

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI PİŞİRME YÖNTEMLERİNİN SİYAH PİRİNCİN FENOLİK
BİLEŞENLERİ VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Gizem SAVAŞ**

Anabilim Dalı : Gıda Mühendisliği

Programı : Gıda Mühendisliği

OCAK 2011

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI PİŞİRME YÖNTEMLERİNİN SİYAH PİRİNCİN FENOLİK
BİLEŞENLERİ VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gizem SAVAŞ

(506081507)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 20 Aralık 2010

Tezin Savunulduğu Tarih : 27 Ocak 2011

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Neşe ŞAHİN YEŞİLÇUBUK (İTÜ)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Dilek BOYACIOĞLU (İTÜ)
Prof. Dr. Z. Selma TÜRKAY (İTÜ)

OCAK 2011

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince desteğini gördüğüm herkese, ama özellikle yüksek lisans eğitimim süresince her konuda danıştığım ve değerli fikirleri ile beni yönlendiren sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Neşe Şahin Yeşilçubuk'a ve deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Dr. Esra Çapanoğlu Güven'e saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez süresince bana hep destek olan sevgili eşim Murat Tekten'e, ilgi ve sevgileri ile bana her zaman güç veren canım aileme teşekkür ederim.

Aralık 2010

Gizem SAVAŞ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	xiv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Serbest Radikaller, Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma	3
2.2 Fenolik Bileşikler	7
2.2.1 Fenolik asitler.....	8
2.2.2 Flavonoidler	9
2.2.2.1 Antosiyanidinler	11
2.3 Gıdaların Fenolik İçeriğine Pişirmenin Etkisi.....	12
2.4 Kullanılan Örneğe İlişkin Literatür Bilgisi	13
2.4.1 Pirinç	13
2.4.2 Siyah pirinç	14
2.4.3 Siyah pirinç fenolikleri üzerine yapılan bazı çalışmalar	17
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	19
3.1 Malzeme	19
3.1.1 Pirinç örnekleri.....	19
3.1.2 Pirinç örneklerinin hazırlanması	19
3.1.3 Analizlerde kullanılan kimyasallar	19
3.2 Yöntemler.....	20
3.2.1 Siyah pirinç örneklerinin ekstraksiyonu	20
3.2.2 Toplam fenolik madde miktarı tayini.....	20
3.2.3 Toplam flavonoid miktarı tayini	21
3.2.4 Toplam antosiyanin miktarı tayini	21
3.2.5 Antioksidan aktivitesi tayinleri	21
3.2.5.1 DPPH metodu ile toplam antioksidan aktivitesi tayini	22
3.2.5.2 ABTS metodu ile toplam antioksidan aktivitesi tayini	22
3.2.5.3 FRAP metodu ile toplam antioksidan aktivitesi tayini	22
3.2.5.4 CUPRAC metodu ile toplam antioksidan aktivitesi tayini	23
3.2.6 Antosiyanin profillerinin belirlenmesi	23
3.2.7 İstatistiksel analiz	24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	25
4.1 Toplam Fenolik Madde Miktarı	25
4.2 Toplam Flavonoid Miktarı	28
4.3 Toplam Antosiyanin Miktarı	31

4.4 Antioksidan Aktivitesi Tayinleri	34
4.4.1 DPPH metodu ile toplam antioksidan aktivitesi tayini	34
4.4.2 ABTS metodu ile toplam antosiyanin aktivitesi tayini	37
4.4.3 FRAP metodu ile toplam antioksidan aktivitesi tayini	40
4.4.4 CUPRAC metodu ile toplam antioksidan aktivitesi tayini	42
4.5 Siyah Pirinç Örneklerinin Antosiyanin Profilleri.....	44
4.6 Genel Değerlendirme	49
5. SONUÇ.....	53
KAYNAKLAR	55
EKLER.....	61

KISALTMALAR

ABTS	: 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiyazolin-6sulfonik asit
BHA	: Butillendirilmiş hidroksianisol
BHT	: Butillendirilmiş hidroksitoluen
CAT	: Katalaz
CUPRAC	: Bakır(II) indirgeyici antioksidan aktivitesi
DHAA	: Dehidroaskorbik asit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH	: Difenilpikrilhidrazil
FRAP	: Demir (III) indirgeyici antioksidan kapasitesi
G6PD	: Glukoz 6-fosfat dehidrojenaz
GAE	: Gallik asit eşdeğerliği
GC-MS	: Gaz kromatografisi – kütle spektrometresi
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HPLC-ECD	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi - elektrokimyasal tanıma
LC-MS	: Sıvı kromatografisi - kütle spektrometresi
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
MDA	: Malondialdehid
mtDNA	: Mitokondriyal deoksiribonükleik asit
PG	: Propil galat
RE	: Rutin eşdeğerliği
RER	: Granüllü endoplazmik retikulum
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SER	: Granülsüz endoplazmik retikulum
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBHQ	: Tersiyerbutil hidrokinon
TEAC	: Troloks eşdeğerliği antioksidan kapasitesi
TPTZ	: 2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine
UV	: Ultraviyole

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 : Reaktif oksijen türleri.....	4
Çizelge 2.2 : Siyah pirinç kompozisyonu.....	16
Çizelge 3.1 : Siyah pirinç örneklerinin antosiyanin profillerinin belirlenmesinde uygulanan yöntemin HPLC çalışma koşulları.....	23
Çizelge 3.2 : Siyah pirinç örneklerinin antosiyanin profillerinin belirlenmesinde uygulanan yöntemin HPLC gradient koşulları.....	24
Çizelge 4.1 : Siyah pirinç örneklerin toplam fenolik madde miktarları.....	25
Çizelge 4.2 : Siyah pirinç örneklerinin toplam flavonoid miktarları.....	29
Çizelge 4.3 : Siyah pirinç örneklerinin toplam antosiyanin miktarları.....	31
Çizelge 4.4 : Siyah pirinç örneklerinin DPPH metodu ile toplam antioksidan aktiviteleri.....	35
Çizelge 4.5 : Siyah pirinç örneklerinin ABTS metodu ile toplam antioksidan aktiviteleri.....	38
Çizelge 4.6 : Siyah pirinç örneklerinin FRAP metodu ile toplam antioksidan aktiviteleri.....	40
Çizelge 4.7 : Siyah pirinç örneklerinin CUPRAC metodu ile toplam antioksidan aktiviteleri.....	43
Çizelge 4.8 : Standartlara ait kolonda alıkonma süreleri.....	45
Çizelge 4.9 : Siyah pirinç örneklerinin HPLC analizi ile siyanidin 3-glikozit miktarları.....	46
Çizelge 4.10 : Siyah pirinç örneklerinin HPLC analizi ile peonidin 3-glikozit miktarları.....	47
Çizelge C.1 : Siyah pirinç örneklerine uygulanan farklı analizlere ait istatistiksel analiz (tek-yollu ANOVA) sonuçları.....	65
Çizelge E.1 : Siyah pirinç örneklerinin HPLC analizi sonuçları.....	72

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Serbest radikallerin kaynakları.....	5
Şekil 2.2 : Oksidatif stresin şematik olarak ifadesi.....	5
Şekil 2.3 : Oksidatif stresin hücrede neden olduğu hasarlar.....	6
Şekil 2.4: Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması.	8
Şekil 2.5 : Fenolik asitlerin genel yapısı: a) Benzoik asit. b) Sinamik asit.	9
Şekil 2.6 : Flavonoidlerin genel yapısı.	10
Şekil 2.7 : Flavonoid alt gruplarının temel kimyasal yapıları.	10
Şekil 2.8 : Antosiyanidinler ve antosiyanin pigmentlerinin yapısı.....	11
Şekil 2.9 : Çeltiği pirince işleme akış diyagramı.	14
Şekil 2.10 : Siyanidin 3-glikozit.	15
Şekil 2.11 : Peonidin 3-glikozit.	16
Şekil 4.1 : Siyah pirinç örneklerinin ortalama toplam fenolik madde miktarları.	26
Şekil 4.2 : Pişmiş siyah pirinç örneklerinin toplam fenolik madde miktarlarındaki azalma.	26
Şekil 4.3 : Siyah pirinç örneklerinin ortalama toplam flavonoid miktarları.....	29
Şekil 4.4 : Pişmiş siyah pirinç örneklerinin toplam flavonoid miktarlarındaki azalma.	30
Şekil 4.5 : Siyah pirinç örneklerinin ortalama toplam antosiyanin miktarları.....	32
Şekil 4.6 : Pişmiş siyah pirinç örneklerinin toplam antosiyanin miktarlarındaki azalma.	32
Şekil 4.7 : Siyah pirinç örneklerinin DPPH metoduna göre belirlenen ortalama antioksidan aktiviteleri.	35
Şekil 4.8 : Siyah pirinç örneklerinin DPPH metoduna göre belirlenen ortalama antioksidan aktivitelerindeki azalma.....	36
Şekil 4.9 : Siyah pirinç örneklerinin ABTS metoduna göre belirlenen ortalama antioksidan aktiviteleri.	38
Şekil 4.10 : Siyah pirinç örneklerinin ABTS metoduna göre belirlenen ortalama antioksidan aktivitelerindeki azalma.....	39
Şekil 4.11 : Siyah pirinç örneklerinin FRAP metoduna göre belirlenen ortalama antioksidan aktiviteleri.	41
Şekil 4.12 : Siyah pirinç örneklerinin FRAP metoduna göre belirlenen ortalama antioksidan aktivitelerindeki azalma.....	41
Şekil 4.13 : Siyah pirinç örneklerinin CUPRAC metoduna göre belirlenen ortalama antioksidan aktiviteleri.	43
Şekil 4.14 : Siyah pirinç örneklerinin CUPRAC metoduna göre belirlenen ortalama antioksidan aktivitelerindeki azalma.....	44
Şekil 4.15 : P kodlu siyah pirinç örneği HPLC kromatogramı.....	45
Şekil 4.16 : D kodlu siyah pirinç örneği HPLC kromatogramı.	45
Şekil 4.17 : Siyah pirinç örneklerinin HPLC analizi ile belirlenen ortalama siyanidin 3-glikozit miktarları.....	46

Şekil 4.18 : Siyah pirinç örneklerinin HPLC analizi ile belirlenen ortalama siyanidin 3-glikozit miktarlarındaki azalma.....	47
Şekil 4.19 : Siyah pirinç örneklerinin HPLC analizi ile belirlenen ortalama peonidin 3-glikozit miktarları.	48
Şekil 4.20 : Siyah pirinç örneklerinin HPLC analizi ile belirlenen ortalama peonidin 3-glikozit miktarlarındaki azalma.	48
Şekil A.1 : Gallik asit kalibrasyon eğrisi.	62
Şekil A.2 : Rutin kalibrasyon eğrisi.....	62
Şekil A.3 : DPPH metodu troloks kalibrasyon eğrisi.	62
Şekil A.4 : ABTS metodu troloks kalibrasyon eğrisi.	63
Şekil A.5 : FRAP metodu troloks kalibrasyon eğrisi.	63
Şekil A.6 : CUPRAC metodu troloks kalibrasyon eğrisi.	63
Şekil B.1 : Siyanidin 3-glikozit standartı kalibrasyon eğrisi.	64
Şekil B.2 : Peonidin 3-glikozit standartı kalibrasyon eğrisi.	64
Şekil D.1 : Toplam fenolik madde ve DPPH regresyon grafiği.	67
Şekil D.2 : Toplam fenolik madde ve ABTS regresyon grafiği.	67
Şekil D.3 : Toplam fenolik madde ve FRAP regresyon grafiği.	67
Şekil D.4 : Toplam fenolik madde ve CUPRAC regresyon grafiği.	68
Şekil D.5 : Toplam flavonoid ve DPPH regresyon grafiği.....	68
Şekil D.6 : Toplam flavonoid ve ABTS regresyon grafiği.....	68
Şekil D.7 : Toplam flavonoid ve FRAP regresyon grafiği.	69
Şekil D.8 : Toplam flavonoid ve CUPRAC regresyon grafiği.	69
Şekil D.9 : Toplam antosiyanin ve DPPH regresyon grafiği.....	69
Şekil D.10 : Toplam antosiyanin ve ABTS regresyon grafiği.....	70
Şekil D.11 : Toplam antosiyanin ve FRAP regresyon grafiği.....	70
Şekil D.12 : Toplam antosiyanin ve CUPRAC regresyon grafiği.....	70
Şekil D.13 : Toplam fenolik madde ve toplam flavonoid regresyon grafiği.....	71
Şekil D.14 : Toplam antosiyanin ve toplam fenolik madde regresyon grafiği.....	71
Şekil D.15 : Toplam antosiyanin ve toplam flavonoid regresyon grafiği.	71

FARKLI PİŞİRME YÖNTEMLERİNİN SİYAH PİRİNCİN FENOLİK BİLEŞENLERİ VE ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

ÖZET

Pirinç, dünya nüfusunun yarısından fazlası için beslenmede büyük önem taşıyan bir hububat çeşididir. Son zamanlarda doğal yollarla alınan antioksidanların öneminin daha iyi bilinmesiyle birlikte farklı renklerdeki pirinç türlerine olan ilgide de artış olmuştur. Bunların arasında özellikle siyah pirinç oldukça önemli bir pirinç çeşididir ve adını antioksidatif aktivite gösteren yüksek miktardaki polifenol içeriğinden almaktadır.

Bu çalışmada siyah pirincin fenolik içeriği ve antioksidan kapasitesi incelenmiş ve farklı pişirme yöntemlerinin fenolik içeriğini ve antioksidan kapasitesini nasıl etkilediği araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda Türkiye’de satışa sunulan tek bir markanın siyah pirinci ile çalışılmıştır. Pirinç pişiricide (R), elektrikli düdüklü tencerede (E), tüplü ocak üstündeki düdüklü tencerede (D) ve tüplü ocak üstündeki teflon tencerede (N) olmak üzere 4 farklı ev tipi pişirme yöntemi kullanılmıştır. Siyah pirinç örneklerinin fenolik madde içerikleri ve antioksidan aktiviteleri çeşitli metotlar ile tespit edildikten sonra fenolik madde profilleri HPLC metodu ile belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan siyah pirinç örneklerinin toplam fenolik madde, toplam flavonoid, toplam antosiyanin ve toplam antioksidan aktivite tayinleri için uygulanan metotlarda kullanılmak üzere ekstraktlar hazırlanmıştır. Uygun çözgen sisteminin hazırlanmasında literatürdeki çalışmalar esas alınarak ekstraksiyon için %1 HCl ile asitlendirilmiş metanol kullanılmıştır.

Örneklerin toplam fenolik madde içerikleri Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve sonuçlar mg gallik asit / 100 g kuru madde cinsinden ifade edilmiştir. Analiz sonunda pişmemiş siyah pirinç örneklerinin ortalama toplam fenolik madde miktarı 2671,2 mg GAE / 100 g kuru madde olarak hesaplanmış, pişirme işlemi sonunda pirinç örneklerindeki yüzde azalma ise D, N, E ve R için sırasıyla %38,4, %45,1, %46,3 ve %51 olarak bulunmuştur.

Toplam flavonoid miktarı analizinde siyah pirinç örneklerin flavonoid miktarı rutin eşdeğerliği (RE) olarak ifade edilmiştir. Pişmemiş siyah pirinç örneklerinin ortalama toplam flavonoid miktarı 219,1 mg RE / 100 g kuru madde olarak bulunmuştur. Pişirme işlemi sonucunda uygulanan tüm pişirme metotlarında pişmemiş siyah pirince göre azalma olmuştur. Toplam flavonoid miktarında en yüksek azalma pirinç pişiricide pişen siyah pirinç örneklerinde, en düşük azalma ise tüplü gaz üzerindeki teflon tencerede pişen siyah pirinç örneklerinde görülmüştür. Toplam flavonoid miktarlarındaki azalma R, E, D ve N için sırasıyla %53, %43, %40,5 ve %32,2 olarak bulunmuştur.

Toplam antosiyanin miktarı analizinde siyah pirinç örneklerin antosiyanin miktarı siyanidin 3-glikozit cinsinden ifade edilmiştir. Pişmemiş siyah pirinç örneklerinin

ortalama toplam antosiyanin miktarı 226,4 mg siyanidin 3-glikozit / 100 g kuru madde olarak bulunmuştur. Pişirme işlemi sonucunda örneklerde gözlenen toplam antosiyanin miktarlarındaki azalma E, N, R ve D için sırasıyla %66,7, %70,1, %77 ve %79,7 şeklindedir.

Toplam antioksidan aktivitesi tayininde DPPH, ABTS, FRAP ve CUPRAC yöntemleri kullanılmış ve siyah pirinç örneklerin antioksidan aktivitesi troloks eşdeğerliği antioksidan kapasite (TEAC) cinsinden ifade edilmiştir.

DPPH metodu ile analiz sonucunda pişmemiş siyah pirinç örneklerinin ortalama toplam antioksidan kapasitesi 2520,2 $\mu\text{mol TEAC} / 100 \text{ g}$ kuru madde, pişirme işlemi sonucu gerçekleşen toplam antioksidan aktivitesindeki azalma ise D, N, E ve R için sırasıyla %11,2, %13,7, %23,9 ve %25,8 şeklinde gözlenmiştir. Pişmemiş siyah pirinç örneklerinin ABTS metodu ile hesaplanan ortalama toplam antioksidan kapasitesi 2763,2 $\mu\text{mol TEAC} / 100 \text{ g}$ kuru madde, pişirme işlemi sonucu gerçekleşen toplam antioksidan aktivitesindeki azalma D, N, E ve R için sırasıyla %45,2, %57,9, %61 ve %73,1 olarak bulunmuştur.

FRAP metodu ile hesaplanan pişmemiş siyah pirinç örneklerinin ortalama toplam antioksidan kapasitesi 2786,2 $\mu\text{mol TEAC} / 100 \text{ g}$ kuru madde ve toplam antioksidan aktivitesindeki azalma D, E, N ve R için sırasıyla %52, %56,3, %58,6 ve %60,8 şeklindedir. Pişmemiş siyah pirinç örneklerinin CUPRAC metodu ile hesaplanan ortalama toplam antioksidan kapasitesi ise 4838,5 $\mu\text{mol TEAC} / 100 \text{ g}$ kuru madde olarak bulunmuş, pişirme sonucu toplam antioksidan aktivitesindeki azalma ise D, E, N ve R için sırasıyla %43,5, %52,1, %57,9 ve %62,2 şeklinde gözlenmiştir.

Siyah pirinç örneklerinin fenolik madde profilleri HPLC metodu ile incelendiğinde ise siyanidin 3-glikozit ve peonidin 3-glikozit olmak üzere iki antosiyanin içerdiği görülmüştür. Farklı pişirme yöntemlerinden sonra siyah pirincin siyanidin 3-glikozit ve peonidin 3-glikozit miktarlarında azalmalar gözlenmiştir. Siyanidin 3-glikozit miktarında yaşanan azalma yüzdeleri N, E, R ve D kodlu siyah pirinç örnekleri için sırasıyla %75,75, %83,3, %84 ve %84,5 iken, peonidin 3-glikozit miktarında yaşanan azalma yüzdeleri N, E, R ve D kodlu siyah pirinç örnekleri için ise sırasıyla %70, %77,8, %79,4 ve %80,4'tür.

Çalışma sonunda, siyah pirincin oldukça yüksek polifenol içeriğe sahip olduğu görülmektedir. Ancak bu yüksek içerik pişirme işleminden etkilenmekte ve antioksidan kapasitesinde azalmalar olmaktadır. Pişirme işlemi sonucunda bile siyah pirincin benzerlerine nazaran yüksek antioksidan içeriğine sahip olduğu görülmektedir.

EFFECT OF DIFFERENT COOKING METHODS ON PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF BLACK RICE

SUMMARY

Rice is one of the most important cereal crop in diet for half of the world's population. Nowadays, with growing knowledge regarding natural antioxidants in diet, people pay more attention to different type of colored rice . Especially black rice is an important rice species and take its name from its high amount of polyphenol content which shows antioxidative activity.

In this study, phenolic content and antioxidant capacity of black rice and how phenolic content and antioxidant capacity is affected by different cooking methods were searched. For this purpose only brand for black rice which go on sale in Turkey and four different type of cooking methods such as rice cooker (R), electric pressure cooker (E), pressure cooker on a gas range (D) and teflon pot on a gas range (N) were used. First phenolic content and antioxidant activity of black rice samples, then phenolic profile by HPLC were determined.

Phenolic extracts were prepared to use in total phenolic content, total flavonoid, total anthocyanin and total antioxidant activity assays. Based on the studies in literature, the suitable solvent system for the extraction of black rice samples was contained methanol which acidified with 1% HCl.

The level of total phenolics of black rice samples were estimated using Folin-Ciocalteu method and results were expressed in mg gallic acid equivalents (GAE) per 100 g dry weight. At the end of the analysis, average phenolic content of uncooked black rice samples were 2671.2 mg GAE / 100 g dry weight, and after cooking percentage of the decrease for D, N, E and R were 38.4%, 45.1%, 46.3% and 51% respectively.

In the analysis of total flavonoid of black rice samples, results were expressed in rutin equivalents (RE) per 100 g dry weight. Average phenolic content of uncooked black rice samples were 219.1 mg RE / 100 g dry weight. At the end of the cooking in the all cooking methods, there were a significant decrease compared to uncooked black rice. Highest decrease in total flavonoid content observed in black rice samples which were cooked in rice cooker and lowest decrease in total flavonoid content observed in black rice samples which were cooked in teflon pot on a gas range. Percentage of the decrease in total flavonoid content for R, E, D and N were 53%, 43%, 40.5% and 32.2% respectively.

In total anthocyanin content assay, results were expressed as mg cyanidin 3-glucoside per 100 g dry weight. Average phenolic content of uncooked black rice samples were 226.4 mg cyanidin 3-glucoside per 100 g dry weight. After cooking percentage of the decrease for E, N, R and D were 66.7%, 70.1%, 77% and 79.7% respectively.

Results were expressed in μmol trolox equivalents antioxidant activity (TEAC) per 100 g dry weight in antioxidant activity assays by DPPH, ABTS, FRAP and CUPRAC methods.

In DPPH method average antioxidant activity of uncooked black rice samples were 2520.2 μmol TEAC per 100 g dry weight and after cooking percentage of the decrease for D, N, E and R were 11.2%, 13.7%, 23.9% and 25.8% respectively. Average antioxidant activity of black rice samples which was determined by using ABTS method were 2763.2 μmol TEAC per 100 g dry weight and after cooking percentage of the decrease for D, N, E and R were 45.2%, 57.9%, 61% and 73.1% respectively.

Average antioxidant activity of black rice samples which was determined by using FRAP method were 2786.2 μmol TEAC per 100 g dry weight and after cooking percentage of the decrease for D, E, N and R were 52%, 56.3%, 58.6% and 60.8% respectively. In the CUPRAC method antioxidant activity of black rice samples were 4838.5 μmol TEAC per 100 g dry weight and after cooking percentage of the decrease for D, E, N and R were 43.5%, 52.1%, 57.9% and 62.2% respectively.

Phenolic profile of black rice samples determined by HPLC, and the results showed that cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside are the major anthocyanins in black rice. After cooking process, there were significant decrease in the amount of cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside content of black rice samples. The decrease in the amount of cyanidin 3-glucoside content for N, E, R and D were 75.75%, 83.3%, 84% and 84.5%, while the decrease in the amount of peonidin 3-glucoside content for N, E, R and D were 70%, 77.8%, 79.4% and 80.4% respectively.

At the end of this study, it is seen that black rice has a high amounts of polyphenol content. Nevertheless, this high amounts of polyphenol content were affected by cooking and antioxidant activity of samples were decreased. Even after cooking black rice still has high antioxidant content compared to similar foods.

1. GİRİŞ

Epidemiyolojik çalışmalar, tam tahılların ve tam tahıl içeren ürünlerin beslenmede fazlaca tüketilmesi ile kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, obezite ve kanser gibi kronik hastalıkların oluşma riskini en aza indirdiğini göstermektedir. Tam tahılların sağlık açısından bu kadar faydalı olmaları eşsiz fitokimyasal içeriklerinden kaynaklanmaktadır (Zhang ve diğ., 2010). Bununla birlikte, tam tahılların sahip olduğu fitokimyasallar meyve ve sebzelerdeki kadar dikkat çekmemekte ve tam tahılların sahip olduğu bu özellikler henüz tam olarak bilinmemektedir.

Fitokimyasallar meyve, sebze, tam tahıllar ve diğer bitkisel kaynaklı gıdalarda bulunan ve karotenoidler, fenolikler, alkaloidler, azot içeren bileşikler ve organosülfür bileşikler şeklinde sınıflara ayrılan bitki bileşikleridir. Tam tahıl fitokimyasalları karotenoidler (lutein, zeaksantin, β -kriptoksantin ve β -karoten), fenolikler ve E vitamini içermektedir. Fenolikler ise fenolik asitler (p-kumarik, kaffeik, ferulik, vanillik, sirinjik asit) ve flavonoidleri (flavonol, flavon, kateşin, antosiyanin) içermektedir (Liu, R. H., 2007).

Pirinç (*Oryza sativa L.*) dünya popülasyonunun yarısı için temel gıda olan dünyanın en önemli mahsullerinden biridir. Pirincin iki ana alt türü mevcuttur; *Oryza sativa L. japonica* ve *Oryza sativa L. indica*. Geleneksel olarak, pirinç cilalanmış ve kabuk, kepek ve rüşeym fraksiyonları uzaklaştırılmış şekilde beyaz olarak tüketilmektedir. Pirinç kepeği yüksek miktarlarda lif, tokoferol, tokotrienol, orizanol, B vitamini kompleksi ve fenolik bileşikler gibi fitokimyasalları içermektedir (Kahlon, T. S., 2009). Bağışıklık sistemini kuvvetlendirme, kanser ve kalp hastalıkları risklerini azaltma fitokimyasalların en önemli fonksiyonlarındanıdır. Ayrıca fitokimyasallar pirince kırmızı, mor ve siyah gibi farklı renkler vermektedir (Zhang ve diğ., 2010).

Son yıllarda tüketicilerin sağlık konusuna olan ilgisinin artmasıyla ve gıda tercihlerinin değişmesiyle beraber, renkli mısır, pirinç ve fasulye gibi gıdalara olan talepte artış görülmektedir. Siyah pirinç besleyici özelliğinin yanında iyi bir lif, mineral ve fitokimyasal kaynağıdır. Siyah pirincin popülerlik kazanmasında oksidatif

stresi azaltıp kronik hastalıkları önleyen etkiye sahip fitokimyasal kompozisyonu, özellikle flavonoidler ve antosiyaninler, en büyük etkendir (Sompong ve diğ., 2011).

Literatürde, beyaz pirincin fitokimyasal içeriğinin ve antioksidan aktivitesinin incelendiği birçok çalışma mevcut olmasına rağmen siyah pirincin sahip olduğu fenolik içerik ve gösterdiği antioksidan aktivite hakkında çok az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Bu çalışmanın ilk amacı, siyah pirincin sahip olduğu fenolik maddelerin miktarlarının belirlenmesi ve antioksidan aktivitesinin tayinidir. Çalışmanın ikinci amacı ise, siyah pirince uygulanan farklı pişirme yöntemlerinin fenolik maddelerin miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisini araştırmaktır.

Çalışma esas olarak iki kısımdan oluşmaktadır. İlk kısım toplam fenolik maddelerin miktar tayini ve farklı metotlar uygulanarak antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, ikinci kısım ise yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile örneklerin içerdiği antosiyaninleri tanımlamaya çalışmak ve bunları kalitatif ve kantitatif olarak incelenmekten oluşmaktadır.

Çalışma; giriş bölümünü takiben, literatür özeti, malzeme ve yöntemler, bulgular ve tartışma, sonuçlar, kaynaklar listesi ve son olarak da ekler şeklinde hazırlanmıştır. Literatür özetinde serbest radikaller, oksidatif stres ve antioksidanlar hakkında bilgi verilmektedir. Ayrıca yine literatür özetinde gıdaların fenolik içeriğine pişirmenin etkisi ve kullanılan hammaddenin özellikleri anlatılmaktadır. Malzeme ve yöntem kısmı analizler için takip edilen protokollerini detaylı bir şekilde içermektedir. Bulgular ve tartışma bölümünde siyah pirinç örneklerine uygulanan analizler sonucu elde edilen veriler sunulmuş ve benzer konudaki çalışmalarda bulunan değerler ile karşılaştırma yapılmıştır. Tezin son bölümünü oluşturan sonuç kısmında ise elde edilen deneysel sonuçlar değerlendirilmiş ve daha sonraki çalışmalar için faydalı olabilecek öneriler getirilmiştir.

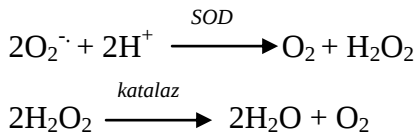
2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Serbest Radikaller, Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma

Serbest radikaller bir veya birden fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve oldukça aktif moleküller olarak tanımlanır. (Scheibmeir ve diğ., 2005). Oksijen molekülleri biyolojik hayatın sürekliliği için vazgeçilmez olmakla birlikte, metabolizmanın doğal işleyişi sürecinde son derece reaktif olan serbest radikallerin de kaynağını oluştururlar (Zempleni ve Dakshinamurti, 2005).

Biyolojik sistemlerde en çok önem teşkil eden serbest radikal olarak oksijen kaynaklı radikaller gösterilebilir (Çiçek, 2005). Bu serbest oksijen kaynaklı radikaller, metabolik işleyişin doğal bir yan ürünü olup oldukça reaktif ve zararlı maddelerdir (Zempleni ve Dakshinamurti, 2005). Reaktif oksijen türleri (ROT) olarak da bilinen bu moleküller protein, lipid ve nükleik asit gibi hücrelerin ana bileşenlerine zarar verir (Bissenbaev ve diğ., 2007). En çok rastlanan serbest radikaller hidroksil radikali, süperoksit radikali, nitrik oksit radikali ve lipid peroksit radikalidir (Migliore ve Coppedè, 2009). Hücrelerde farklı kimyasal yapılara sahip reaktif oksijen türleri Çizelge 2.1’de görülmektedir (Halliwell ve Whiteman, 2004).

Oksijen, demir ve kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimlerinin ve flavoproteinlerin etkisiyle süperoksit radikale indirgenir. Oldukça aktif olan ve hücrede hasara sebep olan süperoksit radikali, bakır ihtiva eden bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) sayesinde hidrojen peroksite çevrilir. Etkisi daha az olan hidrojen peroksit, hücrelerde mevcut katalaz veya glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimlerle oksijen molekülü ve su gibi zararsız maddelere dönüştürülerek etkisiz hale getirilir (Mates, 2000).



Hidrojen peroksit hücre zarından kolaylıkla geçip hücreler üzerinde bazı fizyolojik etkilere neden olabilir, ancak çiftlenmemiş elektrona sahip olmadığından dolayı radikal olarak adlandırılmaz. Oksijen molekülünün kendisi de bir radikaldir ancak orbitalinde çiftlenmemiş elektron bulunduruyor ise süperoksit radikali olarak adlandırılır. Bu sebepten dolayı reaktif oksijen türleri; hidroksil, süperoksit ve peroksil gibi radikaller ve hidrojen peroksit ve singlet oksijen gibi radikal olmayanlar için ortak olarak kullanılan bir terimdir.

Çizelge 2.1 : Reaktif oksijen türleri (Halliwell ve Whiteman, 2004).

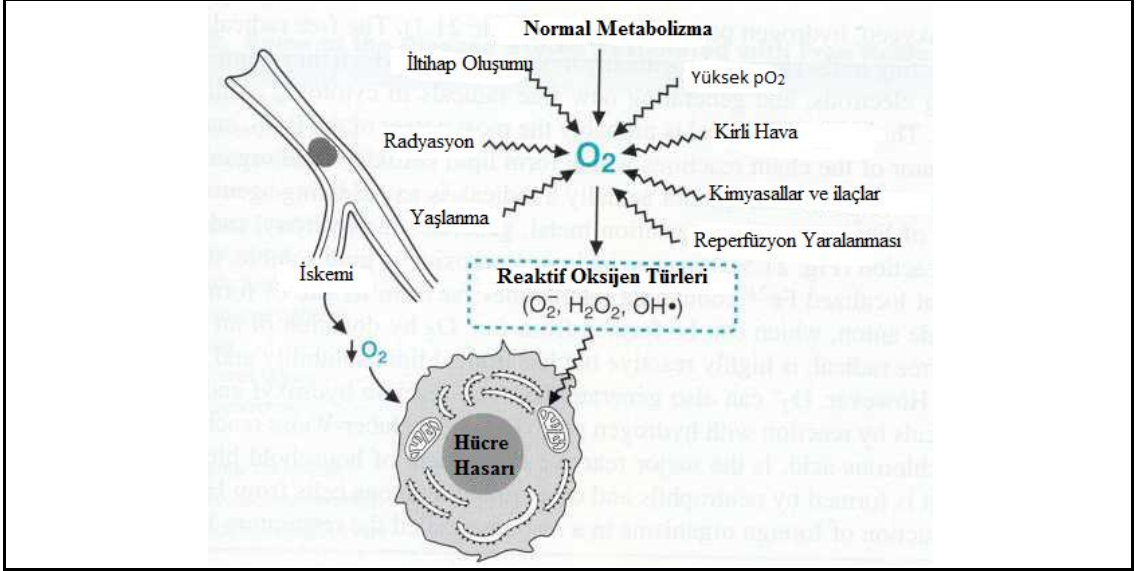
Serbest Radikaller	Radikal Olmayanlar
*Süperoksit	*Hidrojen peroksit
*Hidroksil	*Hipobromik asit
*Hidroperoksil	*Hipoklorik asit
*Peroksil	*Ozon
*Alkoksil	*Singlet oksijen
*Karbonat	*Organik peroksit
*Karbondioksit	*Peroksinitrit
	*Peroksinitrik asit

Radikal olmayan ROT grubunda normal oksijenden çok daha reaktif bir biyolojik molekül olan "singlet oksijen" bulunmaktadır. Singlet oksijen molekülü yapısında çiftlenmemiş elektron bulundurmaz ve radikal olarak adlandırılmaz. Ancak singlet oksijen, hücre zarındaki çoklu doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girer ve lipid peroksitlerin oluşumuna neden olur (Halliwell ve Gutteridge, 1984).

Hücrelerde serbest radikaller endojen ve ekzojen kaynaklı faktörlere bağlı olarak meydana gelirler (Pham-Huy ve diğ., 2008). Şekil 2.1’de hücre hasarına neden olan serbest radikallerin kaynakları şematik olarak gösterilmiştir.

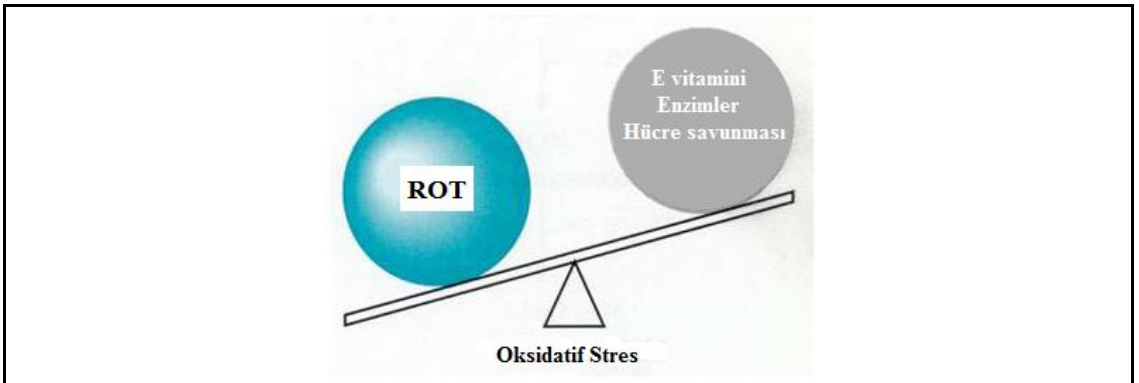
Endojen etmenler organizmada doğal olarak oluşan oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları ile oluşurlar (Williams ve Jeffrey, 2000).

Ekzojen kaynaklı etmenler ise stres, virüsler, enfeksiyon, çeşitli kimyasalların etkisi altında kalma, pestisitler, ilaç toksikasyonları, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği, sigara dumanı ve çevresel faktörler şeklinde sıralanabilir (Pham-Huy ve diğ., 2008).



Şekil 2.1 : Serbest radikallerin kaynakları (Altınışik, 2000).

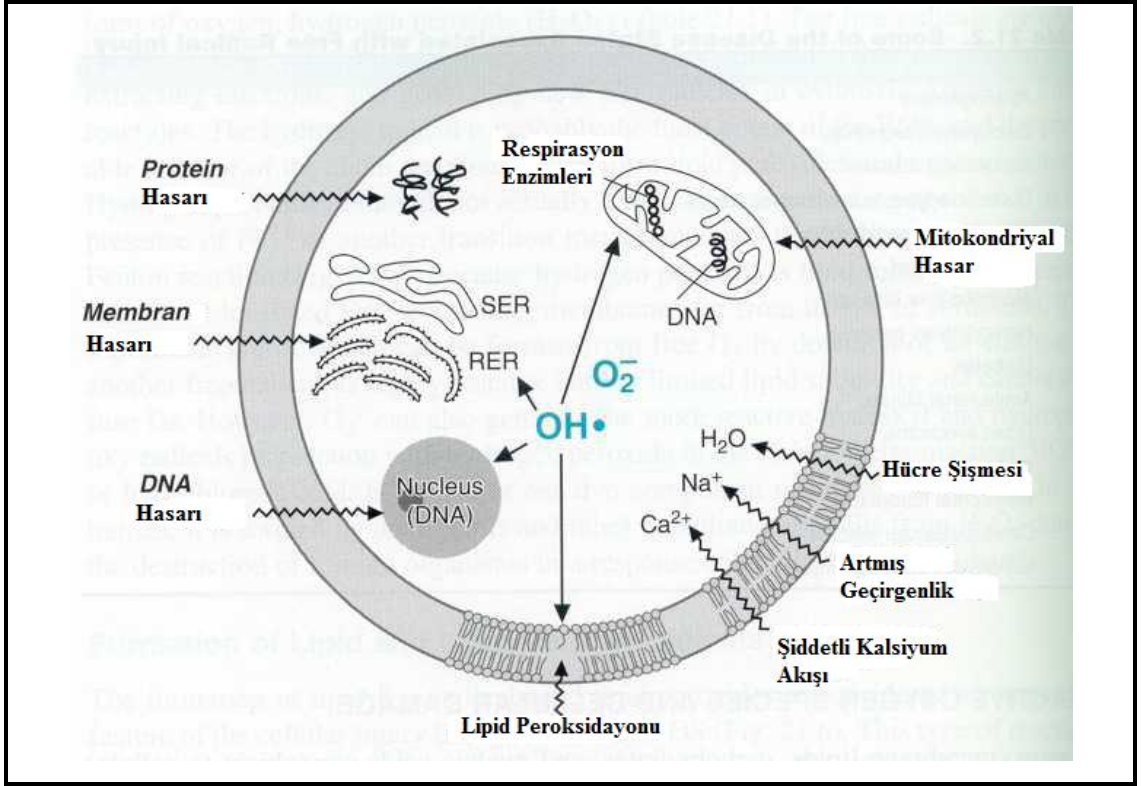
Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri ile canlı organizmadan bunları uzaklaştıran savunma sistemi arasındaki dengenin savunma sistemi aleyhine bozulmuş olmasıdır (Gill ve Tuteja, 2010). Diğer bir şekilde ise, vücudun antioksidan savunma mekanizması ile hücrelerin lipid peroksidasyonuna neden olan serbest radikal oluşumu arasındaki negatif yöndeki dengesizlik olarak tanımlanabilir (Halliwell, 2001). Şekil 2.2’de oksidatif stresin tanımı şematik olarak ifade edilmiştir.



Şekil 2.2 : Oksidatif stresin şematik olarak ifadesi (Altınışik, 2000).

Oksidatif stresin çoğalması sonucunda büyük proteinler, nükleik asitler ve lipidler gibi moleküllerde hasar meydana gelir, kalp hastalıkları ve kanser riski artar.

Oksidatif hasar DNA zedelenmesine, onarılmazsa mutasyonlara sebep olur. Ayrıca farklı mekanizmalar ile tümör oluşumunda da etkilidir (Liu, 2003). Şekil 2.3'te oksidatif stresin hücre içerisinde sebep olduğu hasarlar görülmektedir.



Şekil 2.3 : Oksidatif stresin hücrede neden olduğu hasarlar (Altınışık, 2000).

Oksidatif stres kanser ve ateroskleroz başta olmak üzere pek çok hastalığa sebep olmakta ve bunun yanında pek çok hastalık ve fizyolojik durum da oksidatif strese neden olabilmektedir. Hipertansiyon, kardiyolojik hastalıklar, nörolojik hastalıklar, astım, diyabet, romatolojik hastalıklar, osteoproz ve yaşlanma dahil daha birçok hastalığın oksidatif stres ile alakalı olduğu bildirilmiştir (Altan ve diğ., 2006).

Serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresin engellenmesi ve etkisinin minimuma indirilmesi için yeterli miktarlarda antioksidan tüketilmelidir. Çeşitli antioksidan bileşikler içeren sebze ve meyveler, hücreleri oksidatif stresten koruyarak kronik hastalık risklerini en aza indirir (Liu, 2003).

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların neden olduğu hasarı önlemek amacıyla memeli metabolizması bazı savunma sistemleri geliştirmiştir. Bunlara antioksidan savunma sistemleri denir (Berköz ve Yalın, 2009).

Antioksidan etki mekanizması en basit şekilde aşağıdaki gibi gösterilebilir.

Başlama: $ROO\cdot + AH \rightarrow ROOH + A\cdot$

Gelişme: $ROO\cdot + A\cdot \rightarrow ROOA$

Sonlanma: $A\cdot + A\cdot \rightarrow A-A$

Antioksidanlar hidrojen atomu verme eğilimine sahip kimyasal bileşenlerdir. Böylelikle, birincil radikalleri radikal olmayan türlere çevirerek, okside olmuş antioksidan radikallere dönüşürler. Hidrojenini vererek antioksidan radikali oluşturan antioksidan, lipidlerle reaksiyona girme yeteneğini kaybeder. Antioksidanların molekül yapısı sadece hidrojen atomu verme açısından değil, aynı zamanda radikalleri düşük reaktiviteli hale getirip lipidler ile reaksiyona girmesini engellemesi açısından da oldukça uygundur (Madhavi ve diğ., 1996).

Antioksidan aktivitesi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterir. Bunlar, fiziksel faktörler, substrat faktörleri, gıdanın fizikokimyasal durumu gibi çeşitli faktörler olabilmektedir. Fiziksel faktörler sıcaklık, oksijen ve konsantrasyon şeklinde sıralanabilir. Antioksidan aktivitesi konsantrasyonun artması ile artar. Oksidasyonun yeterli bir seviyede önlenmesi için konsantrasyon belli bir kritik değerin üzerinde olmalıdır (Pokorny ve diğ., 2001).

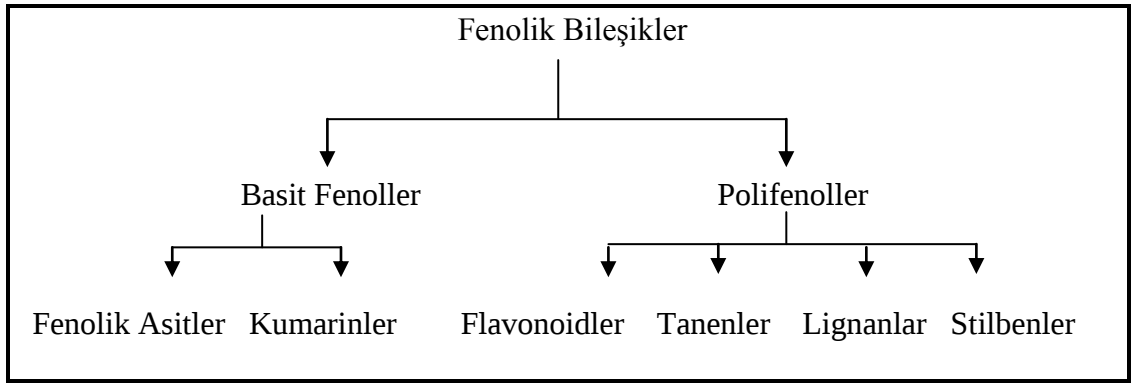
2.2 Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, en az bir aromatik halka ve bu halkaya bağlı en az bir hidroksil grubu bulunduran ve doğal olarak mevcut olan organik bileşiklerdir. Molekül formüllerinde minimum altı karbon atomu ve minimum bir OH grubu içermektedirler. Fenolik bileşikler kolaylıkla okside olabilme özelliklerinden dolayı antioksidan aktivite gösterirler. Birden çok OH grubu içeren fenolik bileşikler hidrofilik karakter gösterirler ve bu sebeple metanol ve su gibi çözügen maddeler ile ekstrakte edilebilirler (Escarpa ve Gonzalez, 2001).

Fenolik bileşikler hemen hemen bütün bitkilerde bulunan bileşiklerdir. Yapılan çalışmalar meyve, sebze ve hububatlarda bulunan fenolik bileşiklerin kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve sinir sistemi ile ilgili hastalıklar gibi bazı kronik hastalıkları önleyebilme özelliğine sahip olduğunu göstermektedir (Escarpa ve Gonzalez, 2001). Bitkisel kaynaklı 8000'den fazla fenolik bileşik bulunmaktadır (Luthria, 2008). Gıdalarda mevcut fenolik maddeler; renk, acılık, burukluk, tat, koku ve ürünün oksidatif dayanıklılığına etki edebilmektedir (Naczki ve Shahidi, 2004).

Besinsel olarak fonksiyonu bulunmamasına karşın gıdalardaki fenoliklerin sağlık üzerine olumlu yönde etkileri vardır. Fenolik bileşiklerin antioksidan etkileri serbest radikalleri bağlamaları, metallerle şelat oluşturmaları, bazı enzimleri inaktive etmeleriyle açıklanmaktadır (Tsao ve Yang, 2003).

Fenolik bileşikler bitkiler içerisinde yaygın sekonder metabolitlerin büyük bir çoğunluğunu oluşturup, hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonuna göre Şekil 2.4'te görüldüğü gibi basit fenoller ve polifenoller olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar (Naczki ve Shahidi, 2004).



Şekil 2.4 : Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması (Naczki ve Shahidi, 2004).

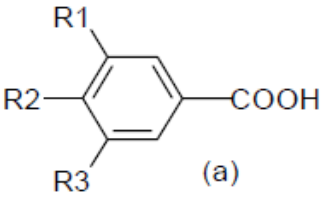
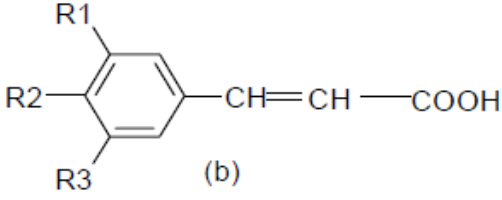
Fenolik bileşikler, bitkilerde homojen olarak dağılmamaktadır. Suda çözünmeyen fenolikler hücre duvarında bulunurken, suda çözünenler bitki hücresinin içinde bulunurlar. Bitkisel dokularda bitkinin dış tabakası iç tabakadan daha fazla fenolik bileşik içermektedir (Naczki ve Shahidi, 2004).

2.2.1 Fenolik asitler

Fenolik asitler; sinnamik ve benzoik asit olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır. Kafeik asit, kumarik asit ve ferulik asit meyvelerde en çok görülen sinnamik asitlerdendir. Sinnamik asitler meyvelerde esterleşmiş halde de bulunabilmektedirler. Kafeik asitin kuinik asit ile yaptığı esterleşme sonucu oluşan klorojenik asit en sık gözlenen sinnamik asit çeşididir (Belitz ve diğ., 2002; Naczki ve Shahidi, 2004).

Meyvelerde benzoik asit türevleri genellikle ester halinde mevcuttur. Salisilik asit (2-hidroksibenzoik asit), p-hidroksibenzoik asit (4-hidroksibenzoik asit), protokateşik asit (3,4-dihidroksibenzoik asit), vanilik asit (3-metoksi-4- hidroksibenzoik asit) ve gallik asit (3-4-5-trihidroksibenzoik asit) en önemli benzoik asit türevleridir (Belitz ve diğ., 2002; Naczki ve Shahidi, 2004). Bitkilerde genel olarak organik asitler ve

şekerlerle esterleşmiş halde yer alan fenolik asitlerin kimyasal yapıları Şekil 2.5'te görülmektedir (Nizamlioğlu ve Nas, 2010).

 (a)				 (b)			
Asit	R1	R2	R3	Asit	R1	R2	R3
<i>p</i> -Hidroksibenzoik	H	OH	H	<i>p</i> -Kumarik	H	OH	H
Pirokate şük	H	OH	OH	Kafeik	H	OH	OH
Vanilik	CH ₃ O	OH	H	Ferulik	CH ₃ O	OH	H
Siringik	CH ₃ O	OH	CH ₃ O	Sinapik	CH ₃ O	OH	CH ₃ O
Gallik	OH	OH	OH				

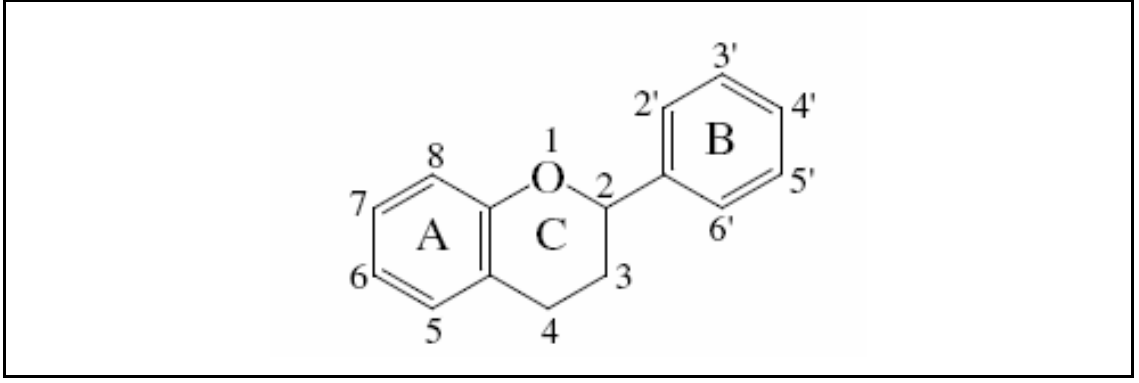
Şekil 2.5 : Fenolik asitlerin genel yapısı: a) Benzoik asit. b) Sinnamik asit (Nizamlioğlu ve Nas, 2010).

Lifli materyaller zengin fenolik asit kaynaklarıdır. Kumarik asit ve ferulik asit gibi bazı yaygın fenolikler düşük antioksidan aktivitesi gösterirler. Kafeik asit gibi moleküllerinde daha fazla fenolik hidroksil grup taşıyan bileşiklerin antioksidan aktivitesi daha yüksektir. Gallik asit ve esterleri ise bilinen en etkili antioksidanlardır (Hudson, 1990).

2.2.2 Flavonoidler

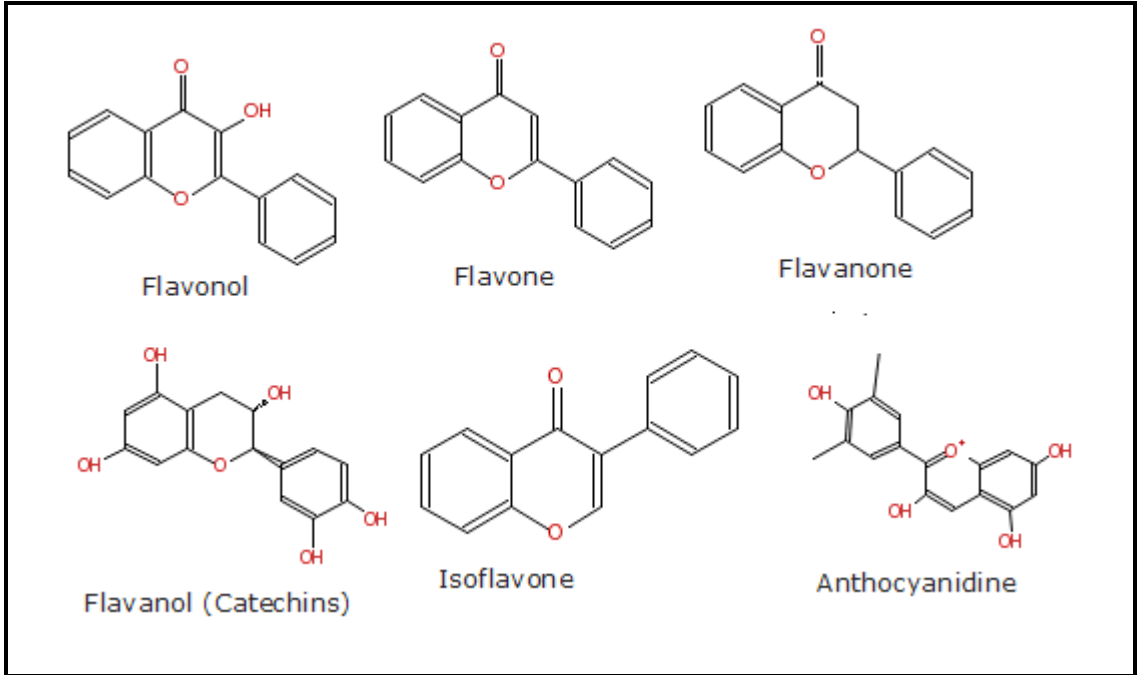
En büyük polifenol grubunu meydana getiren ve difenilpropanlar ile benzer bir yapıya sahip olan flavonoidler; iki benzen halkasının (A ve B) oksijen içeren bir piren halkası (C) ile bağlanması ile oluşmaktadır (Güven ve diğ., 2010). Şekil 2.6'da flavonoidlerin genel yapısı görülmektedir (Naczki ve Shahidi, 2004).

Flavonoidlerin yapısındaki OH grupları, reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla glikozitlenir bu yüzden bitkilerde aglikon formlarına (şeker kısmını içermeyen form) nadiren rastlanmaktadır (Güven ve diğ., 2010).



Şekil 2.6 : Flavonoidlerin genel yapısı (Naczk ve Shahidi, 2004).

Flavonoid aglikonunun farklı hidroksil gruplarına monosakkarit, disakkarit veya trisakkaritlerin bağlanması ile glikozit form meydana gelmektedir (Güven ve diğ., 2010). Doğal şekilde oluşan, Şekil 2.7’de kimyasal yapıları görülen flavonoidler altı gruba ayrılabilirler; flavanon, flavon, izoflavon, flavanol, antosiyanin ve flavonol (Madhavi, 1996).



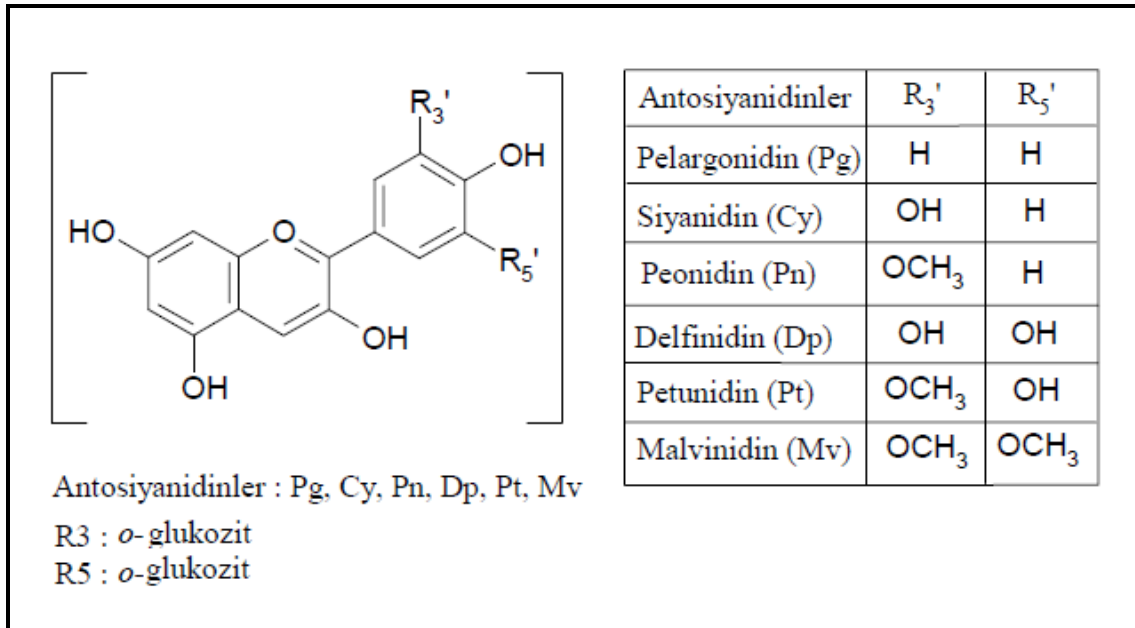
Şekil 2.7 : Flavonoid alt gruplarının temel kimyasal yapıları (Madhavi, 1996).

Flavonoidlerin temel kaynakları arasında, mandalina, portakal, kuşburnu, kayısı, vişne, üzüm, elma, kuş üzümü ve yaban mersini gibi meyveler; soğan, yeşil biber, brokoli, domates ve ıspanak gibi sebzeler; şarap, kahve ve çay gibi içecekler; kahve çekirdeği, soya ürünleri ve baharatlar bulunmaktadır. Flavonoidler tüm bitki dokularında hücrenin içinde ya da organların yüzeyinde bulunmaktadır (Güven ve diğ., 2010).

2.2.2.1 Antosiyanidinler

Doğada serbest halde bulunmayan antosiyanidinler şekerlerle glikozit form oluştururlar ve antosiyanin adını alırlar. Antosiyaninler meyve ve sebzelere pembe, kırmızı ve mor renklerini veren suda çözünebilir özellikteki pigmentleridir (Naczki ve Shahidi, 2004). Bilinen pek çok antosiyanidinden meyve ve sebzelerde en çok bulunan altı antosiyanidinin yapısı Şekil 2.8’de görülmektedir (Nizamlioğlu ve Nas, 2010). Antosiyanidinler bağlanan şekerlere ve bağlanma pozisyonuna göre adlandırılırlar (Mazza ve Miniati, 1993)

Antosiyaninler bir antosiyanidin, şeker ve bazen fenolik asit veya organik asitten oluşurlar. Ramnoz, galaktoz, ksiloz ve arabinoz çoğunlukla şeker kısmını meydana getirir. Ek olarak *p*-kumarik, kafeik ve ferrulik asit gibi asitlerle de açillenebilir ve açillenmiş antosiyaninler, açillenmemiş olanlara göre daha stabildirler (Türker ve diğ., 2004).



Şekil 2.8 : Antosiyanidinler ve antosiyanin pigmentlerinin yapısı
(Nizamlioğlu ve Nas, 2010).

Antosiyaninler, rengin oluşumunda önemli etkiye sahip renk pigmentleridir. Bu pigmentler, taze yapraklarda ultraviyole ışınlarının neden olduğu zarara karşı koruyucu etki göstermekte, patojenlere karşı direnci kuvvetlendirmektedir. Ayrıca antosiyaninler antioksidan enzim inhibitörü olarak da etki gösterebilmektedirler (Mazza ve Miniati, 1993).

Antosiyaninlerin renkleri moleküler yapılarına ve içinde bulundukları ortamın pH derecesine göre farklılık göstermektedir. Örneğin hidroksil gruplarının sayısı arttıkça renk pembeden maviye döner. Metoksil grupların sayısı arttıkça da renk tersine çevrilir. Asidik çözeltide kırmızı renge sahip olan bu renk maddeleri pH>4,5 olduğunda rengini kaybeder ve renksizleşir. Bu maddelerin renklendirici olarak kullanılabilmesi için gıdanın pH<3,5 değerinde olması gerekmektedir. Antosiyaninler düşük pH'da stabildirler ve kırmızı renk oluştururlar (Mazza ve Miniati, 1993).

pH, sıcaklık, ışık, kopigmentler, metalik iyonlar, oksijen, askorbik asit, şeker ve degradasyon ürünleri antosiyaninlerin stabilitesini etkileyen etmenlerdir. Bu etmenlere ilaveten açılma gibi antosiyanin yapısını değiştiren durumlar da stabilizeyi etkilemektedir (Türker ve diğ., 2004).

En önemli antosiyanin kaynakları, bazı üzüm çeşitleri, şarap, kuşburnu, mürver ağacı meyvesi, yabanmersini ve vişne şeklinde belirtilmiştir (Mazza ve Miniati, 1993).

2.3 Gıdaların Fenolik İçeriğine Pişirmenin Etkisi

Gıdayı hazırlama, pişirme işlemleri neticesinde gıdaların fenolik içeriğinde ve antioksidan özelliklerinde farklı değişimler meydana gelmektedir. Karotenoid gibi bazı antioksidanlar yüksek sıcaklığa karşı dayanıklılık gösterirken fenolik maddeler, tokoferol, C vitamini gibi doğal antioksidanlar ısı, ışık ve oksidasyona karşı oldukça hassastırlar (Kalkan, 2007).

Genel olarak bütün sebzeler tüketilmeden önce ya kaynayan su içerisinde ya da mikrodalgada pişirilirlir. Tüm bu pişirme prosesleri sebzelerin fiziksel ve kimyasal karakteristiklerinde sayısız değişikliklere sebep olmaktadır (Türkmen ve diğ., 2005). Yapılan bir çalışmada, pişmiş biberlerin radikal yakalama aktivitelerinde, toplam fenolik madde içeriklerinde ve askorbik asit değerlerinde büyük ölçüde azalmalar olduğu sonucuna varılmıştır (Chuah ve diğ., 2008). Bunun sebebinin ise antioksidan bileşiklerin biberden pişirme suyuna doğru gerçekleşen süzülmeden kaynaklandığı düşünülmektedir. Domatesin askorbik asit, likopen, toplam fenolik ve antioksidan aktivitesi üzerinde kaynatma ve fırınlama küçük bir etki gösterirken, kızartma sonucu domatesin askorbik asit, toplam fenolik ve likopen içeriği üzerinde önemli ölçüde azalma gözlemlenmiştir. Ayrıca yine pişirme brokolinin antioksidan bileşiklerini ve

antioksidan aktivitesini etkilemektedir. Yapılan başka bir araştırmada da; lahan, ıspanak, kabak ve arpacık soğanı gibi sebzelerin hemen hemen hepsinde antioksidan bileşiklerinde bazılarında ise antioksidan aktivitelerinde termal işlem sonucunda azalma olduğu bulunmuştur (Türkmen ve diğ., 2005).

Gıdaların fenolik içeriğini etkileyen diğeri bir önemli faktör ise pişirme süresidir. Çoğunlukla pişirme süresi uzadıkça hem fenolik maddelerin, hem de antioksidan aktivitenin azaldığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar, kızartma esnasında, ilk beş dakikada soğanda % 9 kersetinin arttığını, daha sonraki dakikalarda % 30 kayıp olduğunu gözlemlemiştir. Üç ile altmış dakika süreyle haşlama sonucunda soğanda % 20.6 – 75 oranında kersetin kaybı gözlenmiştir. Bu araştırmada ve yapılan diğeri çalışmalarda söz edilen kayıplar, pişirme sonucu gerçekleşen degradasyondan; pişirme derecesi, pişirme süresi, gıda-haşlama suyu oranı, gıdanın parça boyutları, pişirme kap seçimi, pişirme kabının açık veya kapalı olması gibi pişirme özelliklerinden ve gıdanın çeşidine göre farklılık göstermiştir. Bu kayıplar; pH, su aktivitesi (a_w) ve gıdalarda mevcut diğeri bileşenler gibi faktörlere göre de değişiklik göstermektedir (Kalkan, 2007).

2.4 Kullanılan Örneğe İlişkin Literatür Bilgisi

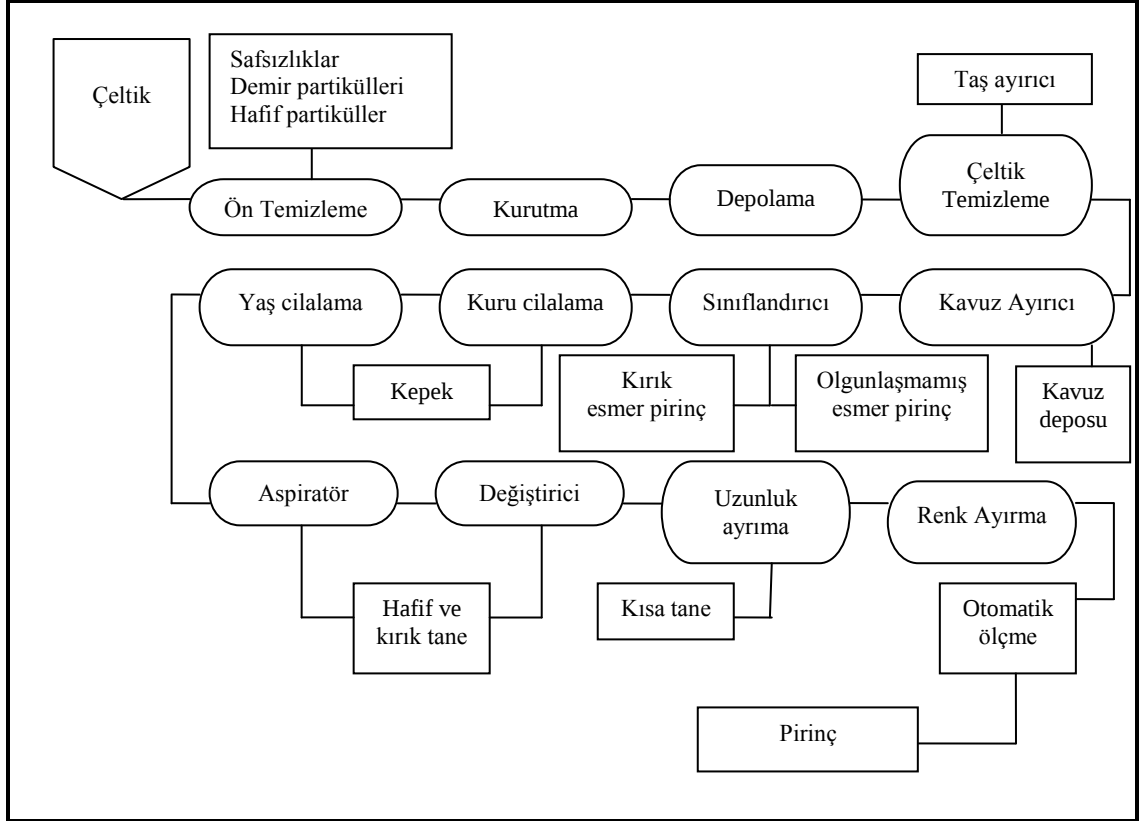
2.4.1 Pirinç

Pirinç buğdaygiller ailesine ait olup, latince adı *Oryza sativa*'dır. Uzun taneli, kısa taneli, orta boy taneli, aromatik, basmati, jasmine, della ve tatlı pirinç gibi çeşitleri mevcuttur (Dönmez, 2007).

Sıcak iklimlerde yetişen ve bu bölgelerde medeniyetin sembolü olarak değerlendirilen pirincin Çin'deki eski kaynaklara göre M.Ö. 2800 yıllarından beri tarımı yapılmaktadır. Pirincin ana vatanı olarak Güneydoğu Asya, büyük olasılıkla da Hindistan olduğu belirtilmektedir (Özşahin, 2008).

Hasat sonrası elde edilen kavuzlu ürüne çeltik denilmektedir. Kavuzları soyulmuş fakat pirince işleme ve parlatma işlemi görmemiş taneye ise kargo ya da kahverengi (esmer) pirinç adı verilmektedir. Kabukları soyulmuş ve cilalanıp parlatılarak kepekleri giderilmiş son ürüne de pirinç denilmektedir. Şekil 2.9'da pirinç üretimi akış diyagramı görülmektedir. Çeltik pirince işlendiği zaman; 100 kg çeltikten 48 kg sağlam pirinç, 16 kg kırık pirinç, 13 kg pirinç kepeği, 3 kg pirinç cila unu ve 20 kg

kavuz elde edilir. Sağlam ve kırık pirinç toplamına ise pirinç veya çeltik randımanı denilir. Tanelerin dış görünüşünü düzeltmek amacıyla yapılan parlatma işlemi ile, esas olarak pirince fonksiyonellik katan kepeğin büyük ölçüde yitirilmesine neden olur. Kepeğin uzaklaştırılması ile protein, yağ, B vitamini, demir ve kalsiyumca zengin dış katman kaybolur. Geriye sadece nişastaca zengin bir ürün kalır (Dönmez, 2007).



Şekil 2.9 : Çeltiği pirince işleme akış diyagramı (URL-1).

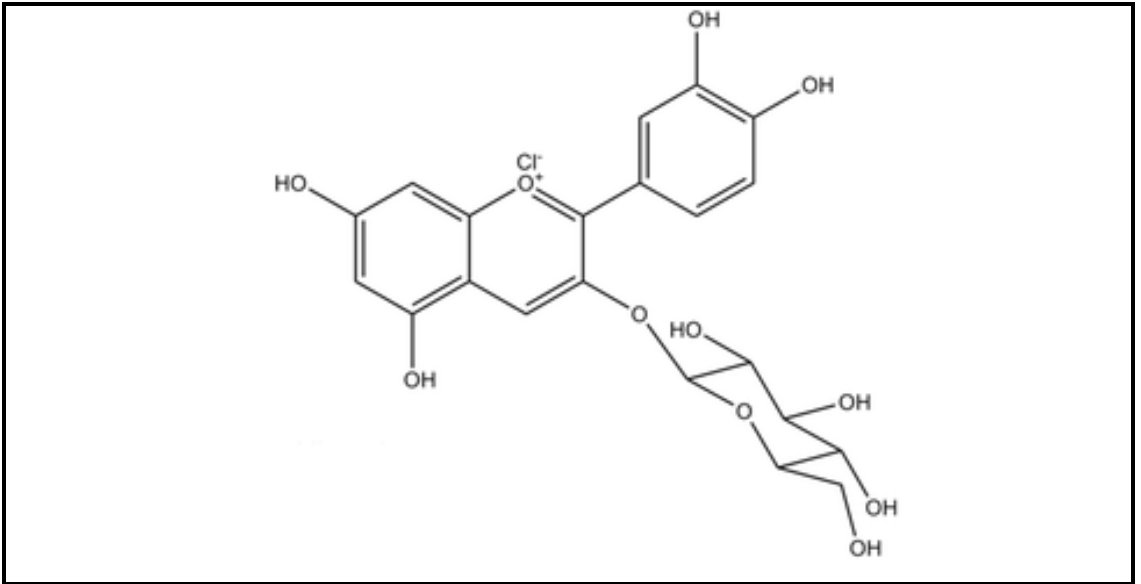
2.4.2 Siyah pirinç

Pirinç, birçok Asya ülkesinde temel gıda olarak tüketilmektedir. Beyaz uzun taneli, kahverengi uzun taneli, kahverengi yapışkan, yabani, basmati, kahverengi basmati, yasmin ve risotto gibi çeşitli türleri bulunmaktadır. En çok beyaz pirinç tüketilmesine rağmen, siyah ve kırmızı gibi birkaç renkli türleri de mevcuttur. Ulusal sağlık konusuna ve genişleyen sağlıklı gıda piyasasına ilginin son zamanlarda oldukça artmasıyla, değişik mahsullerden elde edilen biyoaktif bileşenlerin endüstride kullanımının araştırmaları da ivme kazanmıştır (Min ve diğ., 2010).

Renkli pirinçler, antioksidanların potansiyel kaynakları olarak rapor edilmiş ve bu yararlı antioksidan kaynaklarının fonksiyonel gıda üretiminde kullanımı teşvik

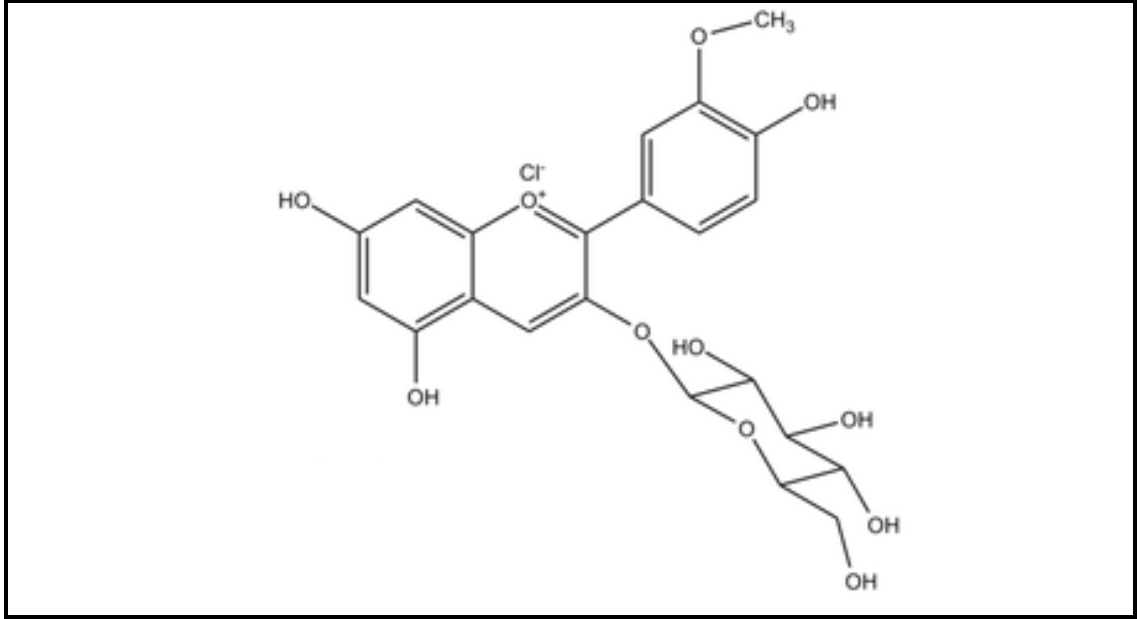
edilmiştir. Bu sebeple, kırmızı pirinç yüksek polifenol ve antosiyanin içeriğinden dolayı Japonya’da popülerlik kazanmıştır. Renkli pirinçlerin tüm bu sağlık için yararları tam olarak bilinmezken, bazı araştırmacılar organik gıda renklendiricisi olarak siyah pirinç kullanımının yaklaşan bir talep olacağını görmüş ve bu yüzden de siyah pirinç üretimi kısmen artmıştır (Sompong ve diğ., 2011).

Özellikle ekonomik açıdan oldukça önemli bir pirinç çeşidi olan siyah pirinç, adını içeriğindeki zengin, doğal antosiyanin bileşikler olan siyanidin 3-glikozit ve peonidin 3-glikozitten alır. Siyanidin 3-glikozit ve peonidin 3-glikozitin yapı formülleri Şekil 2.10 ve Şekil 2.11’de görülmektedir. Bu antosiyaninler siyah pirince antioksidatif aktivite kazandırır (Kong ve Lee, 2010). Siyah pirinçteki bu antosiyaninler çoğunlukla alöron tabakada yer alır ve pirince koyu mordan siyaha dönük bir renk verirler (Chiang ve diğ., 2006).



Şekil 2.10 : Siyanidin 3-glikozit (URL-2).

Siyanidin 3-glikozit açısından zengin olan siyah pirinç, antioksidan, antienflamatuar ve antialerjik aktivite gösterir. Siyanidin 3-glikozit siyah pirinçte olduğu gibi ağız yoluyla alındığında bağırsak mikroflorasında siyanidin ve protokateşuik aside metabolize edilir ve daha sonra kan ve idrarda saptanır. Siyanidin 3-glikozitin bu şekilde metabolize olması antienflamatuar etki göstermesini sağlar (Min ve diğ., 2010).



Şekil 2.11 : Peonidin 3-glikozit (URL-2).

Siyah pirinç beyaz pirince oranla besinsel olarak sayısız avantaja sahiptir. Siyah pirinç beyaz pirince göre daha yüksek miktarlarda protein, vitamin ve mineraller içerir (Hu ve diğ., 2003). Çizelge 2.2’de bu çalışmada kullanılan siyah pirinç örneklerinin ambalajında yer alan siyah pirinç kompozisyonu görülmektedir.

Çizelge 2.2 : Siyah pirinç kompozisyonu.

İçerik	100 g kuru madde için
Protein	8,01 g
Karbonhidrat	69,24 g
Şeker	0 g
Yağ	2,73 g
Lif	1,91 g
Doymuş Yağ Asitleri	,5 g
Sodyum	0,39 mg
Magnezyum	124,17 mg

Kemirgenlerin beyaz pirinç yerine siyah pirinçle beslendiği bir araştırmanın sonucunda, hiperkolestrol sahibi olan tavşanlarda yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) konsantrasyonunda ateriosklerotik lezyonların sayısındaki azalma ile uyumlu olarak artış gözlemlenmiştir. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda, antosiyanince

zengin siyah pirinç ile beslenen apolipoprotein-E eksikliği olan sıçanlarda oksidatif stresin önemli ölçüde düşüşüyle aterosklerotik lezyonlarda azalmalar olduğu sonucuna varılmıştır. Tüm bu bulgular gösteriyor ki, pirinç kepeğinde mevcut yağda çözünen lipid bileşenlere ek olarak, siyah pirinçte bulunan ve beyaz pirinçte olmayan bileşikler kardiyovasküler koruma sağlamaktadır (Hu ve diğ., 2003). Ayrıca siyah pirinç antosiyaninlere ek olarak vitamin E, fitik asit ve γ -orizanol gibi başka yararlı bileşikler de içermektedir. Bu antioksidan bileşikler lipid peroksit ve süperoksit anyon radikalleri gibi reaktif oksijen türlerini elimine etmekte ve kolesterolü düşürmektedir (Kong ve Lee, 2010).

2.4.3 Siyah pirinç fenolikleri üzerine yapılan bazı çalışmalar

Siyah pirincin kimyasal ve biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türlerine karşı etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ekstraksiyon işlemi %1 HCl içeren metanol kullanılarak gerçekleştirilmiş, LC-MS ile siyanidin 3-glikozit ve peonidin 3-glikozit antosiyaninleri tayin edilmiştir. Araştırmanın sonucunda siyah pirinç ekstraktının yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve fonksiyonel gıda formülasyonlarında kullanılabileceği belirtilmiştir (Hu ve diğ., 2003).

Hiemori ve arkadaşlarının (2009) yaptığı bir çalışmada siyah pirincin sahip olduğu antioksidan aktivitenin farklı pişirme yöntemlerinden ne şekilde etkilendiği araştırılmış, bu amaçla öncelikle 1 g öğütülmüş siyah pirinç örneği 8 mL 1 N HCl ile asitlendirilmiş metanol ile karıştırılmış ve 30 dakika boyunca 1800 rpm'de çalkalanmıştır. Daha sonra ekstraktlar 10000 g ve 4°C'de santrifüjlenmiş ve nitrojen gazı altında konsantre edilmiştir. Elektrikli düdüklü tencere, pilav pişirici ve tüplü ocak üstünde tencere olmak üzere üç farklı pişirme metodu kullanılmış ve her üç yöntemin de siyah pirincin antioksidan aktivitesinde azalmalara neden olduğu gözlemlenmiştir. En çok azalma elektrikli düdüklü tencerde pişen siyah pirinçte gözlenirken, bunu sırasıyla pirinç pişiricide ve tüplü ocak üstündeki tencerde pişen siyah pirinç takip etmektedir.

Farklı pirinç türlerinin antioksidatif özelliklerinin incelendiği bir çalışmada kırmızı, siyah ve beyaz olmak üzere 3 farklı renkte pirinç çeşidi ele alınmıştır. Un haline getirilmiş pirinçlerin ekstraksiyonu %1 HCl içeren metanol ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş ve daha sonra metanolik ekstraktlar 15 dakika 4000 g hızında santrifüj edilmiştir. Pirinç örneklerinde toplam fenolik madde, toplam flavonoid ve

ABTS metodu ile antioksidan aktivite bakılmış ve en yüksek sonuçlar siyah pirinç için elde edilmiştir (Shen ve diğ., 2009).

Zhang ve arkadaşlarının (2010) siyah pirinç kepeğinin fenolik profilini incelediği araştırmada, 0,5 g siyah pirinç kepeği 50 mL asitlendirilmiş metanol (95% metanol ve 1 M HCl 85:15,v/v) ile karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışım 10 dakika boyunca 2500 g'de santrifüjlenerek analizler için hazır hale getirilmiştir. Araştırmada siyah pirincin farklı türleri için fenolik içeriğinin farklı olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca bu çalışmada görülüyor ki, siyah pirinç kepeği beyaz pirinç kepeğine kıyasla çok daha yüksek antioksidatif etki göstermektedir.

Ryu ve arkadaşlarının (1998) yaptığı bir çalışmada on farklı siyah pirinç çeşidinin antosiyanin içeriği ve miktarları 285 nm dalga boyunda ters faz ODS-5 kolon ile HPLC analizi uygulanarak tespit edilmiştir. Çalışma sonunda on farklı siyah pirinç çeşidinin siyanidin 3-glikozit ve peonidin 3-glikozit olmak üzere iki ana antosiyanini içerdiği görülmüş ve toplam antosiyanin miktarlarının siyah pirincin farklı çeşitleri için 0-493 mg/100 g arasında değiştiği gözlemlenmiştir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Malzeme

3.1.1 Pirinç örnekleri

Türkiye’de sadece tek bir marka tarafından satışa sunulan 500 g’lık paketlerde vakumlu olarak bulunan 2009 yılı mahsulü siyah pirinç örnekleri farklı zamanlarda üç farklı marketten temin edilmiş ve bu araştırmada malzeme olarak kullanılmıştır.

3.1.2 Pirinç örneklerinin hazırlanması

Siyah pirinç örnekleri pişirilene kadar vakumlu pakette oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Siyah pirinçler pirinç pişiricide (R), elektrikli düdüklü tencerede (E), tüplü ocak üstündeki düdüklü tencerede (D) ve tüplü ocak üstündeki teflon tencerede (N) olmak üzere 4 farklı ev tipi yöntem kullanılarak pişirilmiştir. Pirinç-su oranı 1:3 olacak şekilde, pişirme işlemi ise 75 g pirinç 225 g saf su kullanılarak yapılmıştır. Pişirmeden önce 75 g pirinç 225 g saf suyun içinde 1 saat süreyle bekletilmiş, daha sonra aynı su kullanılarak pişirilmiştir. Pişirme işlemi su tamamen pirinçler tarafından absorbe olana ve pirinçler yenebilecek yumuşaklığa ulaşana kadar sürmüştür. Pişirme işlemi; pirinç pişiricide 70 dakika, elektrikli düdüklü tencerede 30 dakika, tüplü ocak üstündeki düdüklü tencerede 20 dakika ve tüplü ocak üstündeki teflon tencerede 50 dakika olarak ölçülmüştür. Tüm pirinçler piştikten sonra 5 dakika süreyle demlenmiş ve daha sonra zaman kaybetmeden -18°C’de depolanmıştır.

3.1.3 Analizlerde kullanılan kimyasallar

Deneyler için sodyum karbonat (Merck), potasyum persülfat (Riedel-de Haën), potasyum dihidrojen fosfat (Merck), potasyum klorür (BDH), sodyum klorür (Sigma), disodyum hidrojen fosfat (Merck), amonyum asetat (Merck), sodyum asetat (Alfa Aesar), sodyum hidroksit (Sigma), potasyum hidroksit (Sigma), metanol (HPLC saflığında) (Merck), etanol (HPLC saflığında) (Riedel-de Haën), formik asit (%98-100) (Merck), hidroklorik asit (%38) (Sigma), glasiyal asetik asit (BDH), sodyum nitrit (Merck), alüminyum klorür, bakır (II) klorür (Merck), neokuproin,

troloks (Aldrich), demir (III) klorür (Carlo Erba), TPTZ (Alfa Aesar), ABTS (AppliChem), DPPH (Aldrich), Folin-Ciocalteu reaktifi (Merck), gallik asit (Sigma), siyanidin 3-glikozid (Sigma) ve peonidin 3-glikozid (ChromaDex) kullanılmıştır.

3.2 Yöntemler

Siyah pirincin toplam fenolik madde miktarının, toplam flavonoid madde miktarının, antioksidan aktivitesinin ve fenolik profilinin belirlenmesi amacıyla araştırmadaki aşamalar ve kullanılacak yöntemler aşağıda başlıklar altında belirtilmiştir.

3.2.1 Siyah pirinç örneklerinin ekstraksiyonu

Pişmiş siyah pirinç örnekleri -18°C'den liyofilizatöre konmuş ve 24 saat süreyle dondurularak kurutulmuşlardır. Kurutulan pişmiş siyah pirinç örnekleri ve kontrol grubu olan pişmemiş siyah pirinç örneği bir öğütücü yardımı ile öğütülerek toz hale getirilmiştir. Toz haline getirilmiş pirinçlerin her birinden rastgele 4 g alınmış ve 20 ml asitlendirilmiş metanol (metanol:HCl; 99:1, v/v) ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi; önce 1 saat süre ile oda sıcaklığında 400 rpm'de orbital çalkalayıcıda çalkalanarak, daha sonra 15 dakika süre ile 5°C'de 5000 rpm'de santrifüj edilerek gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işleminden sonra üst faz alınmış ve -18°C'de sonraki analizler için saklanmıştır. Tüm ekstraksiyon işlemleri 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir (Li ve diğ., 2007).

3.2.2 Toplam fenolik madde miktarı tayini

Toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Spanos ve Wroldstad, 1990). Yöntemde 900 µl saf su ve 5 ml Folin-Ciocalteu reaktifi (saf su ile 1:10 oranında seyreltilmiş) 100 µl siyah pirinç ekstraktına ilave edilmiş, sonrasında karışıma 4 ml Na₂CO₃ (75 g/l) eklenmiştir. Karışım 2 saat boyunca karanlıkta bekletildikten sonra 765 nm'de absorbans ölçülmüştür. Standart eğrinin hazırlanması için 0,02-0,8 mg/ml gallik asit kullanılmış ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden ifade edilmiştir. Tüm deneyler 3 paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Gallik asit kalibrasyon eğrisi Ek A'da Şekil A.1'de verilmiştir.

3.2.3 Toplam flavonoid miktarı tayini

İlk olarak 0,25 ml örnek ekstraktı 1,25 ml saf su ile karıştırılmıştır. Sonra 75 ml NaNO₂ çözeltisi eklenmiş, 6 dakika bekletilmiş ve 150 ml %10'luk AlCl₃.6H₂O ilave edilmiştir. Beş dakika geçtikten sonra 0,5 ml 1 M NaOH eklenmiş ve son hacme (2,5 ml) saf su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan örneklerin absorbansı spektrofotometrede 510 nm'de köre karşı okunmuştur. Standart eğrinin hazırlanmasında 0,04-0,5 mg/ml aralığındaki konsantrasyonlarda rutin kullanılmıştır (Çapanoğlu, 2008). Tüm deneyler 3 paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Rutin kalibrasyon eğrisi Ek A'da Şekil A.2'de verilmiştir.

3.2.4 Toplam antosiyanin miktarı tayini

Bu çalışmada pH-diferansiyel metot olarak adlandırılan kolorimetrik bir yöntem kullanılmıştır. Öncelikle deneyde kullanılmak üzere 0,025 M potasyum klorür çözeltisi (pH=1) ve 0,4 M sodyum asetat çözeltisi (pH=4.5) hazırlanmıştır (Giusti ve Wrolstad, 2001). Daha sonra 1 ml örnek ekstraktı balonjojeye konmuş ve potasyum klorür çözeltisi ile son hacme (25 ml) tamamlanmıştır. Başka bir balonjojeye de 1 ml örnek ekstraktı konmuş ve o da son hacme sodyum asetat çözeltisi ile tamamlanmıştır. Hazırlanan karışımların absorbansları 510 nm ve 700 nm'de çift ışıklı UV-Visible spektrofotometresinde (Shimadzu UV-1700 Pharmospec) ölçülmüştür. Sonuçlar aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmış ve mg siyanidin 3-glikozit / 100g cinsinden ifade edilmiştir (Yao ve diğ., 2010).

$$\text{Toplam antosiyanin (mg / g)} = (\Delta A * MW * DF * 1000) / (\epsilon * L)$$

$$\Delta A = (A_{510} - A_{700})_{pH=1} - (A_{510} - A_{700})_{pH=4,5}$$

MW : siyanidin 3-glikozitin molekül ağırlığı

DF : dilüsyon faktörü

ϵ : siyanidin 3-glikozit molar ekstinksiyon katsayısı

L : küvet uzunluğu, cm

3.2.5 Antioksidan aktivitesi tayinleri

Siyah pirinç örneklerinin toplam antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde, DPPH (1,1-difenil-2- pikrilhidrazil), ABTS (2,2- azinobis 3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit diamonyum tuzu), FRAP (Demir (III) indirgeyici antioksidan kapasitesi) ve

CUPRAC (Bakır(II) indirgeyici antioksidan aktivitesi) metodu olmak üzere dört farklı yöntem kullanılmıştır. Tüm deneyler 3 paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. DPPH, ABTS, FRAP ve CUPRAC metotları için oluşturulan troloks kalibrasyon eğrileri Ek A'da Şekil A.3, A.4, A.5 ve A.6'da sunulmuştur.

3.2.5.1 DPPH metodu ile toplam antioksidan aktivitesi tayini

Rai ve arkadaşlarının (2006) kullandıkları yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) metodu ile örneklerin antioksidan aktiviteleri spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Bu amaçla, 100 ml örnek ekstraktı ile 2 ml 0,1 mM metanolde çözünmüş DPPH karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında yarım saat bekletildikten sonra karışımların absorbansları çift ısınlı UV-Visible spektrofotometresinde (Shimadzu UV-1700 Pharmospec) 517 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi (TEAC) cinsinden ifade edilmiştir.

3.2.5.2 ABTS metodu ile toplam antioksidan aktivitesi tayini

ABTS (2,2-Azino-bis 3-etillbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) ile toplam antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde Zulueta ve arkadaşlarının (2009) uyguladığı metot bazı ufak modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır. Bir gece bekletilerek hazırlanan ABTS stok çözeltisi fosfat tampon çözeltisi (pH=7,4) içerisinde absorbansı 0,9 olacak şekilde seyreltilmiştir. Daha sonra 100 µl örnek ekstraktı 1ml ABTS çözeltisi ile karıştırılmış ve karışımın absorbansı 6 dakika sonunda 734 nm'de çift ışınlı UV-Visible spektrofotometresiyle (Shimadzu UV-1700 Pharmospec) ölçülmüştür. Sonuçlar troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi (TEAC) cinsinden ifade edilmiştir.

3.2.5.3 FRAP metodu ile toplam antioksidan aktivitesi tayini

FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) metodunda 300 µl örnek ekstraktı ile 1,7 ml FRAP çözeltisi (0,3M asetik asit buffer pH=3,6:10mM TPTZ:20mM FeCl₃.6H₂O; 10:1:1) karıştırılmıştır. Karışımın absorbansı bir saat sonunda 593 nm'de çift ışınlı UV-Visible spektrofotometresiyle ölçülmüştür. Sonuçlar troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi (TEAC) cinsinden ifade edilmiştir (Butsat ve Siriamornpun, 2010).

3.2.5.4 CUPRAC metodu ile toplam antioksidan aktivitesi tayini

CUPRAC metodunda ilk olarak 10 mM $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 M amonyum asetat tampon çözeltisi (NH_4Ac) (pH=7) ve 7,5 mM neokuproin çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra test tüpüne her birinden 1 ml olacak şekilde sırasıyla bakır klorür, neokuproin ve NH_4Ac tampon çözeltileri konulmuştur. Örnek ekstraktı (300 μl) da eklendikten sonra son hacme (4,1 ml) saf su (800 μl) ile tamamlanmıştır. Yarım saat oda sıcaklığında bekleyen karışımların absorbansı 450 nm’de köre karşı okunmuştur. Sonuçlar troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi (TEAC) cinsinden ifade edilmiştir (Çelik ve diğ., 2010).

3.2.6 Antosiyanin profillerinin belirlenmesi

Siyah pirinç numunelerinin antosiyanin profilini belirlemek ve antosiyanin içeriğindeki gerçekleşmesi beklenen değişimleri saptamak amacıyla bazı modifikasyonlar uygulanarak Zhang ve diğerlerine (2010) ait metot kullanılmıştır. Kullanılan yöntemin koşulları Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 : Siyah pirinç örneklerinin antosiyanin profillerinin belirlenmesinde uygulanan yöntemin HPLC çalışma koşulları.

HPLC Sistemi	Waters 2695 Separation module, Waters 2996 PDA dedektör
Kolon	Supelcosil C18, 5 μm , (25 x 4,6 mm)
Mobil Sistem	Gradient
Mobil Faz A	%4,5 formik asit
Mobil Faz B	%100 metanol
Kolon Sıcaklığı	25°C
İnjesiyon Hacmi	10 μl
Dalga Boyu	520nm
Yazılım	Empower Build 1154

Sonuçlar integrasyon alan hesabı ile değerlendirilmiş; alanlar, her standart için kalibrasyon eğrilerinden konsantrasyon olarak hesaplanmıştır. Standartlara ait kalibrasyon eğrileri Ek B’de Şekil B.1 ve B.2’de sunulmuştur.

Çizelge 3.2 : Siyah pirinç örneklerinin antosiyanin profillerinin belirlenmesinde uygulanan yöntemin HPLC gradient koşulları.

Zaman	%A	%B	Akış Hızı
0-30 dk	%90	%10	0,4 ml/dk
30-34 dk	%75	%25	0,4 ml/dk
34-42 dk	%67	%33	0,4 ml/dk
42-45 dk	%10	%90	0,4 ml/dk
45-50 dk	%90	%10	0,4 ml/dk

3.2.7 İstatiksel analiz

Çalışma kapsamındaki tüm deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda elde edilen veriler örnekler işlem kabul edirliliği $p < 0,05$ önem düzeyinde Tek Yollu Varyans Analizi (ANOVA) kullanılarak, SPSS istatistik yazılımı (versiyon 16.0) ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Analizler sonunda uygulanan pişirme metotları arasındaki farklılıkların belirlenebilmesi amacıyla Duncan’ın Çoklu Değerlendirme Testi (Duncan’s Multiple Range Test) kullanılmıştır. Varyans analiz sonuçları ve Duncan testinin detaylı sonuçları EK C’de Çizelge C.1’de verilmiştir. Metotlar arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon grafikleri EK D’de Şekil D.1, D.2, D.3, D.4, D.5, D.6, D.7, D.8, D.9, D.10, D.11, D.12, D.13, D.14 ve D.15’te sunulmuştur.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Siyah pirincin fenolik maddeleri ve antioksidan kapasitesi üzerine dört farklı pişirme yönteminin etkisinin incelendiği çalışmanın sonuçları, kullanılan pişirme yöntemlerinin prensibine göre atmosferik basınç altında [tüplü ocak üzerindeki teflon tencere (N), pirinç pişirici (R)] ve yüksek basınç altında [tüplü ocak üzerindeki düdüklü tencere (D), elektrikli düdüklü tencere (E)] olacak şekilde gruplandırılarak yorumlanmıştır.

4.1 Toplam Fenolik Madde Miktarı

Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak örneklerin fenolik madde miktarları belirlenmiş ve sonuçlar mg gallik asit eşdeğeri (GAE) / 100 g kuru madde cinsinden ifade edilmiştir. Farklı yöntemlerle pişmiş ve pişmemiş siyah pirinç örneklerinin toplam fenolik madde miktarları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Örneklerin ortalama toplam fenolik madde miktarlarına ve toplam fenolik madde miktarındaki azalma yüzdelere ait grafikler Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de sunulmuştur.

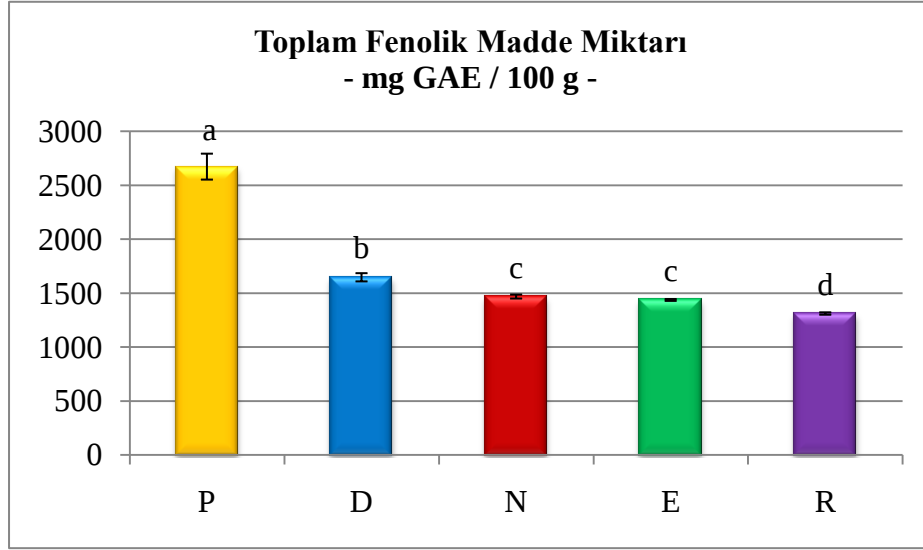
Çizelge 4.1 : Siyah pirinç örneklerin toplam fenolik madde miktarları.^{1,2}

<u>Basınç</u>	<u>Kontrol</u>	<u>mg GAE/100g</u>	<u>% azalma</u>
	P	2671,2±120,1	
	<u>Piştirme Metodu</u>	<u>mg GAE/100g</u>	
Atmosfer	N	1449,9±27,32	45,1
	R	1309,3±1097	51
Vakum	E	1437,9±29,10	46,3
	D	1611,7±20,11	38,4

¹Tabloda yer alan veriler 3 tekrara ait ortalamaları ve standart sapmayı göstermektedir. ²P:pişmemiş, D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

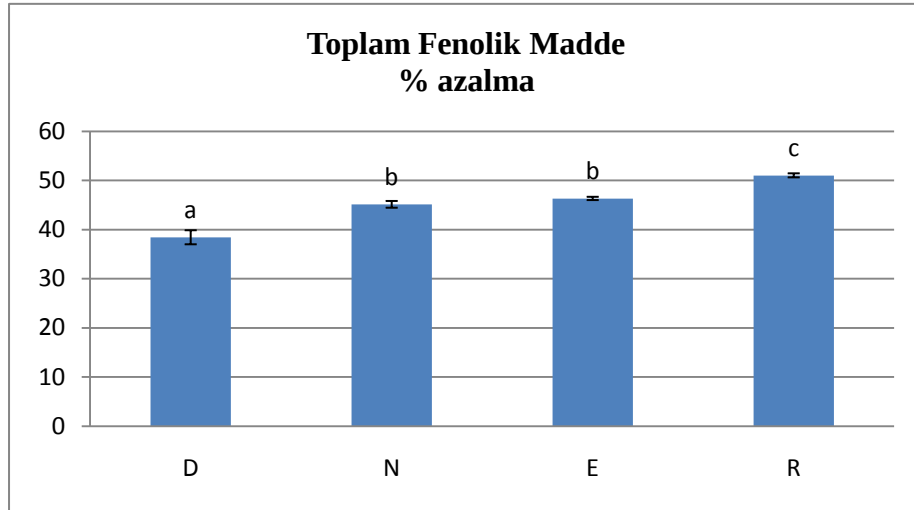
Çizelge 4.1’den de görüldüğü gibi, pişmemiş siyah pirinç (P) örneklerinin ortalama toplam fenolik madde miktarı 2671,2 mg GAE / 100 g kuru maddedir. Pişmiş siyah

pirinç örneklerinin toplam fenolik madde miktarları 1309,3 mg GAE / 100 kuru madde ve 1645,3 mg GAE / 100 g kuru madde arasında değişmektedir.



Şekil 4.1 : Siyah pirinç örneklerinin ortalama toplam fenolik madde miktarları.^{1,2}

¹Her sütunun üzerinde yer alan farklı harfler istatistiksel olarak farklılığın önemli olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$). ²P:pişmemiş, D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.



Şekil 4.2 : Pişmiş siyah pirinç örneklerinin toplam fenolik madde miktarlarındaki azalma.¹

¹D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

Şekil 4.2’de görüldüğü üzere pişirme işlemi sonunda toplam fenolik madde miktarında en fazla azalma atmosferik basınç altında çalışan pirinç pişiricide pişen siyah pirinçte %51 oranında gözlemlenirken, en az azalma yüksek basınç altında çalışan tüplü ocak üstündeki düdüklü tencerede pişen siyah pirinçte %38,4 oranında gerçekleşmiştir.

Farklı yöntemler ile pişirilen siyah pirinç örneklerindeki azalma miktarları D, N, E ve R için sırasıyla %38,4, %45,1, %46,3 ve %51'dir. Tek yollu Anova testi sonuçlarına göre pişirme yöntemleri arasında örneklerin toplam fenolik madde içeriği açısından istatistiksel olarak farklılık önemli bulunmuştur ($P<0,05$). Duncan'ın çoklu değerlendirme testi ile tüm pişirme yöntemleri arasındaki farklılık incelendiğinde ise N ve E yöntemleri ile pişmiş örneklerin fenolik madde içeriği arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunurken, D ve R yöntemleri ile pişirilmiş örnekler arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0,05$).

Shen ve arkadaşlarının (2009) farklı renkteki pirinçlerin fenolik içeriğini araştırdığı bir çalışmada beyaz pirincin farklı türleri için toplam fenolik madde miktarı 108,1 mg GAE / 100 g kuru madde ve 251,4 mg GAE / 100 g kuru madde olarak belirtilmektedir. Yine aynı çalışmada kırmızı ve siyah pirinç örnekleri de analizlenmiş olup toplam fenolik madde miktarı kırmızı ve siyah pirinç için sırasıyla 470.1 mg GAE / 100 g kuru madde ve 1055.7 mg GAE / 100 g kuru madde olarak bulunmuştur. Ticari yabani pirincin fenolik bileşenlerinin antioksidan özelliklerinin araştırıldığı çalışmada siyah yabani pirincin (419– 588 mg GAE / kg) toplam fenolik madde miktarı beyaz yabani pirince (46 mg GAE / kg) göre 9-13 kat kadar daha fazla olarak belirtilmiştir (Qiu ve diğ., 2010).

Yapılan başka bir çalışmada siyah pirincin, kepek ve endosperm olmak üzere farklı fraksiyonlarının antioksidan kapasitesi araştırılmıştır. Pirincin kepek kısmının fenolik içeriğinin endosperm kısmına göre yüksek olduğu saptanmıştır. Çalışmada kepek, endosperm ve tam tanenin fenolik içeriği sırasıyla 98,5, 1,94 ve 16,4 mg GAE / g olarak belirtilmiştir (Kong ve Lee, 2010). Siyah pirinç kepeği ile ilgili yapılan başka bir çalışmada da pirinç kepeklerinin toplam fenolik madde miktarları 2986 mg GAE / 100 g kuru madde ve 7043 mg GAE / 100 g kuru madde arasında değişmektedir (Zhang ve diğ., 2010). Beyaz pirinç kepeğinin antioksidan özelliklerinin incelendiği bir çalışmada ise pirinç kepeğinin fenolik madde miktarı 2,51 mg GAE / g ve 3,59 mg GAE / g arasında belirlenmiştir (Iqbal ve diğ., 2005).

Başka bir çalışmada ise farklı hububatların metanolik ekstraktlarının fenolik madde miktarları ve antioksidan kapasiteleri arasındaki ilişki incelenmiş ve analizlerde kullanılan beyaz pirinç, esmer pirinç, arpa ve sorgum için toplam fenolik madde miktarları sırasıyla 18, 54, 50 ve 733 mg GAE /100 g olarak belirlenmiştir (Choi ve diğ., 2007).

Bir çalışmada, mor buğday kepeğinin antioksidan özelliklerine ısıtma işleminin etkisini araştırmak amacıyla formülasyonunda mor buğday kepeği içeren kek örnekleri pişirilmiş ve pişirme işleminin mor buğday kepeğinin fenolik madde içeriğini azalttığı görülmüştür (Li ve diğ., 2007). Ranilla ve arkadaşlarının (2009) siyah fasulyenin fenolik madde içeriğinin ve antioksidan kapasitesinin çeşitli pişirme koşullarından nasıl etkilendiğinin araştırıldığı bir çalışmada ise, çiğ fasulyelerin toplam fenolik madde miktarı 37 mg kateşin / 100 g kuru madde olarak belirtilmiştir. Bu değer pişirilen fasulye örnekleri için 17,7 mg kateşin / 100 g kuru maddeye kadar düşüş göstermiştir. Başka bir çalışmada ise arpanın antioksidan aktivitesine fırında kızartmanın ve mikrodalganın etkisi araştırılmış ve bunun sonucunda mikrodalga yöntemi (%49,6) ile daha fazla olmak şartıyla her iki yöntemin de toplam fenolik madde miktarında önemli miktarda düşüşe sebep olduğu bulunmuştur (Sharma ve Gujral, 2010).

Bu sonuçlar yöntem ne olursa olsun pişirme işlemi siyah pirincin toplam fenolik madde miktarında azalmalara sebep olmaktadır. Pilav pişiricinde pişen pirincin toplam fenolik madde miktarında daha fazla düşüşün görülmesinin sebebi, bu metottaki sürenin diğerlerine göre çok daha uzun (70 dakika) olmasıyla açıklanabilir. Aynı şekilde tüplü ocak üstündeki düdüklü tencerede pişen pirincin toplam fenolik madde miktarının diğerlerine oranla daha iyi korunmasının nedeni de termal işlemin daha kısa olması şeklinde açıklanabilir. Ayrıca bu çalışmada, siyah pirincin toplam fenolik madde miktarının beyaz pirince göre oldukça fazla olduğu sonucuna da varılmaktadır. Pirinç ürünlerindeki toplam fenolik madde miktarları incelenen pirincin çeşidine, türüne ve analizlenen fraksiyona bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir.

4.2 Toplam Flavonoid Miktarı

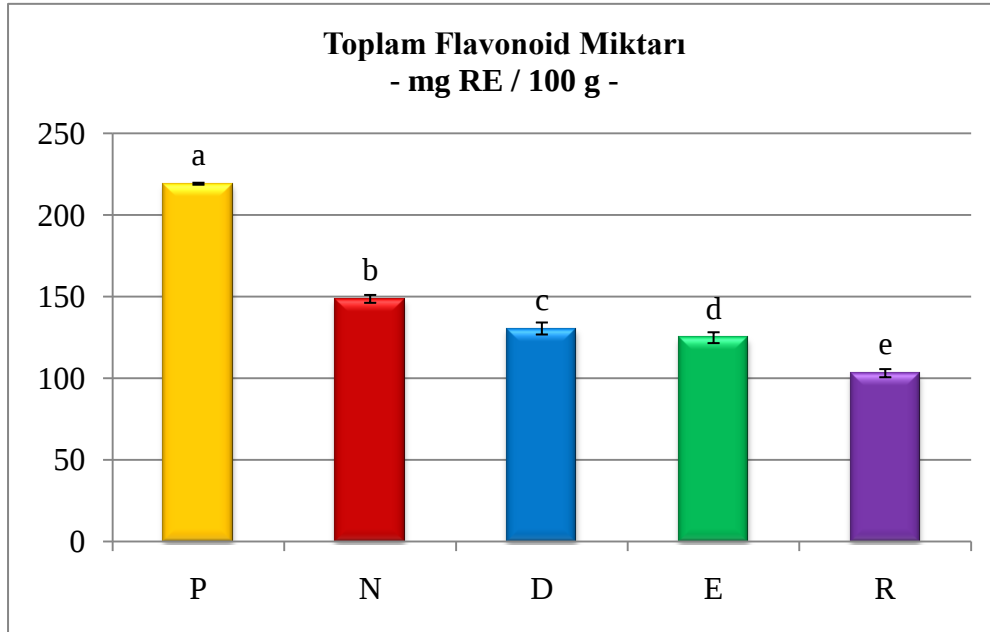
Toplam flavonoid miktarı analizinde siyah pirinç örneklerin flavonoid miktarı rutin eşdeğeri (RE) olarak ifade edilmiştir. Siyah pirinç örneklerinin toplam flavonoid miktarları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Örneklerin toplam flavonoid miktarlarının ortalamalarına ve toplam flavonoid miktarındaki azalma yüzdelerine ait grafikler ise Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’te sunulmuştur.

Çizelge 4.2 : Siyah pirinç örneklerinin toplam flavonoid miktarları.^{1,2}

<u>Basınç</u>	<u>Kontrol</u>	<u>mg RE/100g</u>	<u>% azalma</u>
	P	219,1±0,60	
	<u>Piştirme Metodu</u>	<u>mg RE/100g</u>	
	N	148,5±2,42	
Atmosfer	R	103,0±2,48	53
Vakum	E	124,8±3,33	43
	D	130,4±3,67	40,5

¹Tabloda yer alan veriler 3 tekrara ait ortalamaları ve standart sapmayı göstermektedir. ²P:pişmemiş, D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

Pişmemiş siyah pirinç örneklerinin (p) ortalama toplam flavonoid miktarı 219,1 mg RE / 100 g kuru madde olarak bulunmuştur. Pişmiş siyah pirinç örneklerinin toplam flavonoid madde miktarları 103 mg RE / 100 g kuru madde ile 148,5 mg RE / 100 g kuru madde arasında değişmektedir.

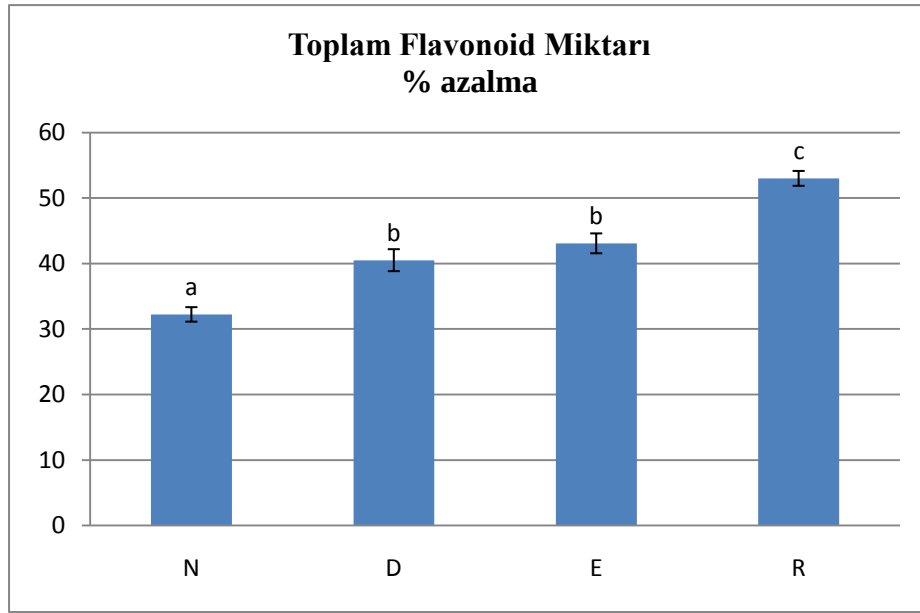


Şekil 4.3 : Siyah pirinç örneklerinin ortalama toplam flavonoid miktarları.^{1,2}

¹Her sütunun üzerinde yer alan farklı harfler istatistiksel olarak farklılığın önemli olduğunu göstermektedir ($p<0,05$). ²P:pişmemiş, D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

Piştirme işlemi sonucunda tüm metotlarda pişmemiş siyah pirince göre azalma olmuştur. Toplam flavonoid miktarında en yüksek azalma (%53) atmosferik basınç altında pirinç pişiricide pişen siyah pirinç örneklerinde, en düşük azalma (%32,2) ise

atmosferik basınç altında tüplü gaz üzerindeki teflon tencerede pişen siyah pirinç örneklerinde görülmüştür. Toplam flavonoid miktarlarındaki azalma R, E, D ve N için sırasıyla %53, %43, %40,5 ve %32,2 şeklindedir. Tek yollu Anova testi sonuçlarına göre farklı pişirme yöntemleri arasında örneklerin toplam flavonoid madde içeriği açısından istatistiksel olarak farklılık önemli bulunmuştur ($P<0,05$). Duncan'ın çoklu değerlendirme testi ile farklı yöntemler ile pişirilmiş örnekler arasındaki farklılık incelendiğinde tüm örneklerin birbiri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0,05$).



Şekil 4.4 : Pişmiş siyah pirinç örneklerinin toplam flavonoid miktarlarındaki azalma.¹

¹D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

Shen ve arkadaşlarının (2009) beyaz, kırmızı ve siyah olmak üzere 3 farklı renkteki pirinç örneklerinin toplam fenolik madde, flavonoid ve antioksidan kapasitesini araştırdığı çalışmada siyah pirinç için toplam flavonoid miktarı 240,6 mg RE / 100 g kuru madde olarak bulunmuştur. Ayrıca kırmızı ve beyaz pirinç için toplam flavonoid miktarı ise sırasıyla 131,6 mg RE / 100 g kuru madde ve 147,2 mg RE / 100 g kuru madde olarak tayin edilmiştir.

Çeşitli ürünlerdeki flavonoid miktarının ısıtma işlem sonucu nasıl değiştiğini inceleyen birçok çalışma mevcuttur. Domates ve soğanın pişirilmesi sonucu içerdikleri kuersetin miktarında azalma yaşanmıştır. Kızartma işlemine göre kaynatma ve mikrodalga ile pişirme yöntemleri flavonoid miktarlarında daha fazla azalmaya

neden olduğu belirtilmiştir (Crozier ve diğ., 1997). Benzer şekilde kırmızı üzüm kabuğunun 60, 100 ve 140°C olmak üzere 3 farklı sıcaklıkta kurutulduğu bir çalışmada ise flavonoid miktarında dondurularak kurutulan örneklerle göre daha fazla azalma gözlenmiştir (Larrauri ve diğ., 1997). Ayrıca uygulanan ısı işlemi süresinin flavonoid miktarını nasıl etkilediğinin araştırıldığı bir çalışmada, karabuğdayın flavonoid miktarındaki düşüş, aynı sıcaklıkta daha uzun süre ısı işlem uygulandığında artmaktadır (Dietrich-Szostak ve Oleszek, 1999).

4.3 Toplam Antosiyanin Miktarı

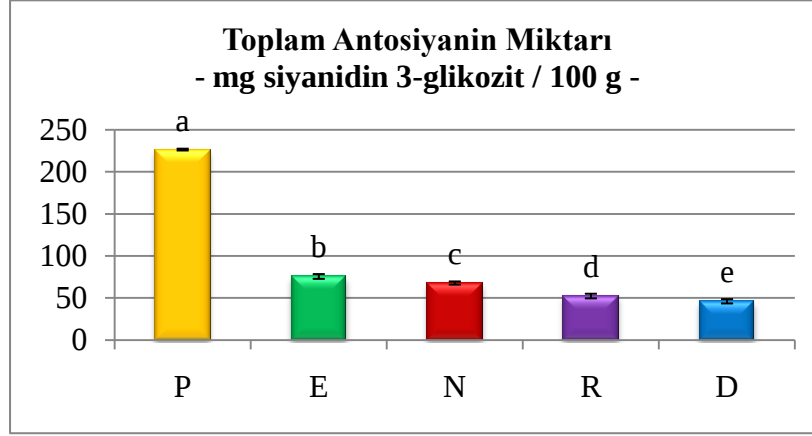
Toplam antosiyanin miktarı analizinde siyah pirinç örneklerinin antosiyanin miktarı siyanidin 3-glikozit cinsinden ifade edilmiştir. Siyah pirinç örneklerinin toplam antosiyanin miktarları Çizelge 4.3'te verilmiştir. Örneklerin toplam antosiyanin miktarlarının ortalamalarına ve toplam antosiyanin miktarındaki azalma yüzdelere ait grafikler ise Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da sunulmuştur.

Çizelge 4.3 : Siyah pirinç örneklerinin toplam antosiyanin miktarları.^{1,2}

<u>Basınc</u>	<u>Kontrol</u>	<u>mg siyanidin 3-glikozit/100g</u>	<u>% azalma</u>
	P	226,4±1,06	
	<u>Pişirme Metodu</u>	<u>mg siyanidin 3-glikozit/100g</u>	
Atmosfer	N	67,57±1,88	70,1
	R	52,10±2,74	77
Vakum	E	75,41±2,84	66,7
	D	45,87±2,57	79,7

¹Tabloda yer alan veriler 3 tekrara ait ortalamaları ve standart sapmayı göstermektedir. ²P:pişmemiş, D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

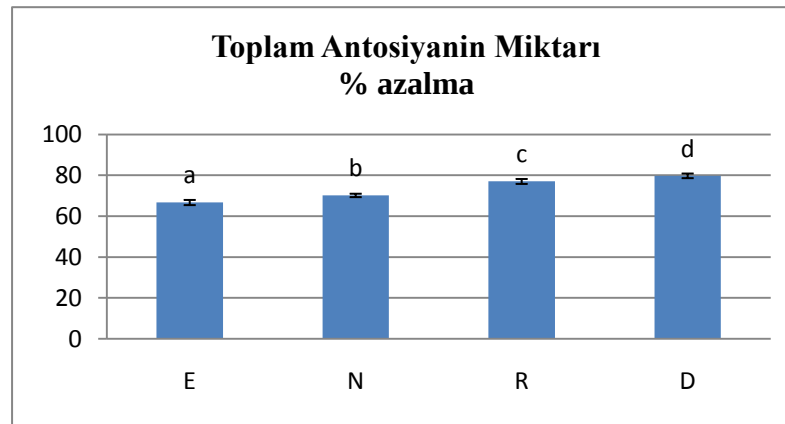
Pişmemiş siyah pirinç örneklerinin ortalama toplam antosiyanin miktarı 226,4 mg siyanidin 3-glikozit / 100 g kuru maddedir. Pişmiş siyah pirinç örneklerinin toplam antosiyanin madde miktarları 52,10 mg siyanidin 3-glikozit / 100 g kuru madde ile 75,41 mg siyanidin 3-glikozit / 100 g kuru madde arasında değişmektedir.



Şekil 4.5 : Siyah pirinç örneklerin ortalama toplam antosiyanin miktarları.^{1,2}

¹Her sütunun üzerinde yer alan farklı harfler istatistiksel olarak farklılığın önemli olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$). ²P:pişmemiş, D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

Piştirme işlemi sonucunda tüm metotlarda pişmemiş siyah pirince göre toplam antosiyanin içeriğinde önemli miktarda azalma olmuştur. Toplam antosiyanin miktarında en fazla azalma (%79,7) tüplü ocak üstündeki düdüklü tencerde pişen siyah pirinç örneklerinde, en düşük azalma (%66,7) ise elektrikli düdüklü tencerde pişen siyah pirinç örneklerinde görülmüştür. Toplam antosiyanin miktarlarındaki azalma E, N, R ve D için sırasıyla %66,7, %70,1, %77 ve %79,7 şeklindedir. Tek yönlü Anova testi sonuçlarına göre dört farklı piştirme yönteminin örneklerin toplam antosiyanin madde içeriği açısından istatistiksel olarak önemli farklılık olduğu görülmektedir ($P < 0,05$). Duncan'ın çoklu değerlendirme testi ile örnekler arasındaki farklılık incelendiğinde tüm örneklerin birbiri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli olduğu görülmektedir ($P < 0,05$).



Şekil 4.6 : Pişmiş siyah pirinç örneklerinin toplam antosiyanin miktarlarındaki azalma.¹

¹D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

Yao ve arkadaşları (2010) Çin’de yetişen siyah pirinç, mor pirinç, kırmızı pirinç, mor mısır, siyah arpa ve siyah soya fasulyesi gibi renkli tahıl tanelerinin antioksidan aktivitesini incelemiş ve bu çalışma sonucunda siyah pirincin en yüksek toplam antosiyanin miktarına sahip olduğunu rapor etmiştir. Çalışmada siyah pirinç, mor pirinç, kırmızı pirinç, mor mısır, siyah arpa ve siyah soya fasulyesi için toplam antosiyanin miktarı sırasıyla 3,83 mg antosiyanin/g kuru madde, 1,22 mg antosiyanin/g kuru madde, 0,05 mg antosiyanin/g kuru madde, 0,31 mg antosiyanin/g kuru madde, 0,27 mg antosiyanin/g kuru madde ve 0,19 mg antosiyanin/g kuru madde olarak bulunmuştur (Yao ve diğ., 2010).

Siyah yapışkan pirinç için optimum ekstraksiyon koşullarının araştırıldığı bir çalışmada, farklı pH ve farklı sürelerde uygulanan ekstraksiyon sonucunda siyah yapışkan pirinç için toplam antosiyanin miktarı 275 – 352 µg siyanidin 3-glikozit / g kuru madde olarak verilmiştir (Tananuwong ve Tewaruth, 2010).

Yapılan başka bir çalışmada mor buğday kepeğinin ve ısıtılmış mor buğday kepeğinin toplam antosiyanin miktarları 1.155 ve 1.035 mg siyanidin 3-glikozit / g kuru madde olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar arasında önemli bir fark olmadığı görülmüştür. Ancak mor buğday kepeğini içeren keklerin toplam antosiyanin miktarları incelendiğinde antosiyaninlerin tümüyle degrade olması sebebiyle %100 kayıp söz konusu olmuştur (Li ve diğ., 2007).

Zhang ve arkadaşlarının (2010), 12 farklı siyah pirinç çeşidinden elde ettiği kepeklerin antioksidan aktivitesini araştırdığı çalışmada, siyah pirinç örnekleri için toplam serbest antosiyanin miktarı pH-diferansiyel metodu kullanılarak 1227 mg siyanidin 3-glikozit / 100 g kuru madde ile 5096 mg siyanidin 3-glikozit / 100 g kuru madde arasında bulunmuştur. Bu değerler aynı çalışmada kontrol grubu olarak kullanılan 2 farklı beyaz pirinç örneğinin toplam serbest antosiyanin miktarından (3,09 – 33,50 mg siyanidin 3-glikozit / 100 g kuru madde) oldukça yüksektir.

Bir çalışmada mürverin antosiyanin içeriğinin ısıtılmış işlem karşı çok hassas olduğu gözlemlenmiştir. 95°C’de 3 saatlik ısıtılmış işlem sonucunda mürver pigmentlerinin yalnızca %50’si korunmuştur. Yüksek sıcaklıklarda işlem gören yabanmersininin toplam monomerik antosiyanin miktarında taze meyvesiyle karşılaştırıldığında %43 azalma olduğu saptanmıştır. Benzer kayıplar ahududu için de gözlemlenmiştir. Reçel yapımı sırasında kaynatma işleminin 10 dakikadan 15 dakikaya kadar değişmesiyle

antosiyenin miktarında %10'dan %80'e varan kayıp olmuştur. Ayrıca kırmızı kabağa uygulanan haşlama, kaynatma ve buharda pişirme yöntemlerinde antosiyenin kayıpları sırasıyla %59, %41 ve % 29 olarak bulunmuştur (Patras ve diğ., 2010).

4.4 Antioksidan Aktivitesi Tayinleri

Antioksidan aktivite analizleri farklı bitki materyallerini veya onların metabolitlerini karakterize etmek amacıyla çoğu kez başka metotlarla beraber kullanılırlar. Bununla birlikte, dokulardaki tüm kullanılabilir antioksidanları analizleme kabiliyetine sahip olmadığından dolayı mevcut antioksidan metotları birbirlerine göre bir çok avantaja ve dezavantaja sahiptirler. Metotların prensipleri, oluşan radikale veya reaksiyon süresine göre oldukça farklılık göstermektedir. Hatta DPPH ve ABTS gibi aynı prensip ile işleyen metotlar bile farklı tipteki antioksidanlara karşı farklı sonuçlar verebilmektedirler. Ayrıca radikal oluşum reaksiyonları veya farklı çözgen sistemlerdeki radikallerin çözünürlükleri de her metot için farklılık göstermektedir (Çapanoğlu, 2008).

ABTS, DPPH gibi antioksidan aktivite ölçümlerinde kullanılan in-vitro metotlar, siyah pirincin içerdiği antosiyeninler gibi fenolik maddelerin biyoyararlılığı ya da bu maddelerin biyolojik sistemlerdeki metabolizması hakkında bilgi vermemektedir. Ancak bu metotlar, çok farklı çeşitlerdeki örneklerle uygulanabilir olduğundan dolayı farklı örnekler arasında antioksidan aktivitesi açısından kıyaslama yapılabilmesine olanak sağlamaktadır (Dykes ve Rooney, 2007).

Bitkisel gıdalarda yalnızca tek bir metot kullanılarak antioksidan aktivitenin ölçülmesi, bitkinin sahip olduğu fitokimyasalların karmaşık ve kompleks yapıları sebebiyle hatalı sonuçlar verebilmektedir. Bu nedenle toplam fenolik madde, toplam flavonoid ve toplam antosiyenin miktarları belirlenen örneklerle DPPH, ABTS, FRAP ve CUPRAC olmak üzere dört farklı çeşit antioksidan aktivitesi tayin yöntemi uygulanmıştır.

4.4.1 DPPH metodu ile toplam antioksidan aktivitesi tayini

Toplam antioksidan aktivitesi analizinde DPPH metodu kullanılmış ve siyah pirinç örneklerin antioksidan aktivitesi troloks eşdeğerliği antioksidan kapasite (TEAC) cinsinden ifade edilmiştir. Siyah pirinç örneklerinin toplam antioksidan aktiviteleri Çizelge 4.4'te verilmiştir. Örneklerin toplam antioksidan aktivitelerinin

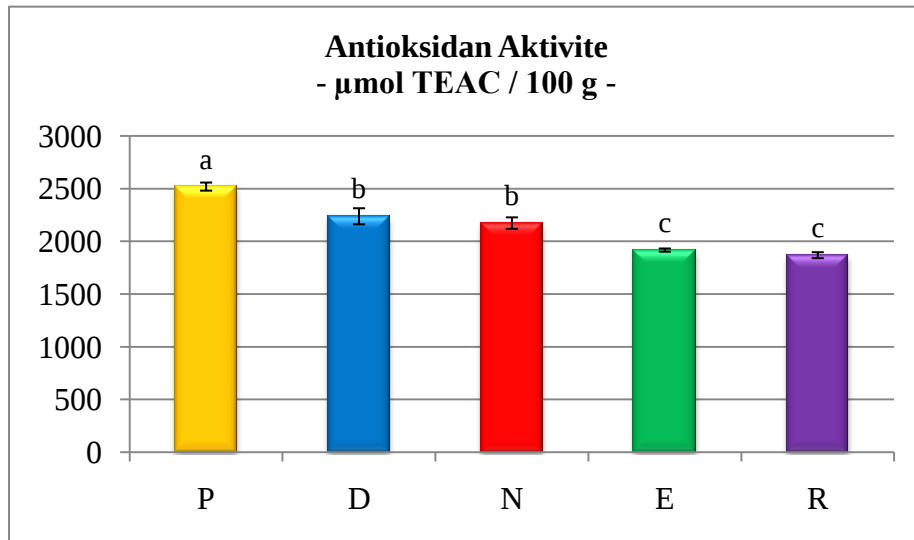
ortalamalarına ve toplam antioksidan aktivitesindeki azalma yüzdelerine ait grafikler ise Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de sunulmuştur.

Çizelge 4.4 : Siyah pirinç örneklerinin DPPH metodu ile toplam antioksidan aktiviteleri.^{1,2}

<u>Basınç</u>	<u>Kontrol</u>	<u>μmol TEAC</u> <u>/100g</u>	<u>% azalma</u>
	P	2520,2±38,34	
Atmosfer	<u>Piştirme</u> <u>Metodu</u>	<u>μmol TEAC</u> <u>/100g</u>	
	N	2173,5±54,74	
Vakum	R	1869,2±28,31	
	E	1917,5±15,08	
	D	2238,5±76,22	

¹Tabloda yer alan veriler 3 tekrara ait ortalamaları ve standart sapmayı göstermektedir. ²P:pişmemiş, D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

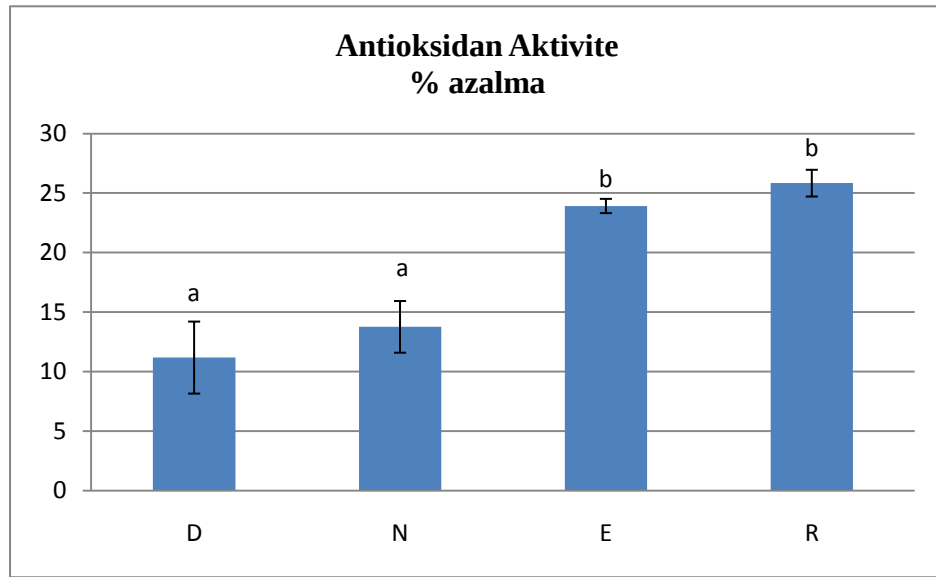
Pişmemiş siyah pirinç örneklerinin DPPH metodu ile bulunan ortalama toplam antioksidan kapasitesi 2520,2 μmol TEAC / 100 g kuru maddedir. Pişmiş siyah pirinç örneklerinin DPPH metodu ile bulunan toplam antioksidan kapasitesi ise 1869,2 μmol TEAC/ 100 g kuru madde ile 2238,5 μmol TEAC / 100 g kuru madde arasında değişmektedir.



Şekil 4.7 : Siyah pirinç örneklerinin DPPH metoduna göre belirlenen ortalama antioksidan aktiviteleri.^{1,2}

¹Her sütunun üzerinde yer alan farklı harfler istatistiksel olarak farklılığın önemli olduğunu göstermektedir (p<0,05). ²P:pişmemiş, D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

Piştirme işlemi sonucunda tüm piştirme metotlarında pişmemiş siyah pirince göre toplam antioksidan aktivitesinde bir miktar azalma gözlenmiştir. Toplam antioksidan aktivitesinde en fazla azalma (%25,8) pirinç pişiricide pişen siyah pirinç örneklerinde, en düşük azalma (%11,2) ise tüplü ocak üstündeki düdüklü tencerede pişen siyah pirinç örneklerinde görülmüştür. DPPH metodu ile toplam antioksidan aktivitesindeki azalma D, N, E ve R için sırasıyla %11,2, %13,7, %23,9 ve %25,8 şeklindedir. Tek yollu Anova testi sonuçlarına göre dört farklı piştirme yönteminin örneklerdeki antioksidan aktivitelerinin azalmasında etkisinin istatistiksel olarak farklı olduğu görülmektedir ($P<0,05$).



Şekil 4.8 : Siyah pirinç örneklerinin DPPH metoduna göre belirlenen ortalama antioksidan aktivitelerindeki azalma.¹

¹D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

Duncan'ın çoklu değerlendirme testi ile örnekler arasındaki farklılık incelendiğinde ise D ile N yöntemleri ve E ile R yöntemleri uygulanarak pişmiş örneklerin fenolik madde içeriği arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunurken, diğer örnekler arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0,05$).

Beyaz pirinç gibi pigmentsiz tanelerle siyah pirinç, kırmızı sorgum gibi pigmentli tanelerin ekstraktlarının toplam antioksidan kapasitesi incelenmiştir. Yapılan çalışmada sonuç olarak siyah pirinç ve kırmızı sorgumun % radikal yakalama aktiviteleri sırasıyla %87 ve %92 olarak bulunurken, pigmentsiz örneklerde bu miktar %7 ile %67 arasında değişmiştir. Buna göre siyah pirinç ve kırmızı sorgumun oldukça yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar yüksek

pigment içeriğine sahip hurma, kuru üzüm gibi meyvelerle yapılan başka bir çalışmayla da yüksek antioksidan aktivite göstermeleri açısından benzerlik göstermektedir. Aynı çalışmada antosiyaninlerin kırmızı sorgum ve siyah pirinç için başlıca ekstrakte edilebilir polifenoller olduğu belirtilmiştir. Ayrıca DPPH radikali ile antosiyaninin renk etkileşimi sonucunda, antosiyaninlerin maksimum 475 – 485 nm’de absorbe olmasından dolayı daha düşük radikal yakalama aktivitesi elde edilmekte ve örneklerin toplam fenolik madde içeriği ile %DPPH yakalama aktivitesi arasındaki korelasyonun, yüksek antosiyanin içerikleri nedeniyle düşük olarak bulunduğu rapor edilmiştir (Choi ve diğ., 2007).

Siyah pirinçle benzerlik gösteren mor pirinçten elde edilen kepeğin iç ve dış fraksiyonlarında DPPH yöntemi ile yapılan analiz sonucunda lipofilik ekstrakt için dış fraksiyondaki toplam antioksidan aktivite 5,6 $\mu\text{mol TEAC} / \text{g}$ kuru madde ve iç fraksiyondaki toplam antioksidan aktivite 4,6 $\mu\text{mol TEAC} / \text{g}$ kuru madde, hidrofilik ekstrakt için dış fraksiyondaki toplam antioksidan aktivite 78,2 $\mu\text{mol TEAC} / \text{g}$ kuru madde ve iç fraksiyondaki toplam antioksidan aktivite 433,6 $\mu\text{mol TEAC} / \text{g}$ kuru madde olarak belirtilmiştir (Jang ve Xu, 2009).

Li ve arkadaşlarının (2007) yapmış olduğu bir çalışmada ise, ısıtma işlem görmüş mor buğday kepeğinde (1,68 mg troluks / g) ısıtma işlem görmemiş ve mor buğday ile yapılan keklere göre DPPH metodu ile daha yüksek antioksidan kapasite elde edilmiştir. İşlem görmemiş mor buğday kepeği ile mor buğday kepeği ile yapılan kekin DPPH yakalama aktivitesi arasında fark görülmemiştir. İşlem görmemiş mor buğday kepeğinin DPPH yakalama aktivitesi 1,47 mg troluks / g olarak ölçülmüştür. Mor buğday kepeğinin ısıtma işleme maruz kaldığı süre boyunca DPPH yakalama aktivitesinde artış gözlemlenmiştir. Formülasyonlarında mor buğday kepeği bulunan pişirilmiş keklerdeki DPPH yakalama aktivitesi pişmemiş keklere göre farklı bulunmamıştır.

4.4.2 ABTS metodu ile toplam antioksidan aktivitesi tayini

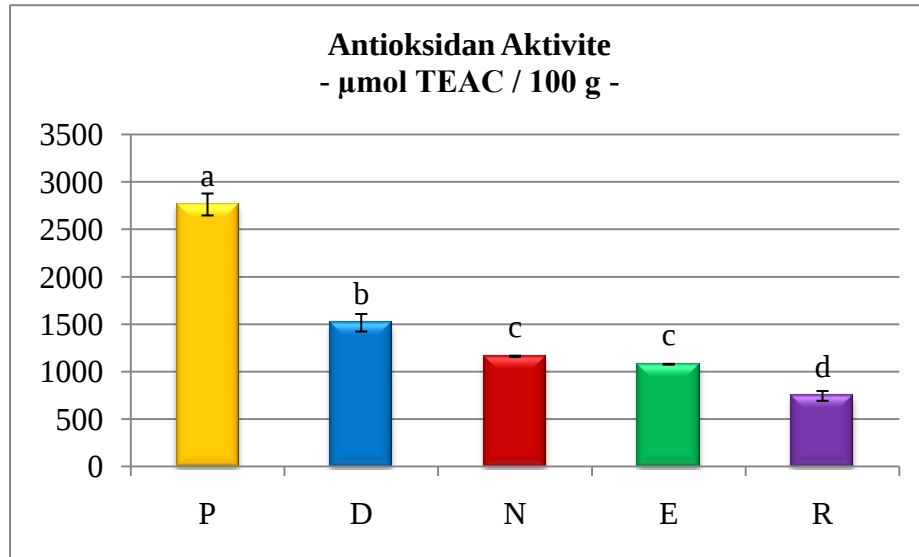
Siyah pirinç örneklerinin ABTS metodu ile hesaplanan toplam antioksidan aktiviteleri Çizelge 4.5’te verilmiştir. Örneklerin toplam antioksidan aktivitelerinin ortalamalarına ve toplam antioksidan aktivitesindeki azalma yüzdelerine ait grafikler ise Şekil 4.9 ve Şekil 4.10’da sunulmuştur. Sonuçlar $\mu\text{mol TEAC} / 100 \text{ g}$ kuru madde olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4.5 : Siyah pirinç örneklerinin ABTS metodu ile toplam antioksidan aktiviteleri.^{1,2}

<u>Basınc</u>	<u>Kontrol</u>	<u>μmol TEAC /100g</u>	<u>% azalma</u>
	<u>Piştirme Metodu</u>	<u>μmol TEAC /100g</u>	
Atmosfer	P	2763,2±115,7	
	N	1161,9±6,45	57,9
Vakum	R	744,2±51,72	73,1
	E	1078,3±3,97	61
	D	1515,4±92,53	45,2

¹Tabloda yer alan veriler 3 tekrara ait ortalamaları ve standart sapmayı göstermektedir. ²P:pişmemiş, D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

Çizelge 4.5’den de görüldüğü gibi, pişmemiş siyah pirinç örneklerinin ABTS metodu ile hesaplanan ortalama toplam antioksidan kapasitesi 2763,2 μmol TEAC / 100 g kuru maddedir. ABTS yöntemi ile tayin edilen toplam antioksidan aktiviteleri 744,2 μmol TEAC/ 100 g kuru madde ile 1515,4 μmol TEAC / 100 g kuru madde arasında değişmektedir.

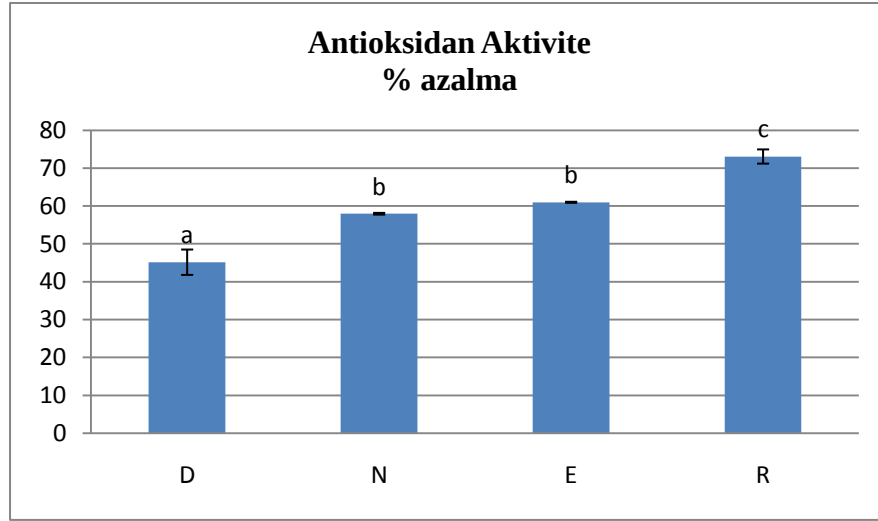


Şekil 4.9 : Siyah pirinç örneklerinin ABTS metoduna göre belirlenen ortalama antioksidan aktiviteleri.^{1,2}

¹Her sütunun üzerinde yer alan farklı harfler istatistiksel olarak farklılığın önemli olduğunu göstermektedir (p<0,05). ²P:pişmemiş, D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

Toplam antioksidan aktivitesinde en fazla azalma (%73,1) pirinç pişiricide pişen siyah pirinç örneklerinde, en düşük azalma (%45,2) ise tüplü ocak üstündeki düdüklü

tencerede pişen siyah pirinç örneklerinde görülmüştür. ABTS metodu ile toplam antioksidan aktivitesindeki azalma D, N, E ve R için sırasıyla %45,2, %57,9, %61 ve %73,1 şeklindedir.



Şekil 4.10 : Siyah pirinç örneklerinin ABTS metoduna göre belirlenen ortalama antioksidan aktivitelerindeki azalma.¹

¹P:pişmemiş, D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

Tek yollu Anova testi sonuçlarına göre dört farklı pişirme yönteminin örneklerdeki antioksidan aktivitelerinin azalmasındaki etkisinin istatistiksel olarak farklı olduğu görülmektedir ($P < 0,05$). Duncan'ın çoklu değerlendirme testi ile örnekler arasındaki farklılık incelendiğinde ise N ve E yöntemleri ile pişmiş örneklerin toplam antioksidan içeriği arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunurken, diğer örneklerin birbirinden istatistiksel olarak farklı olduğu görülmektedir ($P < 0,05$).

Beyaz, kırmızı ve siyah pirincin antioksidan aktivitesinin ABTS metodu ile ölçüldüğü bir araştırmada tüm pirinçler için sonuçlar 0,012 mM TEAC / 100 g kuru madde ile 5,533 mM TEAC / 100 g kuru madde arasında bulunmuş ve genel ortalama 0,413 mM TEAC / 100 g kuru madde olarak hesaplanmıştır. Beyaz pirinç örnekleri için antioksidan aktivite 0,012 mM TEAC / 100 g kuru madde ile 0,413 mM TEAC / 100 g kuru madde arasında değişirken ortalama değer 0,196 mM TEAC / 100 g kuru madde, kırmızı pirinç örnekleri için ise antioksidan aktivite 0,291 mM TEAC / 100 g kuru madde ile 2,963 mM TEAC / 100 g kuru madde arasında değişirken ortalama değer 1,705 mM TEAC / 100 g kuru madde olarak ifade edilmiştir. Siyah pirinç örneklerinin ortalama antioksidan aktivitesi ise 4,484 mM TEAC / 100 g kuru madde olarak belirtilmiş olup, bu değer yaklaşık olarak kırmızı

pirinç için hesaplanan değerin 3 katı kadardır (Shen ve diğ., 2009). Başka bir çalışmada un haline getirilmiş tam karabuğday tanelerinin ABTS metodu ile hesaplanan antioksidan aktiviteleri 0,28 μM TEAC / g un ile 12,45 μM TEAC / g un aralığında bulunmuştur (Hung ve Morita, 2008).

Piştirme işlemi sonucunda tüm piştirme metotlarında pişmemiş siyah pirince göre toplam antioksidan aktivitesinde DPPH metodundan farklı şekilde yüksek miktarda azalma gözlemlenmiştir. Aynı çalışma prensibine sahip ABTS ve DPPH metotları ile antioksidan aktivitesi tayini sonucunda her iki yöntem için de antioksidan aktivitedeki azalmanın aynı sıra ile (D<N<E<R) gerçekleştiği görülmektedir. Ancak ölçümlerdeki değişkenlik ABTS yönteminde (744,2 -2763,2 μmol TEAC / 100 g kuru madde) DPPH yöntemine (1869,2 - 2520,2 μmol TEAC / 100 g kuru madde) göre daha yüksek gözlenmiştir. Söz konusu bu durum ABTS çözeltisinin stabilitesinin DPPH radikaline oranla daha düşük olması ile açıklanabilir (Yu ve diğ., 2002).

4.4.3 FRAP metodu ile toplam antioksidan aktivitesi tayini

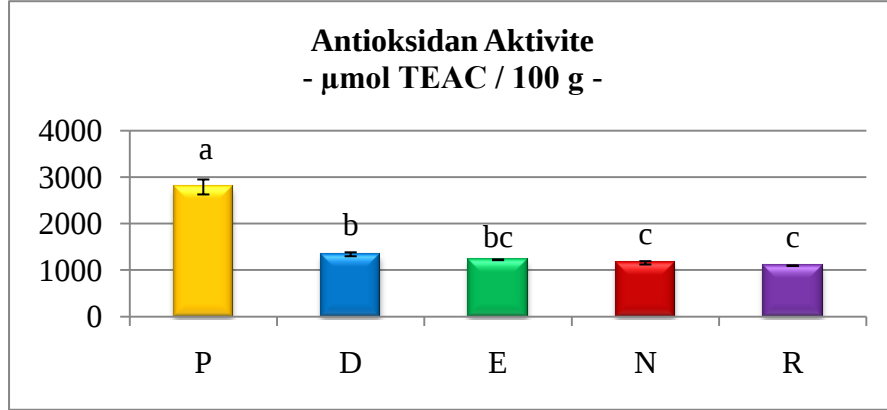
Siyah pirinç örneklerinin FRAP metodu ile hesaplanan toplam antioksidan aktiviteleri Çizelge 4.6’da verilmiştir. Örneklerin toplam antioksidan aktivitelerinin ortalamalarına ve toplam antioksidan aktivitesindeki azalma yüzdelerine ait grafikler ise Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’de sunulmuştur. Sonuçlar μmol TEAC / 100 g kuru madde olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4.6 : Siyah pirinç örneklerinin FRAP metodu ile toplam antioksidan aktiviteleri.^{1,2}

<u>Basınç</u>	<u>Kontrol</u>	<u>μmol TEAC /100g</u>	<u>% azalma</u>
	P	2786,2 $\pm$ 160,9	
	<u>Piştirme Metodu</u>	<u>μmol TEAC /100g</u>	
Atmosfer	N	1152,6 $\pm$ 35,79	58,6
	R	1091,1 $\pm$ 4,16	60,8
Vakum	E	1218,2 $\pm$ 7,75	56,3
	D	1337,0 $\pm$ 42,04	52

¹Tabloda yer alan veriler 3 tekrara ait ortalamaları ve standart sapmayı göstermektedir. ²P:pişmemiş, D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

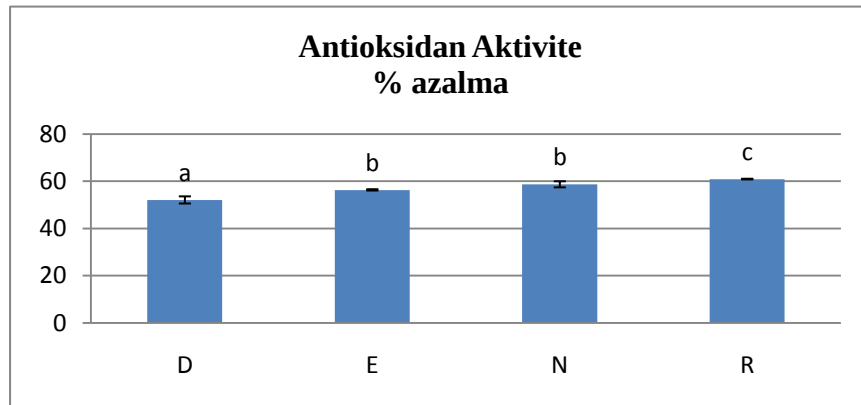
Pişmemiş siyah pirinç örneklerinin FRAP metodu ile hesaplanan ortalama toplam antioksidan kapasitesi 2786,2 $\mu\text{mol TEAC} / 100 \text{ g}$ kuru maddedir. FRAP yöntemi ile tayin edilen toplam antioksidan aktiviteleri 1091,1 $\mu\text{mol TEAC} / 100 \text{ g}$ kuru madde ile 1337,0 $\mu\text{mol TEAC} / 100 \text{ g}$ kuru madde arasında değiştiği görülmektedir.



Şekil 4.11 : Siyah pirinç örneklerinin FRAP metoduna göre belirlenen ortalama antioksidan aktiviteleri.^{1,2}

¹Her sütunun üzerinde yer alan farklı harfler istatistiksel olarak farklılığın önemli olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$). ²P:pişmemiş, D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

Piştirme işlemi sonucunda tüm piştirme metotlarında pişmemiş siyah pirince göre toplam antioksidan aktivitesinde azalma gözlemlenmiştir. Toplam antioksidan aktivitesinde en fazla (%60,8) azalma pirinç pişiricide pişen siyah pirinç örneklerinde, en düşük azalma (%52) ise tüplü ocak üstündeki düdüklü tencerde pişen siyah pirinç örneklerinde görülmüştür. FRAP metodu ile toplam antioksidan aktivitesindeki azalma D, E, N ve R için sırasıyla %52, %56,3, %58,6 ve %60,8 şeklindedir.



Şekil 4.12 : Siyah pirinç örneklerinin FRAP metoduna göre belirlenen ortalama antioksidan aktivitelerindeki azalma.¹

¹D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

Tek yollu Anova testi sonuçlarına göre dört farklı pişirme yönteminin örneklerdeki antioksidan aktivitelerinin azalmasındaki etkisinin istatistiksel olarak farklı olduğu görülmektedir ($P<0,05$). Duncan'ın çoklu değerlendirme testi ile örnekler arasındaki farklılık incelendiğinde ise E, N ve R yöntemleri ile pişmiş örneklerin toplam antioksidan içeriği arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P<0,05$). Ayrıca D ve E yöntemleri uygulanarak pişmiş örneklerin fenolik madde içeriği arasındaki farklılık da istatistiksel olarak önemsizken diğer yöntemler arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0,05$).

Siyah yapışkan pirinç için optimum ekstraksiyon koşullarının araştırıldığı bir çalışmada, farklı pH ve farklı sürelerde uygulanan ekstraksiyon sonucunda siyah yapışkan pirinç için FRAP metodu kullanılarak hesaplanan toplam antioksidan aktivite değerleri 9,31 – 11,46 $\mu\text{mol TEAC} / \text{g}$ un olarak verilmiştir (Tananu Wong ve Tewaruth, 2010).

Çeşitli hububatların polifenol içeriğinin ve antioksidan kapasitesinin incelendiği bir araştırmada, pişmemiş beyaz pirinç için FRAP metodu kullanılarak hesaplanan antioksidan aktivite 3,77 $\mu\text{mol TEAC/g}$ ve kaynamış beyaz pirinç için 4,30 $\mu\text{mol TEAC/g}$ olarak verilmiştir. Kaynatma işlemi beyaz pirincin antioksidan kapasitesinde artışa sebep olmaktadır. Bu da siyah pirinç için bulunan sonuçtan oldukça farklıdır. Ancak ekstraksiyon için kullanılan çözgen sistemlerinin her çalışmada farklılık göstermesinden dolayı veriler arasında kesin bir şekilde mukayese yapmak söz konusu değildir (Perez-Jimenez ve Saura-Calixto, 2005).

4.4.4 CUPRAC metodu ile toplam antioksidan aktivitesi tayini

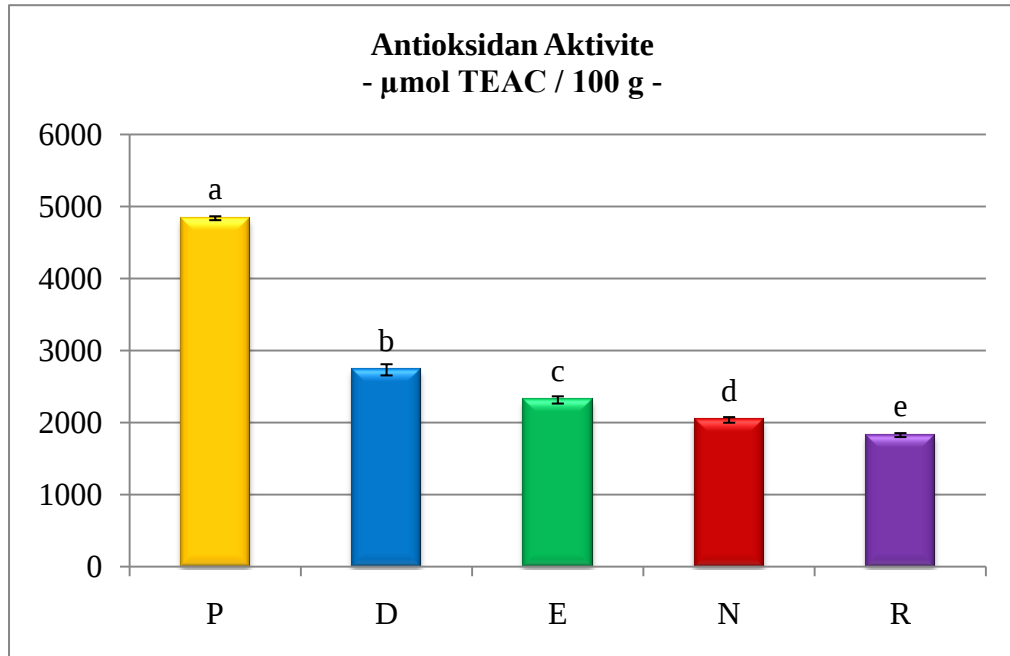
Siyah pirinç örneklerinin CUPRAC metodu ile hesaplanan toplam antioksidan aktiviteleri Çizelge 4.7'de verilmiştir. Örneklerin toplam antioksidan aktivitelerinin ortalamalarına ve toplam antioksidan aktivitesindeki azalma yüzdelerine ait grafikler ise Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te sunulmuştur. Sonuçlar $\mu\text{mol TEAC} / 100 \text{ g}$ kuru madde olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4.7 : Siyah pirinç örneklerinin CUPRAC metodu ile toplam antioksidan aktiviteleri.^{1,2}

<u>Basınc</u>	<u>Kontrol</u>	<u>μmol TEAC</u> <u>/100g</u>	<u>% azalma</u>
	P	4838,5±27,1	
	<u>Piştirme</u> <u>Metodu</u>	<u>μmol TEAC</u> <u>/100g</u>	
Atmosfer	N	2037,8±39,18	57,9
	R	1827,0±27,63	62,2
Vakum	E	2315,3±50,15	52,1
	D	2733,3±77,90	43,5

¹Tabloda yer alan veriler 3 tekrara ait ortalamaları ve standart sapmayı göstermektedir. ²P:pişmemiş, D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

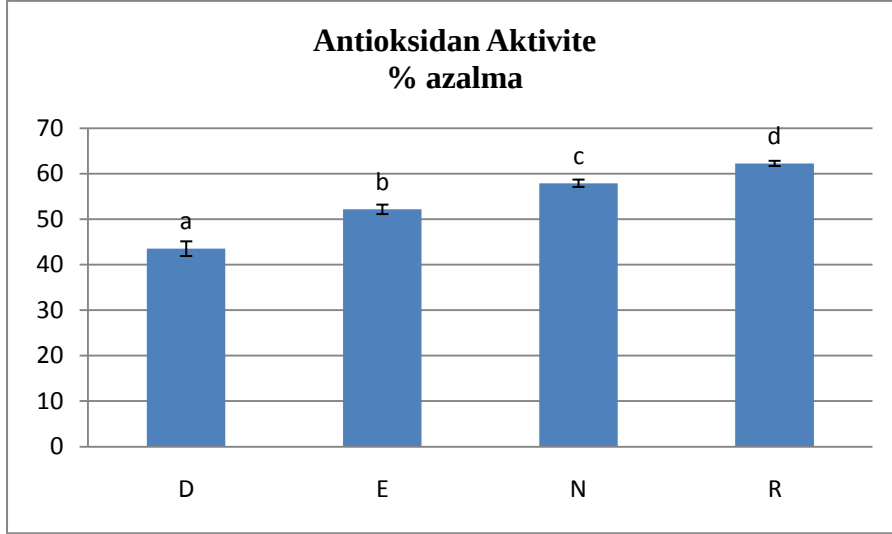
Pişmemiş siyah pirinç örneklerinin CUPRAC metodu ile hesaplanan ortalama toplam antioksidan kapasitesi 4838,5 μmol TEAC / 100 g kuru maddedir. CUPRAC yöntemi ile tayin edilen toplam antioksidan aktiviteleri pişmiş siyah pirinç için 1827,0 μmol TEAC/ 100 g kuru madde ile 2733,3 μmol TEAC / 100 g kuru madde arasında değişmektedir.



Şekil 4.13 : Siyah pirinç örneklerinin CUPRAC metoduna göre belirlenen ortalama antioksidan aktiviteleri.^{1,2}

¹Her sütunun üzerinde yer alan farklı harfler istatistiksel olarak farklılığın önemli olduğunu göstermektedir (p<0,05). ²P:pişmemiş, D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

Piştirme işlemi sonucunda tüm piştirme metotlarında pişmemiş siyah pirince göre toplam antioksidan aktivitesinde azalma gözlemlenmiştir. Toplam antioksidan aktivitesinde en fazla (%62,2) azalma pirinç pişiricide pişen siyah pirinç örneklerinde, en düşük (%43,5) azalma ise tüplü ocak üstündeki düdüklü tencerede pişen siyah pirinç örneklerinde görülmüştür. CUPRAC metodu ile toplam antioksidan aktivitesindeki azalma D, E, N ve R için sırasıyla %43,5, %52,1, %57,9 ve %62,2 şeklindedir.



Şekil 4.14 : Siyah pirinç örneklerinin CUPRAC metoduna göre belirlenen ortalama antioksidan aktivitelerindeki azalma.¹

¹D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

Tek yollu Anova testi sonuçlarına göre dört farklı piştirme yönteminin örneklerdeki antioksidan aktivitelerinin azalmasındaki etkisinin istatistiksel olarak farklı olduğu görülmektedir ($P < 0,05$). Duncan'ın çoklu değerlendirme testi ile örnekler arasındaki farklılık incelendiğinde tüm örneklerin birbiri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli olarak bulunmuştur ($P < 0,05$).

Siyah pirinç ile ilgili olarak bu zamana kadar CUPRAC metodu ile antioksidan aktivite tayini yapılmış bir çalışmaya rastlanamamıştır.

4.5 Siyah Pirinç Örneklerinin Antosiyanin Profilleri

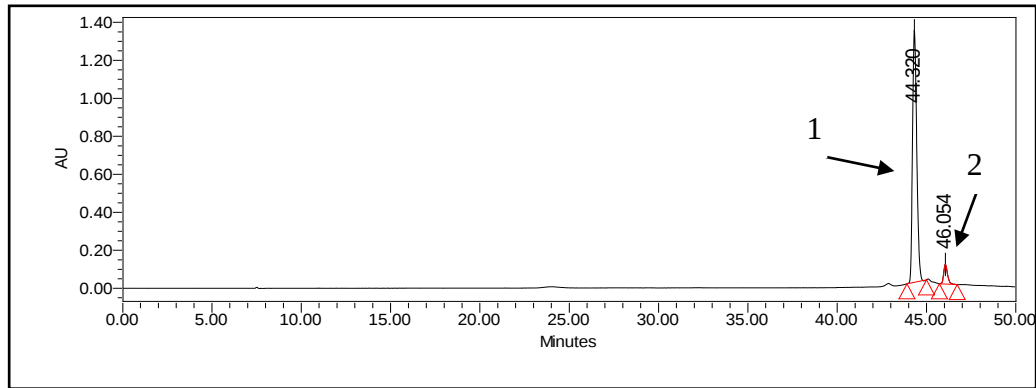
Fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu metodu ile, antioksidan aktiviteleri ise çeşitli metotlar ile belirlenmiş olan örneklerin, antosiyanin profilleri HPLC sisteminde tanımlanmıştır. Standartlara ait kolonda alıkonma süreleri Çizelge 4.8'de

verilmiştir. Pişmiş ve pişmemiş siyah pirinç örneklerinin siyanidin 3-glikozit ve peonidin 3-glikozit miktarları sırasıyla Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10’da, ayrıca siyah pirinç örneklerine ait HPLC analizi sonuçları ayrıntılı olarak EK E’de Çizelge E.1’de verilmiştir.

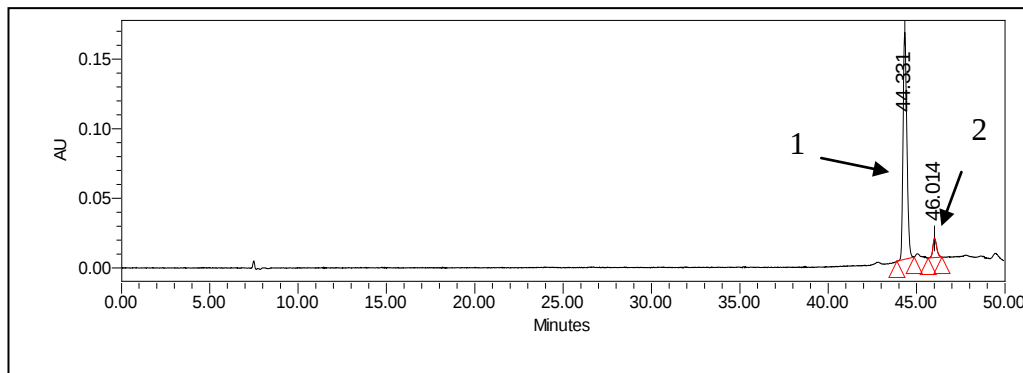
Çizelge 4.8 : Standartlara ait kolonda alıkonma süreleri.

	Antosiyanin	Alıkonma Süresi (dakika)
1	Siyanidin 3-glikozit	44
2	Peonidin 3-glikozit	46

Siyah pirinç örneklerinde siyanidin 3-glikozit ve peonidin 3-glikozit olmak üzere 2 antosiyanin tanımlanmıştır. Zhang ve diğ. (2010), Hiemori ve diğ. (2009), Ryu ve diğ. (1998) ve Zawistowski ve diğ. (2009)’nin yapmış olduğu çalışmalarda da siyah pirincin siyanidin 3-glikozit ve peonidin 3-glikozit içeriğinden bahsedilmektedir. Şekil 4.15’te P kodlu pişmemiş siyah pirinç örneklerinden birinin ve Şekil 4.16’da da D kodlu tüplü ocak üstündeki düdüklü tencerede pişen siyah pirinç örneklerinden birinin HPLC kromatogramı yer almaktadır.



Şekil 4.15 : P kodlu siyah pirinç örneği HPLC kromatogramı.

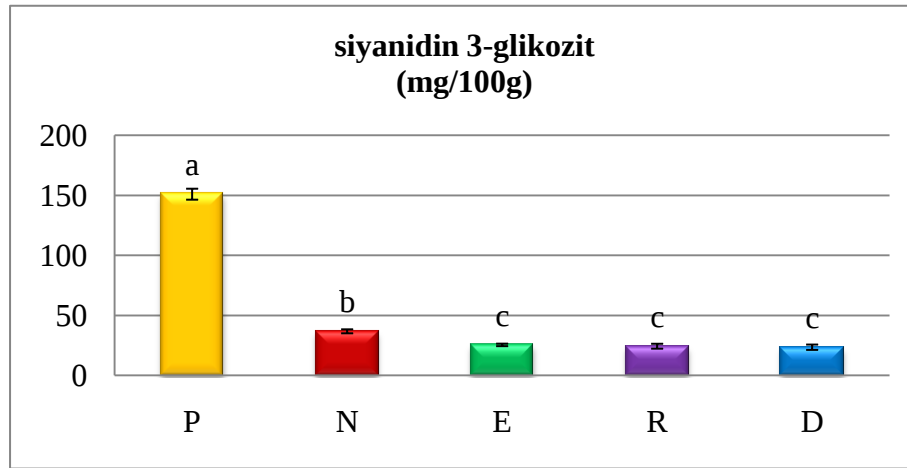


Şekil 4.16 : D kodlu siyah pirinç örneği HPLC kromatogramı.

Çizelge 4.9 : Siyah pirinç örneklerinin HPLC analizi ile siyanidin 3-glikozit miktarları.^{1,2}

<u>Basınç</u>	<u>Kontrol</u>	<u>mg/100g</u>	<u>% azalma</u>
	P	150,8±4,57	
Atmosfer	<u>Pisirme Metodu</u>	<u>mg/100g</u>	
	N	36,56±1,66	
Vakum	R	24,37±0,17	
	E	25,23±1,05	
	D	23,30±2,23	

¹Tabloda yer alan veriler 3 tekrara ait ortalamaları ve standart sapmayı göstermektedir. ²P:pişmemiş, D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici



Şekil 4.17 : Siyah pirinç örneklerinin HPLC analizi ile belirlenen ortalama siyanidin 3-glikozit miktarları.^{1,2}

¹Her sütunun üzerinde yer alan farklı harfler istatistiksel olarak farklılığın önemli olduğunu göstermektedir ($p<0,05$). ²P:pişmemiş, D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

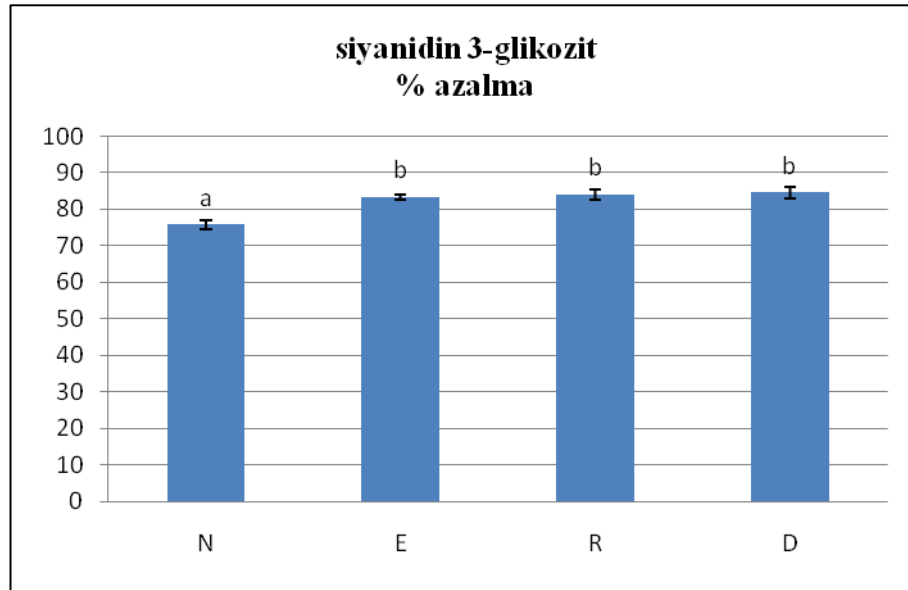
Pişmemiş siyah pirinç örneklerinin ortalama siyanidin 3-glikozit ve peonidin 3-glikozit miktarları sırasıyla 150,8±4,57 mg/100 g ve 9,25±0,44 g/100 g olarak hesaplanmıştır. Hieomori ve diğ. (2009)'nin yapmış olduğu çalışmada pişmemiş siyah pirinç örneklerinin siyanidin 3-glikozit ve peonidin 3-glikozit miktarları ise sırasıyla 57,247 mg/100g ve 2,978 mg/100g olarak bulunmuştur. Farklı siyah pirinç türlerinin antosiyanin miktarlarının incelendiği başka bir çalışmada ise siyanidin 3-glikozit 10-470 mg/100g ve peonidin 3-glikozit 4-40 mg/100 g aralıklarında bulunmuştur (Ryu ve diğ., 1998).

Çizelge 4.10 : Siyah pirinç örneklerinin HPLC analizi ile peonidin 3-glikozit miktarları.^{1,2}

<u>Basınc</u>	<u>Kontrol</u>	<u>mg/100g</u>	<u>% azalma</u>
	P	9,25±0,44	
	<u>Piştirme Metodu</u>	<u>mg/100g</u>	
	N	2,77±0,22	
Atmosfer	R	1,90±0,03	79,5
Vakum	E	2,05±0,11	77,8
	D	1,81±0,19	80,4

¹Tabloda yer alan veriler 3 tekrara ait ortalamaları ve standart sapmayı göstermektedir. ²P:pişmemiş, D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici

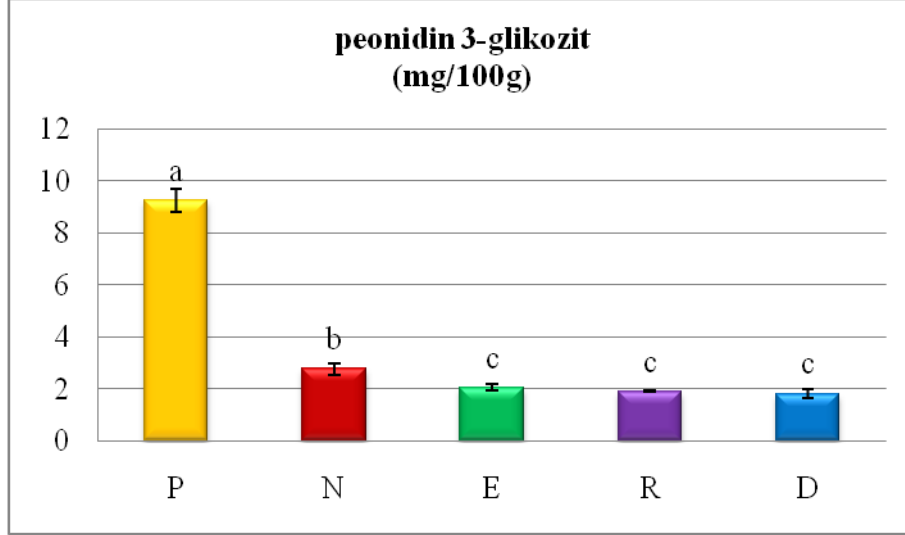
Farklı piştirme yöntemlerinden sonra pişmiş siyah pirincin siyanidin 3-glikozit ve peonidin 3-glikozit miktarlarında azalmalar olduğu gözlenmiştir. Şekil 4.17’de de görüldüğü üzere, siyanidin 3-glikozit miktarında en çok azalma (%84,5) tüplü ocak üstündeki düdüklü tencerede ve en az azalma (%75,7) ise tüplü ocak üstündeki teflon tencerede pişen siyah pirinç örneklerinde yaşanmıştır. Siyanidin 3-glikozit miktarındaki azalma yüzdeleri N, E, R ve D kodlu siyah pirinç örnekleri için sırasıyla %75,75, %83,3, %84 ve %84,5’dir. Bu sonuçlar grafik olarak Şekil 4.18’de görülmektedir.



Şekil 4.18 : Siyah pirinç örneklerinin HPLC analizi ile belirlenen ortalama siyanidin 3-glikozit miktarlarındaki azalma.¹

¹D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

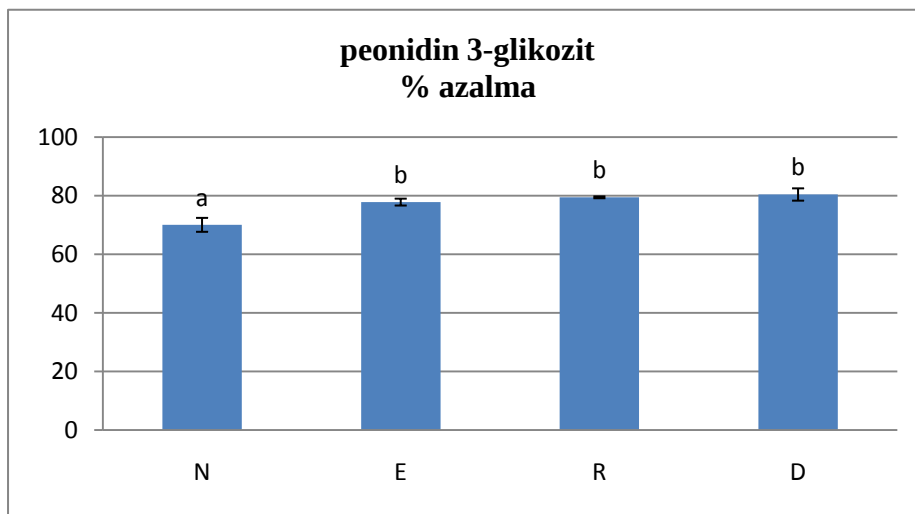
Peonidin 3-glikozit miktarında da yine en fazla (%80,4) azalma tüplü ocak üstündeki düdüklü tencerede ve en az (%70) azalma ise tüplü ocak üstündeki teflon tencerede pişen siyah pirinç örneklerinde yaşanmıştır. Şekil 4.19’da yaşanan bu azalmalar grafik olarak görülmektedir.



Şekil 4.19 : Siyah pirinç örneklerinin HPLC analizi ile belirlenen ortalama peonidin 3-glikozit miktarları.^{1,2}

¹Her sütunun üzerinde yer alan farklı harfler istatistiksel olarak farklılığın önemli olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$). ²P:pişmemiş, D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

Şekil 4.20’de grafik halinde verilen sonuçlardan da görüldüğü üzere peonidin 3-glikozit miktarında yaşanan azalma yüzdeleri N, E, R ve D kodlu siyah pirinç örnekleri için sırasıyla %70, %77,8, %79,4 ve %80,4’tür.



Şekil 4.20 : Siyah pirinç örneklerinin HPLC analizi ile belirlenen ortalama peonidin 3-glikozit miktarlarındaki azalma.¹

¹D:tüplü ocak üstündeki düdüklü tencere, N: tüplü ocak üstündeki teflon tencere, E: elektrikli düdüklü tencere, R: pirinç pişirici.

Tek yollu Anova testi sonuçlarına göre dört farklı pişirme yönteminin örneklerdeki siyanidin 3-glikozit ve peonidin 3-glikozit miktarlarının azalmasındaki etkisinin istatistiksel olarak önemli derecede farklı olduğu görülmektedir ($P<0,05$). Duncan'ın çoklu değerlendirme testi ile örnekler arasındaki farklılık incelendiğinde ise E, R ve D kodlu örneklerin birbiri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsizken, N kodlu örneğin diğer örneklerden farkı istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0,05$). Bu sonuçlar Hiemori ve diğ. (2009) elektrikli düdüklü tencere, pirinç pişirici ve tüplü ocak olmak üzere üç farklı pişirme metodunun siyah pirincin antosiyanin içeriğine etkisini araştırdığı çalışma ile benzerlik göstermektedir. Hiemori ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmada, en çok azalma elektrikli düdüklü tencerede pişen siyah pirinçte gözlenirken, bunu sırasıyla pirinç pişiricide ve tüplü ocak üstündeki tencerede pişen siyah pirinç takip etmektedir.

4.6 Genel Değerlendirme

Fenolik bileşikler açısından oldukça zengin olan pişmemiş siyah pirincin toplam fenolik madde, flavonoid ve antosiyanin miktarının beyaz ve kırmızı pirinç gibi diğer pirinç çeşitlerinden, renkli hububat ürünlerinden ve bu zamana kadar yüksek antosiyanin içeriğine sahip olduğu bilinen çoğu meyve ve sebzededen fazla olduğu görülmüştür. Bu yüksek fenolik içerik ve antioksidan aktivite farklı pişirme yöntemlerinden farklı oranlarda etkilenmiştir. Ancak her metotta gözlenen fenolik bileşik miktarlarındaki ve antioksidan aktivitesindeki azalmanın sırasının ve yüzdelерinin farklı olduğu görülmüştür. Örneğin, toplam fenolik madde miktarı pişirme işlemi sonucunda en az tüplü ocak üstündeki düdüklü tencerede azalma gösterirken, toplam flavonoid miktarındaki en az azalma tüplü ocak üstündeki teflon tencerede yaşanmıştır.

Toplam fenolik madde metodu gıdalardaki fenolik bileşenlerin dışında gıdada bulunan diğer indirgen bileşenlerin varlığı nedeniyle spesifik bir yöntem değildir. Pişirme işleminin etkisinin araştırılmasında toplam fenolik madde yönteminin tek bir metot olarak kullanılması önerilmemekte, toplam flavonoid, toplam antosiyanin ve HPLC metodu gibi daha spesifik yöntemler ile birlikte yapılması önerilmektedir (Çapanoğlu, 2008).

Toplam flavonoid ve toplam antosiyanin metotları sonucu elde edilen değerler karşılaştırıldığında sonuçların birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir. Bu

durum siyah pirinçteki flavonoid bileşenlerinin büyük oranda antosiyaninlerden oluşmasından kaynaklanmaktadır (Ryu ve diğ., 1998; Hu ve diğ., 2003).

Antioksidan aktivitesi hakkında kesin bir karar vermek için tek bir yöntem uygulamak da doğru bir yaklaşım değildir. Her bir antioksidanın farklı radikallere karşı farklı reaksiyon mekanizmasına sahip olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada da bu durum gözlenmiştir. Bu sebepten ötürü de her yöntemden elde edilen verileri ayrı ayrı incelemek gerekmekte, herhangi bir genelleme yapılamamaktadır. Bu çalışmada CUPRAC yöntemi ile bulunan sonuçların, uygulanan diğer antioksidan aktivite metotları ile elde edilen sonuçlardan daha yüksek sayısal değerlere sahip olduğu görülmektedir. Bunun nedeni, CUPRAC yönteminin diğer antioksidan kapasitesi ölçüm yöntemlerine göre daha fazla sayıda antioksidan bileşiklerini ölçmesi olarak gösterilebilir (Çapanoğlu, 2008). DPPH ile ABTS ve FRAP ile CUPRAC metotları farklı pişirme yöntemleri sonucundaki antioksidan aktivitelerindeki azalma miktarları ve sıralama açısından benzer bulunmuştur. Ayrıca metotlar arası uygulanan regresyon analizleri sonucunda hesaplanan yüksek R^2 değerleri de bu uyumu doğrular niteliktedir. Tüm deneyler göz önüne alındığında ise pişirme yöntemleri siyah pirincin fenolik içeriğinde ve antioksidan aktivitesinde istatistiksel olarak önemli miktarlarda azalmaya sebep olmuştur. Bu azalma ise toplam antosiyanin metodu hariç diğer tüm metotlar için en çok 70 dakika boyunca pilav pişiricide (R) pişen siyah pirinçlerde gözlenmiştir. Toplam fenolik içerik ve antioksidan aktivitesinde yaşanan en az azalma ise yine toplam antosiyanin metodu hariç diğer tüm metotlar için 20 dakikada tüplü ocak üstündeki düdüklü tencerede (D) pişen siyah pirinçlerde olmuştur.

Deney aşamasında en son olarak siyah pirincin antosiyanin profili tanımlanmış ve içeriğinin siyanidin 3-glikozit ve peonidin 3-glikozit olmak üzere iki ana antosiyaninden oluştuğu görülmüştür. HPLC analizi sonucuna göre pişirme işlemi sonucunda siyanidin 3-glikozit ve peonidin 3-glikozit miktarlarında yaşanan azalma en çok tüplü ocak üstündeki düdüklü tencerede görülmektedir ki bu sonuç diğer metotlardan farklılık gösterse de toplam antosiyanin metodu ile elde edilen sonuç ile benzerlik göstermektedir. Bu benzerlik, toplam antosiyanin metodu sonucunda bulunan veriler ile HPLC analizi sonucunda elde edilen verilerin karşılaştırıldığı regresyon analizi grafiğinde ($R^2=0,99$) de görülmektedir. Sonuçlar sayısal olarak değerlendirildiğinde ise, HPLC yöntemi ile bulunan antosiyanin miktarları toplam

antosiyenin yöntemi ile elde edilen miktarlara göre daha düşük bulunmuştur. Ancak iki yöntemden birinin seçilmesinde spektrofotometrik yöntemlere göre hassasiyeti daha yüksek olan kromatografik yöntemler tercih edilmelidir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada, dört farklı pişirme yönteminin siyah pirincin toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerine etkileri incelenerek aynı zamanda antosiyanin profilindeki değişimler incelenmiştir.

Piştirme işlemi sonunda toplam fenolik madde miktarında en fazla azalma atmosferik basınç altında çalışan pirinç pişiricide pişen siyah pirinçte %51 oranında gözlemlenirken, en az azalma yüksek basınç altında çalışan tüplü ocak üstündeki düdüklü tencerede pişen siyah pirinçte %38,4 oranında gerçekleşmiştir. Piştirme işlemi süresince ölçülen sıcaklıklar göz önüne alındığında sürenin sıcaklıktan daha etkili bir faktör olduğu görülmektedir. Çünkü pilav pişirici gibi atmosfer basıncı altında çalışan tencerede en yüksek sıcaklık 100°C olarak ölçülürken, düdüklü tencere ve elektrikli düdüklü tencerede yüksek basınçtan dolayı piştirme işlemi 100°C'nin üstünde gerçekleşmektedir.

Sonuç olarak siyah pirincin fonksiyonel bir hububat olduğu, yüksek fenolik içeriğe ve yüksek antioksidan aktivitesine sahip olduğu, bu içeriğin ve aktivitenin piştirme işlemi sonucunda azaldığı ama yine de pişmiş siyah pirincin benzerlerine göre oldukça yüksek fenolik içeriğe ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmektedir.

Bu zamana kadar yapılmış olan farklı pirinç çeşitleriyle ilgili çalışmalarda toplam fenoliklerin ve antioksidan aktivitenin belirlenmesinde bağılı fitokimyasallar çoğunlukla göz önüne alınmamış, serbest ve bağılı fraksiyonların dağılımı incelenmemiştir. Ayrıca, antosiyanin gibi fenolik bileşikler genellikle siyah pirinçte de olduğu gibi tanenin dışında alöron tabakada ve kepekte toplanmıştır. Alöron tabakadaki bu bileşikler genel olarak hücre duvarı polimerlerine kovalent olarak bağılı olduğundan dolayı fenolik bileşiklerin miktarı asit veya baz ile muamele olmadığı sürece gerçek değerlerinden daha düşük olarak ölçülmektedir (Gallardo ve diğ., 2006). Literatürde hububatların antioksidan kapasitesi çoğunlukla gerçek değerlerin altında belirtilmektedir. Bunun sebebi, kullanılan ekstraksiyon çözügenlerinin antioksidan bileşikleri tam anlamıyla ekstrakte edemeyişinden ve

ekstrakte olmayan bazı polifenollerin de göz ardı edilmesinden kaynaklanmaktadır. Diğer yandan, sindirim enzimleri ile ekstraksiyonun in-vitro analizleri sayesinde literatürde yer alan sulu-organik ekstraktların sahip olduğu antioksidan aktiviteden, insan metabolizmasında da olduğu gibi çok daha fazla antioksidan aktivite elde edilebileceği düşünülmektedir (Perez-Jimenez ve Saura-Calixto, 2005). Hücre duvarında bulunan bağlı fenoliklerin tayini yapılmadığından dolayı da tam tahıl tanelerinin fenolik içeriği hakkındaki bilgiler aslında eksik kalmaktadır. İleride siyah pirinç konusunda yapılacak çalışmalarda bu eksikliğin giderilmesi için bağlı fenoliklerin tayini de çalışma kapsamında ele alınabilir. Ayrıca siyah pirincin sahip olduğu yüksek antioksidan miktarının metabolizma üzerindeki etkilerini ve biyoyararlılığını tam olarak gözlemlemek amacıyla enzim ekstraksiyonunun ve *in vivo* yöntemlerin kullanılması faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdel-Aal, E. M., Young, J.C. and Rabalski, I.,** 2006. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 4696-4704.
- Altan, N., Dinçel, A. S. ve Koca, C.,** 2006. Diabetes mellitus ve oksidatif stres, *Türk Biyokimya Dergisi*, **31**, (2), 51–56.
- Altınışık, M.,** 2000. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar, <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01s.pdf>
- Belitz, H. D., Grosch, W. and Schieberle, P.,** 2002. Phenolic compounds, in *Food Chemistry*, pp. 822-835, Springer, Berlin.
- Berköz, M. ve Yalın, S.,** 2009. Normal ve preeklampatik gebelerde lipidperoksidasyonu ve antioksidan aktivite, *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, **10**, (2), 53-58.
- Bissenbaev, A. K., Altybaeva, N. A. and Kolbaeva, G. A.,** 2007. Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in hormone regulating programmed cell death of wheat aleurone layer, *Journal of Cell and Molecular Biology*, **6**, (1), 41-48.
- Butsat, S. and Siriamornpun, S.,** 2010. Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice, *Food Chemistry*, **119**, 606–613.
- Chiang, A., Wu, H., Yeh, H., Chu, C., Lin, H. and Lee, W.,** 2006. Antioxidant effects of black rice extract through the induction of superoxide dismutase and catalase activities, *Lipids*, **41**, 797–803.
- Choi, Y., Jeong, H., and Lee, J.,** 2007. Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea, *Food Chemistry*, **103**, 130-138.
- Chuah, A. M., Lee, Y., Yamaguchi, T., Takamura, H., Yin, L. and Matoba, T.,** 2008. Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers, *Food Chemistry*, **111**, 20–28.
- Crozier, A., Lean, M. E. J., McDonald, M. S. and Black C.,** Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 590-595.
- Çapanoğlu, E.,** 2008. Changes in antioxidant profiles, metabolites and enzymes during development of tomato fruit and tomato paste processing, *PhD Thesis*, Istanbul Technical University, İstanbul.

- Çelik, S. E., Özyürek, M., Güçlü, K. and Apak, R.,** 2010. Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods, *Talanta*, **81**, 1300–1309.
- Çiçek, E.,** 2005. Nükleer tıp uygulamalarının hastalardaki serbest radikaller üzerine etkileri, *Doktora Tezi*, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.
- Dietrych-Szostak, D. and Oleszek, W.,** 1999. Effect of processing on the flavonoid content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Möench) grain, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4384-4387.
- Diplock, A. T.,** 1994. Antioxidant nutrients and disease prevention. *Molecular Aspects of Medicine*, **15**, 293-376.
- Dönmez, D.,** 2007. Pirinç, Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü.
- Duh, P. and Yen, G.,** 1997. Antioxidant efficacy of methanolic extracts of peanut hulls in soybean and peanut oils, *JAOCS*, **74**, 745–748.
- Dykes, L. and Rooney, L. W.,** 2007. Phenolic compounds in cereal grain and their health benefits, *Cereal Foods World*, AACC International, Inc., 105-111.
- Escarpa, A. and Gonzalez, M. C.,** 2001. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods, *critical reviews in analytical chemistry*, **31**, (2), 57-139.
- Feng, Z., Hu, W., Marnett, L. J. and Tang, M.,** 2006. Malondialdehyde, a major endogenous lipid peroxidation product, sensitizes human cells to UV- and BPDE-induced killing and mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair, *Mutation Research*, **60**, 125–136.
- Gallardo, C., Jiménez, N. and Garcia-Conesa, M. T.,** 2006. Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions. *Food Chemistry*, **99**, 455–463.
- Gill, S. S. and Tuteja, N.,** 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, **48**, 909-930.
- Giusti, M. M. and Wrolstad, R. E.,** 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc.
- Güven, E. Ç., Otkun, G. T. ve Boyacıoğlu, D.,** 2010. Flavonoidlerin biyoyararlılığını etkileyen faktörler, *Gıda Dergisi*, **35(5)**, 387-394.
- Fennema, O. R.,** 1996. Food Chemistry, 3rd edition, Marcel Dekker, New York.
- Halliwell, B.,** 1991. Reactive oxygen species in living systems: a thorough explanation of free radicals source: biochemistry and role in human disease. *Am. J. of Medicine*, **91**, 14.
- Halliwell, B.,** 2001. Free radical reactions in human disease, in *Environmental Stressors in Health and Disease*, Marcel Dekker, Inc.

- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C.,** 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochem. J.*, **219**, 1-14.
- Halliwell, B. and Whitman, M.,** 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?, *British Journal of Pharmacology*, **142**, 231–255.
- Hiemori, M., Koh, E. and Mitchell, A. E.,** 2009. Influence of cooking on anthocyanins in black rice (*Oryza sativa* L. *japonica* var. SBR), *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 1908–1914.
- Hu, C., Zawistowski, J., Ling, W. and Kitts, D. D.,** 2003. Black rice (*Oryza sativa* L. *indica*) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 5271-5277.
- Hudson, B.,** 1990. Food Antioxidants, Elsevier Science, USA, pp. 173-188.
- Hung, P. V. and Morita, N.,** 2008. Distribution of phenolic compounds in the graded flours milled from whole buckwheat grains and their antioxidant capacities, *Food Chemistry*, **109**, 325–331.
- Iqbal, S., Bhanger, M. I. and Anwar, F.,** 2005. Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan, *Food Chemistry*, **93**, 265–272.
- Jang, S. and Xu, Z.,** 2009. Lipophilic and hydrophilic antioxidants and their antioxidant activities in purple rice bran, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 858–862.
- Kahlon, T. S.,** 2009, Rice Bran: Production, Composition, Functionality and Food Applications, Physiological Benefits, Taylor & Francis Group, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kalkan, İ.,** 2007. Çeşitli pişirme yöntemlerinin sebzelerin fenolik bileşik ve antioksidan aktivite değerleri üzerine etkisi, *Doktora Tezi*, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Koca, N. and Karadeniz, F.,** 2005, Natural antioxidant compounds in foods, *Gıda*, **30**, (4), 229-236.
- Kong, S. and Lee, J.,** 2010. Antioxidants in milling fractions of black rice cultivars, *Food Chemistry*, **120**, 278–281.
- Kurilich, A. C., Tsau, G. J., Brown, A., Howard, L., Klein, B. P., Jeffery, E. H., Kushad, M., Wallig, M. A. and Juvik, J. A.,** 1999. Carotene, tocopherol, and ascorbate contents in subspecies of *Brassica oleracea*, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1576-1581.
- Larrauri, J. A., Sanchez-Moreno, C. and Saura-Calixto, F.,** 1998. Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 2694-2697.
- Lee, K. and Shibamoto, T.,** 2002. Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4947-4952.

- Li, W., Pickard, M. D and Beta, T.,** 2007. Effect of thermal processing on antioxidant properties of purple wheat bran, *Food Chemistry*, **104**, 1080–1086.
- Liu, R. H.,** 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals, *Am. J. Clin. Nutr.*, **78**, 517–520.
- Liu, R. H.,** 2007. Whole grain phytochemicals and health, *Journal of Cereal Science*, **46**, 207-219.
- Luthria, D. L.,** 2008. Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor, *Food Chemistry*, **107**, 745–752.
- Madhavi, D. L., Deshpande, S. S. and Salunkhe, D. K.,** 1996. Food antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives, pp. 41-50, Marcel Dekker, Newyork.
- Mates, J. M.,** 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology, *Toxicology*, **153**, 83–104.
- Mazza, G. And Miniati, E.,** 1993. Anthocyanin in fruits, vegetables and grains, pp. 32-58, CRC pres, Boca Raton, FL.
- Migliore, L. and Coppedè, F.,** 2009. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging, *Mutation Research*, **674**, 73–84.
- Min, S., Ryu, S. and Kim, D.,** 2010. Anti-inflammatory effects of black rice, cyanidin-3-O- β -D-glycoside, and its metabolites, cyanidin and protocatechuic acid, *International Immunopharmacology*, **10**, 959–966.
- Naczki, M. and Shahidi, F.,** 2004. Phenolics in food and nutraceuticals, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Nizamlioglu, N. M. ve Nas, S.,** 2010. Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, **5**, 20-35.
- Özdaş, Ş. B.,** 2006. GSH S-konjugat transportu açısından farklı hücre soylarında hücre hasar mekanizmalarının incelenmesi, *Doktora Tezi*, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
- Özşahin, E.,** 2008. Gönen ovasında pirinç tarımı, *Fırat Üniversitesi Sosyal Bilimler Dergisi*, **18**, 49-70.
- Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C. and Tiwari, B. K.,** 2010. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation, *Trends in Food Science & Technology*, **21**, 3-11.
- Perez-Jimenez, J. and Saura-Calixto, F.,** 2005. Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 5036-5040.
- Pham-Huy, L. A., He, H. and Pham-Huy, C.,** 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health, *Int J Biomed Sci.*, Vol. **4**, no. 2, 89-96.

- Podsedeck, A.**, 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review, *LWT*, **40**, 1–11.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M.**, 2001. Antioxidants in food, CRC Press, USA.
- Qiu, Y., Liu, Q. and Beta, T.**, 2010. Antioxidant properties of commercial wild rice and analysis of soluble and insoluble phenolic acids, *Food Chemistry*, **121**, 140–147.
- Rai, S., Wahile, A., Mukherjee, K., Saha, B. P. and Mukherjee, P. K.**, 2006, Antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* (sacred lotus) seeds, *Journal of Ethnopharmacology*, **104**, 322–327.
- Ranilla, L. G., Genovese, M. I. and Lajolo, F. M.**, 2009. Effect of different cooking conditions on phenolic compounds and antioxidant capacity of some selected Brazilian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 5734–5742.
- Ryu, S. N., Park, S. Z. and Ho, C.**, 1998. High performance liquid chromatographic determination of anthocyanin pigments in some varieties of black rice, *Journal of Food and Drug Analysis*, **6**, 729–736.
- Scheibmeir, H. D., Christensen, K., Whitaker, S. H., Jegaethesan, J., Clancy, R. and Pierce, J. D.**, 2005. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses, *Intensive and Critical Care Nursing*, **21**, 24–28.
- Sharma, P. and Gujral, H. S.**, 2010. Effect of sand roasting and microwave cooking on antioxidant activity of barley, *Food Research International*, (article in press).
- Shen, Y., Jin, L., Xiao, P., Lu, Y. and Bao, J.**, 2009. Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight, *Journal of Cereal Science*, **49**, 106–111.
- Sompong, R., Siebenhandl-Ehn, S., Linsberger-Martin, G. and Berghofer, E.**, 2011. Physicochemical and antioxidative properties of red and black rice varieties from Thailand, China and Sri Lanka, *Food Chemistry*, **124**, 132–140.
- Spanos, G. A. and Wrolstad, R. E.**, 1990. Influence of processing and storage on the phenolic composition of thompson seedless grape juice, *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1565–1571.
- Suja, K.P., Abraham, J. T., Thamizh, S. N., Jayalekshmy, A. and Arumughan C.**, 2004. Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection, *Food Chemistry*, **84**, 393–400.
- Tananuwong, K. and Tewaruth, W.**, 2010. Extraction and application of antioxidants from black glutinous rice, *LWT - Food Science and Technology*, **43**, 476–481.
- Türker, N., Aksay, S. and Ekiz, H. İ.**, 2004. Effect of storage temperature on the stability of anthocyanins of a fermented black carrot (*Daucus carota* var. L.) beverage: shalgam, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 3807–3813.

- Türkmen, N., Sarı, F., and Velioglu, Y. S.,** 2005. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables, *Food Chemistry*, **93**, 713–718.
- URL-1** <<http://www.alfarid.org/rice.html>>, alındığı tarih 12.11.2010.
- URL-2** <www.polyphenols.com>, alındığı tarih 28.10.2010.
- Williams, G. M. and Jeffrey, A. M.,** 2000. Oxidative DNA damage: endogenous and chemically induced, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **32**, 283–292.
- Tsao, R. and Yang, R.,** 2003. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, **1018**, 29–40.
- Yao, Y., Sang, W., Zhou, M. And Ren, G.,** 2010. Antioxidant and r-glucosidase inhibitory activity of colored grains in China, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 770–774.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J. and Qian, M.,** 2002. Free radical scavenging properties of wheat extracts, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1619-1624.
- Zawistowski, J., Kopec, A. and Kitts, D. D.,** 2009. Effects of a black rice extract (*Oryza sativa L. indica*) on cholesterol levels and plasma lipid parameters in Wistar Kyoto rats, *Journal of Functional Foods*, **1**, 50-56.
- Zempleni, J. and Dakshinamurti, K.,** 2005. Nutrients and Cell Signaling, Taylor & Francis Group, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Zhang, M., Zhang, R. F., Zhang, F. X. And Liu, R. H.,** 2010. Phenolic profiles and antioxidant activity of black rice bran of different commercially available varieties, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 7580–7587.
- Zulueta, A., Esteve, M. J. and Frígola, A.,** 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products, *Food Chemistry*, **114**, 310–316.

EKLER

EK A : Kalibrasyon Eğrileri

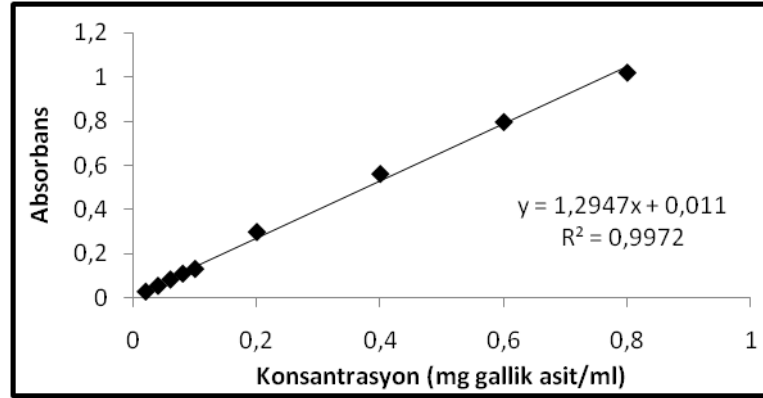
EK B : Standartlar için Kalibrasyon Eğrileri

EK C : ANOVA Tabloları

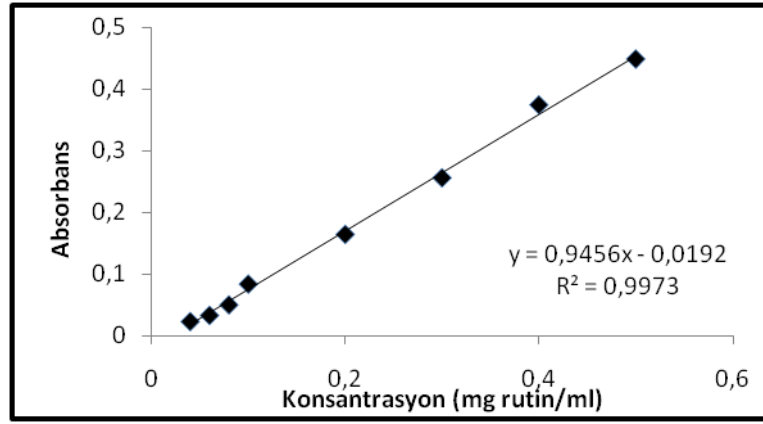
EK D : Regresyon Grafikleri

EK E : HPLC Analizi Tabloları

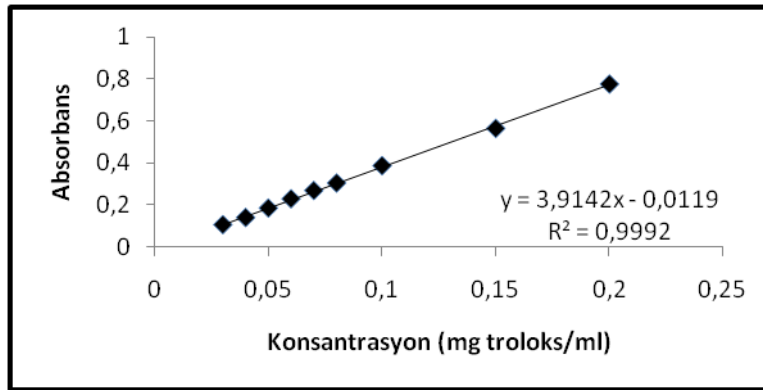
EK A : Kalibrasyon Eğrileri



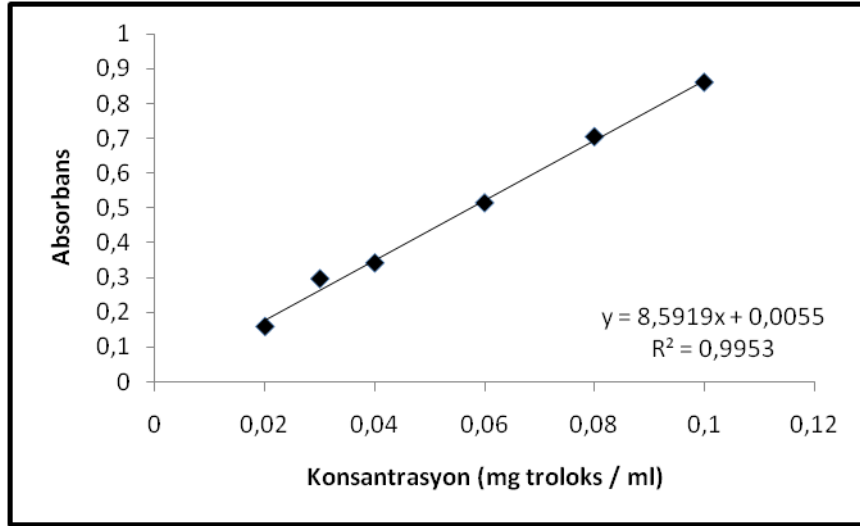
Şekil A.1 : Gallik asit kalibrasyon eğrisi.



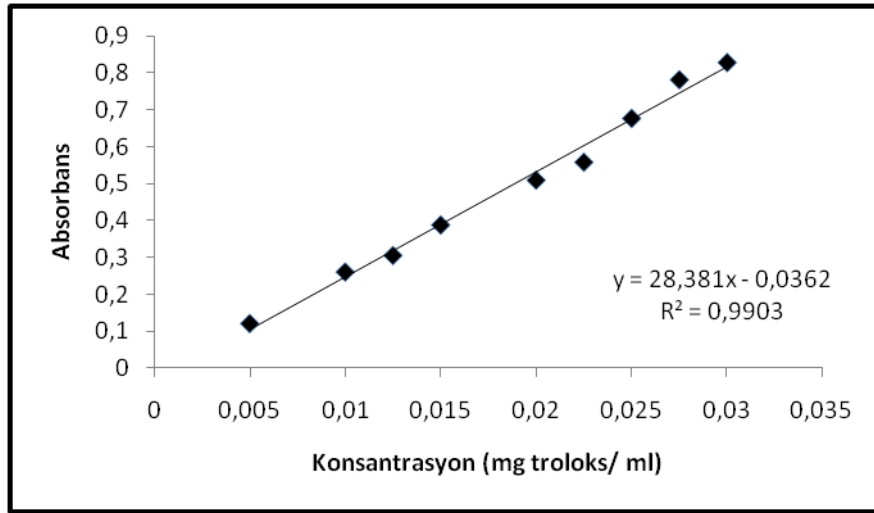
Şekil A.2 : Rutin kalibrasyon eğrisi.



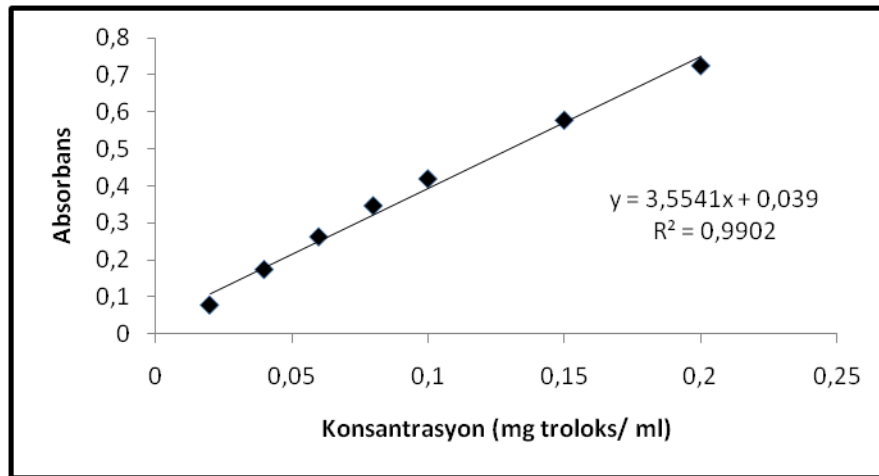
Şekil A.3 : DPPH metodu troluks kalibrasyon eğrisi.



Şekil A.4 : ABTS metodu troloks kalibrasyon eğrisi.

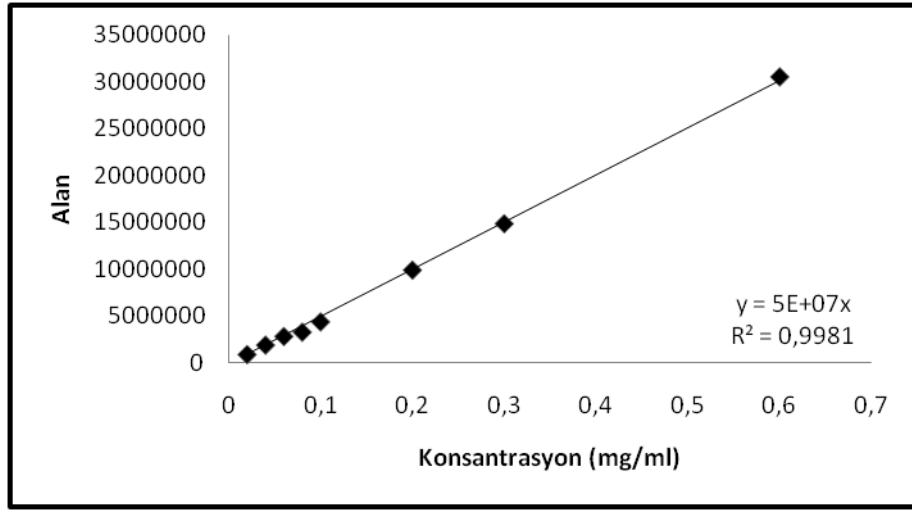


Şekil A.5 : FRAP metodu troloks kalibrasyon eğrisi.

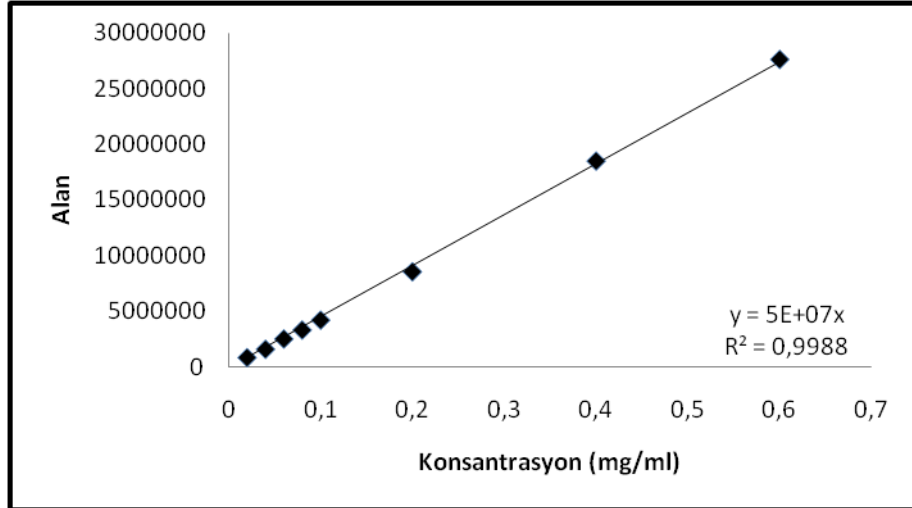


Şekil A.6 : CUPRAC metodu troloks kalibrasyon eğrisi.

EK B : Standartlar için Kalibrasyon Eğrileri



Şekil B.1 : Siyanidin 3-glikozit standartı kalibrasyon eğrisi.



Şekil B.2 : Peonidin 3-glikozit standartı kalibrasyon eğrisi

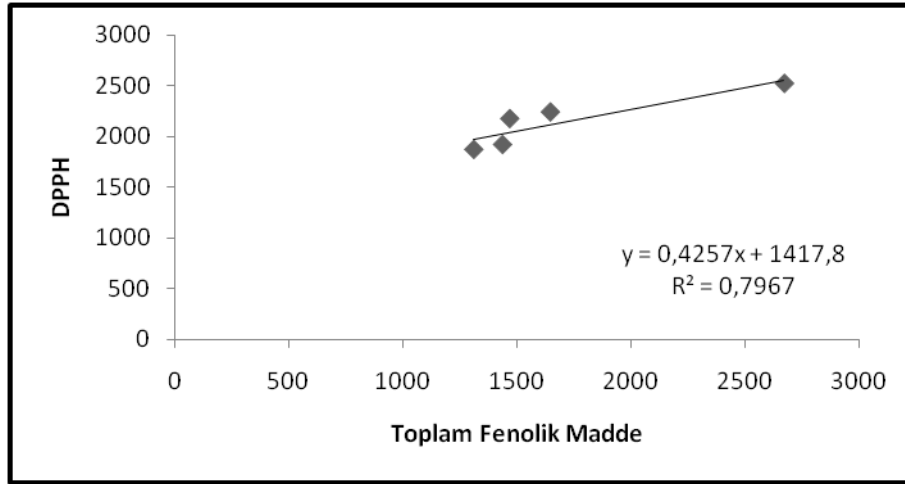
EK C : ANOVA Tabloları**Çizelge C.1 : Siyah pirinç örneklerine uygulanan farklı analizlere ait istatistiksel analiz (tek-yollu ANOVA) sonuçları.**

Toplam Fenolik Madde Miktarı	Kareler Toplamları	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	P
Gruplararası	3668964,591	4	917241,148	279,418	0,000
Grup içi	32826,867	10	3282,687		
Toplam	3701791,457	14			
Toplam Flavonoid Miktarı	Kareler Toplamları	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	P
Gruplararası	23645,929	4	5911,482	799,209	0,000
Grup içi	73,967	10	7,397		
Toplam	23719,896	14			
Toplam Antosiyanin Miktarı	Kareler Toplamları	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	P
Gruplararası	67907,235	4	16976,809	3162	0,000
Grup içi	53,685	10	5,369		
Toplam	67960,921	14			
DPPH	Kareler Toplamları	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	P
Gruplararası	834385,297	4	208596,324	92,255	0,000
Grup içi	22610,927	10	2261,093		
Toplam	856996,224	14			
ABTS	Kareler Toplamları	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	P
Gruplararası	7343990,273	4	1835997,568	371,922	0,000
Grup içi	49365,087	10	4936,509		
Toplam	7393355,360	14			
FRAP	Kareler Toplamları	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	P
Gruplararası	6140523,771	4	1535130,943	264,493	0,000
Grup içi	58040,453	10	5804,045		
Toplam	6198564,224	14			

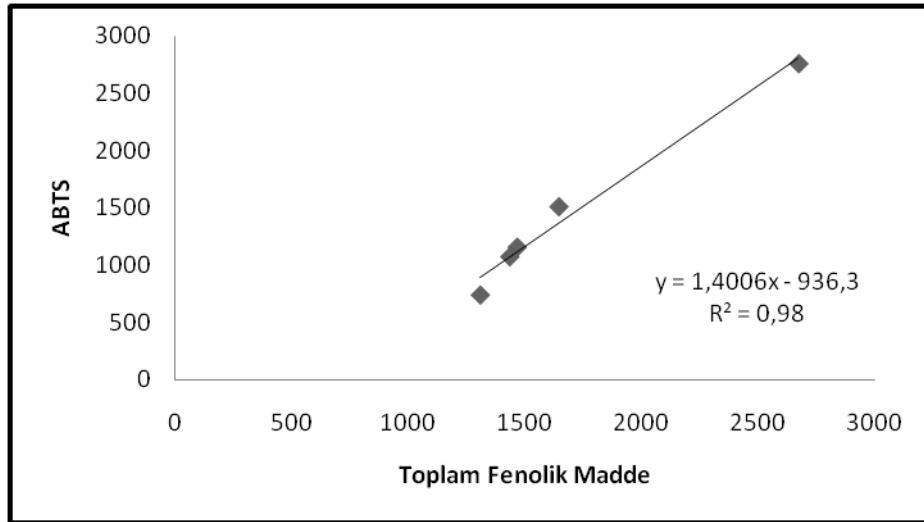
Çizelge C.1 : (devam) Siyah pirinç örneklerine uygulanan farklı analizlere ait istatistiksel analiz (tek-yollu ANOVA) sonuçları.

CUPRAC	Kareler Toplamları	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	P
Gruplararası	1773	4	4432720,431	1908	0,000
Grup içi	23230,327	10	2323,033		
Toplam	1775	14			
HPLC (siyanidin 3- glikozit)	Kareler Toplamları	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	P
Gruplararası	36942,556	4	9235,639	1359	0,000
Grup içi	67,956	10	6,796		
Toplam	37010,513	14			
HPLC (peonidin 3- glikozit)	Kareler Toplamları	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	P
Gruplararası	123,297	4	30,824	528,439	0,000
Grup içi	0,583	10	0,058		
Toplam	123,881	14			

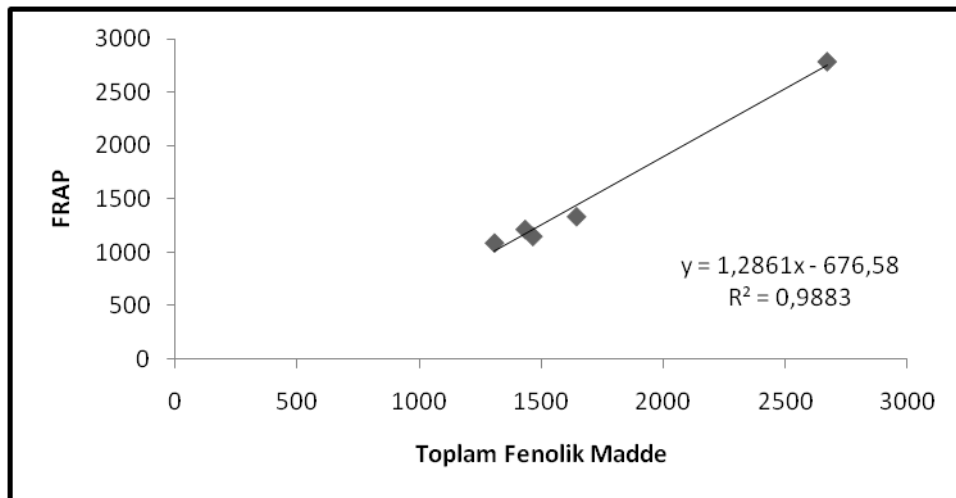
EK D : Regresyon Grafikleri



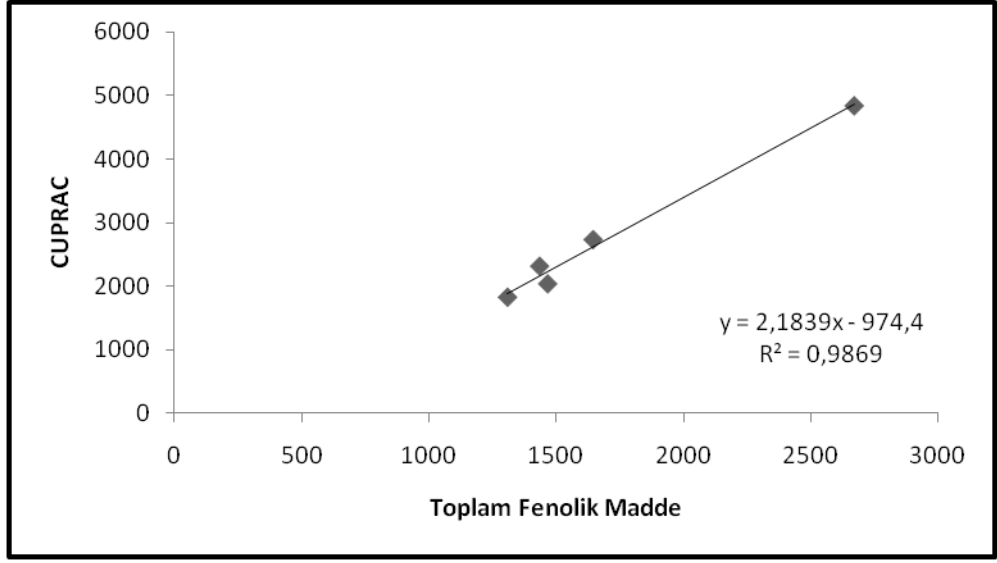
Şekil D.1 : Toplam fenolik madde ve DPPH regresyon grafiği.



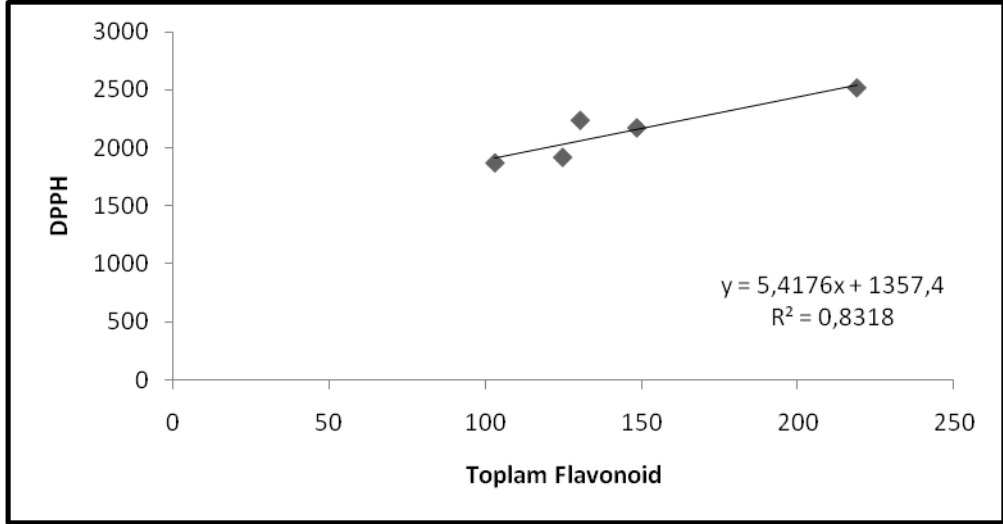
Şekil D.2 : Toplam fenolik madde ve ABTS regresyon grafiği.



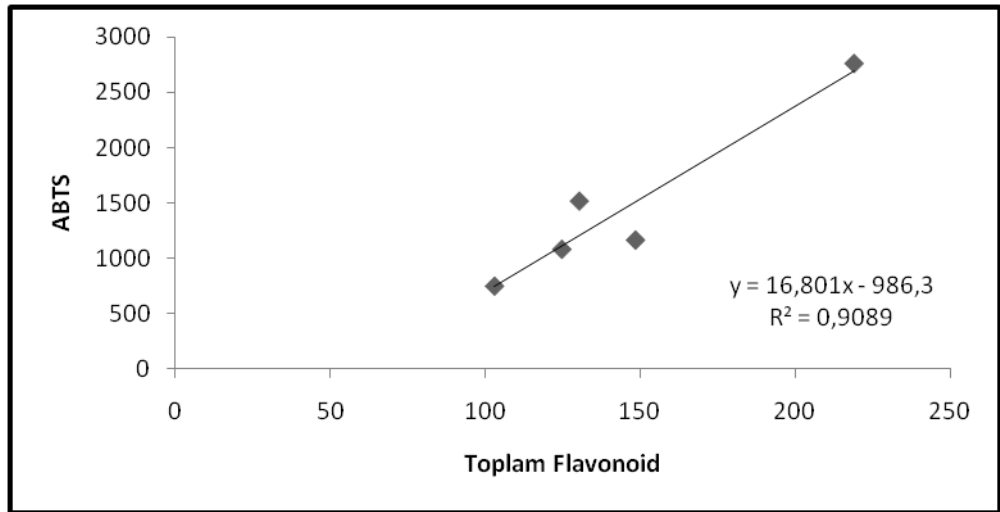
Şekil D.3 : Toplam fenolik madde ve FRAP regresyon grafiği.



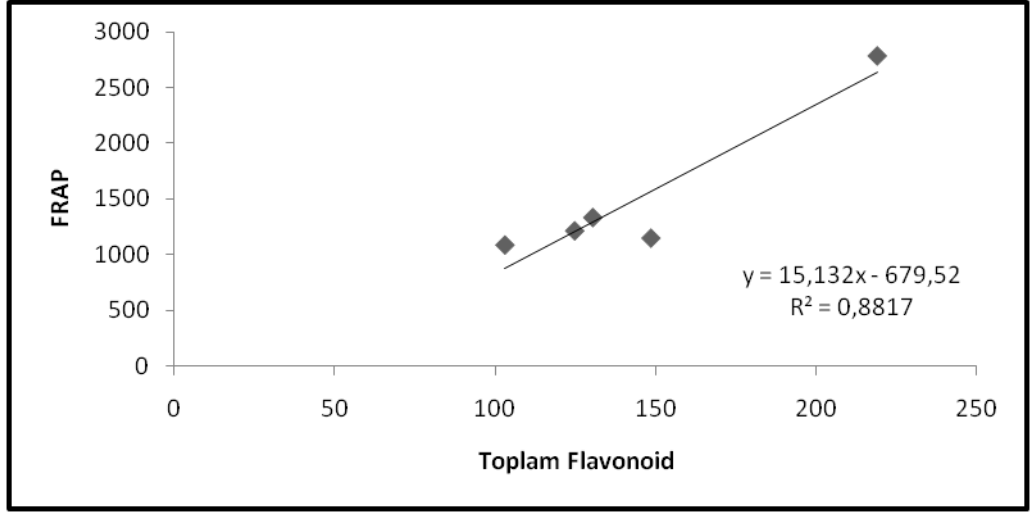
Şekil D.4 : Toplam fenolik madde ve CUPRAC regresyon grafiği.



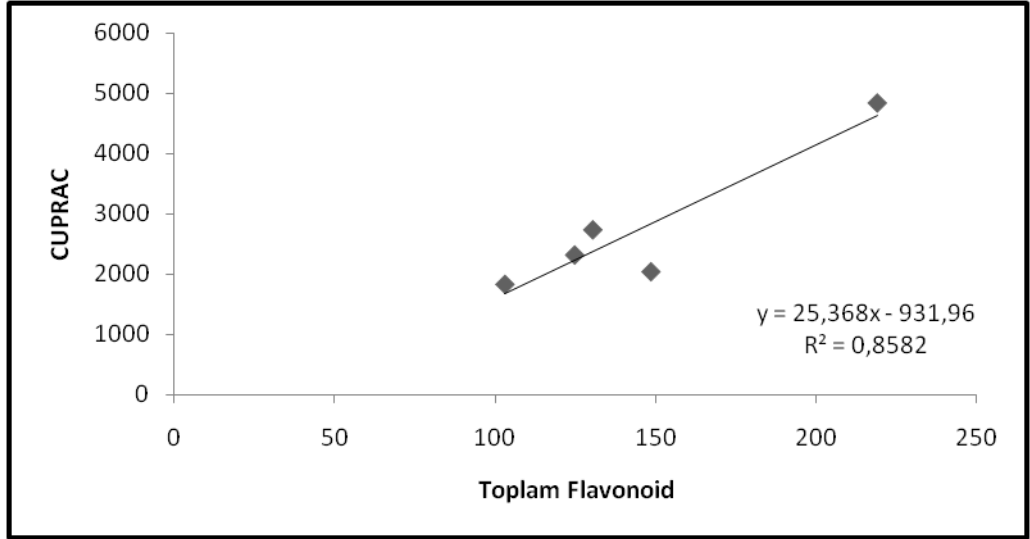
Şekil D.5 : Toplam flavonoid ve DPPH regresyon grafiği.



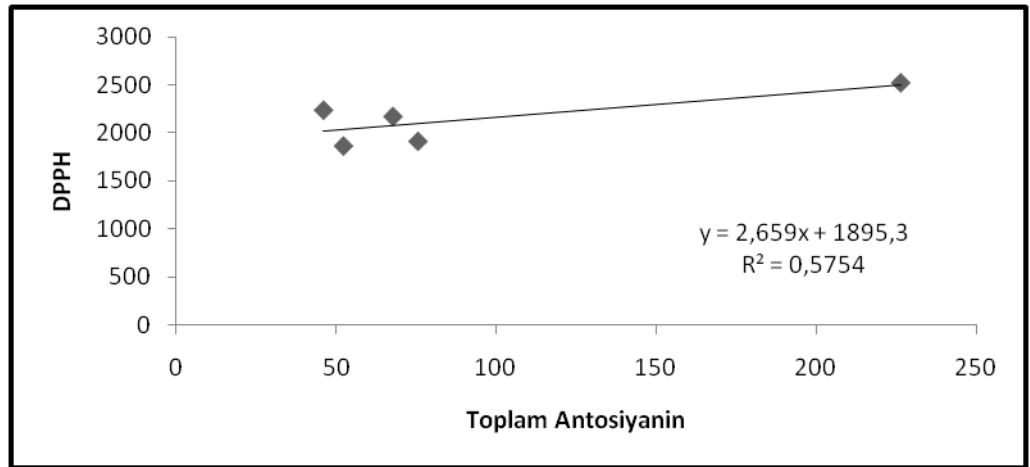
Şekil D.6 : Toplam flavonoid ve ABTS regresyon grafiği.



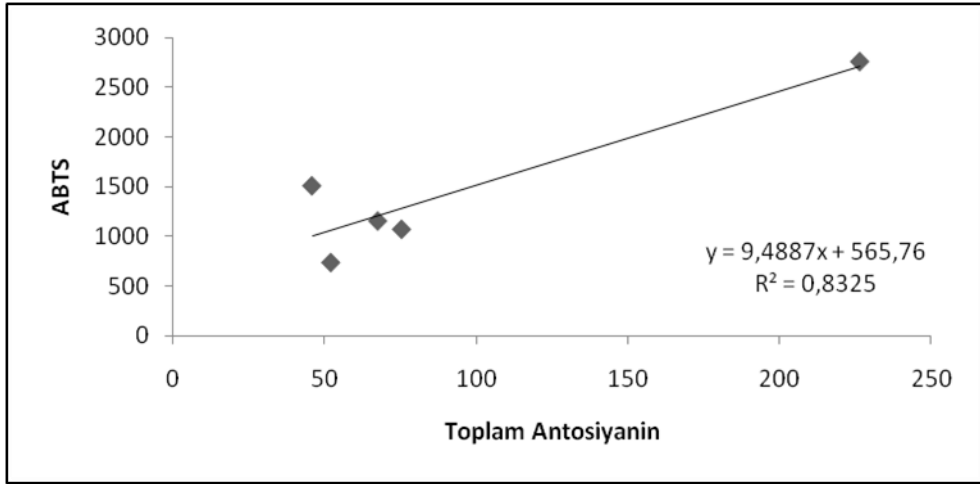
Şekil D.7 : Toplam flavonoid ve FRAP regresyon grafiği.



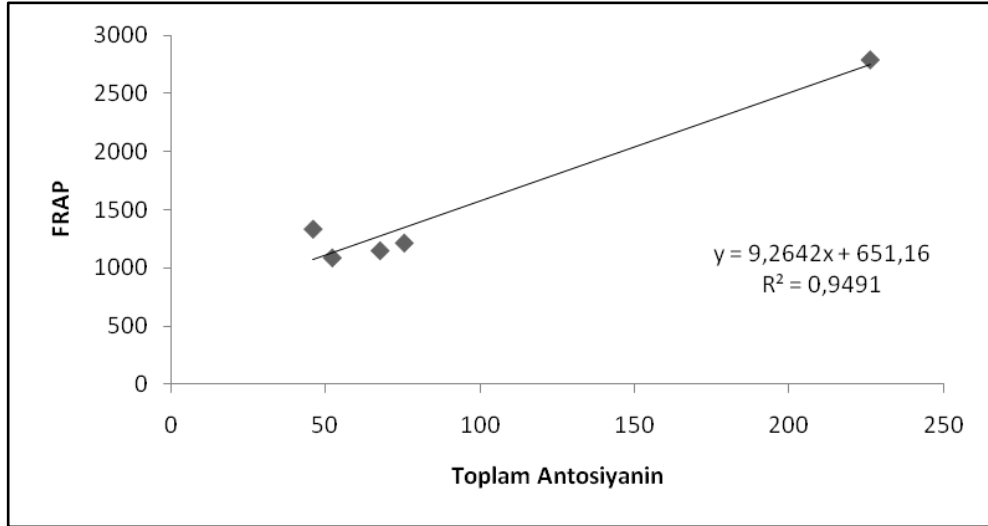
Şekil D.8 : Toplam flavonoid ve CUPRAC regresyon grafiği.



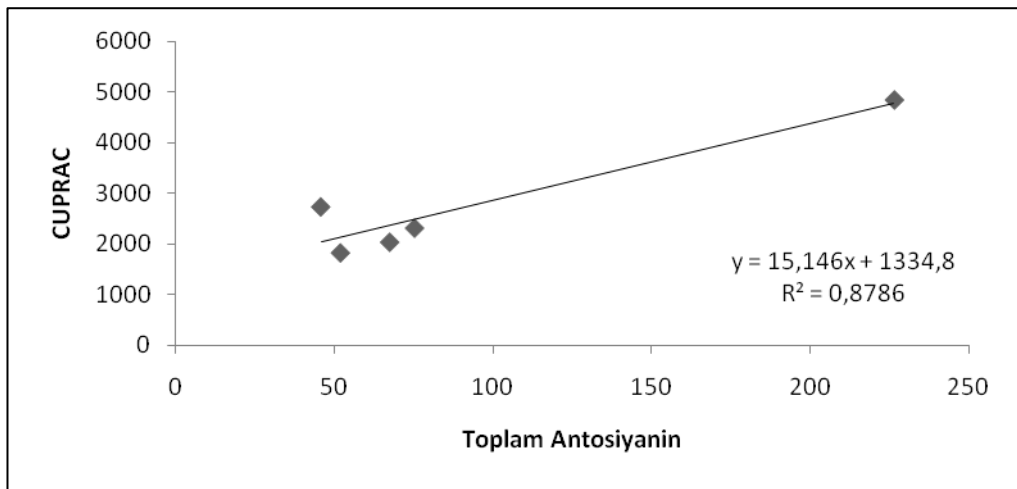
Şekil D.9 : Toplam antosiyanin ve DPPH regresyon grafiği.



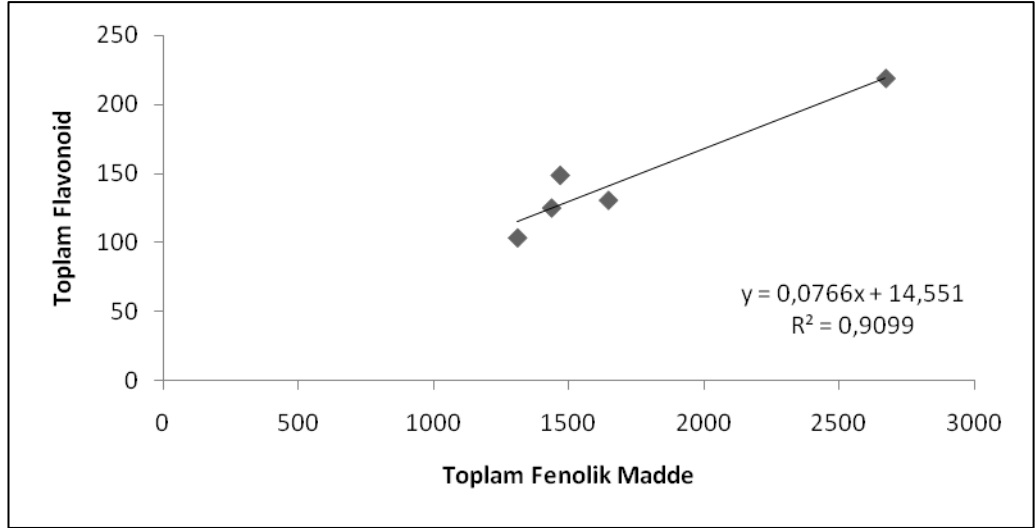
Şekil D.10 : Toplam antosiyanin ve ABTS regresyon grafiği.



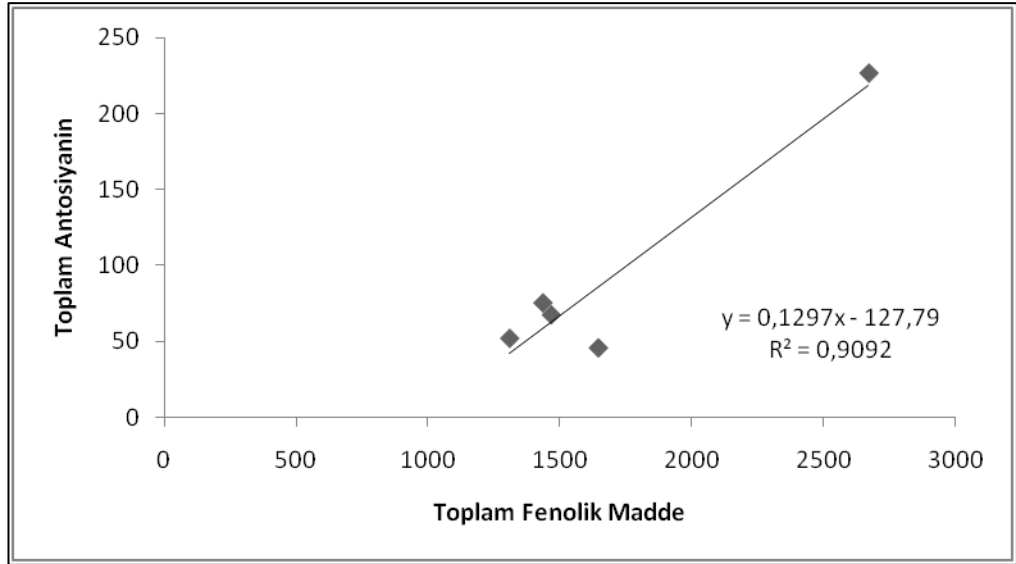
Şekil D.11 : Toplam antosiyanin ve FRAP regresyon grafiği.



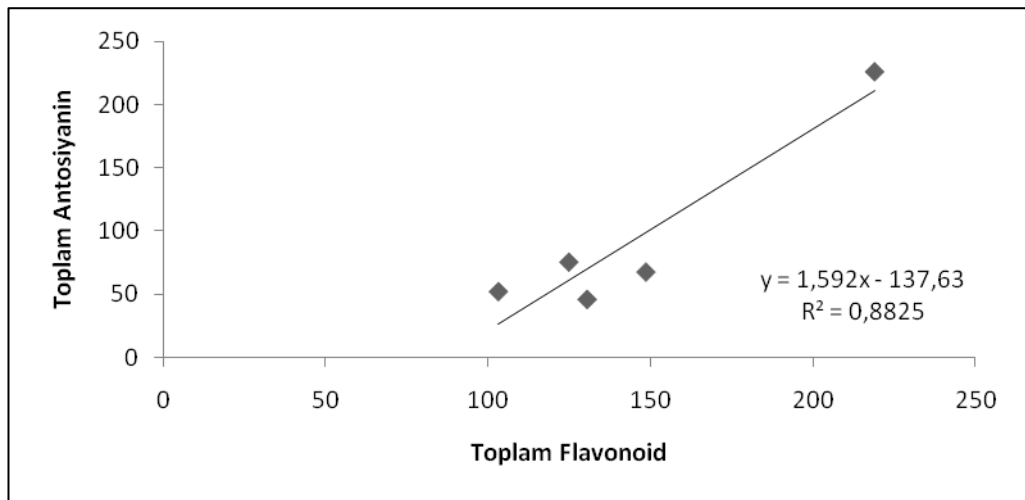
Şekil D.12 : Toplam antosiyanin ve CUPRAC regresyon grafiği.



Şekil D.13 : Toplam fenolik madde ve toplam flavonoid regresyon grafiği.



Şekil D.14 : Toplam antosiyanin ve toplam fenolik madde regresyon grafiği.



Şekil D.15 : Toplam antosiyanin ve toplam flavonoid regresyon grafiği.

EK E : HPLC Analizi Tabloları**Çizelge E.1 : Siyah pirinç örneklerinin HPLC analizi sonuçları.**

	Fenolik bileşik	Alıkonma süresi (dk)	Alan
P1-1	siyanidin 3-glikozit	44.311	15502757
	peonidin 3-glikozit	46.027	936498
P1-2	siyanidin 3-glikozit	44.346	14583973
	peonidin 3-glikozit	46.057	837584
P1-3	siyanidin 3-glikozit	44.342	15234169
	peonidin 3-glikozit	46.050	902612
P2-1	siyanidin 3-glikozit	44.317	16078752
	peonidin 3-glikozit	46.038	1001771
P2-2	siyanidin 3-glikozit	44.332	13571307
	peonidin 3-glikozit	46.045	842014
P2-3	siyanidin 3-glikozit	44.348	14174557
	peonidin 3-glikozit	46.062	882687
P3-1	siyanidin 3-glikozit	44.320	15656401
	peonidin 3-glikozit	46.054	942093
P3-2	siyanidin 3-glikozit	44.289	15186442
	peonidin 3-glikozit	46.038	1030799
P3-3	siyanidin 3-glikozit	44.278	15722152
	peonidin 3-glikozit	46.031	952838
D1-1	siyanidin 3-glikozit	44.235	2562337
	peonidin 3-glikozit	46.010	202531
D1-2	siyanidin 3-glikozit	44.367	2539876
	peonidin 3-glikozit	46.042	187620
D1-3	siyanidin 3-glikozit	44.373	2480642
	peonidin 3-glikozit	46.047	199480
D2-1	siyanidin 3-glikozit	44.354	2086287
	peonidin 3-glikozit	46.035	152296
D2-2	siyanidin 3-glikozit	44.353	2151282
	peonidin 3-glikozit	46.029	155701
D2-3	siyanidin 3-glikozit	44.343	2028459
	peonidin 3-glikozit	46.029	170701

Çizelge E.1 : (devam) Siyah pirinç örneklerinin HPLC analizi sonuçları.

D3-1	siyanidin 3-glikozit	44.331	2436343
	peonidin 3-glikozit	46.014	189683
D3-2	siyanidin 3-glikozit	44.312	2309882
	peonidin 3-glikozit	46.007	178143
D3-3	siyanidin 3-glikozit	44.317	2376701
	peonidin 3-glikozit	46.013	196928
E1-1	siyanidin 3-glikozit	44.313	2549050
	peonidin 3-glikozit	46.008	202413
E1-2	siyanidin 3-glikozit	44.327	2500597
	peonidin 3-glikozit	46.008	196972
E1-3	siyanidin 3-glikozit	44.292	2422675
	peonidin 3-glikozit	45.991	200862
E2-1	siyanidin 3-glikozit	44.081	2422204
	peonidin 3-glikozit	45.922	192112
E2-2	siyanidin 3-glikozit	44.274	2455501
	peonidin 3-glikozit	45.983	196822
E2-3	siyanidin 3-glikozit	44.290	2434317
	peonidin 3-glikozit	45.993	205888
E3-1	siyanidin 3-glikozit	44.268	2630383
	peonidin 3-glikozit	45.990	217014
E3-2	siyanidin 3-glikozit	44.270	2698854
	peonidin 3-glikozit	45.994	189404
E3-3	siyanidin 3-glikozit	44.289	2593576
	peonidin 3-glikozit	46.010	247452
R1-1	siyanidin 3-glikozit	44.269	2603789
	peonidin 3-glikozit	45.988	182483
R1-2	siyanidin 3-glikozit	44.294	2652610
	peonidin 3-glikozit	46.013	194076
R1-3	siyanidin 3-glikozit	44.281	2522112
	peonidin 3-glikozit	45.999	185094

Çizelge E.1 : (devam) Siyah pirinç örneklerinin HPLC analizi sonuçları.

R2-1	siyanidin 3-glikozit	44.238	2577372
	peonidin 3-glikozit	45.975	194557
R2-2	siyanidin 3-glikozit	44.070	2349534
	peonidin 3-glikozit	45.924	192324
R2-3	siyanidin 3-glikozit	44.220	2447500
	peonidin 3-glikozit	45.964	186893
R3-1	siyanidin 3-glikozit	44.238	2198934
	peonidin 3-glikozit	45.975	193565
R3-2	siyanidin 3-glikozit	44.070	2133956
	peonidin 3-glikozit	45.924	188547
R3-3	siyanidin 3-glikozit	44.220	2236701
	peonidin 3-glikozit	45.964	196418
N1-1	siyanidin 3-glikozit	44.238	3836701
	peonidin 3-glikozit	45.975	291571
N1-2	siyanidin 3-glikozit	44.070	3746626
	peonidin 3-glikozit	45.924	287709
N1-3	siyanidin 3-glikozit	44.220	3908340
	peonidin 3-glikozit	45.964	293272
N2-1	siyanidin 3-glikozit	44.238	3453994
	peonidin 3-glikozit	45.975	258368
N2-2	siyanidin 3-glikozit	44.070	3376910
	peonidin 3-glikozit	45.924	241217
N2-3	siyanidin 3-glikozit	44.220	3665047
	peonidin 3-glikozit	45.964	256225
N3-1	siyanidin 3-glikozit	44.238	3838652
	peonidin 3-glikozit	45.975	296155
N3-2	siyanidin 3-glikozit	44.070	3325431
	peonidin 3-glikozit	45.924	284112
N3-3	siyanidin 3-glikozit	44.220	3756920
	peonidin 3-glikozit	45.964	287172

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Gizem Savaş

Doğum Yeri ve Tarihi: Beyoğlu – 25.01.1986

Lisans Üniversite: İstanbul Teknik Üniversitesi – Gıda Mühendisi

