüzde (%) fruktan prebiyotik verimi aşağıdaki denkleme göre değeriendirilmiştir (Lingyun vd., 2007). Fruktan içeriğinin belirlenmesi için total karbonhidrat miktarı Bölüm 3.2.4.1’de verilen metoda göre, indirgeyici şeker miktarı Bölüm 3.2.4.2’de anlatılan yöntem ile belirlenmiştir.

$$(\%) \text{ Fruktan verimi} = \frac{\text{Fruktan içeriği} \times \text{Ekstraksiyon sıvısının hacmi (ml)}}{\text{E.spectabilis tozunun ağırlığı (g)}} \times 100 \quad (3.1)$$

$$\text{Fruktan içeriği} = \text{Total karbonhidrat miktarı} - \text{indirgeyici şeker miktarı} \quad (3.1a)$$

Yapraktan ekstrakte edilen inulin tipi fruktan veriminin kökten daha düşük olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızın bundan sonraki aşamalarında kökten ekstrakte edilen inulin tipi fruktan ile devam edilmiştir. Kökten elde edilen inulin tipi fruktanlar, inulin tipi fruktan ES olarak kodlanmış ve çalışmalarda kullanılmıştır.

3.2.3.4 İnulin tipi fruktan ES ekstralarının liyofilizasyonu

Çiriş bitkisinin kök kısımlarından elde edilen inulin tipi fruktan ES ekstraları kimyasal karakterizasyon, prebiyotik ve biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılmak üzere liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon işleminin basamakları;

1. Kurutulmuş *E. spectabilis* köklerinden inulin tipi fruktan, tespit edilen optimum ekstraksiyon koşullarında (60°C, 1:12, 30 dk) ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi ile ekstre edilmiştir.
2. *E. spectabilis* kök tozları çiriş:su (3:36) oranında toplamda 40 ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). Ekstreler daha sonrasında 4500g'de 15 dk santrifüj (Gyrozen, 1848R) edilmiştir.
3. Muslin kumaştan süzülen numuneler sonrasında -80°C, 1 atm basınç altında 3 gün Christ alpha, 2-4 LDplus cihazında (Şekil 3.3) liyofilizasyonu yapılarak inulin tipi fruktan ES olarak kodlanmış ve 4°C'de muhafaza edilerek çalışmalarda kullanılmıştır (Şekil 3.4)



Şekil 3.2. Ultrason destekli ekstraksiyon sonrası ekstralarının görünümü.



Şekil 3.3. Christ alpha, 2-4 LDplus cihazında liyofilizasyon işleminin görüntüsü.



Şekil 3.4. Liyofilizasyon sonrası inülin tipi fruktan ES görüntüsü.

3.2.4 İnülin tipi fruktan ES'nin kimyasal karakterizasyonu

3.2.4.1 Toplam karbonhidrat tayini

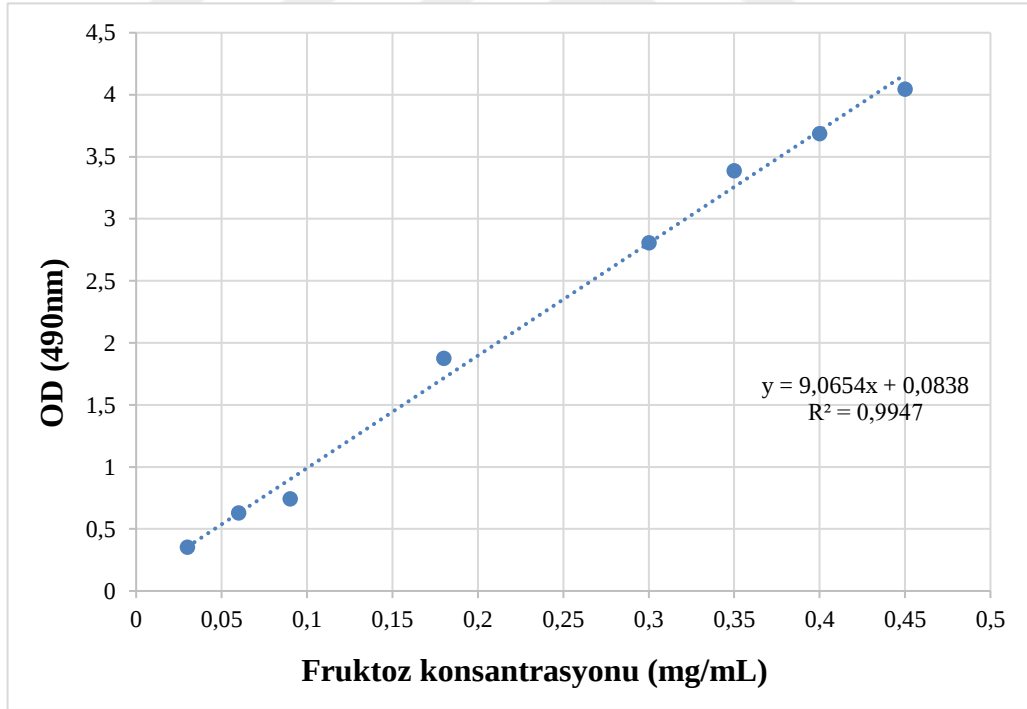
Ultrason destekli ekstraksiyon sonrası, inülin tipi fruktan ES'nin bileşiminde bulunan total karbonhidrat miktarı, fenol sülfirik asit yöntemi kullanılarak kolorimetrik olarak analiz edilmiştir (Paseephol vd., 2007). Ekstraksiyon sonrası inülin tipi fruktan ES numunesi 10 kez distile su ile seyreltilmiş ve seyreltilen numunelerin 1mL'si, %5'lik fenolden (Sigma) 1 mL ve 5 mL sülfirik asit (Carlo Erba) (H_2SO_4) ile karıştırılmıştır. Karışım, 20 dakika boyunca 30°C'de bir su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra numunelerin optikal yoğunluğu (OD) UV-VIS spektrofotometrede (Thermo Scientific, genesys 10s UV-VIS) 490 nm'de ölçülmüştür. Ekstrelerin içerdiği total karbonhidrat miktarlarını hesaplamak için 0,03-0,45 mg/mL arasında değişen oranlarda (Şekil 3.7) D (-)-Fruktoz ($M_w = 180,16$ Fluka) çözeltisi kullanılarak bir standart grafik oluşturulmuştur ve elde edilen denkleme göre inülin tipi fruktan ES'nin total karbonhidrat miktarı mg/mL cinsinden hesaplanmıştır (Şekil 3.5 ve 3.6).



Şekil 3.5. Fenol sülfirik asit eklenmiş fruktoz standart görüntüsü.



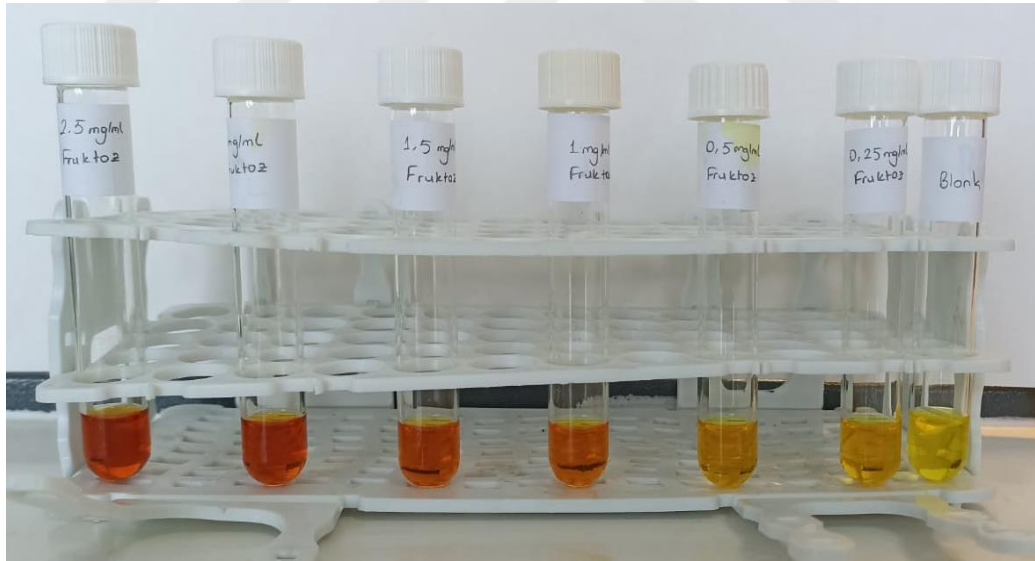
Şekil 3.6. Ekstre edilen çiriş ekstraktlarının fenol sülfirik asit eklenmiş görüntüsü.



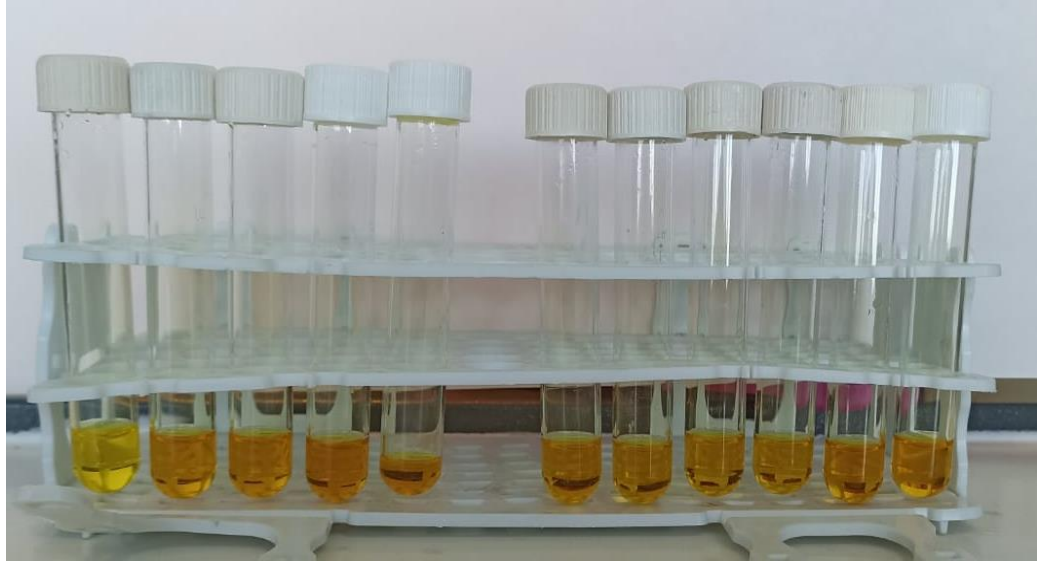
Şekil 3.7. Total karbonhidrat tayini için hazırlanan fruktoz standart grafiği.

3.2.4.2 İndirgeyici şeker analizi

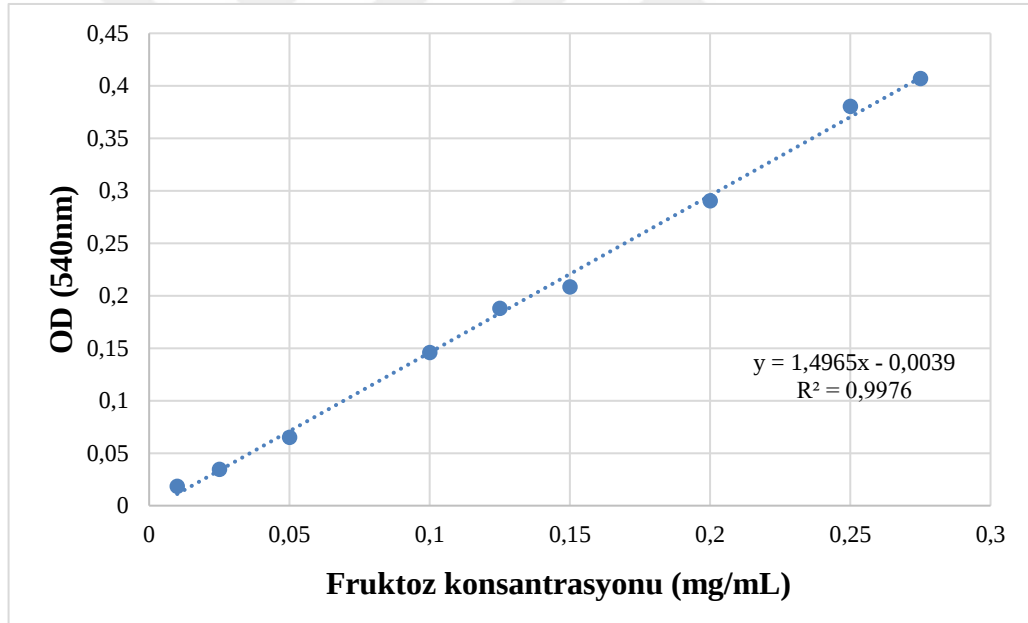
İnülin tipi fruktan ES'nin bileşiminde bulunan çözünür indirgeyici şekerlerin konsantrasyonları, 3,5-dinitrosalisilik asit (DNSA) yöntemi kullanılarak ölçülmüştür (Miller, 1959). İnülin tipi fruktan ES numunesi 1:1 oranında DNSA reaktifi ile karıştırılacağı test tüpüne aktarılmıştır. Örnekler vortex (İka vortex, geni vs3) ile karıştırıldıktan sonra 90°C'de su banyosunda 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda örnekler hızlı bir şekilde buz üzerinde soğutulmuştur. Soğuyan numunelerin üzerine 1,5 mL saf su ilave edilmiş ve reaksiyon durdurulmuştur. Reaksiyon sonrası tüm numunelerin 575 nm'de spektrofotometrede (Thermo Scientific, genesys 10s UV-VIS) ölçümleri yapılmıştır. Çalışmada kör olarak DNSA metodu uygulanmış 150 µL saf su kullanılmıştır. İnülin tipi fruktan ES'nin bileşiminde bulunan indirgeyici şeker miktarını hesaplamak için 0,01-0,275 mg/mL arasında değişen oranlarda (Şekil 3.10) D (-)-Fruktoz (Mw = 180,16; Fluka) çözeltisi kullanılarak bir standart grafik oluşturulmuştur ve bu standarta göre üretilen indirgeyici şeker miktarı mg/mL cinsinden belirlenmiştir (Şekil 3.8 ve 3.9).



Şekil 3.8. DNSA metodu uygulanmış fruktoz standart görüntüsü.



Şekil 3.9. DNSA metodu uygulanmış inulin tipi fruktan ES görüntüsü.



Şekil 3.10. DNSA metodu için hazırlanan fruktoz standart grafiği.

3.2.4.3 Polimerizasyon derecesi

Polimerizasyon derecesinin (PD) indeksi olarak ortalama zincir uzunluğu Paseephol vd. (2007) tarafından aşağıda belirlenen formüle göre belirlenmiştir.

$$PD = \frac{\text{Toplam karbonhidrat miktarı}}{\text{Toplam indirgeyici şeker miktarı}} \quad (3.2)$$

3.2.4.4 Suda çözünürlük

Liyofilize inulin tipi fruktan ES'nin suda çözünürlüğü (Phat vd., 2015)'in metoduna göre belirlenmiştir. İnulin tipi fruktan ES'den 0,2 g (a_1) tartıldıktan sonra üzerine 10 mL saf su eklenerek santrifüj tüpü içerisine alınarak sıcak su banyosunda 80°C'de 30 dk dispersiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Dispersiyon işlemi sonrası numuneler 6000 rpm de 10 dk santrifüj (Gyrozen, 1848R) edilmiştir. Süpernatant önceden darası alınan falkona (a_2) aktarılıp 105°C'de kurutulup tartılmıştır (a_3). Suda çözünürlük değeri Eş. 3.3 de verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Suda çözünürlük (\%)} = \frac{a_3 - a_2}{a_1} \times 100 \quad (3.3)$$

3.2.4.5 İnulin tipi fruktan ES'nin su tutma kapasitesi (STK) ve yağ tutma (YTK) kapasitesi

Liyofilize inulin tipi fruktan ES numunesinden 0,5 g tartılarak, 24 saat boyunca 20 mL su (STK) veya 1 saat boyunca 10 mL ayçiçek yağı (YTK) ile karıştırılmıştır. Homojen karışan numuneler 15 dakika boyunca 4 °C'de 12.000 x g santrifüj (Gyrozen, 1848R) edilmiştir. Numuneler sırasıyla boşaltılmış ve ağırlıkları tartılmıştır. İnulin-tipi fruktan ES'nin SKT veya YTK değerleri Eş. 3.4'de belirtilen denkleme göre sırasıyla g numune başına g su veya yağ olarak hesaplanmıştır (D. Das vd., 2014; Zhiwei Zhang vd., 2022).

$$STK \text{ (veya YTK)} = \frac{a_2 - a_1}{a} \quad (3.4)$$

a: Kuru numunenin ağırlığı, a_1 : Tüp ve kuru numunenin ağırlığı, a_2 : Tüpün ağırlığı ve su veya yağ tutan numunenin ağırlığı.

3.2.4.6 İnülin tipi fruktan ES'nin nem içeriğinin belirlenmesi

Liyofilize inülin tipi fruktan ES'nin nem miktarı Hilman vd., (2018) tarafından belirlenen metota göre araştırılmıştır. Darası alınan alüminyum plaklar ile 1,0 g liyofilize inülin tipi fruktan ES tartılmış ve 105°C'de 4 saat boyunca kurutulmuştur. Desikatör yardımıyla soğutulan alüminyum plaklar tartılmış ve tekrar 30 dk 105°C'de kurutulmuştur. Ağırlık sabitleşene kadar bu işlem tekrar edilmiştir ve Eş. 3.5'te verilen denkleme göre % nem miktarı hesaplanmıştır.

$$\% Nem = \left(\frac{a - b}{a} \right) \times 100 \quad (3.5)$$

a: Alüminyum plakalara konulan toz miktarı (g); b: Kurutma işlemi sonrası tartılan sabit ağırlık miktarı (g)

3.2.4.7 İnülin tipi fruktan ES'nin şişme kapasitesinin belirlenmesi

Ekstraksiyon sonrası liyofilize hale getirilen inülin tipi fruktan ES'nin şişme kapasitesi Zipei Zhang vd., (2012)'ye göre test edilmiştir. İnülin tipi fruktan ES'den 1,0 g mezüre aktarılmış (b) ve inülin tipi fruktan ES tozunun kapladığı hacim (a_1) kaydedilmiştir. Mezürün üzerine 10 mL saf su eklenmiş ve homojen karışım olana kadar karıştırılmıştır. Karışım 24 saat 25°C'de su banyosuna bırakılmıştır. 24 saat sonrası son hacim (a_2) ölçülmüş ve Eş. 3.6'da verilen şişme kapasitesi formülüne göre şişme kapasitesi 1,0 g toz numunesinin emdiği sıvı miktarı olarak mL cinsinden hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme kapasitesi (mL/g)} = \frac{a_1 - a_2}{b} \quad (3.6)$$

3.2.4.8 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi

İnülin tipi fruktan ES'nin FTIR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi) analizi ile yapılarındaki temel işlevsel grupların belirlenmesi amacıyla Perkin Elmer Spectrum 100 FTIR spektroskopisinde ATR örnekleme probu kullanılarak 400 cm^{-1} - 4000 cm^{-1} frekans aralığında tarama Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi tarafından hizmet alımı ile yapılmıştır.

3.2.4.9 Nükleer manyetik rezonans (NMR) analizi

İnülin tipi fruktan ES yapısındaki monomerlerin anomerik konformasyonunun, bağ tiplerinin, ikame maddelerinin ve hatta karbonhidrat dışı doğasının belirlenmesi NMR analizi ile net bir şekilde belirlenebilmektedir. Liyofilize inülin tipi fruktan ES'nin spektrum analizlerinin molekül alt birimlerinin yapısının belirlenmesi için tek boyutlu (1D) ^1H ve ^{13}C NMR deneyleri Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından hizmet alımı ile yapılmıştır. Analiz öncesi inülin tipi fruktan ES örnekleri ($30\text{ mg}/500\text{ }\mu\text{L}$) $25\text{ }^\circ\text{C}$ 'de D_2O 'da (% 99,96) çözülmüştür (Li vd., 2015).

3.2.4.10 Termogravimetrik analiz (TGA)

İnülin tipi fruktan ES'nin ısı özellikleri, termal gravimetrik analiz yapılarak hizmet alımı ile belirlenmiştir. Liyofilize inülin tipi fruktan ES numunesinin TGA'sı sıcaklığa karşı kütle kaybı olarak $30\text{-}700\text{ }^\circ\text{C}$ aralığında EXSTAR S11 7300 analizör (SII NanoTechnology Inc., MA, Japan) cihazı ile incelenmiş, inülin tipi fruktan ES örnekleri alüminyum kroze kullanılarak azot ortamı altında $30\text{ }^\circ\text{C}/\text{dk}$ ısıtma hızı ile $700\text{ }^\circ\text{C}$ 'ye kadar ısıtılarak bozunma sıcaklıkları Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi tarafından hizmet alımı ile belirlenmiştir (Ayyash vd., 2020).

3.2.4.11 Ultraviyole görünür (UV-VIS) analizi

İnülin tipi fruktan ES'nin UV spektrumu, $1\text{ mg}/\text{mL}$ 'lik numunenin ultra saf suda çözülmesi ve $190\text{-}700\text{ nm}$ dalga boylarında spektrofotometre (Thermo Scientific, Genesys 10s UV-VIS) ile taranmasıyla belirlenmiştir

3.2.4.12 İnülin içeriğinin belirlenmesi (monomer analizi)

İnülin tipi fruktan ES'nin monosakkarit bileşimi, Li vd. (2015) tarafından açıklandığı gibi yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntemle göre, 20 mg inülin tipi fruktan ES numunesi, 3 saat boyunca 120°C'de yağ banyosunda karıştırılarak 2 mol/L trifloroasetik asit (TFA) ile hidrolize edilmiştir. Hidrolizden sonra, TFA 60°C'de vakum altında buharlaştırılmış ve kalıntı fazla TFA'yı gidermek için metanol ile üç kez yıkanmıştır. Hidrolizat 2 mL ultra saf suda çözülerek inülin tipi fruktan ES'nin monosakkarit bileşimi, Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından hizmet alımı ile HPLC cihazında RID dedektörü tarafından belirlenmiştir. Standart olarak fruktoz ve glikoz monosakkaritleri kullanılmıştır.

3.2.4.13 Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi

İnülin tipi fruktan ES'nin yüzey morfolojilerinin yüksek çözünürlükte görüntülenmesi amacıyla SEM analizi yapılmıştır. 5 mg inülin tipi fruktan ES kaplama cihazıyla (Cressington sputter coated 108 Auto, TED PELLA, INC.) 10 nm kalınlığında Au/Pd tabakası ile kaplanmıştır. FEI Quanta FEG 250 SEM'de 5 kV'de incelenmiş olup, farklı büyütme oranlarında (1000X, 2500X, 5000X, 10.000X, 20.000X) görüntüleri alınmıştır. Analizler Aksaray Üniversitesi, Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. İnülin tipi fruktan ES'nin yüzeyi vakum altında altın ile kaplanmış ve elementel içeriği SEM (Taramalı Elektron Mikroskopu-Enerji Dağıtıcı X-ray) ile Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi tarafından incelenmiştir (FEI-Quanta FEG 250).

3.2.5 İnülin tipi fruktan ES'nin prebiyotik özelliklerinin belirlenmesi

3.2.5.1 İnülin tipi fruktan ES'nin prebiyotik aktivitesinin belirlenmesi

Bir bileşiğin prebiyotik olarak değerlendirilebilmesi için sahip olması gereken özellikler: **i)** *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi probiyotik bakteriler tarafından kalın bağırsakta sindirilebilmelidir (Prebiyotik İndeks) (Davani-Davari vd., 2019); **ii)** *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi yararlı bakterilerin gelişmesini artırabilmeli, ancak patojen suşlar tarafından fermente edilmemelidirler (Prebiyotik Aktivite

Skoru) (Davani-Davari vd. 2019); **iii**) Gastrointestinal sistemde mide asidi ve safra koşullarında aktif kalabilmelidir (Thammarutwasik vd., 2009). Çalışmamızda da *E. spectabilis* bitkisinin kökünden ekstrakte edilen inülin tipi fruktan ES'nin prebiyotik özelliklerinin belirlenebilmesi için prebiyotik mikroorganizmalar tarafından fermente edilmesi (Prebiyotik İndeks), prebiyotik ve patojen mikroorganizmalar tarafından fermentasyon özellikleri (Prebiyotik Skor Aktiviteleri), ve farklı pH'da yapay mide sıvısı ortamlarındaki dirençleri araştırılmıştır.

İnülin tipi fruktan ES'nin potansiyel prebiyotikler tarafından fermentasyonu

İnülin tipi fruktan ES'nin potansiyel prebiyotik *Lacticaseibacillus rhamnosus* ACS5, *Pediococcus acidilactici* 5008 bakterileri ve *Saccharomyces cerevisiae* BD21 mayası tarafından fermentasyon özellikleri Das vd. (2014)'nin kullandıkları metot modifiye edilerek belirlenmiştir. İnülin tipi fruktan ES fermente edilebilirliğinin araştırılmasında *L. rhamnosus* ACS5 ve *P. acidilactici* 5008 suşları için MRS broth besiyerinden ve *S. cerevisiae* BD21 mayası içinse YEPD besiyerinden karbon kaynağı (glukoz) tamamen çıkarılmıştır. Besiyerlerine çıkarılan karbon kaynağı kadar (%2) inülin tipi fruktan ES (ES-MRS) ilave edilmiştir. Negatif kontrol olarak karbon kaynağı tamamen çıkarılmış besiyerleri (glukozsuz-MRS ve glukozsuz-YEPD) ve pozitif kontrol olarak glukozlu-MRS ve glukozlu-YEPD besiyerleri kullanılmıştır. Karşılaştırma yapabilmek amacıyla karbon kaynağı çıkarılan MRS ve YEPD besiyerlerine glukoz yerine %2 oranında ticari prebiyotik inülin (Sigma) (inülin-MRS) eklenerek çalışmalarda inülin tipi fruktan ES'nin prebiyotik özelliğini karşılaştırmalı olarak belirlemek için kullanılmıştır. Aktifleştirilen mikroorganizmaların optik yoğunlukları (OD) 600 nm'de $0,60 \pm 0,02$ olarak ayarlanarak, OD'leri ayarlanan kültürlerden hazırlanan besiyerlerine %2'lik ekimler yapılmıştır. Ekim yapılan kültürlerden 0. ve 24. saatlerin sonunda örnekler alınarak OD değerleri ölçülmüş ve bu örneklerden seri seyreltmeler hazırlanarak agar besiyerlerine inoküle edilerek 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda canlı bakteri sayıları log kob/mL olarak hesaplanmıştır (3.7) (Gürgün ve Halkman, 1990).

$$\frac{kob}{mL} = \log_{10} \left(\frac{\text{koloni sayısı} \times \text{seyreltme faktörü}}{\text{Ekilen hacim (mL)}} \right) \quad (3.7)$$

İnülin tipi fruktan ES'nin bağırsak patojenleri tarafından fermantasyonun belirlenmesi

Patojen mikroorganizmaların inülin tipi fruktan ES'yi fermente edebilme özelliklerinin belirlenmesinde *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 11229 ve *E. faecalis* ATCC 29212 bağırsak patojenleri kullanılmıştır. Bağırsak patojenlerinin aktif kültürleri hazırlanmış ve OD'leri 600 nm'de $0,60 \pm 0,02$ olarak ayarlanmıştır. Hazırlanan M9 minimal besiyerlerinden (Çizelge 3.4) %2 oranında glikoz (Glikoz-M9), inülin (İnülin-M9), inülin tipi fruktan ES (ES-M9) ve karbon kaynağı olmayan (Glikozsuz-M9) 4 farklı besi ortamı hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerlerine OD'si $0,60 \pm 0,02$ olan her bağırsak patojeninden ayrı ayrı %2 oranında ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra inülin tipi fruktan ES patojen mikroorganizmalar tarafından fermente edilebilmesi ve canlılıkları üzerinde uyarıcı etkisini tespit etmek için 4 farklı grup besiyerinden 10^{-1} - 10^{-7} seri dilüsyonlar hazırlanarak NA besi ortamı içeren petrilere yayma ekimleri yapılarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda NA besi ortamında üreyen koloni sayımları yapılmış ve canlı bakteri sayısı 3.7'de verilen formüle göre log kob/mL şeklinde hesaplanmıştır.

Probiyotik suşlar ve bağırsak patojenleri ile inülin tipi fruktan ES'nin fermente edilme özelliği yukarıda verilen metotlarla tespit edildikten sonra Figueroa-Gonzalez vd. (2019) tarafından belirlenen prebiyotik indeks (PI) formülü kullanılarak Eş. 3.8'de verilen formülle inülin tipi fruktan ES'nin PI değeri hesaplanmıştır.

$$PI = \frac{\text{Prebiyotik karbonhidrattaki probiyotiklerin kob}}{\text{Kontrol karbonhidrattaki probiyotiklerin kob}} \quad (3,8)$$

3.2.5.2 İnülin tipi fruktan ES'nin prebiyotik aktivite skoru testi

Probiyotik suşlar olarak *L. rhamnosus* ACS5, *P. acidilactici* 5008 ve *S. cerevisiae* BD21 kullanılmıştır. Enterik patojenler olarak, *E. coli* ATCC 11229, *E. coli* ATCC 35218, *E. faecalis* ATCC 29212 suşları ve bunların karışımı (1:1:1) kullanılmıştır. Probiyotik ve patojen suşların glikoz, prebiyotik (inülin) ve örnek inülin tipi fruktan ES'deki gelişmeleri, Huebner vd., (2007)'ye göre araştırılmıştır. Aktif bakteri suşlarının optik yoğunluğu (OD) 600 nm' de $0,60 \pm 0,02$ 'ye ayarlanmıştır. Bakteri kültürleri % 2 oranında, MRS broth ve YEPD broth (*S. cerevisiae* suşu için), %1 inulin tipi fruktan ES ve inulin (Sigma) (pozitif kontrol) içeren besi ortamlarına inoküle edilerek 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerlerindeki gelişme, inkübasyondan önce (0 saat) ve inkübasyondan 24 saat sonra spektrofotometrede 600 nm'de OD değerleri ölçülmüştür. Her tüpün 100 µL alikotları, steril salin çözeltisinde (% 0,9 NaCl) seri olarak seyreltilmiş, daha sonra probiyotik suşların sayımı için her seyreltmenin 100 µL alikotu MRS agar veya YEPD agar üzerine yayma ekim yapılmıştır. Yayma plaklar 24 saat 37°C'de inkübe edilerek canlı bakteri sayısı log kob/mL olarak belirlenmiştir. Bağırsak patojenleri olarak kullanılan *E. coli* ATCC 11229, *E. coli* ATCC 35218, *E. faecalis* ATCC 29212 suşlarının aktif kültürleri ve bunların 1:1:1 oranında (enterik karışım) karışımlarının prebiyotik aktivite skor tespiti için M9 broth (3,0 g/L KH_2PO_4 ; 6,0 g/L Na_2HPO_4 ; 1,0 g/L NH_4Cl ; 0,5 g/L NaCl; 0,003 g/L $CaCl_2$) besiyeri kullanılmıştır. Karbon kaynağı içermeyen M9 besiyerlerine % 2 inülin tipi fruktan ES prebiyotik (*E. spectabilis* ekstresi), ticari inülin (pozitif kontrol) ve glikoz eklenerek hazırlanan dört farklı besiyerine patojenler ve bunların 1:1:1 oranındaki karışımları eklenerek 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her bir besiyerindeki kültürlerin OD değerleri ölçülmüştür ve enterik patojenlerin canlı hücresi EMB agar besiyeri kullanılarak log kob/mL olarak belirlenmiştir (Eş. 3.7).

Prebiyotik aktivite skoru, aşağıdaki denklem kullanılarak log kob/mL değerleri kullanılarak hesaplanmıştır:

$$Prebiyotik\ Aktivite\ Skoru = \left[\frac{(PBP_{24h} - PBP_{0h})}{(PBG_{24h} - PBG_{0h})} \right] - \left[\frac{(EPP_{24h} - EPP_{0h})}{(EPP_{24h} - EPP_{0h})} \right] \quad (3.9)$$

PBP24h = 24. saatte prebiyotik (inülin tipi fruktan ES veya ticari inülin) içeren ortamda gelişen probiyotik log kob/mL; PBP0h = 0. saatte prebiyotik (inülin tipi fruktan ES veya ticari inülin) içeren ortamda gelişen probiyotik log kob/mL; PBG24h = 24. saatte glukoz içeren ortamda gelişen probiyotik log kob/mL; PBG0h = 0. saatte glikoz içeren ortamda gelişen probiyotik log kob/mL; EPP24h = 24. saatte prebiyotik (inülin tipi fruktan ES veya ticari inulin) içeren ortamda gelişen enterik patojen log kob/mL; EPP0h = 0. saatte prebiyotik (inülin tipi fruktan ES veya ticari inülin) içeren ortamda gelişen enterik patojen log kob/mL; EPG24h = 24. saatte glukoz içeren ortamda gelişen enterik patojen log kob/mL; EPG0h = 0. saatte glukoz içeren ortamda gelişen enterik patojen log kob/mL. Bu denklemi kullanarak, belirli bir oligosakkaritin prebiyotik aktivite skoru, herhangi bir suşa göre belirlenebilir (Arya ve Shakya, 2021).

3.2.5.3 İnülin tipi fruktan ES'nin mide asidine direncinin belirlenmesi

İnülin tipi fruktan ES ile kontrol grubu olarak kullanılan ticari prebiyotik inülinin farklı pH'daki mide sıvısı ile hidrolizi Wichienchot vd. (2009)'un metoduna göre belirlenmiştir. Yapay mide sıvısı (8 g/L NaCl; 0,2 g/L KCl; 8,25 g/L Na₂HPO₄·2H₂O; 14,35 g/L NaH₂PO₄; 0,1 g/L CaCl₂·2H₂O; 0,18 g/L MgCl₂·6H₂O) hazırlanarak pH'ı 5 M HCl ile 2 paralel olacak şekilde pH 1, 2, 3, 4 ve 5'e ayarlanmıştır. Saf su içerisinde %1 oranında inülin tipi fruktan ES ekstraktı ve kontrol için inülin çözeltileri hazırlanmıştır. İnülin-tipi fruktan ES'nin mide asidine dirençliliğini belirlemek için farklı pH'lardaki mide asitlerinden 5 mL alınarak üzerine %1 oranındaki inülin tipi fruktan ES'den 5 mL eklenerek 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grubu olan ticari prebiyotik inülin için de aynı işlemler uygulanmıştır. İnkübasyondaki farklı pH'daki mide sıvılarından 0, 2, 4 ve 6. saatlerde örnekler alınarak total şeker ve indirgenmiş şeker miktarları hesaplanmıştır.

İndirgenen şeker miktarı Robertson vd. (2001)'un dinitrosalisilik asit (DNSA) metodu ile tespit edilmiştir. Bu metoda göre; farklı pH'daki inülin tipi fruktan ES ve inülin içeren mide sıvılarından 0, 1, 2, 3, 4 ve 5. saat zaman aralıklarında 150 µL örnek alınarak üzerine 150 µL DNSA çözeltisi eklenmiştir. Örnekler karıştırıldıktan (İka vortex, Geni vs3) sonra 100°C'de 5 dk süresince kaynar suda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda örnekler hızlı bir şekilde buz üstünde

soğutulmuştur. Ardından soğutulan örneklerin üzerine 1,5 mL saf su eklenerek spektrofotometrede (Thermo Scientific, genesys 10s UV-VIS) 540 nm’de okuma işlemi yapılmıştır. Kör için 75 µL saf su ile içerisinde inülin tipi fruktan ES veya inülin bulunmayan mide sıvısından 75 µL eklenerek DNSA metodu uygulanmıştır. İnülin tipi fruktan ES ve inülinin mide asidinde yüzde hidrolizini hesaplamak için; total karbonhidrat miktarı fenol sülfirik asit metoduna göre Bölüm 3.2.4.1’de anlatıldığı gibi belirlenmiştir. İnülin tipi fruktan ES ve ticari inülinin farklı pH’daki mide sıvılarında ve farklı sürelerdeki hidroliz yüzdeleri aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Hidroliz} = \left[\frac{\text{indirgenmiş şeker miktarı}}{\text{total şeker miktarı} - \text{başlangıçtaki indirgenmiş şeker}} \right] \times 100 \quad (3.10)$$

3.2.6 Antioksidan biyolojik aktivitenin değerlendirilmesi

Bu bölümde inulin tipi fruktan ES’nin biyolojik aktivite olarak antioksidan özelliklerinin belirlenmesi için 6 farklı çalışma yapılmıştır.

3.2.6.1 DPPH (2,2,-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürücü aktivite

İnülin tipi fruktan ES’lerin antioksidan aktivitesi, DPPH serbest radikalının süpürme kabiliyetine dayanarak test edilmiştir (Wang vd., 2014). Farklı konsantrasyonlarda (0,5; 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg/mL) 0,3 mL inülin tipi fruktan ES çözeltileri 0,1 mM DPPH çözeltisi (0,6 mL, mutlak etanol içerisinde) ile karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığında 30 dk karanlıkta bekletildikten sonra elde edilen çözeltinin absorbansı 517 nm’de ölçülmüştür. Askorbik asit pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. DPPH• süpürme aktivitesi, denklem ile aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

$$\text{Süpürme aktivitesi (\%)} = \left[\frac{B - (S - Sc)}{B} \right] \times 100 \quad (3.11)$$

B, örnek çözeltisinin çözücüyle değiştirilmesiyle hazırlanan kör çözeltinin absorbansı (inülin tipi fruktan ES ve askorbik asit için farklı olarak 0,3 mL çözücü + 0,6 mL DPPH olacak şekilde hazırlanmıştır). S, örnek çözeltilerinin absorbansı. Sc, DPPH çözeltisinin etanol ile değiştirilmesi elde edilen kontrol örneğinin absorbansı (0,3 mL örnek + 0,6 mL EtOH).

3.2.6.2.ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbentiazolin-6-sülfonik asit) radikal süpürücü aktivite

ABTS^{•+}, 7 mM ABTS'nin distile suda 2,45 mM potasyum persülfat ile reaksiyona girmesi ile elde edilmiş ve oda sıcaklığında 16 saat karanlıkta saklanmıştır (Braca vdu., 2001). ABTS^{•+} çözeltisi kullanımdan önce 734 nm'de 0,700 absorbansa kadar etanol ile seyreltilmiştir (Wang vd., 2017). ABTS^{•+} çözeltisine (0,6 mL), farklı konsantrasyonlarda (0,5; 0,75; 1, 1,25; 1,5; 2, 4, mg/mL) inülin tipi fruktan ES (0,3 mL) ilave edilmiştir. Karışım, oda sıcaklığında 5 dk karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası çözeltinin absorbansı 734 nm'de ölçülmüştür. Çalışmada askorbik asit pozitif kontrol olarak kullanılmıştır ve sonuçlar DPPH radikal süpürücü aktivite testinde kullanılan formül (Eş. 3.11) ile hesaplanmıştır.

3.2.6.3 Hidroksil radikalleri süpürücü aktivitesi

Hidroksil radikalleri temizleme aktivitesi daha önce gerçekleştirilen analizlerde bazı modifikasyonlar yapılarak test edilmiştir (Smirnoff vd., 1989; Yang vd., 2015). 6 mM FeSO₄ (2 mL), %0,3 H₂O₂ (1 mL) ile karıştırılmıştır. Hidroksil radikallerinin oluşması için 5 dakika bekletilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (0,5; 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg/mL) inülin tipi fruktan ES (2 mL) çözeltilerine 6 mM salisilik asit (2 mL) eklenerek 30 dk süresince 37°C'de inkübasyona bırakılmış ve 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatantın absorbansı 510 nm'de ölçülmüştür. Çalışmada askorbik asit pozitif kontrol olarak kullanılmıştır ve sonuçlar DPPH radikal süpürücü aktivite testinde kullanılan formül (Eş. 3.11) ile hesaplanmıştır. Ancak, örnek kontrolünün (Sc) absorbansı FeSO₄'nin saf su ile değiştirilmesiyle belirlenmiştir. Kör çözelti ise örneğin çözücü ile değiştirilmesi ile test edilmiştir (Wang vd., 2017).

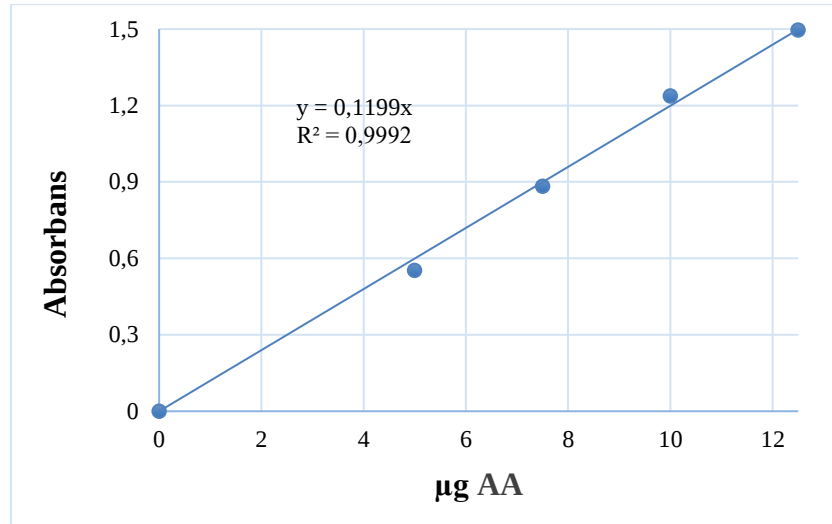
3.2.6.4 Süperoksit anyonu süpürücü aktivitesi

İnülin tipi fruktan ES'nin süperoksit anyonu süpürücü aktivitesi, alkali bir ortamda pirogallol otoksidasyon sisteminde süperoksit radikalleri üretilerek daha sonra üretilen süperoksit radikalının süpürülmesi ile test edilmiştir (Marklund ve Marklund, 1974; Raza vd., 2011). Farklı konsantrasyonlarda (0,5; 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg/mL) inülin tipi fruktan ES çözeltisi (0,5 mL), 0,05 M Tris-HCl (1,5 mL, pH 8,2)

ile karıştırılmış, karışım 25°C' de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Karışıma 25°C' de önceden ısıtılmış 30 mM pirogallol (100 µL) ilave edilmiş ve 4 dk boyunca aynı sıcaklık korunmuştur. Reaksiyon, 0,5 mL derişik HCl ilave edilerek durdurulmuş ve elde edilen çözeltinin absorbası 329 nm'de okunmuştur. Çalışmada askorbik asit pozitif kontrol olarak kullanılmış ve sonuçlar DPPH radikal süpürücü aktivite testinde kullanılan formül ile hesaplanmıştır. Kontrol örneğinin (Sc) absorbası pirogallolün saf su ile değıştirilmesiyle ölçülmüştür

3.2.6.5 Demir indirgeme antioksidan gücü (Ferric reducing antioxidant power-FRAP)

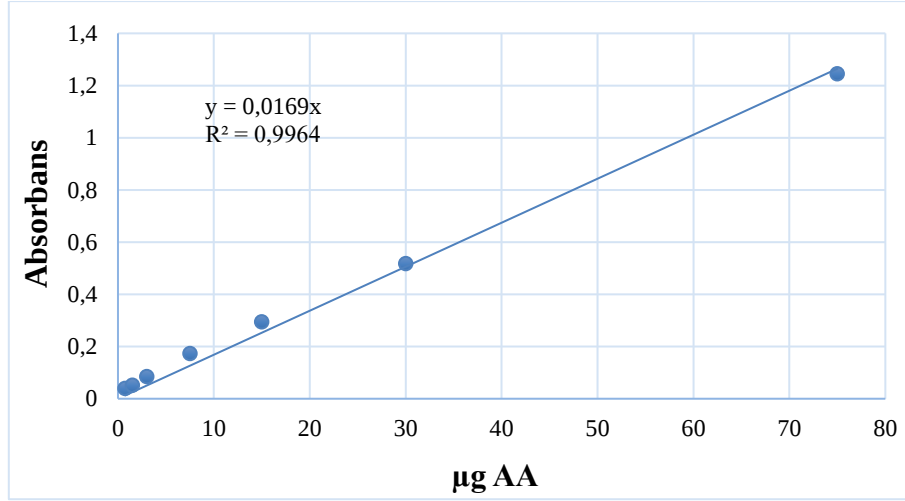
FRAP analizi ilk olarak (Benzie ve Strain, 1996) tarafından insan plazmasının ferrik indirgeme gücünü ölçmek için test edilmiştir. Daha sonra Pulido vd. (2000) bu yöntemi bitki ekstralarının ferrik indirgeme antioksidan gücünü değlendirmek için uyarlamışlardır. Antioksidan aktivite 593 nm'de belirlenir ve sonuçlar mikromolar Fe²⁺ eşdeğerleri olarak veya bir antioksidan standardına göre ifade edilir (Antolovich vd., 2002). TPTZ, 10 mM konsantrasyonda 40 mM HCl içinde hazırlanmıştır. FRAP reaktifi, kullanımdan hemen önce 300 mM asetat tamponu (pH 3.6), 10 mM TPTZ çözeltisi ve 20 mM FeCl₃·6H₂O'nun 10:1:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Reaksiyon sırasında, 2.0 mL FRAP testi çözeltisi, çeşitli konsantrasyonlarda (0,5; 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg/mL) inülin tipi fruktan ES ile (0.1 mL) karıştırılmış ve 30°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda, örneklerin absorbası ölçülmüş ve FRAP potansiyeli Askorbik Asit Eşdeğeri (AAE) olarak ifade edilmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Demir indirgeme antioksidan gücü için Askorbik Asit (AA) kalibrasyon grafiği.

3.2.6.6 Total Antioksidan Kapasite Analizi

İnülin tipi fruktan ES'nin total antioksidan kapasitesi Prieto vd. (1999) tarafından belirlenen yöntemde yapılan bazı modifikasyonlar ile test edilmiştir. Mekanizma Mo^{6+} 'nın Mo^{5+} 'e indirgenmesi sonucunda fosfomolibdenum kompleksi oluşturarak 695 nm'de absorbansda ölçülmüştür (Prieto vd. 1999). İlgili reaktif, 0,6 M sülfürik asit, 28 mM sodyum fosfat ve 4 mM amonyum molibdat içerecek şekilde hazırlanmıştır. Reaktif, sodyum fosfat ve amonyum molibdat için gerekli miktarlar tartıldıktan sonra üzerine sülfürik asit eklenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 6,00; 8,00; 10,00 mg/mL) inülin tipi fruktan ES (0,3 mL), hazırlanan reaktif (3 mL) ile karıştırılmıştır. Karışım, 95°C'de 90 dakika inkübe edildikten sonra 695 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Standart olarak farklı konsantrasyonlarda askorbik asit çözeltileri (0-80 µg) kullanılmıştır ve hazırlanan kalibrasyon grafiği denklemi kullanılarak sonuçlar askorbik asit (AA) eşdeğeri (Şekil 3.11) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.12. Total antioksidan kapasite için AA kalibrasyon grafiği.

3.2.7 İstatistiksel analiz

E. spectabilis kökünden inülin tipi fruktan ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu Minitab19 kullanılarak yapılmış olup Box Bhenken tasarımı ile elde edilen sonuç verileri kuadratik denkleme uygulayabilmek için bu program ile regresyon analizine tabi tutulmuştur. Böylece oluşturulan denkleme ait regresyon sabitleri, determinasyon katsayısı (R^2) ve ANOVA değerleri elde edilmiştir. Regresyon sabitlerinin önem değeri F-testi ve p-değeri ile doğrulanmıştır. Tüm deneyler 2 paralel olarak yapılmış ve sonuçlar ortalama ($\pm$) standard sapma şeklinde verilmiştir. İnülin tipi fruktan ES'nin antioksidan süpürücü aktivite deney sonuçları Minitab19 programı kullanılarak, %95 güven aralığında, tek yönlü varyans analizi ve ardından oneway Anova kullanılarak tespit edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 İnülin Tipi Frukthan ES'nin Ekstraksiyon Veriminin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan *Eremurus spectabilis* bitkisinin kök kısımlarının ultrason destekli ekstraksiyonun verimi Bölüm 3.2.3.3'de anlatıldığı gibi fenol sülfirik asit ve indirgenmiş şeker tayini metodu ile belirlenmiştir. Kodlanmış ve kodlanmamış ekstraksiyon parametrelerinin yüzde verim sonuçları Çizelge 4.1' de verilmiştir. Box behnken deneme desenine göre belirlenen 15 farklı koşuldaki ekstraksiyonların koşullarından her bir ekstraktın inülin tipi fruktan içeriği Eş. 3.1'de verilen yüzde verim denklemine göre hesaplanmıştır. *E. spectabilis* ekstraktlarının yüzde verimleri incelendiğinde ekstraksiyon verimi %29,48 – %44,94 arasında değişim göstermiştir. En yüksek inülin tipi fruktan ES verimi %44,94 ile Box Bhenken tasarımındaki 7. deney tasarımı (60°C, 1:24 (a/h), 20 dk) olduğu tespit edilmiştir.

Bitkisel kaynaklı prebiyotiklerin ekstraksiyon verimi; kullanılan metoda, bitkinin toplandığı döneme, kurutulma işlemlerine, ekstraksiyon süresine, çözücü tipi, partikül boyutu ve numune/çözücü oranı gibi faktörlere göre değişiklik göstermektedir (Figueira vd., 2004; Guo vd., 2019; Su vd., 2021). Álvarez-Borroto vd. (2019)'nun yapmış oldukları çalışmada, Yacón (*Smallanthus sonchifolius*) bitkisinden mikrodalga destekli inülin tipi fruktan ekstraksiyonun optimizasyonu sonucunda, %39,61 verim elde etmişlerdir. Bu çalışma ile karşılaştırdığımızda tez çalışmasında kullanılan ultrason destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyondan daha yüksek oranda verim elde edilmesinde önemli bir parametre olarak belirlenmiştir. Pourfarzad vd. (2015) *E. spectabilis* bitkisinin inülin tipi fruktan içeriğinin geleneksel ve ultrason destekli ekstraksiyon metodlarındaki verim miktarlarındaki değişikliği araştırdıkları çalışmada, ultrason destekli ekstraksiyonun veriminin (%61,28) geleneksel ekstraksiyon verimine (%52,37) kıyasla daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Flores-Girón vd. (2016), Agave (*Agave tequilana. Azul*) bitki köklerinden 15 farklı ekstraksiyon koşulunu test etmiş ve optimizasyon sonucunda % fruktan ekstraksiyon verimliği %17,07 ile %36,33 olduğu rapor edilmiştir. Machado vd., (2015)'in yaptığı çalışmada enginar köklerinden inülin tipi fruktranların ultrason destekli ekstraksiyonu etanol ile çöktürme ile desteklenmiş ve fruktan veriminin %70 olduğu bildirilmiştir. Etanolle çöktürme ile desteklenen ultrason destekli ekstraksiyonda fruktan verimleri yüksek olmasına rağmen, etanolün ekstraksiyon

sırasında kullanılması düşük seçicilik ve toksik etki yaratabilmektedir (Streimikyte vd., 2022). İnülin tipi fruktan ES'nin ekstraksiyon verimini etkileyen deneysel parametreler Bölüm 4.2.1'de verilmiştir.

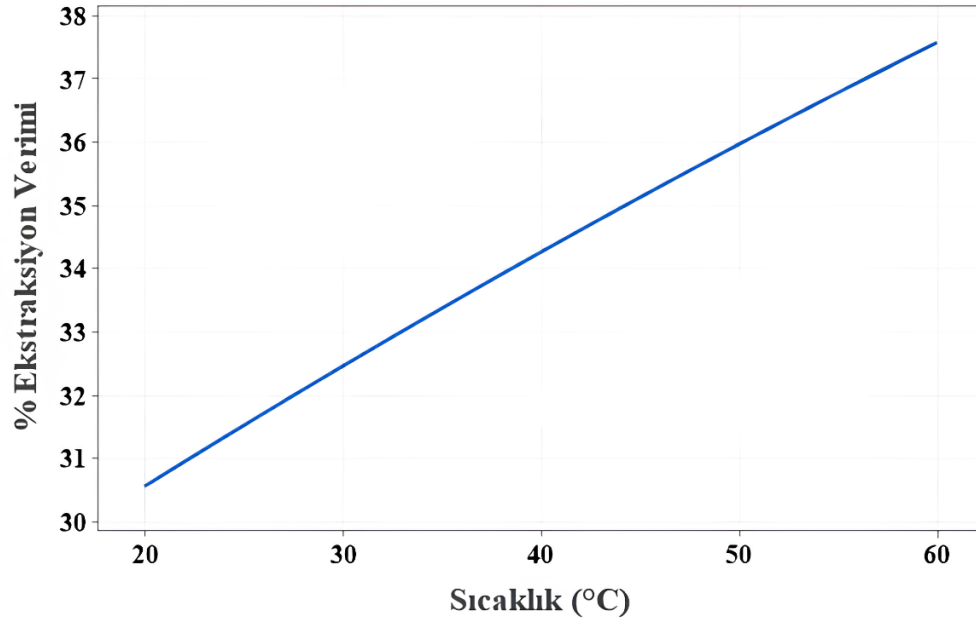
Çizelge 4.1. İnülin tipi fruktan ES'nin farklı koşullarda ekstraksiyon verimi.

Deneme	X ₁ :Sıcaklık (°C)	X ₂ : Çiriş:su oranı (a/h)	X ₃ :Süre (dakika)	Deneysel değerler (%)	Tahmin edilen değerler
1	20(-1)	24(0)	30(1)	35,55±0,07	34,33
2	40(0)	24(0)	20(0)	34,26±0,25	34,26
3	20(-1)	36(1)	20(0)	29,48±0,35	30,89
4	40(0)	12(-1)	30(1)	43,59±0,27	44,57
5	40(0)	36(1)	30(1)	31,43±0,35	31,23
6	60(1)	36(1)	20(0)	35,77±0,77	35,52
7	60(1)	12(-1)	20(0)	44,94±0,32	43,52
8	60(1)	24(0)	10(-1)	38,04±0,06	39,25
9	60(1)	24(0)	30(1)	36,76±0,35	37,17
10	40(0)	36(1)	10(-1)	37,85±0,22	36,86
11	40(0)	24(0)	20(0)	34,31±0,17	34,26
12	40(0)	12(-1)	10(-1)	34,60±0,30	34,79
13	20(-1)	24(0)	10(-1)	28,52±0,18	28,10
14	20(-1)	12(-1)	20(0)	33,93±0,27	34,16
15	40(0)	24(0)	20(0)	34,23±0,52	34,26

4.2 Tepki Yüzeyi Metodolojisi ile Ekstraksiyon Optimizasyonu

4.2.1 Sıcaklık, süre ve çözücü konsantrasyonunun ekstraksiyon üzerine etkisi

E. spectabilis köklerinden inulin tipi fruktanların ultrason destekli ekstraksiyonun sıcaklık, konsantrasyon ve süre parametrelerinin optimizasyonu Tepki Yüzeyi Metodolojisi kullanılarak incelenmiştir. Box Bhenken deney dizaynı aracılığıyla belirlenen konsantrasyonlar (Çizelge 3.5) test edildiğinde; sıcaklığın (Şekil 4.1), çiriş:su oranının (Şekil 4.2) ve sürenin ekstraksiyon verimi üzerine etkisi Şekil 4.3'de verilmiştir.



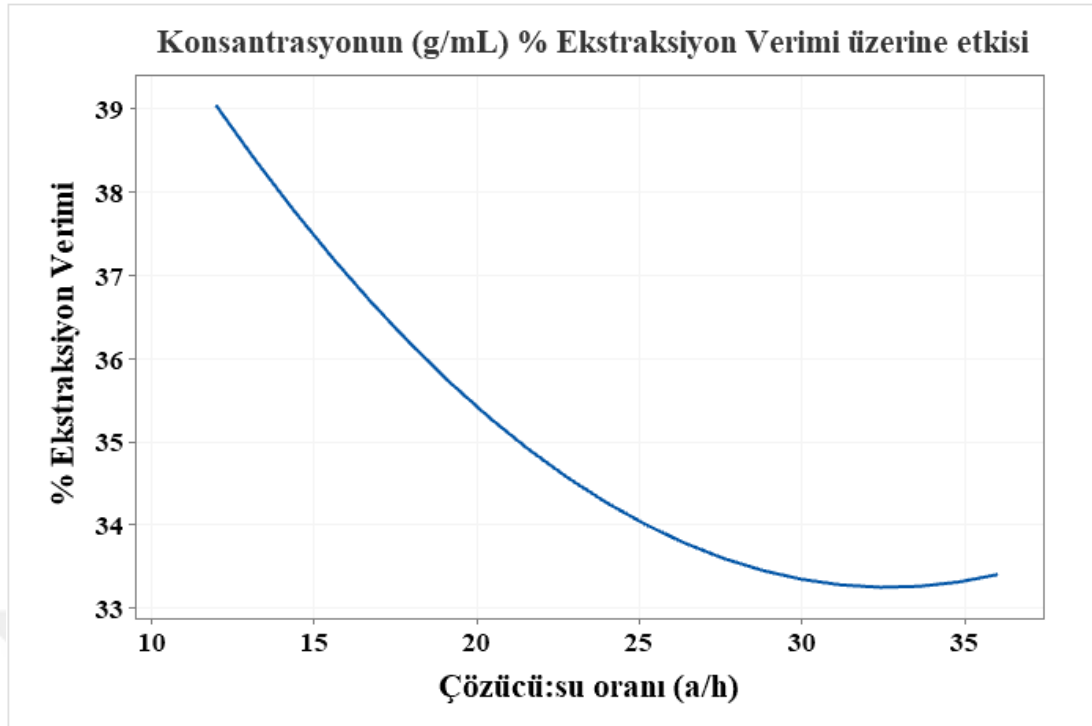
Şekil 4.1. Sıcaklığın inülin tipi fruktan ES ekstraksiyonu üzerine etiksi.

Isıya duyarlı bileşiklerin ekstraksiyonunda sıcaklık en önemli etken olarak bildirilmiştir (Malinovska vd., 2015). Ekstraksiyon esnasında sıcaklığın artmasıyla birlikte çözücü difüzyon hızı ve kütle transferinin yoğunlaşması bileşenlerin çözünmesine neden olmaktadır. Malinovska vd. (2015) ekstraksiyon sıcaklığı 20°C'den 50°C'ye yükseldiğinde meyve ve sebzelerden ekstrakte edilen oligosakaritlerin konsantrasyonu $5,90 \pm 0,23$ 'ten $7,55 \pm 0,32$ g/100 g kuru ağırlığa yükseldiğini raporlamışlardır. Jiang vd. (2009) logan meyvesi perikarpından oligosakkaritlerin ultrason destekli ekstraksiyonun parametrelerini optimize ederek optimum sıcaklığın 65°C olarak tespit etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada Elecampane (*Inula helenium* L.) köklerinden inülin ekstraksiyonunda sıcaklığın 80°C'ye artırılması verimi %20,63 artırdığı rapor edilmiştir. Ancak yüksek sıcaklıklar, elecampane köklerinde suda çözünür polisakkaritlerin tahrip olmasına yol açabilmektedir. Bu bağlamda ekstraksiyon sıcaklığının 60°C'nin üzerine çıkması halihazırda mobilize edilmiş oligosakkaritlerin eş zamanlı ayrışmasını ve bitki matrisinde hala mevcut olan oligosakkaritlerin bozunmasına sebep olabileceği belirtilmiştir (Malinovska vd., 2015). Fruktooligosakkaritlerin en iyi hidrolizinin 60°C'de gerçekleştiği sıcaklık yükseltildiğinde ise buharlaşma yoluyla çözücü kaybı

olduğu için ekstraksiyon işleminin maliyeti artırdığı bildirilmiştir (Matusek vd., 2009).

E. spectabilis bitkisinden yapılan ekstraksiyonda sıcaklık değerinin 20°C'den 60°C'ye yükselmesi verim üzerinde lineer bir verim artışına neden olmuştur (Şekil 4.1). Sıcaklık parametresinin ekstraksiyon üzerindeki etkisi literatür çalışmalarıyla uyumlu bulunmuştur. Ancak 60°C üzerindeki sıcaklıklar inülin tipi fruktan verimini olumlu etkilemesine rağmen istenmeyen maddelerin ekstraksiyonunu artırabileceği ve inülin tipi fruktanların basit şekarlere parçalanmasına sebep olabileceği bildirilmiştir (Redondo-Cuenca vd., 2021).

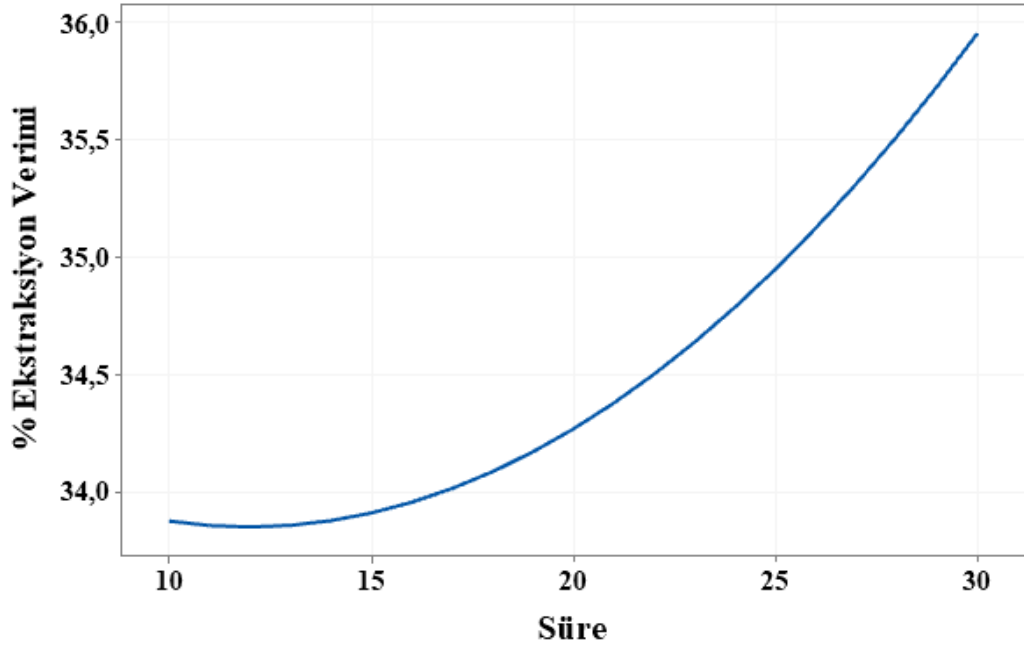
Numune/su oranındaki artış; enerji transferini, kavitasyon hızının ve uygulanan ultrason gücündeki yoğunluğu olumsuz yönde etkilemektedir (Esmaeili vd., 2021). Numunelerin yeterince çözünmemesi veya seyreltilmiş bir ekstraksiyon ortamı, ultrason gücünün bitki kök hücre duvarlarına yeterli etki ve kavitasyon oluşturmamasını engelleyebilmektedir (Dzah ve Dzigbor, 2023; Marhamati vd., 2020). Flores Girón vd. (2016) yaptıkları bir çalışmada Agave (*Agave tequilana*) bitkisinden fruktan ekstraksiyonu için en uygun konsantrasyonun 10 mL/g olduğunu raporlamışlardır. Benzer bir şekilde Sağcan vd. (2024) hindiba köklerinden inülin ekstraksiyonu çalışmasında, en düşük sıvı-katı oranının (10:1 mL/g) ekstraksiyonda en yüksek inülin verimi ile sonuçlandığı raporlamışlardır. Fu vd. (2018) *Codonopsis pilosula* köklerinden elde edilen inülin tipi fruktanın maksimum verimini araştırdıklarında, su/numue oranının 40mL/g'dan 60mL/g'a çıkarmaları ekstraksiyon verimini yalnızca 0,16 artırdığını bulmuşlardır. Bu bağlamda daha fazla sulu çözelti konsantrasyonu kullanmak güç, zaman ve ekonomik açıdan olumsuz etki yaratmaktadır. *E. spectabilis* bitkisinden yapılan ekstraksiyonda numune/su oranı 1:10 seviyesinden 1:36 seviyesine artırıldığında ekstraksiyon veriminde düşüş gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar *E. spectabilis* köklerinden elde edilen inulin tipi fruktanın sulu ortamda kolay çözünebileceğini göstermekte ve literatür çalışmalarıyla da uyumluluk göstermektedir. Bu veriler ekonomik açıdan daha düşük konsantrasyonlarda ekstraksiyon prosedürün sağlanmasının endüstriyel ölçekte uygulamaya daha elverişli olduğunu desteklemektedir.



Şekil 4.2. Çözücü miktarının (mL) % ekstraksiyon verimi üzerine etkisi.

Ultrason destekli prebiyotik ekstraksiyonunda zaman parametresi bitkisel prebiyotik kaynağına göre değişiklik göstermekle beraber diğer ekstraksiyon yöntemlerine kıyasla kısa sürede yüksek verim elde etmeyi hedeflemektedir (Jovanovic-Malinovska vd., 2015; L. Tang vd., 2023). Ultrason destekli ekstraksiyon metodunda ekstraksiyon süresi arttıkça ortamda istenmeyen bileşiklerin artma riski de ortaya çıkmaktadır (Hernández-Hernández vd., 2012). Tang vd. (2023) hindistan cevizi kabuklarından oligosakkarit ekstraksiyonu çalışmasında maksimum verimini 5. dakikada gözlemlemişlerdir. Malinovska vd. (2015)'nin yaptıkları bir çalışmada 10. dakikadan sonra oligosakkaritlerin ekstraksiyonunun 30.dakikaya kadar sabit bir kuru madde ($7,33 \pm 0,22$ g/g) içerdiğini belirlemişlerdir. Benzer bir şekilde Rahim vd. (2022) sarımsak tozundan elde ettikleri fruktooligosakkaritlerde 15 dakikalık sonikasyon işleminde %7,19'luk maksimum verim elde etmişlerdir. Ultrasonik süre arttıkça 20 dk civarında maksimum seviyede oligosakkarit verimi Lin vd. (2016) yaptıkları çalışmada ultrasonik süre yaklaşık 20 dk verim maksimum seviyeye ulaşırken, 20. dakikadan sonra oligosakkaritler bozulduğu için verimin düştüğünü tespit etmişlerdir. Çalışmamızda *E. spectabilis* bitkisinden yapılan ekstraksiyonda 10-15 dakikaları arasında verimin lineer olarak arttığı, 15-30 dakika arasında ise

sadece %2'lik verim artışı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Süre parametresi UDE optimizasyonu çalışmasında tek başına anlamlı ($P = 0,085$) bir etki göstermemektedir. Bu veriler ekonomik açıdan daha kısa sürede ekstraksiyon prosedürün sağlanmasının endüstriyel ölçekte uygulamaya daha elverişli olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.3. Sürenin % ekstraksiyon verimi üzerine etkisi.

4.2.2 Box Bhenken tasarımı ile inülin tipi fruktan ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu

E. spectabilis bitki kökünden inülin tipi fruktan ekstraksiyon parametrelerini optimize etmek için yüzey RSM Box Bhenken tasarımındaki (Çizelge 3.5) koşullar test edilmiştir. Deney parametreleri kuadratik modeller ile tasarıma uygulandığında anlamlı sonuçlar elde edilmiştir ($R^2 = 0,9660$). Yanıt değişken parametrelerinin her biri için ikinci dereceden kuadratik polinom modeli oluşturulmuştur (Eş. 4.1).

$$Y = 12,01 + 0,540X_1 - 0,048X_2 + 1,031X_3 - 0,00049X_1^2 + 0,01358X_2^2 + 0,00646X_3^2 - 0,00492X_1 * X_2 - 0,01039X_1 * X_3 - 0,03209X_2 * X_3 \quad (4.1)$$

Y: tahmin edilen ekstraksiyon verimini, X1: Sıcaklık (°C), X2 Çişiş:su oranı (a/h), X3: Süre (dakika) ifade etmektedir.

Polinom denklemi, tüm ekstraksiyon parametreleri için uygulandığında elde edilen tahmini % ekstraksiyon verimleri Çizelge 4.2’de belirtildiğı üzere deneysel verilerle uyumluluk göstermiştir. İnulin tipi fruktanın *E. spectabilis* bitkisinden ekstraksiyonu için Box Bhenken tasarımı ve kuadratik modele göre oluşturulan optimizasyona ait ANOVA verileri Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. İnulin ekstraksiyonu için kuadratik modele göre oluşturulan ANOVA verileri.

	Sum of squares (Kareler Toplamı)	DF	Mean square (Ortalamanın Karesi)	F-değeri	P-değeri Prob> F(Olasılık)
Model	267,91	9	29,77	15,79	0,004
X₁-Sıcaklık	98,09	3	98,09	52,03	0,001
X₂-Konsantrasyon	63,44	1	63,44	33,65	0,002
X₃-Süre	8,62	1	8,618	4,57	0,086
X₁X₁	0,14	1	0,14	0,07	0,797
X₂X₂	14,13	1	14,13	7,49	0,041
X₃X₃	1,54	1	1,54	0,82	0,407
X₁X₂	5,58	1	5,58	2,96	0,146
X₁X₃	17,28	1	17,28	9,16	0,029
X₂X₃	59,33	1	59,33	31,47	0,002
Error	9,43	5	1,89		
Lack-of-Fit	9,42	3	3,14	1973,62	0,001
Pure Error	0,00	2	0,00		
Total	277,34	5			

DF (serbestlik derecesi), değışkenler için benzer değerlere sahip belirli bir çalışmanın tasarlanan modelde tekrarlanma sayısı ile belirlenir

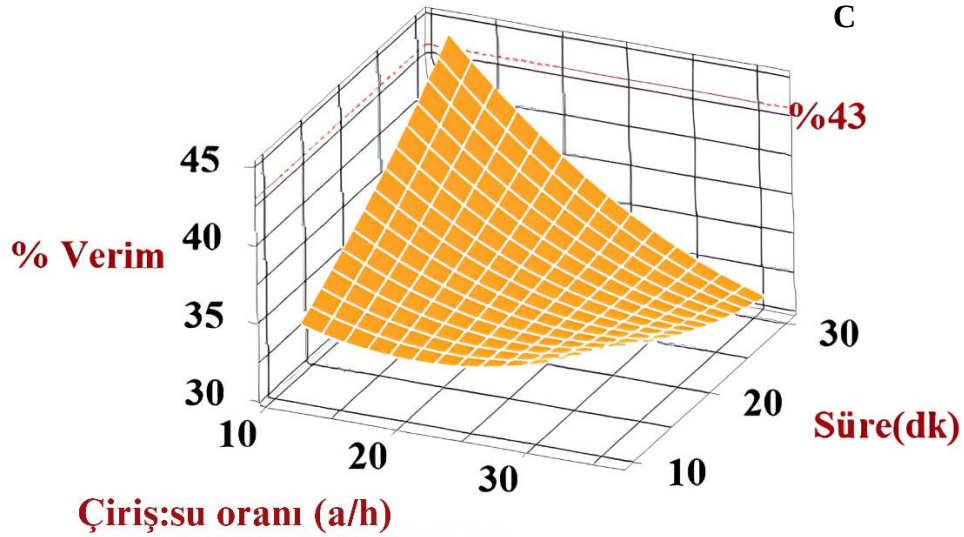
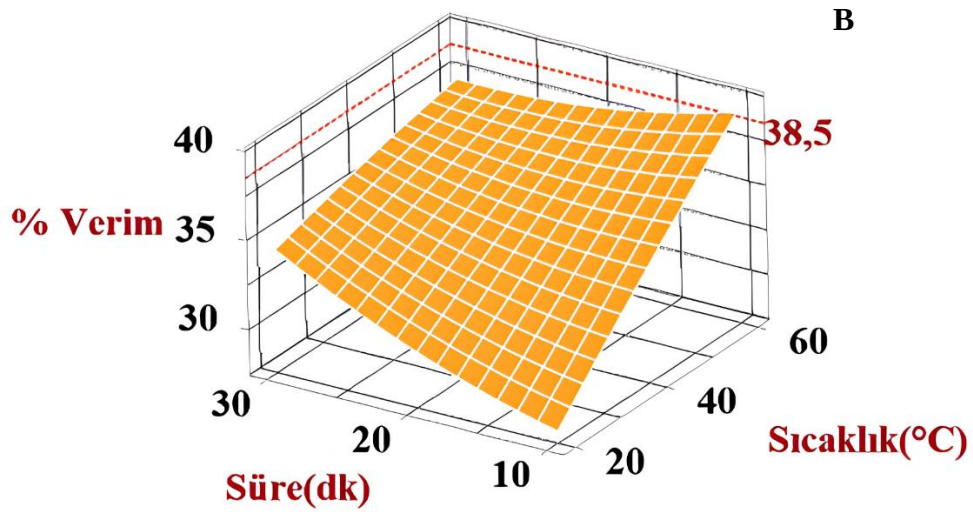
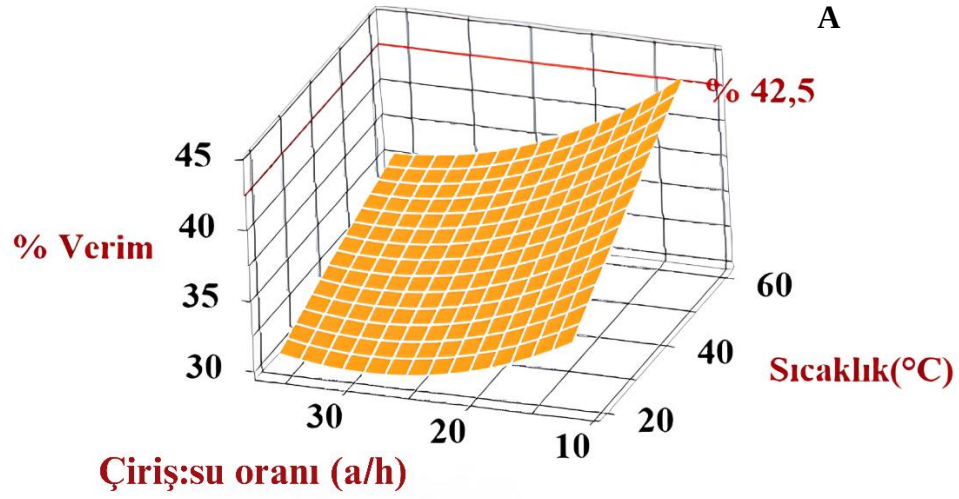
F değeri, gruplar arasındaki değışkenliğin grup içindeki değışkenliğe oranıdır.

P değeri, testlerinde elde edilen istatistiksel değerlerin anlamlılığını belirlemek için kullanılan istatistiksel ölçüdür.

ANOVA (Analysis of Variance), genellikle gruplar arasındaki farklılıkları veya gruplar arasındaki ortalamalar arasındaki anlamlı farkları tespit etmek için kullanılan istatistiksel bir yöntemdir (Zondervan-Zwijnenburg vd., 2022). ANOVA'daki *P* değeri, test edilen değişkenlerin, verilerdeki rastgelelikle karşılaştıran bir F testinden elde edilen istatistiksel ölçüdür. Bu değer, test edilen parametrelerin etki üzerindeki önemini belirlemek için kullanılmaktadır (Sandhu vd., 2021). *P* değeri, yapılan test üzerindeki etkisini belirlemek için kullanılan bir kriterdir. *P* değeri 0,05'ten küçük olduğunda, test edilen gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu kabul edilmektedir. *P* değeri 0,05'ten büyükse, test edilen etkinin verilerde istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ve hipotezin üzerinde bir etkisinin olmadığı kabul edilmektedir (Chakkerla vd., 2016; Quatto vd., 2022).

Çizelge 4.2 incelendiğinde, modelin istatistiksel anlamlılığını belirten F değeri ve buna karşılık gelen *P* değeri verilmiştir. Modelin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir ($F=15,79$, $P=0,004$). Modelin sahip olduğu $P=0,004$ değerindeki uyum eksikliği, modelin X_1 , X_2 ve X_3 değişkenlerinin herhangi bir kombinasyonu altında inülin tipi fruktan verimini tahmin etmek için yeterli olduğunu doğrulamaktadır. Lineer etkiler (X_1 , X_2 , X_3) incelendiğinde, sıcaklık, süre ve konsantrasyon parametrelerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir ($P<0,05$). Kare etkiler incelendiğinde (X_1*X_1 , X_2*X_2 , X_3*X_3) sadece X_2*X_2 (çiriş:su oranının karesi) anlamlı bulunmuştur ($P=0,041$). İki değişken arasındaki etkileşimler incelendiğinde X_1*X_3 , X_2*X_3 değerlerinin anlamlı; sırasıyla, $P=0,029$, $P=0,002$, X_1*X_2 değeri ($P=0,146$ anlamlı olmadığı yani ekstraksiyon verimine etkisinin düşük olduğu anlaşılmaktadır).

RSM analizinde R^2 değeri, modelin veri setindeki modelin tahmin gücünü ve doğruluğuna dair bilgi vermektedir. Daha yüksek R^2 değeri genellikle daha doğru bir model ile ilişkilendirilmektedir. Yapılan RSM çalışmasında modelin R^2 değeri 96,60 ile yüksek bir model performansı sergilemiş ve toplam varyasyonların yalnızca %3,4'ünün model tarafından açıklanamayacağını göstermektedir.

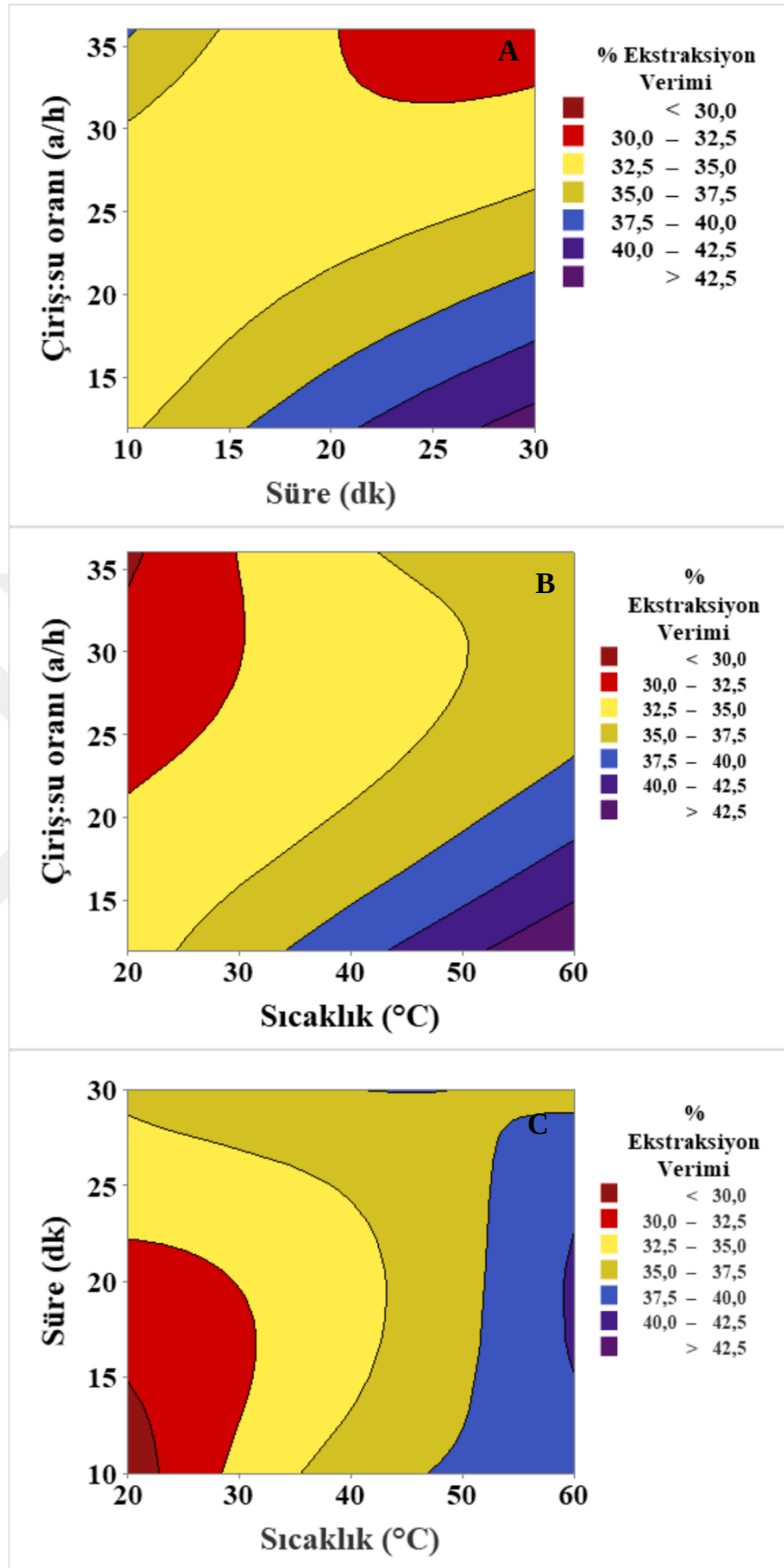


Şekil 4.4. İkili faktörler arasındaki etkileşimlerin 3 boyutlu tepki yüzey grafikleri, 4.4A: Sıcaklık (°C) – Çişiş:su oranı (a/h); 4.4B: Sıcaklık (°C) – Süre (dk); Süre (dk) – Çişiş:su oranı (a/h) etkileşimini göstermektedir.

Üç boyutlu RSM grafikleri, deney tasarımındaki bir parametrenin sıfır seviyesinde (deneme aralığının merkez noktasında) sabit tutulup diğer iki parametrenin interaktif etkilerinin test cevabı üzerindeki etkilerini incelemeyi kolaylaştırmaktadır (Giordano ve Saporta, 2007).

Bağımsız değişkenlerin ekstraksiyon verimi üzerindeki interaktif etkileri incelendiğinde (Şekil4.4); ekstraksiyon sıcaklığının numune/su oranı ile ikili ilişkisi anlamlı olmadığı ($P = 0,146$) tespit edilmiştir.

- Ekstraksiyon süresinin sıfır noktasında (24 dk) sabit tutulduğunda, ekstraksiyon sıcaklığının ($^{\circ}\text{C}$) ve çiriş:su oranının (a/h), inülin tipi fruktan ekstraksiyonun yüzde verimi üzerindeki etkileri Şekil 4.4A grafiğinde verilmiştir. Grafik incelendiğinde ekstraksiyon süresi 20 dk'da sabit tutulduğu koşulda, ekstraksiyon sıcaklığının ($^{\circ}\text{C}$), çiriş:su oranı ile interaktif etkileri anlamlı olmadığı ($P = 0,146$) tespit edilmiştir. Konsantrasyondaki değişiklik, sıcaklığın çözeltideki dağılımda bir etkisi olmayacağı için verim üzerinde bir değişiklik beklenmemesiyle açıklanmaktadır.
- Ekstraksiyon çiriş:su oranının sıfır noktasında (1/24) sabit tutulduğunda, ekstraksiyon sıcaklığının ($^{\circ}\text{C}$) ve süresinin (dakika), inülin tipi fruktan ekstraksiyonu yüzde verimi üzerindeki etkileri Şekil 4.4B grafiğinde verilmiştir. Grafik incelendiğinde ekstraksiyon konsantrasyonu 1:24 sabit tutulduğu koşulda, ekstraksiyon sıcaklığının artması ve sürenin (dakika) azalmasıyla inülin tipi fruktanın ekstraksiyonun yüzde veriminde anlamlı ($P = 0,029$) bir artış olduğunu ortaya koymaktadır.
- Ekstraksiyon sıcaklığı 30°C 'de sabit tutulduğu sıfır noktasında, ekstraksiyon süresinin ve çiriş:su oranının interaktif ilişkisi Şekil 4.4C grafiğinde verilmiştir. Grafik incelendiğinde ekstraksiyon sıcaklığı $30 (^{\circ}\text{C})$ ' de sabit tutulduğu koşulda, sürenin artması ve çiriş:su oranının azalmasıyla inülin tipi fruktan ekstraksiyonun yüzde veriminde anlamlı ($P = 0,002$) artış olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.5. İkili faktörler arasındaki etkileşimlerin contour plot grafikleri, 4.4A: Sıcaklık (°C) – Çişiş:su oranı (a/h); 4.4B: Sıcaklık (°C) – Süre (dk); Süre (dk) – Çişiş:su oranı (a/h) etklileşimini göstermektedir.

Contour plot grafikleri, üç boyutlu verilerin iki boyutlu olarak incelenebilmesine olanak sağlamaktadır.

X ve Y eksenindeki değişkenler (sıcaklık (°C), çirış:su oranı (a/h), süre (dakika) interaktif ilişkisinin, Z eksenindeki (% ekstraksiyon verimi) üzerindeki etkileri Şekil 4.5' de verilmiştir. Contour plot grafikleri incelendiğinde;

- Şekil 4.5A'da verilen ekstraksiyon süresinin (dakika) ve çirış:su (a/h) oranının interaktif ilişkisi incelendiğinde; maksimum yüzde ekstraksiyon verimi mor bölge ile ifade edilmiş olup %42,5'ten büyük olduğu gözlenmiştir. Bu bağlamda, sürenin artması ve çirış:su oranının azalmasıyla ekstraksiyon yüzde verimi üzerinde anlamlı ($P = 0,002$) bir artış olduğunu göstermiştir.
- Şekil 4.4B'de verilen çirış:su oranı (a/h) ve sıcaklığın (°C) interaktif ilişkisi incelendiğinde; maksimum yüzde ekstraksiyon verimi mor bölge ile ifade edilmiş olup %42,5'ten büyük olduğu gözlenmiştir. Ancak bu veriler anlamlı bulunmamıştır ($P = 0,146$). Bu durum; çirış:su oranındaki değişikliğin, sıcaklığın çözeltideki dağılımında etkisi olmayacağı için verim üzerinde bir değişiklik beklenmemesiyle açıklanmaktadır.
- Şekil 4.4C'de verilen ekstraksiyon süresinin (dakika) ve sıcaklığın (°C) interaktif ilişkisi incelendiğinde; maksimum ekstraksiyon yüzde verimi mor bölge ile ifade edilmiş olup %42,5 den büyük bulunmuştur. Bu bağlamda, ekstraksiyon işlemi sıcaklığın yükselmesiyle, sürenin orta seviyelerinde gerçekleştiğinde yüzde ekstraksiyon verimi üzerinde anlamlı ($P = 0,029$) bir artış gözlemlenmiştir.

Minitab-19 programı aracılığıyla yapılan tüm optimizasyon verileri dahilinde, maksimum % ekstraksiyon veriminin gerçekleştiği deneysel veriler Çizelge 4.3'te, optimizasyon sonucu çoklu yanıt tahmini ise Çizelge 4.4' te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Maksimum ekstraksiyon koşulları ve % ekstraksiyon verimi.

Deney modeli	Sıcaklık (°C)	Çişiş:su oranı (a/h)	Süre (dakika)	%Ekstraksiyon verimi
7	60	1:12	20	44,94

Çizelge 4.4. Minitab çoklu yanıt tahminine göre ekstraksiyon koşulları ve % ekstraksiyon verimi.

Parametreler		Değerler		
Sıcaklık (°C)		60		
Çişiş:su oranı (a/h)		1:12		
Süre (dakika)		30		
Response (yanıt)	Fit (Uyum)	SE fit (Standart hata)	%95 CI (Güven aralığı)	%95 PI (Tahmin aralığı)
% Ekstraksiyon verimi	46,98	1,62	(42,81; 51,15)	(41,52; 52,45)

Box Bhenken deney dizaynı aracılığıyla belirlenen (Çizelge 3.6) 15 deneme deseni test edilmiştir. En yüksek yüzde ekstraksiyon verimi model 7 de verilen; 60 (°C), 1:12 (a/h), 20 dk koşulları altında gerçekleşmiş olup %44,94 inülin tipi fruktan ekstraksiyonu verimi elde edilmiştir (Çizelge 4.3). Minitab çoklu yanıt tahminine göre (Çizelge 4.4) en yüksek ekstraksiyon veriminin; 60 (°C), 1:12 (a/h), 30 dk koşulları altında %41,52 ile 52,45 aralığında tahmin edilmiş ve verimin %46,98 olacağı program tarafından belirlenmiştir. Bu deney modeli test edildiğinde ekstraksiyon verimi %46,02 tespit edilmiştir. Bu sonuçlar optimizasyonun doğruluğunu ve güvenilirliğini göstermektedir.

Bitkisel kaynaklı prebiyotik ekstraksiyonunun optimizasyonu; ekstraksiyon yöntemine, bitkinin türüne, toplanma zamanına ve bitki bölümüne göre değişiklik göstermekle beraber ekstraksiyonu etkileyen değişken koşulların interaktif ilişkileri de verimi etkilemektedir. Prebiyotiklerin ekstraksiyon koşullarının optimize

edilmesine yönelik literatür çalışmaları incelendiğinde; Pourfarzad vd. (2015) İran pazarından temin edilen çiriş kök tozlarından ultrason destekli prebiyotik ekstraksiyonun optimizasyonunu test ettiklerinde; sıcaklığın 60°C, sürenin 30dk, sonikasyon genliğinin %79,97 olarak test edildiği optimum ekstraksiyon koşullarında maksimum ekstraksiyon veriminin %59,97 olduğunu raporlamışlardır. Benzer ekstraksiyon koşullarının test edildiği Lingyun vd. (2007)'nin yapmış olduğu çalışmada, yer elmasından inülin ekstraksiyonunda optimum koşullar 76,65°C, 20 dk ve 10:1 mL/g sıvı-katı oranı olarak bildirmiştir. Bu bağlamda azalan konsantrasyonlarda, yükselen sıcaklık seviyesinde ve orta seviyedeki süre koşulları altında yüzde ekstraksiyon veriminin elde edilmesi tez çalışmasıyla uyumluluk göstermektedir.

4.3 İnülin Tipi Fuktan ES'nin Kimyasal Karakterizasyonu

4.3.1 Polimerizasyon derecesinin belirlenmesi

Prebiyotik oligosakkaritlerin zincir uzunluğu yani polimerizasyon derecesi (PD), oligosakkarit kaynağına, hasat zamanına ve depolama süresine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. İnülin tipi fruktanlar, β -(2-1)-glikozidik bağlarla bağlı olan fruktoz zincirlerdir ve polimerizasyon derecesi 3-60 arasında değişmektedir (Pompei vd., 2008; Tarone vd., 2021).

Polimerizasyon derecesi, toplam karbonhidrat miktarının toplam indirgeyici şeker miktarına oranıyla tespit edilmiştir. İnülin tipi fruktan ES'nin bütün model denemeleri incelendiğinde; polimerizasyon derecesi 32 ± 2 ile 58 ± 1 arasında değişiklik göstermektedir. Optimum ekstraksiyon koşullarında ekstrakte edilen ve tez çalışmasında kullanılan inülin tipi fruktan ES'lerin polimerizasyon derecesinin ise 57 ± 1 zincir uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir.

Pompei vd. (2008) yaptıkları çalışmada inülin tipi fruktan (PD>10) ve kontrollü hidroliz ile inülinin hindiba köklerinden elde edilen oligofruktozların (OF) (PD 2-9) polimerizasyon derecesinin bifidobakteriler ile laktobasiller üzerindeki prebiyotik etkisi araştırılmıştır. Bu araştırmacılar *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus*'un 12 saatlik fermantasyonu test edildiğinde, OF içeren besiyeri ortamında HSI içeren besiyeri ortamına kıyasla bakteri canlılıklarının daha fazla olduğu ancak 48 saatlik

fermantasyon sonrası HSI içeren besiyeri ortamında OF içeren besiyeri ortamına kıyasla daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar zincir uzunluğu arttıkça prebiyotiklerin probiyotik bakteriler tarafından metabolize edilme hızlarının düşmesini ancak uzayan fermentasyon koşullarında yüksek PD seviyelerindeki oligosakkaritlerin probiyotik bakteriler tarafından daha çok kullanıldığını göstermektedir (Tarone vd., 2021; Van de Wiele vd., 2007). Yapılan tez çalışmasında inülin tipi fruktan ES'nin yüksek polimerizasyon derecesine sahip olması, yoğurt gibi fermente gıda ürünlerinde kullanıldığında ortamdaki faydalı mikroorganizmaların gelişimini uzun süre destekleyeceği için gıda katkı maddesi olarak kullanılması önerilmektedir.

4.3.2 İnülin tipi fruktan ES'nin suda çözünürlüğünün belirlenmesi

Dondurularak kurutulmuş tozların suda çözünürlük değeri, inülin gibi prebiyotiklerin gıdalarda ve sinbiyotik uygulamalarda kullanımı termal stabiliteyi artırmaktadır. Aynı zamanda depolama ve gıda matrislerine salınma sırasındaki stabilite için suda çözünürlük önemli görülmektedir (Dantas vd., 2021). Prebiyotiklerin suda çözünürlüğü, probiyotik bakteriler tarafından faydalı kısa zincirli yağ asitlerine fermente olmalarını kolaylaştırarak metabolik süreçlere, glikoz homeostazına ve bağırsak mikrobiyom sağlığına yardımcı olacağından önemli bulunmaktadır (Mundi vd., 2017; Tarone vd., 2021).

Liyofize inulin tipi fruktan ES'nin suda çözünürlük değeri Bölüm 3.2.4.4'de anlatıldığı gibi belirlenmiş ve % suda çözünürlük değeri $88,05 \pm 0,3$ olduğu tespit edilmiştir.

Fruktooligosakkaritler yüksek suda çözünürlük değerine sahip prebiyotiklerdir. Hazır toz içecekler için uygun olup ürün çözünürlüğünü artırmaktadırlar (Sebastián vd., 2019). İnulin tipi fruktan ES'nin suda çözünürlüğü $88,05 \pm 0,3$ değeri ile yüksek seviyede çözünürlük göstermiştir. Bu sonuçlar *E. spectabilis*'den ekstre edilen inülin tipi fruktan ES'nin gıda uygulamalarında kolay dağılımı sayesinde yüksek aktivite gösterebileceği göstermektedir.

Liu vd., (2021) yaptıkları çalışmada, ultrason destekli ekstraksiyon sonrası liyofilize edilen *Platycodon grandiflorus* bitki kök tozunun $89,8 \pm 1,18$ suda çözünürlük

indeksi gösterdiği tespit edilmiştir. Benzer bir çalışma olan dondurularak kurutma işlemiyle elde edilen *Hericium erinaceum* tozlarının suda çözünürlük indeksi $53,1 \pm 2,37$ olarak belirlenmiştir. Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde, liyofilize inulin tipi fruktan ES'nin suda çözünürlük indeksi çalışmalarla uyumlu bulunmuş ve bazı bitki köklerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Gıda uygulamalarında kullanımı için oldukça avantajlı olabilecek inulin tipi fruktan ES'nin tüketim sonrasında probiyotik bakteriler tarafından kolay fermente edilebileceği düşünülmektedir.

4.3.3 İnülin tipi fruktan ES'nin su tutma kapasitesi (STK) ve yağ tutma kapasitesi (YTK)'nin belirlenmesi

Prebiyotik bileşiklerin su tutma kapasiteleri;

- Bağırsaklarda su emilimini artırmasına ve gaitanın yumuşak olmasına yardımcı olarak bağırsak hareketlerini düzenler ve kabızlık probleminin önlenmesine yardımcı olmaktadır (McBurney vd., 1985).
- Probiyotik bakteriler tarafından fermentasyona uğramalarını sağlayarak yararlı bağırsak bakterilerinin gelişimini desteklemektedir (Windey vd., 2014).
- Yüksek su tutma kapasitesine sahip prebiyotik bileşikler tokluk hissini artırarak kilo kontrolüne yardımcı olmaktadır (Cheng vd., 2020).
- Bağırsakta enterositlerin çoğalmasını teşvik ederek minerallerin emilimine destek olmaktadır (Scholz-Ahrens vd., 2007).
- Termal stabiliteyi dengeleyerek gıdalarda depolama stabilitesini artırmaktadır (Schmitz vd., 2021).
- Sinbiyotik olarak prebiyotik kullanımında, su tutma kapasitesi mikrokapsüllerde depolama stabilitesini iyileştirmektedir (Verruck vd., 2018).

Prebiyotik bileşiklerin yağ tutma kapasite yetenekleri;

- Gıda uygulamalarında, pişirme sırasında gıdalardaki yağ kaybını azaltmak, emülsiyonları stabilize etmek ve raf ömrünü iyileştirmektedir (Elleuch vd., 2011).

Liyofilize inülin tipi fruktan ES'nin STK ve YTK değerleri Bölüm 3.2.4.5'de verilen metoda göre test edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.5 de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Liyofilize inulin tipi fruktan ES'nin STK ve YTK değerleri.

	Su tutma kapasitesi (g/g)	Yağ tutma kapasitesi (g/g)
İnülin tipi fruktan ES	6,71±0,12	4,80±0,01

Phat vd., (2015) yaptıkları çalışmada *Hericum erinaceum* bitkisinin farklı seviyelerde öğütülen 4 toz örneğinin su tutma kapasiteleri incelendiğinde; maksimum su tutma kapasitesini 7,56±0,15 g/g olarak düşük seviyede öğütülen tozda (5000 rpm) minimum su tutma kapasitesinin ise 4,81±0,04 g/g yüksek seviyede öğütülen (9000rpm) tozda olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar yapılan bu çalışmadaki öğütme işlemi tozların partikül boyutunun küçülmesine buna bağlı olarak da partiküllerin daha az su tutmasına sebep olduğunu belirtmişlerdir. Ahududu diyet liflerinin su ve yağ tutma kapasitelerinin araştırıldığı çalışmada, toplam diyet lifi ve çözünebilir diyet liflerinin su tutma kapasiteleri; 5,3±0,3 g/g ve 10,4±0,4 g/g, yağ tutma kapasiteleri ise 3,9±0,5 g/g ve 1,6±0,1 g/g olarak tespit edilmiştir (Baenas vd., 2020). İnülin tipi fruktan ES'nin liyofilize tozlarının yapılan bu çalışmaya kıyasla daha az su tutma kapasitesi sergilemesi uygulanan ekstraksiyon yönteminin, kaynağın ve partikül boyutunun farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Tez çalışmasına benzer bir çalışma olan ultrason destekli ekstraksiyon yöntemiyle portakal kabuğundan elde edilen prebiyotik kaynaklarının su tutma kapasiteleri 8,52±0,23 g/g ve yağ tutma kapasitesi 7,78±0,29 g/g olarak belirlenmiştir (Zhou vd., 2023). Su ve yağ tutma kapasiteleri prebiyotik bileşenin parçacık boyutu ile

ilişkilidir. Daha küçük parçacık boyutları daha fazla yüzey alanına sahip olacağından su ve yağı daha fazla absorplama yeteneği göstermektedir. Ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi düşük parçacık boyutlu bileşenlerin elde edilmesinde avantajlı bir yöntemdir. Yapılan literatür çalışmaları incelendiğinde farklı metotlar kullanılarak farklı su tutma ve yağ tutma kapasitesi tespit edilmiştir. Tez çalışmasında araştırmalarda ise inülin tipi fruktan ES'nin su tutma ($6,71 \pm 0,12$ g/g) ve yağ tutma kapasitesi ($4,80 \pm 0,01$ g/g) benzer metotlar uygulayan araştırmalardan elde edilen sonuçlar ile uyumlu ve yüksek bulunmuştur.

4.3.4 İnulin tipi fruktan ES'nin nem içeriğinin belirlenmesi

Köklerden sağlanan prebiyotiklerin nem içeriği, bitki türüne ve formülasyonuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Prebiyotikler ilave edildikleri gıdalarda ve sinbiyotik ürünlerde nem içeriğini etkilemektedir. (Zheng ve Li, 2009). Bağırsak sağlığını ve genel refahı teşvik etmek amacıyla kökten ekstre edilen prebiyotiklerin etkinliğini sağlamak için nem seviyelerinin doğru ölçümü ve kontrolü önemli görülmektedir. Gıdalardaki nem içeriği, gıdanın kalitesini, tadını, dokusunu ve raf ömrünü etkilemektedir. Düşük seviyedeki nem içeriği, gıdadaki su aktivitesini azaltmakta bu da mikrobiyal büyümeyi ve bozulmayı kontrol altına almada önemli bulunmaktadır (Cruz-Paredes vd., 2021).

Liyofilize inulin tipi fruktan ES'nin nem içeriğini belirlemek için yapılan çalışmada 4 saat kurutma işleminden sonra tartılan alüminyum plağın ağırlığı 0,9423 g, 30 dk sonrası tartılan ağırlık 0,9407 g ve ağırlığın sabit seyrettiği seviye ise 0,9405 olarak tespit edilmiştir. Eş. 3.5'e göre örneklerin nem değerleri yüzdece hesaplanarak nem miktarı $\% 6,18 \pm 0,12$ olarak belirlenmiştir.

Hilman vd., (2018)'nin yaptıkları çalışmada, gembili kökünden ultrason destekli ekstraksiyon sonrası gembili kök tozlarının nem içeriğini $\%11,48$ olarak tespit etmişlerdir. Prebiyotik inülin kaynağı olarak en çok tercih edilen hindiba kök tozunun nem içeriği ise $\%5$ olarak bulunmuştur. Pourfarzad vd., (2015) liyofilize çiriş tozlarının nem içeriğini $\%6,5$ olarak belirlemiştir. Literatür çalışmaları incelendiğinde inulin tipi fruktan ES'nin nem içeriği gıda ürünlerinde kullanımı açısından avantajlı olacağı ön görülmektedir. Düşük nem oranına sahip inulin tipi

fruktan ES'nin eldesindeki en önemli etken liyofilizasyon işlemi olduğu düşünülmektedir. Liyofilizasyon işlemi, *E. spectabilis* ekstrelerinde bulunan nemi önce dondurulur ardından süblimleştirilerek sıcak hava ile kurutma sırasında ekstredeki nemi buharlaşma ile uzaklaştırmaktadır.

4.3.5 İnulin tipi fruktan ES'nin şişme kapasitesinin belirlenmesi

Şişme kapasitesi, belirli malzemelerin önemli miktarlarda su veya diğer sıvıları emme ve tutma yeteneğini ifade etmektedir. Prebiyotiklerin şişme kapasitesi, gıda uygulamalarında işlevsellik ve etkinlik açısından önemli bir parametredir. Araştırmalar, prebiyotik bileşenlerin şişme kapasitesinin probiyotik bakteri canlılığı ve etkinliği üzerinde etkisi olduğunu göstermektedir (Huq vd., 2016). Aynı zamanda gıda uygulamalarında prebiyotiklerin şişme kapasitesi tüketimi sonucu tokluk süresini artırdığı ve gıdanın fiziksel özelliklerini iyileştirdiği de bildirilmiştir (Tan vd., 2016).

Liyofilize inulin tipi fruktan ES'nin şişme kapasitesi Bölüm 3.2.4.7'de anlatıldığı gibi belirlenmiş ve şişme kapasitesi 2,6 mL/g olarak tespit edilmiştir. Castañeda-Salazar vd., (2023)'nin yaptıkları çalışmada Agav fruktanlarının karakterizasyonu yapılmış ve şişme kapasitesi $0,79 \pm 0,40$ mL/g olarak bildirilmiştir. Bir başka çalışmada ahudududan elde edilen çözülebilir oligosakkaritlerin şişme kapasitesi $2,0 \pm 0,0$ mL/g olarak bulunmuştur (Baenas vd., 2020). El-Kholy vd., (2023) hindiba ve enginar köklerinden ekstre ettikleri inülin tozlarının şişme kapasitelerini sırasıyla 1,50 mL/g ve 1,75 mL/g belirlenmiştir. Bu bağlamda liyofilize inulin tipi fruktan ES yüksek şişme kapasitesi göstermiş olup gıda ve sağlık uygulamalarında ticari prebiyotiklere alternatif olarak kullanılabileceği öngörülmüştür.

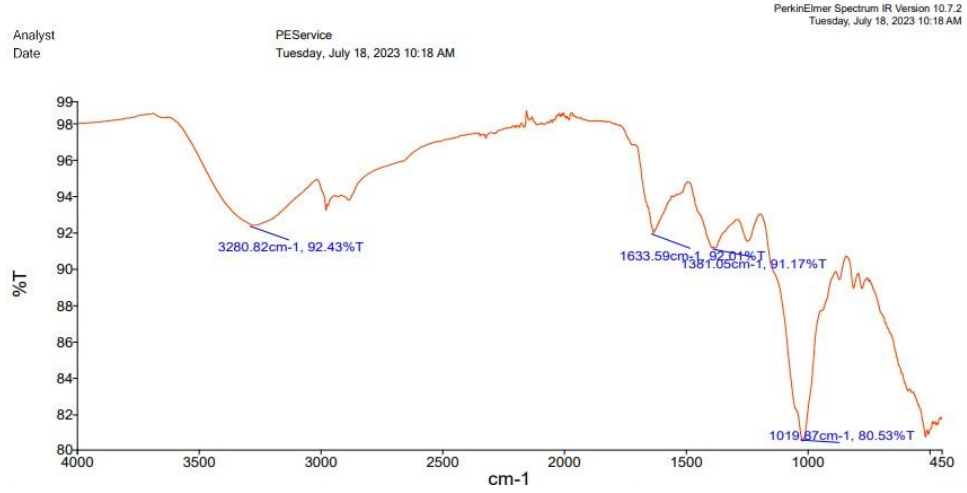
4.3.6 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi

Kızılötesi Spektrofotometresi (FTIR) analizi, fonksiyonel grupların varlığına dayalı olarak polisakkaritlerin hızlı bir şekilde tanımlanması için uygun bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Polisakkaritlerin içerdiği -OH gruplarının geometrisinden ve karbon iskeletindeki C-O, C-C ve C-H bağlarının konfigürasyonundan yararlanılarak polisakkarit yapısı hakkında bilgi edinilebilmektedir.

İnülin tipi fruktan ES'nin FTIR ile yapılarındaki temel işlevsel grupların belirlenmesi amacıyla Perkin Elmer Spectrum 100 FTIR spektroskopisinde ATR örnekleme probu kullanılarak 400 cm^{-1} - 4000 cm^{-1} frekans aralığında tarama hizmet alımı ile yapılmış ve elde edilen pikler Şekil 4.6' da vermiştir. Ayrıca, karakteristik pikler özetlenmiş ve Çizelge 4.6'de verilmiştir. $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ civarındaki geniş bant O-H eğilme titreşimlerine ait olduğu aynı zamanda karbonhidrat ve şeker halkalarına ait olan hidroksil grupları (O-H) dahil olmak üzere hidroksil gruplarının gerilmesinden kaynaklanmaktadır. $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ arasında gözlenen bant alifatik C-H bağlarının gerilme ve bükülme titreşimlerine ait olduğu belirlenmiştir. C-O gerilme titreşimlerine ait bant 1633 cm^{-1} ' de keskin bir bant olarak görülmektedir. Bu bantlar polisakkaritler için karakteristik özellik göstermektedir. 1381 cm^{-1} civarındaki bantlar fruktoz halkasındaki C-H, C-H₂ ve O-H gruplarının düzlem içi bükülme titreşimlerine ve iç deformasyonlarına ait olduğu tespit edilmiştir. Oligosakaritlerin sulu çözeltilerindeki C-O-C glikosidik bağlantısının C-O titreşimleri 1019 cm^{-1} spektral aralıkta keskin bir bant olarak tespit edilmiştir. 1550 cm^{-1} aralığında proteine karşılık gelen bantlar, 1250 cm^{-1} aralığında nükleik asitler ve 2030 cm^{-1} aralığında lipidler gözlenmemektedir. 1019 cm^{-1} aralığında belirgin bantta gözlenen spektrum C-O varlığını ifade etmektedir. Bu sonuçlar numunelerin saflığını doğrulamaktadır. *E. spectabilis* bitki köklerinden elde edilen inülin tipi fruktan ES'nin FTIR analizlerinden elde edilen sonuçlar enginar, buğday kepeği, hindiba ve bambu fruktanları için elde FTIR spektrumlarıyla benzerlik göstermektedir (Azmi vd., 2012; Velázquez-Martínez vd., 2014; Wang vd., 2009; Wu ve Lee, 2000).

Çizelge 4.6. İnülin tipi fruktan ES'nin karakteristik FTIR pikleri.

	İnülin tipi fruktan ES (cm ⁻¹)	Pik tanımı
1	3280	H-bağı yapmış ve yapmamış -OH gerilme titreşimi
2	2800-3000	-C-H gerilme titreşimleri
3	1600	Bağlı su
4	1381	C-C eğilme titreşimi
5	1200	C-O-C glikozidik bağ titreşimi
6	700-800	α-glikozidik bağ



Şekil 4.6. İnülin tipi fruktan ES'nin FTIR kromatogramları.

4.3.7 Nükleer manyetik rezonans (NMR) analizi

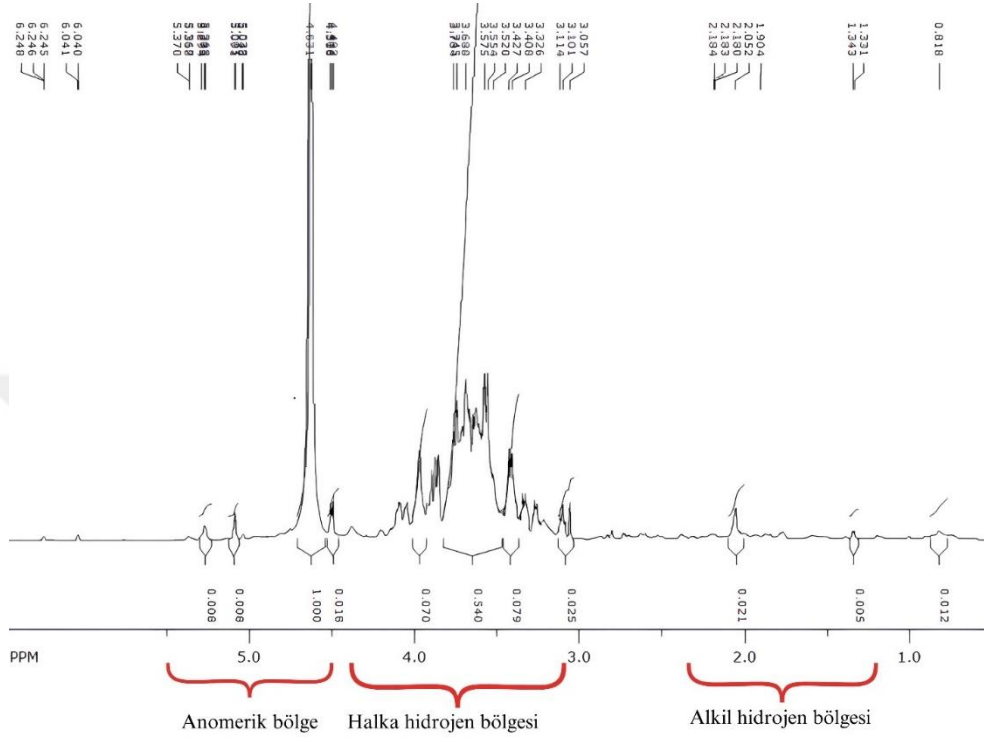
İnülin tipi fruktan ES'nin spektrum analizlerinin molekül alt birimlerinin yapısının belirlenmesi için tek boyutlu (1D) ^1H ve ^{13}C NMR spektrum analizleri hizmet alımı ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ile monomer analizi birlikte değerlendirilmiştir. İnülin tipi fruktan ES'nin proton spektromu (Şekil 4.7) incelendiğinde, anomerik bölgede 5,37 ppm seviyesinde gözlenen spekturumun alfa konfigürasyonunda olduğu belirlenmiştir. H1 NMR spektrumunda, tekrarlanan ve yüksek seviyelerde gözlenen 3,26-3,76 seviyelerindeki pikler ise tekrarlanan bir monomer birimini ifade etmektedir ($\rightarrow 1$)- β -D-Fruf-(2 $\rightarrow$ 1)- β -D-Fruf-(2 $\rightarrow$). İnülin tipi fruktan ES'nin yapısında bulunan monomerlerin hidrojenlerine ait piklerin kimyasal kayma değerleri (Çizelge 4.7) literatürlerdeki (Shan vd., 2022; Liv vd., 2018) kimyasal kayma değerleriyle uyumludur.

Çizelge 4.7. İnülin tipi fruktan ES'nin yapısında bulunan monosakkaritlerin H1 protonlarına ait kimyasal kayma değerleri.

Monomer	Kimyasal kayma değerleri (ppm)
α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$)	5,37
β -D-Fruf-(2 $\rightarrow$ 1)	3,26- 3,76

İnülin tipi fruktan ES'nin ^{13}C NMR spektrumları incelendiğinde (Şekil 4.8), anomerik karbonun karakteristik tepe noktalarını (δ 97,99) ve oksijene bağlı şeker halkası karbonlarını (δ 60,53-80,99) ve a 92,02 ppm'de bir tepe noktasını içeren altı baskın karbon sinyali gözlenmiştir. 97,99 ppm de gözlenen pik değeri ana şeker kalıntısı olan 2,1- β -D-Fruf monomer bağlantısına, 92,02 de gözlenen pik değeri ise 1- α -D-Glcp bağlantısına atfedilmiştir (Wang vd., 2022). İnülin tipi fruktan ES'nin yapısında bulunan monomerlerin ^{13}C kimyasal kayma değerleri, ticari inülin'in literatürlerdeki kimyasal kayma değerleriyle uyumludur (Çizelge 4.8). NMR

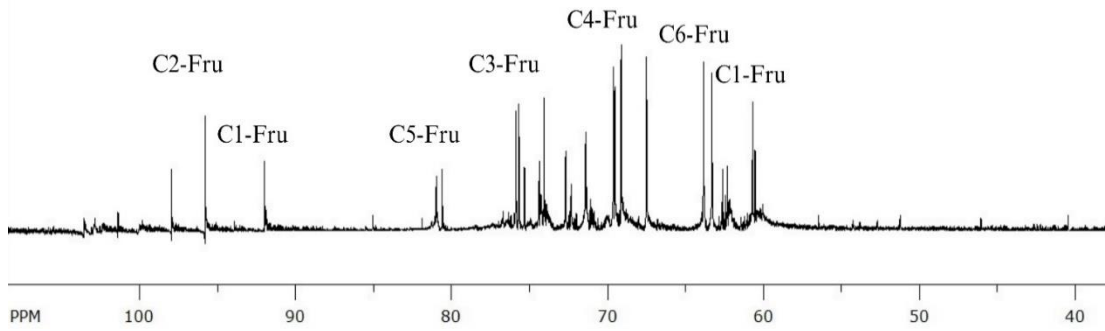
sonuçlarını değerlendirdiğimizde çiriş bitkisinden ekstrakte edilen inülin tipi fruktan ES'nin inulin tipi fruktan yapısında olduğunu önerebiliriz.



Şekil 4.7. İnülin tipi fruktan ES'nin ¹H-NMR spektrumu.

Çizelge 4.8. İnülin tipi fruktan ES'nin yapısında bulunan monosakkaritlerin C13

Karbon atomu	Kimyasal kayma (ppm)	
	İnülin tipi fruktan ES	Ticari İnülin (Franken vd., 2013)
C1	60,53	60,9
C2	97,99	103,3
C3	75,87	77,0
C4	74,07	74,3
C5	80,99	81,1
C6	63,82	62,2



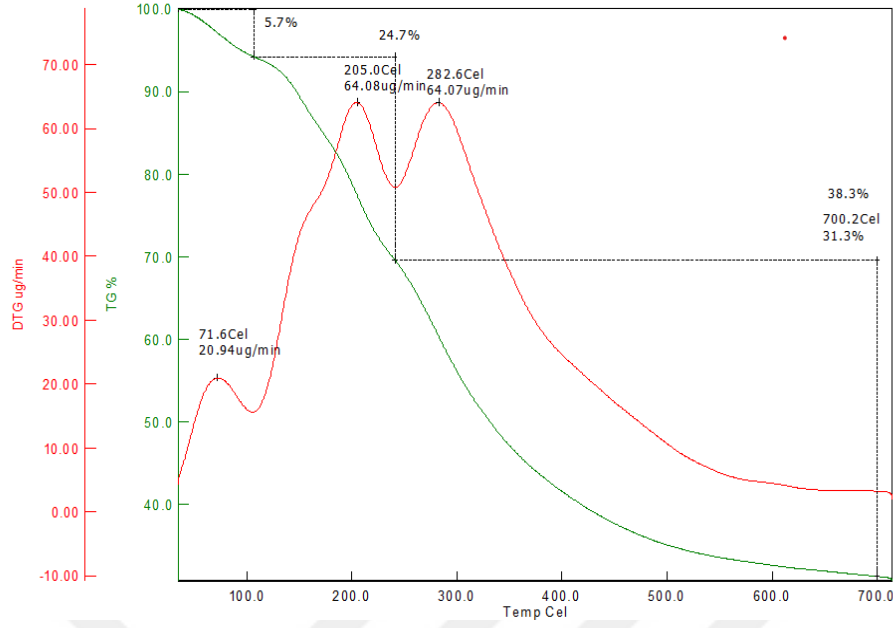
Şekil 4.8. İnülin tipi fruktan ES'ye ait 13C-NMR spektrumu

4.3.8 Termal gravimetrik analizi (TGA)

Termal gravimetrik analiz (TGA), polisakkaritlerin zamana bağlı termal kararlılığının belirlenmesinde kullanılan bir tekniktir (Tilwani vd., 2021). Termal olarak kararlı prebiyotik bileşenlerin ticari kullanımı ve gıda endüstrisi uygulamaları için önem taşımaktadır (Wang vd., 2017). İnülin tipi fruktan ES'nin TGA'ları sıcaklığa karşı kütle kaybı olarak, 30°C/dk ısıtma hızı ile 700°C'ye kadar ısıtılarak bozunma sıcaklıkları belirlenmiş, TGA spektrumları Şekil 4.9.'da verilmiştir. İnülin tipi fruktan ES'nin TGA spektrumu incelendiğinde ilk kütle kaybı %5,7 oranında 71°C'de gözlenmiştir. 100°C'nin altındaki sıcaklıklarda gözlenen kütle kaybının Bölüm 4.3.4'te tespit edilen bağlı olan suyun (%6,5) buharlaşmasıyla ilişkili olduğu

düşünülmektedir. İkinci kütle kaybı %24,7 oranında 205°C’de gerçekleştiği gözlenmektedir. İnülin tipi fruktan ES’nin 205°C’de düşük oranda termal bozulma özelliği göstermesi, sterilizasyon koşullarına (121°C’de 1 atm’de 15 dk) dayanıklı olduğunu dolayısıyla ticari besiyerlerinin içeriğinde kullanımı için uygun olduğu düşünülmektedir. Üçüncü termal bozulma 700°C’ de %38,3 oranında materyalin depolimerizasyonu nedeniyle kütle kaybı görülmektedir. İnülin tipi fruktan ES bileşeni için belirlenen erime noktaları değerlendirildiğinde, 205°C’ye kadar çıkan endüstriyel işlemlerde kullanılabileceği öngörülmektedir. Bu sıcaklığa kadar olan kütle kayıpları inülin tipi fruktan ES’nin içeriğindeki nem oranına ait olduğundan bu sıcaklığa kadar inülin tipi fruktan ES yapısında ve aktivitesinde değişim olmayacağı öngörülmektedir.

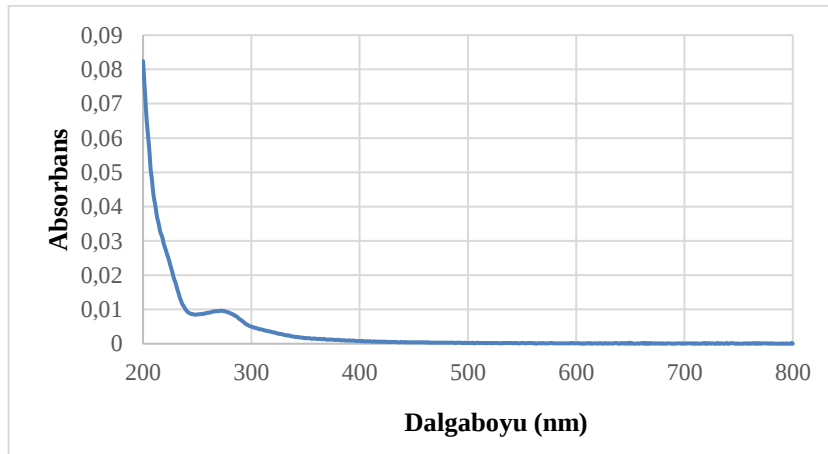
Leyva-Porras vd., (2017) dahlia köklerinden izole ettikleri inülinin TGA analizi sonucunda ilk erime sıcaklığının 137-159°C’de oksidatif ayrışmanın ise 158-172°C’de %60-65 arası kütle kaybı tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada yüksek polimerizasyon derecesine sahip inülin test edilmiş ve sırasıyla erime ile oksidatif ayrışma sıcaklığının 143-150°C ve 205-225°C olduğunu gözlemlemişlerdir. Tez çalışmasında *E. spectabilis* köklerinden izole edilen inülin tipi fruktan ES’nin dahlia inülinine kıyasla daha yüksek sıcaklıklarda oksidatif ayrışma gösterirken ticari inülin ile benzer sıcaklık oksidatif ayrışma profili gözlenmiştir. Bu durum inülin tipi fruktan ES’nin yüksek PD değerine sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.9. İnülin tipi fruktan ES'nin TGA kromotografisi.

4.3.9 Ultraviyole görünür (UV-VİS) analizi

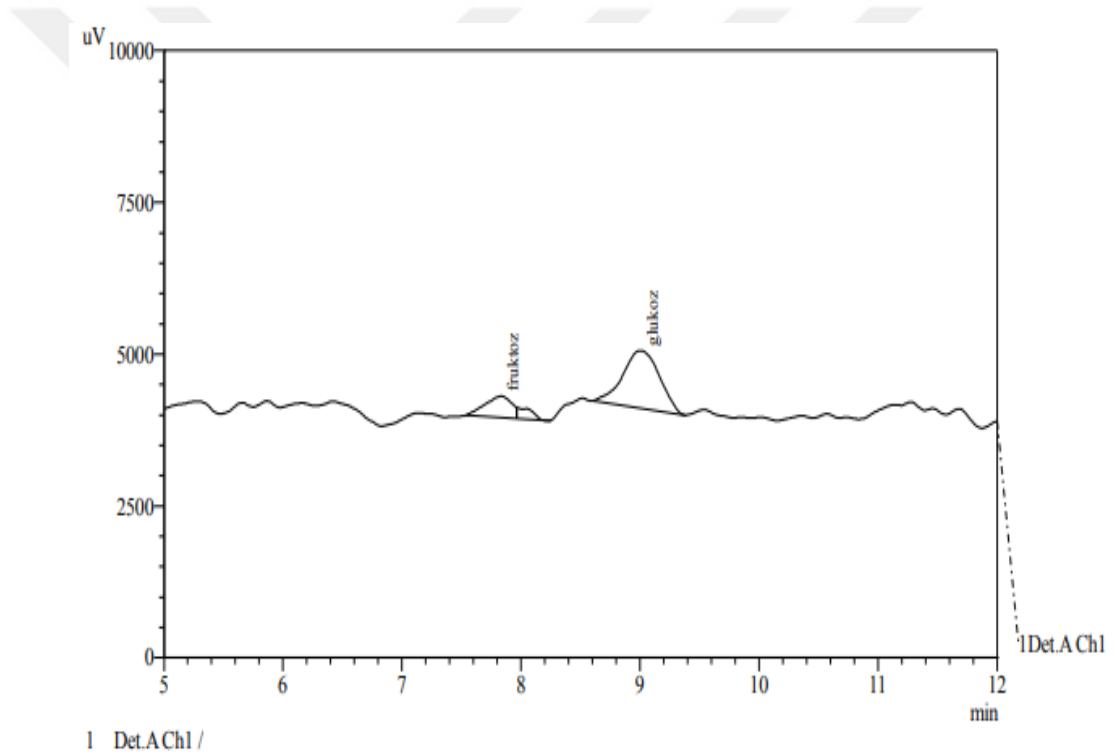
İnülin tipi fruktan ES'nin UV spektrumu, 1 mg/mL'lik numunenin ultra saf suda çözülmesi ve 190-700 nm dalga boylarında spektrofotometre (Thermo Scientific, Genesys 10s UV-VIS) ile taranmasıyla belirlenmiş ve Şekil 4.10' de verilmiştir. 240 nm dalga boyunda görülen pik inülin tipi fruktan ES'nin içeriğindeki fenolik bileşenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Li vd., 2022).



Şekil 4.10. İnülin tipi fruktan ES'nin UV spektrumu.

4.3.10 İnülin içeriğinin belirlenmesi (monomer analizi)

İnülin tipi fruktan ES'nin TFA ile hidroliz edilmiştir ardından monomer kalıntısı 2 mL saf suda çözündükten sonra hizmet alımı ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) cihazında RID dedektör ile analiz edilmiştir. HPLC analizi sonucu Şekil 4,11'da verilmiştir. Fruktoz ve glukoz standart HPLC-RID kromatogramları incelendiğinde alıkonma zamanları (Rt) fruktoz ve glukoz için sırasıyla 7, 8 dk ve 9 dk olarak belirlenmiştir. İnülin tipi fruktan ES'nin içerdiği monosakkarit bileşenlerin miktarı yüzde konsantrasyon cinsinden hesaplandığında; %39,39 fruktoz ve %60,61 glikoz bulunduğu belirlenmiştir.

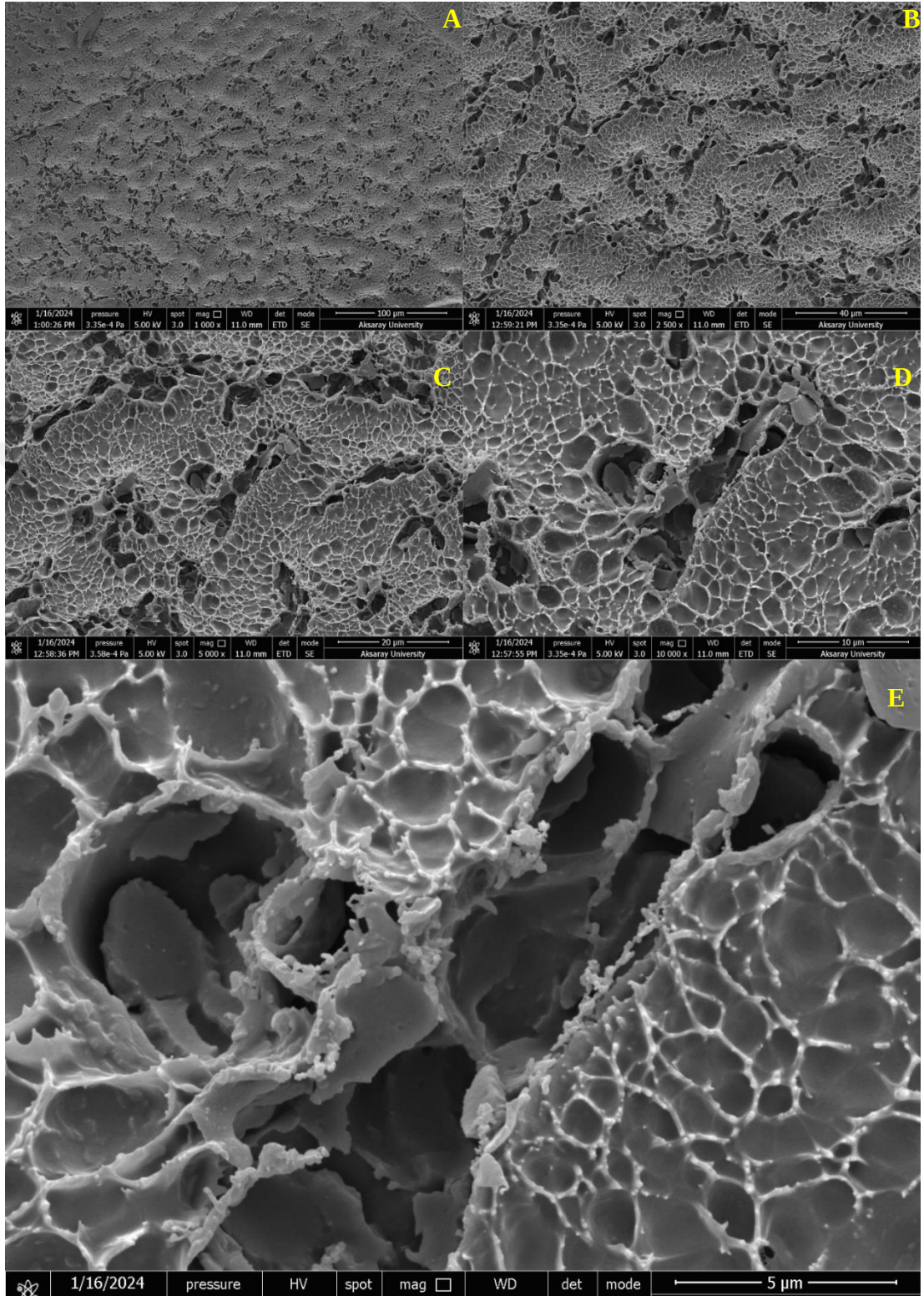


Şekil 4.11. Fruktoz ve glukoz standartları için HPLC-RID kromatogramları.

4.3.11 Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi

İnülin tipi fruktan ES'nin yüzey morfolojilerinin yüksek çözünürlükte görüntülenmesi amacıyla SEM analizi yapılmıştır. İnülin tipi frukta ES'nin SEM görüntüleri 1000X, 2500X, 5000X, 10.000X ve 20.000X büyötmeleri Şekil 4.12'de verilmiştir. İnülin tipi fruktan ES'nin SEM görüntölemesi incelendiğinde yüzey morfolojisinin pürüzlü ve gözenekli bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Kurutulmuş hindiba kökünden ekstre edilen inülinin SEM görüntülerinin incelendiğı bir çalışmada, hindiba SEM görüntüleri inülin tipi fruktan ES'nin morfolojisine benzer şekilde pürüzlü ve seyrek gözeneklere sahip olduğu bildirilmiştir (Puhlman vd., 2024).





Şekil 4.12. İnülin tipi fruktan ES'nin taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri (A)1000X, (B) 2500X, (C) 5000X, (D) 10.000X, (E) 20.000X.

4.4 İnülin Tipi Fruktan ES'nin Prebiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

4.4.1 İnülin tipi fruktan ES'nin *in vitro* fermentasyonu ve prebiyotik indeks değeri

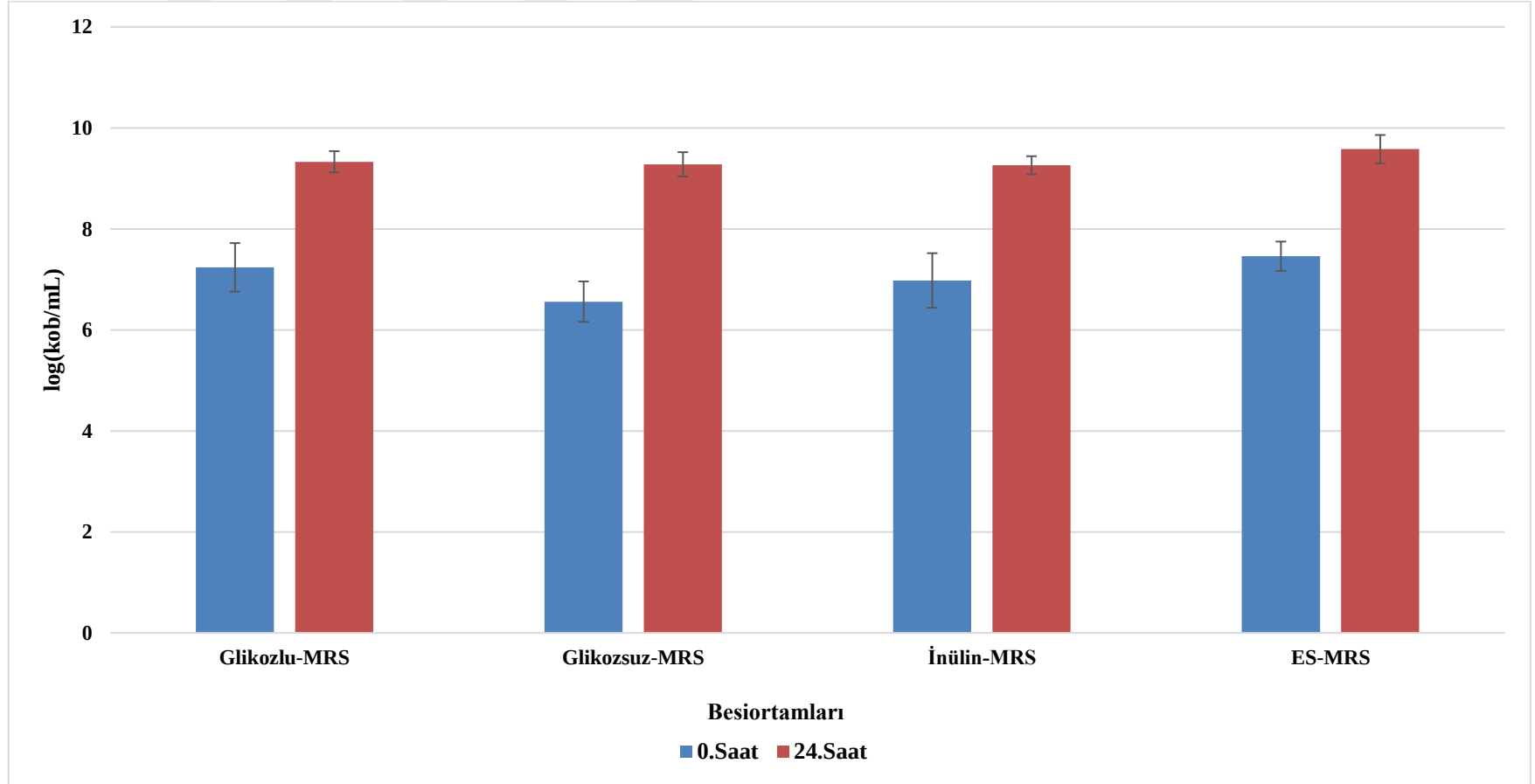
4.4.1.1 İnülin tipi fruktan ES'nin potansiyel probiyotikler tarafından fermentasyonu

Lactocaseibacillus rhamnosus ACS5, *Pediococcus acidilactici* 5008 ve *Saccharomyces cerevisiae* BD21 mayası, *E. spectabilis* köklerinden ekstre edilen inülin tipi fruktan ES'nin prebiyotik aktivitesinin araştırılmasında test bakterileri olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada test suşları inülin tipi fruktan ES içeren besi ortamında geliştirilerek probiyotik suşların fermente etme özellikleri Glikozlu-MRS, Glikozsuz-MRS ve inulinli-MRS ortamları ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

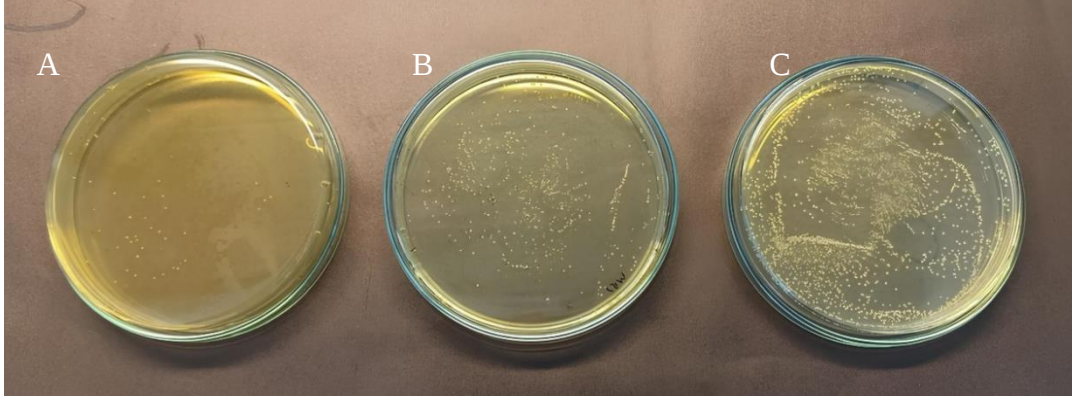
Yapılan çalışmada potansiyel probiyotik suşların (*L. rhamnosus* ACS5, *P. acidilactici* 5008 ve *S. cerevisiae* BD21) inülin tipi fruktan ES'nin fermente edebilme yetenekleri glikozu çıkarılarak yerine %2 oranında inülin tipi fruktan ES ilave edilen besi ortamında (ES-MRS) geliştirilerek araştırılmıştır. Tüm test bakterilerinin 24 saat süresince inulin tipi fruktan ES'yi fermente edilebildiği ve canlılığını sürdürdüğü tespit edilmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan glikozu tamamen çıkarılan MRS besiyeri (Glikozsuz-MRS) ile kıyaslandığında inulin tipi fruktan ES içeren MRS besiyerinde *L. rhamnosus* ACS5 suşunun 0 ve 24 saatlerindeki canlılık oranları daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan glikozlu-MRS besi ortamında 0-24 saatlik inkübasyon süresince canlılık sırasıyla; 7,24-9,33 log kob/mL ve ticari prebiyotik inülinde canlılık 6,98-9,26 log kob/mL olduğu gözlemlenmiştir. *E. spectabilis* köklerinden ekstre edilen ve prebiyotik özelliği test edilen inülin tipi fruktan ES 0-24 saatlik inkübasyon süresince pozitif kontrol ve inüline kıyasla yüksek canlılık göstermektedir (7,46-9,58 log kob/mL) (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.13). *L. rhamnosus* ACS5 suşunun inulin tipi fruktan ES içeren MRS ortamındaki üremeleri Şekil 4.14'te verilmiştir. Bu çalışma sonucunda *L. rhamnosus* ACS5 suşunun inulin tipi fruktan ES'yi fermente edebildiği ve prebiyotik indeks (PI) değerinin 1,03 olduğu belirlenmiştir. Ticari prepiyotik inulinin prebiyotik indeks değerinin (0,992) bu suş için test edilen inulin tipi fruktan ES'den biraz düşük olduğu ($1 < PI$) (Palframan vd., 2003) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.9. *L. rhamnosus* ACS5 suşunun %2 oranında inulin tipi fruktan ES, glikoz, inülin ve glikozsuz-MRS besi ortamlarındaki fermentasyon sonrası canlılıkları

<i>L.rhamnosus</i> ACS5	ES-MRS		Glikoz-MRS		Glikozsuz-MRS		İnülin-MRS	
	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD
0.saat	7,46±0,29	0,55±0,01	7,24±0,48	0,58±0,01	6,56±0,54	0,59±0,01	6,98±0,29	0,58±0,01
24.saat	9,58±0,28	1,46±0,01	9,33±0,2	1,84±0,01	9,28±0,18	0,86±0,01	9,26±0,28	0,71±0,01



Şekil 4.13. *L. rhamnosus* ACS5 suşunun %2 oranında ES, glikoz, inülin ve glikozsuz-MRS besi ortamlarındaki fermantasyon sonrası canlılıklarının karşılaştırılması.

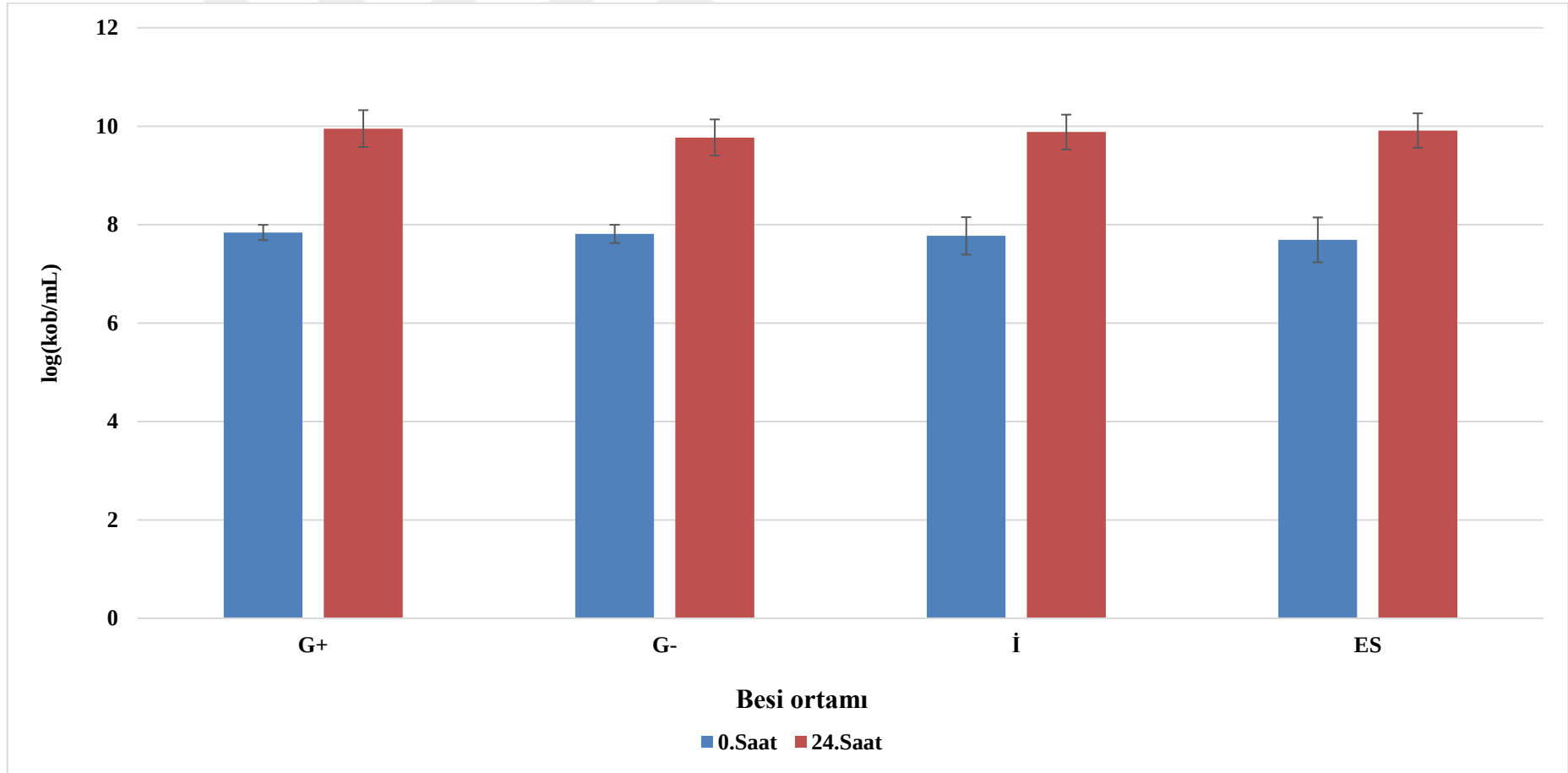


Şekil 4.14. *L. rhamnosus* ACS5 suşunun %2 ES-MRS besi ortamında fermentasyon sonrası 10^{-7} (A), 10^{-6} (B) ve 10^{-5} (C) dilisyonlarındaki kolonilerinin görüntüsü.

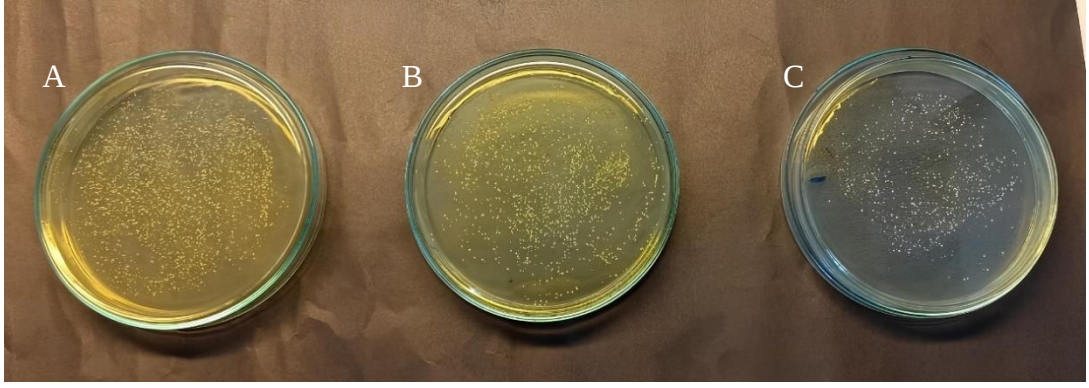
P. acidilactici 5008 suşunun inulin tipi fruktan ES, glikozlu, glikozsuz ve inülin içeren MRS besiyeri ortamlarında fermentasyonu araştırılmış ve sonuçlar Çizelge 4.10 ile Şekil 4.15'te verilmiştir. *P. acidilactici* 5008 suşunun en düşük canlılık oranı, negatif kontrol olarak kullanılan glikozsuz-MRS besi ortamında 24 saatlik inkübasyon süresince gözlemlenmiştir ($9,77 \pm 0,35$ log kob/mL). Test edilen diğer besi ortamlarının 24 saatlik fermentasyonlarının sonucu birbirine yakın olmakla beraber, pozitif kontrol olarak kullanılan glikozlu-MRS besi ortamı inülin tipi fruktan ES içeren MRS besi ortamına kıyasla (0,04 log) düşük bir farkla daha fazla canlılık göstermiştir. Bu benzerlik inulin tipi fruktan ES'nin *P. acidilactici* 5008 suşu tarafından glikoz gibi fermente edilebildiğini göstermektedir. ES-MRS ile ticari inülin içeren MRS besi ortamlarındaki canlılık değerlerinin çok yakın olduğu ve sırasıyla 24. saatteki canlılık değerleri $9,91 \pm 0,35$ kob/mL ve $9,88 \pm 0,36$ kob/mL olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.10). *P. acidilactici* 5008 suşunun inulin tipi fruktan ES içeren MRS ortamındaki üremeleri Şekil 4.16'da verilmiştir. Bu çalışma sonucunda *P. acidilactici* 5008 suşunun inulin tipi fruktan ES'yi fermente edebildiği ancak prebiyotik indeks (PI) değerinin 0,996 olduğu (PI<1, Palframan vd., 2003) belirlenmiştir. Prebiyotik indeks değeri ticari prebiyotik inulin için ise 0,992 olarak bulunmuş olup inulin tipi fruktan ES ve ticari inulinin *P. acidilactici* 5008 suşunun gelişimini glikoz karbon kaynağı kadar desteklediği sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 4.10. *P. acidilactici* 5008 suşunun %2 oranında inulin tipi fruktan ES, glikoz, inülin ve glikozsuz-MRS besi ortamlarındaki fermentasyon sonrası canlılıkları

<i>P. acidilactici</i> 5008	ES-MRS		Glikoz-MRS		Glikozsuz-MRS		İnülin-MRS	
	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD
0.saat	7,70±0,46	0,58±0,01	7,7,85±0,15	0,59±0,01	7,81±0,17	0,59±0,01	7,77±0,46	0,59±0,01
24.saat	9,91±0,35	1,45±0,01	9,95±0,36	1,87±0,03	9,77±0,35	0,840±0,03	9,88±0,36	1,26±0,01



Şekil 4.15. *P. acidilactici* 5008 suşunun %2 oranında ES, glikoz, inülin ve glikozsuz-MRS besi ortamlarındaki fermantasyon sonrası canlılıkların karşılaştırılması.x

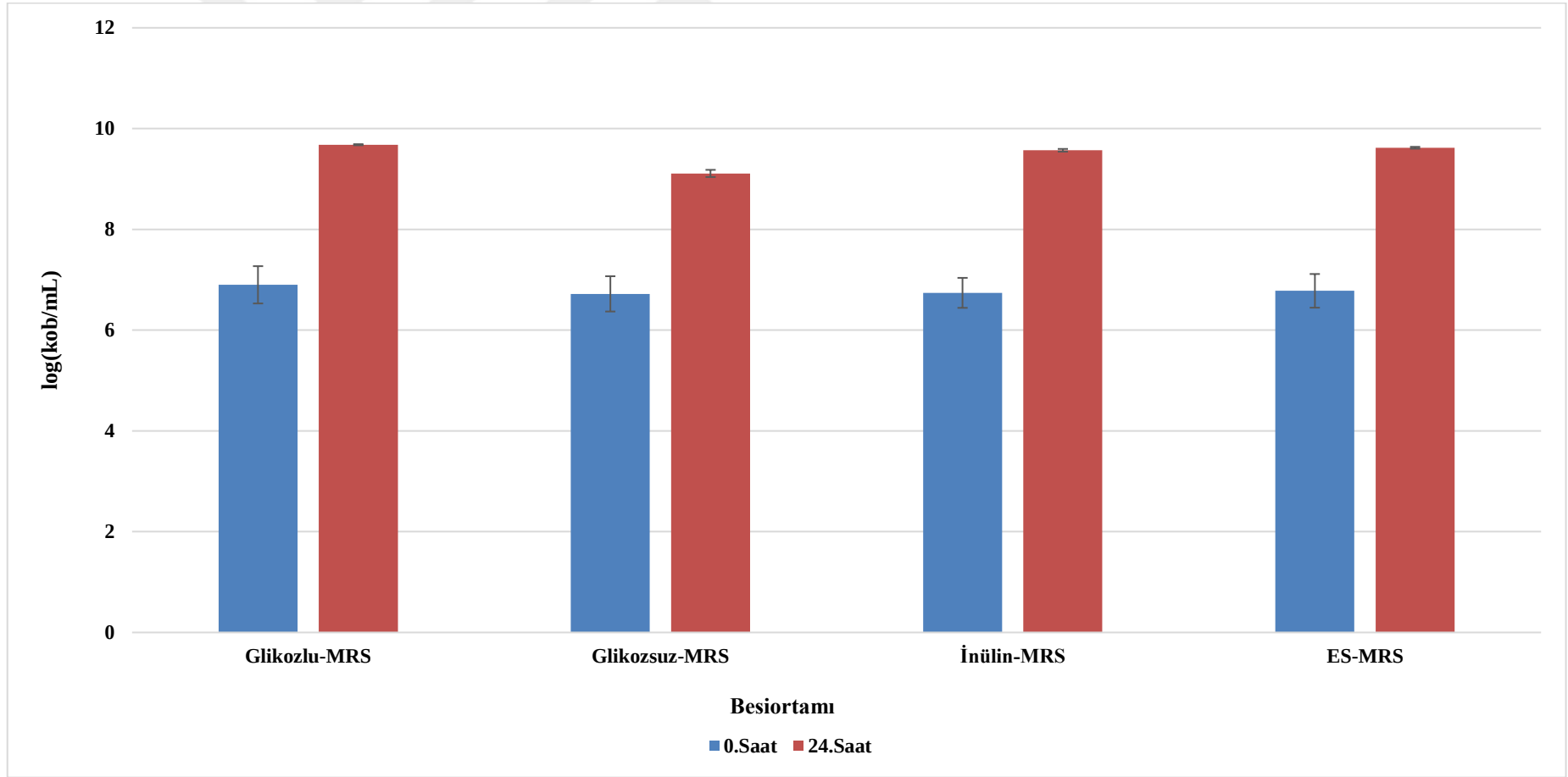


Şekil 4.16. *P. acidilactici* 5008 suşunun %2 ES-MRS besi ortamında fermentasyon sonrası 10^{-5} (A), 10^{-6} (B) ve 10^{-7} (C) dilüsyonlarındaki kolonilerinin görüntüsü.

S. cerevisiae BD21 mayasının inulin tipi fruktan ES, glikoz ve inülini fermentasyonu araştırılmış ve sonuçlar Çizelge 4.11 ile Şekil 4.17’de verilmiştir. *S. cerevisiae* BD21 maya suşunun negatif kontrol olarak kullanılan glikozsuz-YEPD besi ortamında 0-24 saatlik inkübasyon süresince fermentasyona bağlı gelişimin inulin tipi fruktan ES, inülin ve glikoz içeren besi ortamlarından düşük olduğu ($9,57 \pm 0,03$ log kob/mL) tespit edilmiştir. Pozitif kontrol olarak test edilen glikozlu-YEPD besi ortamında fermentasyon sonucu en yüksek canlılık $9,68 \pm 0,07$ (log kob/mL) olarak tespit edilmiştir. ES-YEPD besi ortamındaki fermentasyon sonucu canlılık değeri ticari inülin ile aynı değerde canlılık göstermekle beraber glikozlu-YEPD besi ortamından 0,06 log daha düşük bir canlılık değeri ($9,62 \pm 0,02$) gösterdiği tespit edilmiştir. ES-YEPD besi ortamında *S. cerevisiae* BD21 suşunun glikozlu YEPD besi ortamı ile benzer canlılık oranları gösterdiği ve inulin tipi fruktan ES’yi glikoz gibi fermente edebildiği belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda *S. cerevisiae* BD21 mayasının inulin tipi fruktan ES’yi fermente edebildiği ancak prebiyotik indeks (PI) değerinin 0,994 olduğu (PI<1, Palframan vd., 2003) belirlenmiştir. Prebiyotik indeks değeri ticari prebiyotik inulin için ise 0,989 olarak bulunmuş olup inulin tipi fruktan ES ve ticari inulinin *S. cerevisiae* BD21 mayasının gelişimini glikoz karbon kaynağı kadar desteklemektedir.

Çizelge 4.11. *S. cerevisiae* BD21 suşunun %2 oranında ES, glikoz, inülin ve glikozsuz-YEPD besi ortamlarındaki fermentasyon sonrası canlılıkları.

<i>S. cerevisiae</i> BD21	ES-YEPD		Glikoz-YEPD		Glikozsuz-YEPD		İnülin-YEPD	
	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD
0.saat	6,78±0,33	0,60±0,01	6,90±0,35	0,58±0,03	6,72±0,30	0,58±0,02	6,74±0,33	0,60±0,03
24.saat	9,62±0,02	1,19±0,02	9,68±0,07	1,40±0,06	9,11±0,03	0,78±0,03	9,57±0,02	0,79±0,03



Şekil 4.17. *S. cerevisiae* BD21 suşunun %2 oranında ES, glikoz, inülin ve glikozsuz-YEPD besi ortamlarındaki fermantasyon sonrası canlılıklarının karşılaştırılması.

4.4.2 Liyofilize inülin tipi fruktan ES'nin bağırsak patojen mikroorganizmaları tarafından fermentasyonun belirlenmesi

Prebiyotik bileşikler bağırsak mikroflorasındaki yararlı mikroorganizmaların gelişimini desteklerken patojen mikroorganizmalar tarafından kullanılmamaları gerekmektedir. Bu doğrultuda inülin tipi fruktan ES'nin bağırsak patojeni mikroorganizmalar tarafından (*E. coli* ATCC 11229, *E. coli* ATCC 35218 ve *E. faecalis* ATCC 29212) fermente edilme yeteneği araştırılmış ve sonuçlar Çizelge 4.12 ile Şekil 4.18'te verilmiştir. Test edilen patojen mikroorganizmaların canlılık oranları incelendiğinde; *E. coli* ATCC 11229, *E. coli* ATCC 35218 ile *E. faecalis* 29212 suşlarının en yüksek canlılık oranı glikozlu-M9 besi ortamında gözlemlenmiştir ve sırasıyla $9,39 \pm 0,35$ log kob/mL, $9,42 \pm 0,30$ log kob/mL ile $9,67 \pm 0,25$ log kob/mL olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.12). *E. coli* ATCC 11229 suşu ES-M9 besi ortamında ticari inülin-M9 besi ortamına benzer canlılık oranı göstermektedir (sırasıyla; $8,81 \pm 0,13$ log kob/mL, $8,93 \pm 0,13$ log kob/mL) ve bu canlılık değeri pozitif kontrol olan glikoz-M9 besi ortamına göre düşüktür. *E. coli* ATCC 35218 suşunun en düşük canlılık değeri ($8,57 \pm 0,30$ log kob/mL) glikozsuz-M9 da olduğu belirlenmiştir. İnulin tipi fruktan ES'nin *E. coli* ATCC 35218 suşu tarafından fermentasyonu incelendiğinde; ticari inüline kıyasla 0,09 log daha az canlılık değeri ile $9,46 \pm 0,22$ log kob/mL tespit edilmiş ve pozitif kontrol olan glikozlu-M9 besi ortamına göre daha az fermentasyona uğramıştır. *E. faecalis* ATCC 29212 suşu diğer test patojen mikroorganizmalarına benzer şekilde glikozsuz-M9 besi ortamında en düşük canlılık değerine sahiptir ($8,70 \pm 0,21$ log kob/mL) ve inülin tipi fruktan ES, glikozlu ile inülin-M9 besi ortamlarına kıyasla daha az canlılık değerine sahiptir (Şekil 4.18).

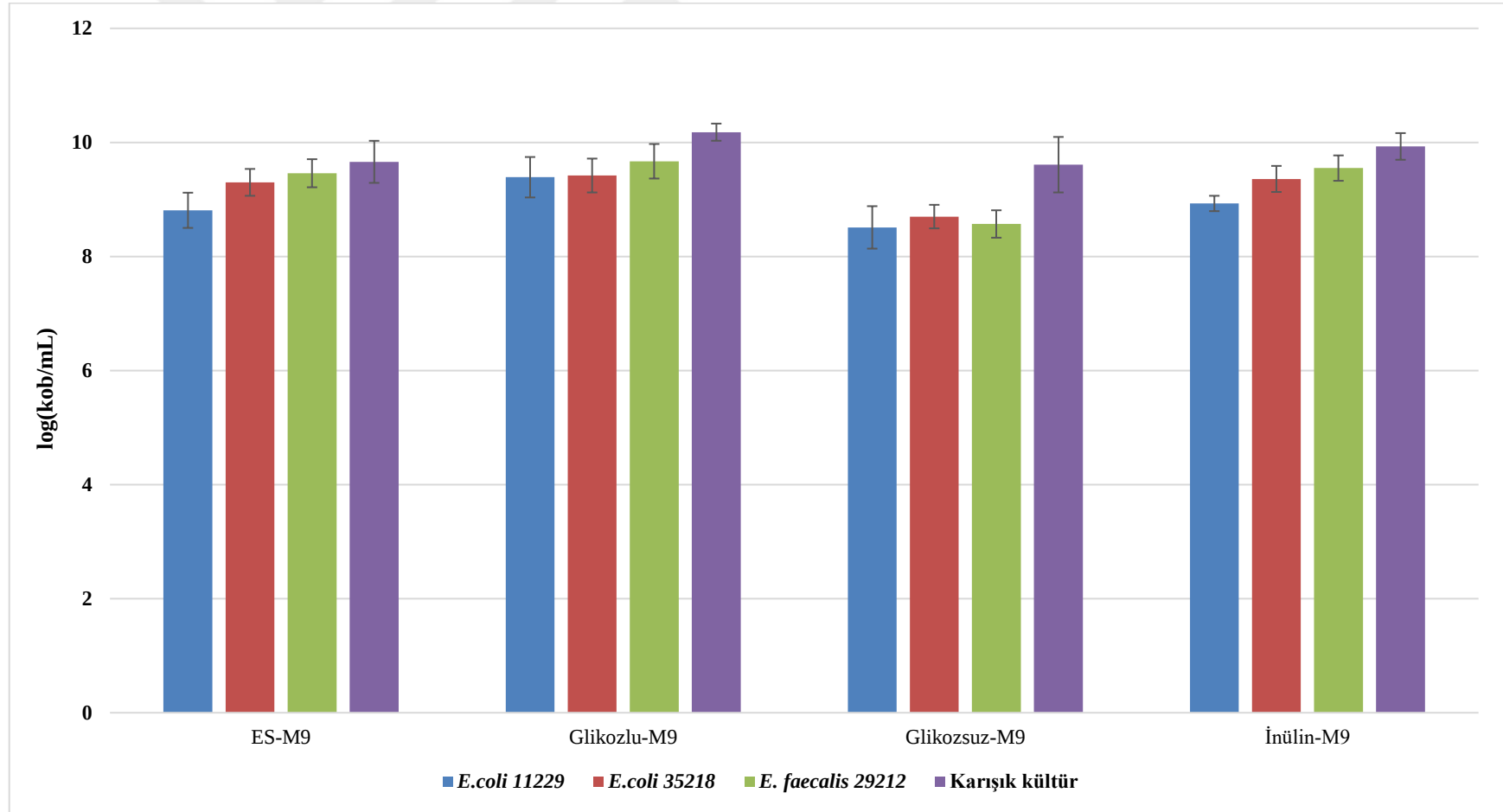
Test edilen bağırsak patojenlerinin en iyi glikoz içeren besi ortamında gelişim gösterdikleri ve ticari prebiyotik olan inülini, inulin tipi fruktan ES'den daha iyi fermente edebildikleri gözlenmiştir. Bir karbonhidrat bileşeninin prebiyotik olarak kullanılabilmesi için bağırsak patojenleri tarafından fermente edilmemesi gerekmektedir. Yapılan çalışma ile inulin tipi fruktan ES'nin bağırsak patojen mikroorganizmaları tarafından düşük oranda fermente edildiği; canlılık oranlarının pozitif kontrole ve ticari prebiyotik kaynağı olarak kullanılan inüline kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda *E. coli* ATCC 11229, *E. coli*

ATCC 35218, *E. faecalis* ATCC 29212 bağırsak patojenlerinin ve bunların karışık kültürünün inulin tipi fruktan ES'yi fermente edemediği prebiyotik indeks (PI) değerlerinin 1' den düşük olduğu (Palframan vd., 2003) (sırayla 0,93, 0,98, 0,97 ve 0,94) belirlenmiştir. Prebiyotik indeks değeri ticari prebiyotik inulin için ise 0,95, 0,99, 0,98 ve 0,97 olarak bulunmuş olup inulin tipi fruktan ES ve ticari inulinin *E. coli* ATCC 11229, *E. coli* ATCC 35218, *E. faecalis* ATCC 29212 bağırsak patojenlerinin gelişimini glikoz karbon kaynağı kadar desteklemediği sonucuna ulaşılmıştır.



Çizelge 4.12. ES'nin bağırsak patojenleri tarafından fermantasyonu.

	ES M9		Glikozlu M9M		Glikozsuz M9M		İnülin M9M	
Suşlar	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD
<i>E. coli</i> ATCC 11229	8,81±0,13	0,62±0,02	9,39±0,35	0,77±0,01	8,51±0,37	0,66±0,01	8,93±0,13	0,78±0,01
<i>E. coli</i> ATCC 35218	9,30±0,23	0,71±0,02	9,42±0,30	0,74±0,01	8,70±0,21	0,49±0,02	9,36±0,33	0,817±0,01
<i>E. feacalis</i> ATCC 29212	9,46±0,22	0,69±0,01	9,67±0,25	0,74±0,30	8,57±0,30	0,57±0,02	9,55±0,24	0,70±0,01
Karışık kültür	9,66±0,23	1,13±0,02	10,18±0,15	1,24±0,02	9,61±0,49	0,44±0,04	9,93±0,23	0,75±0,03



Şekil 4.18. İnülin tipi fruktan ES'nin bağırsak patojenleri tarafından fermantasyon (24.saat) grafiği.

Prebiyotik oligosakkaritler, elde edilme yöntemine, içeriğindeki polisakkaritlerin zincir uzunluğuna ve uygulanan konsantrasyonuna göre probiyotik bakteriler tarafından fermente edilebilmeleri değişiklik göstermektedir. Ayrıca prebiyotiklerin fermentasyonu suşa özgü olabileceği bildirilmiştir (Renye vd., 2021). Bu nedenle tez çalışması kapsamında *E. spectabilis* köklerinden ekstre edilen inülin tipi fruktan ES'nin probiyotik ve patojen bağırsak mikroorganizmaları tarafından fermente edilme yetenekleri test edilmiştir.

Prebiyotik etki literatürde genellikle niteliksel olarak değerlendirilmektedir Palframan vd. (2003) test edilen prebiyotikteki gelişmenin kontrol karbonhidrat ile karşılaştırılarak nicel olarak değerlendirilebileceğini (Eş. 3,8) ve oranın 1'den büyük olmasında ise prebiyotik olarak kullanılabileceğini bildirmiştir. Aynı araştırmacılar galatooligosakkaritler ile elde edilen prebiyotik indeks değerinin inulinden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Figueroa-Gonzalez vd. (2019) ticari prebiyotik laktuloz, frutafit ve oligomate 55 prebiyotiklerinin, prebiyotik indeks değerlerini *Lactobacillus casei* Shirota, *casei* 1, *casei* 2, *rhamnosus* GG ve *L. rhamnosus* probiyotik bakterilerini kullanarak araştırmışlardır. Bu araştırmacılar test edilen karbonhidratların hiçbirinin *L. casei* Shirota suşu üzerinde prebiyotik etkisinin olmadığını ancak diğer probiyotik suşlar üzerinde prebiyotik etkilerinin olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada oligomate 55 galaktooligosakkaritin *L. rhamnosus* suşu üzerindeki prebiyotik etkisinin kontrol karbonhidratdan (laktoz) çok yüksek olduğunu belirlenmiştir. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da inulin tipi fruktan ES, *L. rhamnosus* ACS5 suşu üzerinde prebiyotik etki gösterirken *P. acidilactici* 5008 ve *S. cerevisiae* BD21 suşlarının gelişimini olumlu yönde etkilemiştir. Prebiyotik özellikleri araştırılan inulin tipi fruktan ES'nin bağırsak patojenleri tarafından glikoz kadar fermente edilemediği görülmüştür.

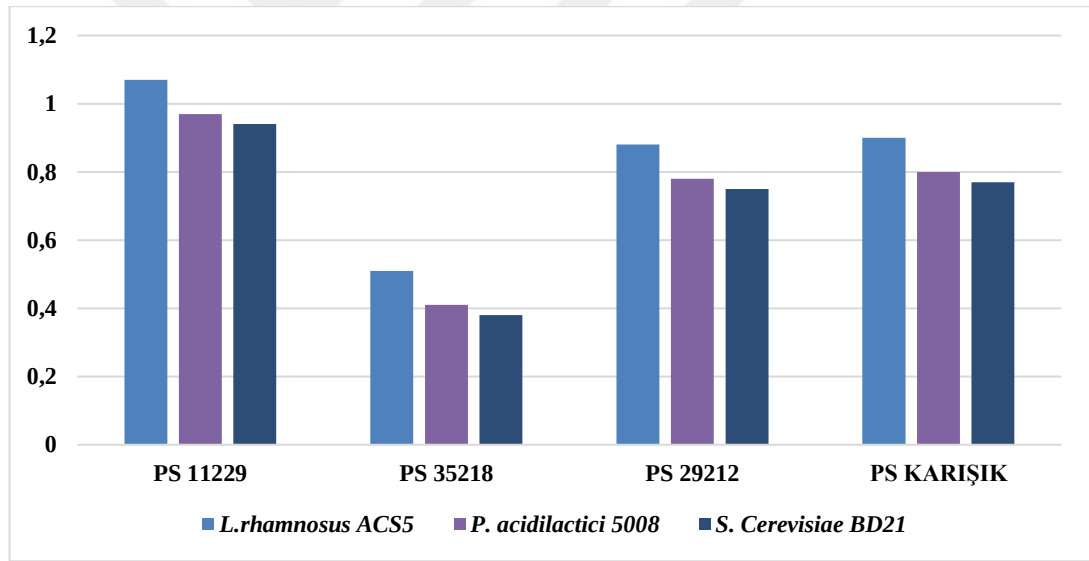
4.4.3 İnülin tipi fruktan ES'nin prebiyotik skorunun belirlenmesi

E. spectabilis köklerinden ekstre edilen inülin tipi fruktan ES'nin potansiyel probiyotik mikroorganizmalar (*L. rhamnosus* ACSF, *P. acidilactici* 5008 ve *S. cerevisiae* BD21) tarafından fermente edilebildiği ve gelişimi düzenleyici etkisinin olduğu ayrıca bağırsak patojeni mikroorganizmalar (*E. coli* ATCC 11229, *E. coli* ATCC 35218 ve *E. faecalis* ATCC 29212) tarafından fermente edilemediği tespit edilmiştir. İnülin tipi fruktan ES'nin ve karşılaştırmak için kullanılan ticari prebiyotik inülinin prebiyotik skor aktivitesi Bölüm 3.2.5.2'de verilen metoda göre belirlenmiş Çizelge 4.9, 4.10, 4.11 ve 4.12'de verilen değerler kullanılarak Eş. 3.6'ya göre prebiyotik aktivite skoru hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.13, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de verilmiştir. İnülin tipi fruktan ES'nin bütün test patojen bakterilerine ve karışık kültüre karşı prebiyotik aktivite göstermekle beraber en yüksek prebiyotik aktivite skoru patojenlerin karışık kültürüne karşı 1,07 PS ile *L. rhamnossus* ACS5 bakterisinde gözlenmiştir. Ticari inülinin en yüksek prebiyotik aktivite skoru, inülin tipi fruktan ES'ye benzer şekilde *L. rhamnossus* ACS5 de *E. coli* ATCC 35218 patojenine karşı 0,99 PS olarak tespit edilmiştir. Ticari inülinin *E. coli* ATCC 11229 patojenine karşı inülin tipi fruktan ES'ye kıyasla daha az prebiyotik aktivite skoru göstermesi prebiyotiklerin probiyotik bakterilerle fermantasyonun suşa özgü olmasıyla açıklanabilmektedir (Şekil 4.19). İnülin tipi fruktan ES'nin *E. faecalis* ATCC 29212 dışındaki tüm test patojenlerine karşı gösterdiği prebiyotik aktivite skoru değeri ticari inüline kıyasla yüksek bulunmuştur. *L. rhamnossus* ACS5 suşunun inülin tipi fruktan ES'deki prebiyotik aktivite skoru *E. faecalis* ATCC 29212 test bakterisinde inülinde daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ticari inülinin *S. cerevisa* BD21 mayasında *E. coli* ATCC 35218 ve *E. faecalis* ATCC 29212 ile prebiyotik aktivite skoru göstermezken, *E. coli* ATCC 11229 ve karışık kültürde aktivitenin düşük olduğu (0,13-0,37) tespit edilmiştir. *S. cerevisiae* BD21 mayasının prebiyotik aktivite skorunun inülin tipi fruktan ES ortamında ticari inüline kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilen aktivitenin karışık kültür, *E. coli* ATCC 35218 ve *E. faecalis* ATCC 29212 sırasıyla 0,94- 0,75 – 0,77 olarak belirlenirken *E. coli* ATCC 11229'deki aktivitesinin düşük olduğu (0,38) tespit edilmiştir. İnülin tipi fruktan ES, *P. acidilactici* 5008 suşunda test edilen patojenlerle ve karışık kültürle prebiyotik skor aktivitesi gösterirken (0,41-0,97), ticari inülin içeren ortamda

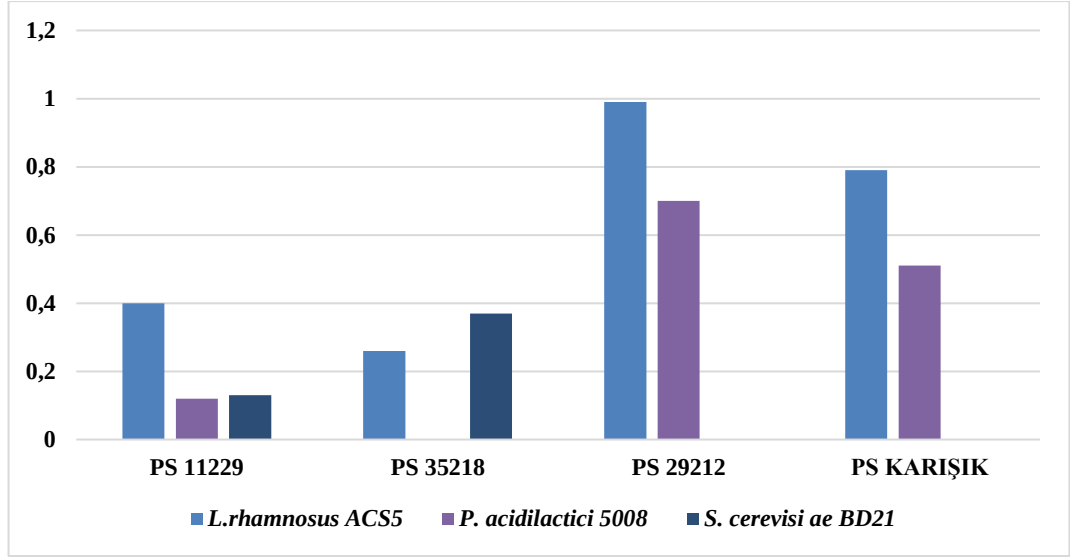
prebiyotik skor aktivitesinin düşük olduğu ve *E. coli* ATCC 1129 ile de aktivitesinin olmadığı belirlenmiştir. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde; *E. spectabilis* köklerinden ekstre edilen inülin tipi fruktan ES'lerin tüm patojen test bakterilerine karşı denenen potansiyel probiyotik bakteriler tarafından prebiyotik skor aktivitesi gösterdiği karışık kültürle skor aktivitesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ticari inülinin patojenlere belirlenen prebiyotik skor aktivitesinin düşük olduğu özellikle *E. coli* ATCC 11229 ve karışık kültürde daha düşük aktivite göstermekle beraber *S. cerevisiae* BD21 suşunda yeteri kadar fermente edilemediği için prebiyotik aktivite sergilemediği düşünülmektedir. Bu bağlamda mayaların fermantasyonunda ve *E. coli* ATCC 11229 patojenine karşı probiyotik bakterilerin gelişimini desteklemek üzere ticari inülinin yerine alternatif olarak inülin tipi fruktan ES'nin kullanılması önerilmektedir. İnulin tipi fruktan ES'nin *L. rhamnosus* ACS5 tarafından daha çok fermente edilmesine paralel olarak (Bölüm 4.4.1.1), bağırsak patojenleri ve bunların karışık kültürü üzerindeki prebiyotik skor aktivitesinin yüksek olması bağırsak düzensizliklerinin dengelenmesinde prebiyotik olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Probiyotiklerin prebiyotikleri sindirebilmek için özel hidroliz ve transport sistemlerine ihtiyaç duyduğu bildirilmiştir (Goh vd., 2007; Gopal vd., 2001; Kaplan ve Hutkins, 2003; Kneifel, 2000). Bu nedenle bu metabolik sistemleri kodlayan genler farklı suşlardaki özel aktiviteler sonucunda farklı prebiyotik skor aktivitelerinin bulunmasına neden olmaktadır.

Lactobacillus plantarum DM5 bakterisinden elde edilen α -D-glukanın prebiyotik skor aktivitesinin araştırıldığı çalışmada *L. plantarum* DM5, *Bifidobacterium infantis* ve *Lactobacillus acidophilus* suşlarında maksimum prebiyotik skor aktivitesini sırayla 0,66; 0,55 ve 0,45 olarak belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışmada kontrol olarak inulin kullanıldığında *L. plantarum* DM5, *B. infantis* ve *L. acidophilus* suşlarında prebiyotik skor aktivitesi 0, 65, 0,68 ve 0,60 maksimum değerler olarak tespit edilmiştir (Das vd., 2014). İnulin tipi fruktan ES'nin prebiyotik skor aktivitesinin belirlemek için kullanılan probiyotik suşlar Das vd. (2014) çalışmasından farklı olmakla birlikte test edilen suşların prebiyotik skor aktivite değerlerinin daha yüksek olduğu Çizelge 4.13' de görülmektedir. Fruktooligosakkarit (NutraFlora P-95 ve Raftilose P95), inulin (Inulin-S ve Raftiline HP) ve galaktooligosakkarit (GOS) (Oligomate 55) prebiyotiklerinin araştırıldığı çalışmada

Lactobacillus paracasei 1195 suşunun Inulin-S, Raftiline HP ve Raftilose P95 ile prebiyotik aktivite skoru sırayla 1,17; 1,10 ve 0,99 olarak belirlenirken, *L. plantarum* 4008, *L. acidophilus* 33200 ve *L. acidophilus* NCFM suşları Oligomate 55 içeren ortamda geliştirildiğinde, *L. acidophilus* NCFM suşu ise Raftilose P95 ile geliştirildiğinde prebiyotik aktivite skoru sırayla 0,82; 0,70; 0,66 ve 0,58 olarak belirlenmiştir (Huebner vd., 2007). Bu araştırmacılar *L. plantarum* 4008 suşunun test edilen prebiyotiklere *L. plantarum* 12006'dan daha yüksek aktivite gösterdiğini, *L. acidophilus* 33200 suşunun test edilen fruktooligosakkarit prebiyotikleri ve inulinle *L. acidophilus* NCFM den daha yüksek aktivite gösterdiğini belirleyerek aynı türe ait suşların aynı prebiyotiğe gösterdiği prebiyotik skor aktivitenin farklı olabileceğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da test edilen iki farklı türden bakterilerinin (*L. rhamnosus* ACS5 ve *P. acidilactici* 5008) ve mayanın (*S. cerevisiae* BD21) inulin tipi fruktan ES ile prebiyotik aktivite skorunun farklı olduğu görülmektedir.



Şekil 4.19. İnulin tipi fruktan ES'nin prebiyotik skor aktivitesi.



Şekil 4.20. Ticari inülinin prebiyotik skor aktivitesi.

Çizelge 4.13. Ticari inülin ve inülin tipi fruktan ES'nin prebiyotik skor aktivite değerleri.

Suşlar	İnülin				İnülin tipi fruktan ES			
	Karışık	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. feacalis</i>	Karışık	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. feacalis</i>
	kültür	ATCC 11229	ATCC 35218	ATCC 29212	kültür	ATCC 11229	ATCC 35218	ATCC 29212
<i>L. rhamnosus</i> ACS5	0,4	0,26	0,99	0,79	1,07	0,51	0,88	0,9
<i>P. acidilactici</i> 5008	0,12	-	0,7	0,51	0,97	0,41	0,78	0,8
<i>S. cerevisiae</i> BD21	0,13	0,37	-	-	0,94	0,38	0,75	0,77

Sinbiyotik mikrokapsülleme, gıdalardaki probiyotik bakteriler için koruyucu bir ortam görevi görmek yanı sıra, probiyotik bakterilerin gastrointestinal ortamlarında canlılığını kaybetme eğiliminde olması nedeniyle onları geçiş sırasında canlılıklarını korumaya yardımcı olmaktadır. Bu canlılık seviyesi prebiyotiklerin uyumlu olduğu probiyotik kaynağına göre değişiklik gösterir ve bu uyum prebiyotik skor aktivite analizi ile tespit edilebilmektedir. Moumita ve Das (2022) yaptıkları çalışmada yenilebilir mantarlardan (*Pleurotus florida*) prebiyotik inülinin sinbiyotik kullanıma en uyumlu probiyotik-prebiyotik bileşen ilişkisini belirlemek üzere prebiyotik aktiviteleri incelemişlerdir. Bu araştırmacılar mantardan ekstre edilen inülinin *Enterobacter cloacae* NCIM 2164 enterik suşuna karşı prebiyotik aktivitesi incelenen *L. helveticus*, *E. faecium*, *L. plantarum* bakterilerinin prebiyotik aktiviteleri sırasıyla; 0,3-0,6-0,1 olarak tespit etmişler ve prebiyotik inülinin mikrokapsülasyon işlemi için en uyumlu sinbiyotik ilişki *E. faecium* bakterisi olduğunu bildirmiştir. Bu bilgilerden ve tez çalışmasından yola çıkarak gelecek mikrokapsülasyon çalışmalarında inülin tipi fruktan ES'nin en çok prebiyotik aktivite gösterdiği (1,07 PS) *L. rhamnosus* ACS5 bakterisi ile sinbiyotik kullanımı önerilmektedir. Kustyawati vd., (2022) yaptıkları çalışmada değişen konsantrasyonlardaki ejder meyvesi ekstraktının probiyotik *Lactobacillus casei* bakterisindeki gelişimi düzenleyici etkisi araştırmıştır. Bu araştırmacılar *E. coli* ye karşı test edilen maksimum prebiyotik aktivite skorunu besiyerine %10 ilave edilen ejder meyvesi ekstraktında (1,84) minimum aktivite değerini ise %2 oranında eklenen ejder meyvesi ekstraktında (0,97) olduğunu bulmuşlardır. Tez çalışmasında karbon kaynağı çıkarılan besiyerine %2 oranında inülin tipi fruktan ES eklendiğinde ejder meyvesi ile yapılan çalışmaya benzer şekilde *L. rhammosus* şu tarafından benzer prebiyotik aktivite skoru *E. coli* ATCC 35218 test bakterisinde ve bağırsak patojenleri karışık kültüründe belirlenmiştir (0,88-1,07). Besiyerine eklenen inülin tipi fruktan ES oranı artırılırsa prebiyotik skor aktivite değerlerindeki artacağı düşünülmektedir.

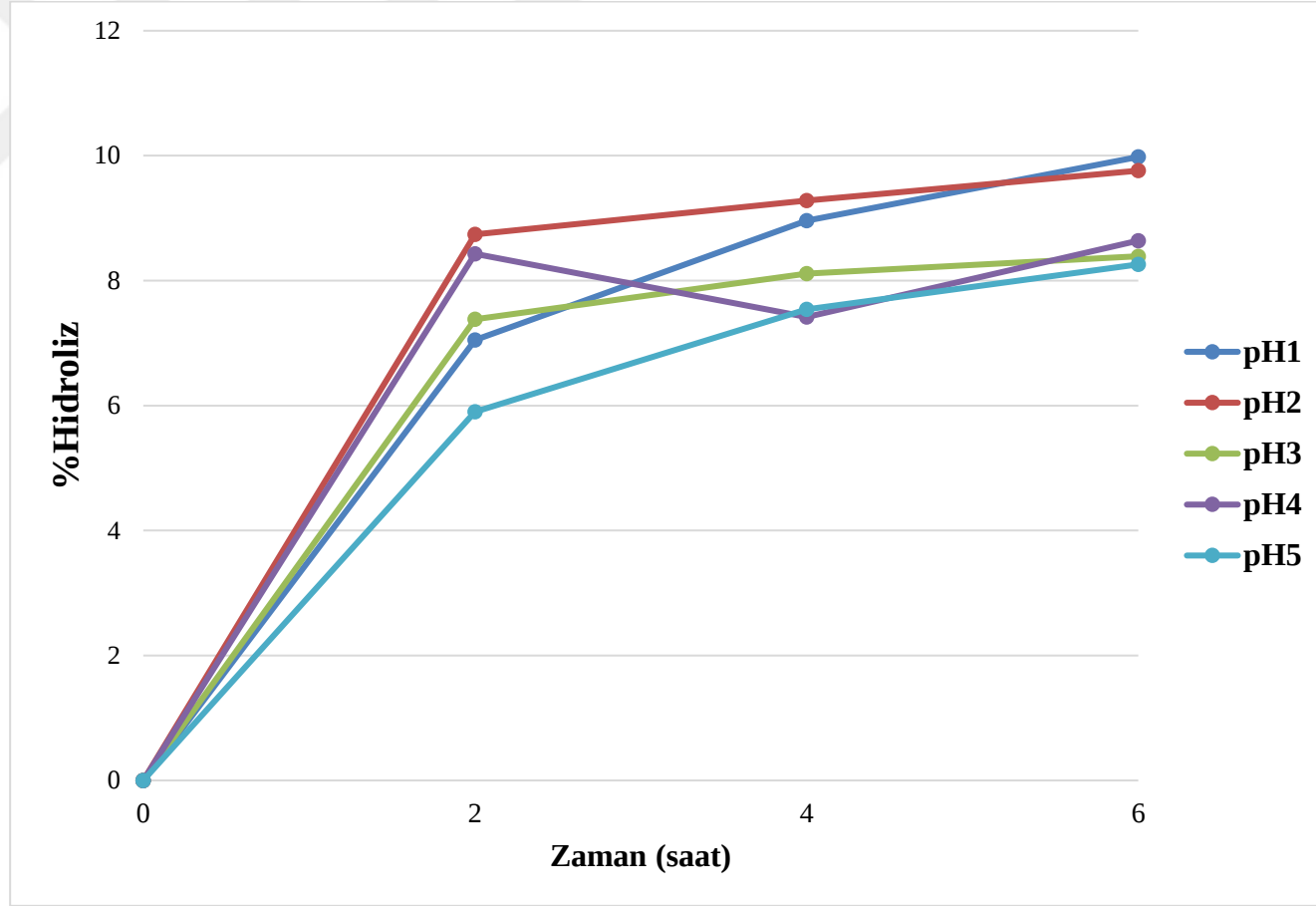
4.4.4 İnülin tipi fruktan ES'nin mide asidine direncinin belirlenmesi

E. spectabilis köklerinden ekstre edilen inülin tipi fruktan ES'nin potansiyel probiyotik mikroorganizmalar (*L. rhamnosus* ACS5, *P. acidilactici* 5008 ve *S. cerevisiae* BD21) tarafından fermente edilebildiği, gelişimi düzenleyici etkisinin olduğu tespit edilmiş ve prebiyotik skor aktivitesi belirlenmiştir. Prebiyotiklerin etki gösterebilmesi için mide asidinde hidrolizinin düşük olması gerektiği bildirilmiştir (Hongpattarakere vd., 2012). Bu çalışmada inülin tipi fruktan ES'nin pH 1, pH 2, pH 3, pH 4 ve pH 5 olan mide sıvısına direnci 0, 2, 4 ve 6 saatlik inkübasyon sürelerinden sonra hidroliz yüzdeleri Bölüm 3.2.5.3'te verilen denkleme (Eş 3.10) göre hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.14, Şekil 4.21 ve Şekil 4.22'de verilmiştir. Farklı inkübasyon sürelerinde yapay mide sıvısının pH'ı arttıkça inülin tipi fruktan ES'nin hidrolizi azalmıştır. İnülin tipi fruktan ES'nin inülin tipi fruktan ES'nin en düşük hidrolizi pH 5 stimüle mide sıvısında 2 ve 4 saatlik inkübasyondan sonra (%5,9-7,05) gözlemlenmiştir. En yüksek hidroliz oranı ise 6 saatlik inkübasyon sonrası pH 1 mide ortamında (%9,98) tespit edilmiştir. Ticari inülinin en yüksek hidroliz olduğu yapay mide sıvısı koşulunda benzer şekilde pH 1'de 6. saatte (%7,3) tespit edilmiştir. İnülin tipi fruktan ES'de azalan pH koşulları altında ticari inüline kıyasla daha yüksek oranda % hidroliz gözlenmiştir.

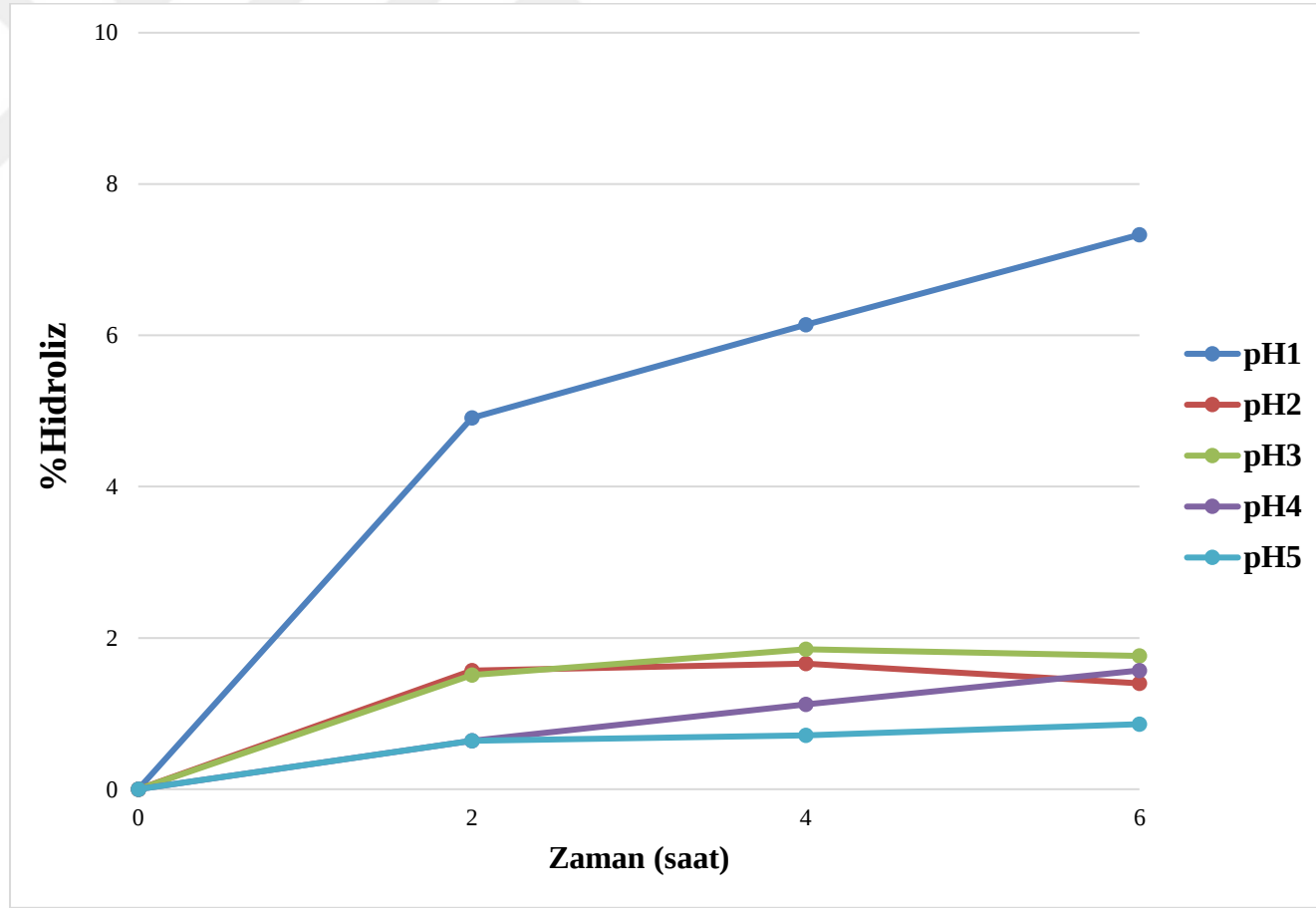
Lu vd. (2021)'nin yaptıkları çalışmada sarımsak poligosakkaritlerinin farklı zaman (0,5; 1, 2, 4 ve 6.saat) aralıklarında farklı pH'larda (1, 2, 3, 4, 5) mide sıvısında % hidroliz oranlarında test etmişlerdir. Bu araştırmacılar azalan pH koşullarında ve artan inkübasyon süresi ile sarımsak polisakkaritlerinin yüzde hidrolizinin arttığı, pH 1'deki yüzde hidroliz oranının %52,33, kontrol olarak test edilen fruktooligosakkaritin ise %58,34 olduğunu bildirmiştir. Sarımsak oligosakkaritlerinin pH 2 ile artan pH ortamlarında %10 dan daha az hidroliz olduğunu ve büyük bir kısmının sindirilmediğini dolayısıyla kalın bağırsağa ulaşabildikleri önerilmiştir. İnülin tipi fruktan ES'nin tüm pH koşullarında %10 dan küçük hidroliz göstermekte ve bu da inülin tipi fruktanların çoğunun sindirilmediğini ve dolayısıyla kalın bağırsağa ulaşabileceklerini göstermektedir.

Çizelge 4.14. ES ve inülinin farklı pH’ daki mide sıvısında farklı inkübasyon sürelerindeki % hidrolizi.

	pH 1 mide sıvısı		pH 2 mide sıvısı		pH 3 mide sıvısı		pH 4 mide sıvısı		pH 5 mide sıvısı	
	% hidroliz		% hidroliz		% hidroliz		% hidroliz		% hidroliz	
	İnulin	ES	İnulin	ES	İnulin	ES	İnulin	ES	İnulin	ES
2 saat	4,91±0,20	7,05±0,28	1,30±0,27	8,74±0,00	1,51±0,18	7,38±0,03	0,67±0,00	8,43±0,32	0,64±0,10	5,91±0,05
4 saat	6,14±0,58	8,96±0,34	1,51±0,15	9,28±0,63	1,85±0,27	8,1±0,03	1,12±0,19	7,42±0,25	0,71±0,02	7,54±0,24
6 saat	7,33±0,20	9,98±0,25	1,96±0,56	9,76±0,47	1,76±0,24	8,39±0,00	1,57±0,04	8,64±0,06	0,83±0,02	8,26±0,54



Şekil 4.21. İnülin tipi fruktan ES'nin farklı pH' lardaki mide sıvısında farklı inkübasyon sürelerindeki % hidrolizi.



Şekil 4.22. Ticari inülinin farklı pH' lardaki mide sıvısında farklı inkübasyon sürelerindeki % hidrolizi.

4.5 Antioksidan Biyolojik Aktivitenin Değerlendirilmesi

4.5.1 İnülin tipi fruktan ES'nin DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürücü aktivitenin belirlenmesi

2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), yüksek stabilitesi nedeniyle doğal bileşenlerin antioksidan kapasitesini belirlemek amacıyla yaygın olarak kullanılan serbest bir radikaldir (Ngueumaleu vd., 2023). Antioksidan bileşikler, hidrojen atomlarını veya elektronlarını DPPH radikale aktararak mor renkli DPPH radikalini renksiz α , α -difenil- β -pikrilhidrazil molekülüne indirger. Bu yöntemdeki renk değişimi, numunenin antioksidan aktivitesinin 517 nm dalga boyunda etkili bir değerlendirmesine izin vermektedir (Sirivibulkovit vd., 2018). İnülin tipi fruktan ES'nin DPPH radikal süpürücü aktivitesi, yüksek antioksidan aktivitesi kanıtlanmış olan askorbik asit'in (AA) pozitif kontrol olarak kullanılmasıyla değerlendirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda inulin tipi fruktan ES'nin (0,5; 1, 4, 6, 8 ve 10, mg/mL) yüzde DPPH radikal süpürücü aktiviteleri Bölüm 3.2.6.1'de verilen süpürme aktivitesi denklemi (Eş. 3.11) kullanılarak tespit edilmiş sonuçlar Çizelge 4.15 ve Şekil 4.23'te verilmiştir. İnülin tipi fruktan ES'nin DPPH radikal süpürücü aktivitesi incelendiğinde; inulin tipi fruktan ES konsantrasyonunun artmasıyla DPPH süpürme aktivitesinin kademeli olarak önemli ölçüde arttığı, 0,5 mg/mL konsantrasyonda $7,27 \pm 1,58$ süpürme aktivitesi gösterirken, 8 mg/mL konsantrasyondan itibaren neredeyse DPPH radikallerinin tamamını indirgeyerek $97,31 \pm 3,11$ radikal süpürücü aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Pozitif kontrol olarak test edilen askorbik asit ise %100 DPPH süpürme aktivite değerini 1 mg/mL konsantrasyon da gerçekleştirdiği gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre İnülin tipi fruktan ES'nin düşük konsantrasyonlarında yüksek DPPH süpürme aktivitesi gösterdiği ve potansiyel antioksidan bir bileşik olduğu gözlenmektedir.

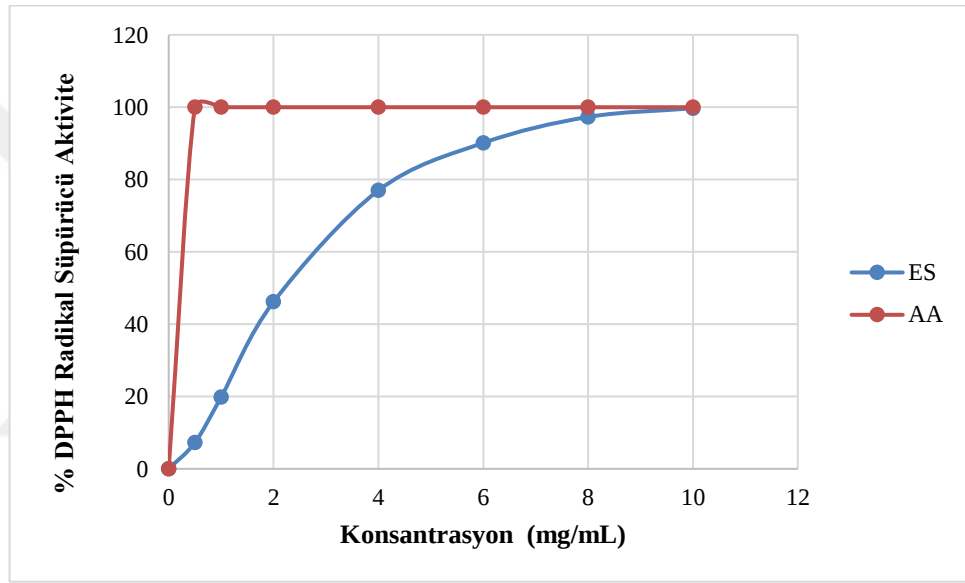
Meksika turpundan (*Pachyrhizus erosus*) mikrodalga destekli ekstraksiyon ile elde edilen inülinin antioksidan aktivitesinin araştırıldığı çalışmada DPPH süpürücü aktivitesi 10 mg/mL konsantrasyonda $75,74 \pm 4,5$ olarak belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışmada kontrol olarak inülin kullanıldığında DPPH süpürücü aktivite yüzdesi, 10 mg/mL konsantrasyonda $84,78 \pm 1,5$ olarak tespit etmişlerdir (Bhanja vd., 2023). İnülin tipi fruktan ES'nin düşük konsantrasyondaki (0,5 mg/mL) DPPH süpürücü aktivitesinin meksika turpu polisakkariti ve ticari inüle kıyasla daha yüksek olduğu

(96,13±0,37) Çizelge 4.15'te belirlenmiştir. İnülin tipi fruktan ES'nin DPPH radikal süpürücü aktivitesinin (Bhanja vd., 2023) yapıtları çalışmaya kıyasla daha yüksek olmasının sebebi, *E. spectabilis* bitkisinin hasat zamanına, ekstraksiyon yöntemine, köklerin içerdiği fenolik bileşenlerin içeriğine ve miktarındaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Çizelge 4.15 incelendiğinde, inülin tipi fruktan ES için elde edilen verilerin grup içerisinde (0,5-10 mg/mL aralığında) genellikle birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$). 6-10 mg/mL aralığındaki konsantrasyonlar grup içerisinde istatistiksel olarak aynı olduğu tespit edilmiştir ($P\geq0,05$).



Çizelge 4.15. İnülin tipi fruktan ES ve askorbik asit DPPH radikal süpürücü aktivitesi.

	Konsantrasyon (mg/mL)						
	0,5	1	2	4	6	8	10
İnülin tipi fruktan ES	7,27±1,58 ^e	19,83±0,35 ^d	46,18±0,70 ^c	76,89±1,92 ^b	90,13±2,27 ^a	97,3±3,11 ^a	99,72±2,90 ^a
Askorbik asit	96,13±0,37	96,21±0,22	96,35±0,05	96,44±0,05	96,38±0,00	96,41±0,05	96,38±0,08



Şekil 4.23. İnülin tipi fruktan ES ve askorbik asit DPPH radikal süpürücü aktivitesi.

4.5.2 İnülin tipi fruktan ES'nin ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbentiazolin-6 sülfonik asit) radikal süpürücü aktivitesinin belirlenmesi

ABTS⁺ radikali, doğal bileşenlerin toplam antioksidan kapasitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan kararlı bir radikaldir (Kut vd., 2023). Genellikle bitkisel bileşiklerin ve protein yapılarının radikal süpürücü aktivitelerini test etmek için kullanılmaktadır. İnülin tipi fruktan ES' nin ABTS radikal süpürücü aktivitesi, ABTS radikali ile etkileşim sonucu oluşan mor rengin 734 nm'deki absorpsiyon değerleri kullanılarak süpürme aktivitesi denklemi (Eş. 3.11) ile belirlenmiştir. İnülin tipi

fruktan ES'nin ve pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asidin değişen konsantrasyonlardaki konsantrasyonlardaki (0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 6,00; 8,00; 10,00 mg/mL) radikal süpürücü aktiviteleri Çizelge 4.16 ve Şekil 4.24'de verilmiştir. İnülin tipi fruktan ES'nin ABTS radikal süpürücü aktivitesi incelendiğinde; inülin tipi fruktan ES ile pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit arasında benzer antioksidan aktivite profilleri gözlenmiş olup düşük konsantrasyon değerlerinde yüksek radikal süpürme aktiviteleri tespit edilmiştir (Çizelge 4.16). İnülin tipi fruktan ES'nin 2 mg/mL konsantrasyonu %99,07±0,98 radikal süpürücü aktivite gösterirken, askorbik asitin 1 mg/mL konsantrasyonun %100±0,00 radikal süpürücü aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, inülin tipi fruktan ES'nin ABTS⁺ radikallerini süpürücü aktivitesinin olduğunu göstermiştir.

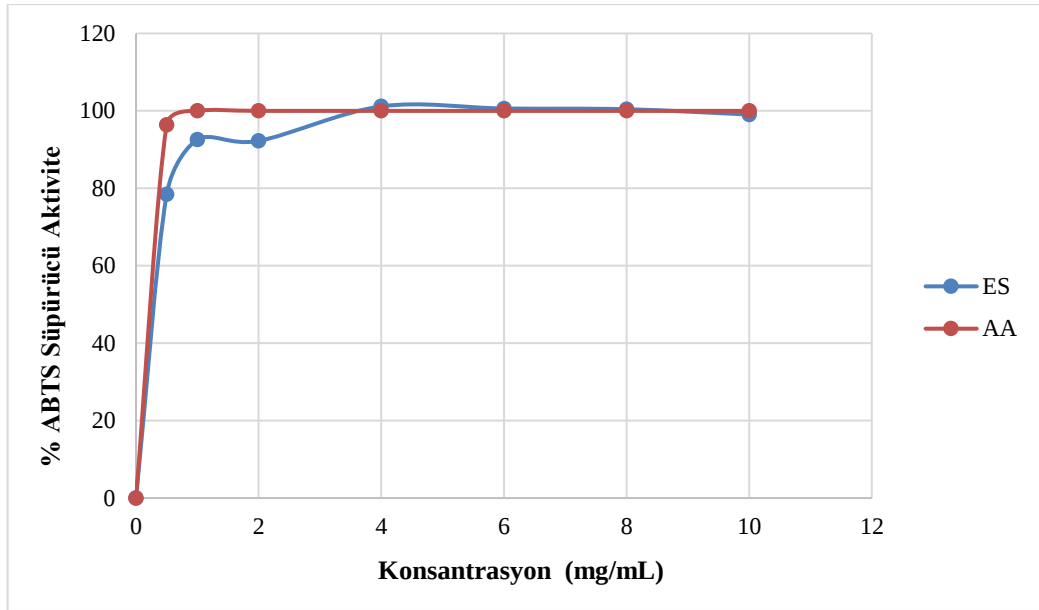
Ticari inülinin ABTS⁺ radikal süpürücü aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada 10 mg/mL dozunda inülinin süpürücü aktivitesi %7,79±0,37 olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada kontrol olarak kullanılan askorbik aside kıyasla ABTS radikal süpürücü aktivite değeri çok düşük olduğu belirtilmiştir (Shang vd., 2018). Çizelge 4.16 incelendiğinde, inülin tipi fruktan ES için elde edilen verilerin grup içerisinde 0,5 mg/mL konsantrasyon haricindeki tüm konsantrasyonlarda elde edilen verilerin istatistiksel olarak farklı olmadığı belirlenmiştir ($P \geq 0,05$).

Literatürde bitkilerden ekstrakte edilen prebiyotiklerin ABTS radikal süpürücü aktiviteleri ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Çiriş bitkisinin köklerinden elde edilen inulin tipi fruktan ES'de tespit edilen ABTS radikal süpürücü aktivite sonuçlarıyla literatüre katkı sağlanılacağı düşünülmektedir.

Çizelge 4.16. İnülin tipi fruktan ES ve askorbik asidin ABTS radikal süpürücü aktivitesi.

	Konsantrasyon (mg/mL)						
	0,5	1	2	4	6	8	10
İnülin tipi fruktan ES	78,43±0,94 ^b	92,56±0,98 ^a	99,07±0,65 ^a	101,17±0,55 ^a	100,62±1,67 ^a	100,43±0,8 ^a	99,07±69 ^a
Askorbik asit	99,72±0,12	100,0±0,00	99,93±0,12	100,0±0,00	99,96±0,07	99,98±0,02	100,0±0,00

Aynı satırdaki küçük harfler grup içi istatistiksel farkı belirtmektedir ($P < 0,05$).



Şekil 4.24. İnülin tipi fruktan ES'nin %ABTS⁺ radikal süpürücü aktivitesi.

4.5.3 İnülin tipi fruktan ES'nin hidroksil radikalleri süpürücü aktivitesi

Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$), Deoksiriboz Nükleik Asitte (DNA) *in vivo* oksidatif hasara neden olabilen ve çeşitli biyomoleküllerle reaksiyona girerek mutasyonlara yol açabilen oldukça reaktif bir oksijen türüdür (ROS) (Halliwell vd., 2021).. Hidroksil radikalleri temizleme aktivitesi H_2O_2 ile oluşturulan hidroksil radikallerinin temizlenmesi ile belirlenmiştir. İnülin tipi fruktan ES'nin ve pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asidin değişen konsantrasyonlardaki (0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 6,00; 8,00; 10,00 mg/mL) radikal süpürücü aktiviteleri Çizelge 4.17 ve Şekil 4.25'te verilmiştir. İnülin tipi fruktan ES'nin hidroksil radikal süpürücü aktivitesi incelendiğinde; inülin tipi fruktan ES ile pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit arasında benzer antioksidan aktivite profilleri gözlenmiş olup konsantrasyonun artmasıyla aktivite değerlerinde kademeli olarak artış gözlenmiştir (Şekil 4.25). Pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit için en düşük konsantrasyon olan 0,50 mg/mL'de hidroksil radikalleri süpürücü aktivitesinin $61,78 \pm 1,36$ olduğu, 6 mg/mL askorbik asit derişiminde hidroksil radikal süpürme aktivitesinin maksimum değere ulaşarak $100 \pm 0,77$ olduğu tespit edilmiştir. İnülin tipi fruktan ES'nin süpürme aktivitesi en düşük konsantrasyon olan 0,50 mg/mL'de $50,79 \pm 5,78$ olduğu, 10 mg/mL konsantrasyonda $85,99 \pm 2,04$ süpürücü aktivite değeri tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, inülin tipi fruktan ES'nin hidroksil radikalleri süpürücü aktivitesinin olduğunu göstermiştir. Çizelge 4.17 incelendiğinde, inülin tipi fruktan

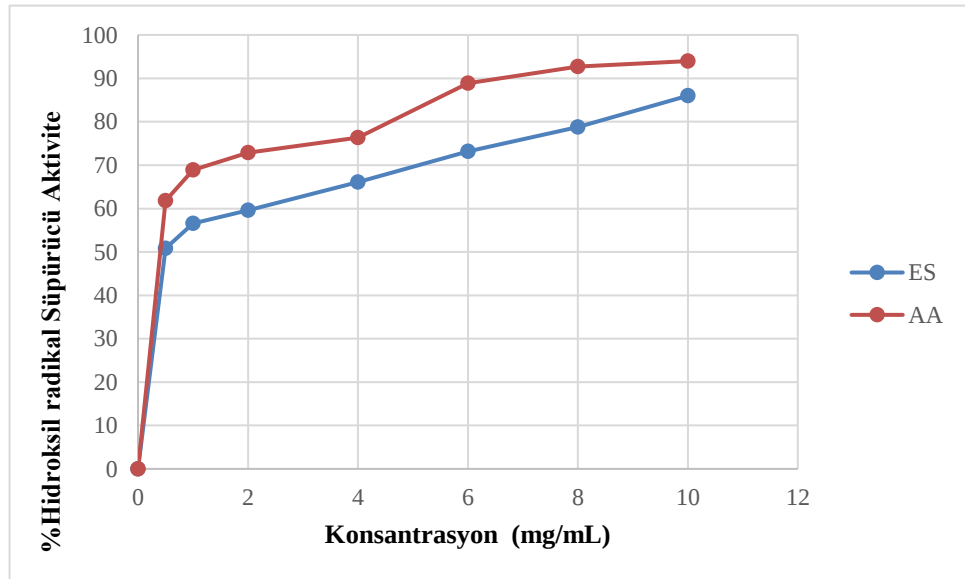
ES için elde edilen verilerin grup içerisinde (0,5-10 mg/mL aralığında) istatistiksel fark genellikle farklı olmadığı belirlenmiştir ($P \geq 0,05$).

Stachytarpheta jamaicensis kök ekstraktının hidroksil radikal süpürücü aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada, 1 mg/mL konsantrasyonda test edilen ekstraktlar %60 hidroksil radikal süpürücü aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Utami vd., 2021). Literatürde bitkilerden ekstrakte edilen prebiyotiklerin hidroksil radikal süpürücü aktiviteleri ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Çiriş bitkisinin köklerinden elde edilen inulin tipi fruktan ES’de tespit edilen hidroksil radikal süpürücü aktivite sonuçlarıyla literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Çizelge 4.17. İnulin tipi fruktan ES’nin hidroksil radikal süpürücü aktivitesi.

	Konsantrasyon (mg/mL)						
	0,5	1	2	4	6	8	10
İnulin tipi fruktan ES	50,79±5,78 ^b	56,54±4,8 ^{ab}	59,6±4,86 ^{ab}	66,06±10,66 ^{ab}	73,17±11,1 ^{ab}	78,8±5,92 ^{ab}	85,99±2,04 ^a
Askorbik asit	61,78±1,36	68,9±2,91	44,1±3,10	76,3±0,58	88,9±0,19	92,74±0,19	93,97±0,77

Aynı satırdaki küçük harfler grup içi istatistiksel farkı belirtmektedir ($P < 0,05$).



Şekil 4.25. İnulin tipi fruktan ES’nin hidroksil radikal süpürücü aktivitesi.

4.5.4 İnülin tipi fruktan ES'nin süperoksit anyonu süpürücü aktivitesi

Reaktif oksijen türü olan süperoksit anyon radikali, mitokondri ve prokaryotlarda aerobik metabolizmanın sonucu olarak açığa çıkmaktadır (Larosa ve Remacle, 2018). Hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen moleküllerinin oluşmasına öncü olan süperoksit anyonu mitokondriyal fonksiyon bozukluğuyla ilgili sinyal yollarında önemli rol oynamaktadır (Lundgren vd., 2018). İnülin tipi fruktan ES ve pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asidin süperoksit anyon süpürücü aktivitesi Bölüm 3.2.6.4'te verilen metoda göre süpürme aktivitesi Eş. 3.11'de verilen denklem kullanılarak tespit edilmiştir. İnülin tipi fruktan ES'nin ve pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asidin değişen konsantrasyonlardaki (0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 6,00; 8,00; 10,00 mg/mL) süperoksit anyon süpürücü aktiviteleri Çizelge 4.18 ve Şekil 4.26'da verilmiştir. İnülin tipi fruktan ES'nin süperoksit radikal süpürücü aktivitesi incelendiğinde; pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit 0,5 mg/mL konsantrasyon seviyesinde $100 \pm 0,70$ inhibisyon gözlemlenirken, inülin tipi fruktan için maksimum süpürücü aktivite değeri 10 mg/mL'de $29,05 \pm 4,15$ olarak tespit edilmiştir. Süperoksit anyon radikali süpürücü aktivite, inülin tipi fruktan ES için konsantrasyona bağlı doğrusal artış göstermektedir. Bu nedenle, inülin tipi fruktan ES'nin anlamlı antioksidan etki göstermesi için yüksek konsantrasyonların test edilmesi gerekmektedir.

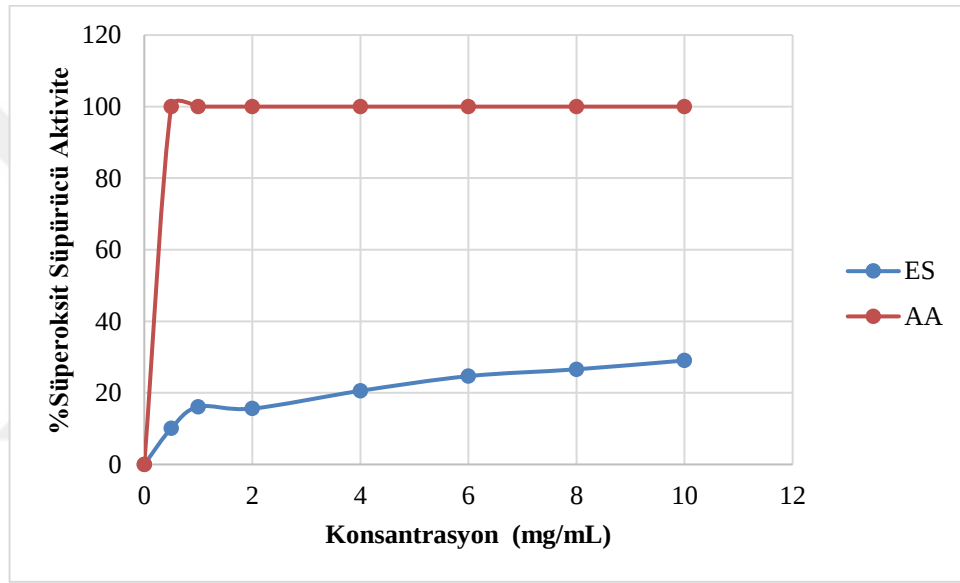
Dulavrat otu (*Arctium lappa*) köklerinden elde edilen polisakkaritlerin süperoksit anyon süpürücü aktivitesinin araştırıldığı çalışmada, 5g/mL konsantrasyonda test edilen dulavrat otu polisakkaritleri $18,33$ süpürücü aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Tez çalışmasında dulavrat otu polisakkaritlerine benzer olarak düşük anyon süpürücü aktiviteye sahip olduğu Çizelge 4,18'de görülmektedir. Çizelge 4.18 incelendiğinde, 1-2 ve 4 mg/mL konsantrasyonlar kendi aralarında istatistiksel olarak farklı olmadığı ($P \geq 0,05$) benzer şekilde 6-8 ve 10mg/mL konsantrasyonlar da istatistiksel olarak aynı olduğu belirlenmiştir ($P \geq 0,05$).

Literatürde bitkilerden ekstrakte edilen prebiyotiklerin süperoksit anyon süpürücü aktiviteleri ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Çiriş bitkisinin köklerinden elde edilen inulin tipi fruktan ES'de tespit edilen süperoksit süpürücü aktivite sonuçlarıyla literatüre katkı sağlanılacağı düşünülmektedir.

Çizelge 4.18. İnülin tipi fruktan ES'nin süperoksit anyonu süpürücü aktivitesi.

	Konsantrasyon (mg/mL)						
	0,5	1	2	4	6	8	10
İnülin tipi fruktan ES	10,11±2,47 ^b	16,12±1,43 ^{ab}	15,61±2,62 ^{ab}	20,58±5,18 ^{ab}	24,68±5,18 ^a	26,58±5,82 ^a	29,05±4,15 ^a
Askorbik asit	100±0,70	100±0,84	100±0,84	100±0,14	100±0,14	100±0,28	100±0,00

Aynı satırdaki küçük harfler grup içi istatistiksel farkı belirtmektedir ($P<0,05$).



Şekil 4.26. İnülin tipi fruktan ES'nin süperoksit anyonu süpürücü aktivitesi.

4.5.5 İnülin tipi fruktan ES'nin demir indirgeme antioksidan gücü (Ferric reducing antioxidant power-FRAP)

FRAP analizi diğer radikal süpürücü aktivite analizlerinden farklı olarak, test edilen bileşenin antioksidan kapasitesini asidik ortamda Fe^{3+} iyonlarının Fe^{2+} ya indirgenmesine dayanmaktadır. Normal şartlarda sarı renkte olan ferrik solüsyonu (Fe^{3+}) antioksidanlar tarafından demir formuna (Fe^{2+}) indirgendiğinde rengi maviye döner ve 593 nm dalga boyunda bu değer okunur hale gelmektedir. Standart olarak farklı konsantrasyonlarda askorbik asit çözeltileri kullanılarak (0-12 μ g) çizilen kalibrasyon denklemi (Şekil 3.11) aracılığıyla sonuçlar askorbik asit (AA) eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. İnülin tipi fruktan ES'nin artan derişimlerine paralel olarak

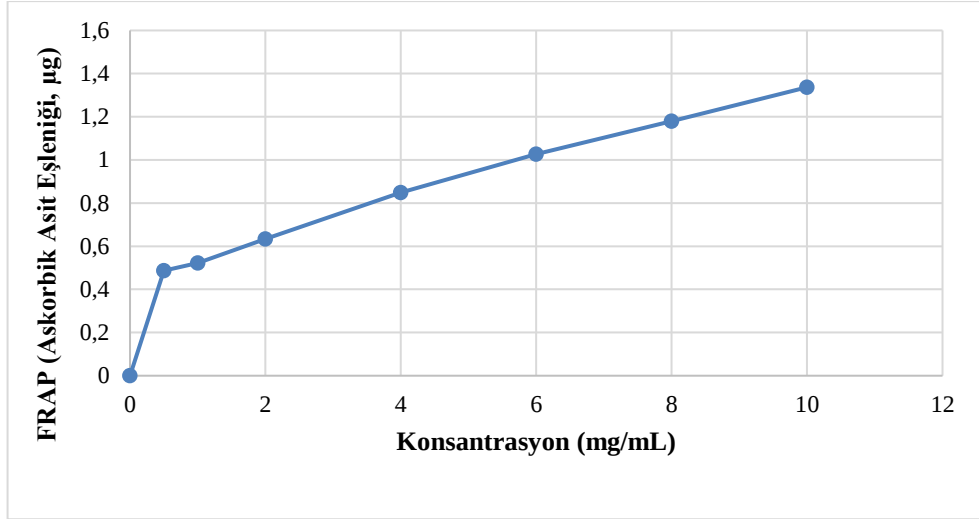
demir indirgeme antioksidan gücünün arttığı gözlenmiştir. İnülin tipi fruktan ES' demir indirgeme antioksidan gücü 10 mg/mL derişimde $1,34 \pm 0,00$ μ g askorbik asit eşleniğı olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.19 incelendiğinde, 1 mg/mL konsantrasyon seviyesi hariç tüm konsantrasyonlar grup içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$).

Meksika turpu polisakkaritlerinin demir indirgeme antioksidan gücünün test edildiğı çalışmada, 10 μ g/ml'deki FRAP aktivitesinin sırasıyla $0,11 \pm 0,007$ μ g ve $0,16 \pm 0,007$ μ g ile ticari inülininkine benzer olduğunu belirtmişlerdir (Bhanja vd., 2023). Tez çalışmasında test edilen inülin tipi fruktan ES'nin FRAP akivitesi Bhanja vd. (2023) yaptıkları çalışmaya kıyasla ticari inülin ve meksika turpu polisakkaritlerinden daha yüksek olduğu Şekil 4.27'te görölmektedir. Literatürde bitkilerden ekstrakte edilen prebiyotiklerin FRAP aktiviteleri ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Çiriş bitkisinin köklerinden elde edilen inulin tipi fruktan ES'de tespit edilen FRAP sonuçlarıyla literatüre katkı sağlanacağı düşünölmektedir.

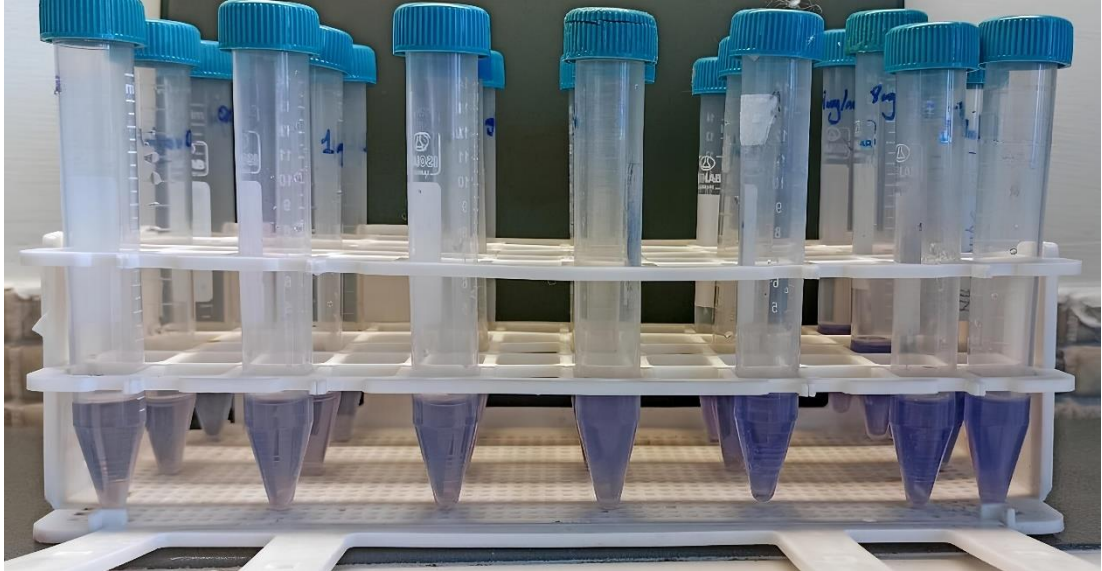
Çizelge 4.19. İnülin tipi fruktan ES'nin ferrik indirgeyici antioksidan güç sonuçları (ortalama $\pm$ standart sapma)

	Konsantrasyon (mg/mL)						
	0,5	1	2	4	6	8	10
İnülin tipi fruktan ES	$0,49 \pm 0,02^f$	$0,52 \pm 0,0^{ef}$	$0,63 \pm 0,2^e$	$0,85 \pm 0,04^d$	$1,03 \pm 0,05^c$	$1,18 \pm 0,06^b$	$1,34 \pm 0,0^a$

Aynı satırdaki küçük harfler grup içi istatistiksel farkı belirtmektedir ($P < 0,05$).



Şekil 4.27. İnülin tipi fruktan ES'nin demir indirgeme antioksidan gücü.



Şekil 4.28. İnülin tipi fruktan ES'nin demir indirgeme antioksidan deneyi görüntüsü.

4.5.6 Total antioksidan kapasite analizi

İnülin tipi fruktan ES'nin farklı konsantrasyonlarda (0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 6,00; 8,00; 10,00 mg/mL) antioksidan kapasitesi Şekil 3.11'de verilen kalibrasyon grafiği denklemi kullanılarak sonuçlar askorbik asit (AA) eşdeğeri olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.29). Total antioksidan kapasiteye, inülin tipi fruktan ES için konsantrasyona bağlı doğrusal artış göstermektedir. Maksimum total antioksidan kapasite 10 mg/mL konsantrasyon seviyesinde $63,73 \pm 3,45$ µg askorbik asit eşleniği olarak belirlenmiştir.

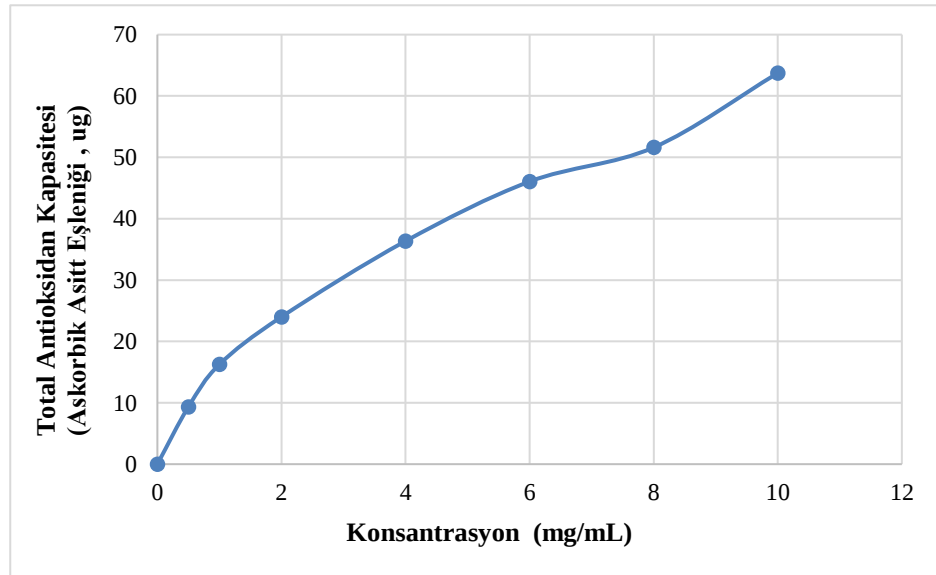
Çizelge 4.20 incelendiğinde, inülin tipi fruktan ES için elde edilen verilerin grup içerisinde (0,5-10 mg/mL aralığında) genellikle birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$).

Bouallegue vd. (2020) yaptıkları çalışmada *Bacillus subtilis* AF17'den elde ettikleri levanın 2 mg/mL' konsantrasyon seviyesinde $70,27\pm3,315$ total antioksidan aktivite gösterdiği belirtilmiştir. İnülin tipi fruktan ES *Bacillus subtilis* AF17 suşundan izole edilen levana kıyasla düşük total antioksidan süpürücü aktivite göstermiştir. Literatürde bitkilerden ekstrakte edilen prebiyotiklerin total antioksidan aktiviteleri ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Çiriş bitkisinin köklerinden elde edilen inulin tipi fruktan ES'de tespit edilen FRAP sonuçlarıyla literatüre katkı sağlanılacağı düşünülmektedir.

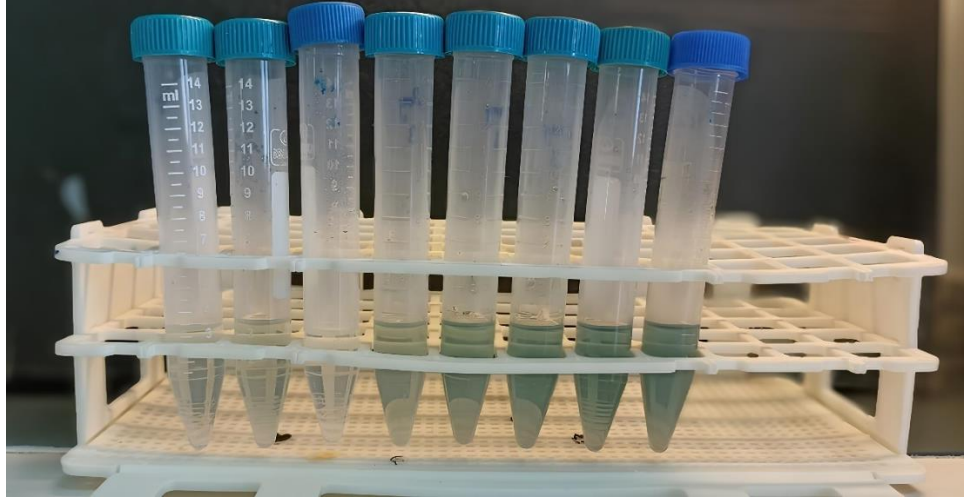
Çizelge 4.20. İnülin tipi fruktan ES'nin total antioksidan süpürücü aktivitesi (μg).

	Konsantrasyon (mg/mL)						
	0,5	1	2	4	6	8	10
İNÜLIN TİPİ FRUKTAN ES	9,33 $\pm$ 0,70 ^e	16,25 $\pm$ 2,90 ^e	24,00 $\pm$ 0,74 ^d	36,35 $\pm$ 1,47 ^c	46,06 $\pm$ 1,66 ^b	51,61 $\pm$ 2,03 ^b	63,73 $\pm$ 3,45 ^a

Aynı satırdaki küçük harfler grup içi istatistiksel farkı belirtmektedir ($P<0,05$).



Şekil 4.29. İnülin tipi fruktan ES'nin total antioksidan kapasitesi (askorbik asit eşleniği, μg).



Şekil 4.30. İnülin tipi fruktan ES'nin total antioksidan kapasitesi deneyi görüntüsü.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bitkilerden elde edilen prebiyotikler son zamanlarda gıda katkı maddesi ve yeni terapötik ajanların geliştirilmesi için kaynak olarak ilgi çekici hale gelmiştir. Bitki kaynaklı prebiyotiklerinin biyolojik aktiviteleri iyi tanımlanmıştır ancak bunların nutrasötikler olarak kullanımları hala sınırlı kalmıştır (Gómez-García vd., 2022). Bu nedenle Çiriş (*Eremurus spectabilis*) bitkisinden prebiyotik özelliklere sahip inülin tipi fruktanların izole edilip saflaştırılarak insan tüketimine yönelik sağlıklı ve faydalı gıda bileşeninin belirlenmesi ile biyolojik özelliklerinin araştırılması, tez çalışmasının konusunu oluşturmaktadır.

Tez çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre;

Prebiyotiklerin doğal kaynaklardan ekstraksiyonunun optimize edilmesi; verimi en üst düzeye çıkarmak, maliyetleri azaltmak, çevresel etkiyi en aza indirmek ve yüksek saflıkta prebiyotik oligosakkaritlerin elde edilmesi için önemlidir. Yüksek saflık bağırsak sağlığını ve genel refahını iyileştirmek isteyen tüketiciler için prebiyotiklerin daha yaygın olarak bulunmasına ve erişilebilir olmasına yardımcı olabilmektedir. Bu nedenle çalışmamızın ilk basamağı olan inülin tipi fruktanların ultrason destekli ekstraksiyonu; minitab programı, Box Bhenken tasarımı ile test edilmiş ve tepki yüzey metodolojisi ile optimizasyonu etkileyen parametreler incelenmiştir. Ekstraksiyon verimini etkileyen Sıcaklık (°C), süre (dk) ve konsantrasyon (g/mL) değişkenlerinin ekstraksiyon verimi üzerine etkileri test edildiğinde maksimum ekstraksiyon koşulu 60°C, 21dk, 1:12 g/mL olduğu ve verimin bu koşullar sağlandığında %44,94 olduğu tespit edilmiştir.

Prebiyotik bileşiğin, prebiyotik ajan olarak kullanılabilmesi ve fonksiyonel özelliklerini araştırmak için yeterince karakterize edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, *E. spectabilis*'ten elde edilen inülin tipi fruktanın fonksiyonel özelliklerinin daha derinlemesine anlaşılması, biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi, gıda ve diğer alanlardaki gelecekteki uygulamaları için iyi bir temel sağlayacaktır. Bu nedenle tez çalışmasında *E. spectabilis*'ten saflaştırılan inülin tipi fruktanların kimyasal yapısının; toplam karbonhidrat tayini, indirgeyici şeker tayini, monomer analizi, polimerizasyon derecesi, FTIR analizi, NMR analizi, termo gravimetrik analiz (TGA), ultraviyole görünürlük (UV-vis) analizi, taramalı elektron mikroskobu

(SEM), suda çözünürlük ve su tutma kapasitesi kombinasyonu kullanılarak karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışması kapsamında inülin tipi fruktan ES'nin polimerizasyon derecesi 58 olduğu belirlenmiştir. İnülin tipi fruktan ES'nin yüksek polimerizasyon derecesine sahip olması, yoğurt gibi fermente gıda ürünlerinde kullanıldığında ortamdaki faydalı mikroorganizmaların gelişimini uzun süre destekleyeceği için gıda katkı maddesi olarak kullanılması önerilmektedir.

İnülin tipi fruktan ES'nin suda çözünürlüğü $88,05 \pm 0,3$ değeri ile yüksek seviyede çözünürlük göstermiştir. Bu sonuçlar *E. spectabilis*'den ekstre edilen inülin tipi fruktan ES'nin gıda uygulamalarında kolay dağılımı sayesinde yüksek aktivite gösterebileceği düşünülmektedir.

İnülin tipi fruktan ES'nin su tutma kapasitesi $6,71 \pm 0,12$ g/g, yağ tutma kapasitesi $4,80 \pm 0,01$ g/g olduğu belirlenmiştir. İnülin tipi fruktanın yüksek STK ve YTK aktivitesi gıda uygulamalarında, gıda kalitesini ve saklama koşullarını iyileştirebilmekle birlikte tüketimi sonucu tüketiciye olumlu sindirim sistemi desteği sunabileceği düşünülmektedir.

İnülin tipi fruktan ES'nin nem miktarı $6,18 \pm 0,12$ olarak belirlenmiştir. İnülin tipi fruktan ES'nin düşük seviyedeki nem içeriği, gıda uygulamalarında, su aktivitesini azaltmasına buna bağlı olarak mikrobiyal büyümeyi ve bozulmayı kontrol altına alınmasında faydalı olabileceği öngörülmektedir.

İnülin tipi fruktan ES'nin şişme kapasitesi 2,6 mL/g olduğu belirlenmiştir. Yüksek şişme kapasitesi gösteren inülin tipi fruktan ES, gıda uygulamalarında tüketimi sonucu tokluk süresini artıracabileceği ve gıdanın fiziksel özelliklerini iyileştirebileceği düşünülmektedir.

E. spectabilis bitki köklerinden elde edilen inülin tipi fruktan ES'nin FTIR analizlerinden elde edilen sonuçlar incelendiğinde; enginar, buğday kepeği, hindiba ve bambu fruktanları için elde FTIR spektrumlarıyla benzerlik göstermektedir (Azmi vd., 2012; Velázquez-Martínez vd., 2014; Wang vd., 2009; Wu ve Lee, 2000). Aynı zamanda 1381 cm^{-1} civarında gözlenen pikler fruktoz halkasındaki CH, CH₂ ve OH gruplarının düzlem içi bükülme titreşimlerine ve iç deformasyonlarına ait olduğu

tespit edilmiştir. Oligosakaritlerin sulu çözeltilerindeki C-O-C glikosidik bağlantısının C=O titreşimleri 1019 cm^{-1} spektral aralıkta keskin bir bant olarak tespit edilerek ekstraksiyonun saflığını ve doğruluğunu desteklemektedir. NMR sonuçlarını değerlendirdiğimizde çiriş bitkisinden ekstrakte edilen ES'nin inülin tipi fruktan yapısında olduğunu önerebiliriz

İnülin tipi fruktan ES bileşeni için belirlenen erime noktaları TGA analizi aracılığıyla tespit edilmiştir. İnüşin tipi fruktan ES'nin 205°C 'ye kadar çıkan endüstriyel işlemlerde kullanılabileceği öngörülmektedir. Bu sıcaklığa kadar olan kütle kayıpları inülin tipi fruktan ES'nin içeriğindeki nem oranına ait olduğundan bu sıcaklığa kadar inülin tipi fruktan ES yapısında ve aktivitesinde değişim olmayacağı öngörülmektedir.

İnülin tipi fruktan ES'nin UV VİS spektrumları incelendiğinde; 240 nm absorbans seviyelerinde gözlenen piklerin yapısında fenolik içeriklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Fenolik içerikler bakımından zengin olan inülin tipi fruktan ES, antioksidan bileşik ve gıda katkı maddesi olarak kullanılma potansiyelinin olabileceği düşünülmektedir.

İnülin tipi fruktan ES'nin içerdiği monosakkarit bileşenlerin miktarı HPLC analizi aracılığıyla incelenmiş %39,39 fruktoz ve %60,61 glukoz monomerleri içeriği tespit edilmiştir. Bu sonuç *E. spectabilis* polisakkaritlerinin ticari bir prebiyotik olan inülinin kimyasal yapısına çok benzer olduğunu kanıtlar niteliktedir.

İnülin tipi fruktan ES'nin yüzey morfolojilerinin yüksek çözünürlükte görüntülenmesi amacıyla SEM analizi yapılmıştır. SEM görüntülemesi incelendiğinde yüzey morfolojisinin gözenekli bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir ve ticari inülinin morfolojik yapısına benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda da *E. spectabilis* bitkisinin kökünden ekstrakte edilen inülin tipi fruktan ES'nin prebiyotik özelliklerinin belirlenebilmesi için probiyotik mikroorganizmalar tarafından fermente edilmesi (Prebiyotik İndeks), probiyotik ve patojen mikroorganizmalar tarafından fermentasyon özellikleri (Prebiyotik Skor Aktiviteleri), ve farklı pH'da yapay mide sıvısı ortamlarındaki dirençleri araştırılmıştır.

İnülin tipi fruktan ES'nin prebiyotik özelliklerinin belirlenmesi için yapılan araştırmalar sonucu;

Bir karbonhidrat bileşeninin prebiyotik olarak kullanılabilmesi için bağırsak patojenleri tarafından fermente edilmemesi, probiyotik mikroorganizmalar tarafından ise patojen mikroorganizmalara kıyasla daha yüksek oranda fermente edilmesi gerekmektedir.

Tüm test bakterilerinin 24 saat süresince inulin tipi fruktan ES'yi fermente edilebildiği ve canlılığını sürdürdüğü tespit edilmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan glikozu tamamen çıkarılan MRS besiyeri (Glikozsuz-MRS) ile kıyaslandığında inulin tipi fruktan ES içeren MRS besiyerinde *L. rhamnosus* ACS5 suşunun 0 ve 24 saatlerindeki canlılık oranları daha yüksek olduğu, pozitif kontrol olarak kullanılan glikozlu-MRS besi ortamında 0-24 saatlik inkübasyon süresince canlılık sırasıyla; 7,24-9,33 log kob/mL ve ticari prebiyotik inülinde canlılık 6,98-9,26 log kob/mL olduğu gözlemlenmiştir. *E. spectabilis* köklerinden ekstre edilen ve prebiyotik özelliği test edilen inülin tipi fruktan ES 0-24 saatlik inkübasyon süresince pozitif kontrol ve inüline kıyasla yüksek canlılık gösterdiği (7,46-9,58 log kob/mL) tespit edilmiştir. Test edilen bağırsak patojenlerinin en iyi glikoz içeren besi ortamında gelişim gösterdikleri ve ticari prebiyotik olan inülini, inulin tipi fruktan ES'den daha iyi fermente edebildikleri gözlenmiştir. Yapılan çalışma ile inulin tipi fruktan ES'nin bağırsak patojen mikroorganizmaları tarafından düşük oranda fermente edildiği; canlılık oranlarının pozitif kontrole ve ticari prebiyotik kaynağı olarak kullanılan inüline kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar inülin tipi fruktan ES'nin ticari prebiyotik kaynaklarına alternatif potansiyel bir prebiyotik kaynağı olarak kullanılabileceği öngörülmektedir.

Prebiyotik bileşenlerin tüketici sağlığına olumlu etki gösterebilmeleri için mide asidinde hidrolizinin düşük olması gerektiği bilinmektedir. İnülin tipi fruktan ES'nin test edilen tüm pH koşullarında %10 dan küçük hidroliz göstermektedir bu da inülin tipi fruktanların çoğunun sindirilmediğini ve dolayısıyla kalın bağırsağa ulaşabilecekleri düşünülmektedir.

İnülü tipi fruktan ES, kontrol olarak yüksek antioksidan aktivite yeteneğine sahip olan askorbik asit (AA) kullanılarak DPPH, ABTS, hidroksil radikal süpürücü aktivite, süperoksit anyonu radikallerinin süpürücü aktiviteleri, FRAP ve total antioksidan kapasite analizleri yapılarak potansiyel antioksidan olarak kullanılabilirliği test edilmiştir.

İnülin tipi fruktan ES'nin antioksidan biyolojik aktivitesinin değerlendirilmesi için yapılan çalışmalar sonucu;

İnülin tipi fruktan ES'nin düşük konsantrasyonlarda yüksek DPPH ve ABTS⁺ radikal süpürücü aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. İnülin tipi fruktan ES ile pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit arasında benzer hidroksil radikal süpürücü aktivite profilleri gözlenmiş olup konsantrasyonun artmasıyla aktivite değerlerinde kademeli olarak artış gözlenmiştir. Süper oksit anyon süpürücü aktivitesi incelendiğinde, kontrol olarak test edilen askorbik aside kıyasla düşük aktivite göstermektedir. İnülin tipi fruktan ES için konsantrasyona bağlı doğrusal süperoksit anyon süpürücü aktivitede artış göstermektedir. Bu nedenle, inülin tipi fruktan ES'nin anlamlı süperoksit anyon süpürücü etki göstermesi için yüksek konsantrasyonların test edilmesi gerekmektedir. İnülin tipi fruktan ES'nin askorbik asit eşleniği kullanılarak test edilen FRAP ve total antioksidan süpürücü aktiviteleri incelendiğinde artan konsantrasyonlara bağlı olarak aktivitenin arttığı ve ticari inüline kıyasla yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

İnülin tipi fruktan ES'nin genel olarak yüksek antioksidan aktivite gösterdiği, bu aktiviteye sebep olan mekanizmanın ise inülin tipi fruktanın içerdiği fenolik bileşiklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Antioksidan aktivite mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi için inülin tipi fruktan ES'nin fenolik bileşiklerinin ayrıntılı karakterizasyonunun yapılması önerilmektedir.

Genel olarak inülin tipi fruktan ES'nin; minimum maliyetlerde yüksek verimde elde edilebilmesi, fiziksel özelliklerinin gıda uygulamaları ve tüketici sağlığı üzerindeki olumlu etkileri, potansiyel probiyotik suşlar tarafından fermente edilip patojen mikroorganizmalar tarafından düşük seviyede kullanılabilmesi, mide asit hidrolizine dayanıklı olması ve yüksek antioksidan süpürücü aktiviteye sahip olması *E.*

spectabilis köklerinin endstrüyel uygulamalar için doğal, güvenilir bir kaynak olduğunu düşünmekteyiz.



KAYNAKLAR

- Akdag, S. ve Tuncer, B., 2020. Effects of combined pretreatments on germination and emergence of wild *Eremurus spectabilis* M. Bieb. Seeds, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 48, 2, 1-23.
- Álvarez-Borroto, R., González-Gavilánez, H. R. ve Montenegro-Cepeda, A. C., 2019. Extracción y determinación del contenido de fructanos del tipo inulina del yacón (*Smallanthus sonchifolius*): Esquema tecnológico para su producción industrial, *Tecnología Química*, 39, 1, 37-48.
- Angelin, J. ve Kavitha, M., 2020. Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential, *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 1, 853-865.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S. ve Robards, K., 2002. Methods for testing antioxidant activity, *Analyst*, 127, 1, 183-198.
- Arya, S. S. ve Shakya, N. K., 2021. High fiber, low glycaemic index (GI) prebiotic multigrain functional beverage from barnyard, foxtail and kodo millet, *Food Science and Technology*, 135, 1, 1-8.
- Azmi, A. F. M. N., Mustafa, S., Hashim, D. M. ve Manap, Y. A., 2012. Prebiotic activity of polysaccharides extracted from *Gigantochloa levis* (Buluh beting) shoots, *Molecules*, 17, 2, 1635-1651.
- Baenas, N., Nunez-Gomez, V., Navarro-Gonzalez, I., Sanchez-Martinez, L., Garcia-Alonso, J., Periago, M. J. ve Gonzalez-Barrio, R., 2020. Raspberry dietary fibre: chemical properties, functional evaluation and prebiotic *in vitro* effect, *LWT*, 134, 1, 1-10.
- Bamigbade, G. B., Subhash, A. J., Kamal-Eldin, A., Nyström, L. ve Ayyash, M., 2022. An updated review on prebiotics: Insights on potentials of food seeds waste as source of potential prebiotics, *Molecules*, 27, 18, 1-34.
- Barclay, T., Ginic-Markovic, M., Cooper, P. ve Petrovsky, N., 2016. Inulin-a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses, *Journal of Excipients and Food Chemicals*, 1, 3, 1-24.
- Benkeblia, N., 2022. Insights on fructans and resistance of plants to drought stress, *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6, 1, 1-12.
- Benzie, I. F. F. ve Strain, J. J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay, *Analytical Biochemistry*, 239, 1, 70-76.
- Bhanja, A., Paikra, S. K., Sutar, P. P. ve Mishra, M., 2023. Characterization and identification of inulin from *Pachyrhizus erosus* and evaluation of its antioxidant and *in-vitro* prebiotic efficacy, *Journal of Food Science and Technology*, 60, 1, 328-339.

- Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M. E. ve Ouwehand, A. C., 2020. Criteria to qualify Microorganisms as “probiotic” in foods and dietary supplements, *Frontiers in Microbiology*, 11, 1, 1-9.
- Bornet, F. R. J., Meflah, K. ve Menanteau, J., 2002. Enhancement of gut immune functions by short-chain fructooligosaccharides and reduction of colon cancer risk, *Bioscience and Microflora*, 21, 1, 55-62.
- Cardoso, B. B., Amorim, C., Silvério, S. C. ve Rodrigues, L. R., 2021. Novel and emerging prebiotics: Advances and opportunities, *Advances in Food and Nutrition Research*, 95, 1, 41-95.
- Castañeda-Salazar, A., Figueroa-Cárdenas, J. de D., López, M. G. ve Mendoza, S., 2023. Physicochemical and functional characterization of agave fructans modified by cationization and carboxymethylation, *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 5, 1, 1-10.
- Chakker, H. A., Schold, J. D. ve Kaplan, B., 2016. P value: Significance is not all black and white, *Transplantation*, 100, 8, 1607-1609.
- Chen, H.-L., Lu, Y.-H. ve Ko, L.-Y., 2000. Effects of fructooligosaccharide on bowel function and indicators of nutritional status in constipated elderly men, *Nutrition Research*, 20, 12, 1725-1733.
- Cheng, S., Xiao, L., Qin, S., Ruirui, X. I. A., Liu, X., Jinlong, Y. A. N. ve Zhiguang, Z. O. U., 2020. Soluble dietary fiber and preparation method thereof, Google Patents.
- Cınar, A., AY, S. T., Fırat, A., Karabak, S., Guzelsoy, N. ve Ucurum, O., 2017. Foxtail Lilly (*Eremurus spectabilis* M. Bieb.) as priority species of biodiversity for food and nutrition project of Turkey, *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 27, 2, 69-73.
- Côté, G. L., 2009. Acceptor products of alternansucrase with gentiobiose. Production of novel oligosaccharides for food and feed and elimination of bitterness, *Carbohydrate Research*, 344, 2, 187-190.
- Cruz-Paredes, C., Tájmél, D. ve Rousk, J., 2021. Can moisture affect temperature dependences of microbial growth and respiration, *Soil Biology and Biochemistry*, 156, 1, 1-10.
- Cui, S. W. ve Roberts, K. T., 2009. Dietary fiber: Fulfilling the promise of added-value formulations, *Modern Biopolymer Science*, 1, 1, 399-448.
- Dantas, A., Verruck, S., Canella, M. H. M., Maran, B. M., Murakami, F. S., de Avila Junior, L. B. ve Prudencio, E. S., 2021. Current knowledge about physical properties of innovative probiotic spray-dried powders produced with lactose-free milk and prebiotics, *Food Science and Technology*, 151, 1-11.

- Das, D., Baruah, R. ve Goyal, A., 2014. A food additive with prebiotic properties of an α -d-glucan from *Lactobacillus plantarum* DM5, International Journal of Biological Macromolecules, 69, 1, 20-26.
- Dashti, M., Zarif Ketabi, H., Paryab, A. ve Tavakoli, H., 2005. Study of ecological requirements of Foxtail Lili (*Eremurus spectabilis*) in Khorasan, Iranian Journal of Range and Desert Research, 12, 2, 153-166.
- Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S. J. ve Ghasemi, Y., 2019. Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications, Foods, 8, 3, 92.
- Del Pozo, A., Méndez-Espinoza, A. M. ve Yáñez, A., 2019. Fructan metabolism in plant growth and development and stress tolerance, Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants: Recent Advances and Future Perspectives, 1, 1, 319-334.
- Dimitroglou, A., Merrifield, D. L., Spring, P., Sweetman, J., Moate, R. ve Davies, S. J., 2010. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*), Aquaculture, 300, 1-4, 182-188.
- Dodoo, C. C., Wang, J., Basit, A. W., Stapleton, P. ve Gaisford, S., 2017. Targeted delivery of probiotics to enhance gastrointestinal stability and intestinal colonisation, International Journal of Pharmaceutics, 530, 1-2, 224-229.
- Dzah, C. S. ve Dzigbor, A., 2023. Ultrasound assisted extraction: A relook at solvent to material ratio, its effects on process efficiency and how it can be exploited for different uses, Journal of Food Process Engineering, 46, 7, 1-13.
- Eggleston, G., Triplett, A., Gaston, P. ve Stewart, D., 2022. Fructan (Levan) is a more pervasive polysaccharide in the sugar industry than previously thought, 147, 11, 556-564.
- El-Kholy, W. M., Bisar, G. H. ve Aamer, R. A., 2023. Impact of inulin extracted, purified from (chicory and globe artichoke) roots and the combination with maltodextrin as prebiotic dietary fiber on the functional properties of stirred bio-yogurt, Food and Nutrition Sciences, 14, 2, 70-89.
- Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C. ve Attia, H., 2011. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review, Food Chemistry, 124, 2, 411-421.
- Eseceli, H., Değirmencioğlu, N., Demir, E. ve Bilgic, M., 2010. The effects of bio-mos (r) mannan oligosaccharide and antibiotic growth promoter performance of broilers, Journal of Animal and Veterinary Advances, 9, 2, 1-4.

- Esmaeili, F., Hashemiravan, M., Eshaghi, M. R. ve Gandomi, H., 2021. Optimization of aqueous extraction conditions of inulin from the *Arctium lappa* L. roots using ultrasonic irradiation frequency, *Journal of Food Quality*, 2021, 1-12.
- Figueira, G. M., Park, K. J., Brod, F. P. R. ve Honorio, S. L., 2004. Evaluation of desorption isotherms, drying rates and inulin concentration of chicory roots (*Cichorium intybus* L.) with and without enzymatic inactivation, *Journal of Food Engineering*, 63, 3, 273-280.
- Figueroa-Gonzalez, I., Rodriguez-Serrano, G., Gomez-Ruiz, L., Garcia-Garibay, M. ve Cruz-Guerrero, A., 2019. Prebiotic effect of commercial saccharides on probiotic bacteria isolated from commercial products, *Food Science and Technology*, 3, 39, 747-753.
- Flores-Girón, E., Salazar-Montoya, J. A. ve Ramos-Ramírez, E. G., 2016. Application of a Box–Behnken design for optimizing the extraction process of agave fructans (*Agave tequilana* Weber var. Azul), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 11, 3860-3866.
- Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Munoz-Quezada, S. ve Gil, A., 2013. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics, *British Journal of Nutrition*, 109, 52, 535-550.
- Fu, Y.-P., Li, L.-X., Zhang, B.-Z., Paulsen, B. S., Yin, Z.-Q., Huang, C. ve Song, X., 2018. Characterization and prebiotic activity *in vitro* of inulin-type fructan from *Codonopsis pilosula* roots, *Carbohydrate Polymers*, 193, 1, 212-220.
- Fujimoto, Y., Hattori, T., Uno, S., Murata, T. ve Usui, T., 2009. Enzymatic synthesis of gentiooligosaccharides by transglycosylation with β -glycosidases from *Penicillium multicolor*, *Carbohydrate Research*, 344, 8, 972-978.
- Funane, K., Terasawa, K., Mizuno, Y., Ono, H., Miyagi, T., Gibu, S. ve Kimura, A., 2007. A novel cyclic isomaltooligosaccharide (cycloisomaltodecaose, CI-10) produced by *Bacillus circulans* T-3040 displays remarkable inclusion ability compared with cyclodextrins, *Journal of Biotechnology*, 130, 2, 188-192.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J. ve Cani, P. D., 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics, *Nature reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14, 8, 491-502.
- Goh, Y. J., Lee, J.-H. ve Hutkins, R. W., 2007. Functional analysis of the fructooligosaccharide utilization operon in *Lactobacillus paracasei* 1195, *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 18, 5716-5724.
- Gómez-García, R., Sánchez-Gutiérrez, M., Freitas-Costa, C., Vilas-Boas, A. A., Campos, D. A., Aguilar, C. N. ve Pintado, M., 2022. Prebiotic effect, bioactive compounds and antioxidant capacity of melon peel (*Cucumis melo* L. *inodorus*) flour subjected to *in*

vitro gastrointestinal digestion and human faecal fermentation, Food Research International, 154, 1, 1-13.

- Gopal, P. K., Sullivan, P. A. ve Smart, J. B., 2001. Utilisation of galacto-oligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20, International Dairy Journal, 11, 1, 19-25.
- Guo, Z., Zhao, B., Li, H., Miao, S. ve Zheng, B., 2019. Optimization of ultrasound-microwave synergistic extraction of prebiotic oligosaccharides from sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.), Innovative Food Science and Emerging Technologies, 54, 1, 51-63.
- Gürgün, V. ve Halkman, A. K., 1990. Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri, Gıda Teknolojisi Dernegi Basım ve grafik. Numara. 7.
- Halliwell, B., Adhikary, A., Dingfelder, M. ve Dizdaroglu, M., 2021. Hydroxyl radical is a significant player in oxidative DNA damage *in vivo*, Chemical Society Reviews, 50, 15, 8355-8360.
- Hernández-Hernández, O., Marín-Manzano, M. C., Rubio, L. A., Moreno, F. J., Sanz, M. L. ve Clemente, A., 2012. Monomer and linkage type of galacto-oligosaccharides affect their resistance to ileal digestion and prebiotic properties in rats, The Journal of Nutrition, 142, 7, 1232-1239.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B. ve Salminen, S., 2014. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic, Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, 11, 1, 506-514.
- Hongpattarakere, T., Cherntong, N., Wichienchot, S., Kolida, S. ve Rastall, R. A., 2012. *In vitro* prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria, Carbohydrate Polymers, 87, 1, 846-852.
- Huang, R., Xing, H.-Y., Liu, H.-J., Chen, Z.-F. ve Tang, B.-B., 2021. Efficacy of probiotics in the treatment of acute diarrhea in children: systematic review and meta-analysis of clinical trials, Translational Pediatrics, 10, 12, 3248-3260.
- Huebner, J., Wehling, R. L. ve Hutkins, R. W., 2007. Functional activity of commercial prebiotics, International Dairy Journal, 17, 7, 770-775.
- Huq, T., Vu, K. D., Riedl, B., Bouchard, J., Han, J. ve Lacroix, M., 2016. Development of probiotic tablet using alginate, pectin, and cellulose nanocrystals as excipients, Cellulose, 23, 1, 1967-1978.
- Hurtado-Romero, A., Del Toro-Barbosa, M., Garcia-Amezquita, L. E. ve García-Cayuela, T., 2020. Innovative technologies for the production of food ingredients with prebiotic potential: Modifications, applications, and validation methods, Trends in Food Science and Technology, 104, 1, 117-131.

- Iliev, I., Vassileva, T., Ignatova, C., Ivanova, I., Haertlé, T., Monsan, P. ve Chobert, J., 2008. Gluco-oligosaccharides synthesized by glucosyltransferases from constitutive mutants of *Leuconostoc mesenteroides* strain Lm 28, *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1, 243-250.
- Jackson, P. P. J., Wijeyesekera, A. ve Rastall, R. A., 2023. Inulin-type fructans and short-chain fructooligosaccharides—their role within the food industry as fat and sugar replacers and texture modifiers—what needs to be considered!, *Food Science & Nutrition*, 11, 1, 17-38.
- Jiang, G., Jiang, Y., Yang, B., Yu, C., Tsao, R., Zhang, H. ve Chen, F., 2009. Structural characteristics and antioxidant activities of oligosaccharides from longan fruit pericarp, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 19, 9293-9298.
- Jovanovic-Malinovska, R., Kuzmanova, S. ve Winkelhausen, E., 2015. Application of ultrasound for enhanced extraction of prebiotic oligosaccharides from selected fruits and vegetables, *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 1, 446-453.
- Judprasong, K., Tanjor, S., Puwastien, P. ve Sungpuag, P., 2011. Investigation of Thai plants for potential sources of inulin-type fructans, *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 4, 642-649.
- Kaplan, H. ve Hutkins, R. W., 2003. Metabolism of fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4, 2217-2222.
- Karaoğlu, E. S., Albayrak, A., Kutlu, Z. ve Bayır, Y., 2018. Gastroprotective and antioxidant effects of *Eremurus spectabilis* Bieb. methanol extract and its isolated component isoorientin on indomethacin induced gastric ulcers in rats, *Acta Cirurgica Brasileira*, 33, 1, 609-618.
- Katapodis, P. ve Christakopoulos, P., 2008. Enzymic production of feruloyl xylo-oligosaccharides from corn cobs by a family 10 xylanase from *Thermoascus aurantiacus*, *LWT-Food Science and Technology*, 41, 7, 1239-1243.
- Kawakami, A. ve Yoshida, M., 2005. Fructan: fructan 1-fructosyltransferase, a key enzyme for biosynthesis of graminan oligomers in hardened wheat. *Planta*, 223, 1, 90-104.
- Khorasani, M. M., Yousefi, A. A. ve Ershad, L. A., 2006. Viscoelastic Behaviour of Asphodel-Borax Gels, *Iranian Journal of Polymer Science and Technology*, 19, 1, 3-11.
- King, S., Tancredi, D., Lenoir-Wijnkoop, I., Gould, K., Vann, H., Connors, G. ve Merenstein, D., 2019. Does probiotic consumption reduce antibiotic utilization for common acute infections? A systematic review and meta-analysis, *European Journal of Public Health*, 29, 3, 494-499.

- Kneifel, W., 2000. *In vitro* growth behaviour of probiotic bacteria in culture media with carbohydrates of prebiotic importance, *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12, 1, 27-34.
- Korzenik, J. R. ve Podolsky, D. K., 2006. Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease, *Nature reviews Drug Discovery*, 5, 3, 197-209.
- Kumar, C. G., Sripada, S. ve Poornachandra, Y., 2018. Status and future prospects of fructooligosaccharides as nutraceuticals. *Role of Materials Science in Food Bioengineering*, 1, 1, 451-503.
- Korzenik, J. R. ve Podolsky, D. K., 2006. Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease, *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 3, 197-209.
- Kumar, C. G., Sripada, S. ve Poornachandra, Y., 2018. Status and future prospects of fructooligosaccharides as nutraceuticals, *Role of Materials Science in Food Bioengineering*, 1, 1, 451-503.
- Kustyawati, M. E., Nurlita, E. M., Fadhalah, E. G. ve Rizal, S., 2022. Prebiotic activity of *Lactobacillus casei* grown on medium containing of *Hylocereus undatus* extract and its use in the fermentation of goat's milk kefir, *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23, 12, 6513-6519.
- Kut, K., Stefaniuk, I., Bartosz, G. ve Sadowska-Bartos, I., 2023. Formation of a Purple Product upon the Reaction of ABTS Radicals with Proteins, *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 10, 1-13.
- Larosa, V. ve Remacle, C., 2018. Insights into the respiratory chain and oxidative stress, *Bioscience Reports*, 38, 5, 393-405.
- Lee, M.-G., Joeng, H., Shin, J., Kim, S., Lee, C., Song, Y. ve Jiang, H.-H., 2022. Potential probiotic properties of exopolysaccharide-producing *Lactocaseibacillus paracasei* EPS DA-BACS and prebiotic activity of its exopolysaccharide, *Microorganisms*, 10, 12, 1-20.
- Leyva-Porras, C., Saavedra-Leos, M. Z., López-Pablos, A. L., Soto-Guerrero, J. J., Toxqui-Terán, A. ve Fozado-Quiroz, R. E., 2017. Chemical, thermal and physical characterization of inulin for its technological application based on the degree of polymerization, *Journal of Food Process Engineering*, 40, 1, 1-13.
- Li, H., Yao, Y., Yang, X., Zhou, X., Lei, R. ve He, S., 2022. Degradation of phenol by photocatalysis using TiO₂/montmorillonite composites under UV light, *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 45, 68293-68305.
- Li, J., Zhang, X., Cao, L., Ji, J. ve Gao, J. 2018. Three inulin-type fructans from *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. Roots and their prebiotic activity on *Bifidobacterium longum*, *Molecules*, 23, 12, 1-11.

- Li, T., Li, S., Du, L., Wang, N., Guo, M., Zhang, J. ve Zhang, H., 2010. Effects of haw pectic oligosaccharide on lipid metabolism and oxidative stress in experimental hyperlipidemia mice induced by high-fat diet, *Food Chemistry*, 121, 4, 1010-1013.
- Li, W., Xia, X., Tang, W., Ji, J., Rui, X., Chen, X. ve Dong, M., 2015. Structural characterization and anticancer activity of cell-bound exopolysaccharide from *Lactobacillus helveticus* MB2-1, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 13, 3454-3463.
- Liao, S. F. ve Nyachoti, M., 2017. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization, *Animal Nutrition*, 3, 4, 331-343.
- Lin, X., Chen, J., Xiao, G., Xu, Y., Tang, D., Wu, J. ve Chen, W., 2016. Extraction, molecular weight distribution, and antioxidant activity of oligosaccharides from longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) pulp, *Food Science and Biotechnology*, 25, 3, 701-706.
- Lingyun, W., Jianhua, W., Xiaodong, Z., Da, T., Yalin, Y., Chenggang, C. ve Fan, Z., 2007. Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers, *Journal of Food engineering*, 79, 3, 1087-1093.
- Liu, H.-T., He, J.-L., Li, W.-M., Yang, Z., Wang, Y.-X., Bai, X.-F. ve Du, Y.-G., 2010. Chitosan oligosaccharides protect human umbilical vein endothelial cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis, *Carbohydrate Polymers*, 80, 4, 1062-1071.
- Liu, Y., Sun, W., Li, B., Shang, N., Wang, Y., Lv, W. ve Wang, L., 2021. Value-added application of *Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A. DC. roots (PGR) by ultrasound-assisted extraction (UAE) process to improve physicochemical quality, structural characteristics and functional properties, *Food Chemistry*, 363, 1, 1-11.
- Lopes, S. M. S., Krausová, G., Carneiro, J. W. P., Gonçalves, J. E., Gonçalves, R. A. C. ve de Oliveira, A. J. B., 2017. A new natural source for obtainment of inulin and fructo-oligosaccharides from industrial waste of *Stevia rebaudiana* Bertoni, *Food Chemistry*, 225, 1, 154-161.
- Lu, X., Li, N., Zhao, R., Zhao, M., Cui, X., Xu, Y. ve Qiao, X., 2021. *In vitro* prebiotic properties of garlic polysaccharides and its oligosaccharide mixtures obtained by acid hydrolysis, *Frontiers in Nutrition*, 8, 1, 1-10.
- Lundgren, C. A. K., Sjöstrand, D., Biner, O., Bennett, M., Rudling, A., Johansson, A.-L. ve Högbom, M., 2018. Scavenging of superoxide by a membrane-bound superoxide oxidase, *Nature Chemical Biology*, 14, 8, 788-793.
- Machado, M. T. C., Eca, K. S., Vieira, G. S., Menegalli, F. C., Martinez, J. ve Hubinger, M. D., 2015. Prebiotic oligosaccharides from artichoke industrial waste: evaluation of different extraction methods, *Industrial Crops and Products*, 76, 1, 141-148.
- Madhukumar, M. S. ve Muralikrishna, G., 2010. Structural characterisation and determination of prebiotic activity of purified xylo-oligosaccharides obtained from

Bengal gram husk (*Cicer arietinum* L.) and wheat bran (*Triticum aestivum*), Food Chemistry, 118, 2, 215-223.

- Mano, M. C. R., Neri-Numa, I. A., da Silva, J. B., Paulino, B. N., Pessoa, M. G. ve Pastore, G. M., 2018. Oligosaccharide biotechnology: approach of prebiotic revolution on the industry, Applied Microbiology and Biotechnology, 102, 1, 17-37.
- Marhamati, M., Kakhaki, Z. K. ve Rezaie, M., 2020. Advance in Ultrasound-Assisted Extraction of Edible Oils: A Review, Journal of Nutrition, Fasting & Health, 8, 4, 1-13.
- Maryati, Y., Nuraida, L. ve Hariyadi, R. D., 2021. Production of Organic Acid and Short-Chain Fatty Acids (SCFA) from Lactic Acid Bacteria Isolate on Oligosaccharide Media, Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi, 24, 6, 213-221
- Matussek, A., Merész, P., Le, T. K. D. ve Örsi, F., 2009. Effect of temperature and pH on the degradation of fructo-oligosaccharides, European Food Research and Technology, 228, 1, 355-365.
- McBurney, M. I., Horvath, P. J. ve Jeraci, J. L., 1985. Effect of *in vitro* fermentation using human faecal inoculum on the water-holding capacity of dietary fibre, British Journal of Nutrition, 53, 1, 17-24.
- Meena, A. K., Verma, S. C., Rani, R., Rao, M. M., Panda, P., Padhi, M. M. ve Devalla, R. B., 2012. Evaluation of preliminary phytochemical and physicochemical studies on *Juniperus communis* L. fruit used in ayurvedic formulations, Research Journal of Pharmacy and Technology, 5, 1, 88-91.
- Miller, G. L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Analytical chemistry, 31, 3, 426-428.
- Mirzadeh, M., Lelekami, A. K. ve Khedmat, L., 2021. Plant/algal polysaccharides extracted by microwave: A review on hypoglycemic, hypolipidemic, prebiotic, and immune-stimulatory effect, Carbohydrate Polymers, 266, 1, 1-14.
- Mitsou, E. K., Turunen, K., Anapliotis, P., Zisi, D., Spiliotis, V. ve Kyriacou, A., 2009. Impact of a jelly containing short-chain fructo-oligosaccharides and Sideritis euboea extract on human faecal microbiota, International Journal of Food Microbiology, 135, 2, 112-117.
- Moumita, S. ve Das, B., 2022. Assessment of the prebiotic potential and bioactive components of common edible mushrooms in India and formulation of synbiotic microcapsules, LWT, 156, 1, 1-10.
- Moure, A., Gullón, P., Domínguez, H. ve Parajó, J. C., 2006. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals, Process Biochemistry, 41, 9, 1913-1923.

- Mundi, M., Mikal, K. M., Ahmed, O. H. ve Sarbini, S. R., 2017. A review on the effects of prebiotics on cell toxicity and integrity, *International Journal of Food Properties*, 20, 3, 1045, 1052.
- Munjal, U., Glei, M., Pool-Zobel, B. L. ve Scharlau, D., 2009. Fermentation products of inulin-type fructans reduce proliferation and induce apoptosis in human colon tumour cells of different stages of carcinogenesis, *British Journal of Nutrition*, 102, 5, 663-671.
- Ngueumaleu, Y., Deutchoua, A. D. D., Hanga, S. S. P., Liendji, R. W., Dedzo, G. K. ve Ngameni, E., 2023. Probing the reactivity of 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) with metal cations and acids in acetonitrile by electrochemistry and UV-Vis spectroscopy, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 25, 6, 5282-5290.
- O'Bryan, C. A., Pak, D., Crandall, P. G., Lee, S. O. ve Ricke, S. C., 2013. The role of prebiotics and probiotics in human health, *Health*, 108, 1, 1-2.
- Okada, H., Fukushi, E., Yamamori, A., Kawazoe, N., Onodera, S., Kawabata, J. ve Shiomi, N., 2010. Novel fructopyranose oligosaccharides isolated from fermented beverage of plant extract, *Carbohydrate Research*, 345, 3, 414-418.
- Palframan, R., Gibson, G. R. ve Rastall, R. A., 2003. Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides, *Letters in Applied Microbiology*, 37, 4, 281-284.
- Paseephol, T., Small, D. ve Sherkat, F., 2007. Process optimisation for fractionating Jerusalem artichoke fructans with ethanol using response surface methodology, *Food Chemistry*, 104, 1, 73-80.
- Phat, C., Li, H., Lee, D.-U., Moon, B., Yoo, Y.-B. ve Lee, C., 2015b. Characterization of *Hericium erinaceum* powders prepared by conventional roll milling and jet milling, *Journal of Food Engineering*, 145, 1, 19-24.
- Pompei, A., Cordisco, L., Raimondi, S., Amaretti, A., Pagnoni, U. M., Matteuzzi, D. ve Rossi, M., 2008. *In vitro* comparison of the prebiotic effects of two inulin-type fructans, *Anaerobe*, 14, 5, 280-286.
- Pourfarzad, A., Habibi Najafi, M. B., Haddad Khodaparast, M. H. ve Hassanzadeh Khayyat, M., 2015. Characterization of fructan extracted from *Eremurus spectabilis* tubers: a comparative study on different technical conditions, *Journal of Food Science and Technology*, 52, 1, 2657-2667.
- Pourfarzad, A., Najafi, M. B. H., Khodaparast, M. H. H., Khayyat, M. H. ve Malekpour, A., 2014. Fractionation of *Eremurus spectabilis* fructans by ethanol: Box–Behnken design and principal component analysis, *Carbohydrate Polymers*, 106, 1, 374-383.
- Quatto, P., Ripamonti, E. ve Marasini, D., 2022. Beyond $p < .05$: a critical review of new Bayesian proposals for assessing the p-value, *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, 32, 2, 308-329.

- Quigley, E. M. M., 2010. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota, *Pharmacological Research*, 61, 3, 213-218.
- Rahim, M. A., Yasmin, A., Imran, M., Nisa, M. U., Khalid, W., Esatbeyoglu, T. ve Korma, S. A., 2022. Optimization of the ultrasound operating conditions for extraction and quantification of Fructooligosaccharides from garlic (*Allium sativum* L.) via high-performance liquid chromatography with refractive index detector, *Molecules*, 27, 19, 1-11.
- Rawi, M. H., Zaman, S. A., Pa'ee, K. F., Leong, S. S. ve Sarbini, S. R., 2020. Prebiotics metabolism by gut-isolated probiotics, *Journal of Food Science and Technology*, 57, 8, 2786-2799.
- Redondo-Cuenca, A., Herrera-Vázquez, S. E., Condezo-Hoyos, L., Gómez-Ordóñez, E. ve Rupérez, P., 2021. Inulin extraction from common inulin-containing plant sources, *Industrial Crops and Products*, 170, 1, 1-9.
- Renye Jr, J. A., White, A. K. ve Hotchkiss Jr, A. T., 2021. Identification of *Lactobacillus* strains capable of fermenting fructo-oligosaccharides and inulin, *Microorganisms*, 9, 10, 1-11.
- Rivera-Huerta, M., Lizárraga-Grimes, V. L., Castro-Torres, I. G., Tinoco-Méndez, M., Macías-Rosales, L., Sánchez-Bartéz, F. ve Gracia-Mora, M. I., 2017. Functional effects of prebiotic fructans in colon cancer and calcium metabolism in animal models, *BioMed Research International*, 2017, 1, 1-11.
- Roberfroid, M. ve Buddington, R., 2007. Inulin and oligofructose: health benefits and claims: a critical review: Proceedings of the 5th ORAFTI research conference Inulin and oligofructose: proven health benefits and claims, *Journal of Nutrition Supplement*, 137, 11, 2489-2597.
- Rubin, R., 2002. The Melagria: on anchorites and edible roots in Judaeen Desert, *Liber Annuus*, 52, 1, 347-352.
- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J.-M. ve Bressollier, P., 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field, *LWT-Food Science and Technology*, 50, 1, 1-16.
- Sağcan, N., Sağcan, H., Bozkurt, F., Güneş, A. N. B., Fakir, H., Dertli, E. ve Sağdıç, O., 2024. Optimization of inulin extraction from chicory roots and an ultrafiltration application to obtain purified inulin and hydrolyzed fructooligosaccharides, *Journal of Agricultural Sciences*, 30, 1, 166-178.
- Sam-on, M. F. S., Mustafa, S., Hashim, A. M., Yusof, M. T., Zulkifly, S. ve Roslan, M. A. H., 2023. Determination of prebiotic utilisation capability of potential probiotic *Bacillus velezensis* FS26 through *in silico* and *in vitro* approaches, *Food Bioscience*, 53, 102566.

- Sánchez, O., Guio, F., Garcia, D., Silva, E. ve Caicedo, L., 2008. Fructooligosaccharides production by *Aspergillus* sp. N74 in a mechanically agitated airlift reactor, *Food and Bioproducts Processing*, 86, 2, 109-115.
- Sandhu, H. K., Sinha, P., Emanuel, N., Kumar, N., Sami, R., Khojah, E. ve Al-Mushhin, A. A. M., 2021. Effect of ultrasound-assisted pretreatment on extraction efficiency of essential oil and bioactive compounds from citrus waste by-products, *Separations*, 8, 12, 1-14.
- Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N. ve Prapulla, S. G., 2005. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides, *Trends in Food Science and Technology*, 16, 10, 442-457.
- Scheppach, W. ve Weiler, F., 2004. The butyrate story: Old wine in new bottles?, *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 7, 5, 563-567.
- Schmitz, E., Karlsson, E. N. ve Adlercreutz, P., 2021. Altering the water holding capacity of potato pulp via structural modifications of the pectic polysaccharides, *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 1, 1-8.
- Scholz-Ahrens, K. E., Ade, P., Marten, B., Weber, P., Timm, W., Asil, Y. ve Schrezenmeir, J., 2007. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure¹, *The Journal of Nutrition*, 137, 3, 8385-8465.
- Sebastián, O.-C., Ariel, C. A. C. ve Eduardo, O. A. C., 2019. Prebiotics in beverages: from health impact to preservation, *Preservatives and Preservation Approaches in Beverages*, 15, 1, 339-373.
- Shan, S., Xiong, Y., Guo, J., Liu, M., Gao, X., Fu, X. ve Lu, W., 2022. Effect of an inulin-type fructan from *Platycodon grandiflorum* on the intestinal microbiota in rats exposed to PM2. 5, *Carbohydrate Polymers*, 283, 1, 1-9.
- Sirivibulkovit, K., Nouanthavong, S. ve Sameenoi, Y., 2018. based DPPH assay for antioxidant activity analysis, *Analytical Sciences*, 34, 7, 795-800.
- Song, J.-M. ve Wei, D.-Z. 2010. roduction and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9, *Biomass and bioenergy*, 34, 12, 1930-1934.
- Sorour, N. M., Tayel, A. A., Abbas, R. N. ve Abonama, O. M., 2017. Microbial biosynthesis of health-promoting food ingredients, *Içinde Food Biosynthesis*, 1, 1, 55-93.
- Streimikyte, P., Viskelis, P. ve Viskelis, J., 2022. Enzymes-assisted extraction of plants for sustainable and functional applications, *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 4, 1-15.

- Su, Y., Tang, J., Yang, X. ve Wang, R., 2021. Effect of geometrical parameters on extraction efficiency of the annular centrifugal contactor, *Separations*, 8, 7, 1-11.
- Tan, C., Wei, H., Zhao, X., Xu, C., Zhou, Y. ve Peng, J., 2016. Soluble fiber with high water-binding capacity, swelling capacity, and fermentability reduces food intake by promoting satiety rather than satiation in rats, *Nutrients*, 8, 10, 1-15.
- Tang, S.-L., Hii, S.-L. ve Koh, C.-C., 2023. Process Optimisation of Ultrasound-Assisted Extraction of Oligosaccharides from Coconut Husk, *The Scientific World Journal*, 1, 1, 1-10.
- Tang, Z., Shao, T., Gao, L., Yuan, P., Ren, Z., Tian, L. ve Zhou, X., 2023. Structural elucidation and hypoglycemic effect of an inulin-type fructan extracted from *Stevia rebaudiana* roots, *Food & Function*, 14, 5, 2518-2529.
- Tarone, A. G., Silva, E. K., Cazarin, C. B. B. ve Junior, M. R. M., 2021a. Inulin/fructooligosaccharides/pectin-based structured systems: Promising encapsulating matrices of polyphenols recovered from Jabuticaba peel, *Food Hydrocolloids*, 111, 1, 1-10.
- Tegin, İ., Hallaç, B., Sabancı, N., Sadik, B., Fidan, M. ve Yabalak, E., 2024. A broad assessment of *Eremurus spectabilis* M. Bieb: chemical and elemental composition, total phenolic and antimicrobial activity analysis, and quantum chemical calculations of radical scavenging potential, *International Journal of Environmental Health Research*, 34, 4, 2124-2139.
- Thammarutwasik, P., Hongpattarakere, T., Chantachum, S., Kijroongrojana, K., Itharat, A., Reanmongkol, W. ve Ooraikul, B., 2009. Prebiotics review, *Songklanakarin, Journal of Science and Technology*, 31, 4, 401-408.
- Tilwani, Y. M., Lakra, A. K., Domdi, L., Yadav, S., Jha, N. ve Arul, V., 2021. Optimization and physicochemical characterization of low molecular levan from *Enterococcus faecium* MC-5 having potential biological activities, *Process Biochemistry*, 110, 1, 282-291.
- Tulp, O. L., Krasner, S. P., Einstein, G. P. ve Awan, A. R., 2022. Effect of a chromium-fructooligosaccharide complex on glycemic parameters in obese and obese-NIDDM rats, *The FASEB Journal*, 13, 1, 5-10.
- Tuzcu, Z., Koclar, G., Agca, C. A., Aykutoglu, G., Dervisoglu, G., Tartik, M. ve Sahin, K., 2017. Antioxidant, antimicrobial and anticancer effects of different extracts from wild edible plant *Eremurus spectabilis* leaves and roots, *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 10, 3, 4787-4797.
- Utami, J. P., Wasiaturrahmah, Y. ve Putri, D. K. T., 2021. Hydroxyl Radical Scavenging Activity of *Stachytarpheta jamaecensis* Root Extract using *In Vitro* Deoxyribose Degradation Assay, *Majalah Obat Tradisional*, 26, 2, 103-110.

- Van de Wiele, T., Boon, N., Possemiers, S., Jacobs, H. ve Verstraete, W., 2007. Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced *in vitro* prebiotic effects, *Journal of Applied Microbiology*, 102, 2, 452-460.
- Velázquez-Martínez, J. R., González-Cervantes, R. M., Hernández-Gallegos, M. A., Campos Mendiola, R., Jiménez Aparicio, A. R. ve Arenas Ocampo, M. L., 2014. Prebiotic potential of *Agave angustifolia* Haw fructans with different degrees of polymerization, *Molecules*, 19, 8, 12660-12675.
- Verruck, S., Santana, F., de Olivera Müller, C. ve Prudencio, E. S., 2018. Thermal and water sorption properties of *Bifidobacterium* BB-12 microcapsules obtained from goat's milk and prebiotics, *LWT*, 98, 1, 314-321.
- Wang, B., Song, Q., Zhao, F., Han, Y. Ve Zhou, Z. 2019. Production optimization, partial characterization and properties of an exopolysaccharide from *Lactobacillus sakei* L3, *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 1, 21-28.
- Wang, R., Shan, H., Zhang, G., Li, Q., Wang, J., Yan, Q. ve Wei, L. 2022. An inulin-type fructan (AMP1-1) from *Atractylodes macrocephala* with anti-weightlessness bone loss activity, *Carbohydrate Polymers*, 294, 1, 1-13.
- Wang, J., Yuan, X., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y. ve Wang, C., 2009. On-line separation and structural characterisation of feruloylated oligosaccharides from wheat bran using HPLC-ESI-MSn, *Food Chemistry*, 115, 4, 1529-1541.
- Weijers, C. A. G. M., Franssen, M. C. R. ve Visser, G. M., 2008. Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides, *Biotechnology Advances*, 26, 5, 436-456.
- Wichienchot, S., Jatupornpipat, M. ve Rastall, R. A., 2010. Oligosaccharides of pitaya (*dragon fruit*) flesh and their prebiotic properties, *Food Chemistry*, 120, 3, 850-857.
- Windey, K., François, I., Broekaert, W., De Preter, V., Delcour, J. A., Louat, T. ve Verbeke, K., 2014. High dose of prebiotics reduces fecal water cytotoxicity in healthy subjects, *Molecular Nutrition & Food Research*, 58, 11, 2206-2218.
- Wu, X. Y. ve Lee, P. I., 2000. Preparation and characterization of inulin ester microspheres as drug carriers, *Journal of Applied Polymer Science*, 77, 4, 833-840.
- Xiao, M., Ren, X., Cui, J., Li, R., Liu, Z., Zhu, L. ve Mou, H., 2022. A novel glucofucobiose with potential prebiotic activity prepared from the exopolysaccharides of *Clavibacter michiganensis* M1, *Food Chemistry*, 337, 1, 1-10.
- Yu, L., Ye, G., Qi, X., Yang, Y., Zhou, B., Zhang, Y. ve Ping, W., 2023. Purification, characterization and probiotic proliferation effect of exopolysaccharides produced by *Lactiplantibacillus plantarum* HDC-01 isolated from sauerkraut, *Frontiers in Microbiology*, 14, 1, 1-13.

- Zaninette, F., Lopes de Melo Rocha, G. A., Bom Pessoni, R. A., Braga, M. R., Simões, K., de Cassia Leone Figueiredo-Ribeiro, R. ve Batista Fialho, M., 2019. Production of inulin-and neolevan-type fructooligosaccharides by *Penicillium janczewskii* Zaleski CCIBt 3352, Biotechnology and Applied Biochemistry, 66, 3, 419-425.
- Zhang, Zhiwei, Zhao, L., Qu, H., Zhou, H., Yang, H. ve Chen, H., 2022. Physicochemical characterization, adsorption function and prebiotic effect of chitin-glucan complex from mushroom *Coprinus comatus*, International Journal of Biological Macromolecules, 206, 1, 255-263.
- Zhang, Zipei, Song, H., Peng, Z., Luo, Q., Ming, J. ve Zhao, G., 2012. Characterization of stipe and cap powders of mushroom (*Lentinus edodes*) prepared by different grinding methods, Journal of Food Engineering, 109, 3, 406-413.
- Zhao, C., Wu, Y., Liu, X., Liu, B., Cao, H., Yu, H. ve Xiao, J., 2017. Functional properties, structural studies and chemo-enzymatic synthesis of oligosaccharides, Trends in Food Science and Technology, 66, 1, 135-145.
- Zheng, S., Zhang, G., Wang, H., Long, Z., Wei, T. ve Li, Q., 2021. Progress in ultrasound-assisted extraction of the value-added products from microorganisms, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 37, 1, 1-14.
- Zheng, X. J. ve Li, Y., 2009. Effect of soil moisture sorption on soil moisture availability, Arid Zone Research, 26, 1, 744-749.
- Zhou, L., Luo, J., Xie, Q., Huang, L., Shen, D. ve Li, G., 2023. Dietary fiber from navel orange peel prepared by enzymatic and ultrasound-assisted deep eutectic solvents: Physicochemical and prebiotic properties, Foods, 12, 10, 1-17.
- Zondervan-Zwijnenburg, M., Van de Schoot, R. ve Hoijsink, H., 2022. Testing ANOVA replications by means of the prior predictive p-value, Meta-Psychology, 6, 1, 1-15.

EKLER

EK A. Bitki toplama izini

Kayseri Çevre, Şehircilik ve İklim Değişikliği İl Müdürlüğünden alınan izinle (E-27684489-250-6506471 sayılı yazı) Türkiye'nin Kayseri-Yeşilhisar bölgesinden (N 38°14'45.4208'' E 35°04'35.0364'') 30 Mayıs-15 Haziran 2023'te bitki vejetasyon döneminde toplanmıştır. 1428m'den toplanan *Eremurus spectabilis* (Çiriş) bitkisi toprak altı (kök) ile toprak üstü kısmı olmak üzere iki parçaya ayrılarak toprak ve kirlilikten arındırmak için distile su ile yıkanmıştır. Temizlenen bitki bölümleri kurutma kağıtlarına alınarak oda sıcaklığında kurutulmuş ve kurutulan bitki bölümleri ayrı ayrı blender (Waring, commercial blender) ile toz haline getirilerek 4°C'de muhafaza edilmektedir.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Hakan YÜCEDAĞ

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Aksaray Üniversitesi/Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji,
2017-2021

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi/Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji,
2022-2024

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

- Aksaray Üniversitesi/ Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Topluluk Başkanı, 2018-2019
- Enka Süt Fabrikası A.Ş. Mikrobiyoloji ve Kimya Laboratuvar Personeli.

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Bildiriler

- Yücedağ, H., Önal Darılmaz, D., İnanan, T. 2023. *Eremurus spectabilis* (Çiriş) Bitkisinden İnulin Tipi Frukthan Prebiyotiğinin Ekstraksiyonu ve Optimizasyonu. 6. UBBK ulusal uygulamalı 6. Biyolojik bilimler kongresi. 3-5 Kasım 2023. Syf 91 (Sözlü Bildiri)

Projeler

- Ultrason Destekli Ekstraksiyon Yöntemi ile Türkiyede Yetişen *Eremurus spectabilis* (Çiriş) Bitkisinden Prebiyotik Ekstraksiyonunun Optimizasyonu, Prebiyotik ve Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması (223Z079) /Bursiyer/ Araştırmacı Öğrenci, 2024-devam