

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**PİRİNÇ KEPEĞİNDEN ULTRASON DESTEKLİ PROTEİN
EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU:
ANTİOKSİDAN VE ANTİPROLİFERATİF ÖZELLİKLER
ÜZERİNE ETKİLER**

**Hazırlayan
Elif Meltem İŞÇİMEN**

**Danışman
Prof. Dr. Mehmet HAYTA**

Yüksek Lisans Tezi

**Haziran 2016
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**PİRİNÇ KEPEĞİNDEN ULTRASON DESTEKLİ PROTEİN
EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU:
ANTİOKSİDAN VE ANTİPROLİFERATİF ÖZELLİKLER
ÜZERİNE ETKİLER**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Elif Meltem İŞÇİMEN**

**Danışman
Prof. Dr. Mehmet HAYTA**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi
Tarafından FYL-2014-5471 Kodlu Proje İle Desteklenmiştir.**

**Haziran 2016
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

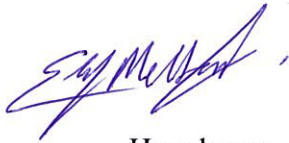
Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Elif Meltem İŞÇİMEN



YÖNERGEYE UYGUNLUK

“Pirinç Kepeğinden Ultrason Destekli Protein Ekstraksiyonunun Optimizasyonu: Antioksidan Ve Antiproliferatif Özellikler Üzerine Etkiler” adlı **Yüksek Lisans tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.



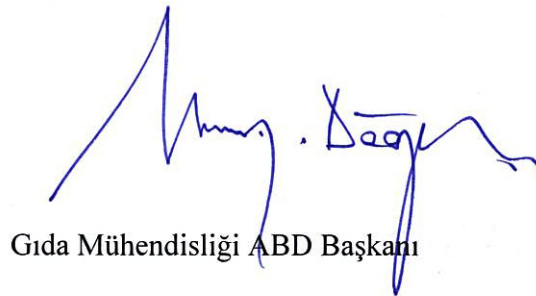
Hazırlayan

Elif Meltem İŞÇİMEN



Danışman

Prof. Dr. Mehmet HAYTA



Gıda Mühendisliği ABD Başkanı

Prof. Dr. Mahmut DOĞAN

Prof. Dr. Mehmet HAYTA danışmanlığında **Elif Meltem İŞÇİMEN** tarafından hazırlanan “**Pirinç Kepeğinden Ultrason Destekli Protein Ekstraksiyonunun Optimizasyonu: Antioksidan Ve Antiproliferatif Özellikler Üzerine Etkiler**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

.....31/05/2016

JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Mehmet HAYTA



Üye : Yrd. Doç. Dr. Kevser KAHRAMAN

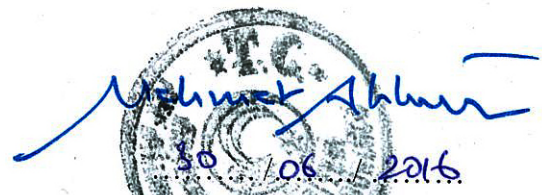


Üye : Yrd. Doç. Dr. Safa KARAMAN



ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 30/06/2016 tarih ve 2016/18-SL sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Mehmet AKKURT
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tezin planlanması ve yürütülmesi esnasında sahip olduğu bilgi ve deneyimleriyle çalışmama ışık tutan ve araştırma olanakları sağlayan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet HAYTA'ya, tüm samimiyeti ve sahip olduğu bilgi birikimiyle yardımını esirgemeyen hocam Büşra BENLİ'ye,

Erciyes üniversitesinde tamamlamış olduğum lisans ve yüksek lisans eğitimim sırasında emeği geçen tüm hocalarıma,

FYL-2014-5471 kodlu proje ile tez çalışmamı destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Son olarak da hayatım boyunca yanımda olan, sevgisini esirgemeyen, her daim sabır ve destekle bana yol gösteren yardımcı olan canım aileme ve eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Elif Meltem İŞÇİMEN,

Mayıs 2016, KAYSERİ

**PİRİNÇ KEPEĞİNDEN ULTRASON DESTEKLİ PROTEİN
EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU: ANTİOKSİDAN VE
ANTİPROLİFERATİF ÖZELLİKLER ÜZERİNE ETKİLER**

Elif Meltem İŞÇİMEN

**Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Mayıs 2016
Danışman: Prof. Dr. Mehmet HAYTA**

ÖZET

Bu çalışmada çeltik işlemede yan ürün olarak açığa çıkan pirinç kepeğinin katma değerinin artırılması amaçlanmıştır. Gelişmekte olan ekstraksiyon tekniklerinden ultrason yöntemi kullanılarak pirinç kepeğinden protein ekstraksiyonunun optimizasyonu sonucunda en yüksek protein veriminin elde edildiği parametreler 0.43 katı/sıvı oranı, %48.25 amplitud gücü ve 29.89 dakika olarak belirlenmiştir. Ekstraksiyon optimizasyonu ile belirlenen kat/sıvı oranı ve süre esas alınarak farklı ultrason güçleri uygulanan pirinç kepeğinden elde edilen protein izolatlarının antioksidan ve antiproliferatif özellikleri araştırılmıştır. Bu amaçla pirinç kepeği protein izolatlarının toplam antioksidan kapasite (TEAC), DPPH süpürücü aktivite, toplam fenolik bileşen miktarı (TPC), metal şelatlama aktivitesi ve HepG2 hücresi üzerine etkileri belirlenmiştir. En yüksek antioksidan kapasite (17,73 mg trolox/mg örnek), DPPH süpürücü aktivite (%63,61), toplam fenolik bileşen miktarı (297,43mg GAE/g protein ekstraktı) ve metal şelatlama aktivitesi (%55,34) değerleri %100 güç uygulanan örneklerden elde edilmiştir. Uygulanan ultrason gücünün HepG2 karaciğer karsinom hücre kültürleri üzerine sitotoksik etkisinin olmadığı ($p>0.05$), ve pirinç kepeği protein izolatları için toksik etkinin gözlemlendiği minimum konsantrasyonun 1 mg/mL protein izolatı/besiyeri olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler; Pirinç Kepeği, Ultrason Destekli Ekstraksiyon, Optimizasyon, Biyoaktif Özellikler, Antioksidan, Antiproliferatif

**OPTIMIZATION OF ULTRASOUND ASSISTED EXTRACTION OF
RICE BRAN PROTEINS: EFFECTS ON ANTIOXIDATIVE AND
ANTIPROLIFERATIVE PROPERTIES**

**Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences
M. Sc. Thesis, May 2016
Supervisor: Prof. Dr. Mehmet HAYTA**

ABSTRACT

In this study, it was aimed to increase added value of rice bran releasing as the by-product of paddy processing. The highest protein yield parameters were found as 0.43 solid/liquid ratio, power of 48.25% amplitude, and ultrasound application time of 29.89 minutes as result of using ultrasound which is an emerging extracting techniques. Based on the solid/liquid ratio and time determined by extraction optimization, antioxidant and antiproliferative properties of protein isolates obtained from rice bran treated by ultrasound of varying power were determined. For this purpose, total antioxidant capacity (TEAC), DPPH scavenging activity, total phenolic content (TPC), metal chelating activity and the effects on HepG2 citotoxicity of rice bran protein isolates were evaluated. The highest values for TEAC (17,73%), DPPH (63,61%), TPC (297,43 mg GAE/mg), metal chelating activity (55,34%) were obtained from samples treated with 100% ultrasonund power. It has been determined that the ultrasound power had no significant ($p>0,05$) cytotoxic effect on HepG2 liver carsinom cell line, and minumum concentration of rice bran protein isolate for toxic effect was 1mg/mL protein isolate/medium.

Key words: Rice Bran, Ultrasound Assisted Extraction, Optimization, Bioactive Properties, Antioxidant, Antiproliferative

İÇİNDEKİLER

PIRINÇ KEPEĞİNDEN ULTRASON DESTEKLİ PROTEİN EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU: ANTİOKSİDAN VE ANTİPROLİFERATİF ÖZELLİKLER ÜZERİNE ETKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK	ii
ONAY	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Ultrason.....	4
1.1.1. Hız, Dalga Boyu, Frekans.....	5
1.1.2. Ultrason Sistemi Bileşenleri	5
1.1.3. Kavitasyon	6
1.1.4 Ultrason Destekli Ekstraksiyon	7
1.2. Optimizasyon ve Cevap Yüzey Yöntemi.....	9
1.3. Antioksidanlar.....	11
1.3.1. Serbest Radikaller.....	11
1.3.1.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri.....	12
1.3.1.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri	13
1.3.1.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere ve DNA'ya Etkileri.....	13
1.3.1.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri.....	13
1.3.2. Antioksidan Bileşiklerin Özellikleri	13

1.3.3. Antioksidan Aktivite Tayin Metotları.....	15
1.3.3.1. DPPH Radikali Süpürme	15
1.3.3.2. Folin Ciocalteu (FC)Yöntemi İle Toplam Fenolik Madde	16
1.3.3.3. Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAC veya ABTS).....	17
1.3.3.4. Fe ³⁺ İyonu İndirgeme Gücü (FRAP)	17
1.4. Hücre Kültürü	17
1.4.1. Kanser	17
1.4.2. Hücre Kültürü Çalışmaları	18
1.4.3. Apoptozis	19
1.4.3.1. Apoptotik Hücre Ölümü Aşamaları.....	19
1.4.4. Hücre Canlılığı (Viabilite) ve Ölümü (Sitotoksosite) Belirlemek İçin Kullanılan Analiz Yöntemleri	19
1.4.4.1. Laktat Dehidrojenaz (LDH).....	21
1.4.4.2. Süksinat Dehidrojenaz.....	21
1.4.5. HepG2 İnsan Karaciğer Kanseri Hücreleri.....	22

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal.....	23
2.2. Yöntem	23
2.2.1. Nem, Protein, Yağ Tayini	23
2.2.2. Örnek ve Ekstrakt Hazırlama	24
2.2.2.1. Yağ Uzaklaştırma.....	24
2.2.2.2. Optimizasyon.....	25
2.2.2.3. Bradford Yöntemi İle Protein Miktarının Belirlenmesi.....	26
2.2.3. Ultrason Uygulaması.....	27
2.2.4. Protein İzolatı Hazırlama	28
2.2.5. Biyoaktif Özellikler	28
2.2.5.1. Toplam Fenolik Madde	28
2.2.5.2. Toplam Antioksidan Aktivite.....	29
2.2.5.3. DPPH Radikali Süpürücü Aktivite	30

2.2.5.4. Metal Şelatlama Aktivitesi	30
2.2.6. Antiproliferatif Aktivite	31
2.2.6.1 HepG2 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi	31
2.2.6.2. HepG2 Hücrelerinin Dondurulması.....	31
2.2.6.3. Dondurulmuş HepG2 Hücrelerinin Çözülmesi	31
2.2.6.4. Hücrelerinin Pasajlanması	32
2.2.6.5. Hücre Canlılığının Belirlenmesi	33
2.2.6.5.1. Örnek Hazırlama	33
2.2.6.5.2. Mikroskopik İnceleme	33

3. BÖLÜM

BULGULAR- SONUÇ VE TARTIŞMA

3.1. Nem, Yağ ve Protein Miktarı.....	35
3.2. Ultrason Uygulamasının Protein Konsantratu Verimine Etkisi.....	35
3.3. Antioksidan Özellikler.....	39
3.3.1. Toplam Fenolik Madde	39
3.3.2. Toplam Antioksidan Aktivite.....	41
3.3.3. DPPH Radikali Süpürücü Aktivite Analizi	42
3.3.4. Metal Şelatlama Aktivitesi	45
3.5. Antiproliferatif Özellikler	47

4. BÖLÜM

ÖNERİLER

KAYNAKLAR	55
EKLER	55
ÖZGEÇMİŞ	80

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Bazı serbest radikal türleri.....	11
Tablo 1.2. Bazı antioksidanlar	14
Tablo 2.1. Cevap yüzey yönteminde belirlenen bağımsız değişken verileri	25
Tablo 2.2. Optimizasyon aşamasında uygulanan katı/sıvı oranı, sıcaklık ve güç parametreleri.....	26
Tablo 2.3. Ultrason uygulama parametreleri	28
Tablo 3.1. Ultrason uygulanmış örneklerin protein verim değerleri	36
Tablo 3.2. US optimizasyonu için kuadratik model varyans (ANOVA) analizi.	37
Tablo 3.3. Optimizasyonda cevap yüzey metodu ile oluşturulan optimum noktalar ve istenirlik fonksiyonu değerleri.	39
Tablo 3.4. Örneklerin gallik asit eşdeğeri (GAE)cinsinden toplam fenolik madde miktarları	40
Tablo 3.5. Örneklerin antioksidan aktivite değerleri.....	41
Tablo 3.6. Örneklerin DPPH radikali inhibisyon ve IC ₅₀ değerleri	43
Tablo 3.7. Örneklerin metal şelatma aktiviteleri	46
Tablo 3.8. Canlı hücre (%).	48

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Ses dalgası tipleri	4
Şekil 1.2. Kavitasyon oluşumu.....	7
Şekil 1.3. Ultrason uygulama aşamasında partikülde oluşan değişim	8
Şekil 1.4. Merkezi kompozit dizaynın değişken noktalarını temsil eden sanal küp	10
Şekil 1.5. Lipid peroksidasyonunun temel reaksiyonları	12
Şekil 1.6. DPPH'in moleküler yapısı	15
Şekil 1.7. Fenolat anyonu oluşumu	16
Şekil 2.1. Yağ Alma Aşaması	24
Şekil 2.2. Yağı alınıp kurutulmuş örneklerin görüntüsü	24
Şekil 2.3. Ultrason uygulama aşaması.....	27
Şekil 2.4. HepG2 hücrelerine ait ışık mikroskobu görüntüsü	34
Şekil 3.1. Design expert programı ile elde edilen modele ait 3 boyutlu grafikler.....	38
Şekil 3.2. Kontrol örneğine ait 1 mg/mL pirinç kepeği protein izolatu uygulanmış HepG2 hücrelerinin mikroskop görüntüsü.....	49
Şekil 3.3. Kontrol örneğine ait 0,4 mg/mL pirinç kepeği protein izolatu uygulanmış HepG2 hücrelerin mikroskop görüntüsü	49
Şekil 3.4. Kontrol örneğine ait 0,2 mg/mL pirinç kepeği protein izolatu uygulanmış HepG2 hücrelerin mikroskop görüntüsü	50

GİRİŞ

Günümüzde hızla artan dünya nüfusuna karşılık üretimin artışının aynı süratte olmayışı gıda sanayi artıklarının değerlendirilmesi veya yan ürünlerinin katma değerlerinin artırılmasını gerekli kılmıştır.

Pirinç kepeği çeltik işleme sanayinin en önemli yan ürünü olup çoğunlukla ülkemizde hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Pirinç tanesinin yaklaşık olarak %10'unu kepek oluşturmakta bileşim ve içerik çeşitli, önişlem ve öğütme parametrelerine bağlı olarak değişmekle birlikte [1] kepek, %11,3-14,9 protein, %34,0–62,0 nişasta ve %15,0–19,7 yağ içermektedir [2]. Bununla birlikte kepek proteini yüksek besinsel değerinin yanı sıra nütrosotik özelliklere sahiptir [3].

Doğal ürünlerden biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda yeni gelişen, yüksek hidrostatik basınç, vurgulu elektrik alan, mikrodalga, süperkritik akışkan ekstraksiyonu, basınçlı sıvı ekstraksiyon sistemleri ve ultrason gibi çeşitli teknikler ile desteklenmiş yöntemler giderek yaygınlaşmaktadır [4; 5;]. Bu yeni gelişen yöntemlerden biri olarak ultrason destekli ekstraksiyon ucuz, basit ve kısa süreli bir yöntem olmasından dolayı geleneksel yöntemle göre daha çok tercih edilmektedir. Ultrasonun mekanik ve kavitasyonel etkisi sayesinde hücre duvarı parçalanmakta ve hücre içi maddenin ekstraksiyonu kolaylaşmaktadır [6].

Ultrason etkisinin yüksek ısı ve basınç oluşturan küçük kaviteler, şok dalgalar ve partikül hızlanması sonucu oluştuğu kabul edilmektedir. Kaviteasyon olarak adlandırılan bu etkinin 20 kHz'e kadar mekanik ötesinde kimyasal olabileceği bildirilmiştir [7]. Ultrason uygulamasında kepeğe fiziksel muamele hücre duvarını parçalayabilir ve sonuçta hidroliz için uygun bir ortam oluşur. Ultrason uygulaması ile gerçekleşen kaviteasyon sonucu oluşan ısı ve basınç hücre duvarı ve hücre içi moleküler bağlara etki eder [8; 9].

Protein ekstraksiyonunda ultrason desteği yeni gelişen metotlardan olup umut verici tekniklerden biri olarak görülmektedir. Örneğin, pirinç kepeği proteinlerinin ekstraksiyonunda ultrason desteği ile yüksek verimliliklere ulaşılabildiği kaydedilmiştir.

Gıda proteinlerinin farklı yollarla parçalanması sonucunda açığa çıkan hidrolizat ya da hidrolizatların düşük molekül ağırlıklı kısa zincirli peptit fraksiyonlarının biyoaktif etkileri yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Mesela, pirinç kepeğinden elde edilen protein hidrolizatlarının antioksidan aktiviteye sahip oldukları belirtilmiştir. Pirinç kepeği protein izolatından elde edilen albümin, globülin, prolamin ve glutelin fraksiyonlarından globülin fraksiyonunun pepsin ve tripsin hidrolizatlarının linoleik asit peroksidasyonuna karşı en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir [10].

Protein hidrolizatlarının biyoaktivitesini belirlemede kullanılan yöntemlerden biri de hücre kültürü çalışmalarıdır. Buğday, pirinç ve mısır günlük hayatta fazla tüketilen gıdalardandır. Bu tahıllar yine protein içeriği bakımından zengindirler, antioksidan ve antikanser protein ve peptitleri içerirler [11]. Yapılan bir çalışmada pirinç kepeğinden elde edilen sabunlaşmayan bileşenlerin HepG2 hücrelerinin enzim aktivitesini ve oksidatif stresi düzenlediği bildirilmiştir[12].

Çeşitli bitkisel ve hayvansal materyalden protein ekstraksiyonunda etkinliğin sağlanması kullanılan yaklaşımlardan biri de deney dizaynının cevap yüzey yöntemi kullanılarak yapılması ve böylelikle en az sayıda deney yaparak hedeflenen sonuca deney parametrelerinin hangi değerleri ile ulaşılabileceğinin ortaya konulmasıdır. Konu ile alakalı olarak cevap yüzey yöntemi kullanılarak pirinç kepeğinden ultrason destekli antioksidan bileşen ekstraksiyonu çalışmasında, solvent konsantrasyonu, sıcaklık ve süre parametreleri incelenmiş ve optimum ekstraksiyonun %65–67 etanol, 51–54  C, 40–45 dk ile gerçekleşebileceği tespit edilmiştir [13]

Bu çalışmada  eltik işleme sanayinin yan ürünü olan pirinç kepeğinden öncelikle ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılarak protein ekstraksiyonunun cevap yüzey yöntemiyle optimize edilmesi amaçlanmıştır. Belirlenen optimum parametreler kullanılarak elde edilen pirinç kepeği protein izolatlarının DPPH süpürücü aktivite, toplam fenolik bileşik analizi, toplam antioksidan kapasite tayini (TEAC), metal

şelatlama gibi biyoaktif özellikleri ile birlikte karaciğer kanser hücre hattı (HepG2) üzerinde antiproliferatif etkileri belirlenmiştir.

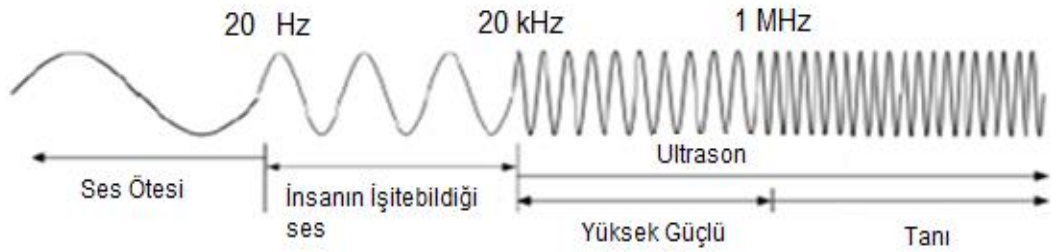


1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Ultrason

Ses dalgaları frekanslarına göre gruplandırılırlar. 20 Hz ile 20 kHz insan tarafından algılanabilir ses aralığıdır [14]. Katı, sıvı ve gazlardan geçebilen ses dalgaları olan ultrason insan kulağı tarafından algılanamayan dalga boyu 20 kHz den yüksek olan ses dalgalarıdır [15]. Gıda uygulamalarında 20 kHz ile 1 mHz arasındaki ultrason kullanılmaktadır. 1 mHz in üstündeki dalga boyları tıp alanında görüntüleme amaçlı kullanılmaktadır [14].



Şekil 1.1. Ses dalgası tipleri

Ultrason; karıştırma, homojenizasyon, emülsiyon oluşturma, enzim ve mikroorganizmaların inaktivasyonunda kullanılmakta ve bu konudaki çalışmalar devam etmektedir. Ultrason işleminin yağ globüllerinin boyutunu küçülttüğü bilinmekte ve klasik homojenizasyon yerine kullanılabilir [16; 17; 18].

1.1.1. Hız, Dalga Boyu, Frekans

Ses dalgaları meydana geldiği ve ilerlediği ortamda ki molekülleri titreştirirler[19]. Tüm ses dalgaları $V=F/l$ eşitliğine göre yayılım gösterir.

V:hız (m/sn)

F: frekans (hertz, siklus/saniye)

l: dalga boyu (mm)

Denklemden de anlaşıldığı gibi frekans arttıkça dalga boyu kısalır. Ses dalgasının gücü yani şiddeti amplitud/genlik olarak ifade edilir. Ses gücü ses yüksekliği ile aynı anlama gelmektedir. Ses yoğunluğu ise birim alan boyunca oluşan enerji akım oranıdır. Dalga boyu peşpeşe gelen iki dalganın tepe noktaları arasındaki mesafedir. Frekans ise birim zamanda belli noktadan geçen dalga sayısıdır [20].

1.1.2. Ultrason Sistemi Bileşenleri

Ultrason dalgalarının üretiminde elektrik enerjisi veya mekanik enerji ses enerjisine dönüştürülür. Gaz zorlamalı, sıvı zorlamalı ve elektromekanik dönüştürücü olmak üzere üç tip dönüştürücü yaygın olarak bu amaçla kullanılır [21]. Sistem olarak jeneratör, dönüştürücü ve iletici kısımlardan oluşur [22] Jeneratör; alternatif akımı dönüştürücünün kullanabileceği türden daha yüksek frekanslı bir alternatif akıma çevirir. Dönüştürücü elektrik akımından mekanik titreşimler elde edilmesini, yüksek frekanslı elektrik akımından mekanik titreşimler oluşmasını sağlar. İletici kısım ise oluşan mekanik titreşimleri ultrason işleminin uygulanmak istendiği ortama iletir.

Prob aracılığıyla istenilen bölgeye mekanik enerji gönderilmekte ve gelen yankı yine prob ile ultrason enerjisinden elektrik enerjisine çevrilebilmektedir. Kısaca prob ultrason sisteminin alıcısı ve vericisidir. Ultrason cihazı olarak adlandırılan sistem temelde elektronik bir cihazdır. Kısaca ultrason sistemindeki mekanizmayı özetlenecek olursa; önce elektrik enerjisi voltaj ve akım halinde transdusere iletilmekte, buraya gelen enerji mekanik enerjiye dönüştürülerek yayılmakta, yayılan ses dalgaları akustik bir enerji oluşturarak ısı ve basınç şartlarını değiştirmekte ve kavitasyon

oluşturmaktadır. Oluşan kavitasyonlarda ortamda yayılarak çeşitli etkilere yol açmaktadır.

Ultrason uygulandığı ortamda mekanik titreşim oluşumu, akustik dalga oluşumu ve akustik kavitasyon oluşumu gibi etkiler meydana getirir. İlk iki etki kavitasyonel olmayan fiziksel etkiler olarak sınıflandırılabilir. Oluşan bu ilk etki ile temizleme, ekstraksiyon, dilimleme gibi işlemleri yapmak mümkündür. Akustik kavitasyon ise ultrason uygulamaları sonucu oluşan temel etkidir [23;24].

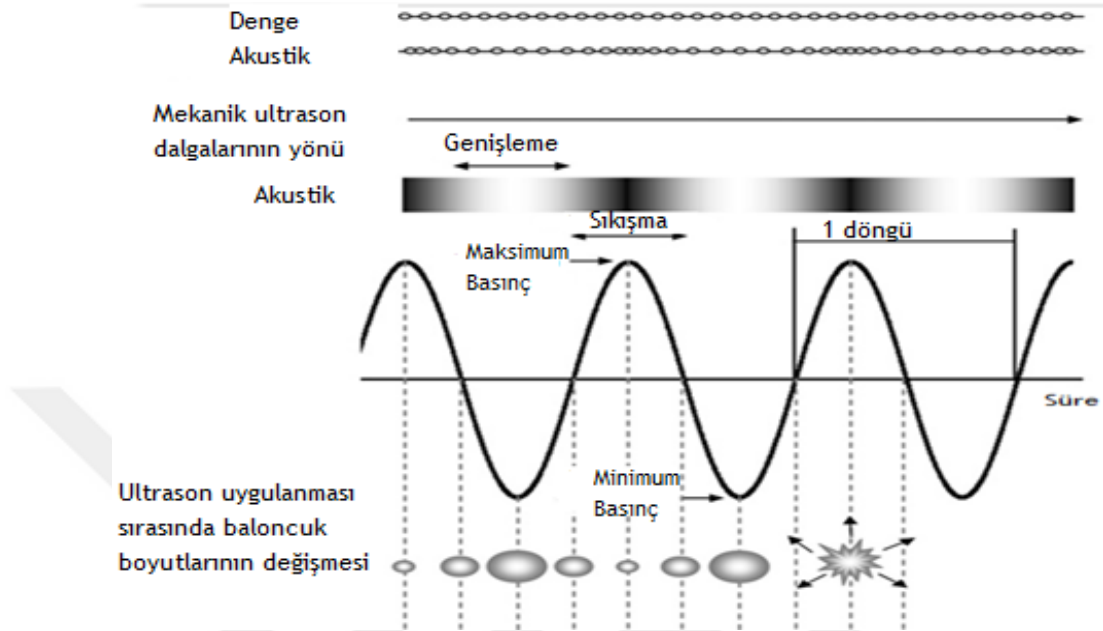
1.1.3. Kavitasyon

Ultrason dalgalarının kimyasal ve mekanik etkileri kavitasyon kabarcıkları oluşturmaktadır [25]. Kavitasyon buhar ve gaz dolu kabarcıkların oluşması, büyümesi ve geri sönümlenmesi işlemidir. Kavitasyon baloncuklarının oluşması için belirli bir sıcaklıkta sıvının statik basıncının buhar basıncının altına düşmesi gerekmektedir [26]. Kavitasyon mekanizmasının oluşması esnasında sıvı içindeki diğer moleküller kenara çekilerek bir boşluk oluşturur [27].

Ultrason dalgaları sıvı ortamdan geçerken sıkışma fazında sıvı molekülleri üzerine pozitif bir basınç oluşturur ve moleküller birbirlerine yaklaşır, genleşme fazında ise su molekülleri üzerinde negatif bir kuvvet oluşturur ve moleküller birbirinden uzaklaşır. Genleşme esnasında eğer yeterince güçlü bir negatif basınç oluşmuşsa, kaviteler meydana gelir. Bir kabarcığın oluşabilmesi için ultrason negatif basıncının sıvının çekme gerilimini yenmesi gerekir. Uygulanması gereken negatif basınç sıvı ortamın özelliklerine ve saflığına bağlıdır. Saflığı yüksek sıvılarda moleküller arası çekme gücü yüksek olduğundan kavitasyon oluşumu için gerekli negatif basınç yetersiz kalır.

Ultrason uygulamalarında kavitasyon sayesinde bölgesel olarak sıcaklıkta 5000 K'e basınçta ise 1000 atm'e varan değişimler meydana gelebilir (Şekil 2.2). Bu sıcaklık artışı ve basınç şiddeti madde içerisinde bir takım kimyasal değişikliklere yol açar. Ortamda H ve OH serbest radikalleri oluşarak yeni kimyasal tepkimeleri tetikler. Uygulanan frekansa göre serbest radikal oluşumu değişkenlik gösterir. Düşük güçteki uygulamalarda daha az kavitasyon oluşurken baloncuk başına düşen serbest radikal sayısı daha fazladır. Yüksek güçteki uygulamalarda ise daha çok baloncuk oluşur ancak

baloncuk başına daha az radikal oluştuğu bildirilmektedir. Çalışmalarda kimyasal etkinin en çok olduğu aralık 200-500 kHz olarak [28].



Şekil 1.2. Kaviteasyon oluşumu [29]

Sistem şartlarına bağlı olarak sıvı içerisinde geçici ve kalıcı olmak üzere iki tip kaviteasyon oluşur. Geçici kaviteasyon birkaç akustik döngüden sonra boyutlarını birkaç kat artırıp şiddetli şekilde çökerek kaybolur. Kararlı kaviteasyonlar ise onlarca döngü boyunca lineer olmayan şekilde titreşim gösterirler. Kaviteasyon çökmesi sonucu kimyasal ve mekanik etkiler ortaya çıkar ve etkilere yol açan bu enerjiyi açıklayan teori “hot spot” olarak adlandırılır [30].

1.1.4 Ultrason Destekli Ekstraksiyon

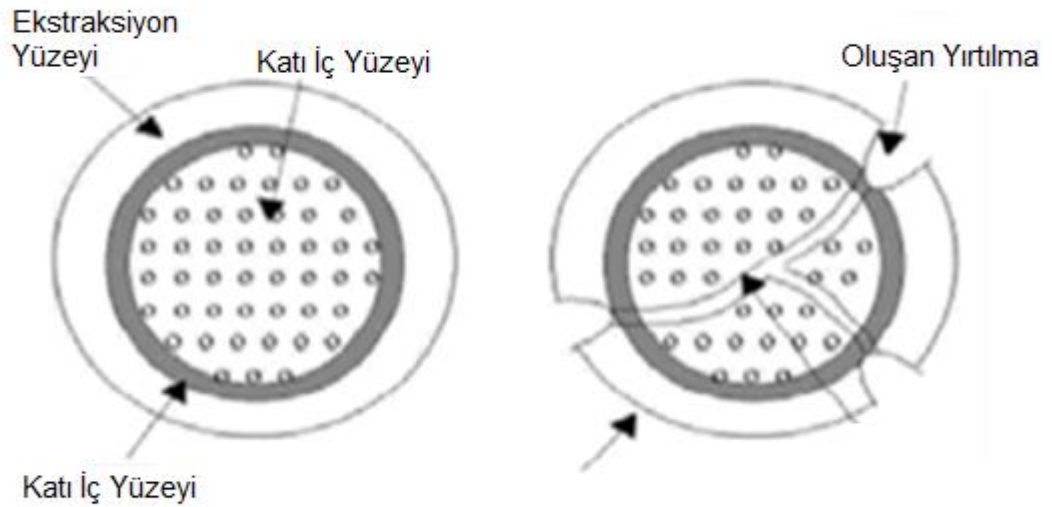
Ultrason destekli ekstraksiyonda verim maddenin doğal yapısına bağlı olarak değişim gösterir. Ultrason sayesinde katı yüzeyinde tahribat oluşturulur ve sonuçta ekstraksiyon veriminin artması sağlanır [15; 19].

Ultrason ile oluşan mikro jetler katı yüzeyine çarparak sıvıyı katı içine enjekte eder [31]. Oluşan kabarcıklar aynı frekansta titreşmenin devamını sağlar. Sürekli devam eden bu durum katı içindeki sıvının dışarı çıkmasını dışarıdaki sıvının da katı içerisine girmesini sağlar [32].

Ultrason destekli ekstraksiyon sistemleri kullanılarak biyoaktif bileşenlerin ekstrakte edilmesini sağlamak ve ekstraksiyon verimini arttırmak mümkündür [33]

Geleneksel ekstraksiyon sistemlerine göre daha ucuz, pratik ve verimli olması bu sistemin avantajıdır. Özellikle katı-sıvı ekstraksiyon sistemlerinde verim artışı sağlamaktadır. Ultrasonik uygulamalar ısısal olmayan işlemler olduklarından sıcaklığa duyarlı maddelerin ekstrakte edilmesini mümkün kılar [34].

Ultrason uygulama ile hücre duvarı parçalanır ve hücre içi materyalin alımı kolaylaşır. Hücre duvarı faktörü ortadan kalktığından diğer yöntemlere kıyasla daha kolay ve verimi yüksek bir ekstraksiyon gerçekleştirilmektedir. Ayrıca ultrason çözgenin dokular arasında dağılımını da sağlar [35]. Bu nedenlerle ultrason destekli ekstraksiyon uygulamalarının gelecekteki ekstraksiyon sistemleri için önemli bir potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir [36; 37; 38].



şekil 1.3. Ultrason uygulama aşamasında partikülde oluşan değişim

Yağlar, esansiyel yağlar, antioksidanlar ve biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu için uygun olan ultrason destekli ekstraksiyon için pek çok çalışma mevcuttur [36; 39; 40; 41; 42; 43].

Buğday kepeğinden ultrason destekli fenolik bileşen ekstraksiyonu [44; 45] enzimatik ve ultrason destekli arabinoksilan ekstraksiyonu [46] çalışmaları diğer bazı örneklerdir.

1.2. Optimizasyon ve Cevap Yüzey Yöntemi

Mühendislik çalışmalarında optimizasyon deney ve yeni ürün tasarlama, üretim sürecinin iyileştirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Amaç değişkenlerden doğru ölçüde etkilenen güvenilir bir proses oluşturmaktır [47].

Optimizasyon gıda mühendisliği alanında proses verimini en üst düzeye çıkarmak ve ürün kabulünü artırmak için kullanılan bir yöntemdir [48].

Cevap yüzey yöntemi optimizasyon işlemleri için 1951 yılında Box and Wilson tarafından denemelerin optimum koşullara ulaşması amacıyla tasarlanmış istatistiksel bir tekniktir [48].

Cevap yüzey yöntemi tasarım alanı içerisinde seçilen değişkenlerin birbiri arasındaki etkileşimi ve optimum etki seviyelerini belirlemek için kullanılan deney sayısını minimize eden ve zaman tasarrufu sağlayan istatistiksel bir yöntemdir [47]. Bu teknik yaygın olarak biyokimyasal ve diğer sanayi işlem değişkenlerini optimize etmek için kullanılan bir tekniktir [37].

Cevap yüzey yönteminde proses değişkenlerinin etkilerini araştırmak amaçlanmaktadır. Sistemin yanıtı ve bu yanıt üzerine etkisi olan bağımsız parametrelerin arasındaki ilişkiyi belirlemek için kullanılır. Belirlenen bu etkiler içinde arzu edilen yanıtı oluşturan bağımsız değişken değerleri optimum seviyeyi oluşturmaktadır [49].

Cevap yüzey yönteminde çoğunlukla ilk işlem yanıt ve bağımsız değişkenler arasında ki ilişki için doğru fonksiyonel yaklaşımı bulmaktır. Yanıt bağımsız değişkenlerin lineer fonksiyonu olarak belirleniyorsa fonksiyon birinci derecedendir.

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon$$

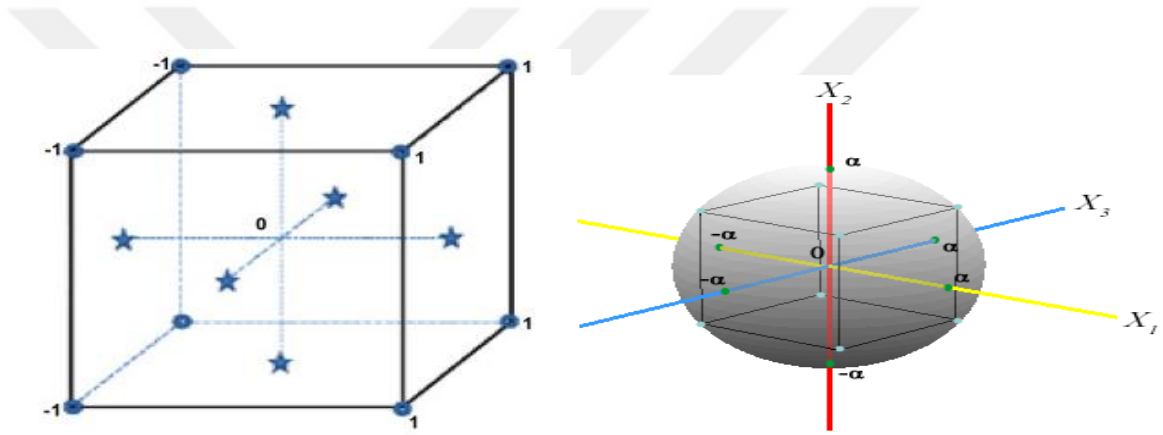
Eğer yaklaşım lineer değilse yüksek dereceli denklemler ile bir model oluşturulur.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_i X_i^2 + \sum \beta_i X_i + \sum \sum \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Cevap yüzey yöntemi'nin tümünde bu denklemlerden biri ya da tümü kullanılır [47]

Cevap yüzey yönteminde ürün veya süreç için önemli kritik noktaların belirlenmesi gereklidir. Daha sonra etkisi sınanacak faktörlerin seviye aralıkları belirlenmelidir. Üçüncü aşama olarak belirlenen dizayn test edilir ve son olarak cevap yüzey yöntemi ile analiz edilir ve yorumlanır [50].

Merkezi kompozit tasarımlar (CCD: Central composite designs) ikinci dereceden tasarımlardan biridir. Bu tasarımın en önemli avantajı yeni bir deney tasarımına gerek duyulmadan $2k$ tasarımına sadece eksen ve merkez noktalarının eklenmesiyle yeni tasarımın elde edilmesidir. Şekil 2.4'te gösterilen sanal küp merkezi kompozit dizaynda kullanılan noktaları (yıldız $\pm\alpha$, 0 merkezi nokta) göstermektedir [51].



Şekil 1.4. Merkezi kompozit dizaynın değişken noktalarını temsil eden sanal küp

Gıda teknolojisi alanında son yıllarda geniş bir uygulama alanı bulan cevap yüzey yöntemi ile basit modellemeler yapılarak prosesi etkileyen çok sayıdaki bağımsız değişkenler eş zamanlı olarak incelenebilmekte ve oluşan yanıtlar en az sayıda deneme yapılarak belirlenebilmektedir. Cevap yüzey yönteminin ön plana çıkmasının sebebi diğer optimizasyon yöntemlerine göre farklı gıda proseslerinde uygulanabilir olması ve çok fazla yanıtı dikkate alarak optimum noktayı belirleyebilmesidir. Yöntemin dezavantajı ise eğrilik içeren tüm yanıtları ikinci dereceden bir denkleme uygun olduğunun varsayılmasıdır. Ancak eğrilik içeren tüm sistemlerin ikinci dereceden bir denkleme uygun olduğunu söylemek doğru değildir [48].

1.3. Antioksidanlar

1.3.1. Serbest Radikaller

Bir veya birden daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron içeren atomik veya moleküler yapıdaki bileşenler serbest radikal olarak adlandırılırlar. Yapılarında bulunan eşleşmemiş elektronlar sebebiyle çok aktif olan radikaller ortamdaki diğer moleküllerle reaksiyona girerek onların da yapısını bozarlar. Antioksidan olarak adlandırılan maddeler bu serbest radikallerin etkisini inhibe ederler [52].

İnsan metabolizmasındaki serbest radikaller çoğunlukla reaktif oksijen sebebiyle oluşmaktadır. Reaktif oksijenler; elektron transfer sisteminde, enzimatik reaksiyonlar sonucunda, oksidasyon reaksiyonları, UV ışınları, beslenme, sigara kullanımı ve kanserojen maddelerin tüketilmesi gibi sebeplerle oluşabilir [53;54].

Organizmada reaktif oksijen oluşumu enflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek oksijen basıncı, ozon, azot dioksit ve kimyasal maddeler gibi bazı etmenlerin bulunmasıyla artış gösterir. Artan serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşenlerinin zarar görmesine sebep olurlar [55].

Tablo 1.1. Bazı serbest radikal türleri (Halliwell, 1994).

Adı	Formülü	Tanımı
Hidrojen atomu	H [•]	En basit serbest radikal
Süperoksit	O ₂ ^{•-}	Oksijen merkezli radikal, seçimli reaktif
Hidroksil	•OH	En reaktif oksijen radikali, insan vücudundaki tüm moleküllere etki eder.
Triklormetil	CCl ₃ [•]	C merkezli radikal, CCl ₄ metabolizması sonucunda üretilir ve O ₂ ile hızlı reaksiyona girer
Tiyil	RS [•]	Kükürt üzerinde eşleşmiş elektron bulunduran türlerin genel adı
Peroksil, Alkoksil	RO ₂ [•] , RO [•]	Organik peroksitlerin yıkımı sırasında oluşan oksijen merkezli radikaller
Nitrik oksit	NO [•]	L-arginin amino asitinden in vivo koşullarda üretilir

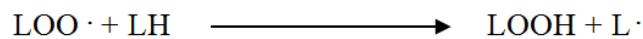
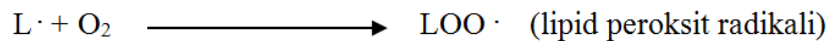
Azotdioksit	$\text{NO}_2^\cdot$	$\text{NO}^\cdot$ 'nun O_2 ile reaksiyonunda oluşur. Kirli hava, sigara dumanı vb. maddelerde bulunur
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Reaktivitesi en düşük, moleküler hasar yeteneği düşük
Singlet oksijen	$^1\text{O}_2$	Oksijenin güçlü oksidatif formu

1.3.1.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri

Serbest radikallerden en çok etkilenen bileşenler lipitlerdir. Özellikle hücre duvarında bulunan doymamış yağ asiti içeren kolesterol ve yağ molekülleri serbest radikal ile etkileşime girerek peroksidasyon ürünleri meydana getirirler.

Lipit peroksidasyonu bir zincir reaksiyonları halinde kendi kendine ilerler. Peroksidasyon sonucu hücre duvarında serbest radikallerin ve lipid peroksit radikallerinin oluşması reaktif oksijenlerin neden olduğu en önemli hasardır ve sağlığı olumsuz etkiler. Serbest radikallerin neden olduğu lipit oksidasyonu enzimatik olmayan yağ oksidasyonu olarak adlandırılır [56].

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin oksidasyonuyla malondialdehit (MDA) oluşur. MDA; lipit peroksidasyon seviyesinin indikatörü olarak kabul edilir [55].



Şekil 1.5. Lipid peroksidasyonunun temel reaksiyonları

1.3.1.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Proteinler amino asit dizisine bağılı olarak serbest radikallerden etkilenirler ancak lipitler kadar hassas değildirler. Özellikle doymamış bağ içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin ve sistein gibi amino asitleri içeren proteinler serbest radikallere karşı daha hassaslardır [57]. Serbest radikallerin proteinlere etkisi sonucunda sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller meydana gelmektedir. Yapısında fazlaca disülfid bağ bulunduran albumin gibi proteinler tersiyer yapıları bozularak fonksiyonel özelliklerini yitirirler [58].

1.3.1.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere ve DNA'ya Etkileri

Serbest radikallerden etkilenen hücre DNA'sı hücrede mutasyona ve ölüme sebebiyet verir. Ayrıca hidroksil radikali DNA ve RNA ile reaksiyona girerek hücre yapısında değişikliğe yol açar [59].

1.3.1.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine temel etkisi polisakkarit depolimerizasyonu ve özellikle monosakkarit otooksidasyonudur. Monosakkaritlerin serbest radikallerden etkilenmesi sonucu oluşan okzaaldehitler kanser ve yaşlanma üzerine etkiye sahiptirler. [60]

1.3.2. Antioksidan Bileşiklerin Özellikleri

Serbest radikallere ve normal oksijen metabolizmasının toksik etkilerine karşı vücudu koruma etkisine sahip sistemler antioksidan olarak adlandırılır. Antioksidanlar vücutta sentezlenmesinin yanı sıra beslenme yolu ile gıdalardan da vücuda temin edilebilmektedir. Vücudun kendi ürettiği endojen dışarıdan alınan antioksidan ise ekzojen antioksidan sistemleri olarak adlandırılır [54].

Endojen antioksidanlar enzim yapısında olup oksidatif hasarları gidermek için ortamdaki radikal ve reaktifleri etkisiz hale getirir [61]. Önemli antioksidan enzimleri içinde süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidazlar örnek olarak sayılabilir.

Tablo 1.2. Bazı antioksidanlar

Antioksidan Enzimler	Enzim Yapısında Olmayan Antioksidanlar
Süperoksit dismutaz	A vitamini (β -karoten)
Katalaz	C vitamini (askorbik asit)
Süperoksit redüktaz	E vitamini (tokoferol)
Peroksiredoksinler	Proteinler(transferrin, ferritin, albümin, bilirubin)
Peroksidazlar	Hormonlar (serotonin, melatonin)
Glutasyon redüktaz	Fenolik bileşikler (polifenoller, flavonoidler)
Glutasyon S-transferans	Lipoik asit, ürik asit, glutasyon

Dışarıdan alınabilecek antioksidanlar doğal ve yapay olarak iki grup altında toplanır. Askorbik asit, tokoferol ve beta-karoten, bilinen önemli doğal antioksidanlardandır. Doğal antioksidanlar daha çok yeşil sebzelerde, baklagillerde ve tohumlarda bulunur [54].

Yağda çözünen önemli bir antioksidan olan tokoferol hücre zarında ve lipoproteinlerde koruyucu bir role sahiptir. Tokoferoller serbest peroksit radikalleri ile tepkimeye girerek onların aktifliğini durdurur bu sayede lipid peroksidasyonunu engellemiş olur [62].

Askorbik asit serbest radikallerin hücre içinden uzaklaştırılmasını sağlayan bir antioksidandır. Askorbik asit, kolayca hidrojen atomu vererek dehidroaskorbik asite dönüşür böylece serbest radikali indirgemiş olur ve aktifliğini engeller. Askorbik asit ısıya karşı direnci düşük bir antioksidandır [63; 64; 65].

Polifenoller ve flavonoidler bitkilerin yaprak, dal, meyve ve çiçeklerinde çeşitli reaksiyonlar sonucu meydana gelen antioksidan etkiye sahip bileşenlerdir. Suda çözünme özelliğine sahiptirler. Flavonoidler insan bağışıklık sistemini güçlendirmekte kalp krizi riskini azaltmaktadır [66]. Polifenolik bileşikler ve flavonoidler, lipid peroksidasyonu gibi serbest radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırırlar, metal iyonları şelatlar ve oksidasyonu azaltarak antioksidan özellik gösterirler. Polifenollerin her molekülünde birden fazla fenol grubu bulunur. Antimikrobiyal ve antioksidan etkiye sahip bileşenlerdir. Kateşin, gallik asit, epikateşin, kuersetin, p-kumarik asit önemli fenolik bileşiklerdir [67].

Sentetik antioksidanlar; bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), tersiyerbütillhidrokinon (TBHQ), propil galat (PG) yapay antioksidanlardır ve gıda sanayinde kullanılırlar [68]. Sentetik antioksidanlar gıdaların oksidasyonu sonucu oluşan bozulmalar, koku oluşumu, tatların bozulması ve vitamin miktarındaki azalmalar gibi oluşan problemleri çözmede ve bunların raf ömürlerini uzatmak amacıyla tercih edilmektedirler. Ancak sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen olabileceğini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur [69].

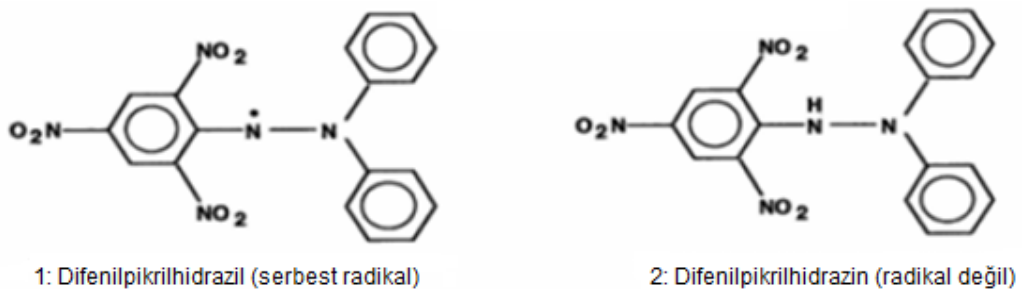
1.3.3. Antioksidan Aktivite Tayin Metotları

1.3.3.1. DPPH Radikali Süpürme

DPPH serbest radikal süpürme analizinde, ticari olarak elde edilebilen, kararlı bir organik nitrojen radikali olan DPPH bileşeni kullanılır ve antioksidanın DPPH serbest radikalini yakalama yeteneği analiz edilerek antioksidan aktivitenin belirlenmesi sağlanır [70; 71; 72]. Antioksidan-DPPH radikali arasındaki reaksiyon mekanizması aşağıda gösterilmiştir.



DPPH radikali normalde koyu mor renkte bir çözelti oluşturur, ortamda antioksidan bulunduğunda, bir proton alarak indirgenmiş moleküle dönüşmekte ve renksiz bir çözelti meydana getirmektedir (Şekil 1.6.).



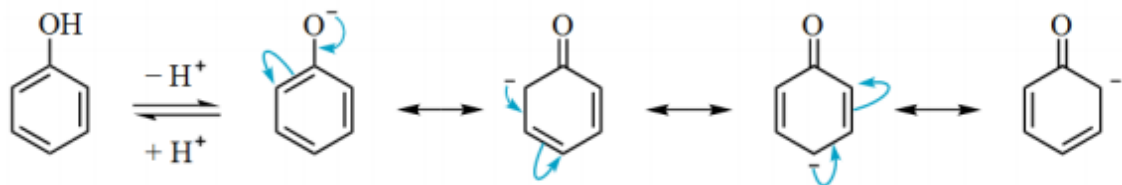
Şekil 1.6. DPPH'in moleküler yapısı

DPPH'in, antioksidan madde ile reaksiyonunun absorbandsının 515-517 nm'de ölçülmesi en yaygın kullanılan DPPH analiz yöntemlerindendir [53;70;73;]. Analiz genel olarak; DPPH'in belli konsantrasyonlarda metanol ya da etanolde çözündürülerek

hazırlanması, hazırlanan çözeltiden belirli miktarın alınıp örnek çözeltinin belirlenen konsantrasyonuyla karıştırılıp inkübe edilmesi ve ardından absorbansın okunması ilkesine dayanır. İnkübasyon süresi sonunda örneğin antioksidan kapasitesine bağlı olarak, indirgenme reaksiyonu gerçekleşir ve karışımın rengi açılır. DPPH[•] konsantrasyonunun yarısını inhibe eden antioksidan konsantrasyonu IC₅₀ olarak hesaplanır [70;72;73]. DPPH analizi basit ve hızlı olduğundan dolayı bitkiler ve gıdalardan elde edilen ekstraktlar ya da bileşiklerdeki serbest radikal süpürücü aktiviteyi belirlemek için sıklıkla tercih edilen yöntemdir.

1.3.3.2. Folin Ciocalteu (FC)Yöntemi İle Toplam Fenolik Madde

Toplam fenolik madde analizi için kullanılan FC metodu ürünlerdeki antioksidan özelliği sağlayan grupların hidroksil grupları hakkında fikir veren bir analizdir. FC yönteminde fenolik, polifenolik antioksidanlar kolorimetrik olarak belirlenir. Analiz edilen örneğin, FC'nin oksidasyonunu inhibe etmesi için gerekli miktarın belirlenmesi esasına dayalı bir yöntemdir. FC yöntemi fenolik bileşikler ve diğer indirgeyici antioksidanlardan molibden elektron transfer edilmesi temeline dayanmaktadır ve mavi renkli bir bileşik oluşur. Oluşan mavi renkli kompleksin absorbansı 750-765 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Analizin temel prensibi oksidasyon-redüksiyon kimyasal reaksiyonlarına dayandığından antioksidan kapasitesi ölçme yöntemleri arasında yer almıştır. Fenolik bileşikler bazik şartlar altında FC ile reaksiyona girerler bu sebeple analiz yapılırken sodyum karbonat ile pH'nın yaklaşık 10'a ayarlanması gerekmektedir. Analizde, fenolik protonların disosiasyonu ile fenolat anyonu oluşur (Şekil 2.7.). Oluşan fenolat anyonu da FC'yi indirger ve sonuçta mavi bileşen oluşur, bu bileşenin rengi fenolik maddenin yapısından bağımsızdır [53;70;72;73].



Şekil 1.7. Fenolat anyonu oluşumu

FC metodunda gallik asit genellikle fenol referans standardı olarak kullanılır. Sonuçlar gallik asit eşiti olarak (mg/g, mg/L) ifade edilir [53;70;72].

1.3.3.3. Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAC veya ABTS)

TEAC analizi 2,2'-azinobis (3-etil-bezotiazolin 6 sulfonat) (ABTS) radikal katyonunun antioksidanlar tarafından absorbansının engellenmesi ilkesine dayalı olarak gerçekleştirilen bir analizdir. TEAC'ın karakteristik dalga boyu 660, 734 ve 820 nm'dir [61]. ABTS radikali katyon formunda üretilir, temel spektrofotometrik olarak çeşitli maddelerin toplam antioksidan aktivitesini ölçmede kullanılan bir bileşendir. TEAC analizi renksiz sıvı potasyum persülfid ile ABTS'nin oksidasyonu sonucunda ABTS'deki renk üretimine dayanmakta olup hem lipofilik bileşenlere hem de hidrofilik bileşenler için kullanılabilir bir tayin yöntemidir. ABTS çözeltisi seyreltilir ve yaklaşık 10 dakika içinde absorbansı ölçülüp daha sonra farklı konsantrasyondaki örneklerin absorbansı ölçülür. Trolox, vitamin E'nin suda çözünen formu olup TEAC analizinde referans standart olarak kullanılır. Analiz geniş bir şekilde bitkilerin antioksidan özelliklerini tespit etmek amacıyla kullanılmaktadır [75].

1.3.3.4. Fe³⁺ İyonu İndirgeme Gücü (FRAP)

Düşük pH'da ferrik tripiridiltriazin kompleksi (Fe³⁺-TPTZ) antioksidanlarla etkileşime girerek ferröz kompleksine (Fe²⁺-TPTZ) indirgenir. Oluşan ferröz kompleksin 593 nm'de absorbansı ölçülür. Bu analizde elektron vermenin antioksidanların toplam indirgeme kapasitesiyle doğru orantılı olduğu varsayılır [76; 77].

1.4. Hücre Kültürü

1.4.1. Kanser

Kanser, hücrenin farklılaşarak kontrolsüz bir şekilde çoğalması sonucu gelişen, gelişimi karmaşık ve çoklu adımlar içeren ölümcül bir hastalık olup bir hücre grubunun kontrolsüz bir şekilde büyüüp anormal bir yapıya sahip olan, kan dolaşımı ve lenf sistemine katılıp diğer organlara yayılabilme özelliği gösterebilen doku kitlesi olarak tanımlanmıştır [78].

Normal işleyen organizmada hücreler kontrollü bir şekilde ihtiyaca göre bölünerek çoğalırlar. Hücreler bir taraftan çoğalırken diğer taraftan programlı ölüm ya da "apoptoz" denilen olay ile yok olurlar. DNA'da bulunan büyüme faktörlerinde meydana gelen bozulmalar hücrelerin anormal şekil ve hızda büyümesine sebep olarak 'tümör' adı verilen kitlenin oluşumuna sebebiyet verir. Tümörler normal dokuları sıkıştırabilirler, içine sızabilir ve tahrip edebilirler [79; 80].

Kanser köken aldığı dokuya göre adlandırılır. Kanser yaklaşık %85'i epitelyal hücrelerde görünür ve bu durum karsinom olarak adlandırılır. Kemik, kas ya da konnektif doku gibi mezenşimal dokularda gözlenen kanser sarkomalar; kemik iliği, lenfatik sistem ve periferik kan boyunca meydana gelen kanser ise lösemi ve lenfoma gibi hematopoetik ve lenfoid malignansiler olarak adlandırılır [81].

Gıdalarda bulunan bazı bileşiklerin hücre savunması ve hücre ölümü mekanizmalarını düzenlediğini ve karsinogenez sürecini engellediğini gösteren *in vitro* ve *in vivo* bir çok çalışma bulunmaktadır [82; 83]. Kanser oluşma riskini azaltacağı düşünülen ya da tahmin edilen gıdalara yönelik çalışmalar giderek artış göstermektedir. Meyve sebzelerin çok tüketilmesinin kansere yakalanmayı azalttığını gösteren ve birbirini doğrulayan bir çok çalışma mevcuttur [84; 85].

1.4.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü, bir grup hücrenin organ veya dokudan alınıp, uygun fizikokimyasal ve biyolojik koşulların sağlanması ile *in vitro* koşullarda geliştirilmesi tekniğidir. Hücre hatları bir organ veya dokuya ait özel hücrelerin güçlü bir virus antijeninin promoteri ile immortalizasyon işlemlerinden geçtikten sonra oluşan ve sürekli bölünme yeteneği olan ölümsüz hücreler olarak nitelendirilir [86].

Hücre hatları süspansiyon ve monolayer kültürler olarak iki başlıkta gruplandırılır. Kan ve kemik iliği gibi yumuşak doku tümörleri daha çok süspansiyon kültürler olarak adlandırılırlar. Süspansiyon tipi hücreler, içinde bulundukları kabın yüzeyine yapışma özelliği göstermezler. Fibroblast, epitel, sinir doku gibi tümörlerin hücre hatları monolayer kültürler olarak adlandırılır ve içinde bulundukları kabın yüzeyine yapışma özelliği gösterirler.

Hücre kültürleri kökenlerine göre farklı zamanlarda bölünür. Bu sebeple her biri için farklı besiyeri, beslenme, üreme ve yaşam ortamı uygun şekilde hazırlanmalıdır [86].

1.4.3. Apoptozis

Apoptozis eski Yunanca'dan apo (ayrı) ve ptosis (düşmek) kelimelerinden oluşan gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin bir gereksinimi olarak ihtiyaç duyulmayan, fonksiyonları bozulmuş hücrelerin bulunduğu ortama zarar vermeden ölmesidir [87]. Apoptozis hücre içi dengenin sağlanması ve organ büyüklüklerinin korunması açısından önemli bir olaydır [88]. Yapım (mitozis) ile yıkım (apoptozis) arasında kontrollü bir denge olması gerekmektedir. Kurulması gereken bu dengenin apoptozisin lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın oluşmasına sebebiyet verebilir.

1.4.3.1. Apoptotik Hücre Ölümü Aşamaları

Apoptozis hücre içinden veya dışından gelen sinyallerle başlar ve birbirini takip eden bir olaylar zinciri olarak peş peşe meydana gelir. Apoptoz aşamaları; I) Apoptozun başlatılması, II) Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu, III) Hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması ve son olarak IV) Fagositoz olarak özetlenebilir [89].

1.4.4. Hücre Canlılığı (Viabilite) ve Ölümü (Sitotoksisite) Belirlemek İçin Kullanılan Analiz Yöntemleri

Sitotoksisite, kullanılan kimyasal ve biyolojik maddelerin hücre üzerinde meydana getirdiği toksik etkinin değerlendirilmesidir. *In vitro* hücre kültürü sistemlerinde, sitotoksik etkisi araştırılan maddenin toksik olup olmadığını anlamak için hücresel "tutunmaya" engel olup olmadığı, hücre morfolojisini belirgin derecede bozup bozmadığı, hücre büyüme hızını azaltması ya da hücre üzerine olan ölümcül etkisi değerlendirilir [89]. Bu değerlendirmelerin yapılabilmesi amacıyla çeşitli testler geliştirilmiştir. Metabolizma ve ATP'ye bağlı olarak gerçekleştirilen viabilite deneylerinde, hücrelerin bu etkinlikleri, canlı hücre sayısı ile orantılıdır ve madde uygulanmasından sonra kontrol grubuna göre etkinlikte azalma sitotoksisiteyi gösterir.

Sitotoksisite ile hücre canlılığı arasında ters bir orantı mevcuttur; bu ters orantıyı etkileyen durumlar bulunabilir. Bunların arasında kimyasal madde ile işlem süresi önem arz etmektedir. Kısa süreli (dört saat veya daha az) kimyasal madde uygulamalarında madde ile temas metabolizma göstergelerini (marker) ters yönde etkileyebileceği gibi ölçülebilir membran bütünlüğü parametrelerini değiştirmeden ATP içeriğini etkileyebilmektedir. Uzun süreli (24 saat ve daha fazlası) uygulamalarda ise sitotoksisite göstergelerinde azalma oluşabilmektedir. Ayrıca uygulanan kimyasalın yapısı da önemlidir [90]

Hücre canlılığının ve çoğalımının (proliferasyonunun) araştırılabilmesi için kuyucuklu platelerde üretilen hücre kültürlerinin, analizlerin aynı anda ve hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan modern yöntemler geliştirilmiştir. Kolorimetrik olarak gerçekleştirilen bu yöntemlerde plate, mikropate okuyucu ya da ELISA plate okuyucusu ile doğrudan ölçümler yapılabilmektedir. Sitotoksisite çalışmaları için genellikle hücre metabolizmasında oluşan değişikliklerin tespit edildiği testler kullanılır. Metabolizma testlerinde 96-kuyucuklu mikropatelere yerleştirilmiş hücrelerin canlılıkları mikropate okuyuculu spektrofotometrelerde alınan absorbansa göre tespit edilir. Genel olarak bakıldığında bu yöntemler arasında metabolizma redüktaz etkinliğine dayanan (azalan metabolik etkinliği değerlendiren), biyoluminesant ATP değerlendirilmesinin yapıldığı testler, plazma membran hasarına bağlı çeşitli enzimlerin salınmasına, DNA fragmentasyonuna ya da işaretli izotopların salınmasına dayanan sitotoksisite deneyleri bulunmaktadır [89;91].

Günümüzde herhangi bir maddenin organ ve dokular üzerine kanserojen, mutajen, teratojen olma olasılığını araştırmak ve anti-kanser ilaç etkinliğini belirleyebilmek amacıyla hücre kültürü testleri hayvan testlerine tercih edilmekte olup sonuçların daha gerçekçi ve spesifik olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Hayvan kullanılan toksisite testleri zaman alıcı, pahalı ve çok sayıda hayvanın kullanılmasını gerektirmektedir. Bu sebeplerle, hücre kültürü yöntemi yani *in vitro* yöntemler, deneyler için gerekli hayvan sayısını azaltmakta dolayısıyla giderleri azaltan bir metot olarak tercih edilmektedir. Yeni anti-kanser ilaç araştırmalarında kanser hücrelerine karşı etkinliği belirlemede en çok kullanılan yöntem sitotoksisite testleridir. *In vitro* sitotoksisite testlerinde hızlı ve rasyonel sonuçlar alınabilmektedir [92].

Sitotoksik etkisinin belirlenmesinde kullanılan testler; tekrarlanabilir olmalı, test edilen konsantrasyonlar için doz-cevap eğrisini vermeli, hücre sayısı ve test cevabı arasında doğrusal ilişki olmalıdır. *In vitro* sitotoksikite testlerinin avantajları arasında; diğer metabolik olaylardan farklı olarak hücre metabolizmasındaki spesifik bir fonksiyonun değerlendirilebilmesi, çok sayıda örneğin kısa zamanda ve ekonomik olarak incelenebilmesi, kantitatif sonuçlara ulaşabilme ve standardize edilebilme sayılabilir. Ancak bu testlerde, her test için bir tür hücre kullanılması, kültür hücrelerinin konak hücrelerinden farklı olması gerekliliği, kültür ortamında doku koruyucu mekanizmaların olmaması gerekliliği gibi dezavantajlar da mevcuttur [93].

1.4.4.1. Laktat Dehidrojenaz (LDH)

Tüm hücrelerde var olan ve stabil bir sitoplazmik enzim olan LDH; hücre lizisi veya membran hasarı meydana geldiğinde hızlıca hücre kültürü süpernatantına salınır. Bu test, bir test bileşiği ile inkübasyon sonrası, plazma membranındaki değişimleri belirleyen hızlı ve basit bir metottur. LDH, nikotinamid adenine dinükleotidin (NADH) NAD^+ 'ye oksidasyonu ile piruvatı laktata indirger. NADH tüketimi spektrofotometrede 340 nm'de ölçülür (2-1). LDH testi ile maddenin IC_{50} (%50 inhibisyon sağlayan konsantrasyon), membran bütünlüğü ve hücre canlılığı üzerine etkisi hakkında bilgi edinmek mümkündür [94].

1.4.4.2. Süksinat Dehidrojenaz

Mitokondriyal süksinat dehidrojenaz enzim aktivitesinin ölçüldüğü testte, özel bir çözücü ile çözündürülen sarı renkli ana bileşen MTT (3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür) canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrojenaz enzimleri tarafından parçalanarak suda çözünmeyen mor-mavi renkli formazan kristalleri oluşur. Bu kristaller asitlendirilmiş isopropanol içinde çözünürler. Çözünme ile elde edilen mor solüsyonun absorbansı ölçülür. Hücre sayısındaki artma veya azalma, hücre sayısı ile bağlantılı olarak oluşan formazan miktarıyla belli olur ve spektrofotometrik ölçüm sonucu elde edilen değer test edilen materyalin sitoksisitesini belirlemiş olur [95].

1.4.5. HepG2 İnsan Karaciğer Kanseri Hücreleri

HepG2 karaciğer kanseri hücresi, nude mice'da (timusu alınmış, immunitesi suprese edilmiş farelerde) tumor oluşturmeyen ancak yarı sıvı besiyerinde koloni oluşturan yapısal olarak epithelyal olan hücrelerdir. HepG2 albumin, transferin, fibrinojen, gibi önemli plazma proteinleri sentezleme özelliğindedir. Üzerinde insulin büyüme faktör reseptörü bulundurmaktadır [96]. HepG2 çeşitli türlere ait ölümsüz hücre hatları çalışma ve kültürü bakımından diğer hücre hatlarına göre daha kolay olması açısından tercih edilmekte ve *in vitro* modellemelerde yaygın olarak çalışılmaktadır [97].

Oksidatif zarar kanser başlangıç evresini oluşturabilir ve hücrelerin düzensiz aralıklarla çoğalmasını tetikleyebilir. Kanser hücrelerinin çoğalması kanser tümörünün ilerlemesine dolayısıyla hastalığın ilerlemesine sebebiyet verir [83].

Kanseri önleyen çeşitli hastalıkların iyileşmesinde etkili ve sağlığı geliştirici etkisi olan nötrosotik peptilerin ve amino asitlerin temel kaynağı gıda proteinleri olarak düşünülmektedir [98;99].

Pirinç kepeğinden ekstrakte edilen proteinlerle yapılan çalışmada molekül ağırlığı <5kDa olan peptilerin en fazla antikanserojen etkiye sahip olduğu kaydedilmiştir. Safılaştırılmış peptitlerin (600–700 µg/mL) kolon kanseri hücrelerinin (Caco-2, HCT-116) %84'ünü, göğüs kanseri hücrelerinin (MCF-7, MDA-MB-231) %80'ini ve karaciğer kanser hücrelerinin %84'ünü inhibe ettiği tespit edilmiştir. Kütle spektroskopisi analizinde tespit edilen moleküler ağırlığı 685,378 Da olan Glu-Gln-Arg-Pro-Arg peptit dizisinin kolon, göğüs, akciğer ve karaciğer kanseri hücrelerini inhibe edici olduğu kaydedilmiştir [100].

Fermente kırmızı pirinç ham ekstraktlarının ve ekstrakte edilen monokolin K'nın HepG2 hücrelerinde morfolojik yapı değişikliğine yol açtığı ve geri dönüşümsüz bir büyüme eğrisi gösterdiği belirlenmiştir [101].

Mısır peptitlerinin HepG2 üzerine doz ve süreye bağlı olarak önemli derecede inhibe edici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [102].

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Çalışmada kullanılan pirinç kepeği Çeltiksan Gıda ve Tarım Ürünleri Ltd. (İpsala, Edirne) firmasından temin edilmiştir. Kullanılan kimyasal maddeler ve standartlar yurt dışından aracı firmalar vasıtasıyla temin edilmiştir.

Sodyum fosfat dibazik (Na_2HPO_4) (Merck- 10028-24-7, Germany), sodyum fosfat monobazik (NaH_2PO_4) (Carlo Erba-7558-80-7, Italy), demir klorür (FeCl_3) (Carlo Erba-3260,Italy), Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco -10270, USA) ve Trypan blue boya (Gibco, USA), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-D913-2, Germany), 4,4'-(3-(2-pyridinyl)-1,2,4-triazine-5,6-diyl)bis-, disodium salt (ferrozin) (Sigma-160601, Germany), Dulbecco's Modified Eagle's Medium Besiyeri (DMEM) (Sigma- D642, Germany) ve 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate) (ABTS) (Sigma-A1888-1, Germany). Çalışmada kullanılan HepG2 hücre hattı ATCC'den satın alınmış olup, Erciyes Üniversitesi Gen-Kök Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir

2.2. Yöntem

2.2.1. Nem, Protein, Yağ Tayini

Nem miktarı gravimetrik yöntemle örneklerin darası alınmış tartım kaplarına yaklaşık 10 g tartılarak 105°C'de 4 saat etüvde bekletilmesi suretiyle belirlenmiştir. Protein miktarı Dumas yakma yöntemi prensibine göre çalışan protein/nitrojen analizörü (Leco, FP-528, USA) kullanılarak belirlenmiştir [102]. Yağ miktarı Soxhalet yöntemi kullanılarak, yaklaşık 10g örneğin hekzan ile 4 saat muamele edilmesi sonucunda belirlenmiştir [103].

2.2.2. Örnek ve Ekstrakt Hazırlama

2.2.2.1. Yağ Uzaklaştırma

Pirinç kepeğinde oksidasyonu önlemek amacıyla Wang et. al. (1990) tarafından önerilen yöntem kullanılarak yağ uzaklaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler ağırlık/hacim esasına göre 1/5 oranında hekzan ile 220 rpm ve 45°C’de 4 saat manyetik karıştırıcı (KS 4000i, IKA, Almanya) ile karıştırılıp 4200 rpm de 10 dakika santrifüj (NF 1200R, Nüve, Türkiye) edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernanant uzaklaştırılıp bir gece çeker ocakta bekletilen örnekler öğütülerek (Werke M20, IKA, Almanya) 250 mikronluk elekten geçirildikten sonra 4°C’de muhafaza edilmiştir [104].



Şekil 2.1. Yağ Alma Aşaması



Şekil 2.2. Yağı alınıp kurutulmuş örneklerin görüntüsü

2.2.2.2. Optimizasyon

Optimizasyon aşamasında, Design Expert programı (DesignExpert software, Trial Version 7, Stat-Ease Inc., Minneapolis,MN) Cevap yüzey yöntemlerinden merkezi kompozit dizayn kullanılarak (CCD) hazırlanan Tablo 3.1’de belirtilen süre, güç ve katı/sıvı oranlarında ultrason uygulaması yapılmıştır. Çalışmada kullanılan alt ve üst sınırlar $-\alpha$ ($=-1.68$), -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$ ($=1.68$) ön denemeler ve literatür çalışması sonucunda belirlenmiştir. Optimizasyonda birbirinin tekrarı olan 5 nokta ile birlikte toplam 20 noktada farklı güç, süre ve oran parametrelerinde uygulama yapılmıştır(Tablo 3.2). Aşağıdaki ikinci dereceden polinom denklem deneysel verilerin değerlendirilmesi için kullanılmıştır.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2$$

Burada Y cevap değişkeni, X_1 : güç, X_2 : katı/sıvı oranı ve X_3 : süre bağımsız değişkenini göstermektedir. B ise model sabitlerini göstermektedir.

Tablo 2.1. Cevap yüzey yönteminde belirlenen bağımsız değişken verileri

Bağımsız Değişkenler	Bağımsız Değişken Parametreleri		
	-1,000	0,000	+1,000
Kullanılan Katı/sıvı Oranı	0,10	0,30	0,50
Ultrason Gücü	20,00	60,00	10,00
Uygulama Süresi	10,00	20,00	30,00

Tablo 2.2. Optimizasyon aşamasında uygulanan katı/sıvı oranı, sıcaklık ve güç parametreleri.

Deneme noktası	Blok	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Tepki 1
		A:Katı/ Sıvı Oranı	B:Güç (amplitude)	C:Süre (dakika)	A:Katı/ Sıvı Oranı	B:Güç (amplitude%)	C:Süre (dakika)	Protein Verimi (%)
1	1	-1,000	1.000	1.000	0.10	100.00	30.00	
2	1	-1,000	0.000	0.000	0.10	60.00	20.00	
3	1	0,000	0,000	1,000	0,30	60,00	30,00	
4	1	1,000	-1,000	-1,000	0,50	20,00	10,00	
5	1	1,000	1,000	-1,000	0,50	100,00	10,00	
6	1	0,000	0,000	0,000	0,30	60,00	20,00	
7	1	-1,000	-1,000	-1,000	0,10	20,00	10,00	
8	1	-1,000	-1,000	1,000	0,10	20,00	30,00	
9	1	0,000	0,000	0,000	0,30	60,00	20,00	
10	1	0,000	0,000	0,000	0,30	60,00	20,00	
11	1	-1,000	1,000	-1,000	0,10	100,00	10,00	
12	1	0,000	0,000	0,000	0,30	60,00	20,00	
13	2	0,000	-1,000	0,000	0,30	20,00	20,00	
14	2	1,000	0,000	0,000	0,50	60,00	20,00	
15	2	0,000	1,000	0,000	0,30	100,00	20,00	
16	2	0,000	0,000	-1,000	0,30	60,00	10,00	
17	2	1,000	1,000	1,000	0,50	100,00	30,00	
18	2	1,000	-1,000	1,000	0,50	20,00	30,00	
19	2	0,000	0,000	0,000	0,30	60,00	20,00	
20	2	0,000	0,000	0,000	0,30	60,00	20,00	

2.2.2.3. Bradford Yöntemi İle Protein Miktarının Belirlenmesi

Bradford yöntemi esas alınarak Chittapalo ve Noomhorm (2009)'a göre mikrokuyucu (Multiscan FC, Thermo, İstanbul) cihazında gerçekleştirilmiştir. 50 mL Coomassie Blue, 50 mL %9'luk etanol ve 50 mL %85'lik fosforik asit ile hazırlanan boya çözeltisi 10 kat seyreltikten sonra Watman No:1 süzgeç kâğıdından süzölmüştür. Mikrokuyucu yuvalarına örnek ve boya karışımı (40 µL örnek ve 200 µL boya) eklenmiştir. 1 dakika karıştırma, 10 dakika beklemenin ardından 620 nm'de absorbans kaydedilmiştir. Örnekler 5 paralelli hazırlanmıştır. Standart grafiği oluşturmak için; sığır serum albumini (BSA) çözeltisi kullanılmıştır. BSA stok çözeltisinden (1 mg/mL) farklı konsantrasyonlarda (0,2-0,5-0,6-0,8) hazırlanıp 1 dakika karıştırma, 10 dakika bekleme sonucunda 620 nm'de, okuma yapılmıştır. Elde edilen verilerle doğrusal bir grafik

oluşturulmuş ve örneklerin protein miktarları oluşturulan bu grafik denklemiyle belirlenmiştir [105]. Protein miktarını belirlemek için kullanılan standart grafik denklemi; $y=0,7825x+0,1477$ şeklindedir.

2.2.3. Ultrason Uygulaması

Ultrason cihazı (UP400S, Hielscher, Almanya), 400 W güç, 24 kHz frekans ve 120 μm genlikte titanyum prob (H22D, 22 mm) kullanılarak ultrason uygulaması gerçekleştirilmiştir. Kullanılan probun maksimum enerji yoğunluğu 85 W/cm^2 ve genliği 100 μm 'dir.

Örnekler Tablo 3. 2' de belirtilen oranlara uygun miktarlarda 100 mL saf su ile 250 mL'lik beherler içerisinde hazırlanmıştır. Sıcaklık artışını kontrol edebilmek için tuzlu buz hazırlanmış ve örnek cihaza yerleştirilmeden önce 250 mL'lik beher 500 mL'lik beher içerisine yerleştirilip etrafına buz eklendikten sonra cihaz çalıştırılmıştır. Prob numunelerin içerisine 4 cm derinliğe kadar daldırılmıştır. Ultrason cihazından alınan örnekler 4200 rpm'de 10 dakika santrifüj (NF 1200 R, Nüve, Türkiye) edildikten sonra kaba filtre kâğıdı ile süzülüp uygulanacak olan analizler için -18°C de depolanmıştır. Optimizasyon sonucunda elde edilen oran ve süre sabit tutularak farklı güçlerde ultrason uygulanmış örneklerin antioksidan ve antiproliferatif özellikleri belirlenmiştir.



Şekil 2.3. Ultrason uygulama aşaması

Tablo 2.3. Ultrason uygulama parametreleri

Örnek No	Katı/sıvı oranı	Güç (amplitude%)	Süre (dakika)
1	0,43	20,00	30
2	0,43	48,25	30
3	0,43	65,91	30
4	0,43	100,00	30
Kontrol	0,43	0	30

2.2.4. Protein İzolatı Hazırlama

Pirinç kepeği protein izolatları alkali ekstraksiyon metoduna [106; 107]. göre hazırlanmıştır. Tablo 3.32’de verilen noktalarda ultrason uygulanmış olan pirinç kepeği ekstraktları bir beher içerisine alınıp manyetik karıştırıcı (Ret, IKA, Almanya) üzerine yerleştirilmiştir. Karıştırma işlemi devam ederken örnek pH’sı 10’a 0,5 M NaOH kullanılarak ayarlanmıştır. pH’nın 10’a ayarlanmasından itibaren örnek 2 saat manyetik karıştırıcıda bekletilmiştir. Ardından karışım 4100 rpm’de 15 dakika santrifüj (NF 1200 R, Nüve, Türkiye) edilmiş, elde edilen süzöntü 2 M HCl ile pH 4,5’e ayarlanmış ve 4°C’de bir saat bekletilmiştir. Ardından 4100 rpm’de tekrar 15 dakika santrifüj edilmiş ve çöken kısım alınıp tüpteki örneğin üzerine yaklaşık 5 katı kadar saf su eklendikten sonra 4100 rpm’de 10 dakika santrifüjleyerek birinci yıkama, çöken kısmın 2 katı olacak şekilde saf su eklenip 4100 rpm’de 10 dakika santrifüjleyerek 2. yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak örnekler liyofilize edilerek (Labconco, FreeZone 2.5, ABD) analize kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

2.2.5. Biyoaktif Özellikler

2.2.5.1. Toplam Fenolik Madde

Analiz Sağdıç vd. (2011) tarafından öngörülen metoda göre bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Pirinç kepeği protein izolatları ön denemelerde belirlenen oranlarda seyreltilmiştir. Daha sonra örnek (400 µL) üzerine Folin-Ciocalteu reaktifi (2 mL) ve sodyum karbonat (1,6 mL, %7’lik) çözeltisinden eklenmiştir. Çözelti oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında örneklerin absorbansı spektrofotometrede (UV1700 Pharmaspec, Shimadzu, Japonya) 765 nm’de

belirlenmiştir. Hesaplama da kullanılacak gallik asit standardı bir seri standart çözelti şeklinde (0-1 mg/mL) hazırlanmış ve yukarıda belirtilen prosedür uygulanmıştır. Oluşturulan gallik asit kurvesi kullanılmış ve toplam fenolik madde miktarı sonuçları mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g kuru ekstrakt cinsinden verilmiştir [108]. Fenolik bileşen miktarını hesaplamak için kullanılan standart grafik denklemi; $y=0,8689x+0,0024$ şeklindedir.

2.2.5.2. Toplam Antioksidan Aktivite

Analizde Miller ve Rice-Evans (1997) ile Arts ve diğ. (2001) tarafından öngörülen metotta bazı değişiklikler yapılarak kullanılmıştır. Potasyum persulfat çözeltisi (5 mL, 2,25 mM) 100 mL 7 mM'lık ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) çözeltisine eklenmiştir. Hazırlanan bu çözelti 12-16 saat karanlıkta bekletildikten sonra kullanılmıştır. Analizde radikal çözeltisinin ve örneklerinin seyreltilmesi amacıyla fosfat tamponu (0,1 M) hazırlanmıştır. Tampon hazırlanırken NaCl (8,77 g) ilave edildikten sonra çözelti 1 L'ye tamamlanmış ve pH 7'e ayarlanmıştır. Pirinç kepeği protein izolatları tartılıp örnekler saf su ile 10 kat seyreltilmiş ve 4100 rpm'de santrifüj (NF 1200 R, Nüve, Türkiye) edildikten sonra kullanılmıştır. Absorbans değerleri 734 nm'de spektrofotometrede (UV1700 Pharmaspec, Shimadzu, Japonya) okunmuştur. Hazırlanan ABTS radikali absorbansı $0,700 \pm 0,002$ olacak şekilde fosfat tamponu ile seyreltilmiştir. İlk olarak ABTS reaktifinin absorbansı okunup kaydedilmiş daha sonra örnekten 40 µL alınıp üzerine 2 mL seyreltik ABTS radikalinden eklenmiş ve 6 dakika karanlıkta inkübe edilmiş ve 6. dakika absorbans kaydedilmiştir [109; 110].

Absorbans değerine göre başlangıç değerindeki azalma aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\%inhibisyon = \frac{[(Başlangıç\ absorbans\ değeri - örnekle\ okunan\ absorbans\ değeri)]}{Başlangıç\ absorbans\ değeri} \times 100$$

Kalibrasyon eğrisi çizilirken Trolox stok çözeltisi (2,5 mM) hazırlanmış, çözeltiden 2, 4, 6 ve 8 mL alınıp 10 mL hacme tamamlanarak 2,48, 4,96, 7,44 ve 9,52 µg Troloks içeren standartlar oluşturulmuştur. Bu standartlardan 10 µL alınıp üzerine 2 mL ABTS çözeltisi eklenmiş ve 6. dakikada absorbans okunarak % hesaplama yapılmıştır.

Hesaplanan %inhibisyon ile μg Trolox'a karşılık standart eğrisi oluşturulmuştur. Sonuçlar trolox eşdeğeri antioksidan kapasitesi olarak belirtilmiştir [111].

2.2.5.3. DPPH Radikali Süpürücü Aktivite

Analizde Sanchez-Moreno ve diğ. (1998) tarafından verilen metot bazı değişiklikler yapılarak kullanılmıştır. DPPH reaktifi (0,1 mM) metanol kullanılarak hazırlanmıştır. Ekstraktlardan farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanıp bu çözeltilerden 100 μL alınıp, DPPH çözeltisinden 3900 μL ilave edilmiş, vorteks yardımıyla karıştırıldıktan sonra karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon sağlanmıştır. Bekletme süresinin ardından absorban değerleri 514 nm'de spektrofotometrede (UV1700 Pharmaspec, Shimadzu, Japonya) okunmuştur. DPPH radikali süpürücü aktivite aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır [112].

$$İ (\%) = 100 \times [(AK - AÖ) / AK]$$

İ= örnek tarafından inhibe edilen DPPH

AÖ= örnek absorbanı

AK= kontrol absorbanı

Farklı üç konsantrasyondaki inhibisyonlardan yararlanılarak DPPH'in %50'sinin inhibisyonu (IC_{50}) için gerekli ekstrakt miktarı grafik yöntemiyle belirlenmiştir. Sonuçlar hem IC_{50} cinsinden hem % inhibisyon olarak verilmiştir.

2.2.5.4. Metal Şelatlama Aktivitesi

Analizde Dinis ve diğ. (1994) tarafından öngörülen metot kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (2, 0,8 ve 0,4 mg/mL) protein ekstraktları (400 μL) üzerine FeCl_2 çözeltisi (2mM) eklenmiş, 30 dakika oda koşullarında inkübasyondan sonra ferrozin çözeltisi (200 μL , 5 mM) eklenerek vortekslenmiş 10 dakika sonra absorban 562nm'de spektrofotometrede (UV1700 Pharmaspec, Shimadzu, Japonya) okunmuştur. Kontrol olarak 1 mL saf su kullanılmıştır [113]. Örneklerin % inhibisyon değerleri, aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$\text{Şelatlama Aktivitesi (\%)} = [(A\ddot{O}-AK)/A\ddot{O}] \times 100$$

A $\ddot{O}$ = örnek absorbansı

AK= kontrol absorbansı

2.2.6. Antiproliferatif Aktivite

2.2.6.1 HepG2 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

Çalışmada %10 fetal bovin serum (FBS), %1 L-glutamin, %1 penisilin- streptomisin içeren DMEM besiyeri kullanılmıştır. DMEM besiyeri ile üretilen kanser hücre hattı HepG2, 37°C’de %95 nem ve %5 CO₂’li etüvde (EC 160, Nüve, Türkiye) çoğaltılmıştır.

2.2.6.2. HepG2 Hücrelerinin Dondurulması

1) Flasklerde bulunan yeterli yoğunluğa ulaşmış hücreler tripsinizasyon işlemi ile yapışmış oldukları yüzeyden kaldırılmıştır. Bu amaçla ortama 3mL tripsin-EDTA eklenmiş ve 5 dakika inkübatörde bekletilmiştir.

2) Falkon tüplere alınan hücrelerin üzerine besiyeri ilave edilerek 1200 rpm’de 5 dakika santrifüj (NF 1200 R, Nüve, Türkiye) edilmiştir. Hücrelerin konulacağı 1,5 mL’lik cryo tüpler hazırlanmış ve buz içerisine batırılmıştır.

3) FBS/DMSO 9/1 oranında karıştırılarak hazırlanmıştır.

4) Santrifüj sonrasında üst kısımdaki süpernatant atılmış ve cryo tüplerle birlikte buz içerisine alınmıştır. Dip kısmında hücrelerin bulunduğu falkon tüp içerisine 750 µL FBS/DMSO konularak resüspanse edilmiştir.

Karışım cryo tüplere aktararak, -86°C’ye kaldırılmıştır.

2.2.6.3. Dondurulmuş HepG2 Hücrelerinin Çözülmesi

1) -86°C’ye dondurulup muhafaza edilmiş olan hücreler 37°C’lik ortama alınmıştır.

2) DMSO'nun hücre canlılığı üzerindeki negatif etkisini azaltmak amacıyla, cryo tüp içerisine hızlı bir şekilde besiyeri eklenerek, çözülen hücreler pastör pipeti yardımıyla falkon tüp içerisine alınmıştır.

3) Falkon tüpe yaklaşık 10 mL besiyeri ilave edilerek, hücreler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

4) Santrifüj işlemi sonrası, süpernatant atılarak, dipte kalan hücrelerin üzerine tekrar besiyeri ilave edilerek 2. kez 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

5) Santrifüj sonrası, supernatant atılarak, hücrelerin üzerine 8 mL besi yeri ilave edilmiş ve 75 cm²'lik flasklara aktarılmıştır.

6) Flasklar, 37°C'de %95 nem ve %5 CO₂'li etüve kaldırılmıştır.

Flasklar belirli zaman aralıklarında kontrol edilip, çoğalmalarını sağlamak amacıyla kullanılan eski besiyerleri dökülerek, ortamları değiştirilmiş ve flask yüzeyini kaplayan hücrelerin devamlılığını sağlamak amacıyla pasaj yapılmıştır.

2.2.6.4. Hücrelerinin Pasajlanması

1) Etüvden çıkarılan hücrelerin içerisinde bulunduğu besiyeri alınıp 20 mL kadar PBS çözeltisi eklenmiş ve hücreler yıkandıktan sonra PBS ortamdan uzaklaştırılmıştır.

2) HepG2 hücreleri monolayer hücreler oldukları için tripsinizasyon işlemi uygulanmıştır. Bunun için ortama 3 mL tripsin-EDTA eklenmiş ve 5 dakika inkübatörde bekletilmiştir.

3) Hücrelerin üzerine 20 mL besiyeri eklenip 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek hücrelerin dibe çökmesi sağlanmıştır.

4) Üst kısımdaki süpernatant atılarak, hücrelerin üzerine tekrar 2 mL besiyeri eklenip homojen bir şekilde karışım sağlamak için 20-25 defa pipetaj yapılmıştır. Pipetaj sonrası sayım yapılarak 6 kuyucuklu plate içine ne kadar hücre ekleneceğini hesaplamak için tripan mavisi boya ile sayım yapılmıştır. Tripsinizasyon işleminden sonra, hareketli hücreler üzerine 2mL besiyeri eklenip iyi bir pipetaj yapıldıktan sonra 10 µL hücreden alınıp ve üzerine 10 µL tripan mavisi boyası eklenip Neubauer lamında, inverted ışık mikroskobu (CKX41, Olympos, USA) ile hücre sayımı yapılmıştır(Louis ve Siegel, 2011). Hücre konsantrasyonu(c)=Hücre sayısı(n)x10⁴ formülüyle

belirlenmiştir. 1 kuyucukta 500.000 hücre olacak şekilde yoğun ortamdan belirlenen oranda hücre alınıp flasklara ayrı ayrı paylaştırılmış, flastaki ortamlar 5 mL'ye besiyeri ile tamamlanmıştır.

5) Flasklar 37°C'de %95 nem ve %5 CO₂'li etüve kaldırılmıştır.

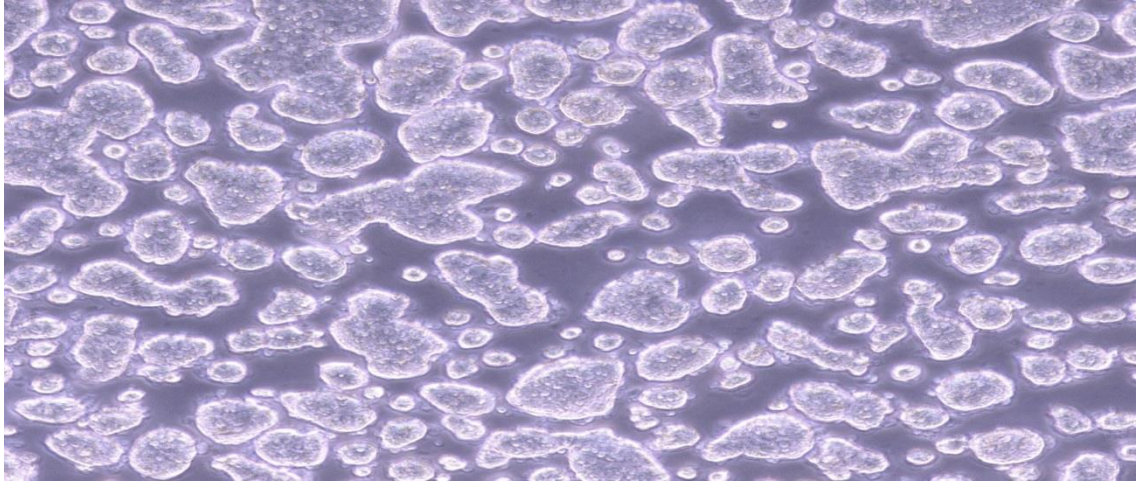
2.2.6.5. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

2.2.6.5.1. Örnek Hazırlama

Pirinç kepeği protein izolatları her bir örnek için 1 mL besiyerinde 10 mg olacak şekilde hazırlanıp pH 9 olacak şekilde hazırlanan tripsin tamponu içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra steril kabin içerisinde 0.20 mikronluk filtreden geçirilmiş ve steril hale getirilmiştir. Kullanılacak izolat miktarını belirlemek için ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Örnek oranını belirlemek için 1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/1000 ve 1/2000 w/v, örnek/tampon oranları uygulaması yapılmıştır. Yapılan ön deneme sonucunda uygun oranlar 1/10, 1/25 ve 1/50 olarak belirlenmiştir.

2.2.6.5.2. Mikroskopik İnceleme

Hücre canlılığının belirlenmesinde, HepG2 kanser hücrelerine Louis ve Siegel (2011) tarafından öngörülen manuel sayımı esas alan tripan mavisi boya testi uygulanmıştır. Canlı hücreler tripan mavisi boyayı metabolize ederek dışarı atması nedeniyle beyaz renkte, ölü hücreler ise tripan mavisi boyayı metabolize edememeleri nedeniyle mavi renkte görülmüştür. Kanser hücrelerini kaldırmak için 500 µL tripsin eklenip yaklaşık 5 dakika beklenmiştir. Tripsinizasyon işleminden sonra, hareketli hücreler üzerine 2mL besiyeri eklenip iyi bir pipetaj yapıldıktan sonra 10 µL hücreden alınıp ve üzerine 10 µL tripan mavisi boyası eklenip Neubauer lamında, inverted ışık mikroskobu (CKX41, Olympus, USA) ile hücre sayımı yapılmıştır [114]. Hücre konsantrasyonu(c)=Hücre sayısı(n)x10⁴ formülüyle belirlenmiştir. Hücre sayımı için kullanılan inverted ışık mikroskopla alınan görüntülere örnek Şekil 3.4' de verilmiştir.



Şekil 2.4. HepG2 hücrelerine ait ışık mikroskobu görüntüsü

2.2.7 İstatistiksel Analiz

Analizler sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi SAS paket programı (8.2 versiyon) ile yapılmıştır. Değerlendirilen parametreler için Tek Faktör Varyans analizi yapılarak örnekler uygulanan güçlerin etkisi değerlendirilmiştir. Ayrıca örnekler arası farklılıklar $p=0.05$ manidarlık düzeyinde Tukey testi ile tespit edilmiştir.

3. BÖLÜM

BULGULAR- SONUÇ VE TARTIŞMA

3.1. Nem, Yağ ve Protein Miktarı

Çalışmada kullanılan pirinç kepeğinde yağ %15,4, nem %14,9 ve protein %10,5 olarak bulunmuştur. Tarım ürünlerinde kimyasal bileşim, yetiştirilme şartları ve sulama, gübreleme vb. agronomik uygulamalara bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Yapılan bir çalışmada pirinç kepeği nem içeriği %12,28 yağ miktarı %14,12 ve protein miktarını %13,29 olarak bulunmuştur [115]. Bu değerler mevcut çalışma ile benzerlik göstermektedir. Pirinç ve pirinç kepeği kompozisyonu pirinç türüne, mevsim özelliklerine ve yetiştirilen toprak koşullarına bağlı olarak değişim gösterir.

3.2. Ultrason Uygulamasının Protein Konsantratu Verimine Etkisi

Yapılan protein analizi sonucu elde edilen protein verim değerleri tablo 3.1’de verilmiştir. Test edilen değişkenlerden yalnızca katı/sıvı oranının ekstraksiyon verimi üzerine etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Örnek içerisindeki katı miktarı arttıkça gücün etkisinin azalmasının kavitasyonun çok yoğun ortamda etkin olmayışından kaynaklandığı düşünülmektedir. Süre ve güç etmenlerinin ekstraksiyon verimi üzerine etkisinin istatistiki olarak önemli olmadığı ($p>0,05$) görülmüştür. Şekil 3.1 A ve B’ de de görüldüğü gibi oran optimum değere yaklaştıkça cevap faktöründe artarken güç ve süre parametrelerinde ki değişiklik cevap faktörünü etkilememektedir (Şekil 3.1). Ekstraksiyon verimini etkileyen en önemli faktör ise katı/sıvı oranıdır. Model için uyumluluk değeri ise $p<0,05$ olarak bulunmuştur (Tablo 3.2). Optimizasyon işlemi sonucunda en yüksek protein verimi parametreleri 0,43 katı/sıvı oranı, %48,5 güç, 29,89 dakika olarak tespit edilmiştir (Tablo 3.3).

Wattanasiritham ve diğ. (2015) pirinç kepeğinden klasik yöntemlerle yapılan ekstraksiyonda protein miktarını %23,21 olarak bulmuşlardır. Ultrason destekli ekstraksiyonun kullanıldığı çalışmamızda daha yüksek protein verimine ulaşılmıştır

Ultrason uygulamanın ekstraksiyon verimini artırdığı görülmektedir. Ultrason teknolojisi mekanik ve kavitasyonel etkisi sayesinde hücre duvarından madde geçişini dolayısıyla da ekstraksiyon verimini artırmaktadır [102;116].

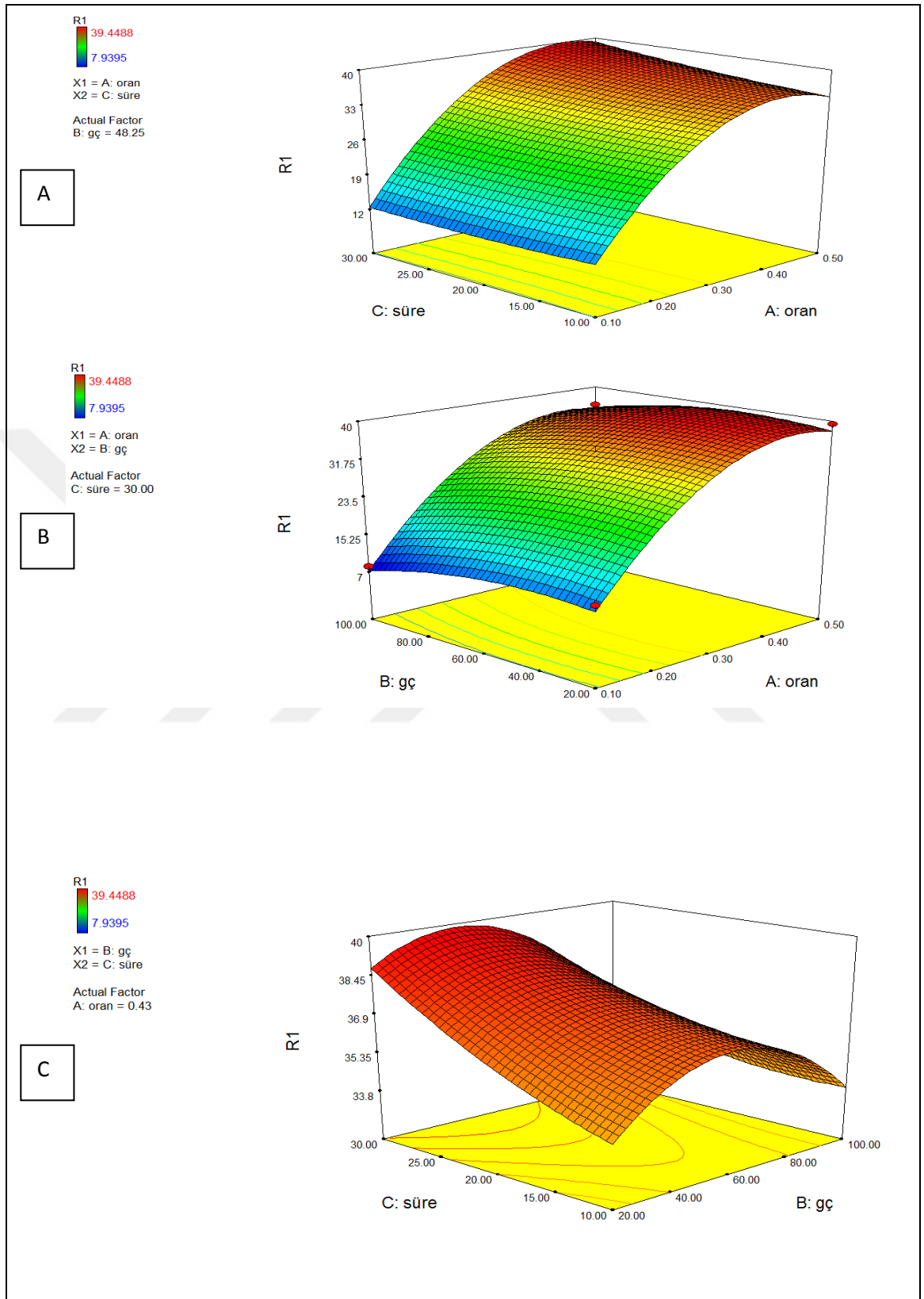
Tablo 3.1. Ultrason uygulanmış örneklerin protein verim değerleri

	Katı/Sıvı Oranı	Güç (% amplitude)	Süre (dakika)	Protein Verimi (mg BSA/mL)
1	0,10	100,00	30,00	8,26
2	0,10	60,00	20,00	12,16
3	0,30	60,00	30,00	30,03
4	0,50	20,00	10,00	31,55
5	0,50	100,00	10,00	31,26
6	0,30	60,00	20,00	36,29
7	0,10	20,00	10,00	10,07
8	0,10	20,00	30,00	13,19
9	0,30	60,00	20,00	29,42
10	0,30	60,00	20,00	34,20
11	0,10	100,00	10,00	7,94
12	0,30	60,00	20,00	34,69
13	0,30	20,00	20,00	31,52
14	0,50	60,00	20,00	36,55
15	0,30	100,00	20,00	30,82
16	0,30	60,00	10,00	38,25
17	0,50	100,00	30,00	35,83
18	0,50	20,00	30,00	39,45
19	0,30	60,00	20,00	31,27
20	0,30	60,00	20,00	35,00

Tablo 3.2. US optimizasyonu için kuadratik model varyans (ANOVA) analizi.

	Sum of		Mean	F	p-value	
Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F	
Model	2120.833	9	235.6481	24.81597242	< 0.0001	significant
A-A	1513.733	1	1513.733	159.4103849	< 0.0001	
B-B	13.60366	1	13.60366	1.432593433	0.2589	
C-C	5.884965	1	5.884965	0.619742313	0.4494	
AB	1.245644	1	1.245644	0.13117803	0.7248	
AC	10.19317	1	10.19317	1.073436465	0.3246	
BC	4.699936	1	4.699936	0.494947631	0.4978	
A^2	238.5036	1	238.5036	25.11667936	0.0005	
B^2	17.08568	1	17.08568	1.799283368	0.2095	
C^2	0.620298	1	0.620298	0.065323234	0.8035	
Residual	94.95826	10	9.495826			
Lack of Fit	61.40679	5	12.28136	1.830226407	0.2616	not significant
Pure Error	33.55147	5	6.710294			
Cor Total	2215.792	19				
R-Squared	0.957					
Adj R-Squared	0.919					
Pred R-Squared	0.765					
Adeq Precision	14.103					

*: A; katı/sıvı oranı, B;güç, C;süre



Şekil 3.1. Design expert programı ile elde edilen modele ait 3 boyutlu grafikler.

Tablo 3.3. Optimizasyonda cevap yüzey metodu ile oluşturulan optimum noktalar ve istenirlik fonksiyonu değerleri.

Örnek No	Katı: Sıvı Oranı	Güç (% amplitude)	Süre (dakika)	Protein Verimi (%)	İstenirlik
1	0,43	48,25	29,89	39,85	1
2	0,42	48,78	28,8	39,50	1
3	0,46	44,47	29,5	39,71	1
4	0,45	47,65	28,78	39,57	1
5	0,45	42,85	29,29	39,67	1

3.3. Antioksidan Özellikler

Gıdaların raf ömrünü uzatmak için, kozmetikte ve tıpta yapay antioksidanlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak birçok araştırmacı doğal olmayan bu bileşenlerin yan etkisinin olduğunu belirtmiştir. Dolayısıyla etkili ve ucuz doğal antioksidanların arayışına yönelik çalışmalarda artış söz konusudur [117]. Çeltik işleme teknolojinin yan ürünü olan pirinç kepeği de sahip olduğu fonksiyonel bileşenler sebebiyle dikkat çekmektedir [118; 119; 120]. Ultrason destekli ekstraksiyonun çok fazla avantajı olduğu ancak antioksidan bileşenlerin degrade olabileceği de çalışmalarda belirtilmiştir [121]. Antioksidan kapasite gıdaların sağlığa faydalarını değerlendirmek için önemli bir gösterge olup; çeşitli yöntemler antioksidan özelliklerini belirlemek için kullanılmaktadır [122]. Bu çalışmada ultrason destekli ekstraksiyon ile elde edilen pirinç kepeği protein izolatlarının antioksidan özellikleri; toplam fenolik bileşen analizi, DPPH süpürücü aktivite, toplam antioksidan kapasite tayini ve metal şelatlama aktivitesi analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Toplam Fenolik Madde

Örneklerin gallik asit eşdeğeri cinsinden hesaplanmış toplam fenolik madde miktarları Tablo 3.4'te verilmiştir. Sabit katı/sıvı oranında(0,43 pirinç kepeği/saf su) ve sürede(30 dakika) yapılan farklı güçlerde ultrason uygulamasının fenolik bileşen içeriğine etkisi değerlendirildiğinde örnekler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. %100 amplitude güç uygulanan 4 numaralı örnek için fenolik madde

içeriği, %65,91 amplitudde güç uygulanan 3 numaralı örnekle benzerlik gösterirken, kontrol örneği, %20 ve %48,25 amplitudde güç uygulanan örneklerden farklı ve daha yüksektir. Uygulanan ultrason genlik değeri arttıkça fenolik bileşen miktarında artış gösterdiği görülmektedir.

Tablo 3.4. Örneklerin gallik asit eşdeğeri (GAE)cinsinden toplam fenolik madde miktarları

Örnek No	mg GAE/g kuru örnek
Kontrol	286,30±0,27 ^b
1	272,49±0,82 ^c
2	283,43±3,26 ^b
3	299,34±3,52 ^a
4	297,43±1,90 ^a

Kontrol, %0; 1, %20; 2, %48,25; 3, %65,91; 4, %100 amplitudde güç uygulanmış örnekler.

^{a-d} : Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$) bir farklılık olduğunu göstermektedir.

Pirinç kepeği sahip olduğu fenolik bileşenler sayesinde yüksek bir antioksidan aktiviteye sahiptir. Bu sebeple değerlendirilmesi gereken bir ya üründür ve bu amaçla çeşitli çalışmalar yapılmıştır [104; 110]. Yapılan bir çalışmada pirinç kepeğinin toplam fenolik bileşen içeriği 1,27–3,31 mg GAE/g kepek olarak bulunmuştur [123]. Kırmızı beyaz ve esmer pirincin embriyo, kepek ve endosperm kısımlarının antioksidan özelliklerinin değerlendirildiği çalışmada en yüksek fenolik bileşen içeriği pirinç kepeğinde 3.817 mg GAE/g olarak bulunmuş ve fenolik madde miktarının coğrafi varyasyon, çevre koşulları ve genetik faktörlerden etkilenebileceği bildirilmiştir [124]. Fenolik bileşiklerin etkinliği büyük ölçüde kimyasal yapılarına ve aromatik halkaya bağlı hidroksil grubu sayısına bağlıdır [112]. Çeltik çeşitlerinin kepeklerinde fenolik madde miktarlarının 2,2 ile 3,2 mg GAE/g pirinç kepeği arasında değiştiği belirlenmiştir [113].

Buğday kepeğinden fenolik bileşiklerin ultrason destekli ve geleneksel yöntemlerle ekstraksiyonunun karşılaştırıldığı bir çalışmada aynı verim değeri için ultrason destekli ekstraksiyonun geleneksel yöntemden daha kısa sürdüğü ve çözgen tüketiminin daha az

olduğu bildirilmiştir [45]. Benzer şekilde pirinç kepeğinden de ultrason destekli ekstraksiyon sonucunda daha yüksek fenolik madde elde edilmiştir [127].

Çeltiğin kavuz, kepek ve endosperminden %80 etanol/su kullanarak 25°C de 16 saat ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstraktlarda en yüksek toplam fenolik madde miktarı 2,5–2,7 mg GAE/g değeri ile kepekte bulunmuştur [128]. Genellikle fenolik bileşiklerin eldesinde kullanılan ekstraksiyon sıvısı özellikleri elde edilen verim açısından önemlidir. Çözgen olarak metanol kullanımının fenolik bileşen ekstraksiyonunu artırdığı çalışmalarda bildirilmiştir [129;130; 131]. Kullanılan çözügene göre elde edilen fenolik bileşen miktarının metanol>etanol>su sıralamasına sahip olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur [132]. Ayrıca fermantasyon gibi işlemler proteinlerin parçalanmasını sağladığından enzim uygulamaları ile daha yüksek toplam fenolik bileşik elde edilebilmektedir [133; 134] .

3.3.2. Toplam Antioksidan Aktivite

Pirinç kepeğinden elde edilen protein izolatlarının antioksidan kapasitesi üzerine ultrason gücünün etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0,05$) tespit edilmiştir (Tablo3.5).

Tablo 3.5. Örneklerin antioksidan aktivite değerleri

Örnek No	$\mu\text{g trolox/mg örnek}$
Kontrol	16,47 $\pm$ 1,27 ^a
1	15,14 $\pm$ 0,37 ^a
2	15,16 $\pm$ 0,72 ^a
3	16,23 $\pm$ 0,28 ^a
4	17,73 $\pm$ 1,49 ^a

Kontrol, %0; 1, %20; 2, %48,25; 3, %65,91; 4, %100 amplitud gücü uygulanmış örnekler.

^{a-d}: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$) bir farklılık olduğunu göstermektedir.

Serbest radikaller oksidasyonun oluşumunda ve devam etmesinde en önemli etkidir. Hücre içerisinde meydana gelen oksidasyon reaksiyonları hücrede zarar oluşturarak kanser ve kalp hastalıkları gibi çeşitli hastalıkların oluşmasına sebebiyet verebilirler

[135]. Antioksidanlar özellikle de doğal antioksidanlar oksidasyon oluşumunu önleyerek vücut sağlığı açısından önemli rol oynarlar [136]. Çalışmalar pirinç kepeğinin yaklaşık 100 farklı antioksidan madde içerdiğini göstermiştir [137]. Pirinçte ferulik asit esteri olarak bulunan fitosterol γ -oryzanol olarak adlandırılır. Literatürde birçok çalışma pirinç kepeğinin alkoller ve γ -oryzanol açısından zengin olduğunu göstermektedir [138; 139; 140]. Pirinç kepeği yapısında ayrıca vitamin E'nin iki formunu (tokoferol, 100 mg/kg; tokotrienol, 180 mg/kg) barındırmaktadır [140]. Vitamin E'nin her iki formu da radikallere fenolik hidrojen vererek yüksek antioksidan aktivite gösterir. Pirinç kepeğinin sahip olduğu bu bileşiklerinin hücreyi oksidatif strese karşı koruduğu bildirilmiştir [141]. Pirinç kepeğinden farklı solventler ve farklı sıcaklıklar kullanarak elde edilen ekstraktların antioksidan kapasiteleri 33,61 ile 59,85 μmol trolox eşdeğeri/g örnek olarak bildirilmiştir. Bu çalışma sonuçları ile kıyaslandığında pirinç kepeği yağının daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu söylenebilir. Ayrıca kullanılan solvent türünün de antioksidan ekstraksiyonunu etkilemiş olması muhtemeldir [142]. Geleneksel olarak yetiştirilen ve özel geliştirilmiş pirinç kepeklerinden yağı uzaklaştırdıktan sonra klasik yöntemle elde edilen ekstraktların antioksidan özellikleri değerlendirilmiş ve örneklerin ABTS radikal süpürücü aktiviteleri $8,67 \pm 0,14$ ile $14,25 \pm 0,46$ μmol trolox eşdeğeri/g örnek aralığında bulunmuştur [143]. Bulunan bu değerler bu çalışmada elde edilen sonuçlarla benzerdir. Pirinç kepeği proteinlerinin sahip olduğu antioksidan aktivitenin sülfür grubu amino asitleri ihtiva etmesinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir [144].

3.3.3. DPPH Radikali Süpürücü Aktivite Analizi

DPPH süpürücü aktivite 4 farklı noktada ultrason genliği uygulanan örnek ve kontrol için değerlendirilmiştir. Sonuçlar %50 inhibisyon değeri olarak ve % süpürücü aktivite olarak sırasıyla Tablo 3.6'da gösterilmiştir. IC_{50} değerinin hesaplanabilmesi için 3 farklı konsantrasyonda örnekler hazırlanmış ve % süpürücü aktivitelerin konsantrasyona karşı grafiği oluşturulmuştur. Oluşturulan bu grafikten %50 inhibisyonu sağlayacak örnek konsantrasyonları belirlenmiştir. Ultrason genliğinin %100 tutulduğu 4 numaralı örneğin DPPH süpürücü aktivite üzerine etkisi, %65,91 güç uygulanmış olan 3 numaralı ve %48,25 amplitud güç uygulanmış 2 numaralı örneklerle benzerlik gösterirken ultrason uygulanmamış ve %20 amplitud ultrasonik güç uygulanmış 1 numaralı örnekten farklı

olduğu görülmüştür. Toplam fenolik bileşen ve antioksidan analizinde görüldüğü gibi güç arttıkça DPPH süpürücü aktivitenin de arttığı söylenebilir. En yüksek % radikal süpürücü aktivite değeri %100 amplitud ultrason uygulanmış örnekte %63,61 olarak bulunmuştur. DPPH konsantrasyonunu %50 azaltmak için gerekli antioksidan miktarın hesaplanması bileşenlerin antioksidan kapasitesi ölçme analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır [132]. Yapılan IC₅₀ hesaplamalarında %100 amplitud güç uygulanmış örnek için IC₅₀ değeri 0,032 g/mL olarak bulunmuştur. Yani örneğin DPPH radikali üzerine %50 inhibisyon gösterebilmesi için 0,0317 g/mL konsantrasyonda hazırlanması gerekmektedir.

Tablo 3.6. Örneklerin DPPH radikali inhibisyon ve IC₅₀ değerleri

Örnek No	İnhibisyon (%) (40 mg/mL protein izolatu/saf su)	IC ₅₀ (g/mL)
Kontrol	54,41±0,56 ^b	0,037±0,001 ^b
1	55,66±1,38 ^b	0,036±0,001 ^b
2	59,46±3,04 ^{ab}	0,033±0,003 ^a
3	61,86±2,17 ^a	0,032±0,001 ^a
4	63,61±0,15 ^a	0,032±0,001 ^a

Kontrol, %0; 1, %20; 2, %48,25; 3, %65,91; 4, %100 amplitud güç uygulanmış örnekler.

IC₅₀: %50 inhibisyon için gerekli konsantrasyon

^{a-d}: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli (p<0,05) bir farklılık olduğunu göstermektedir.

DPPH oldukça kararlı bir radikal olup birçok ürünün radikal süpürücü aktivitesini belirlemek için kullanılmakta ve maksimum absorbands değeri 517 nm'de gözlenmektedir [145]. DPPH radikali antioksidanlar gibi proton verici bir maddeyle karşılaştığında radikalin rengi açılır ve absorbandsında azalma gözlenir [146].

Ultrason ile pirinç kepeğinden antioksidan bileşenlerin ekstraksiyonunu inceleyen bir çalışmada, DPPH süpürücü aktivite değerini %55,61 olarak elde etmişlerdir. Bulunan bu sonuç bizim çalışmamızda elde edilen verilerle yaklaşık olarak aynıdır. Ultrason

uygulanmadığında elde edilen değer %54,41 iken g uygulaması ile doğru orantılı olarak % aktivite de artmıştır [147].

Pirinç kepeği proteinlerinin DPPH süpürücü aktivite değeri %39,1 olarak bildirilmiştir [148]. Mevcut çalışmada elde edilen değerlerin farklı olması kullanılan protein izolatının konsantrasyon farklılığında kaynaklanabilir.

Bir proteinin antioksidan özelliği ilk olarak onun amino asit kompozisyonuna bağlıdır [149]. Bu amino asitlerin doğru pozisyonda bulunması antioksidan kapasiteyi etkileyen ikinci önemli faktördür. Pirinç kepeği sahip olduğu sülfidril grubu amino asitler sayesinde yüksek radikal süpürücü aktiviteye sahiptir.

Pirinç kepeğinden klasik yöntemle farklı çözgenler (metanol, etanol ve etil asetat) kullanarak elde edilen ekstraktlar ile ilgili bir çalışmada metanol ekstraktı en yüksek % süpürücü aktivite değeri (93,91%) göstermiştir. Su ekstratlarının kullanıldığı bu çalışmada pirinç kepeği proteinlerinin DPPH süpürücü aktivite değerleri de metanol ekstraktlarının süpürücü aktivite değerlerine yaklaşık bulunmuştur [124].

Kırmızı, beyaz ve esmer pirinçlerde en yüksek DPPH süpürücü aktivite kepek kısmında gözlemlenmiştir [125]. Çalışmalarda materyal farklılığına bağlı olarak antioksidan özelliklerin de değiştiği söylenebilir. Pirinç kepeği yapısında da bulunan ferulik asit hidroksisinamik asit olarak bilinen polifenolik bileşikler ailesine aittir. Bu polifenolün ise radikal süpürücü etkisinin olduğu belirtilmiştir [138]. Farklı çeşitlere ait uzun pirinç kepeklerinde DPPH süpürücü aktivite IC₅₀ olarak 0.38-0.74 mg/mL arasında bulunmuştur [126].

Pirincin kavuz, kepek ve endosperminden %80 etanollü su kullanarak 25°C de 16 saat yapılan ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstraktların antioksidan özelliklerinin değerlendirildiği çalışmada en yüksek DPPH süpürücü aktivite değerini %85,9 ile kepekten elde edilmiştir [128]. Ultrason destekli ekstraksiyon yapılan mevcut çalışmada 30 dakikalık ekstraksiyon sonucunda elde edilen protein ekstraktlarında %63,6'lık bir DPPH radikali süpürücü değerine ulaşılmıştır. Bu sonuç ile ultrason destekli ekstraksiyonda srenin önemli derecede kısaltılabileceği görülmektedir.

Thai princinden elde ettikleri ekstraktların radikal süpürücü aktivitesinin onların toplam fenolik bileşen miktarına bağlı olarak değişim gösterdiği bildirilmiştir [151]. Bu tez kapsamında yapılan çalışmada da toplam fenolik madde ile DPPH süpürücü aktivite arasında doğrusal bir ilişki olduğu gözlenmektedir.

Pirinç kepeğinden geleneksel ve yeni yöntemlerle biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu konusunda yapılan farklı çalışmalarda en yüksek DPPH radikal süpürücü aktivite etanol/su kullanarak ultrason destekli ekstraksiyon sonucunda elde edilmiştir [152; 126]. Benzer şekilde mevcut çalışmada da ultrason desteği ile elde edilen ekstraktlarda DPPH süpürücü aktivitenin arttığı tespit edilmiştir.

Birçok çalışma ile biyoaktif peptitlerin antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [153]. Küçük boyutta ki moleküllerin büyük boyutlu olanlara kıyasla daha yüksek radikal süpürücü aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [155].

3.3.4. Metal Şelatlama Aktivitesi

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan pirinç kepeği protein izolatlarının göstermiş olduğu % şelatlama aktivitesine karşılık konsantrasyon ile oluşturulan doğrusal grafik aracılığıyla hesaplanan IC_{50} ve sahip oldukları % şelatlama aktiviteleri de Tablo 3.7’de verilmiştir.

Yapılan istatistiksel değerlendirmede örnekler arasında fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Yani uygulanan ultrasonik gücün şelatlayıcı aktivite üzerine etkisinin olmadığı görülmüştür. Pirinç kepeği protein izolatının konsantrasyonu arttıkça % şelatlama aktivitesinin de arttığı tespit edilmiştir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde de yüzde aktivitenin şelatlayıcı oran ile doğru orantılı olduğu görülmüştür. En yüksek şelatlama değeri % $55,34 \pm 0,67$ olarak % 100 amplitud gücü uygulanan 4 numaralı örnekte bulunmuştur. Fenolik bileşen analizi, toplam antioksidan kapasite ve DPPH süpürücü aktivite analizlerinde de gözlemlendiği gibi uygulanan ultrasonik genlik arttıkça % değerlerde artmıştır. %50 inhibisyon konsantrasyonu ise 4 numaralı örnek için $0,58 \pm 0,01$ mg/mL olarak bulunmuştur (Tablo 3.7).

Tablo 3.7. Örneklerin metal şelatma aktiviteleri

Örnek No	İnhibisyon (%) (1 mg/mL)	IC ₅₀ (mg/mL)
Kontrol	34,17±1,37 ^c	1,40 ±0,02 ^a
1	40,73±1,69 ^b	1,16 ±0,03 ^b
2	46,65±0,56 ^b	0,96 ±0,02 ^c
3	45,82±2,43 ^b	1,01 ±0,06 ^c
4	55,34±0,67 ^a	0,58 ±0,01 ^d

Kontrol, %0; 1, %20; 2, %48,25; 3, %65,91; 4, %100 amplitude güç uygulanmış örnekler.

IC₅₀: %50 inhibisyon için gerekli konsantrasyon

^{a-d}: Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli (p<0,05) bir farklılık olduğunu göstermektedir.

Pirinç kepeği sağlık açısından önem arz eden bir çok fitokimyasal yapısında bulundurulur [155]. Pirinç kepeği yapısında bulunan gamma oryanolün ferulik asit yapısından dolayı demir şelatlama aktivitesinin olduğu bilinmektedir [147]. Demir ve bakır gibi metallerin oksidasyonu başlatıcı ve hızlandırıcı özellikleri vardır [156]. Bu çalışmada en yüksek şelatlama aktivitesinin elde edildiği 4 numaralı örnek için %50 inhibisyon gösteren pirinç kepeği protein izolatu konsantrasyonu 0,84 mg/mL, % inhibisyon ise 0,4 mg/mL örnek için %49,082 olarak bulunmuştur. Şelatlayıcı ajan varlığında demir kompleksinin oluşturduğu kırmızı renkte bir azalma meydana gelir. Renkteki bu azalma ölçülerek şelatlama aktivitesi değerlendirilmektedir. Biyoaktif proteinlerin ve peptitlerin serbest metal iyonlarını amino ya da hidroksil grupları aracılığıyla bağladıkları bilinmektedir [157]. Uygulanan örnek miktarı arttıkça demir kompleksinin sahip olduğu kırmızı renkte azalma şelatlama aktivitesinde artış gözlenmiştir. Bu artış pirinç kepeği proteinlerinin yapısında barındırdığı biyoaktif bileşenlerden kaynaklanmaktadır.

Fermente pirinç kepeği ve normal pirinç kepeği ile yapılan çalışma neticesinde fermente edilmiş ürünün daha yüksek şelatlama aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Proteinlerin hidrolize olması yani ortamdaki peptit miktarının fazlalığı ile şelatlama aktivitesinin arttığı belirtilmiştir. Protein izolatu yerine hidrolizat ile yapılan deneylerde daha yüksek şelatlama aktivitesi elde edilebilir. Ultrason uygulamasının da protein yapısında mekanik ve kavitasyon etkileri donucunda meydana gelen değişiklerin

biyoaktivitede artışa yol açması muhtemeldir. Ayrıca kükürt ve asidik formdaki amino asitleri içeren proteinlerin daha yüksek demir indirgeyici etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [158].

Ultrason destekli ekstraksiyon ile antioksidanların pirinç kepeğinden ekstraksiyonunun optimize edildiği bir çalışmada demir şelatlama değeri %57,2 olarak bildirilmiştir. Bu değer mevcut çalışmada elde edilen değere oldukça yakındır. Bununla birlikte ekstraksiyonda kullanılan çözügen farklılığının sonuçları etkileyebilecek önemli bir parametre olduğu göz ardı edilmemelidir [147].

Metal şelatlama aktivite değerleri de antioksidan özellikleri değerlendirmek için yapılan analizlerin sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Toplam fenolik madde içeriğinin antioksidan özelliklerle benzer trend seyrettiği bilinmektedir [160;161].

3.4. Antiproliferatif Özellikler

Pirinç kepeği protein izolatlarının antiproliferatif özellikleri HepG2 hücre hattı üzerine sitotoksitesi bakımından değerlendirilmiştir. Farklı ultrason güçlerinin uygulanan örneklerin hücre hattı üzerine olan sitotoksitesi istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. Toksisite gösteren minimum değer olan %50 inhibisyon noktasının belirlenmesi için farklı konsantrasyonlardaki örneklerle yapılan uygulamalarda minimum toksik konsantrasyon 1 mg/mL protein izolatı/hücre kültür ortamı olarak bulunmuştur. Artan konsantrasyona bağlı olarak ve uygulanan güce bağlı olarak değişen hücre canlılığı değerleri Tablo 3.8’de verilmiştir. Üç farklı oranda yapılan uygulamalar için güçler arasında fark olduğu görülmektedir. Uygulanan güç arttıkça toksik etkinin azaldığı söylenebilir. Uygulanan farklı pirinç kepeği protein izolatı konsantrasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. Diğer bir deyişle uygulanan pirinç kepeği protein izolat miktarı arttıkça hücre ölüm oranında da artış meydana gelmiştir.

Tablo 3.8. Canlı hücre (%).

Örnek No	1 mg/mL	0,4 mg/mL	0,2 mg/mL	IC ₅₀
Kontrol	18,43±0,74 ^{ce}	43,97±2,47 ^{bf}	67,03±4,58 ^{bg}	1,71±0,12 ^a
1	16,14±0,65 ^{de}	55,25±4,28 ^{abf}	65,47±4,81 ^{bf}	1,81±0,14 ^a
2	24,62±4,00 ^{cbe}	59,13±2,81 ^{abf}	83,74±2,61 ^{ag}	2,20±0,05 ^a
3	32,35±1,39 ^{be}	46,99±6,74 ^{bf}	64,41±0,36 ^{bf}	1,87±0,11 ^a
4	45,3±1,21 ^{ae}	67,57±3,43 ^{af}	64,09±4,09 ^{bf}	3,00±0,30 ^b

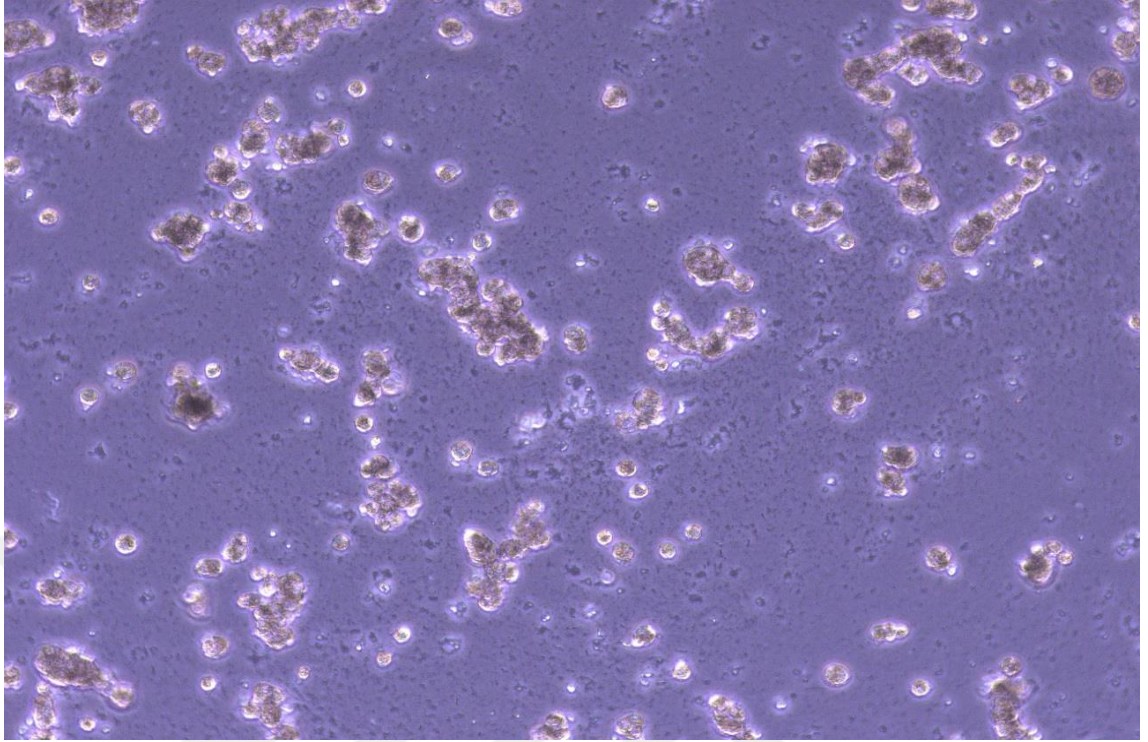
Kontrol, %0; 1, %20; 2, %48,25; 3, %65,91; 4, %100 amplitude güç uygulanmış örnekler.

IC₅₀: %50 inhibisyon için gerekli konsantrasyon

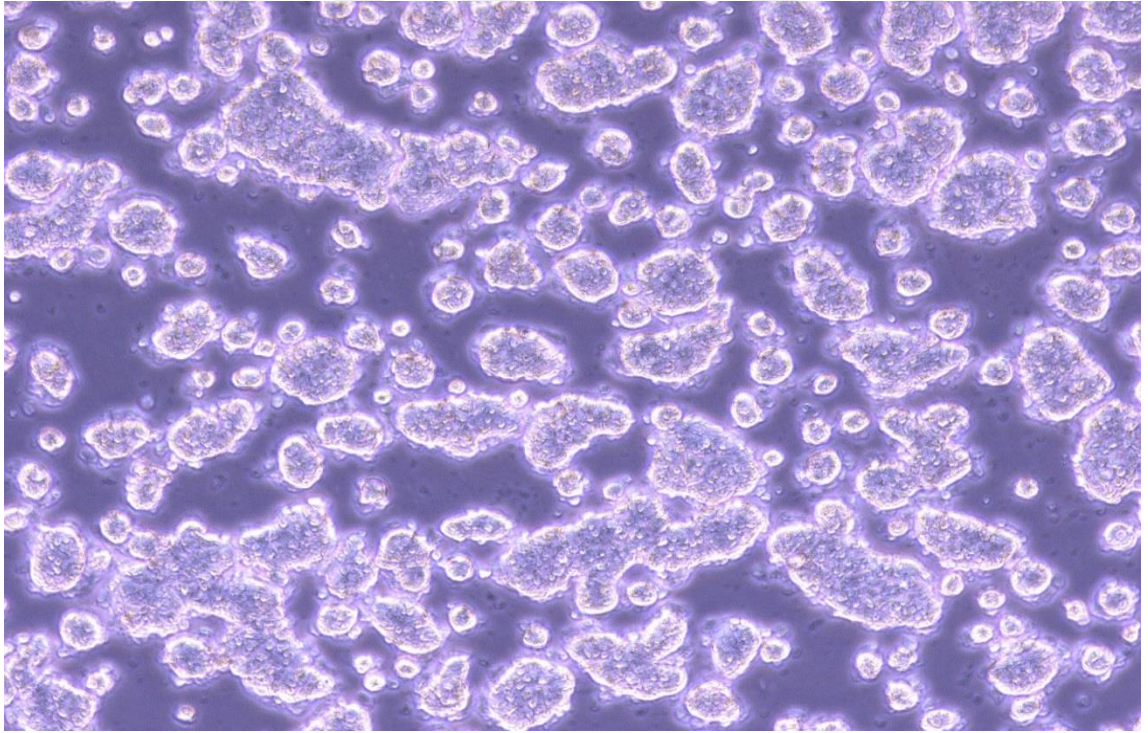
^{a-d} : Aynı sütundaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli (p<0,05) bir farklılık olduğunu göstermektedir.

^{e-h} : Aynı satırdaki birbirinden farklı küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli (p<0,05) bir farklılık olduğunu göstermektedir.

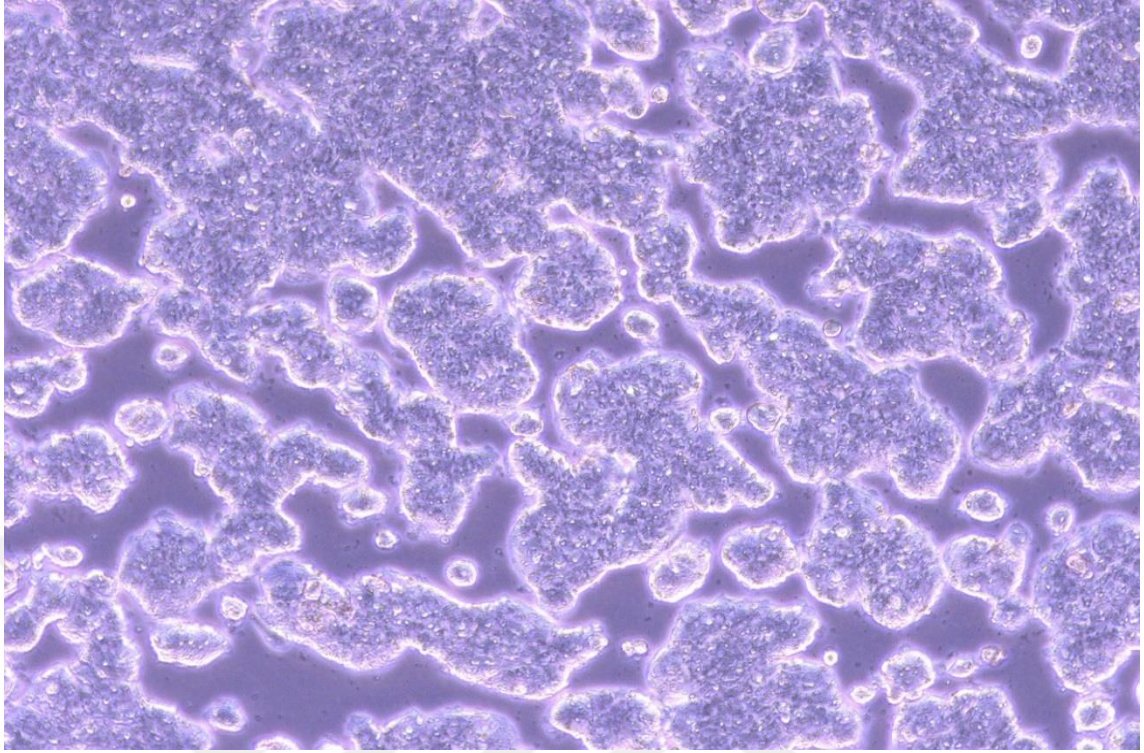
Hüce kültürlerine ait mikroskop görüntüleri Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3’de gösterilmiştir. 1 mg/mL örnek uygulanmış hücre hatlarında daha az yoğunlukta hücre varlığı gözlenirken örnek uygulama miktarı azaldıkça mikroskopta görüntülenen hücre miktarında artış olmuştur. Şekil 3.2’de Şekil 3.1’e göre daha fazla hücre geliştiği gözlemlenirken en düşük konsantrasyonda örnek uygulanmış hücre hattına ait olan şekil 3.3’te oldukça yoğun hücre konsantrasyonu olduğu görülmektedir. En yüksek toksik etki %20 amplitude güç uygulanmış olan 2 numaralı örnekte %83,96 olarak bulunmuştur.



Şekil 3.2. Kontrol örneğine ait 1 mg/mL pirinç kepeği protein izolatu uygulanmış HepG2 hücrelerinin mikroskop görüntüsü



Şekil 3.3. Kontrol örneğine ait 0,4 mg/mL pirinç kepeği protein izolatu uygulanmış HepG2 hücrelerin mikroskop görüntüsü



Şekil 3.4. Kontrol örneğine ait 0,2 mg/mL pirinç kepeği protein izolatu uygulanmış HepG2 hücrelerin mikroskop görüntüsü

Doğal bileşenlerin antikanserojen özelliklere sahip olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir [161; 162]. Antioksidan bileşenlerce zengin besinlerin gıda yoluyla alınmasının kanser, kalp, diyabet gibi hastalıklarının oluşmasının önlenmesinde etkin olduğu kanıtlanmıştır [163]. Pirinç kepeğinde yer alan gamma oryzanolün tümör yapılarını inhibe ettiği çalışmalarda gösterilmiştir [164]. Ayrıca yapılan bir çalışmada γ -oryzanolün tümör taşıyan farelerde tümör büyümesini engellediği kaydedilmiştir [165]. Yine pirinç kepeği proteinlerinin anti-kanser aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir [166]. Pirinç kepeği yapısında E vitamini formlarından tokoferol ve tokotrienollerin antikarsinojenik özellikler sergilediği bilinmektedir [167]. Bu sebeplerden dolayı pirinç kepeği proteinlerinin sahip olabileceği toksik etki HepG2 karaciğer kanser hücreleri üzerinde değerlendirilmiştir.

HepG2 insan karaciğer kanseri hücre dizisi gıda bileşenlerinin antikanser özelliklerini belirlemede yaygın olarak kullanılan bir hücre hattıdır [168]. Pirinç kepeğinden elde edilen sabunlaşmayan maddelerin (0-100 mg/mL) HepG2 hücresi enzim aktivitesi üzerine koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada MTT testi ile sitotoksik etkinin oluşmadığı sonucuna varılmıştır [12].

Pirinç kepeğinin kanser hücreleri üzerine sitotoksitesinin değerlendirildiği bir çalışmada kolon kanser hücresi (Caco-2), akciğer kanser hücresi (MCF-7) ve karaciğer kanser hücresi (HepG2) ile çalışılmıştır. Pirinç kepeği proteinlerinden elde edilen peptitlerin kullanıldığı bu çalışmada 600-700 µg/mL örnek uygulaması Caco-2 hücresinde %84, MCF-7 hücresinde %80 ve HepG2 hücresinde %84 inhibisyon sağladığı kaydedilmiştir [169]. Bu tez çalışmasında da pirinç kepeği proteinlerinden direkt olarak 400 µg/mL uygulama yapılarak yaklaşık %80 inhibisyon elde edilmiştir.

Farklı çeşit pirinç kepeklerindeki biyoaktif bileşenlerinin kolektoral kanser hücreleri (HT-29, Caco-2) ve SW-480 insan kolon kanser hücreleri üzerine inhibisyonunun araştırıldığı bir çalışmada kepek miktarına bağlı olarak inhibisyon oranının değiştiği belirtilmiştir [170].

Pirinç kepeğinden elde edilen enzim ekstraktlarının MOLT-4 (kemik kanseri-lösemi) hücreleri üzerine inhibisyonunun çalışıldığı araştırmada 2,2-10 mg/mL konsantrasyon aralığında örnek uygulaması sonucunda 7,5 mg/mL örnek uygulamasından itibaren sitotoksiste gözlenmiş en yüksek sitotoksiste ise 10 mg/mL örnek uygulamasında elde edilmiştir. Çalışmanın kontrolü olarak lenfositlerde (kanseri olmayan hücre hattı) yapılan sitotoksiste çalışmasında pirinç kepeğinin toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Kullanılan hücre hattına bağlı olarak toksik etki de değişmektedir [171].

Pirinç kepeğinden farklı solventler kullanarak ekstraksiyon gerçekleştirilen ve bu ekstraktların antiproliferatif özelliklerinin kolon kanser hücresi (Caco-2), göğüs kanser hücresi (MCF-7) ve akut miyeloid lösemi (HL-60) hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini MTT testi ile değerlendirildiği çalışmada metanol ekstraksiyonu ile yapılan ekstraktın en etkin ekstrakt ve HL-60 hücre hattının ise en hassas hat olduğu kaydedilmiştir [172].

Pirinç kepeğinden enzimatik yolla ekstrakte edilen antioksidan maddelerin insan deri hücresi olan keratinosit hücreleri üzerine MTT testi ile toksik etkisi 1, 10, 50, 100, ve 500 µg/mL konsantrasyon aralığında örnek uygulanarak çalışılmış ve 500 µg/mL de çok az toksik etki gözlemlenirken daha düşük konsantrasyonlarda toksik etki belirlenemediği bildirilmiştir [144].

Bir diğ er çalışmada pirinç kepeğinde bulunan yüksek antioksidan  zelliğ e sahip ferulik asitin HepG2 hücrelerinin büyümesini yavaşlattığı ve hücre üzerine toksik etkisinin olduğu çalışmalarda gösterilmiştir [173].



4. BÖLÜM

ÖNERİLER

Çalışma sonucunda ultrason uygulamanın protein verimi için optimum noktası belirlenmiş ve 4 farklı % ultrason genliği noktasında yapılan ultrason uygulamasının antioksidan ve antiproliferatif özellikler üzerine etkisi tartışılmıştır. Çalışma sonucuna göre ultrason uygulamasının, protein ekstraksiyonunda, verim artırmak için bir ön işlem olarak kullanılabileceği söylenebilir. Optimizasyon çalışmasında uygulanan oranın protein verimini arttırdığı saptanmıştır. Katı/sıvı oranındaki artışın belirli bir noktaya kadar pozitif etkisi olmakla birlikte, optimum değerden daha yüksek katı/sıvı oranları kullanıldığında, verime etkisinin değişmediği hatta azalttığı gözlemlenmiştir. Meydana gelen bu verim azalmasının örnekteki katı artışının kavitasyon özelliğini azaltmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple katı/sıvı oranının optimum değerler civarında seçilmesi gerektiği önerilebilir.

Farklı güç noktalarında elde edilen protein ekstraktlarının antioksidan değerleri arasında ki farkın değerlendirilmesi yapılmıştır. Genel olarak seçilen güç noktalarında maksimum değerlerin %100 ultrason genliği uygulamasında elde edildiği söylenebilir. Ancak sonuçlar uygulanan 4 farklı güç için geçerlidir. Güç uygulama noktaları artırılarak ve farklı katı/sıvı oranı ve süre değişkenleri kullanılarak daha kapsamlı çalışmalar yapılabilir.

Çalışmamızda protein ekstraksiyonu için yapılan optimizasyon çalışmasından elde edilen optimum oran ve süre kullanılmıştır. Bu değerler antioksidan özellik için değişim gösterebileceğinden antioksidan bileşiklerin ultrason destekli ekstraksiyonunun optimizasyon çalışmasının yapılmasının faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca literatür taramasında çalışmalar göstermiştir ki etanol/su ya da metanol /su karışımları ile yapılan ekstraksiyonlarda ekstraksiyon verimi daha yüksektir. Fenolik ve

antioksidan bileşenlerin ekstraksiyonu için kullanılacak solvent ve bu solvent oranının da optimize edilmesi daha yüksek ekstraksiyon değerlerinin elde edilmesini sağlayacaktır.

Yine literatür çalışması ile proteinlere kıyasla peptitlerin daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Bu sebeple elde edilen protein izolatları peptitlere parçalanarak antioksidan özellikleri değerlendirildiğinde daha yüksek antioksidan aktivite değerleri elde edilebilir.

Antiproliferatif özelliğin değerlendirilmesi için HepG2 hücresi ile yapılan çalışmada ultrasonik gücün toksisiteye etkisinin önemli olduğu gözlemlenmiştir. Ancak farklı katı/sıvı oranlarında ve farklı sürelerde ultrason genliği uygulamaları yapılarak sonuçlar daha ayrıntılı değerlendirilebilir.

Pirinç kepeği proteinlerinin hücre kültürü üzerine etkisini görmek açısından farklı kanser hücre hatları ile de çalışmalar yapılabilir.

Ayrıca hücre metabolizmasına etkiyi arttıracakı düşünüldüğünden izolat yerine hidrolizat uygulaması da çalışılabilir.

KAYNAKLAR

1. Saunders, R.M., 1990. The properties of rice bran as a food stuff. **Cereal Foods World**, **35**: 632-639.
2. Juliano, B.O., 1993. Rice in human nutrition (first ed.). International Rice Research Institute/FAO, Rome, 35-45pp.
3. Tang, D.K., Vang, D.A., Karner, D., Armstrong, E., Shafer, M.M., 2003. The detection of dissolved thiols in natural waters using a solid phase extraction and HPLC determination of fluorescently derivatized thiolic compounds. **Journal of Chromatography A**, **998**: 31-40.
4. Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., Nokihara, K., 1998. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **46**: 49-53.
5. Huang, W., Xue, A., Niu, H., Jia, Z., Wang, J., 2009. Optimised ultrasonicassisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro. **Food Chemistry**, **114**:1147.
6. Hu H, Wu J, Li-Chan Ecy, Zhu L, Zhang F, Xu X, Fan G, Wang L, Pan Xhs. 2013. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (spi) dispersions. **Food Hydrocolloids**, **30**: 647-655.
7. Fabian, C., Ju, Y.H., 2011. A review on rice bran protein: its properties and extraction methods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, **51**: 816-827.
8. Passribu, S.j., Tomlinson, J. D., McMaster, G.j., 1992. Fractionation of wheat flour proteins by size exclusion-HPLC on an agarose-based matrix. **Journal of Cereal Science****15**: 121-136.
9. Morel, M.H., Dellon, P., Autran, J.C., Leygue, J.P., Bar, L., Helgouac, C., 2000. Effects of temperature, sonication time, and power settings on size distribution and extractability of total wheat flour proteins as determined by size-exclusion high-performance liquid chromatography. **Cereal Chemistry**, **77**: 685-691.

10. Chanput, W., Theerakulkait, C., Nakai, S., 2009. Antioxidative properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. **Cereal Science**, **49**: 422-428.
11. Liu, R.H., 2007. Whole grain phytochemicals and health. **Journal of Cereal Science**, **46**: 207-219.
12. Ham, H., Yoon, S.W., Kim, I., Kwak, J., Lee, J., Jeong, H., Lee, J., 2015. Protective effects of unsaponifiable matter from rice bran on oxidative damage by modulating antioxidant enzyme activities in HepG2 cells. **Food Science and Technology**, **61**: 602-608.
13. Tabaraki, R., Nateghi, A., 2011. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, **18**: 1279-1286.
14. Feng, H., Yang, W., 2011. Ultrasonic processing: in **Nonthermal Processing. Technology for Food**, **74**: 109-134.
15. Villamiel, M., Jong, P., 2000. Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins, and native enzymes of milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **48**: 472-478.
16. Bermúdez-Aguirre, D., Mawson, R., Barbosa-Cánovas, G. V., 2008. Microstructure of fat globules in whole milk after thermosonication treatment. **Journal of Food Science**, **73**: 325-332.
17. Riener, J., Noci, F., Cronin, D. A., Morgan, D. J., Lyng, J. G., 2009. Characterization of volatile compounds generated in milk by high intensity ultrasound. **International Dairy Journal**, **19**: 269-272.
18. Şengül, M., Başlar, M., Erkaya, T., Ertugay, M.F., 2009. Ultrasonik homojenizasyon işleminin yoğurdun su tutma kapasitesi üzerine etkisi. **Gıda**, **34**: 219-222.
19. Halliday, D., Resnick, R., 1992. Fiziğin Temelleri-1, Arkadaş kitapevi, Ankara, 369s.

20. Dinç, D.A., 2008. Ultrason Fiziği ve İneklerde Reprodüktif Ultrasonografi. Pozitif Matbaacılık, Ankara, 22-39s.
21. De Castro, M. D. L., Capote, F. P., 2006. Introduction: fundamentals of ultrasound and basis of its analytical uses: **Analytical Applications of Ultrasound, 26:** 1-34.
22. Mason, T. J., 1998. Power ultrasound in food processing - the way forward. In M.J.W. Povey & T.J. Mason (Eds.), *Ultrasound in Food Processing*, Blackie Academic & Professional, London. 300pp.
23. Ashokkumar, M., Bhaskaracharya, R., Kentish, S., Lee, J., Palmer, M., Zisu, B., 2010. The ultrasonic processing of dairy products- An overview. **Dairy Science Technology, 90:** 147-168.
24. Muthukumarappan, K., Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., Cullen, P. J., 2010. *Ultrasound Processing: Rheological and Functional Properties of Food: In Novel Food Processing, Effects On Rheological And Functional Properties*, CRC press, New York, 479pp.
25. Suslick, K.S., 1988. *Ultrasound: Its Chemical, Physical And Biological Effects*. VCH Publishers, New York, 1: 129-130pp.
26. Koivula, T., 2000. On cavitation in fluid power. PhD Thesis, University of Bath, UK. 382pp.
27. Sun, D.W., 2005, *Emerging technologies for food processing*, Elsevier Academic Press, London, 771pp.
28. Barbaso-Canovas, G. V., Feng, H. and Weiss, J., 2010. *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*, Food Engineering Series. Springer, New York. 665pp.
29. Soria, A. C., Villamiel, M., 2010. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends in Food Science & Technolog, 21:** 323-331.
30. Suslick, K. S., 1989. The chemical effects of ultrasound. **Scientific American, 260:** 80-86.

31. Mason, T. J., Cordemans, E.D., 1996. Ultrasonic identification of chemical processing and related operations, A review, **Trans Icheme**, **74** (Part A): 511-516.
32. Floros, J.D., Liang, H., 1994, Acoustically assisted diffusion through membranes and biomaterials. **Food Technology**, **12**: 79-85.
33. Salisova, M., Toma S., Mason, T. J., 1997. Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from *Salvia officinalis*. **Ultrasonics Sonochemistry**, **4**: 131.
34. Wang, L., Weller, C. L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, **Trends in Food Science and Technology**, **17**: 300-312.
35. Kim, S., Zayas, J., 1989. Processing parameters of chymosin extraction by ultrasound. **Journal of Food Science**, **54**: 700-703.
36. Vinatoru, M., 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, **8**: 303.
37. Wu, J., Lin, L. and Chau, F., 2001. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. **Ultrasonics Sonochemistry**, **8**: 347.
38. Li, H., Pordesimo, L., and Weiss, J., 2004. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans, **Food Research International**, **37**: 731.
39. Laufenberg, G., Kunz, B. M., 2003. Nystroem (transformation of vegetable waste into value added products (a) the upgrading concept b) practical implementations. **Bioresourse Technology**, **87**: 167.
40. Sharma, A., Gupta, M., 2004. Oil extraction from almond, apricot and rice bran by three-phase partitioning after ultrasonication. **European Journal of Lipid Science and Technology**, **106**: 183.
41. Cravotto, G., Binello , A., Merizzi, G. and Avogadro M., 2004. Improving solvent-free extraction of policosanol from rice bran by high-intensity ultrasound treatment. **European Journal of Lipid Science and Technology**, **106**: 147-151

42. Peschel, W., Sanchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzia, I., Jimenez, D., Lamuela- Raventos, R., Buxaderas, S. and Codina, C., 2006. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, **97**: 137.
43. Jerman, T., Trebše, P., Vodopivec, B.M., 2010. Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. **Food Chemistry**, **123**: 175-182.
44. Wang, J., Sun B., Cao, Y., Tian, Y. and Li, X., 2008. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. **Food Chemistry**, **106**: 804.
45. Hromádková Z., Košťálová, Z., Ebringerová A., 2008. Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of phenolics-rich heteroxylans from wheat bran. **Ultrasonics Sonochemistry**, **15**: 1062-1068.
46. Wang, j., Sun, B., Liu Y., Zhang, H., 2014. Optimisation of ultrasound-assisted enzymatic extraction of arabinoxylan from wheatbran. **Food Chemistry**, **150**: 482-488.
47. Myers, R.H., Montgomery D.C.,1995. Response surface methodology process and product optimization using design experiments, John Wiley & Sons, New York, 522 pp.
48. Koç, B., Kaymak, F., 2009. Yanıt yüzey yöntemi ve gıda işleme uygulamaları. **Gıda Dergisi**, **35**: 63-70.
49. Eren, İ. 2004. Patateslerin osmotik dehidrasyonunun “response surface” metodu kullanılarak optimizasyonu. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, İzmir, Türkiye, 141s.
50. Demirekler, P., Şumnu, G., Sahin, S., 2004. Optimization of bread baking in a halogen lamp–microwave combination oven by response surface methodology. **European Food Research and Technology**, **219**: 341-347.
51. Achat, S., Tomao, V., Madani , K., Chibane, M., Elmaataoui, M., Dangles O., Chemat, F., 2012. Direct enrichment of olive oil in oleuropein by

- ultrasound-assisted maceration at laboratory and pilot plant scale. **Ultrasonics Sonochemistry**, **19**: 777-786.
52. Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., 2004a. Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: α -Hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside. **Planta Medica**, **70**: 561-563.
53. Albayrak, S., Sağdıç, O., Aksoy, A., 2010. Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. **Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, **26**: 401-409.
54. Gülçin, İ., Şat, İ.G., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004b. Evaluation of the *in vitro* antioxidant properties of extracts of broccoli (*Brassica oleracea* L.). **Italian Journal of Food Sciences**, **16**: 17-30.
55. Onat T., Emerk K., 2002. İnsan Biyokimyası, Sözman Ey. (Ed.), Palme Yayıncılık, Ankara, 569s.
56. Halliwell, B., Gutteridge, JMC., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. **In: Methods in Enzymology**, **186**: 1-85.
57. Vliet, A.V.D., O'Neill, C.A., Halliwell, B., Cross, C., Kaur, H., 1994. Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanine and tyrosine by peroxynitrite. **FEBS Letters**, **339**: 89-92
58. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., 1996. Harper'ın Biyokimyası 24. baskı, (Çev: Dikmen N., Özgünen T.), Barış Kitabevi, İstanbul, 394s.
59. Halliwell B., 1994. Free radicals and antioxidants:A personal view. **Nutrition Reviews**, **52**: 253-265.
60. Mcneil, J.D., Wiebkin, O.W., Betts, W.H., Cleland, L.G., 1985. Depolymerisation products of hyaluronic acid after expose to oxygen-derived free radicals. **Annals of the Rheumatic Diseases**, **44**: 780-789.
61. Fridovich, I., 1976. Free Radical in Biology; Academic Press, New York, 880pp.
62. Ames, B.M., Shigena, M.K., Hagen, T.M., 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of ageing. **Proceedings of National Academy of Sciences**, **90**: 7915-7922.

63. Keha, E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2000. Biyokimya, Aktif Yayınevi, 11. Baskı, Erzurum, 653s.
64. Arrigoni, O., De Tullio, M.C., 2002. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, **1569**: 1-9.
65. Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y.H., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S.L., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K., Levine, M., 2003. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. **Journal of the American College of Nutrition**, **22**: 18-35.
66. Jung, K.A., Song, T.C., Han, D.S., Kim, I.H., Kim, Y.E., Lee, C.H., 2005. Cardiovascular protective properties of kiwifruit extracts in vitro. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, **28**: 1782-1785.
67. Stevenson, D.E., Hurst, R.D., 2007. Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more. **Cellular and Molecular Life Sciences**, **64**: 2900-2916.
68. Bursal, E., Köksal, E., Gülçin, İ., Bilsel, G., Gören, A.C., 2013. Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium* L.) determined by LC–MS/MS. **Food Research International**, **51**: 66-74.
69. Haigh, R., 1986. Safety and necessity of antioxidants: EEC approach. **Food and Chemical Toxicology**, **24**: 1031-1036.
70. Ardağ, A., 2008. Antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin analitik açıdan karşılaştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 55s.
71. Sağdıç, O., Ekici, L., Oral, R.A., Yetim, H., 2005. Bioactivities and Human Health Effects of Flavonoids and Some Other Phenolic Compounds, ITAFE 2005 Information Technology in Agriculture, Food & Environment, Proceedings Volume II, 12-14 October, Adana, Turkey, 869-874pp.
72. Öztan, T., 2006. Mor havuç, konsantresi, şalgam suyu, nar suyu ve nar ekşisi ürünlerinde antioksidan aktivitesi tayini ve fenolik madde profilinin belirlenmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 93.

73. Roginsky, V., Lissi, E.A., 2004. Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. **Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 92**: 235-254.
74. Prior, R.L., 1998. Antioxidant capacity and health benefits of fruits and vegetables. **NABC Meetings in Portland, Oregon.**
75. Yazıcıoğlu, A., Kolaylı, R., Kara, S., Yıldız, M., Sarıkaya, O., Cengiz, A.O., Er, S., 2009. Determination of chemical, physical and biological characteristics of some pekmez (molasses) from Turkey. **Asian Journal of Chemistry, 21**: 2215-2223.
76. Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay a measure of “antioxidant power”: the frap assay. **Analytical Biochemistry, 239**: 70-76.
77. Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L. 2005. The chemistry behing antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53**: 1841-1856.
78. Grizzi, F., Chiriva-Internati, M., 2006. Cancer: looking for simplicity and finding complexity. **Cancer Cell International, 6**: 4- 7.
79. Mc Cormick, F., 1999. Signalling networks that cause cancer. **Trends Cell Biology, 12**: 53-6.
80. Ruddon, R.W., 2007. Cancer Biology, Fourth edition, Oxford University press, Oxford , 568pp.
81. Schulz, W. A., 2005. Molecular biology of human cancers. Springer, Netherlands, 529pp
82. Sun, Z.J., Pan, C.E., Liu, H.S., Wang, G.J., 2002, Anti-hepatoma activity of resveratrol in vitro. **World Journal of Gastroenterol, 8**: 79-81.
83. Ollsson, M. E., Gustavsson, Cancer K., Andersson., S., Nilsson, A., Duan, R., 2004. Inhibition cell proliferation *in vitro* by fruit and berry extract and correlations with antioxidant levels. Journal of **Agricultural and Food Chemistry, 52**: 7264-7271.

84. Dragsted, L. O., Strube, M.; Larsen, J. C., 1993. Cancer-protective factors in fruits and vegetables: biochemical and biological background. **Pharmacology Toxicology**, **72**: 116-135.
85. Birt D. F., Hendrich, S., Wang, W., 2001. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, **90**: 157-177.
86. Uçar, F., 2003. Hücre Kültüründe Temel İlkeler, Hematolojide Uygulamalı Hücre Kültür Teknikleri, 16. Ulusal Halk Sağlığı Kongresi, 27-31 Ekim 2013, Antalya, 702s.
87. Cohen, J.J., 1998. Apoptosis, to be or not to be. **Postgraduate Syllabus (AA-AA-I)**, **1**: 1-19.
88. Sjöström, J., Bergh, J., 2001. How apoptosis regulated, and what goes wrong in cancer? **British Medical Journal**, **322**: 1538-1539.
89. Butler, M., 2004. Animal Cell Culture and Technology. Taylor & Francis. New York, 288pp.
90. Barile, F.A., 1994. Introduction To In Vitro Cytotoxicology: Mechanisms And Methods, CRC Press, New York, 240pp.
91. Frazier, J.M., 1992. In vitro toxicity testing: applications to safety evaluation. New York: Marcel Dekker, Inc., 850pp.
92. Davila, J.C., Rodriguez, R.J., Melchert, R.B., Acosta, D. Jr., 1998. Predictive value of in vitro model systems in toxicology. **Annual Review Pharmacology Toxicology**, **38**: 63-96.
93. Schmalz, G., 1997. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. **Clinical Oral Investigations**, **1**: 154-162.
94. Kildal, K.K., Ruyter, L., 1994. How different curing methods affect the degree of conversion of resin based inlay/onlay materials. **Acta Odontologica Scandinavica**, **52**: 315-322.
95. Kehe, K., Reichl, F.X., Durner, J., Walther, U., Hickel, R., Forth, W., 2001. Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in pulmonary cells. **Biomaterials**, **22**: 317-322.

96. Anonymous, 2011. Product Information Sheet for ATCC, HepG2 ATCC Catalog No: HB-8065, **www.atcc.org**.
97. Dehn, P.F., White, C.M., Connors, D.E., Shipkey, G., Cumbo, T.A., 2004. Characterization of the human hepatocellular carcinoma (HEPG2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal**, **40**: 172-182.
98. De Mejia, E.G., Dia, V.P., 2010. The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells. **Cancer Metastasis Review**, **29**: 511-528
99. Möller, N.P., Scholz-Ahrens, K.E., Roos, N., Schrezenmeir, J., 2008. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects . **European Journal of Nutrition** **47**: 171-182.
100. Kannan, A., Hettiarachchy, N.S., Lay, J.O., Liyanage R., 2010. Human cancer cell proliferation inhibition by a pentapeptide isolated and characterized from rice bran Peptides, **Open Bioactive Compound Journal**, **31**:1629-1634
101. Wei Y., Popovich D.G., 2013. Red azaphilone pigments extracted from red yeast rice induces cellular senescence and reduces viability in HepG2 cells. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, **3**: 331-337.
102. Li, J., Zhang, J., He H., Ma, Z., Nie, Z., Wang, Z., Xu, X., 2013. Apoptosis in human hepatoma HepG2 cells induced by corn peptides and its anti-tumor efficacy in H22 tumor bearing mice. **Food and Chemical Toxicology**, **51**: 297-305.
103. AOAC. 1995. Official Methods of Analytical Chemist. 5th Edition. Washington, USA.
104. Wang, M., Qi, W., Burks, W., Siebenmorgen, T., 1990. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **47**: 411-416.
105. Chittapalo, T., Noomhorm, A., 2009. Ultrasonic assisted alkali extraction of protein from defatted rice bran and properties of the protein concentrates. **International Journal of Food Science & Technology**, **44**: 1843-1849.

106. Adebisi, A. P., Adebisi, A. O., Ogawa, T. and Muramoto, K. 2008. Purification and characterisation of antioxidative peptides from unfractionated rice bran protein hydrolysates. **International Journal of Food Science & Technology**, **43**: 35-43.
107. Gnanasambandam, Hettiahachy, 1995. Protein concentrate from unstabilized rice bran preparation and properties. **Journal of Food Science**, **60**: 1066-1074
108. Sağdıç, O., Silici, S., Ekici, L., 2013. Evaluation of the phenolic content and antiradical, antioxidant, antimicrobial activities of different floral sources of honey. **International Journal Of Food Properties**, **16**: 658-666.
109. Miller, N.J., Rice-Evans, C.A., 1997. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. **Food Chemistry**, **60**: 331-337.
110. Arts, I.C., Hollman, P.C., Feskens, E.J., 2001. Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, **74**: 227-32.
111. Carbone, K., Mencarelli, F., 2015. Influence of short-term postharvest ozone treatments in nitrogen or air atmosphere on the metabolic response of white wine grapes. **Food And Bioprocess Technology**, **8**: 1739-1749
112. Sanchez-Moreno, C.A., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F., 1998. a procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, **6**: 270-276.
113. Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C., Almeida, L.M., 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) assay inhibitors of membrane lipid peroxidation and assay peroxyl radical scavengers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **315**: 161-169.
114. Louis, K.S., Siegel, A.C., Levy, G.A., 2011. Comparison of Manual Versus Automated Trypan Blue Dye Exclusion Method for Cell Countingm. *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols. Series Methods In Molecular Biology*, Springer Protocols, New York, 240pp.

115. Bagchi, T.B., Sharma, S., Chattopadhyay, K., 2016. Development of NIRS models to predict protein and amylose content of brown rice and proximate compositions of rice bran. **Food Chemistry**, **191**: 21-27.
116. Hossain, M.B., Brunton, N.P., Patras, A., Tiwari, B., O'Donnell C.P., 2012. Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, **19**: 582-590.
117. Devi, R.R., Jayalekshmy, A., Arumughan C., 2007. Antioxidant efficacy of phytochemical extracts from defatted rice bran in the bulk oil system. **Food Chemistry**, **104**: 658-664
118. Azizah, A.H., Yu, S.L., 2009. Functional properties of dietary fiber prepared from defatted rice bran. **Food Chemistry**, **68**: 15-19.
119. Gurpreet, K.C., Sogi, D.S., 2007. Functional properties of rice bran protein concentrate **Journal of Food Engineering**, **79**: 592-597.
120. Parrado, J., Miramontes, E., Jover, M., Gutierrez, J.F., Collantes de Terán, L., Bautista, J., 2006. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. **Food Chemistry**, **98**: 742-748.
121. Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.-S., Chemat F., 2013. Degradation during application of ultrasound in food processing: a review. **Food Control**, **31**: 593-606.
122. Madhujith, T., Shahidi, F., 2009. Antioxidant potential of barley as affected by alkaline hydrolysis and release of insoluble-bound phenolics. **Food Chemistry**, **117** (4): 615-620.
123. Mariod, A.A., Adamu, H.A., Ismail, M., Ismail, N., 2010. Antioxidative effects of stabilized and unstabilized defatted rice bran methanolic extracts on the stability of rice bran oil under accelerated conditions. **Grasas Y Aceites**, **61**: 409-415.
124. Arab, F., Alemzadeh, I., Maghsoudi, V., 2011. Determination of antioxidant component and activity of rice bran extract. **Scientia Iranica**, **18**: 1402-1406.
125. Shao, Y., Xu, F., Sun, X., Bao, J., Beta, T., 2014. Identification and quantification of phenolic acids and anthocyanins as antioxidants in bran,

embryo and endosperm of white, red and black rice kernels (*Oryza Sativa L.*) .
Journal of Cereal Science, **59**(2): 211-218.

126. Chotimarkorn, C., Benjakul, S., Silalai, N., 2008. Antioxidant components and properties of five long-grained rice bran extracts from commercial available cultivars in Thailand. **Food Chemistry**, **111**: 636-641.
127. Farahmandfar, R., Asnaashari, M., Sayyad, R., 2015. Comparison antioxidant activity of Tarom Mahali rice bran extracted from different extraction methods and its effect on canola oil stabilization. **Journal of Food Science and Technology**, **52**: 6385-94.
128. Butsat, S., Siriamornpun, S., 2010. Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. **Food Chemistry**, **119**: 606-613.
129. Ye, F., Liang, Q., Li, H., Zhao G., 2015. Solvent effects on phenolic content, composition, and antioxidant activity of extracts from florets of sunflower (*Helianthus annuus L.*) **Industrial Crops and Products**, **76**: 574-581.
130. Vajic, U.J., Jelica, G.M., Zivkovic, J., Savikin, K., Godevac, D., Miloradovic, Z., Bugarski, B., Nevena M.S., 2015. Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, **74**: 912-917.
131. Nabyala, K.K., Lila, B.M., Madani, K., 2014. Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. **Industrial Crops and Products**, **61**: 41-48.
132. Inglett, G.E., Chen, D., Berhow, M., 2011. Antioxidant activity of commercial buckwheat flours and their free and bound phenolic compositions. **Food Chemistry**, **125**: 923-929.
133. Martins, S., Mussatto, S.I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C.N., Teixeira, J.A., 2011. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation, A review. **Biotechnology Advances**, **29**: 365-373.
134. Nigam P.S., 2009. Production of Bioactive Secondary Metabolites. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization*. Springer, New York, 145pp.

135. Rai, S., Wahile, A., Mukherjee, K., Saha, B.P., Mukherjee P.K., 2006. Antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* (sacred lotus) seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, **104**: 322-327.
136. Saleem, M., Kim, H.J., Ali, M.S., Lee, Y.S., 2005. An update on bioactive plant lignans, **Natural Product Reports**, **22**: 696-716.
137. Bidlack W., 1999. Phytochemicals As Bioactive Agents, Technomic Publishing Co., Inc., CRC Press, Switzerland, 274pp.
138. Seetharamaiah, G.S., Chandrasekhara, N., 1989. Studies on hypocholesterolemic activity of rice bran oil. **Atherosclerosis**, **78**: 219-223.
139. Nicolosi, R.J., Rogers, E.J., Ausman, L.M., Rogers, E.L., 1997. Health Benefits of Unsaponifiable Constituents of Fats and Oils: **New Technologies For Healthy Foods And Nutraceuticals**, Marcel Dekker press, New York, 101pp.
140. Duve, J.K., White, P.J., 1991. Extraction and identification of antioxidants in oats. **Journal of American Oil Chemists Society**, **68**: 365-370
141. Xu, Z., Hua, N., Godber, J.S., 2001. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and γ -oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2-azobis (2-methyl propionamide) dihydrochloride. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **49**: 2077-2081.
142. Zigoneanu, I.G., Williams, L., Xu, Z., Sabliov, C.M., 2008. Determination of antioxidant components in rice bran oil extracted by microwave-assisted method. **Bioresource Technology**, **99**: 4910-4918.
143. Premakumara, G.A.S., Abeysekera, W.K.S.M., Ratnasooriya, W.D., Chandrasekharan, N.V., Bentota, A.P., 2013. Antioxidant, anti-amylase and anti-glycation potential of brans of some sri lankan traditional and improved rice (*oryza satival.*) varieties. **Journal of Cereal Science**, **58**: 451-456.
144. Santa-María, C., Revilla, E., Miramontes, E., Bautista, J., García-Martínez, A., Romero, E., Carballo, M., Parrado, J., 2010. Protection against free radicals (UVB irradiation) of a water-soluble enzymatic extract from rice bran.

- Study using human keratinocyte monolayer and reconstructed human epidermis. **Food and Chemical Toxicology**, 48: 83-88.
145. Rufino, M.S.M., Fernandes, F.A.N., Alves, R.E., Brito, E.S., 2009. Free radical-scavenging behavior of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system **Food Chemistry**, 114: 693-695.
 146. Sakanaka, S., Tachibana, Y., Okada Y., 2005. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha) **Food Chemistry**, 89: 569–575.
 147. Zhang, Z., Wei, T., Hou, J., Li, G., Yu, S., Xin, W., 2003. Iron-induced oxidative damage and apoptosis in cerebellar granule cells: attenuation by tetramethylpyrazine and ferulic acid. **European Journal of Pharmacology**, 25: 41-47.
 148. Wattanasiritham, L., Theerakulkait, C., Wickramasekara, S., Maier, C.S., Stevens, J.F., 2016. Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. **Food Chemistry**, 192: 156-162.
 149. Elias, R.J., Kellerby, S.S., Decker, E.A., 2008. Antioxidant activity of proteins and peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 48: 430-441.
 150. Srinivasan, M., Sudheer, A.R., Menon, V.P., 2007. Ferulic acid: therapeutic potential through its antioxidant property **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, 40: 92-100.
 151. Liyana-Pathirana, C., Shahidian antioxidant, F., 2007. free radical scavenging activities of whole wheat and milling fractions. **Food Chemistry**, 101: 1151-1157.
 152. Ghasemzadeh, A., Jaafar H.Z.E., Juraimi S.A., Tayebi-Meigooni A., 2015. comparative evaluation of different extraction techniques and solvents for the assay of phytochemicals and antioxidant activity of hashemi rice bran. **Molecules**, 20: 10822-10838.
 153. Zhu, K., Zhou, H., Qian, H., 2006. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (wgph) prepared with alcalase. **Process Biochemistry (Amsterdam, Netherlands)**, 41: 1296-1302.

154. Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **53**: 4290-4302.
155. Jariwalla, R.J., 2001. Rice-bran products: phytonutrients with potential applications in preventive and clinical medicine. **Drugs Under Experimental and Clinical Research**, **27**: 17-26.
156. Xie, Z., Huang, J., Xu, X., Jin, Z., 2008 . Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. **Food Chemistry**, **111**: 370-376.
157. Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y.L., Xia, X., 2010. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. **Food Chemistry**, **118**: 403-410.
158. Udenigwe, C.C., Aluko, R.E., 2011. Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates. **International Journal of Molecular Sciences**, **12**: 3148-3161.
159. Aguilar-Garci, C., Gavino, G., Baragaño-Mosqueda, M., Hevia, P., Gavino V.C., 2007. Correlation of tocopherol, tocotrienol, γ -oryzanol, and total polyphenol content in rice bran with different antioxidant capacity assays. **Food Chemistry**, **102**: 1228-1232.
160. Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **46**: 4113-4117.
161. Shoemaker, M., Hamilton, B., Dairkee, S.H., Cohen, I. and Campbell, M.J. 2005. In vitro anticancer activity of twelve Chinese medicinal herbs. **Phytotherapy Research**, **19**: 649-651.
162. Kaefer, C.M., Milner, J.A. 2008. The role of herbs and spices in cancer prevention. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, **19**: 347-361.
163. Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam R., 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food Bioproducts Processing**, **89**: 217-233.

164. Yasukawa, K., Akihisa, T., Kimura, Y., Tamura, T., Takido, M., 1998. Inhibitory effect of cycloartenol ferulate, a component of rice bran, on tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, **21**: 1072-1076.
165. Kim, S.P., Kang, M.Y., Nam, SH, Friedman, M., 2012. Dietary rice bran component γ -oryzanol inhibits tumour growth in tumour bearing mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, **56**: 935-944.
166. Kawamura, Y., Muramoto, M., Waldron, K.W., Johnson, I.T., Fenwick, L.R., 1993. Anti-tumorigenic and immunoactive protein and peptide factors in foodstuffs 2. anti-tumorigenic factors in rice bran. **Food Cancer Prevention: Chemical And Biological Aspects**, **10**: 331-401.
167. Packer, L., Weber, S.U., Rimbach G., 2001. Molecular aspects of α -tocotrienol antioxidant action and cell signaling. **Journal of Nutrition**, **131**: 369-373.
168. Liu, R.H., Sun, J., 2003. Antiproliferative activity of apples is not due to phenolic-induced hydrogen peroxide formation, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **51**: 1718-1723.
169. Kannan, A., Hettiarachchy, N., Narayan, S., 2009. Colon and breast anti-cancer effects of peptide hydrolysates derived from rice bran. **Open Bioactive Compound Journal**, **2**:17-20.
170. Genevieve, M., Forster, A., Raina, B.K., Ajay Kumar, A, Sushil Kumar, B, Rajesh Agarwal B.C., Ming-Hsuan Chen, D., John, E., Bauer, E., Anna, M., McClung, D., Elizabeth, P., 2013. Rice varietal differences in bioactive bran components for inhibition of colorectal cancer cell growth. **Food Chemistry**, **141**: 1545-1552.
171. Revilla, E., Santa-María, C., Miramontes, E., Candiracci, M., Rodríguez-Morgado, B., Carballo, M., Bautista, J., Castaño, A., Parrado, J., 2013. Antiproliferative and immunoactivatory ability of an enzymatic extract from rice bran. **Food Chemistry**, **136**: 526-531.
172. Leardkamolkarn, V., Thongthep, W., Suttiarporn, P., Kongkachuichai, R., Wongpornchai, S., Wanavijitr, A., 2011. Chemopreventive properties of the

bran extracted from a newly-developed thai rice: the riceberry. **Food Chemistry**, **125**: 978-985.

173. Lee, Y.S., 2005. Role of NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species in the mechanism of apoptosis induced by phenolic acids in HepG2 human hepatoma cells. **Archives of Pharmacal Research**, **28**: 1183-1189.



EKLER

Ek 1. Protein Verimi Optimizasyonu İçin Yapılan Bradford Analizi Ham Verileri

Örnekler	Veriler				
1	0,7338	0,7728	0,7851	0,7689	0,7439
2	0,8227	0,8159	0,8309	0,8105	0,8029
3	0,9281	0,9445	0,9432	0,9233	0,9172
4	0,9831	0,9786	0,9352	0,9764	-
5	0,9680	0,9965	0,9693	0,9685	0,9281
6	0,9854	0,9854	0,9854	0,9854	0,9854
7	0,8084	0,8015	0,8076	0,8101	0,7735
8	0,8424	0,8529	0,8215	0,7974	0,8359
9	0,9444	0,9190	0,9200	0,9235	0,9255
10	0,9799	0,9836	0,9569	0,9515	0,9474
11	0,7790	0,7674	0,7877	0,7926	0,7911
12	0,9597	0,9507	1,0090	0,9515	-
13	0,9759	0,9585	0,9676	0,9827	0,9558
14	0,9957	1,0032	0,9757	0,9545	-
15	0,9599	0,9659	0,9593	0,9654	-
16	1,0057	0,9917	0,9980	0,9892	0,9936
17	1,0084	0,9838	1,0185	1,0160	0,9824
18	1,0242	1,0398	1,0231	1,0507	1,0128
19	0,9378	0,9384	0,9476	0,9516	0,9297
20	0,9979	1,0063	0,9868	1,0166	0,9690
Kontrol	0,549	0,547	0,5498	0,5749	0,5759

Ek 2. Bradford Analizi İçin Çizilen Bsa Standart Kurve Ham Verileri

BSA Miktarı	0.2 mg/mL	0.5mg/mL	0.6mg/mL	0.8mg/mL
	0,4364	0,5222	0,529	0,5538
	0,4401	0,5303	0,547	0,5585
	0,4563	0,5038	0,5638	0,5821
	0,4499	0,532	0,5577	0,5591
	0,4716	0,548	-	-

Ek 3. Yüz Kat Seyreltilmiş Örneklerin Fenolik Bileşen Analizine Ait Ham Veriler

Örnek No	Veriler			Örnek No	Veriler		
Kontrol	0,251	0,25	0,252	Kontrol	0,249	0,251	0,254
1	0,24	0,239	0,237	1	0,241	0,239	0,239
2	0,246	0,247	0,247	2	0,252	0,245	0,255
3	0,259	0,258	0,264	3	0,268	0,263	0,263
4	0,258	0,261	0,26	4	0,259	0,259	0,261
Gallik asit standart grafiği için elde edilen veriler							
0,2 mg/mL	0,4 mg/mL		0,6 mg/mL		0,8mg/mL		
0,1723	0,3305		0,5356		0,7465		
0,1761	0,3519		0,5360		0,6007		
0,1747	0,3496		0,5327		0,6304		
0,1765	0,3807		0,5262		0,6916		
0,1734	0,3587		0,5519		0,8802		

Ek 4. Örneklerin DPPH Süpürücü Aktivite Analizine Ait Ham Veriler

1/25						
	Kör	Kontrol	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4
	1,535	0,595	0,699	0,677	0,714	0,545
	1,535	0,614	0,693	0,514	0,719	0,619
		0,604	0,76	0,692	0,763	0,538
		0,6	0,669	0,703	0,69	0,532
		0,632	0,657	0,691	0,582	
1/100						
	Kör	Kontrol	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4
	1,533	1,399	1,42	1,435	1,432	1,394
	1,529	1,4	1,428	1,42	1,434	1,397
		1,41	1,421	1,42	1,435	1,371
		1,407	1,446	1,427	1,44	1,393
		1,391	1,421	1,428	1,427	1,344
1/200						
	Kör	Kontrol	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4
	1,536	1,423	1,453	1,459	1,465	1,447
	1,531	1,447	1,468	1,461	1,473	1,446
		1,45	1,45	1,468	1,478	1,448
		1,46	1,438	1,467	1,484	1,45
		1,43	1,464	1,47	1,479	1,447
1/25						
	Kör	Kontrol	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4
	1,361	0,575	0,279	0,519	0,681	0,494
	1,332	0,572	0,569	0,516	0,292	0,308
		0,546	0,608	0,304	0,586	0,501
		0,375	0,275	0,65	0,576	0,494
		0,278	0,77	0,75	0,577	0,492
1/100						
	Kör	Kontrol	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4
	1,042	0,771	0,874	0,792	0,89	0,861
	1,038	0,862	0,899	0,869	0,854	0,862
	1,045	0,882	0,892	0,888	0,89	0,827
		0,848	0,881	0,905	0,882	0,905
		0,883	0,871	0,875	0,912	0,846
1/200						
	Kör	Kontrol	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4
	1,002	0,939	0,931	0,844	0,953	0,907
	1,018	0,938	0,933	0,94	0,953	0,904
	1,04	0,877	0,934	0,941	0,945	0,924
		0,931	0,942	0,905	0,928	0,922
			0,929	0,944	0,939	0,965

Ek 5. Örneklerin Toplam Antioksidan Aktivite (Teac) Analizine Ait Ham Veriler

Örnekler	Kontrol	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Kontrol
	0,358	0,367	0,39	0,348	0,312	0,329
	0,355	0,386	0,395	0,336	0,328	0,278
	0,38	0,326	0,385	0,337	0,304	0,284
	0,364	0,397	0,386	0,345	0,396	0,307
	-	-	-	-	-	0,314
kör	0,775					
Örnekler	Kontrol	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Kontrol
	0,329	0,378	0,37	0,348	0,258	0,329
	0,278	0,344	0,327	0,316	0,25	0,278
	0,284	0,364	0,367	0,346	0,259	0,284
	0,307	0,381	0,334	0,336	0,264	0,307
	0,314	-	0,333		0,301	0,314
kör	0,742					

Ek 6. Antioksidan Aktivitenin Değerlendirilmesi İçin Çizilen Trolox Kurve Ham Verileri

Trolox Miktarı	2,48 µg/ml	4,96 µg/ml	7,44 µg/ml	9,52 µg/ml
	0,59	0,433	0,294	0,121
	0,587	0,438	0,27	0,122
	0,577	0,422	0,258	0,197
	0,58	0,424	0,267	0,143
	0,58	0,462	0,264	0,085
	0,5828	0,4358	0,2706	0,1336

EK 7. Örneklerin Metal Şelatlama Analizine Ait Ham Veriler

1mg/mL					
Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Kontrol	Kör
0,236	0,209	0,220	0,176	0,261	0,394
0,217	0,204	0,216	0,176	0,260	0,386
2mg/mL					
Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Kontrol	Kör
0,127	0,104	0,089	0,128	0,104	0,522
0,098	0,1	0,094	0,11	0,107	0,512
0,114	0,106	0,1	0,105	0,114	-
0,09	0,105	0,095	0,105	0,19	-
0,106	0,109	0,097	0,123	0,119	-
5mg/ml					
Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Kontrol	Kör
0,067	0,062	0,049	0,051	0,05	0,58
0,061	0,062	0,055	0,048	0,051	0,507
0,055	0,07	0,07	0,054	0,052	-
0,061	0,059	0,05	0,055	0,058	-
0,058	--	0,074	0,077	0,06	-
1mg/mL					
Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Kontrol	Kör
0,233	0,204	0,202	0,171	0,241	0,396
0,235	0,212	0,204	0,171	0,261	0,377
2mg/mL					
Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Kontrol	Kör
0,079	0,074	0,068	0,061	0,078	0,394
0,082	0,073	0,072	0,073	0,078	0,396
0,080	0,076	0,071	0,07	0,079	-
0,079	0,071	0,073	0,074	-	-
0,079	0,074	0,068	0,061	0,078	-
5mg/ml					
Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Kontrol	Kör
0,040	0,038	0,031	0,036	0,031	0,394
0,051	0,032	0,031	0,045	0,038	0,396
0,033	0,038	0,032	0,027	0,027	-
0,043	0,038	0,034	0,026	0,037	-
0,061	0,035	0,035	0,031	0,049	-

EK 8. Örneklerin Sitotoksosite Analizine Ait Ham Veriler

	Kontrol Tampon			Kontrol Örneği (Güç:%0)			Örnek 1 (Güç:%20)		
Oran	1mg/mL	0,2mg/mL	0,4mg/mL	1mg/mL	0,2mg/mL	0,4mg/mL	1mg/mL	0,2mg/mL	0,4mg/mL
Hücre Sayısı TEKERRÜR	40	39	50	9	24	42	11	25	42
	38	51	66	5	14	32	2	22	30
	780000	900000	1160000	140000	380000	740000	130000	470000	720000
	45	50	50	4	29	32	7	31	33
	30	35	56	11	13	46	5	20	40
Hücre Sayısı	750000	850000	1060000	150000	420000	780000	120000	510000	730000
Ortalama	765000	875000	1110000	145000	400000	760000	125000	490000	725000
	Örnek 2 (güç:%48,25)			örnek 3 (güç:%65,91)			Örnek 4 (güç:%100)		
Oran	1mg/mL	0,2mg/mL	0,4mg/mL	1mg/mL	0,2mg/mL	0,4mg/mL	1mg/mL	0,2mg/mL	0,4mg/mL
Hücre Sayısı TEKERRÜR	9	26	47	7	22	37	18	37	44
	8	29	48	19	22	38	18	24	27
	170000	550000	950000	260000	470000	750000	360000	630000	710000
	7	18	41	11	19	27	19	14	39
	14	32	54	13	28	41	15	43	32
Hücre Sayısı	210000	500000	950000	240000	440000	680000	370000	400000	710000
Ortalama	190000	525000	950000	250000	455000	715000	340000	570000	710000

Ek 9. Pirinç Kepeğinin Kuru Madde, Yağ Ve Protein Analizi Ham Verileri

Yağ	Nem	Protein
15,4	14,82	1,767
15,4	14,9	1,761

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Elif Meltem İŞÇİMEN
 Uyuğu : TC
 Doğum Yeri ve Tarihi : Yenimahalle 21.04.1990
 İletişim Adresi :Erciyes Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda
 Mühendisliği Bölümü
 E-posta : eliferen@erciyes.edu.tr
 İş Tel : 352 207 66 66 - 32758

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü	2013- Devam Ediyor
Lisans	Erciyes Üniversitesi- Mühendislik Fakültesi	2009- 2013

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Kurum	Görev
2013-2015	Erciyes Üniversitesi	Tübitak Proje Asistanı
2015 -	Erciyes Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce (YDS:81,25)