

Enzimatik, asidik ve sulu ekstraksiyon metotları ile çiriş (*Asphodelus aestivus* Brot.) yumrularının HPLC ile şeker kompozisyonları

Eyyüp KARAOĞUL (Orcid: 0000-0001-8162-6838)^{*1}, Mehmet Hakkı ALMA (Orcid: 0000-0001-7011-3965)²

¹ Harran Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, ŞANLIURFA

² Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Orman Fakültesi, KAHRAMANMARAŞ

*Sorumlu yazar/Corresponding author: eyyupkaraogul@gmail.com, Geliş tarihi/Received: 04.03.2018, Kabul tarihi/Accepted: 23.03.2018

Öz

Çalışmanın amacı çiriş otu (*Asphodelus aestivus* Brot.) yumrularının ekstraksiyon verimlerini ve çözünebilir şeker kompozisyonlarını incelemektir. Çiriş yumrularının ekstraksiyon işlemleri; 150 µL, 300 µL ve 450 µL hacimlerinde Gluko-Amilaz, α-Amilaz ve eşit oranlarda α-Amilaz&Gluko-Amilaz enzim takviyeleri 60 dk, 90 dk, 120 dk ve 180 dk sürelerinde saf su ve 0,8 M ve 1,6 M konsantrasyonunda asetik ve sülfürik asit takviyeleri ile yapılmıştır. Bu yumrularında şeker kompozisyonlarının tespiti için yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve refraktif-indeks dedektörü (HPLC-RID) cihazı kullanılmıştır. Çiriş otu yumrularının ekstraksiyon verimleri gravimetrik yöntemle tespit edilmiştir. Çiriş otu yumrularında şeker kompozisyonlarının belirlenmesi için glukoz, galaktoz, ksiloz, fruktoz ve sukroz referans olarak kullanılmış ve bunların kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre uygulanan farklı ekstraksiyon türleri, hem verimlerin hem de şeker birimlerinin farklı oranlarda çıkmasına sebep olmuş; genellikle ekstraksiyon verimleri % 81-96 arasında seyretmiştir. Ancak en yüksek ekstraksiyon verimi(% 96), enzim veya asit takviyeleri ile yapılan metotların aksine, bir katkının olmadığı saf su ekstraksiyonunda tespit edilmiştir. Çiriş otu yumruları içerisinde glukoz, galaktoz, ksiloz, fruktoz ve sukroz şeker kompozisyonları belirlenmiştir. Çiriş yumrularından elde edilen şekerlerin ana bileşimleri, sukroz için enzimatik metotta 2.510 µg/ml, asidik metotlarda ksiloz için 1.043 µg/ml ve galaktoz için 2.180 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Bazı şeker birimleri ise ekstraksiyon metoduna bağlı olarak hidroliz edilememiştir. Elde edilen sonuçlardan ekstraksiyon metotları oligomer veya polimer formunda olan karbonhidratları hidroliz ederek sukroz oranının daha yüksek çıkmasına sebep olduğu anlaşılmıştır. Ekstraksiyona uygulanan takviyeler, sukrozu hidroliz ederek hem glukoz, hem de fruktoz miktarının daha fazla çıkmasını sağlamıştır. Ekstraksiyon koşullarının daha ekstrem olduğu şartlarda ise şekerlerin hidroksimetilfurfurala dönüşmesi şekerlerin tükendiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Çiriş otu (*Asphodelus aestivus* Brot.) Yumruları, Ekstraksiyon metotları, Ekstraksiyon Verimleri, HPLC-RID, Şeker kompozisyonları

Sugar compositions by HPLC of asphodel (*Asphodelus aestivus* Brot.) tuber with enzymatic, acidic and water extraction methods

Abstract

The aim of this study was to investigate extraction yield and soluble sugar composition of asphodel (*Asphodelus aestivus* Brot.) tubers. The tubers of asphodel were extracted with enzymatic extraction methods (150 µL, 300 µL and 450 µL added Gluko-Amilaz, α-Amilaz and simultaneously α-Amilaz & Gluko-Amilaz enzyme), deionized water extraction methods (60 min, 90 min, 120 min and 180 min extraction time) and acidic extraction methods (0,8 M and 1,6 M concentration with acetic and sulfuric acid). The sugar compositions of tubers were determined by high performance liquid chromatography and refractive index detector (HPLC-RID). The extraction yields were also detected by gravimetric method. The glucose, galactose, xylose, fructose and sucrose were used as reference compounds. The calibration curves were plotted based on linear regression analysis of the integrated peak areas (x) and versus concentrations (y, µg/ml) in the reference solutions. All results were evaluated as concentration (µg/ml) for every extraction method. Various types of extraction caused differences in both yields and sugar units. Generally, extraction yields were determined about 81-96% for all extraction methods. However, the highest extraction yield was found 96% for deionized water unlike the ones added enzyme or acid. At the same time, results showed that glucose, fructose, mannose and sucrose were found in tubers in all methods. The main concentrations of sugar in the tuber were identified as 2.510 µg/ml for sucrose in enzymatic method, 50.144 µg/ml for glucose, 21.066 µg/ml for fructose, 1.043 µg/ml for xylose and 2.180 µg/ml for galactose in acidic methods. Nevertheless, the lowest amount of glucose and fructose were found in deionized water extraction method at 180 min. The results indicated that sucrose amount had higher concentration in some extraction methods due to hydrolysis of carbohydrates in oligomer or polymer form. Moreover, glucose and fructose were also determined higher amounts in some extraction methods due to hydrolysis of sucrose. It can be understood that when the extraction conditions are more extreme, all sugar unit may convert to hydroxymethylfurfural.

Keywords: Asphodel tubers (*Asphodelus aestivus* Brot.), extraction methods, extraction yield, HPLC-RID, sugar compositions

To cite this article (Atf): KARAOĞUL, E., ALMA, M. (2018). Enzimatik, asidik ve sulu ekstraksiyon metotları ile çiriş (*Asphodelus aestivus* Brot.) yumrularının HPLC ile şeker kompozisyonları. Ormanlık Araştırma Dergisi, 5 (1), 64-73.
DOI: 10.17568/ogmoad.401318

1. Giriş

Geçmiş yıllardan bugüne kadar insanlar kendi yöresinde bulunan bitki ve ağaçların ikincil metabolitlerinden farklı amaçlarla faydalanmışlardır. İnsanlar doğadan topladıkları yabancı bitkileri önce kullanmış, sonra ise en çok kullandıklarının tarımını yapmışlardır (Karaogul ve ark., 2016; Alma ve ark., 2011). Çiriş otu bitkisi (*Asphodelus aestivus* Brot.) 50-150 cm boyunda, yaprakları uzun ve sivri, 35-45 cm boy ve 3 cm enindedir. Bitki nisan ya da mayıs aylarında çiçeklenen, 7 mm büyüklüğünde küçük yeşil meyvelere sahip, bütün sene boyunca yeşil ve özellikle kuru, besince fakir, kumlu, kültüre edilmeyen topraklarda büyüyen ve ayrıca Afrika, Arap ülkeleri, Mısır, Türkiye ve Avrupa'nın bazı kesimlerinde yayılış gösteren çok yıllık bir bitkidir (Davis, 1965). Çiriş otu çevre kirliliği ve toprak ıslahında etkili olan ve topraktaki istenmeyen ağır metaller gibi kirleticileri ortamdaki uzaklaştıran önemli bir bitkidir (Yağan ve ark., 2008).

Beyaz çiriş, yabancı çiriş, yalancı çiriş ve çiriş otu gibi isimlerle anılan çiriş bitkisi hemoroit, saçkıran ve mafsalsız hastalıklarının tedavisinde ve maya endüstrisinde, ciltçilik ve ayakkabı yapıştırıcısı olarak, deriye ve kumaşa sertlik ve parlaklık vermek amacıyla tercih edilmektedir (Baytop, 1999; Ugulu ve ark., 2009; Gürhan ve Ezer, 2004). Bu bitkinin modern tıpta kullanımına ilişkin bilgiler oldukça azdır (Polunin ve Huxley, 1987). Çiriş otunun beyaz kan hücrelerini (WBC) fazlalaştırdığı ve dolayısıyla savunma sistemimiz için önemli bir özelliğe sahip olduğu rapor edilmektedir (Karataş ve ark. 2011; URL-1). Çiriş otunun antimikrobial özelliği ile ilgili çalışmalar yapılmış ve etkili antimikrobial özelliğe sahip olduğu gözlenmektedir (Oskay ve ark., 2007; Tosun ve ark., 2004). Çiriş otu antioksidan özelliği de göstermektedir (Peksel ve İmamoglu, 2009). Çiriş otu ve yumrusu glutasyon, C ve B3 vitamini açısından yüksek orana sahiptir (Karataş ve ark., 2011). İmamoglu (2010), çiriş otunun yüksek oranda flavanoidlere, karatenoidlere, antosiyanin ve pirolin miktarlarına sahip olduğunu tespit etmiştir. Aynı çalışmada farklı radikal süpürücüler ile antioksidant aktivite çalışmaları da yapılmış ve bitkinin yüksek oranda antioksidant özelliğe olduğunu belirtilmiştir.

Tablo 1'de çiriş otu yumrusunun tam kuru ağırlığa göre kimyasal kompozisyonu verilmektedir. Besin değerleri açısından yumru; nişasta, çözülebilir şekerler, proteinler, vitaminler, lif ve mineral açısından zengin gözüktüğü de, koyunlarda yapılan bir çalışmada çiriş otu yiyen koyunlarda şiddetli sinirsel sendromla birlikte yoğun nöronal pigmentasyon tanımlanmaktadır (Birincioğlu ve ark., 2005).

Çiriş otu bitkisinin yumruları ile ilgili önceki çalışmalarda bitkinin yumrusundaki kimyasal kompozisyonları bulunmaktadır. Hatta vitamin içeriği, protein ve prolin oranları, toplam flavanoid ve antosiyanin miktarları ile bitkinin biyolojik aktiviteleri de mevcuttur. Ancak çiriş otu yumrusunun içerisinde, yüksek oranda karbonhidrat var olmasına rağmen, şimdiye kadar şeker birimlerinin hangi kompozisyonlardan oluştuğu üzerine bir çalışma bulunmamaktadır. O yüzden bu çalışmanın ana amacı, şimdiye kadar yapılmamış olan çiriş otu yumrusunun farklı ekstraksiyon metodları ile verimlerini belirlemek ve ekstraksiyon sonrası içerisindeki şeker bileşimlerini incelemektir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Materyal

Kullanılan numuneler Kahramanmaraş ili 37°34'37.1" kuzey paraleli ve 36°51'00.4" doğu meridyeni koordinatından temin edilmiştir. Toplanan örnekler Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi'nde Botanik Uzmanı Öğr. Gör. Tolga OK tarafından teşhis edilmiştir. Ekstraksiyonda kullanılan α -Amilaz ve Gluko-Amilaz enzimleri Novozymes marka olup Danimarka'dan temin edilmiş ve Sigma Aldrich marka referans şekerleri kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Ekstraktların hazırlanması

Çiriş otu yumruları toplandıktan sonra üzerlerinde bulunan topraklarından arındırıldı ve sonra gölgede hava ortamında kurutulmuş kurutulmuş yumruların kabukları soyulmuş ve öğütülmüştür. Elekte 60 mesh ve altında kalan öğütülmüş yumru örneklerinden 2 g tartılarak 200 ml su ile 100°C sıcaklıkta ekstraksiyon yapılmıştır. Çiriş otu yumrularının ekstraksiyon işlemi; farklı hacimlerde

Tablo 1. Çiriş otu yumrusunun tam kuru ağırlığa göre kimyasal kompozisyonu (Polycarpus, 2009)
Table 1. Chemical composition of *Asphodel* tubers by dry weight (Polycarpus, 2009)

Maddeler	Nişasta	Çözülebilir şekerler	Protein	Lif	Kül
Miktar (%)	53,3	15,8	3,7	23,7	3,5

enzim varlığında (Gluko-Amilaz, α -Amilaz ve α -Amilaz & Gluko-Amilaz birlikte), farklı ekstraksiyon sürelerinde, hidrolizi destekleyici bir katkı olmaksızın su ile (60 dk, 90 dk, 120 dk ve 180 dk) ve değişen konsantrasyonlarda kuvvetli (Sülfirik Asit) ve zayıf asit (Asetik asit) varlığında (0,8 M ve 1,6 M) gerçekleştirilmiştir. Enzim ve asit varlığında yapılan ekstraksiyonlar 60 dk boyunca sabit tutularak yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemleri bittikten sonra süpernatantın elde edilmesi için her bir örnek 10 dk süreyle 5.000 rpm devirde santrifüjde bekletilmiş ve 0.45 μ m partikül çapında milipurdan süzülerek şeker analizine hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan örnekler analiz yapılana kadar buzdolabında (+4°C) bekletilmiştir. Çiriş otu yumrularının ekstraksiyonu 3 tekrar ile yapılmış ve bu yumruların verimleri aşağıdaki eşitlikten faydalanılarak hesaplanmıştır ki eşitlikte; *EV*: Ekstraksiyon verimi; *W₀*: Numune ağırlığı (g) ve *W₁*: Ekstraksiyon sonrası çözünmeyen yumru miktarı ağırlığıdır (g).

$$EV (\%) = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100$$

2.2.2. Referans kimyasalların hazırlanması

Referans kimyasallar olarak glukoz, galaktoz, ksiloz, fruktoz, arabinoz, mannoz ve sükröz şekerleri kullanılmış; bu şeker standartları yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve refraktif indeks dedektöründe (HPLC-RID) tanıtılmak amacıyla farklı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Tablo 2’de her bir şeker standardı konsantrasyonlarının lineer aralıkları (μ g/ml) bulunmaktadır.

2.2.3. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-RID) şartları

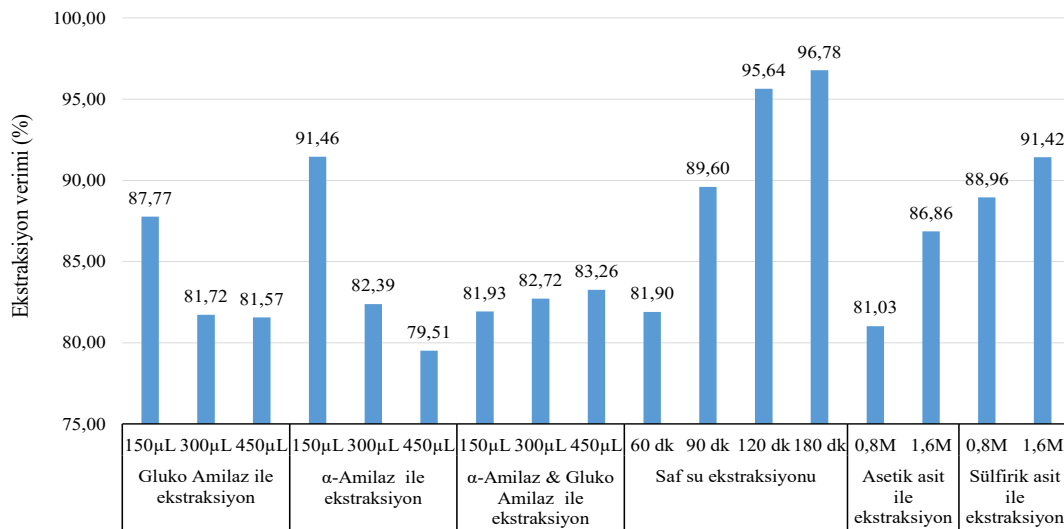
Çiriş otu yumrularının şeker içeriğinin belirlenmesi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi LC-20AD model (HPLC) ve refraktif indeks dedektörü RID 10A model (RID) Shimadzu marka cihaz kullanılmıştır. Kullanılan kolon HyperREZ Pb++ marka olup 250 x 4,6 mm uzunluğundadır ve partikül çapının boyut genişliği 8 μ m’dir. Taşıyıcı faz olarak 0,25 μ m partikül çapında milipurdan süzölmüş ultra saf su kullanılmıştır. Akış hızı bütün şeker birimlerinin daha iyi ayrılması için 0,2 ml/dk olarak belirlenmiş, kolon 80°C sıcaklığa getirilmiş ve şiringanın enjeksiyon hacmi 20 μ l olarak ayarlanmıştır.

3. Bulgular

3.1. Ekstraksiyon verimleri

Çiriş otu yumrularının ekstraksiyon sonrası verim miktarları hesaplanmış olup Tablo 2’de ağırlıkça hesaplanan yüzde verim miktarları gösterilmektedir. Farklı ekstraksiyon türlerine göre ekstraksiyon verimleri değişiklikler göstermekte ve genel olarak ekstraksiyon verimleri % 81 ile % 96 arasında seyretmektedir.

Enzim takviyesi eşliğinde yapılan ekstraksiyonlar birbirleri arasında değerlendirildiğinde, çözücü içine eklenen enzim miktarının artması ekstraksiyon verimini hem Gluko-Amilaz için, hemde α -Amilaz için olumsuz etkilemiştir. Her iki enzimde de kullanılan 150 μ L hacimdeki enzim varlığı en yüksek ekstrakt verimine sebep olmuş; en düşük ekstrakt



Şekil 1. Çiriş otu yumrularının ekstraksiyon sonrası ağırlıkça yüzde (%) verimleri
Figure 1. Yield of Asphodel tubers by weight after the extraction (%)

verimi ise en yüksek oranda kullanılan enzim hacmi varlığında ortaya çıkmıştır. Enzimler kendi arasında karşılaştırıldığında ise α -Amilaz en yüksek ekstrakt verimi sergilemiş; en düşük ekstrakt verimi de 450 μ L α -Amilaz ile ekstraksiyon işleminde ortaya çıkmıştır. Enzimlerin sinerjik etkisinin ekstraksiyona olan etkisi incelendiğinde eşit hacimlerde karışım olarak çözücü içine eklenen α -Amilaz ve Gluko-Amilaz konsantrasyonlarının artması ekstrakt verimlerini de artırmış; fakat enzimlerin ayrı ayrı uygulanmasına göre verimler çok daha düşük değerler vermiştir. Muhtemelen enzimler arası sinerji etkileşim ekstraksiyon verimine olumsuz yansyarak hidrolize takviye edici bir etki göstermemiştir.

Herhangi bir katkının olmadığı (saf su ile) ekstraksiyon işlemi kendi içinde değerlendirildiğinde, ekstraksiyon süresinin 60 dk'dan 180 dk'ya uzatılması ile verim % 81,90'dan % 96,79'a artmıştır. 60 dk saf su ekstraksiyonunda her iki enzimin de ortamda olması verimi pozitif etkilemiştir. Ancak enzim veya asit olmaksızın 120 dk ve 180 dk sürede saf su ile ekstraksiyon, bütün ekstraksiyon türlerinin en üstünde verim göstermiştir. Verim açısından değerlendirildiğinde saf su ile ekstraksiyon yapılması bir başka katkı yapılmasına gerek olmaksızın yeterli gözükmiştir (Şekil 1).

Çiriş otu yumrularında ekstraksiyon verimini hidroliz ederek artırmak için asit katalizli ortamda ekstraksiyon yapılmış ve bu maksatla yumrular farklı konsantrasyonlarda kuvvetli ve zayıf asitli ortamda hidroliz edilmiştir. Verim açısından değerlendirildiğinde, asitlerin konsantrasyonunun 0,8 M'dan 1,6 M'a artması ile asetik asit için verim % 81,00'den % 86,86'ya; sülfirik asit için ise verim % 88,96'dan % 91,43'e yükselmiştir. Sülfirik asitli ortamda asetik aside göre verimin daha yüksek olmasının nedeni, yumru liflerinin kuvvetli asit ile hidroliz derecesinin yüksek olmasıdır. Asit konsantrasyonunun artması oligomer veya polimer formunda bulunan kompozisyonu da hidroliz etmiş ve bu durum ekstraksiyon verimini yükseltmiştir.

Polycarpos (2009), çiriş otu yumrularının suda çözünebilir miktarlarını % 76,30 olarak tespit etmiş; lif içeriğini ise % 23,70 olarak yorumlamıştır. Çalışmamızda ise ekstraksiyon verimi % 81 ile % 96 arasında belirlenmiş ve çalışmada kullanılan çiriş otu yumrularının öğütme ve ekstraksiyondan önce kabuklarının soyulmuş olması gerçek yumru kompozisyonunu göstermiştir. Literatürde çözünebilir değerler düşük çıkmasının nedeni ise muhtemelen kabuklarından arındırılmadan ekstraksiyon işlemlerinin yapılmasıdır. Literatürden çıkan sonuçlar gerçek yumru kompozisyonunu yansıtmaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre çiriş otu

yumrusunun suda çözünebilir yapısı en yüksek oran için % 96 olarak tespit edilmiş olup bu sonuç lif oranlarının da çok düşük değerde olduğunu göstermektedir.

Tablo 2. Çiriş otu yumrularının ağırlık olarak yüzde (%) verimleri
Table 2. Yield of Asphodel tubers by weight (%)

Ekstraksiyon tipi	Ekstraksiyon verimi (%)		
Gluko-Amilaz ile ekstraksiyon	150 μ L ¹	87,77	\pm 2,27
	300 μ L	81,72	\pm 1,58
	450 μ L	81,57	\pm 2,24
α -Amilaz ile ekstraksiyon	150 μ L	91,46	\pm 3,49
	300 μ L	82,39	\pm 2,34
	450 μ L	79,51	\pm 1,37
α -Amilaz & Gluko-Amilaz ile ekstraksiyon	150 μ L	81,93	\pm 2,26
	300 μ L	82,72	\pm 2,26
	450 μ L	83,26	\pm 1,39
Saf su ekstraksiyonu	60 dk ²	81,90	\pm 1,58
	90 dk	89,60	\pm 1,43
	120 dk	95,64	\pm 1,46
Asetik asit ile ekstraksiyon	180 dk	96,78	\pm 1,47
	0,8 M ³	81,03	\pm 3,19
	1,6 M	86,86	\pm 1,42
Sülfirik asit ile ekstraksiyon	0,8 M	88,96	\pm 2,30
	1,6 M	91,42	\pm 1,43

¹Ekstraksiyon çözücüsüne eklenen enzimin hacmi, ²Ekstraksiyon süresi (dakika), ³Ekstraksiyon çözücüsüne eklenen asidin konsantrasyonu (Molarite),

3.2 HPLC-RID analiz sonuçları

Ekstrakte edilen çiriş otu yumrularının içerisinde hangi şeker birimlerinin var olduğunu tespit edilebilmesi için ilk olarak referans kimyasallar farklı konsantrasyonlarda analiz edilmiş ve her bir şeker standartlarının HPLC cihazına enjeksiyonu yapılarak alıkonma zamanları belirlenmiştir. Tablo 3'te her bir şeker standardının alıkonma zamanları (dk) ve kalibrasyon eğrileri için hazırlanan şeker konsantrasyonlarının lineer aralıkları (μ g/ml) bulunmaktadır. Tabloda kalibrasyon eğrilerinden oluşturulan denklemler ve bunların regresyon eşitlikleri de mevcut olup her bir şeker standartlarının ölçülebilir en alt sınır (LOD), Kabul edilebilir hassasiyet sınırında en düşük konsantrasyon (LOQ), belirsizlik oranı ve aynı konsantrasyonun tekrar enjeksiyonu ile geri kazanım yüzde oranı (Kesinlik) değerleri de verilmiştir. Referans kimyasalların

alıkonma zamanlarını tespit etmek için şekerler karışım halinde çözelti olarak hazırlanmış olup Şekil 2'de referans kimyasalların alıkonma zamanlarını gösteren bir HPLC diyagramı bulunmaktadır.

Çiriş otu yumru ekstrelerinin bileşiminde bulunan şeker birimi konsantrasyonlarının tespiti için HPLC-RID ile analizler yapılmış; kromatogramlardan oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin denklemlerinden faydalanılarak çiriş otu yumrularının şeker birimleri ve konsantrasyonları tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçların güvenilirlik seviyesinin

yüksek oranda olduğunu gösteren veriler Tablo 2'de belirtilmiştir. Yüksek regrasyon, düşük LOD ve LOQ değerleri, yüksek geri kazanım oranı ve tekrarlanabilirliğinde düşük belirsizlik ile oluşturulan denklemlerden çiriş otu yumrularının şeker birimleri $\mu\text{g/ml}$ cinsinden hesaplanmıştır.

Amilaz enzimleri (Gluko-Amilaz ve α -Amilaz) nişastanın hidrolizine takviye açısından önemli bir yere sahiptir; bu enzimler nişastanın α -1,4 ve karbohidratların β -1,4 glukozidik bağlarını hidroliz ederek parçalayabilmektedir (Özdemir ve Sidal,

Tablo 3. Şeker standartlarının kalibrasyon eğrilerinin değerleri ve güven aralıkları
Table 3. Values and confidence intervals of calibration curves of sugar standards

Z	Şeker türleri	Alıkonma zamanı (dk)	Lineer aralık ($\mu\text{g/ml}$)	Kalibrasyon denklemi	Regrasyon (R^2)	LOD ¹	LOQ ²	Geri kazanım (Kesinlik) (%)	U_{95} (%) ³
1	Glukoz	39,1	100-400	$y=0,0013x-9,2182$	0,9983	37,8	133,4	100,21	2,23
2	Galaktoz	46,9	130-1000	$y=0,001x-6,6472$	0,9999	29,2	102	96,28	2,60
3	Ksiloz	42,1	120-1100	$y=0,0011x-21,089$	0,9992	34,1	147,2	100,24	6,03
4	Fruktoz	58,7	150-950	$y=0,001x+46,308$	0,9998	90,9	181,6	97,13	3,00
5	Sükroz	32,8	250-2000	$y=0,0024x+0,333$	0,9999	50,8	153,5	101,51	2,07

¹Ölçülebilen en alt sınır ($\mu\text{g/ml}$), ²Kabul edilebilir hassasiyet ve sınırdaki en düşük konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$), ³Belirsizlik oranı

2013). Çiriş otu yumrusu içerisinde yüksek oranda nişasta olması, çözücü içerisinde bu enzimlerin eklenerek ekstraksiyon işleminin yapılmasını gerektirmiş ve etkileri incelenmiştir. Hatta enzimlerin sinerjik etkisinin ekstraksiyon sonrası şeker oranlarına tesirinin anlaşılması için eşit oranlarda karışım halinde α -Amilaz ve Gluko-Amilaz birlikte de kullanılmış olup Şekil 3'te enzim ekstraksiyonu ile çiriş yumrularının şeker miktarları gösterilmektedir.

Ekstraksiyon işlemlerinde enzim takviyesi yapılan çiriş otu yumrularının şeker bileşimleri kendi içinde değerlendirildiğinde, çözücü içerisinde Gluko-Amilaz ve α -Amilaz enzim miktarlarının artması sükroz konsantrasyonunu her iki enzim türü için de pozitif etkilemiştir. En düşük (411 $\mu\text{g/ml}$) sükroz konsantrasyonu 150 μL hacim ile Gluko-Amilaz enzimi varlığında iken; en yüksek (2120 $\mu\text{g/ml}$) sükroz konsantrasyonu 450 μL hacim ile α -Amilaz enzimi varlığında tespit edilmiştir. Nişastanın hidrolizinde takviye olarak kullanılan enzimler çiriş yumrusu içerisindeki nişastanın hidrolize uğraması ile sükroz konsantrasyonunun artmasına sebep olmuştur. Enzimlerin sinerjik etkisinin incelendiği ekstraksiyonda konsantrasyonun artması, sükroz oranını 1.028 $\mu\text{g/ml}$ 'den 2.510 $\mu\text{g/ml}$ 'ye arttırmıştır ki bu oran enzim muamelesinde sükroz konsantrasyonunun en yüksek değeridir. Sonuçlara göre sükroz konsantrasyonunda enzimlerin sinerjik etkisi,

ayrı ayrı uygulanan enzim ekstraksiyonu işleminde daha etkili çıkmıştır. Nişastanın hidrolizinde enzimlerin aynı ortamda beraber olması sükroz konsantrasyonunu olumlu etkilemiştir (Tablo 2).

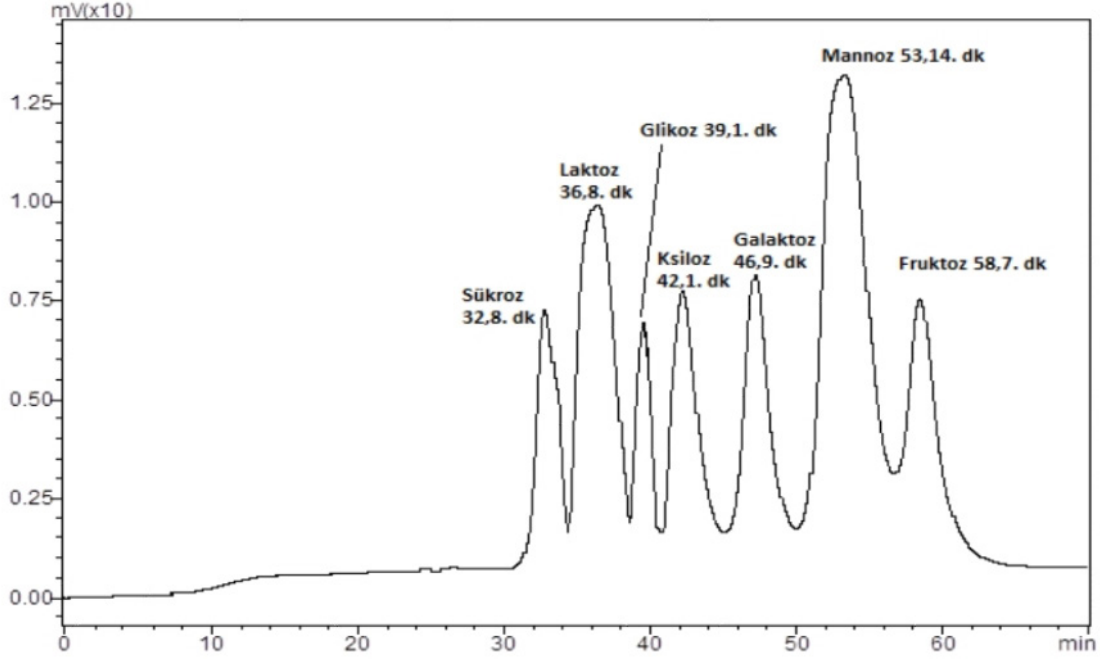
Yumruların glukoz konsantrasyonları ise Gluko-Amilaz miktarlarının artması ile 353 $\mu\text{g/ml}$ 'den 377 $\mu\text{g/ml}$ 'ye kısmi oranda artmış; ancak α -Amilaz enziminin artmasıyla glukoz miktarı 441 $\mu\text{g/ml}$ 'den 376 $\mu\text{g/ml}$ 'ye düşmüştür. Lee ve Nagy (1990)'e göre, şeker birimleri ısıtma maruz kaldığında hidroksimetilfurfurala (HMF) dönüşmektedir. Wahlborn ve Hagerdal (2002)'in çalışmalarında, şeker birimlerinin HMF dönüşümü, bazı enzimler ile inhibe edilebilmiştir. Gluko-Amilaz miktarının artışına bağlı olarak glukoz konsantrasyonunun da yükselmesi, HMF dönüşümünü engellediğini göstermekte ve hidrolizi destekleyici bir enzim olarak gözükmektedir. Fakat α -Amilaz miktarının artması ile glukozun azalması, HMF inhibisyonunu engellemediğini ve glukoz birimlerinin bu HMF'ye dönüşmesinden dolayı azaldığını göstermiştir.

Her iki enzimin beraber kullanıldığı ekstraksiyonda ise glukoz miktarı 223 $\mu\text{g/ml}$ 'den 863 $\mu\text{g/ml}$ 'ye önemli bir seviyede yükselmiştir. Enzimlerin sinerjik etkisi hem glukoz konsantrasyonunun artmasında nişastanın hidrolizini takviye etmiş, hem de HMF oluşumunda önemli bir inhibisyon

sergilemiştir. Çiriş yumrularının galaktoz konsantrasyonunda enzimlere bağlı olarak lineer bir değişim göstermediği anlaşılmıştır. En yüksek galaktoz miktarı 300µL hacim ile Gluko-Amilaz enzimi varlığında 1054 µg/ml olarak tespit edilmiş; ayrıca enzim ile muamelede ksiloz konsantrasyonu göz-

lenebilmiştir.

Çiriş otu yumrularındaki fruktoz konsantrasyonları Gluko-Amilaz miktarlarının artması ile 4643 µg/ml'den 1103 µg/ml'ye azalmış ve α-Amilazın artmasıyla 505 µg/ml'den 391 µg/ml'ye düşmüştür.



Şekil 2. Referans şekerlerin alıkonma zamanları ve HPLC diyagramı
Figure 2. The retention time for reference sugar and HPLC diagram

Enzimlerin beraber olduğu ortamda ise fruktoz miktarında azalmanın aksine, 570 µg/ml'den 1261 µg/ml'ye artmıştır. Batu ve ark. (2014), fruktozun HMF'ye dönüşümünün diğer şekerlere göre daha dayanıksız ve daha fazla meyilli olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada ise enzimlerin ayrı ayrı kullanıldığı durumlarda fruktoz miktarının dayanıksız olduğu ve HMF'ye dönüşümden dolayı fruktoz konsantrasyonunun azaldığı yorumlanmıştır. Ancak enzimlerin sinerjik etkisi fruktozun hem sükrozdan hidrolizinde daha etkili olmasını sağlamış, hem de HMF'ye dönüşüm direncini pozitif etkilemiştir. Ayrıca fruktoz miktarı en yüksek oranda 150µL hacim ile Gluko-Amilaz enzimi varlığında tespit edilmiştir.

Çiriş yumrularının saf su ile ekstraksiyon işleminde, şeker birimlerinin ekstraksiyon sürelerine bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, farklı ekstraksiyon süreleri şeker birimi oranlarının önemli oranda farklılaşmasına sebep olmuş ve yumrular içinde en yüksek sükroz oranı 90dk ekstraksiyon süresinde 1371 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Ekstraksiyon

süresinin uzaması, yumruların daha fazla ısı ile temas etmesine ve 90dk'dan sonra sükrozun monomerlere parçalanmasına sebep olmuştur. Bu yüzden glukoz ve fruktoz konsantrasyonu ekstraksiyon süresi 120dk'ya kadar glukoz için 244 µg/ml'den 3197 µg/ml'ye ve fruktoz için 1082 µg/ml'den 1835 µg/ml'ye sürekli yükselmiştir (Şekil 4).

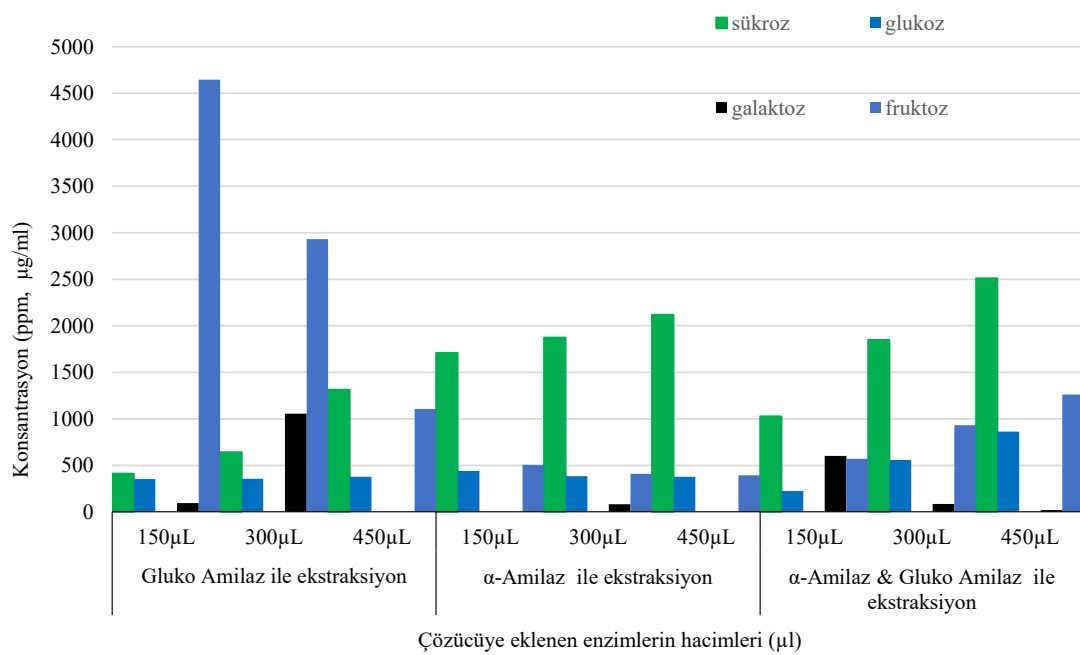
Glukoz ve fruktoz açısından optimum süre ise 120dk olarak tespit edilmiştir. Sükrozun hidrolizine bağlı olarak glukoz ve fruktoz konsantrasyonunun artımı değerlendirildiğinde, glukoz miktarı fruktoza göre daha çok artmıştır. Bunun sebebi ise fruktozun HMF'ye dönüşümünün glukozu göre daha dayanıksız olmasıdır. Elde edilen sonuçlar Batu ve ark. (2014) ile örtüşmektedir. 180dk ekstraksiyon sürecinde ise bütün şeker birimleri önemli bir seviyede azalmıştır. Bütün şeker konsantrasyonlarının önemli seviyede düşmesi ise 180 dk sürenin HMF dönüşümü için en yüksek seviye olduğunu göstermiştir. Sonuçlara göre 180 dk bu ekstraksiyona uygun değildir. Odun şekeri olarak bilinen ksiloz, diğer ekstraksiyon metotlarında görünmemesine rağmen, 180 dk ekstraksiyon meto-

Tablo 4. Farklı ekstraksiyon metodlarına göre çiriş yumrularının $\mu\text{g/ml}$ cinsinden şeker oranları
Table 4. Sugar rates of Asphodel tubers in $\mu\text{g/ml}$ by different extraction methods

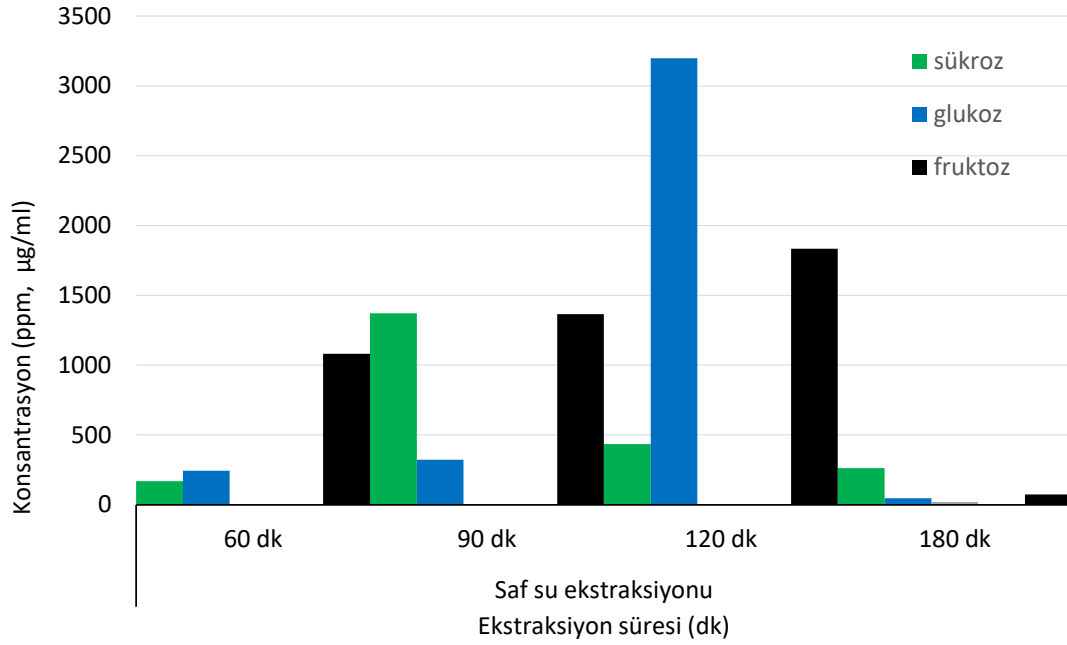
Ekstraksiyon tipi		Sükroz ($\mu\text{g/ml}$)	Glukoz ($\mu\text{g/ml}$)	Ksiloz ($\mu\text{g/ml}$)	Galaktoz ($\mu\text{g/ml}$)	Fruktoz ($\mu\text{g/ml}$)
Gluko-Amilaz ile ekstraksiyon	150 μL	411,91	353,19	-	94,57	4.643,90
	300 μL	642,94	356,36	-	1.054,34	2.929,95
	450 μL	1.313,25	377,50	-	-	1.103,99
α -Amilaz ile ekstraksiyon	150 μL	1.707,78	441,36	-	-	505,01
	300 μL	1.873,95	384,56	-	82,67	407,28
	450 μL	2.120,08	376,44	-	-	391,94
α -Amilaz & Gluko-Amilaz ile ekstraksiyon	150 μL	1.028,60	223,94	-	600,35	570,00
	300 μL	1.849,34	557,75	-	86,46	931,04
	450 μL	2.510,03	863,17	-	18,96	1.261,82
Saf su ekstraksiyonu	60 dk	168,99	244,77	-	-	1.082,33
	90 dk	1.371,76	323,44	-	-	1.365,97
	120 dk	435,10	3.197,86	-	-	1.835,01
	180 dk	262,58	45,95	14,09	-	74,84
Asetik asit ile ekstraksiyon	0,8 M	720,00	2.142,85	-	-	21.066,62
	1,6 M	-	1.407,48	-	-	4.256,50
Sülfirik asit ile ekstraksiyon	0,8 M	505,75	50.144,27	1043,96	2.031,00	5.786,78
	1,6 M	-	2.329,68	-	2.180,11	4.493,88

dunda 14 $\mu\text{g/ml}$ olarak ortaya çıkmıştır. Bu şekerin gözükmemesinin nedeni ise uzun süre ısıya maruz kalan yumru, içindeki az miktarda da olsa bulunan odunsu yapıları hidroliz etmesidir (Şekil 4).

Çiriş otu yumrularının hidrolizini takviye açısından ekstraksiyonda sürecinde kullanılan solvente, farklı konsantrasyonlardaki zayıf (Asetik asit 0,8 M ve 1,6 M) ve kuvvetli (Sülfirik asit 0,8 M



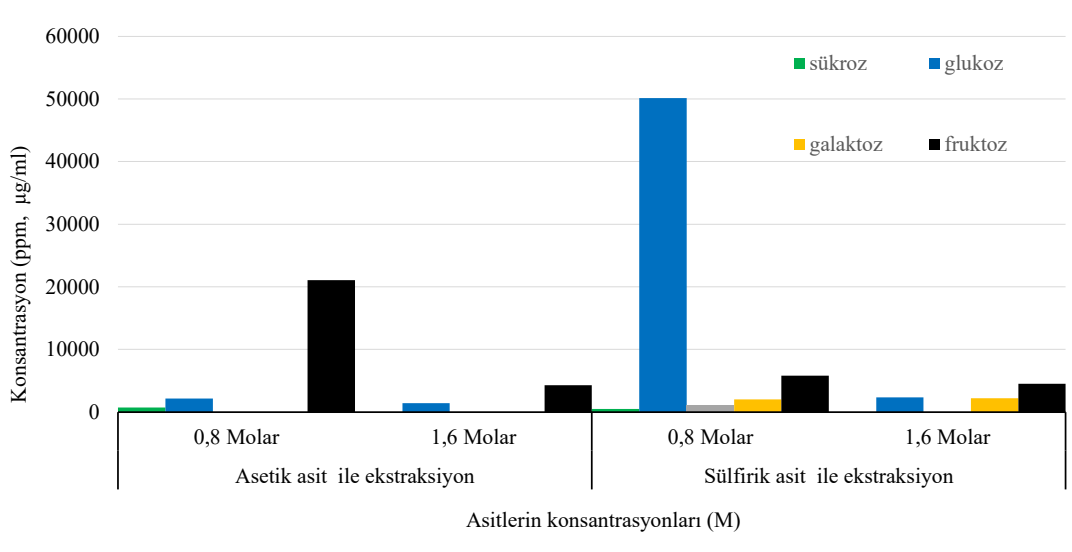
Şekil 3. Enzim ekstraksiyonu ile çiriş yumrularının şeker oranları
Figure 3. Sugar rates of Asphodel tubers in enzymatic extraction



Şekil 4. Çiriş otu yumrularının farklı sürelerde saf su ekstraksiyonu sonrası şeker oranları
Figure 4. Sugar rates of Asphodel tubers after deionized water extraction

ve 1,6 M) asit eklenmiştir. Asit muamelesinde dimer, oligomer veya polimer formunda bulunan beş veya altı karbonlu şekerlerin hidrolizi amaçlanmıştır; bu hidroliz neticesinde şeker birimlerinin önemli bir seviyede değiştiği gözlenmiştir. Yumrunun bileşiminde bulunan sükroz miktarı hem asetik asitle muamelede (720 µg/ml), hem de sülfirik asitle muamelede (505 µg/ml) diğer ekstraksiyon metodlarına göre en alt seviyede tespit edilmiştir. Sükroz oranı zayıf aside göre kuvvetli asitte, hidroliz dere-

cesinin daha yüksek olmasından dolayı azalmıştır. Her iki asitte de konsantrasyonun artışı sükrozun tamamen hidroliz olup bitmesine sebep olmuştur. Sükrozun hidrolizi glukoz konsantrasyonunu da artırmıştır. Hidroliz derecesinin sülfirik asitte diğer asite göre daha yüksek olması, glukoz miktarının en yüksek oranda olmasına neden olmuştur; hatta bütün ekstraksiyon yöntemleri karşılaştırıldığında en yüksek glukoz 0,8 M sülfirik asitli ortamda 50.144 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Her iki



Şekil 5. Zayıf ve kuvvetli asit ile hidroliz edilen çiriş yumrularının şeker miktarları
Figure 5. Sugar amounts of Asphodel tubers in acidic method

asitte de konsantrasyonun artışı glukoz miktarının asetik asit için 2.142 µg/ml'den 1.407 µg/ml'ye ve sülfürik asit için 50.144 µg/ml'den 2.329 µg/ml'ye düşmesine sebep olmuştur. Bu sonuçlar asit konsantrasyonunun glukozu HMF'ye dönüştürdüğünü ve bu yüzden glukoz oranının azaldığı şeklinde yorumlanmıştır (Şekil 5).

Fruktoz miktarı da, glukozdaki gibi, sükrozun hidrolizine bağlı olarak asit takviyesi ile yüksek seviyede tespit edilmiştir. Ancak asidin konsantrasyonunun artması ile fruktoz miktarı zayıf asit için 21.066 µg/ml'den 4.256 µg/ml'ye ve kuvvetli asit için 5.786 µg/ml'den 4.493 µg/ml'ye büyük oranda düşüş göstermiştir. Asite bağlı olarak fruktoz miktarının glukozu göre daha çok düşmesi, muhtemelen HMF direnci açısından fruktozun aside daha dayanıksız olduğunu göstermiştir. Zayıf asit ile ekstraksiyonda çiriş yumruları içerisindeki odunsu yapılar tam anlamı ile hidroliz edilememiştir. Çünkü odunsu yapıların hidrolizinden gelen galaktoz ve ksiloz bu metotta saptanamamış; ancak kuvvetli asitte bu iki şeker birimi de tespit edilebilmiştir. Yumrudan galaktozun elde edilmesi için kuvvetli asit konsantrasyonu önemli bir rol oynamış; hatta asit konsantrasyonunun artışına bağlı olarak galaktoz miktarı 2.031 µg/ml'den 2.180 µg/ml'ye yükselmiştir. Ksiloz miktarı ise 0,8 M sülfürik asit ile 1.043 µg/ml olarak tespit edilebilmiştir (Şekil 5).

4. Tartışma ve Sonuç

Çalışmada çiriş otu yumrularının ekstraksiyon verimleri ve çözünebilir şeker kompozisyonları incelenmiştir. Bu amaçla ekstraksiyon işleminde 150µL, 300 µL ve 450 µL hacimlerinde enzim ekstraksiyonları (Gluko-Amilaz, α-Amilaz ve eşit oranda beraber α-Amilaz & Gluko-Amilaz enzimleri), saf su ekstraksiyonları (60 dk, 90 dk, 120 dk ve 180 dk) ve asidik ekstraksiyonlar (0,8 M ve 1,6 M konsantrasyonunda asetik ve sülfürik asit) ile çiriş otu yumrularının hidrolizleri ve ekstraksiyonları yapılmıştır.

Ekstraksiyon türlerinin farklılaşması verim miktarlarının da önemli oranda değişmesine sebep olmuş; genel olarak ekstraksiyon verimleri % 81-96 arasında tespit edilmiştir. Çözücü içinde enzim miktarının artması ekstraksiyon verimini artırmış; ancak enzimlerin sinerjik etkisi ekstraksiyon verimlerinde etkili olmamıştır. Asitler de hidroliz verimini artırmak için çözücü içine takviye edilmiştir. Elde edilen verilere göre, asit konsantrasyonlarının artması ile ekstraksiyon verimleri yükselmiştir. Ancak sülfürik asit, asetik aside göre, verimi daha çok artırmıştır ki sebebi yumru liflerinin kuvvetli asit ile hidrolize uğramasıdır. Aslında enzim ve asit takviyeleri ile ekstraksiyon metotla-

rının aksine, bir katkının olmadığı saf su ekstraksiyonunda en yüksek verim belirlenmiştir. Verim açısından saf su ekstraksiyonu yeterli ve en etkili metot olarak tespit edilmiştir.

Çiriş otu yumrularında glukoz, galaktoz, ksiloz, fruktoz ve sükroz şeker kompozisyonları HPLC-RID cihazı kullanılarak tespit edilmiştir. Yumrulara uygulanan farklı ekstraksiyon türleri tespit edilen şekerlerin oranlarını önemli seviyede etkilemiştir. Kromatogramlardan elde edilen sonuçlara göre en yüksek sükroz oranı 450 µL hacimde eşit oranda beraber kullanılan α-Amilaz & Gluko-Amilaz enzimleri varlığında 2.510 µg/ml olarak belirlenirken, hem kuvvetli hem de zayıf asidin olduğu 1,6 M ortamda sükroz tamamen tükenmiştir. En fazla glukoz miktarı 0,8 M kuvvetli asidin olduğu ortamda 50.144 µg/ml olarak belirlenmiştir; glukozun en az olduğu ekstraksiyon ise 180 dk saf su ekstraksiyonu ile gözlenmiştir. Ksiloz miktarı neredeyse bütün ekstraksiyon türlerinde gözlenmemesine rağmen; 0,8 M kuvvetli asidin olduğu ortamda 1.043 µg/ml konsantrasyonda hidroliz edilebilmiştir. Galaktoz ise ekstraksiyon metotlarının hemen hemen yarısında hidroliz edilememiştir. Galaktozun en fazla hidroliz edilebildiği metot ise 1,6 M kuvvetli asidin olduğu ortamda 2.180 µg/ml olarak belirlenebilmiştir. Yumruda bulunan fruktoz miktarı bütün ekstraksiyon metotlarında glukozda olduğu gibi gözlenebilmiştir. En fazla fruktozun olduğu ekstraksiyon metodu ise 0,8 M zayıf asidin olduğu ortamda 21.066 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Fruktozun en düşük miktarı ise 180 dk saf su ekstraksiyonu metodunda ve tespit edilebilir sınır konsantrasyonun altında bir değer vermiştir.

Teşekkür

Bu çalışma çerçevesinde, çiriş otu yumrularının nereden temin edileceği hakkında ve bitki teşhisi hususunda yardımlarını esirgemeyen Öğr. Gör. Tolga OK'a teşekkürlerimi sunarım.

Kaynaklar

Alma, M.H., Karaoğul, E., Ertaş, M. ve Altuntaş, E. 2011. Analysis and Comparison of Some Thyme Kinds Growing Natural Habitat and Culture Habitat, II. International Non-Wood Forest Products Symposium, 8-10 Eylül: 68.

Batu, A., Aydoymuş, R.E., Batu, H.S. 2014. Gıdalarda Hidroksimetilfurfural (HMF) Oluşumu ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkisi, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi Cilt: 9, No: 1, 2014 40-55.

Baytop, T 1999. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

- Birincioğlu, S., alış, İ., Avcı, H. Erdađ, B. 2005. Pathological and Phytochemical Investigation of Neuronal Lipofuscinosis Caused by *Asphodelus aestivus* in Sheep: I. Pathological Findings, *Turk J Vet Anim Sci* 29 (2005) 1351-1356.
- Davis, P.H., 1965. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 8, Edinburgh Universty Press, Edinburgh.
- Gürhan, G. ve Ezer, N., 2004. "Halk Arasında Hemoroit Tedavisinde Kullanılan Bitkiler-1", *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 24: 37-55.
- İmamoğlu, S., 2010. *Asphodelus aestivus* Brot. (Çiriş otu) Bitkisinin Çeřitli Ekstraktlarının In Vitro Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programı Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Karaogul, E., Kirecci, E., Alma, M.H. 2016. Determination of Phenolic Compounds From Turkish Kermes Oak (*Quercus coccifera* L.) Roots By High Performance Liquid Chromatography; Its Antimicrobial Activities, *Fresenius Environmental Bulletin*, Volume 25 No. 7/2016, pages 2356-2363.
- Karataş, F., Bektař, İ., Biriřik, A., Aydın, Z., Kurtul A., 2011. Çiriş Otu'nda (*Asphodelus aestivus* L.) Suda Çözünen Bazı Bileřiklerin Araştırılması, *DU Journal of Science (E-Journal)*, 2011, 6 (1): 35-39.
- Lee, H.S., Nagy, S., (1990). Relative reactivities of sugars in the formation of 5-hydroxymethylfurfural in sugar-catalyst model systems. *J. Food Process. Preserv.* 14, 171-178.
- Oskay, M. Aktas, K. Sari, D. Azeri, C. 2007. A comparative study of antimicrobial activity using well and disk diffusion method on *Asphodelus aestivus* (Liliaceae), *Ekoloji* , 16(62) : 62- 65.
- Özdemir, A. ve Sıdal, U., 2013. *Streptomyces* sp. MC10 Suřunun Alfa Amilaz Üretim Kabiliyetinin Belirlenmesi, *C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 9.1 (2013) 39 – 46.
- Peksel, A. Imamođlu, S., 2009. Antioxidative properties of extracts from *asphodelus aestivus* brot (liliaceae), *Annals of Nutrition and Metabolism* , 55: 596 -596 Suppl. 1.
- Polunin, O, Huxley, A., 1987 *Flowers of the Mediterranean*. Hogarth Press, London.
- Polycarpos, P., 2009. Review Bioethanol production from *Asphodelus aestivus*, *Renewable Energy* 34, 2525–2527.
- Tosun, F., Akyüz, Kızılay, Ç., Sener, B., Vura, M., Pallitpongarnpim, P., 2004. Antimycobacterial Activity of Some Turkish Plants, *Pharmaceutical Biology*, 42: 39- 43.
- Ugulu, I., Baslar, S., Yorek, N., Dogan, Y., 2009. The investigation and quantitative ethnobotanical evaluation of medicinal plants used around Izmir province, Turkey, *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(5): 345-367.
- (URL-1). [http:// www.google.com.tr/patents?id=MZAgAAAAEBAJ&zoom=4&dq=asphodelus %20white%20blood%20%20cell&pg=PA1#v=onepage&q&f=false](http://www.google.com.tr/patents?id=MZAgAAAAEBAJ&zoom=4&dq=asphodelus%20white%20blood%20%20cell&pg=PA1#v=onepage&q&f=false) (Eriřim tarihi: 06.03.2018)
- Wahlborn, C.F., Hagerdal, B., 2002. Furfural, 5-Hydroxymethyl Furfural, and acetone act as external electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology and Bioengineering*, 78, 2, 172-178.
- Yağan, B.D., Gönüz, A., ve Atař, S., 2008. "A Study On Heavy Metal Accumulation By *Asphodelus aestivus* Brot. Taxon and Plant and Soil Texture Features In Tuzla Area,Canakkale-TURKEY", *Balwois* 27: 1-4.