

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**SİYEZ (*Triticum monococcum*) VE GERNİK (*Triticum dicoccum*)
BUĞDAYLARINDAN EKSTRAKTE EDİLEN FERULİK ASİDİN FONKSİYONEL
GIDA BİLEŞENİ OLARAK KULLANIM OLANAKLARININ BELİRLENMESİ**

Ümit BABACAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

AĞUSTOS 2024

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**SİYEZ (*Triticum monococcum*) VE GERNİK (*Triticum dicoccum*)
BUĞDAYLARINDAN EKSTRAKTE EDİLEN FERULİK ASİDİN FONKSİYONEL
GIDA BİLEŞENİ OLARAK KULLANIM OLANAKLARININ BELİRLENMESİ**

Ümit BABACAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

AĞUSTOS 2024

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİYEZ (*Triticum monococcum*) VE GERNİK (*Triticum dicoccum*)
BUĞDAYLARINDAN EKSTRAKTE EDİLEN FERULİK ASİDİN FONKSİYONEL
GIDA BİLEŞENİ OLARAK KULLANIM OLANAKLARININ BELİRLENMESİ

Ümit BABACAN
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
proje FBA-2019-4837 numarası ile desteklenmiştir.

AĞUSTOS 2024

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİYEZ (*Triticum monococcum*) VE GERNİK (*Triticum dicoccum*)
BUĞDAYLARINDAN EKSTRAKTE EDİLEN FERULİK ASİDİN FONKSİYONEL
GIDA BİLEŞENİ OLARAK KULLANIM OLANAKLARININ BELİRLENMESİ

Ümit BABACAN

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 05/08/2024 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ (Danışman)	[imza]
Prof. Dr. Muharrem CERTEL	[imza]
Prof. Dr. Taner AKAR	[imza]
Prof. Dr. Erdoğan KÜÇÜKÖNER	[imza]
Prof. Dr. Sabri ERBAŞ	[imza]

ÖZET

SİYEZ (*Triticum monococcum*) VE GERNİK (*Triticum dicoccum*) BUĞDAYLARINDAN EKSTRAKTE EDİLEN FERÜLİK ASİDİN FONKSİYONEL GIDA BİLEŞENİ OLARAK KULLANIM OLANAKLARININ BELİRLENMESİ

Ümit BABACAN

Doktora Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Ağustos 2024; 160 sayfa

Bitkilerde yaygın olarak bulunan bir fenolik asit olan ferülik asit ($C_{10}H_{10}O_4$) hidroksisinnamik asit ailesinin bir üyesidir ve antioksidan, antimikrobiyal, anti-inflamatuar, antikarsinojenik, UV koruyucu ve antidiyabetik aktivitelere sahip olduğu literatür çalışmalarında sıklıkla yer almaktadır. Fonksiyonel özellikleri ile ön plana çıkan bu önemli bileşiğin özellikle tahılların kepek fraksiyonlarında yüksek miktarda bulunduğu rapor edilmektedir. Bu doktora tezinin amacı, ülkemizin tarihsel buğday çeşitlerinden olan Siyez (*Triticum monococcum*) ve Gernik (*Triticum dicoccum*) buğday çeşitlerinin farklı fraksiyonlarında analizler gerçekleştirilerek ferülik asitçe zengin çeşit ve fraksiyonun belirlenmesi, tespit edilen çeşit ve fraksiyondan ferülik asidin ekstrakte edilerek saflaştırılması, saflaştırılan materyalin yapısal analizlerinin gerçekleştirilmesi, ilgili materyalde antioksidan aktivite, serbest radikal analizleri, toplam fenolik içerik, antimikrobiyal aktivite, antikarsinojenik aktivite testlerinin gerçekleştirilmesi ve ferülik asit açısından zengin olarak belirlenen çeşit kullanılarak üretilen bazı gıda ürünlerinin ferülik asit düzeyleri açısından karşılaştırılmasıdır. Çalışmalar kapsamında, Siyez ve Gernik buğday numuneleri TÜBİTAK 214O401 numaralı projeden temin edilerek laboratuvar ortamına getirilmiş kavuzlarından ayrılmış ve un ve kepek fraksiyonları elde edilmiştir. Numunelerdeki ferülik asit miktarları yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı kullanılarak tespit edilmiştir. Saflaştırma çalışmalarında, kolon kromatografisi, solvent ekstraksiyonu, süperkritik akışkan karbondioksit (SA CO_2) ekstraksiyonu yöntemleri ve ayrıca enzimatik yöntem (ferüloil esteraz) kullanılmıştır. Saflaştırma sonucu elde edilen materyal kütle spektrometrisi ve FTIR cihazları kullanılarak yapısal analizlere tabii tutulmuş ve ardından saf materyal ve ferülik asit analitik standardı kullanılarak ABTS, DPPH ve Folin Ciocalteu yöntemleri ile antioksidan kapasite, MTT yöntemi ile hücre canlılığı, hücre göçü testleri, kuyucuk yöntemi ile antimikrobiyal ve insan melanoma (SK-MEL-30) hücre hattında antikarsinojenik etkinlik deneyleri yapılmıştır. Fonksiyonel gıda bileşeni olarak değerlendirilebilme imkanları kapsamında ise Siyez ve Gernik buğday çeşitlerinden normal ekmek, kepekli ekmek, bulgur, erişte ve irmik üretilerek ürünlerdeki ferülik asit düzeyleri ticari ürünlerle karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre, Siyez ve Gernik buğdaylarının kepek fraksiyonlarında sırasıyla $1323,70 \pm 667,55$ ppm ($n=15$) ve $1629,87 \pm 456,72$ ppm ($n=15$) olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte en yüksek oranda ferülik asit Siyez 6 buğday çeşidinden elde edilen kepek fraksiyonunda $2953,93 \pm 3,16$ ppm olarak belirlenmiştir. Siyez buğdayının un fraksiyonunda tespit edilen ferülik asit düzeylerinin ortalama değeri $66,01 \pm 7,72$ ppm aralığındayken, değerin Gernik

buğdayından elde edilen un fraksiyonunun ortalama değeri $68,83 \pm 17,68$ ppm olarak belirlenmiştir. Saflaştırma çalışmaları Siyez 6 buğday kepeği fraksiyonu kullanılarak gerçekleştirilmiş ve bu çalışmalarda en yüksek saflaştırma oranı ve ekstraksiyon verimi enzimatik yöntem yardımıyla ekstraksiyon ve ardından dondurarak kurutma yöntemi ile elde edilmiştir. Bu yöntemde ferülik asit %17,2 oranında saflaştırılırken ekstraksiyon verimi %44,02 olarak bulunmuştur. Saflaştırılan materyal ile gerçekleştirilen biyoaktivite çalışmalarında ABTS DPPH ve Folin Ciocalteu deneylerinde sırasıyla $1584,95 \mu\text{g}/100\text{g}$, $186,80 \mu\text{g}/100\text{g}$ ve $245,7 \mu\text{g}/100\text{g}$ olarak bulunmuş olup elde edilen değerler analitik standardının eşdeğer konsantrasyonu ile uyumlu bulunmuştur. Antimikrobiyal duyarlılık testinde ise ferülik asidin *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterileri üzerinde EUCAST kılavuzundaki veriler ile kıyaslandığında düşük derecede etkinliğinin olduğu sonucuna varılmıştır. Antikarsinojenik etkinlik testler kapsamında SK-MEL-30 hücre hattında yapılan hücre canlılığı testi sonucuna göre, $1500 \mu\text{M}$ konsantrasyondaki ferülik asidin 72 saat sonunda melanoma hücrelerinin aktivitesini %30'un altına düşürdüğü belirlenmiştir. Hücre göçü testinde ise 72 saat sonunda SK-MEL-30 hücrelerinin $2000 \mu\text{M}$ dozunda hücreler arasındaki mesafenin kapanmadığı böylelikle melanoma hücrelerinin arasındaki etkileşimi azalttığı sonucuna varılmıştır. Ferülik asitçe zengin fonksiyonel gıda üretiminde Siyez 6 buğday çeşidi kullanılarak üretilen ürünlerde normal ekmekte $97,74 \pm 8,01$ ppm, kepekli ekmekte $528,12 \pm 26,43$ ppm, bulgurda $831,01 \pm 309,47$ ppm, eriştede $84,05 \pm 7,02$ ve ırmikte $694,16 \pm 278,25$ ppm ferülik asit düzeyleri belirlenmiştir.

Sonuç olarak, ferülik asit tarihsel buğday çeşitlerimizden olan Siyez buğdayından elde edilen kepek fraksiyonunda yüksek oranda tespit edilmiş olup, ilgili buğday çeşidinin ve özellikle kepek fraksiyonunun fonksiyonel bir gıda bileşeni olarak kullanılabilme potansiyeli bulunmaktadır. Tez çalışmasında elde edilen verilerin fonksiyonel gıda üretimi ve tarımsal atıklardan katma değeri yüksek bileşiklerin elde edilme çalışmalarına ışık tutması ümit edilmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: Ferülik asit, Gernik (*Triticum dicoccum*), Saflaştırma, Siyez (*Triticum monococcum*)

JÜRİ: Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Prof. Dr. Muharrem CERTEL

Prof. Dr. Taner AKAR

Prof. Dr. Erdoğan KÜÇÜKÖNER

Prof. Dr. Sabri ERBAŞ

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE POSSIBILITIES OF USING FERULIC ACID EXTRACTED FROM EINKORN (*Triticum monococcum*) AND EMMER (*Triticum dicoccum*) WHEAT AS FUNCTIONAL FOOD COMPONENT

Ümit BABACAN

PhD Thesis in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

August 2024; 160 pages

Ferulic acid ($C_{10}H_{10}O_4$), a phenolic acid commonly found in plants, is a member of the hydroxycinnamic acid family. It has been demonstrated to possess a range of beneficial properties, including antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, anticarcinogenic, UV protective and antidiabetic activities. It has been documented that this significant compound, which is distinguished by its functional properties, is present in considerable quantities, particularly in the bran fractions of cereals. The objective of this doctoral thesis is to ascertain the variety and fraction of ferulic acid-rich wheat by analyzing the different fractions of Siyez (*Triticum monococcum*) and Gernik (*Triticum dicoccum*) wheat varieties, which are the historical wheat varieties of our country. Furthermore, the aim is to extract and purify ferulic acid from the identified variety and fraction. The purified material will be subjected to structural analysis, antioxidant activity testing, free radical analyses, total phenolic content analysis, antimicrobial activity testing, and anticarcinogenic activity testing. Additionally, the levels of ferulic acid in a selection of food products produced using the variety of wheat determined to be rich in this compound will be compared.

In the context of the aforementioned studies, wheat samples belonging to the Siyez and Gernik varieties were procured from the TUBITAK 214O401 project and subsequently transported to the laboratory setting. There, the samples were separated from their husks, and the flour, bran, and other fractions were obtained. The amounts of ferulic acid present in the samples were determined using high-performance liquid chromatography (HPLC). In the purification studies, a number of different techniques were employed, including column chromatography, solvent extraction, supercritical fluid carbon dioxide ($SF\ CO_2$) extraction, and an enzymatic method utilizing feruloyl esterase. The purified material was subjected to structural analyses using mass spectrometry and FTIR devices, followed by antioxidant capacity assessment through the ABTS, DPPH and Folin Ciocalteu methods, cell viability determination using the MTT method, cell migration tests, antimicrobial activity evaluation through the well method and anticarcinogenic activity experiments in the human melanoma (SK-MEL-30) cell line, which were conducted using the pure material and the ferulic acid analytical standard. In order to evaluate their potential as functional food components, a range of products were produced from Siyez and Gernik wheat varieties, including normal bread, whole meal bread, bulgur, noodles and semolina. The levels of ferulic acid present in these products were then compared with those of commercial products.

According to the results obtained, $1323,70 \pm 667,55$ ppm (n=15) and $1629,87 \pm 456,72$ ppm (n=15) was determined in the bran fractions of Siyez and Gernik wheats, respectively. However, the highest amount of ferulic acid was determined as $2953,93 \pm 3,16$ ppm in the bran fraction obtained from Siyez 6 wheat variety. Purification studies were carried out using Siyez 6 wheat bran fraction and the highest purification rate and extraction efficiency were obtained by enzymatic extraction followed by freeze drying. In this method, ferulic acid was purified at a rate of 17.2% and the extraction yield was found to be 51%. In the bioactivity studies performed with the purified material, 1584.95 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 186.80 $\mu\text{g}/100\text{g}$ and 245.7 $\mu\text{g}/100\text{g}$ were found in ABTS DPPH and Folin Ciocalteu assays, respectively, and the values obtained were found to be compatible with the equivalent concentration of the analytical standard. In the antimicrobial susceptibility test, it was concluded that ferulic acid had low activity on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922 bacteria compared to the data in the EUCAST guideline. According to the results of the cell viability test performed on SK-MEL-30 cell line within the scope of anticarcinogenic activity tests, it was determined that ferulic acid at a concentration of 1500 μM reduced the activity of melanoma cells below 30% at the end of 72 hours. In the cell migration test, it was concluded that the distance between SK-MEL-30 cells at the dose of 2000 μM at the end of 72 hours did not close the distance between the cells, thus reducing the interaction between melanoma cells. Ferulic acid levels of $97,74 \pm 8,01$ ppm in normal bread, $528,12 \pm 26,43$ ppm in whole meal bread, $831,01 \pm 309,47$ ppm in bulgur, $84,05 \pm 7,02$ in noodles and $694,16 \pm 278,25$ ppm in semolina were determined in products produced using Siyez 6 wheat variety in the production of functional food rich in ferulic acid.

As a result, ferulic acid was detected at a high rate in the bran fraction obtained from Siyez wheat, one of our historical wheat varieties, and the related wheat variety and especially the bran fraction have the potential to be used as a functional food component. It is hoped that the data obtained in the thesis study will shed light on functional food production and studies on obtaining high value-added compounds from agricultural wastes.

KEYWORDS: Einkorn (*Triticum monococcum*), Emmer (*Triticum dicoccum*), Ferulic acid, Purification

COMMITTEE: Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Prof. Dr. Muharrem CERTEL

Prof. Dr. Taner AKAR

Prof. Dr. Erdoğan KÜÇÜKÖNER

Prof. Dr. Sabri ERBAŞ

ÖNSÖZ

Gün geçtikçe kısıtlı kaynaklarımızın kullanımı ve tüketimi sonrasında oluşan organik atıkların değerlendirilmesi, artan nüfus ihtiyaçlarının giderilmesi için ortaya çıkan ve en önemli bilim dallarından biri olan biyoteknoloji, insanlık tarihinde temel ihtiyaçların giderilmesi için minimum enerji ile maksimum verimi almayı hedefler. Biyoloji, fizik, kimya ve matematikten oluşan temel bilimlerden alınan güç ile problemlere genetik temelli çözümler sunmakla birlikte enzimatik olarak üretim işlemlerini de daha verimli hale getirilmesi, ekolojik olarak doğa dostu ürünler geliştirmeyi misyon olarak belirlemek olup, multidisipliner ilerlemeyi ve topluma biyoteknoloji alanında farklı görüşlere sahip neferler kazandırır.

Bu bilgiler ışığında biyoteknoloji, ülkemizde daha çok desteklenmeli ve toplumsal bir hareket olarak yeni nesillere, ekolojik problemlere neden değil çözüm üretme odaklı düşünmeyi, ülkemizin dışa bağımlılığını minimize etmek üzerine daha fazla fikirlerin konuşulduğu buna ek olarak, doktoralı birey sayısının popülasyon içerisinde arttırarak, tüketici toplum kavramını revize edilmesi üzerine, ihtiyacı kadar tüketmekten korkmayan ancak üretmek için elini taşın altına koymaktan çekinmeyen bireylerin topluluğunu ifade etmektedir.

Ülkemizin bilime ve bilim insanına verdiği desteğin giderek artması ve temel bilimlerin hak ettiği değerin daha da arttırılması hedeflenerek YÖK 100/2000 doktora programı kapsamında tamamlamış olduğum bu doktora programının, kişisel başarılarımın yanı sıra akademik bilgimin değerli hocalarımız ışığında arttırabilmenin, ülkeme fayda sağlaması hedeflenen bu tezin vermiş olduğu huzuru, mutluluğu ve gururunu yaşamaktayım. Ancak bilimin dinamiği süreklilik arz eder. Yılmadan yorulmadan bana her zaman her konuda destek olan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ hocama teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Beni asistanınız olarak kabul ettiğiniz ve bana kattığınız her türlü bilgi için size her zaman minnettarım. Her türlü sorularıma sıklıkla bunalmadan ve sabırla cevap veren, düşüncelerimin daha da karmaşık hale getirmekten çekinmeyen hocam, sayın Prof. Dr. Nedim MUTLU'ya, teşekkürü borç bilir, gösterdikleri bu yolda düşe kalka ilerleyerek bu tez için çok değerli katkılarını benden esirgemedikleri için saygılarımı sunarım.

Tüm problemlerimin çözerken daima yanımda olan, desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen, bilim insanı olabilmem için gerektiğinde evimizin tüm harcamalarını minimize etmek zorunda kalan, canım babam sayın Adem BABACAN ve hiçbir konudan eksik kalmamam için kendini hırpalayan canım annem sayın Adile BABACAN'a ve dünyadaki sırdaşım dayanağım canım ablam Özlem BABACAN'a teşekkürü borç bilir her zaman düşüncelerimde kalbimde ve dilimde sizlerle olmanın mutluluğunu yaşamayı bana sağladığınız için teşekkür ederim.

Akademik hayatım boyunca beni destekleyen arkadaşlarıma, beni dinlemek zorunda kalıp, kahrımı çeken ve en önemlisi bana zaman ayıran Ph.D. Fulya YILMAZ'a her zaman bir telefon kadar uzağımda olup, benimle parklarda oturmayı göze alıp hastalanmasına neden olduğum Sayın Deniz YILDIRIM'a, kendisiyle birçok akademik başarıya imza attığımız ve oburluğumuzdan gurur duyduğumuz sayın Oya TEMİZ'e teşekkür ederim. Tüm laboratuvar arkadaşlarıma saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
AKADEMİK BEYAN	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
1.1. Buğday tarihçesi	1
1.2. Buğdayın Sınıflandırılması	3
1.3. Buğdayın Morfolojisi	5
1.3.1 Buğday kepeği	9
1.3.2. Ferülik asit	12
1.4. Buğdayın Genetiği ve Islahı	22
1.5. Buğday Türleri ve Farklılıkları	23
1.5.1. Siyez buğdayı	23
1.5.2. Gernik buğdayı	25
1.6. Fonksiyonel Gıda Üretimi	26
1.6.1. Ekmek	26
1.6.2. Kepekli ekmek	27
1.6.3. Bulgur	28
1.6.4. İrmik	28
1.6.5. Erişte	29
1.7. Ferülik Asidin Buğday Kepeğinden Ekstraksiyon Yöntemleri	30
1.7.1. Hidrodistilasyon yöntemi ile ferülik asit eldesi	31
1.7.2. Soxhlet yöntemi ile ferülik asit eldesi	31
1.7.3. Süperkritik sıvı akışkan karbondioksit ekstraksiyonu ile ferülik asit eldesi	33
1.7.4. Çözücü ekstraksiyonu	34
1.7.5. Enzim kullanılarak ekstraksiyon	35
1.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	37

1.9. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	37
1.10. Kütle Spektrometrik Analizler	38
1.11. Antioksidan Aktivite	38
1.11.1. Serbest radikal analizleri	39
1.11.2. Toplam fenolik içerik	39
1.12. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi	40
1.12.1. Kuyucuk difüzyon metodolojisi	40
1.12.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	41
1.12.3. <i>Escherichia coli</i>	41
1.13. Hücre Kültürü.....	41
1.13.1. Hücre canlılığı testi (MTT testi)	42
1.13.2. Halka hücre göçü testi (Ring cell migration assay)	42
2. KAYNAK TARAMASI	44
3. MATERYAL VE METOT	50
3.1. Kullanılan Buğday Çeşitleri	50
3.2. Kimyasal ve Sarf Malzemeleri	51
3.3. Denemeler Kapsamında Kullanılan Cihazlar	54
3.4. Buğday Numunelerinin Ön Hazırlık İşlemleri	55
3.5. Ferülik Asit Analizleri için Ekstraksiyon	57
3.6. Ferülik Asidin HPLC Analizi	59
3.7. Ferülik Asit Saflaştırma İşlemleri	60
3.7.1. Süper kritik karbondioksit ekstraksiyonu yöntemi kullanılarak saflaştırma	60
3.7.2. Çözücü ekstraksiyonu ile saflaştırma	60
3.8. Ferülik Asidin Yapısal Analizleri.....	64
3.8.1. Spektrofotometrik analizler	64
3.8.2. Kütle spektrometrik analizler	65
3.9. Biyolojik Etkinlik Değerlendirme Çalışmaları.....	66
3.9.1. Antioksidan kapasite testleri.....	66
3.9.2. Serbest radikal analizleri.....	66
3.9.3. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi	66
3.10. Antimikrobiyal Etkinin Değerlendirilmesi.....	67
3.11. Antikarsinogenik Etkinin Değerlendirilmesi	68

3.11.1. Hücre canlılığı testi.....	70
3.11.2. Halka hücre göçü deneyi	71
3.12. Ferulik Asidin Fonksiyonel Gıda Olarak Kullanabilme Çalışmaları	71
3.12.1. Ekmek eldesi.....	72
3.12.2. Kepek ekmeği eldesi.....	73
3.12.3. Erişte eldesi.....	74
3.12.4. Bulgur eldesi.....	76
3.12.5. İrmik eldesi	77
3.13. İstatistiksel Çalışmalar	77
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	78
4.1. Ferulik Asidin Kromatografik Yöntemle Tanımlanması ve Validasyonu	78
4.2. Buğday Numuneleri Fraksiyonlarındaki Ferulik Asit Düzeyleri	82
4.2.1. Siyez ve Gernik buğdaylarına ait un fraksiyonunun analizi.....	85
4.3. Ferulik Asidin Saflaştırılması.....	86
4.3.1. Süper kritik karbondioksit ekstraksiyonu yöntemi kullanılarak saflaştırma.....	86
4.3.1. Çözücü ekstraksiyonu ile saflaştırma	87
4.3.2. Enzimatik ilavesinin ekstrakte edilen ferulik asit üzerine etkisi	88
4.3.3. Mumsu bileşenlerin uzaklaştırılmasının ferulik asit üzerine etkileri.....	90
4.3.5. Kolon kromatografisi sonuçları	93
4.3.8. Dondurarak kurutma yöntemi kullanılarak saflaştırma sonuçları	94
4.4. Saflaştırılan Materyalin Yapısal Analizleri.....	96
4.4.1. FTIR analizleri.....	96
4.4.2. MS analizleri.....	98
4.5. Biyolojik Etkinlik Değerlendirme Çalışmaları.....	101
4.5.1. Antioksidan kapasite testleri.....	101
4.5.2. Serbest radikal analizleri.....	104
4.5.3. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi	106
4.5.4. Antimikrobiyal etkinin değerlendirilmesi	108
4.5.5. Antikarsinojenik etkinin değerlendirilmesi	111
4.6. Fonksiyonel Gıda Olarak Kullanım İmkanları.....	118
4.6.1. Ekmek	118
4.6.2. Kepek ekmeği	119

4.6.3. Erişte	121
4.6.4. Bulgur	122
4.6.5. İrmik	125
5. SONUÇLAR	128
6. KAYNAKLAR	131
7. EKLER.....	151
ÖZGEÇMİŞ	



AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “SİYEZ (*Triticum monococcum*) VE GERNİK (*Triticum dicoccum*) BUĞDAYLARINDAN EKSTRAKTE EDİLEN FERÜLİK ASİDİN FONKSİYONEL GIDA BİLEŞENİ OLARAK KULLANIM OLANAKLARININ BELİRLENMESİ” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

05/08/2024

Ümit BABACAN

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C : Santigrat

% : Yüzde

α : Alfa

β : Beta

°F : Fahrenheit

K : Kelvin

L : Litre

Kısaltmalar

AÜ	: Akdeniz Üniversitesi
GC-MS	: Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometrisi
He	: Helyum
MÖ	: Milattan Önce
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
DAD	: Diyot Dizisi Dedektörü
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
GFP	: Yeşil Floresans Protein
FTIR	: Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi
OD	: Optik Yoğunluk
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
MAU	: Milli-Absorbans Birimi
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UV	: Ultraviyole
Kcal	: Kilo kalori
GRAS	: Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen
HeLa	: Serviks Adenokarsinomu Hücre Hattı
CaSki	: Servikal Kanser Hücre Hattı
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
ESC	: Embriyonik Kök Hücreler
GSH	: Aktif Glutatyon
LOD	: Gözlemlenebilir Limit (Tespit sınırı)
LOQ	: Belirlenebilirlik Sınır (Ölçüm sınırı)
SKA-CO ₂	: Süperkritik Sıvı Akışkan Karbondioksit Ekstraksiyonu
MPa	: Megapascal

μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
g	: Gram
kg	: Kilogram
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
sn	: Saniye
ha	: Hektar
M	: Metre
ppm	: Milyonda Bir Birim
μM	: Mikromolar
mM	: Milimolar
MSTFA	: N-Metil-N-(trimetilsilil)trifloroasetamid
EUCAST	: Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi

Tezde ondalık ayırıcı olarak virgöl (,) kullanılmıştır (Örn. “19,09”).

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bereketli hilal bölgesi (Ozberk 2018)	2
Şekil 1.2. Yetiştirilen Buğdayın Evrimi (Feldman ve Levy 2023)'den değiştirilerek alıntılanmıştır.	3
Şekil 1.3. Tez kapsamında ekilen buğdayların morfolojisi.....	6
Şekil 1.4. Buğday tanesinin yapısı (Marchini, Montanari vd. 2016).....	8
Şekil 1.5. Tez kapsamında ekilen buğdaylardan elde edilen kepek fraksiyonu.....	9
Şekil 1.6. Ferulik asidin kimyasal yapısı (PubChem 2004).....	13
Şekil 1.7. Ferulik asit önce vaniline sonrasında vanilik aside dönüşümü (Rosazza, Huang vd. 1995).....	14
Şekil 1.8. Lignin birimlerinin oluşum yolları (Chen, Srinivasa Reddy vd. 2006)	15
Şekil 1.9. Hücre döngüsünün bozulması ve apoptoza yol açan sinyal süreçlerinde ferulik asidin moleküler hedefleri. Bcl-2-ilişkili X proteini (BAX), BCL-2 antagonisti/katili (BAK), tümör baskılayıcı p53 (p53) ve sitokrom kompleksi (CYCS), B-hücreli lenfoma 2 (Bcl-2), Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP), Fas-ligand (FASL) ve TNFR-ilişkili ölüm alanı (TRADD) (Singh Tuli, Kumar vd. 2022).....	19
Şekil 1.10. Tez çalışması kapsamında ekilen Siyez buğdayı.....	24
Şekil 1.11. Tez çalışması kapsamında ekilen Gernik buğdayı.....	25
Şekil 1.12. Hidrodistilasyon düzeneği	31
Şekil 1.13. Soxhlet ekstraksiyonu düzeneği (Reeve 2002).....	32
Şekil 1.14. Tipik bir SKA-CO ₂ cihazının şematize edilmiş hali (Lari, Moradi-kheibari vd. 2016)	34
Şekil 1.15. ABTS testinde meydana gelen reaksiyonlar (Echegaray, Pateiro vd. 2021).	38
Şekil 1.16. DPPH testinde meydana gelen reaksiyonlar (Echegaray vd. 2021)	39
Şekil 1.17. Folin-Ciocalteu reaktifinin indirgenme reaksiyonu (Echegaray, Pateiro vd. 2021)	40
Şekil 1.18. Halka hücre göçü testi illüstrasyonu (Shiode, Morizane vd. 2017).....	43
Şekil 3.1. Tez kapsamında ekilen buğdayların görüntüsü. A: Gernik (<i>Triticum dicoccum</i>) B: Siyez (<i>Triticum monococcum</i>).....	50
Şekil 3.2. Laboratuvar tipi kavuz soyma makinası	55
Şekil 3.3. Laboratuvar tipi valsli un değirmeni.....	56
Şekil 3.4. Steril tüplere alınan kepek fraksiyonları.....	56
Şekil 3.5. Laboratuvar tipi öğütücü.....	57
Şekil 3.6. Ferulik asit analizi için ekstraksiyon prosedürü	58
Şekil 3.7. Feruloil esteraz enziminin arabinoksilan ile ferulik asit arasındaki ester bağlarını kesmesi (Puchart, Šuchová vd. 2023).....	61
Şekil 3.8. Mumsu bileşenlerin filtre edilerek uzaklaştırma işlemi.....	62
Şekil 3.9. Döner buharlaştırıcı işlemi sonrasında elde edilen çözelti	63

Şekil 3.10. Buğday kepeği ekstraksiyonunun silika jel kolondan yürütülmesi ve toplanan elüatlar	63
Şekil 3.11. Soldaki görüntü dondurarak kurutma işlemi öncesini, sağdaki ise dondurarak kurutma işlemi sonrasında göstermektedir	64
Şekil 3.12. Antioksidan kapasite testlerine hazırlanan numunelerin analiz öncesi görüntüsü.....	67
Şekil 3.13. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan hücreler A) BJ hücre hattı B) SK-MEL-30 hücre hattı	69
Şekil 3.14. Hücre sayımı için kullanılan Thoma lamı ve yüzeyinde bulunan kareler	70
Şekil 3.15. MTT deneyinin akış şeması (Babacan, Adem vd. 2021).....	71
Şekil 3.16. Ekmek eldesinde meydana gelen aşamalar.....	72
Şekil 3.17. Kepekli ekmek eldesinde meydana gelen aşamalar.....	73
Şekil 3.18. Eriştenin elde edilme aşamaları	74
Şekil 3.19. Bulgur üretimine ait görseller.....	76
Şekil 3.20. İrmik elde edilme aşamaları.....	77
Şekil 4.1. Ferulik asidin HPLC cihazındaki analizi sonucundaki kromatogramı	78
Şekil 4.2. Ferulik asidin UV spektrumu	78
Şekil 4.3. Ferulik asidin kalibrasyon denklemi.....	79
Şekil 4. 4. Hidrolizasyon aşamasında kullanılan NaOH miktarları ve ultrasonikasyon sıcaklık ve sürelerine yönelik yanıt yüzey grafikleri	80
Şekil 4. 5. Farklı NaOH konsantrasyonlarından elde edilen ortalama ferulik asit miktarları	80
Şekil 4. 6. Farklı pH değerlerinden elde edilen ortalama ferulik asit analizi	81
Şekil 4. 7. Ferulik asit ekstraksiyonunda farklı çözügenlerin etkileri.....	82
Şekil 4. 8. Ferulik asidin Siyez buğday çeşitlerinin kepek fraksiyonunda saptanan miktarları (ppm)	82
Şekil 4.9. Ferulik asidin Gernik buğday çeşitlerinin kepek fraksiyonunda saptanan miktarları (ppm)	83
Şekil 4.10. Siyez ve Gernik buğdaylarının kepek fraksiyonlarındaki ortalama ferulik asit değeri.....	83
Şekil 4.11. Farklı fırınlardan elde edilen kepek fraksiyonunun ferulik asit miktarları...	84
Şekil 4.12. Farklı fırınlardan elde edilen kepek fraksiyonunun ortalama ferulik asit miktarı	85
Şekil 4.13. Gernik buğdayı un fraksiyonunda bulunan ferulik asit içeriği.	85
Şekil 4.14. Siyez ve Gernik buğdaylarından elde edilen un içeriğinde bulunan ortalama ferulik asit miktarı	86
Şekil 4.15. Süper kritik karbondioksit ekstraksiyon cihazından elde edilen özüte ait görsel.....	87
Şekil 4.16. Feruloil esteraz enzimi kullanıldıktan sonra elde edilen katı faz	88
Şekil 4.17. Feruloil esteraz enzimi kullanılarak aktif karbondan süzülen ekstrakta ait kromatogram	89

Şekil 4.18. Mumsu bileşenlerin giderimi işlemi öncesi (sol) sonrası (sağ)	90
Şekil 4.19. Döner buharlaştırıcı sonucunda elde edilen katı faz.....	91
Şekil 4.20. Döner buharlaştırıcı sonrasında katı fazdan %100 metanolde çözülen maddeler.....	92
Şekil 4.21. Döner buharlaştırıcı sonrasında elde edilen katı fazda %30 metanolde çözülen maddenin görüntüsü.....	92
Şekil 4.22. Dondurarak Kurutma Yöntemi Kullanılarak Saflaştırma aşamaları	94
Şekil 4.23. Dondurup kurutma yöntemi ile geri kazanılan ferülik asit miktarı	95
Şekil 4.24. Ferülik asidin FTIR analizi sonucu elde edilen spektrum	96
Şekil 4.25. Dondurup kurutma işlemi kullanılarak saflaştırılan yarı akışkan faza ait FTIR analizi sonucu elde edilen spektrum.....	97
Şekil 4.26. Dondurup kurutma işlemi kullanılarak saflaştırılan yarı akışkan faza ait FTIR analizi sonucu elde edilen spektrum.....	97
Şekil 4. 27. Ferülik asite ait FTIR analiz sonucu (ChemicalBook 2017)	98
Şekil 4.28. Ferülik asidin GC-MS cihazından elde edilen kalibrasyon denklemi	99
Şekil 4.29. Ferülik asidin GC-MS analizi sonucunda elde edilen spektrum	100
Şekil 4.30. Dondurup kurutma yöntemi ile elde edilen yarı akışkan faza ait GC-MS spektrumu.....	100
Şekil 4.31. Antioksidan Aktivite deneylerine ait görüntüler	101
Şekil 4.32. ABTS testinde kullanılacak kalibrasyon denklemleri	102
Şekil 4.33. Ferülik asit analitik standardı ve saflaştırılan ferülik asidin konsantrasyon açısından karşılaştırılması	104
Şekil 4.34. Ferülik asit analitik standardının saflaştırılan ferülik asidin DPPH Test sonucu karşılaştırması	105
Şekil 4.35. Ferülik asit analitik standardının saflaştırılan ferülik asidin toplam fenolik içerik karşılaştırması	107
Şekil 4.36. <i>E. coli</i> ATCC 25921 suşu üzerinde gentamisin antibiyotiğinin oluşturduğu zon çapı	109
Şekil 4.37. <i>S. aureus</i> ATCC 29213 suşu üzerinde penisilin antibiyotiğinin oluşturduğu zon çapı	110
Şekil 4.38. SK-MEL-30 hücre hattı üzerine ferülik asit analitik standardının farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde hücre canlılığı üzerine etkinliği	111
Şekil 4.39. SK-MEL-30 hücre hattı üzerine buğday kepeği ekstraktının farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde hücre canlılığı üzerine etkinliği	112
Şekil 4.40. SK-MEL-30 hücre hattı üzerine paklitakselin farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde hücre canlılığı üzerine etkinliği	112
Şekil 4.41. SK-MEL-30 hücre hattı üzerine epirubisinin farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde hücre canlılığı üzerine etkinliği	113
Şekil 4.42. BJ hücre hattı üzerine ferülik asit analitik standardının farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde hücre canlılığı üzerine etkinliği	113
Şekil 4.43. Hücre göçü testine ait uzaklık sonuçlarının karşılaştırılması	117

Şekil 4.44. Gernik ve Siyez Unundan Elde Edilen Ekmek İçerisinde Bulunan Ortalama Ferülik Asit İçeriği	119
Şekil 4.45. Gernik ve Siyez Kepek Emeği İçerisinde Bulunan Ortalama Ferülik Asit İçeriği	120
Şekil 4.46. Siyez 6 buğdayından elde edilen un kullanılarak üretilen eriştede bulunan ferülik asit miktarı	121
Şekil 4.47. Fonksiyonel Gıdaların Eldesinde Kullanılan Malzemelerin İçerdiği Ferülik Asit Miktarı	121
Şekil 4.48. Siyez bulgurunun içeriğinde bulunan ferülik asidin çeşitler arasındaki dağılımı	122
Şekil 4.49. Gernik buğdayından elde edilen bulgurun çeşitler arasındaki ferülik asit dağılımı	122
Şekil 4.50. Siyez ve Gernik buğdaylarından elde edilen bulgur fraksiyonunda bulunan ortalama ferülik asit değeri	123
Şekil 4.51. Farklı bulgur markalarının içeriğinde bulunan ferülik asit içeriği.....	124
Şekil 4.52. Siyez buğdayından elde edilen irmiğin çeşitler arasındaki ferülik asit dağılımı	125
Şekil 4.53. Gernik buğdayından elde edilen irmiğin çeşitler arasındaki ferülik asit dağılımı	125
Şekil 4.54. Siyez ve Gernik buğdaylarından elde edilen irmikte bulunan ortalama ferülik asit değeri	126
Şekil 4.55. İrmik ekstraksiyon öncesi görüntüsü A) Gernik B) Siyez.....	127
Şekil 4.56. Farklı irmik markalarının içeriğindeki ferülik asit içeriği	127

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Buğdayın Taksonomik Sınıflandırması (USDA 2023)	4
Çizelge 1.2. Buğday Çeşitlerinin Sınıflandırılması	4
Çizelge 1.3. 100 gram buğdayın besin değeri (USDA 2023)	7
Çizelge 1.4. 100 gram buğdayın vitamin ve mineral değeri (USDA 2023)	7
Çizelge 1.5. Kepekli buğday, buğday kepeği ve rüşeym fraksiyonlarındaki biyoaktif bileşiklerin ortalama içeriği (g / 100 g) (Fardet 2010).	10
Çizelge 1.6. Siyez, Gernik ve durum buğdayının içeriğinde bulunan vitaminler ve mikro elementlerin ortalama değerler tablosu (A vitamini ppb, diğer parametrelerin birimi ppm olarak sunulmuştur.) (Tekin, Cengiz vd. 2018).	11
Çizelge 1.7. Ferülik asidin kimyasal ve fiziksel özellikleri (PubChem 2004).....	13
Çizelge 1.8. Farklı tahıl fraksiyonlarında ferülik asit miktarları (µg/g) (Ndolo ve Beta 2014)	16
Çizelge 1.9. Farklı buğday türlerinin içeriğindeki besin makro bileşenlerin ortalama içeriği (Akar, Cengiz vd. 2019), (Hidalgo ve Brandolini 2014), (USDA 2022)	23
Çizelge 1.10. Ekmeğin besin değeri (pişmiş) (ELGÜN 1982)	27
Çizelge 1.11. Kepekli ekmeğin besin değeri (pişmiş) (Özkaya 1986)	27
Çizelge 1.12. Bulgurun besin değeri (pişmemiş) (Pekmez 2018)	28
Çizelge 1.13. İrmiğin besin değeri (pişmemiş) (USDA 2021)	29
Çizelge 1.14. Eriştenin besin değeri (pişmemiş)	30
Çizelge 1.15. Enzimlerin sınıflandırılması	36
Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan Siyez ve Gernik buğday hatları	51
Çizelge 3.2. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal ve sarf malzemelerine ait bilgiler ..	51
Çizelge 3.3. Doktora tezi kapsamında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları	54
Çizelge 3.4. HPLC cihazının analitik koşulları	59
Çizelge 3. 5. İki değişkenli merkezi bileşik tasarım kullanılarak elde edilen deney planı	61
Çizelge 3.6. GC-MS cihazına ait analitik koşullar	65
Çizelge 3.7. Ferülik asidin farklı konsantrasyonlarının hazırlanması.....	70
Çizelge 3.8. Ekmek, kepekli ekmek ve erişte yapımında kullanılan diğer maddelerin gram cinsinden miktarları	75
Çizelge 4.1. Ferülik aside ait validasyon verileri.....	79
Çizelge 4.2. Buğday kepeğinden hazırlanan ekstraksiyonların döner buharlaştırıcı sonrasındaki ağırlık verileri	91
Çizelge 4.3. GC-MS cihazına ait ferülik asidin validasyon verileri	99
Çizelge 4.4. Antioksidan aktivite testinde kullanılacak olan standart Troloks verileri	101
Çizelge 4.5. ABTS test sonuçları.....	103
Çizelge 4.6. DPPH testinden elde edilen sonuçlar.....	105

Çizelge 4.7. Folin-Ciocalteu yönteminden elde edilen absorbans değerleri ve toplam fenolik madde miktarı ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	107
Çizelge 4.8. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 antimikrobiyal duyarlılık testi sonucu	108
Çizelge 4.9. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 antimikrobiyal duyarlılık testi sonucu	109
Çizelge 4.10. Hücre göçü testinde yapılan ölçüm sonuçları (alan (μm^2))	116
Çizelge 4.11. Siyez ve Gernik buğdaylarından elde edilen ekmek içeriğinde bulunan ferulik asit değeri	118
Çizelge 4.12. Siyez ve Gernik buğdaylarından elde edilen kepek ekmeğinin içeriğinde bulunan ferulik asit değeri.....	119



1. GİRİŞ

1.1. Buğday tarihçesi

İnsanlık tarihi, Paleolitik Çağ ile başlayan ve Neolitik Çağ ile son bulan tarih öncesi döneme dayanmaktadır. Neolitik Çağ, Yakın Doğu'nun Bereketli Hilal'inde, MÖ 10.000 ila 5.000 yılları arasında başlayan tarım devriminin ilk olarak gerçekleştiği dönem olduğu bilinmektedir. Bu dönemde insanlar, bitki ve hayvanları sistematik olarak yetiştirmeye başlamış, bu durum da onların göçebe yaşam tarzından yerleşik yaşam tarzına geçişine neden olmuştur. Yerleşik yaşam, çiftçilik gibi üretim faaliyetlerinin gelişmesini sağlamış, bu durumda insan topluluklarının nüfusunun ve üretim kapasitesinin artmasına yol açmıştır. İnsan topluluklarının tarih öncesi dönemden itibaren yerleşik yaşam tarzına geçişi, güvenilir içme suyu kaynaklarına erişimine bağlı olduğu bilinmektedir (Muscarella 2013). Bu nedenle, ilk yerleşkeler, akarsu, göl ve nehir gibi su kaynaklarına yakın yerlerde kurulmuştur. MÖ 4.000'li yıllara gelindiğinde, bu yerleşkeler İran, Mezopotamya, İndus Nehri vadisi, Mısır ve Hindistan ile Çin'in nehirleri boyunca genişlemiştir. Tarım faaliyetlerinin gelişmesi, tahıl tarımının daha sofistike bir hâle gelmesine yol açmıştır. Tüm bunlara neden olan ve insanlığın varoluşundan gelişmesine kadar baş aktörümüz, nimetimiz “buğday” ilk olarak Batı Asya'daki avcı-toplayıcılar, MÖ 21.000 gibi bir tarihte yabani buğdayları hasat edildiği bilinmektedir (Baines, Málek vd. 2000), (Bard 2015). Bu erken aşamada, yabani buğdaylar insanların diyetlerinin küçük bir bileşenini oluşturuyordu. Ancak, buğdayın ıslah edilebilmesi için gerekli olan genetik değişiklikler, bu erken aşamada zaten başlamıştı. Yabani buğdaylar, hasat sırasında kolayca dağılan kırılğan bir başakçık yapısına sahip olması nedeniyle, avcı-toplayıcıların buğday tanelerini toplamasını zorlaştırıyordu. Ancak, daha büyük taneler ve daha sert bir başakçık yapısına sahip mutant buğdaylar, hasat sırasında daha kolay toplanabiliyordu. Bu mutantlar, avcı-toplayıcılar tarafından tekrar tekrar ekim ve hasat yoluyla morfolojik olarak seçilerek, istemeden de olsa genetik biliminin yıkılmaz sütunlarının temellerini atmıştır (Richter ve Maher 2013), (Piperno, Weiss vd. 2004), (Arranz-Otaegui, González Carretero vd. 2018). Bu süreç, MÖ 10.000'lere kadar sürmüştür ve buğdayın günümüzde tanıdığımız, ıslaha uğramış formlarının ortaya çıkmasına yol açmıştır. Islah edilmiş buğdayda, taneler daha büyüktür ve tohumlar (başakçıkların içindeki) hasat sırasında sertleştirilmiş bir sap ile başağına bağlı kalır. Bu özellikler, tohumların daha kolay toplanması ve hasat sonrası depolanmasına imkân sağlayarak, morfolojilerine göre seçim yapılmasında işlevsel olduğu düşünülmüştür. Yüksek oranda ıslah edilmiş buğday türlerinde, başakçıklar hasat sırasında kolayca koparılamayıp ve tohumlar toprakla buluşmaması nedeniyle, ıslah edilen buğdayların doğada hayatta kalamadığını öğrenen avcı toplayıcılar, bunun nedenini ise türlerin doğal yollarla tohum dağıtma mekanizmalarını kaybetmesi olarak yorumlamışlardır. Yabani buğdaylar ise, başakçıklarının kolayca dağılması sayesinde, rüzgâr ve hayvanlar yoluyla tohumlarını yayarak doğada insanların gözetmesine ihtiyaç duymadan hayatta kalabiliyordu. Bu nedenle, ıslah edilmiş buğday türleri, yalnızca insanlar tarafından ekilmeleri durumunda doğada varlıklarını devam ettirebiliyorlar. (Fuller, Willcox vd. 2011), (Hughes, Oliveira vd. 2019). Buğdayın türleşmesinin temelinde evrimsel mekanizmaların, özellikle coğrafi izolasyonun etkisi ile farklı türlerinin oluşmasında önemli rol oynadığı aşikardır. Yabani Siyez buğdayı (*Triticum monococcum subsp. boeoticum*), Güneybatı Asya'da açık park ve bozkır ortamlarında yetişen bir tür olduğu bilinmektedir. Üç farklı ırktan oluşur ve bunlardan yalnızca biri, Güneydoğu Anadolu'ya özgü olan *T. monococcum subsp.*

boeoticum var. *boeoticum*, ıslaha alınmıştır (Zohary, Hopf vd. 2012). Şekil 1.1’de buğdayların ilk yetiştiği olarak adlandırılan bereketli hilal bölgesi gösterilmiştir.

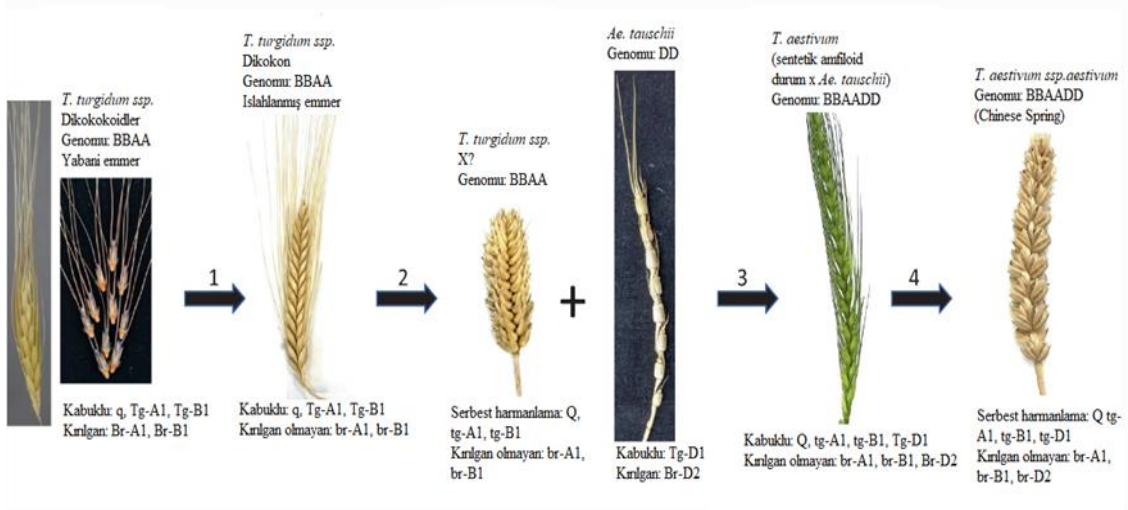


Şekil 1.1. Bereketli hilal bölgesi (Ozberk 2018)

Islaha alınmış Siyezi yabani Siyezden ayıran temel özellik, başaklarının baskı olmadan parçalanmaması, bu da onu dağılma ve üreme için insanlara bağımlı hale getirmesidir. Yabani Siyez, MÖ 10.700-9000 yılları arasında Tell Abu Hureyra ve Mureybet gibi yerlerde toplanmıştır, ancak evcil form için en eski arkeolojik kanıtlar MÖ 8800'den sonra Türkiye'nin güneyinde, Çayönü, Cafer Höyük ve muhtemelen Nevalı Çori'de bulunmaktadır. Genetik kanıtlar, yabani Siyezin bağımsız olarak birden fazla yerde ıslaha alındığını göstermektedir (Özkan, Brandolini vd. 2002). Ayrıca buğdaygillerin ait olduğu *Poaceae* familyasının Mezopotamya bölgesinde yetişmesinin uygun iklim, uygun toprak koşulları, su kaynakları ve güneş ışınlarının gelme açısı gibi faktörlerin hepsinin optimum hale gelmesi sonucunda hayat buldukları göz ardı edilmemelidir. Yabani Gernik buğdayı (*T. turgidum subsp. dicoccoides*), Siyezden daha az yaygındır ve Bereketli Hilal'in dağlık kesimlerinde bulunan kayalık bazaltik ve kireçtaşı toprakları tercih eder. Daha çeşitlidir ve ıslaha alınmış çeşitleri iki ana gruba ayrılır:

- ❖ **Kabuklu ya da kırmaz:** Harmanın başakçığının tamamını ayırdığı çeşitlerdir.
- ❖ **Serbest harmanlı:** Harmanın tek tek tanelerin ayrıldığı çeşitlerdir.

Her iki çeşit de muhtemelen tarih öncesinde vardı, ancak zamanla serbest harmanlı çeşitler daha yaygın hale geldi. Yabani Gernik ilk olarak MÖ 9600 gibi erken bir tarihte güney Levant'ta hayat bulduğu düşünülmektedir. Şekil 1.2’de yetiştiren buğdayın evrimi hakkındaki görsel sunulmaktadır.



Şekil 1.2. Yetiştirilen Buğdayın Evrimi (Feldman ve Levy 2023)'den değiştirilerek alıntılanmıştır.

1.2. Buğdayın Sınıflandırılması

Buğday, sınıflandırmada ilk ele alınan bitkilerden biri olması hiç şüphesizdir. Buğdayın başak özellikleri sınıflandırma için öne çıkmıştır ve bu duruma ek olarak dane, kavuz rengi, kılçık durumu gibi fiziksel özellikleri inceleyerek bilim adamları bir sistem oluşturmaya başlayarak sınıflandırmanın temelinı atmışlardır. Fiziksel özelliklerden biri olan başak sıklığı ise ayrıca bir parametre olarak değerlendirmeye alınmıştır. Sınıflandırma için bilim insanları farklı metodolojilerde geliştirmeye çalışarak, biyotipler ve ekotipler üzerinde de çalışmalar yapılmıştır. Bu kapsamda ekotipler, belirli bir coğrafyada kendiliğinden yetişen türler, biyotipler ise belirlenen alan içerisinde yetişen grupları tanımlar. Bunlar morfolojik temelli olup, yetersiz olduğu kanısına varılmıştır. Diğer bir bilim dalı olan sitoloji (hücre bilimi) ise buğdayların sınıflandırılmasının hücresel düzeyde çekirdeğin içinde bulunan kromozomların sayıları üzerinden yaparak daha nitel bir kapsamda inceler.

Böylece buğdaylar kromozom sayılarına göre iki ana gruba ayrılmıştır. Bunlar diploid ve allopoloid buğdaylardır. Diploid buğdaylar ($2n=14$), kromozom setinin birisi, ana türden yani (*Triticum boeoticum*) gelir. Diploid buğdayların en önemli türü, *Triticum monococcum*'dur. Siyez buğday türleri olarak bilinirler. Allopoloid buğdaylar ise ($2n>14$), kromozom setinin, iki veya daha fazla ana türden geldiği deklare edilmiştir. Allopoloid buğdayların en önemli türleri, *Triticum aestivum* ve *Triticum durum*'dur. Tüm bu bilgiler ışığında, kromozom sayıları ve genom formülleri de ayrıca kullanılarak sınıflandırmada rol oynar. Böylelikle daha detaylı ve güvenilir bir sınıflandırma hedeflenmiştir (Huang, Börner vd. 2002), (Dvorak ve Akhunov 2005). Genom formülasyonunda ana türün kromozom sayısını ifade etmek için büyük harflerden yararlanılır. Örnek verilmesi gerekirse, *Triticum aestivum* genomik olarak ifadesi AABBDD'dir. Atasal türün (*Triticum boeoticum*) A kromozom setine ve bir diğer Atasal türün (*Triticum turgidum*) BBDD kromozom setine sahip olduğunu ifade eder. Eğer bu şekilde genel olarak sınıflandırma yapılırsa buğdaylar 3 temel grup altında toplanabilir.

- ❖ **Kaplıca grubu (AA):** Bu gruptaki buğdaylar, genellikle dağlık bölgelerde yetişir ve kışa dayanıklıdır.
- ❖ **Makarnalık buğdaylar grubu (AABB):** Bu gruptaki buğdaylar, genellikle makarna yapımına daha uygundur.
- ❖ **Ekmeklik buğdaylar grubu (AABBDD):** Bu gruptaki buğdaylar, genellikle ekmek yapımında kullanılır.

Her grubun da yabancı formları, kavuzlu ve çıplak kültür formları vardır. Aslında bu türlerin biyokimyasal olarak içerik analizleri yapıldığında gluten olarak isimlendirilen protein içeriğinden de kaynaklandığı ifade edilmektedir (Peng, Sun vd. 2011) . Tür ve alttür üzerindeki çalışmaların kümülatif sonuçlarının analizi sonucunda, tetraploid ve hekzaploid gruptaki bütün buğdaylar tek tür altında toplanmış olup, daha önce tür sınıflandırılmasında kabul edilen buğdaylar ise çeşit grupları haline sokulmuştur. Tüm bu bilgilerin ışığında, buğdaylar kromozom sayılarına göre diploid ve allopoloid olarak iki grupta toplanmıştır (Luo, Yang vd. 2007). Çizelge 1.1’de buğdayın taksonomik sınıflandırılması ve Çizelge 1.2’de buğday çeşitlerinin sınıflandırılmasına yönelik bilgiler sunulmuştur.

Çizelge 1.1. Buğdayın Taksonomik Sınıflandırması (USDA 2023)

Sınıflandırma	Bilimsel isimlendirme	Türkçe açıklaması
Alem	<i>Plantae</i>	Bitkiler
Alt alem	<i>Tracheobionta</i>	Damarlı bitkiler
Üst şube	<i>Spermatophyta</i>	Tohumlu bitkiler
Şube	<i>Magnoliophyta</i>	Çiçekli bitkiler
Sınıf	<i>Liliopsida</i>	Monokotiledon
Alt sınıf	<i>Commelinidae</i>	Monokotil olup,
Takım	<i>Cyperales</i>	Papirüs giller
Aile	<i>Poaceae</i>	Buğdaygiller
Cins	<i>Triticum</i>	Buğday
Tür	<i>Triticum aestivum</i>	Ekmeklik buğday

Buğday çeşitlerinin sınıflandırılması Çizelge 1.2’de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Buğday Çeşitlerinin Sınıflandırılması

Buğday çeşidi	Tür adı
Ekmeklik buğday	<i>Triticum aestivum</i>
Siyez buğdayı	<i>Triticum monococcum</i>
Durum buğdayı	<i>Triticum durum</i>
Gernik buğdayı	<i>Triticum Dicoccum</i>

1.3. Buğdayın Morfolojisi

Buğday (*Triticum spp.*), Buğdaygiller (*Poaceae*) familyasına ait, yıllık bir bitki sınıflandırmasına dahildir. Buğday (*Triticum L.*), dünyada yetiştirilen tüm tarım ürünleri içerisinde hasat edilen alan açısından 219.153.830 ha ekiliş ile birinci, üretim miktarları açısından ise 8.084.411.568 ton ile buğday, mısır ve şeker kamışından sonra üçüncü sırada yer aldığı deklare edilmiştir (FAOSTAT 2022). Buğdayın morfolojik yapısı, türüne ve çeşidine göre farklılık gösterir. Ancak, sınıflandırma açısından genel olarak bitkilerin çoğu ile temel yapısal özelliklere sahiptir. Bu temel olarak paylaşılan fiziksel özellikleri, kök sistemi, gövde, yapraklar, başak ve tane olarak kabaca sıralayabiliriz. Buğdayın kök sistemi saçak kök sistemi olup kökler, toprağın 15-20 cm derinliğine kadar uzanabilir. Gövdesi ise silindirik veya üçgen şeklindedir. Gövdenin yüksekliği, çeşidine göre 50-150 cm arasında değişir. Buğday bitkisinin yaprakları uzun ve dardır. Yapraklar, iki kısımdan oluşur: Yaprak sapı ve yaprak ayası. Yaprak ayası, genellikle yeşil renklidir. Buğdayın başak kısmı ise, çiçeklerin oluşturduğu bir yapıdır. Başak, genellikle 10-20 cm uzunluğundadır. Başakçıklar, başağın küçük birimleridir. Başakçıklar, genellikle 2-5 çiçekten oluşur. Buğdayın tane, çiçeğin tohumudur. Tane, genellikle 5-6 mm uzunluğundadır. Tane, üç kısımdan oluşur: Kabuk, endosperm ve embriyodan meydana gelir. Kabuk, taneyi dış etkilerden korur. Endosperm, tanede bulunan besin maddelerini içerir. Embriyo, yeni bitkiyi oluşturur. Tüm bu bilgilerin ışığında morfolojik yapı, bitkilerin çevresel koşullara uyum sağlamasını ve verimli bir şekilde büyümesini sağlar (Ozberk 2018). Şekil 1.3'te tez kapsamında yetiştirilen buğdayın görseli sunulmuştur.



Şekil 1.3. Tez kapsamında ekilen buğdayların morfolojisi

Tahılların, dünyada var olmalarının evrimsel olarak nedeninin sonucu olarak ortaya çıkan canlılar ya da birlikte evrimleşerek harmoni içerisinde yaşamının oluşabilmesi için zemin hazırlayan buğdaygiller familyası beslenmede önemli bir yere sahiptir. İnsanlık tarihi boyunca karşılıklı olarak paylaşılan bilgiler sayesinde varoluşun anlaşılmasında da insanoğluna ışık olmuştur. Genetik biliminin temelleri sayesinde insanlığa birçok açıdan perspektif kazandırarak gerek gıda endüstrisi gerekse yem sanayisinde yüksek besleyiciliği sayesinde her zaman gözde bir tarım ürünü olarak insanoğlunun hemen her öğünde yoldaşı ve nimetidir.

Türkiye'de yem sanayisinde kullanılan başlıca tahıllar, buğday, darı, arpa, çavdar, yulaf, mısır ve pirinçtir. İçerik bakımından nişastanın majör olarak bulunduğu bilinmekle birlikte, protein açısından orta, selülozca oldukça az olduğu deklare edilmiştir. Buğdayın tanesinin 100 gramında bulunan besin değeri Çizelge 1.3'te verilmiştir.

Çizelge 1.3. 100 gram buğdayın besin değeri (USDA 2023)

İçerik	Miktar
Kalori	340 kcal
Su	11%
Protein	13.2 g
Karbohidrat	72 g
Şeker	0,4 g
Fiber	10,7 g
Yağ	2,5 g

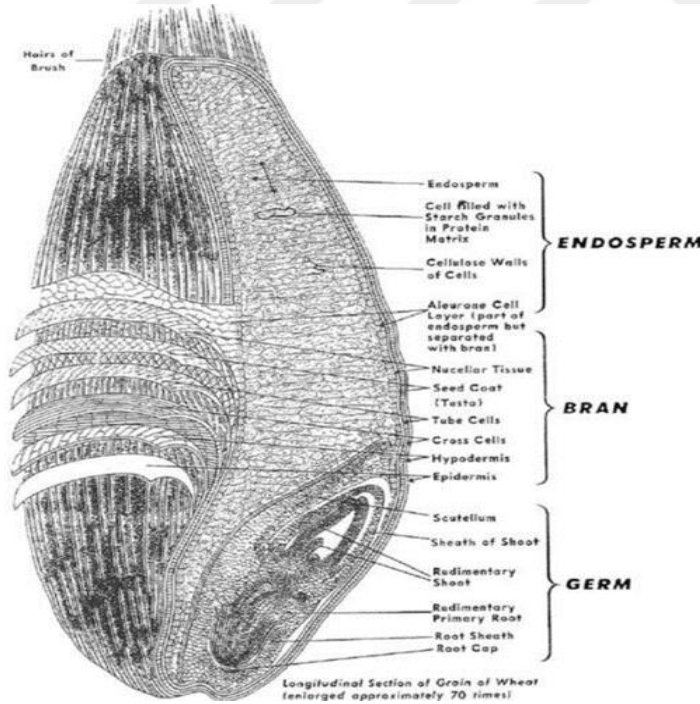
Buğdaygiller tohumlarında bulunan protein miktarı, danenin türüne göre değişmektedir. Genel olarak, nişasta içeriği arttıkça protein içeriği azalmaktadır. Buğdaygiller tohumlarında bulunan proteinlerin kalitesi yüksek olmadığı da bilinmektedir. Özellikle tavukların beslenmesinde, tek olarak kullanımının yanı sıra iyi kalitedeki protein kaynaklarıyla birlikte kullanılmalıdır. Büyükbaş hayvanlarda ise (sığır, koyun ve atlar vd.) baklagiller ile karıştırılıp yem olarak verilmesi hem hayvan sağlığı hem de zirai verim açısından pozitif etki yaratmaktadır. 100 gram buğdayın içermiş olduğu besin değeri Çizelge 1.4'te verilmiştir.

Çizelge 1.4. 100 gram buğdayın vitamin ve mineral değeri (USDA 2023)

Vitamin ve mineral	Miktar (mg)	Günlük vitamin ve mineral ihtiyacının karşılanma oranı (%)
Tiamin (B1 vitamini)	0,383	33
Riboflavin (B2 vitamini)	0,115	10
Niasin (B3 vitamini)	5,464	36
Pantotenik asit (B5 vitamini)	0,954	19
B6 vitamini	0,3	23
Folat (B9 vitamini)	38	10
E vitamini	1,01	7
K vitamini	1,9	2
Kalsiyum (Ca)	29	3
Magnezyum (Mg)	126	35
Manganez (Mn)	3,985	190
Fosfor (P)	288	41
Potasyum (K)	363	8
Sodyum (Na)	2	0
Bakır (Cu)	2,65	28

Elde edilen ortalama veriler ışığında buğdayın içeriği türe göre değişmekle birlikte, çevresel şartların etkileri, toprağın kimyasal yapısı, yağış ve güneş ışığı gibi parametrelere bağlıdır.

Buğday tanesi, üç ana bölümden oluşan karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu bölümler; embriyo, endosperm ve perikarptır. Embriyo, buğday tanesinin en küçük bölümüdür. En küçük olmasına rağmen tüm insanlık tarihine yön veren bu yaratılış mucizesi, tanenin alt ucunda yer alır ve yeni bir bitkiyi oluşturmak için gerekli olan tüm hücreleri içerir. Embriyo protein, yağ, karbonhidrat ve vitaminler bakımından zengindir. Endosperm, buğday tanesinin ambarı olarak nitelendirilebilir bu nedenle en büyük bölümüdür. Tanenin %80-85'ini oluşturur ve çimlenme sırasında embriyoyu besinlerle besler. Endosperm, nişasta, protein ve yağ bakımından zengindir. Perikarp, buğday tanesinin dış katmanıdır. Tanenin %13-17'sini oluşturur ve embriyo ve endospermi korur. Perikarp, selüloz, lignin ve pentozanlar bakımından zengindir. Buğday tanesinin kimyasal bileşimi ise bölümlerinin yapısına göre farklılık gösterir. Buğday taneleri genellikle eliptiktir. Ancak, farklı buğday türleri, neredeyse uzun, çignenmiş, ince ve küresel şekle kadar değişen tanelere sahiptir. Çekirdeğin uzunluğu ve kütlesi tipik olarak 5-9 mm ve 35-50 mg civarındadır. Buğday tanesinin ağırlığı, tanesinin boyutuna ve nem içeriğine bağlı olarak değişir. Kuru buğday taneleri, yaklaşık 35-50 mg ağırlığındadır. Nemli buğday taneleri ise, yaklaşık 50-70 mg ağırlığındadır (Poutanen, Kårlund vd. 2022), (Šramková, Gregová vd. 2009). Şekil 1.4'te buğday tanesinin görseli sunulmuştur.



Şekil 1.4. Buğday tanesinin yapısı (Marchini, Montanari vd. 2016)

Buğdayın bitkisinin stratejik olarak doğada hayatta kalmasını sağlayan diğer bir yapısı olan buğday kepeğine 1.3.1'de değinilmiştir.

1.3.1 Buğday kepeği

Buğday kepeği, buğday tanesinin dış katmanlarından biridir. Öğütme işlemi sırasında buğday tanesinden ayrılır. Kepek kısmı lif, mineraller, vitaminler ve antioksidanlar bakımından zengin bir besin kaynağıdır. Buğday kepeği, lif bakımından en zengin besinlerden biridir. Bir yemek kaşığı (7 gram) buğday kepeği, yaklaşık 2 gram lif içerir. Kepek, çözünebilir ve çözünmez lif olmak üzere iki tür lif içerir. Çözünür lif, sindirim sisteminin sağlığını desteklemeye yardımcı olur. Çözünmez lif, bağırsakların düzenli çalışmasına yardımcı olur (Shewry 2009). Kepek, ayrıca mineraller bakımından da zengindir. Bir yemek kaşığı (7 gram) buğday kepeği, yaklaşık 10 mg demir, 100 mg magnezyum ve 100 mg fosfor içerir. Memeli hayvanların buğday kepeği tüketmesi halinde, demir, magnezyum ve fosfor gibi mineralleri sağlayabildiğinden dolayı besinler arasında önemli bir yer tutar. Kepek, ayrıca vitaminler bakımından da zengindir. Bir yemek kaşığı (7 gram) buğday kepeği, yaklaşık 2 mg tiamin, 1 mg riboflavin, 1 mg niasin ve 1 mg E vitamini içerir. Tiamin, enerji üretimi için gereklidir. Riboflavin, enerji üretimi ve hücre büyümesi için gereklidir. Niasin, enerji üretimi ve sinir fonksiyonu için gereklidir. E vitamini, bir antioksidandır. Kepeğin mekanik etkilerinden bahsetmek için lif içeriği üzerinde durulması gerekmektedir. Yüksek lif içeriği gastrointestinal sistem üzerinde olumlu etkileri mevcuttur. Bu etkiler kabızlığı önleyerek bağırsak sağlığını optimize etmeye fayda sağladığı deklare edilmiştir (Yao, Gong vd. 2022). Tez kapsamındaki buğday hatlarından elde edilen kepek fraksiyonu Şekil 1.5'te gösterilmiştir.



Şekil 1.5. Tez kapsamında ekilen buğdaylardan elde edilen kepek fraksiyonu

1.3.1.1. Buğday kepeğinin antioksidan içeriği

Kepek, antioksidanlar bakımından zengin bir besin olmakla birlikte içeriğinde bulunan başlıca antioksidanlar fenolik asitler ve alkilresorsinoller olarak sınıflandırabilir. Antioksidan olan moleküller fitokimyasallar sınıfına girer ve genellikle hücre içi pH

dengede tutmaya yardımcı olur. Bununla birlikte hücre içindeki oksidan etkinlik göstererek, bir takım biyokimyasal reaksiyonları, yavaşlatma ya da bloke etme gibi negatif etkileri hücrenin yaşamı süresince nötralize etmeye çalışırlar. Antioksidan bileşikler hücre içinde doğal olarak bulunurlar (Adom, Sorrells vd. 2005). Araştırmalar, buğday tanesinin faydalı antioksidan fitokimyasalların çoğunun kepek, rüşeym/tan fraksiyonlarında bulunduğunu bildirmiştir. Bu nedenle kepek karıştırılmış un içeriği antioksidan ve lif açısından zenginleşir. Kepekli buğday ununda, kepek/rüşeym fraksiyonları toplam fenolik içeriğin %83'ünü içermektedir. Sonuç olarak, kepek fraksiyonu diğer öğütülmüş fraksiyonlardan daha yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir (Carson ve Edwards 2009). Çizelge 1.5'te kepekli buğday, buğday kepeği ve rüşeym fraksiyonlarındaki biyoaktif bileşenlerin ortalama içeriği sunulmuştur.

Çizelge 1.5. Kepekli buğday, buğday kepeği ve rüşeym fraksiyonlarındaki biyoaktif bileşiklerin ortalama içeriği (g / 100 g) (Fardet 2010).

Biyoaktif bileşikler	Kepekli buğday	Buğday kepeği	Buğday tanesi
α -Linoleik Asit (18:3n-3)	0	0,16	0,53
Sülfür bileşikleri	0,5	0,7	1,2
Toplam serbest glutatyon	0,007	0,038	0,27
Lif (AOAC olarak)	13,2	44,6	17,7
Ligninler	1,9	5,6	1,5
Oligosakkaritler	1,9	3,7	10,1
Fitik asit	0,9	4,2	1,8
Mineraller ve eser elementler	1,12	3,39	2,51
B vitaminleri	0,0091	0,0303	0,0123
E Vitamini (tokoferoller ve tokotrienoller)	0,0047	0,0095	0,0271
Karotenoidler	0,0003	0,0007	0
Polifenoller	0,15	1,10	0,38
Fenolik asitler	0,11	1,07	0,08
Flavonoidler	0,037	0,028	0,300
Lignanlar	0,0004	0,0050	0,0005
Alkilresorsinol	0,07	0,27	0
Fitosteroller	0,08	0,16	0,43

Buğday hatlarında yapılan diğer çalışmalarda ile elde edilen mineral besin maddeleri ve vitaminlerin karşılaştırılması korelasyon göstermektedir. Bu kapsamda Siyez, Gernik ve durum buğdaylarının mikro element ve vitamin tablosu Çizelge 1.6'da verilmiştir.

Çizelge 1.6. Siyez, Gernik ve durum buğdayının içeriğinde bulunan vitaminler ve mikro elementlerin ortalama değerler tablosu (A vitamini ppb, diğer parametrelerin birimi ppm olarak sunulmuştur.) (Tekin, Cengiz vd. 2018).

Parametreler	Gernik buğdayı	Siyez buğdayı	Durum buğdayı
Demir	41,72	27,44	36,85
Çinko	17,06	7,28	3,39
Bakır	2,85	1,76	14,18
Manganez	18,11	19,39	29,61
Selenyum	0,05	0,05	0,08
A vitamini	65,48	19,9	99,3
B1 vitamini	4,22	0,8	5,41
B2 vitamini	0,36	0,29	0,72
B5 vitamini	3,6	0,32	2,18
B6 vitamini	2,06	0,29	3,31

Arabinoksilan, buğday kepeğinde bulunan önemli bir antioksidan-fenolik bileşik kaynağıdır, buğday kepeğinde bulunan bir tür liftir. Arabinoksilan, alkilresorsinoller ve fenolik asitler (ferülik asit dahil) içerir. Arabinoksilan, gastrointestinal sistem içerisinde mikroorganizmalar tarafından fermentasyon yolu ile içeriğindeki fenolik asitleri bu liftten ayırır, böylelikle insan sağlığı için önemli olan antioksidan-fenolik bileşikler dolaşıma kazandırır (Liu 2007). Öte yandan Alkilresorsinoller, hücre membranlarına dahil olabilir ve in vivo olarak membran fonksiyonlarında rol oynayabilir. Böylelikle membran potansiyeli üzerinde pozitif etkileri ortaya çıkarabilir. Kepek fraksiyonu içerisinde majör olarak bulunan ve antioksidanlar, serbest radikallerin neden olduğu hasara karşı korumaya yardımcı olan ferülik asit, tam tahıllı buğday fraksiyonlarındaki fenolik bileşiklerin çoğu gibi bağlı formda bulunur. Bağlı formdaki ferülik asidin, sindirim sisteminde emilimi oldukça zordur. Bunun nedeni ferülik asit polisakkaritlere kovalent olarak bağlıdır (Bunzel, Ralph vd. 2001). Bu kapsamda tüketimden önce çeşitli işlemlerden (ısıtılı işlemler ve fermentasyon gibi) geçen kepek fraksiyonundan ferülik asit ve diğer bağlı fenoliklerin salınımını iyileştirebileceği öne sürülmüştür. Diğer çalışmalar ise ferülik asit ve diğer fenolik asitlerin, arabinoksilan gibi bağlı fitokimyasalların biyokimyasal olarak oluştuğu maddelere ayrışmasını farklı bir bakış açısı değerlendirirken meyve ve sebzelerden elde edilen fitokimyasalların aksine gastrointestinal sistem içerisinde emilimi sonucunda organ sistemleri üzerinde bölgeye özgü bir etkiye sahip olabileceklerini öne sürmektedir. Bu nedenle, buğday kepeğinin daha geniş bir diyetin parçası olarak tüketildiğinde sağlık açısından daha fazla fayda

sağlayabileceğini öne sürmektedirler (Anson, Selinheimo vd. 2009). Buğday kepeğindeki fenoliklerin çoğu sindirimi zor olan hücre duvarı materyallerine bağlı olsa da mikroflora tarafından kolonik sindirime uğradıklarını düşünülürse, potansiyel sağlık faydalarını daha yüksek oranda gösterebilirler. Dolayısıyla kişisel olarak mikrobiyota sağlığı çeşitli besinlerin sindiriminden elde edilecek biyoyararlılık açısından önem teşkil etmektedir. Bu durum sadece belirli fitokimyasallarla sınırlı kalmayıp, polifenoller ve karotenoidler gibi kimyasal bağlarla bağlı antioksidanların sindirim sistemi içerisinde emiliminin oransal başarısı ve sağlık üzerindeki etkisini önemli ölçüde etkileyebileceğini belirtmektedir. Dolayısıyla beslenme ve sağlık çalışmalarında korelasyon oluşması nedeniyle emilim oldukça önemli bir yer tutar (Saura-Calixto 2011). Örneğin, gastrointestinal sistem içerisinde enzim havuzu içerisinde bulunan hidrolaz enzim grubuna dahil esteraz enzim grubu ester bağlarını (yağ asitleri ve gliserol arasındaki bağ) bir mol su molekülü ile kimyasal tepkimeye girerek H^+ iyonu (asit) ve $-OH$ (hidroksil grubu) bulunduran alkol molekülü meydana getirerek, kepek içerisinden ferülik asidi serbest bırakır. Böylelikle sadece sindirim sistemi içerisinde değil ferülik asidi saflaştırmak içinde önemli bir basamak olarak görülmektedir.

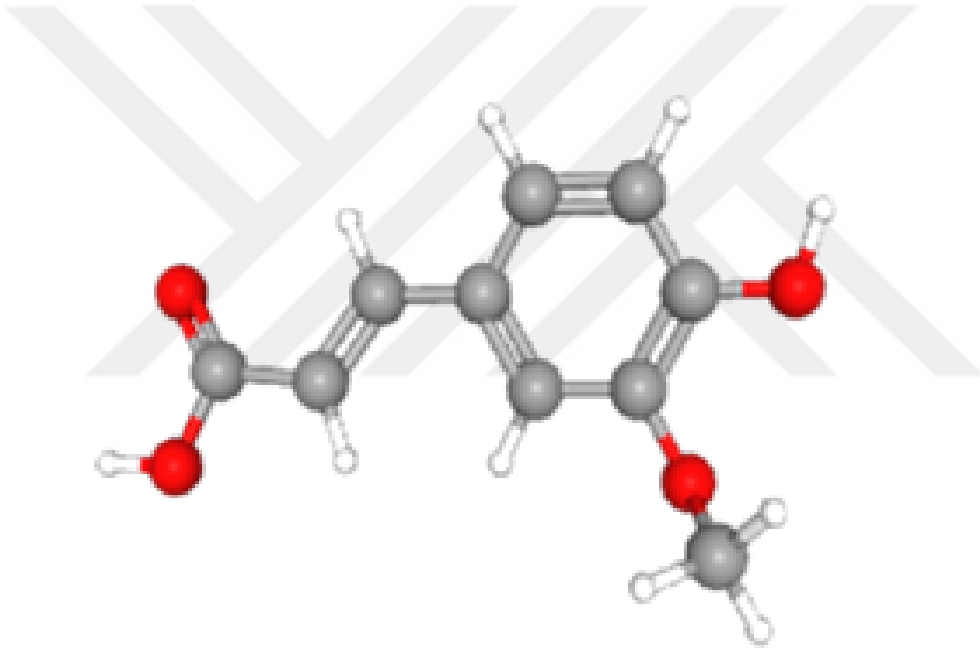
1.3.2. Ferülik asit

Ferülik asit, 4-hidroksi-3-metoksisinamik asit olarak da bilinen, bitkilerde yaygın olarak bulunan bir fenolik asittir (Bourne ve Rice-Evans 1998). $(CH_3O)HOC_6H_3CH=CHCO_2H$ formülüne sahip, bitkilerde yaygın olarak bulunan bir hidroksisinamik asittir. Adı, dev rezeneye (*Ferula communis*) atıfta bulunan *Ferula* cinsinden türetilmiştir. Fenolik bir fitokimyasal veya polifenol olarak sınıflandırılan ferülik asit, kehribar renkli bir katıdır. Ferülik asit, bitki hücre duvarlarında arabinoksilanlar gibi hemiselüloza kovalent olarak bağlanmış halde bulunur. Bu bağlar, ferülik asidin insan vücudunda emilimini sınırlayabilir (de Oliveira, Finger-Teixeira vd. 2015).

Tahıllarda en yüksek hidroksisinamik asit seviyesine sahip olan ferülik asit, meyvelerin kabuğunda, köklerde ve sebzelerin kabuklarında ve özellikle tahılların kepek fraksiyonlarında bulunur (Zhao ve Moghadasian 2008). Ferülik asit, serbest formda veya dimerize, esterleşmiş veya polisakkaritlere bağlı formda bulunabilir. Serbest formdaki ferülik asit, insan sağlığının korunmasında önemli işlevlere sahiptir. Yüksek antioksidan etkisi nedeniyle kanser ve diyabet gibi birçok hastalık riskini azalttığı belirtilmektedir. Bu bilgiler ışığında ferülik asidin antioksidan aktivitesinin yanı sıra antienflamatuvar, antikarsinojenik, antidiyabetik ve kötü kolesterol olarak ifade edilen LDL (düşük yoğunluklu protein) azalttığı birden fazla yayınlara kanıtlanmıştır (J. Gao, H. Yu vd. 2018), (Srinivasan, Sudheer vd. 2007) (Li, Wu vd. 2022) (Bumrungpert, Lilitchan vd. 2018). Tüm bu bilgilere ek olarak ferülik asidin toksisitesinin oldukça düşük olduğu bilinmektedir. Bu kapsamda yapılan bir çalışmada trombositler, beyaz kan hücreleri ve kırmızı kan hücreleri üzerine 300 ppm ferülik asit uygulandığında toksik bir etki oluşmadığı rapor edilmiştir (Choi, Park vd. 2018). Çizelge 1.7’de ferülik aside ait fiziksel ve kimyasal özellikler sunulmuştur. Şekil 1.6’da ise ferülik asidin 2 boyutlu kimyasal yapısı verilmiştir.

Çizelge 1.7. Ferülik asidin kimyasal ve fiziksel özellikleri (PubChem 2004)

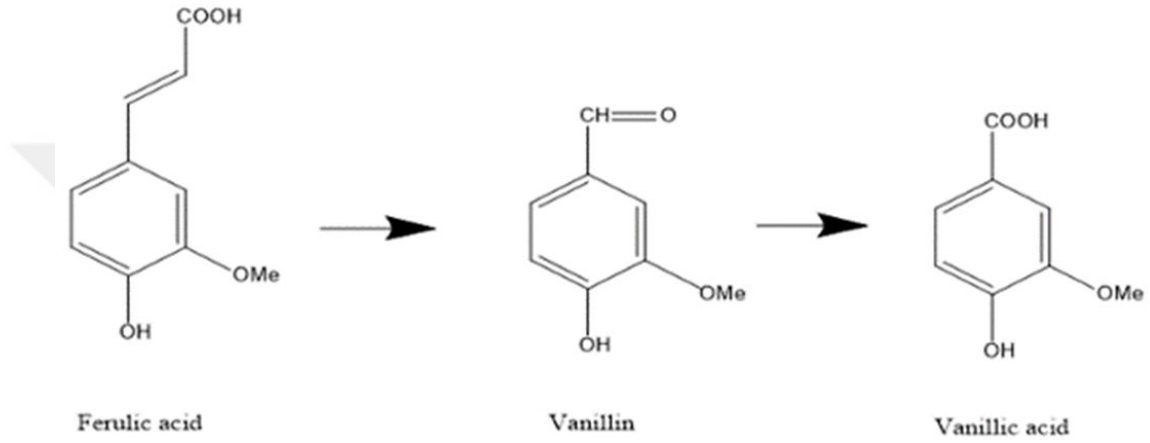
IUPAC İsmi	(E)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenol) prop-2-enoik
Kimyasal formülü	$(\text{CH}_3\text{O})\text{HOC}_6\text{H}_3\text{CH}=\text{CHCO}_2\text{H}$
Molekül ağırlığı	194,18 g/mol
Fiziksel hali	Kristalize toz (amber renkli)
Erime noktası	168-172°C (334-342 °F; 441-445 K)
Sudaki çözünürlüğü	0,78 g/L
pKa	4,61



Şekil 1.6. Ferülik asidin kimyasal yapısı (PubChem 2004)

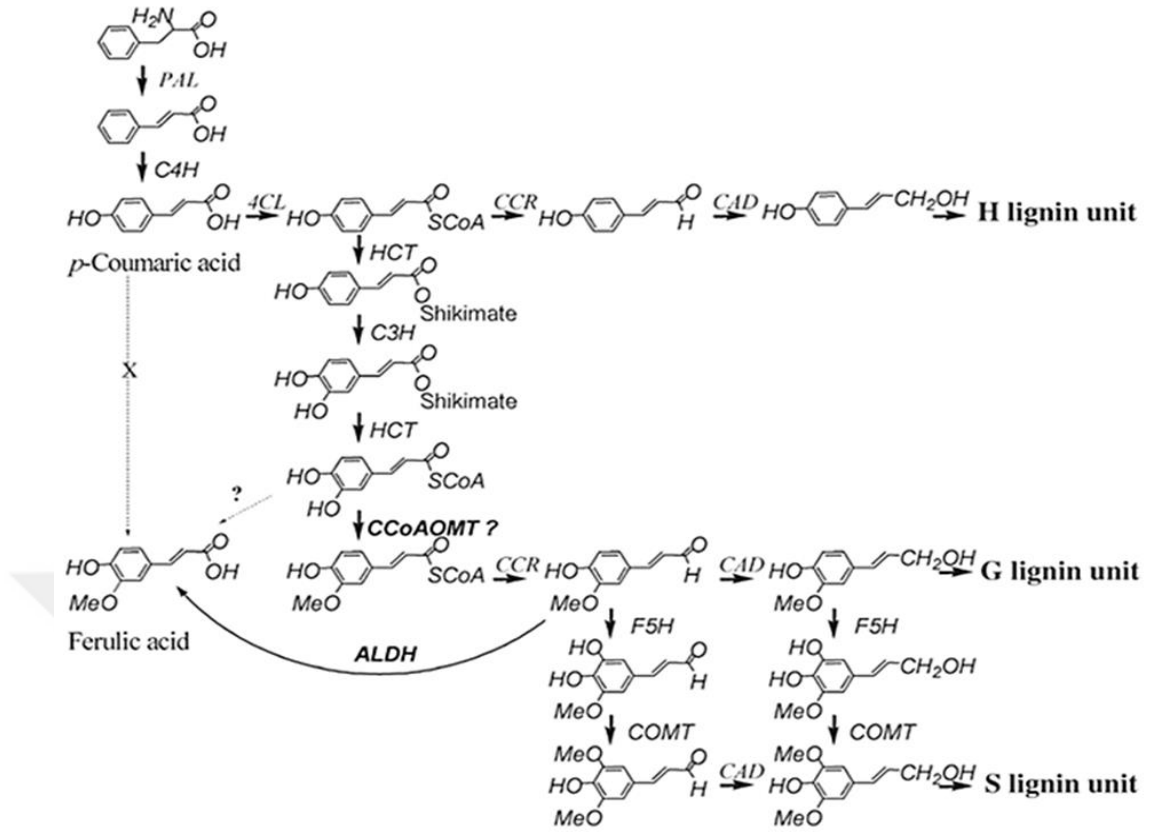
1.3.2.1. Ferülik asidin doğadaki rolü

Ferülik asit bitkilerde doğal olarak aromatik amino asitler L-tirozin ve L-fenilalanininden başlayan şikimat yolu aracılığıyla üretilir. Tirozin ve fenilalanin ilk olarak tirozin amonyak liyaz ve fenilalanin amonyak liyaz enzimi ile p-kumarik ve sinamik aside dönüştürülür. Daha sonra p-kumarik asit hidroksilasyon yoluyla kafeik aside ve ardından metilasyon yoluyla ferülik aside dönüştürülür. Ferülik asit daha sonra diğer aromatik bileşiklerle birlikte oksidasyon ve metilasyon yoluyla sinamik asidin di- ve trihidroksi türevlerine dönüştürülür. Bu bileşikler ve ferülik asit lignin oluşumunda yer alır (Kumar ve Pruthi 2014). Şekil 1.7’de ferülik asidin biyokimyasal olarak vanilik aside dönüşümü sunulmuştur.



Şekil 1.7. Ferülik asit önce vaniline sonrasında vanilik aside dönüşümü (Rosazza, Huang vd. 1995)

Ferülik asit, bitkilerin hücre duvarının bir bileşenidir ve rolü mekanik mukavemetini artırmaktır. Hücre duvarındaki artan mukavemet, pentozan zincirlerinin ve hemiselülozların çapraz bağlanmasıyla sağlanır. Bu aynı zamanda hücre duvarını çimlenme sırasında hidrolitik enzimlere karşı daha az geçirgen hale getirir. Şekil 1.8’de ferülik asidin lignin oluşumundaki rolü sunulmuştur.



Şekil 1.8. Lignin birimlerinin oluşum yolları (Chen, Srinivasa Reddy vd. 2006)

1.3.2.2. Ferülik asidin kullanım alanları ve ticari önemi

Ferülik asit, doğal olarak birçok bitkide bulunan bir fenolik asit olduğu bilinmekle birlikte antioksidan, antienflamatuar, antimikrobiyal, antikarsinojenik özelliklere sahip olduğu birden fazla çalışma ile rapor edilmiştir. Bu özellikleri nedeniyle, gıda, kozmetik, ilaç ve tarım sektörlerinde çeşitli uygulamalara sahiptir (Zhao ve Moghadasian 2008).

Gıda endüstrisinde, ferülik asidin, doğal koruyucu, antioksidan ve tatlandırıcı olarak kullanıldığı bilinmektedir. Bu kapsamda meyve ve sebze suları ayrıca tahıllara da eklenerek potansiyel sağlık etkilerinden yararlanılabilir (Ou ve Kwok 2004). Öte yandan kozmetik endüstrisinde ise ferülik asit oldukça gözde bir molekül olarak öne çıkmaktadır. Yaşlanma karşıtı ve güneş koruyucu ürünlerde kullanıldığı bilinmektedir. Özellikle ürünlerin içerisinde ağırlığınca %0,5 ile %1 gibi düşük oranlarda etkinlik göstermesi ve toksisitesinin düşük olması nedeniyle geniş bir pazara sahiptir (Zdunska, Dana vd. 2018). Sağlık sektörünün bel kemiği olan ilaç endüstrisinde ise ferülik asit, kanser, alzheimer, kalp hastalığı ve diyabet gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde potansiyel bir ajan olarak halen araştırılmaktadır ve elde edilen verilerde etkinliği kanıtlanmış ilaçlar ile kombinasyonun umut vaat ettiği konusunda raporlar mevcuttur (Alam 2019), (Sri Balasubashini, Rukkumani vd. 2003), (Zhang, Cui vd. 2021), (Sgarbossa, Giacomazza vd. 2015). Bu kapsamda kendisine ayrı bir pazar açan ferülik asit ilaç sektöründe de kendisinden oldukça bahsettirmektedir. Dünyayı ayakta tutan diğer bir ekonomik alan olan tarım endüstrisinde ise ferülik asit, bitkileri hastalıklara ve zararlılara karşı korumak için kullanılmakla birlikte sürdürülen çalışmalarda ise tarım ilaçlarının içine eklenerek,

zirai ilaç kategorisinde ferülik asit sayesinde çevreye daha duyarlı ürünler sunmayı hedefledikleri bilinmektedir (dos Santos, Ferrarese vd. 2008), (He, Ma vd. 2019), (Gan, Hu vd. 2017).

Tüm bu bilgiler ışığında ferülik asit, önemli bir endüstriyel ürün olduğunu ifade edebilmekle birlikte küresel pazar büyüklüğünün 2022 yılında 67,8 milyon ABD doları olduğu deklare edilmiştir. Dünya ferülik asit pazarının 2022 yılından 2032 yılına kadar %6,74 oranında büyümesi hedeflenerek toplam pazarın 130,1 milyon ABD doları olacağı öngörülmektedir (Sights 2023).

1.3.2.3. Tahıllarda ferülik asit içeriği

Fenolik asitler, bitkilerde yaygın olarak bulunan ve antioksidan özelliklere sahip olan bileşiklerdir. Tahıllarda, serbest ve bağlı formlarda bulunabilirler. Serbest fenolik asitler, perikarpın dış tabakasında bulunurken, bağlı fenolik asitler hücre duvarlarına ester bağı ile bağlanmıştır. Bu bağlı bileşikler hücre duvarları matrisinden serbest bırakmak için asit veya baz hidrolizi gereklidir. Ferülik asit, tahıllarda en yaygın bulunan fenolik asitlerden biridir. Genel olarak tahıl tanelerinin dış tabakasında yoğunlaşır ve en düşük seviyede endosperm tabakasında bulunur. Yapılan çalışmalarda kullanılan tahıllar arasında mısırın tüm fraksiyonlarda en yüksek ferülik asit içeriğine sahip olduğu deklare edilmiştir. Öte yandan buğday kepeğinin içeriğinde en yüksek seviyede bulunan ferülik asit, hücre duvarı polisakkaritlerinin yapısal bir ögesidir ve çoğu hücre duvarı yapılarına kovalent olarak bağlıdır. Tahıllardaki serbest ferülik asit miktarının %0,1-0,5 olduğu, çoğunun polisakkaritler ve sterollerle bağlı olduğu belirtilmektedir (Gani, Wani vd. 2012), (Ndolo ve Beta 2014).

Buğday kepeği, iyi bir ferülik asit kaynağıdır ve kepektaki ferülik asit hücre duvarlarındaki hemiselülozlara esterleşmiştir. Buğday tanesi kuru maddede yaklaşık 0,8-2 g/kg ferülik asit içerir ve bu buğdaydaki toplam polifenollerin %90'ına karşılık gelir. Bu nedenle ferülik asidin buğday antioksidanlarının bir belirteci olarak kullanılacağı bildirilmektedir (Gani vd. 2012). Ferülik asit içerikleri bakımından tahıllar mısır, buğday, yulaf ve pirinç olarak sıralanabilir. Tahıl kepekleri arasında mısır kepeği en yüksek düzeyde ferülik asit içerir. Buğday kepeği, çavdar ve yulaf kepeğine göre daha fazla ferülik asit içermektedir. Bununla ilgili Çizelge 1.8'de farklı tahıl fraksiyonlarında ferülik asit miktarları sunulmuştur.

Çizelge 1.8. Farklı tahıl fraksiyonlarında ferülik asit miktarları (µg/g) (Ndolo ve Beta 2014)

Çeşitli fraksiyonlar	Buğday	Yulaf	Mısır	Arpa
Tam tahıl	689	367	1788	731
Perikarp	3517	2758	18400	2807
Alöron	3365	748	4836	1329
Tohum	823	571	863	565
Endosperm	111	98	169	119

1.3.2.4. Ferülik asit miktarının fermentasyon, çimlendirme ve öğütme ile ilişkisi

Fonksiyonel gıda bileşenlerinin çeşitli yöntemlerle eldesi, tahıllarda bulunan ferülik asidin bileşimini ve biyoyararlanımı konusunda değişiklikler olduğunu vurgulamıştır. Bundan dolayı bu bölümün ifade edilmesi ferülik asidin saflaştırılması konusunda yol gösterici olacağını hedeflemiştir. Tahıllarda serbest ferülik asit miktarı düşüktür. Ancak, fermentasyon, çimlenme ve pişirme gibi işlemler sırasında bağlı formdan serbest forma dönüşerek ferülik asidin biyoyararlılığın artması besinleri daha sağlıklı hale getirebilir. Böylelikle fermentasyon, tahıllardaki ferülik asit içeriğini artırabilir. 48 saatlik fermentasyon süresi boyunca pizza hamurundaki serbest ferülik asit içeriğinde %75-130 oranında bir artış tespit edilmiş olup, bu artış maya veya diğer mikroorganizmalardan üretilen enzimler tarafından çözünmeyen bağlı veya çözünür konjuge ferülik asidin enzimatik hidrolizinin bir sonucu olabildiği deklare edilmiştir (Moore, Luther vd. 2009). Ferülik asidin biyoyararlanımının tahıl kepeği ve lifinin gıda üretimi sırasında fermentasyon ve enzim işlemleriyle işlenmesiyle artırılabilirliğini göstermiştir (Napolitano, Costabile vd. 2009). Çavdar kepeğinin maya fermentasyonunda da ferülik asidin bağlı formdan serbest forma geçişinin arttığı ifade edilmiştir (Katina, Laitila vd. 2007). Tüm bu bilgilerin ışığında, diğer bir işlem olan çimlenme ise tahıllardaki ferülik asit içeriğini de etkileyebileceği düşünülmüştür. Diğer bir araştırmada buğday çimlendikten sonra ferülik asit içeriklerinde herhangi bir değişiklik olmadığını veya sınırlı bir azalma olmadığını, ancak çimlenmenin işlenmesi aşamasında ferülik asit miktarında önemli bir artış olduğunu gözlemlemiştir (Yang 2001). Mekanik bir işlem olan öğütme ise tahıllardaki ferülik asit içeriğini azaltabileceğini ortaya koymuştur. Öğütme işleminden sonra kırmızı ve beyaz pirinçte toplam antioksidan azalmasına neden olduğunu ve bu azalmanın öğütme derecesine bağlı olarak %51-87'ye kadar çıkabileceğini belirtmiştir. Ayrıca, öğütmenin ferülik ve sinapik asitte de bir azalmaya neden olduğunu gözlemlemişlerdir (Finocchiaro, Ferrari vd. 2007). Pişirmenin tahıllardaki ferülik asit içeriğini nasıl etkilediği konusundaki araştırmalar henüz kesin değildir. Bazı çalışmalar, pişirmenin ferülik asit içeriğini artırabileceğini göstermiştir. Diğer çalışmalar ise, pişirmenin ferülik asit içeriğini azaltabileceğini veya değiştirmedeğini göstermiştir. Bu tez çalışmasında fonksiyonel gıda elde edilecek olup, bu kıyaslama bulgular ve tartışma kısmında değinilecektir. Tahılların işlenmesinin ferülik asit içeriğini ve biyoyararlanımını etkileyebileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bu nedenle, tahılların işlenmesinin ardından ferülik asit içeriğinin biyoyararlanımı ve salınım gibi etkilerinin daha iyi anlaşılması gerekmektedir.

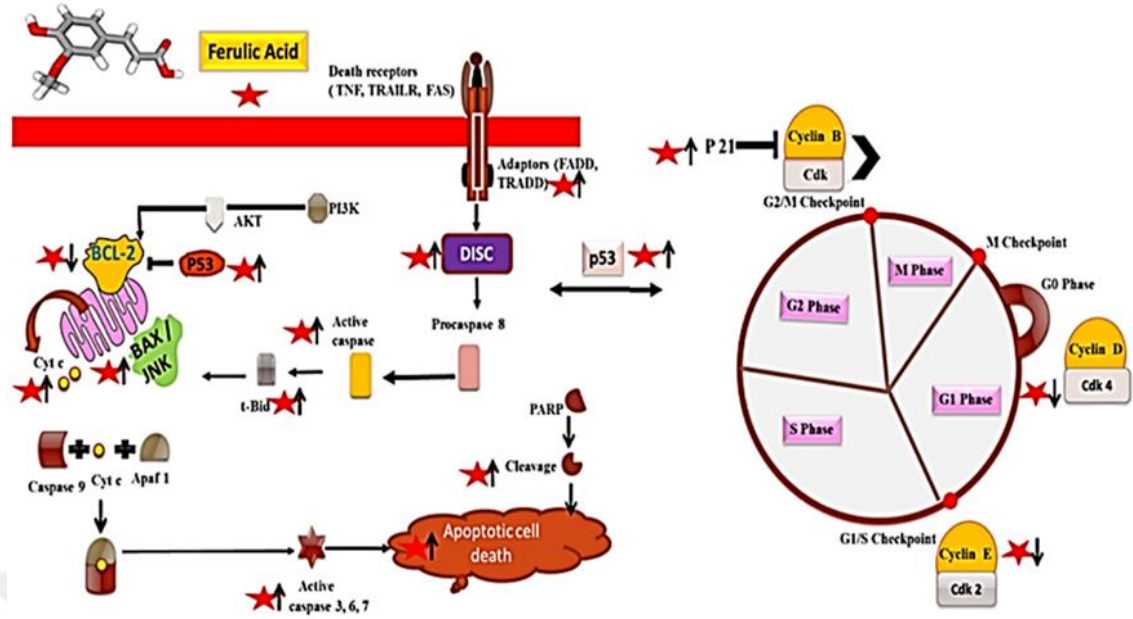
1.3.2.5. Ferülik asidin insan sağlığı üzerine etkileri

İnsan vücudu, ateroskleroz ve kanser gibi ciddi hastalıklara neden olan serbest radikallere ve reaktif oksijen türlerine karşı hassastır (Young ve Woodside 2001), (Ou ve Kwok 2004). İnsan vücudundaki serbest radikaller iç ve dış faktörlerinden etkilenmektedir. Birçok hastalığa neden olan süperoksit ve hidroksilin memeli organizmada biyokimyasal tepkimeler sonucunda ara ya da son ürün olarak ortaya çıkmaktadır. Yüksek antioksidan etkiye sahip ferülik asit, hidrojen peroksit, süperoksit, hidroksil radikali ve nitrojen dioksit gibi serbest radikaller için yüksek radikal tutucu etkiye sahiptir. Hidroksil radikallerinin 250 mg/L konsantrasyonda %92,5'ini süpürmektedir (Ou ve Kwok 2004). Nitrojen dioksit radikalının nitrat ve nitrit metabolizmasında üretilen toksik bir madde olduğu bilinmektedir. Ferülik asit, sinapik

asit ve kafeik asit dahil olmak üzere hidroksisinnamik asit türevlerinin nitrojen dioksit radikallerini temizlediğini göstermiştir (Zhang, Wei vd. 2003).

Diyabet tip 1 ya da tip 2 türü birçok insanın muzdarip olduğu bir hastalıktır. Oksidatif stres, hiperglisemi ve serbest radikallerin aşırı üretimi ile karakterizedir. Oksidatif stres, antioksidanlar ve pro-oksidanlar arasında bir dengesizliğe yol açarak hücrel hasarla sonuçlanabilir. Ferülik asit, pankreastaki serbest radikallerin miktarının azalmasına ve nötralize edilmesine yardımcı olur. Streptozotosine antibiyotiğine maruz kalan kişilerin pankreasında serbest radikaller miktarının arttığı bilinmektedir. Streptozotosin alkilleyici antineoplastik ajandır. Pankreasta insülin üreten beta hücreleri için zararlıdır. Bu bilgiler ışığında ferülik asidin streptozotosinin toksisitesini azalttığına dair veriler bulunmaktadır. Ferülik asit pankreastaki oksidatif stresi ve dolayısıyla toksisiteyi azalttığından, bunun artan beta hücre dokusu nedeniyle beta hücrelerinin daha fazla insülin salgılamasına yardımcı olup olamayacağı tartışılmıştır. Bu da karaciğerdeki dokudan glikoz kullanımının artmasına neden olarak kan glikoz seviyesini düşürmesi düşünülmektedir (Kumar ve Pruthi 2014).

Kanserin ana nedenlerinden biri vücuttaki serbest radikallerin varlığıdır. Ayrıca bu bilgiye ek olarak tirozin kinaz aktivasyonunun dengesizliğinin kanseri tetiklediği bilinmektedir. Bu nedenle, antioksidanların diyetle alımı, ölmesi gereken ya da üremesini engellemesi gereken hücreler için büyük bir potansiyele sahiptir. Bunun sebebi tersine evrim olarak düşünülebilir. Hiçbir hücre ölmek istemez ve hücre siklusunun dışına bir şekilde çıkan hücre ya da hücre topluluğu yaşamak için her türlü biyokimyasal reaksiyonları değiştirip, programlı hücre ölümünden (apoptosis) kaçmayı hedefler. Böylelikle serbest radikalleri nötralize etmek yerine glikoneogenesis gibi işlemlerde enerji elde eder. Bunun temel sebebi ise apoptosisten kaçmak için sitokrom C'nin uyarılmasıdır. Dolayısıyla mitokondri ile ilişkisini keserek, hücrenin enerji metabolizmasını değiştirir. Bu warburg etkisi olarak bilinir (Liberti ve Locasale 2016). Tüm bunlara ek olarak aşırı derece de antioksidan ya da oksidan üreterek diğer hücrelere saldırarak kanserin yayılmasına sebebiyet verebilir. Antioksidanların genel olarak DNA hasarına sebebiyet vermesinin bir nedeni tirozin kinaz inhibitörü olmalarından kaynaklanmaktadır. Hücre içerisinde oksidan ve antioksidan bileşikler her zaman dengede olması gerekir ki tüm biyokimyasal tepkimeler harmoni içerisinde çalışmasını amaçlar. Organizmanın sağlığı açısından en önemli parametrelerden biri bu dengedir. Bu kapsamda ferülik asidi etkili bir antikanser ajan yapan ana özellik, reaktif oksijen türlerinin (ROS)'u temizleme ve sitoprotektif enzimleri uyarma yeteneğidir. Bu, lipid peroksidasyonunu engelleyerek, belirli proteinleri inaktive eder, hücrel membranlar arasındaki iletişimin bozulmasını engeller ve DNA tek iplik kopmasını azaltır. Ferülik asit ayrıca karaciğerdeki UGT's enzim aktivitesini yükselten detoksifikasyon enzimlerini de uyarır. Bu da kansere neden olan maddelerin detoksifikasyonunu iyileştirerek gastrointestinal kanserin engellenmesine neden olur. Ferülik asit ayrıca kolon kanseri ve meme kanserinin önlenmesine yardımcı olur ve bağışıklık savunmasını artırarak radyoterapi ve kemoterapinin yan etkilerini azalttığı da doğrulanmıştır (Srinivasan vd. 2007). Şekil 1.9'da ferülik asidin sinyal yolları ile ilişkileri sunulmuştur.



Şekil 1.9. Hücre döngüsünün bozulması ve apoptoza yol açan sinyal süreçlerinde ferülik asidin moleküler hedefleri. Bcl-2-ilişkili X proteini (BAX), BCL-2 antagonisti/katili (BAK), tümör baskılayıcı p53 (p53) ve sitokrom kompleksi (CYCS), B-hücreli lenfoma 2 (Bcl-2), Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP), Fas-ligand (FASL) ve TNFR-ilişkili ölüm alanı (TRADD) (Singh Tuli, Kumar vd. 2022).

1.3.2.6. Ferülik asidin cilt sağlığı üzerindeki etkileri

Ciltte UV kaynaklı hasarın başlıca nedeni ROS oluşmasıdır. Cilt UV radyasyonuna maruz kaldığında fotonlar ciltteki yapısal moleküllerle reaksiyona girerek tekli oksijen gruplarının açığa çıkmasına neden olur. Oksijen, nükleik asit, yağ ve proteinlerin oksidasyonu ile sonuçlanan ve nihayetinde cildin yaşlanmasının hızlanmasına ve cilt kanserine yol açabilen tüm oksijensiz radikal kaskadını aktive eder. Ferülik asit bir UV emici olarak kullanılabilir. Ferülik asit, cilt damarlarındaki hemoglobinin içeriğinin artmasından kaynaklanan UVB kaynaklı yıkım karşıtı iyi bir koruyucudur. Bunun nedeni tirozine olan fiziksel benzerliğidir (Saija, Tomaino vd. 2000). Benzerlik nedeniyle tirozinin melanin üretimini engeller. Ferülik asit tek başına veya C vitamini ve E vitamini ile kombinasyon halinde güneşe maruz kalma sonucu oluşan radyasyon hasarına karşı yaklaşık 4-8 kat koruma sağlar (Kumar ve Pruthi 2014).

Ferülik asit ve kafeik asit topikal foto koruyucular olarak birçok çalışmaya konu olmuştur. Ferülik asit ve kafeik asidin her ikisi de pH seviyeleri 3 ve 7.2 olan bir su çözeltisi içerisinde çözerek, antioksidan cildi UV'nin oluşturacağı oksidatif hasardan koruyup koruyamayacağını incelemiştir. Bu minvalde tedavinin etkili olabilmesi için antioksidanın stratum corneum'a nüfuz ederek cildin daha derin deri katmanlarına ulaşması gerekmektedir, yani antioksidanın cilt tarafından emilimi için en uygun pH seviyesi hayati önem taşıması ifade edilmiştir ve ayrıca pH seviyesinin emilim üzerinde bir etkisi olmadığını ve ferülik asit kafeik asitten daha iyi emildiğini göstermiştir. Bunun açıklamasının Ferülik asidin kafeik asitten daha yüksek bir lipofilikliğe sahip olması

olduğu düşünülmektedir ki bunun da deriye nüfuz etme sürecinde önemli bir rol oynadığı deklare edilmiştir (Saija vd. 2000).

1.3.2.7. Ferülik asidin tarımsal alanda kullanımı

Ferülik asit, gıda unsurları üzerinde bakteriyel kontaminasyonunu önler. Örneğin yeşil bezelyenin rengini korumak için kullanılmıştır. Ayrıca yeşil çay ve muzun renk değişimini de önlediği deklare edilmiştir. Öte yandan balıkçılık alanında kırmızı deniz çipurasında astaksantin ve luteinin foto oksidasyonuna karşı koyduğu da bildirilmiştir. Balıklarda büyümeyi de artırabilir. Bunun nedeni normetanefrine olan fiziksel benzerliğidir, bu da hipofiz bezindeki somatotropin üzerindeki uyarıcı etkiyi yansıttığı anlamına gelir. Böylelikle balıklarda irileşme gözlemlenmiştir (Kumar ve Pruthi 2014).

1.3.2.8. Ferülik asidin gıda ve içeceklerde kullanımı

Ferülik asidin radikal gruplara sahip olması nedeniyle birçok farklı moleküle dönüştürülebilir. Bu duruma ekonomik olarak verilebilecek en değerli bileşik vanilin gibi değerli aromatik aldehittir. Vanilin, bazı yiyecek ve içeceklere daha fazla lezzet vermek için kullanılan bir tatlandırıcı bileşiktir. Vanilin aynı zamanda aroma maddesi olarak kullanılan vanilik asidi de dönüştürülebilir (Rosazza vd. 1995).

Gıda ve içeceklerdeki toplam vanilin tüketiminin küresel olarak yılda yaklaşık 12.000 ton olduğu hesaplanmaktadır. Vanilin ayrıca ilaç endüstrisinde L-DOPA (1-3,4-dihidroksifenilalanin) ve metil L-DOPA üretimi için temel molekül olarak kullanılmaktadır. Kimyasal olarak üretilen vanilin yaklaşık 1000 \$/kg değerindedir (Buranov ve Mazza 2009). Bu, vanilin üretimine daha düşük maliyetle kimyasal bir alternatifin endüstriyel sentezinin kazançlı bir pazar olduğu anlamına gelir. Ferülik asit ayrıca bira, şarap, soya sosu ve meyve sularını tatlandırmak için kullanılan 4-vinilfenole dönüştürülebilir, 4-Vinilfenol ayrıca polimerik malzemeler üretmek için radikal polimerizasyon yoluyla polimerize edilebilen bir monomer olarak da işlev görebilir (Rosazza vd. 1995).

1.3.2.9. Ferülik asidin antikarsinojenik özellikleri

Ferülik asidin antikarsinojenik etkisi, çeşitli kanser türlerinde yapılan çalışmalarda kolon kanseri, meme kanseri, prostat kanseri ve pankreas kanseri gibi kanser türlerinin gelişimini ve ilerlemesini önlemeye yardımcı olabileceği gösterilmiştir (Chen, Huang vd. 2015), (Kumar ve Pruthi 2014) (Zhang, Wu vd. 2017). Hela ve Caski insan servikal kanser hücreleri üzerinde konsantrasyona bağlı bir şekilde önemli bir inhibisyon etkisine sahip olduğunu göstermiştir (J. Gao vd. 2018). Ayrıca ferülik asit, MMP-9 mRNA ekspresyonunu azaltarak hücre invazyonunu inhibe etmiştir. Ferülik asit, Hela ve Caski hücrelerinde p53 ve p21 gibi hücre döngüsü ile ilgili proteinlerin ekspresyonunu indükleyerek hücre apoptozunu ve hücre siklusundaki G0/G1 fazının durmasını indüklemiş ve siklin D1 ve siklin E seviyelerini azaltmıştır. Ayrıca ferülik asit, LC3-II, Beclin1 ve Atg12-Atg5 gibi otofaji ile ilişkili proteinleri doza bağlı bir şekilde azaltmıştır (Eroğlu, Seçme vd. 2015), (Markiewicz-Żukowska, Naliwajko vd. 2013), (Hirata, Murakami vd. 2005), (Karthikeyan, Kanimozhi vd. 2011), (CHEN, LIU vd. 2000). Hücre döngüsü tümörigenez (tümör oluşumu) ile yakından ilişkilidir. P53 proteini ve hücre döngüsünü üzerinde farklı etkileri olan moleküllerde dahil olmak üzere birçok tümör

önleyici faktör hücre döngüsünde yer alır (Evan ve Vousden 2001). Herhangi bir şekilde iç yada dış etkililerle ekspresyon seviyeleri değişmiş P21 ve P53 genleri, hücre döngüsü ve apoptozda rol oynar (CHEN vd. 2000). P21, hücre döngüsü ilerlemesinin G1 ve S aşamalarının bir kontrolörüdür ve bu nedenle P21'in aşırı ekspresyonu, problemli hücrelerde hücre döngüsü durmasını onarmak için çalışır (Mikule, Delaval vd. 2007). Ayrıca, P53 proteini hücre gelişmesi, DNA onarımı ve hücre apoptozunda önemli rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. P53 geninin ekspresyonun azalması, bozulmuş DNA sayısının artması nedeniyle tümörigenez riski artacaktır (Schärer ve Lggo 1992). P53 genindeki işlev kaybı mutasyonu tümörün gelişimine katkıda bulunur ve CD44 ekspresyonu genellikle P53 ve CD44 promotörlerinin bağlanmasıyla inhibe edilir. Bu nedenle, mutant P53 tümör hücrelerinde artmış bir CD44 ekspresyonu tespit edilmiştir. Çeşitli tümör türlerinde kanser kök hücreleriyle (CSC'ler) ilişkili hücre yüzeyi belirteçlerinden biridir (Yoshida, Fuchimoto vd. 2012), (Yoshida ve Saya 2014).

Ferülik asit hücre içerisinde P53 ve P21 protein düzeylerini arttırdığı rapor edilmiştir. Böylelikle hücre döngüsünün kontrolörlerinin uyarılmasına destek olduğu düşünülmektedir (Jinhua Gao, Hui Yu vd. 2018). Yapılan diğer bir çalışmada ise Ferülik asit, kas hücrelerinin yapısını iyileştirirken tümör boyutunu ve hacmini azaltabileceği, bu da ESC'ye karşı antineoplastik aktiviteye sahip olabileceğini düşündürmektedir. Daha ileri araştırmalar, ferülik asidin HIF-1 α 'yı ekspresyon seviyesini azalttığı ve antioksidan proteinler Nrf2 ve HO-1'in ekspresyonunu artırdığını ortaya koymuştur. Ek olarak, ferülik asit proliferasyon belirteçleri cMyc ve siklin D1 ekspresyonunu azaltır ve hücrel düzenleyiciler mTOR ve STAT3'ü aşağı regüle eder. Böylelikle kanserli hücrenin bölünmesini ve bölünme hızını azaltabileceği deklare edilmiştir (Yoshida vd. 2012).

1.3.2.10. Ferülik asidin mikrobiyolojik özellikleri

Ferülik asidin antimikrobiyal aktivitesi, çeşitli mikroorganizmalara karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Bu mikroorganizmalar arasında bakteriler, mantarlar, virüsler ve protozoa bulunur. Bu aktivite mikroorganizmanın türüne, konsantrasyonuna ve pH değerine bağlı olarak değişebilir. Bu kapsamda yapılan çalışmalardan birinde ferülik asidin test edilen bakterilere karşı *P. aeruginosa* için 500 $\mu\text{g/mL}$, *E. coli* için 1500 $\mu\text{g/mL}$, *S. aureus* için 1750 $\mu\text{g/mL}$ ve *L. monocytogenes* için 2000 $\mu\text{g/mL}$ minimum inhibitör konsantrasyonu belirlenmiştir. Verilere göre antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Ferülik asit, bakterilerin özellikle membranlarında hidrofobik etkileşim değişiklikleri, negatif yüzey yükünün azalması ve hücre zarlarında yırtılmalar veya gözenek oluşumunun meydana gelmesine neden olarak ve bunun sonucunda temel hücre içi bileşenlerin hücre dışına sızması yoluyla zar özelliklerinde (yük, hücre içi ve dışı geçirgenlik ve fizikokimyasal özellikler) geri dönüşü olmayan değişikliklere yol açmıştır (Borges, Ferreira vd. 2013). Diğer bir çalışmada ise kinolon bazlı antibiyotikler, siprofloksasin ve gemifloksasin ile ferülik asidi sinerjistik etkisinden faydalanarak mikroorganizma içerisinde ROS üretiminin artmasına, GSH tükenmesine ve *A. baumannii* elimine edildiği rapor edilmiştir (Ibitoye ve Ajiboye 2019).

1.4. Buğdayın Genetiği ve Islahı

Buğday, dünyada en yaygın olarak yetiştirilen bitki türü olup, dördüncü en önemli tahıl ürünüdür (FAOSTAT 2022). Islah, buğday bitkisinin veriminin artırılmasından ve tane kalitesi, biyotik streslere karşı direnç gibi diğer birçok özelliğin geliştirilmesinden sorumlu bir alandır. Ancak, tahılın küresel talebini karşılamak için önümüzdeki yıllar içinde ortalama genetik olarak elde edilen tüm pozitif kazancın iki katına çıkarılması gerektiği düşünülmektedir. Bu nedenle, buğday ıslah programlarında iyileştirilmiş stratejilerin geliştirilmesi gerekmez. Uygulanmasına yönelik çabaların devamlılığı gerekmekte ve biyoteknolojik geliştirmelerle paralel ilerlemesi elzemdir (Venske, dos Santos vd. 2019). Bu nedenle buğday ıslah programının beş aşaması şunlardır: (1) sorunun tanımlanması ve hedefin belirlenmesi, (2) yararlı genetik varyasyonun tanımlanması ve dahil edilmesi, (3) akrabalı yetiştirme ve elde edilen varyantlar arasında seçim, (4) seçilen pozitif özelliklere sahip hatların değerlendirilmesi ve (5) çeşit salımı. Bu beş aşama, buğdayın kendine özgü biyolojisi ve genetik çeşitliliği kullanılarak açıklanmaya çalışılmaktadır (Baenziger 2016). Dolayısıyla devam eden çalışmalara maddi desteğin yanı sıra yeni bakış açıların, yeni yöntemlerin ve genetik biliminin giderek derinleşmesi bitki ıslahı bilimini daha da ileriye götürmesi aşikardır. Ancak bu kapsamda sadece bitki ıslahının değil ekolojik olarak sonuçların değerlendirilmesi elzemdir. Buğday için yaygın ıslah yöntemleri şunlardır: (1) kitle seleksiyonu, (2) saf hat ıslahı, (3) soy ağacı ıslahı (pedigree), (4) toplu seleksiyon, (5) tek tohum veya çift haploid ıslahı (bu iki yöntem benzer amaçlara sahiptir) ve (6) geriye melezleme yöntemleri şeklinde sıralanabilir. Her bir akrabalı yetiştirme ve seleksiyon yönteminin detaylı bir laboratuvar analiz bölümü vardır. Genel olarak, ıslah yöntemleri popülasyonun nasıl melezlendiği ve seçimin nasıl yapıldığı konusunda farklılık gösterir. Buğday ıslahının bu kısa açıklamada temel amaç ülkemizde buğday ıslahının ne kadar değerli ve önem arz ettiğini vurgulamaktır. Ekonomik açıdan ülkemize katkı sağlamak ve nüfusun gıda ihtiyacını karşılamak için, çeşitli kimyasallar kullanılması ile bitkileri, toprağı ve havayı kısacası doğayı enfekte etmek yerine karbon ayak izimizi genetik manipülasyonlar ile düşürebileceğimiz bir gerçektir. Ayrıca doğada, bir yetiştiricinin gözlemlemek istediği tüm özelliklerin aynı mevsimde ortaya çıkması maalesef nadirdir. Örneğin, birçok hastalık enfeksiyon için yüksek nem ve/veya yağmur gerektirir. Ancak, kuraklığa tolerans için seleksiyon düşük nem ve düşük yağış gerektirir. Bu nedenle, aynı ıslah alanını kullanarak hastalık direnci ve kuraklığa toleransı aynı anda seçmek çok zor olması tahmin edilemez değildir. Elbette ıslahçılar tohumları ayırabilir ve bunları hastalık ve kuraklığa eğilimli ortamlara ekebilir, ancak bu ıslah fidanlıklarının boyutunu iki katına çıkaracak ve daha da fazla emek ve kaynak harcaması olarak geri dönecektir. Eğer seleksiyon için tek bir ana ıslah fidanlığı kullanılıyorsa, bu sahadaki çeşit seleksiyonu sırasında bazı mevsimlerin yüksek hastalık enfeksiyonuna uygun olması ve direnç için seleksiyona izin vermesi, diğer mevsimlerin ise kuraklığa tolerans için seleksiyona uygun olması mümkündür. Kümülatif olarak bir çeşidin hastalıklara karşı direncini ve kuraklığa karşı toleransını belirlemek önem arz eder. Soyağacı yöntemi günümüzde buğday ıslahı için hala çok yaygındır, ancak bu durum tarım gelişmesinden önce mekanizasyonun daha gelişmediği durumlarda kullanıldığı bilinmektedir (Baenziger 2016).

1.5. Buğday Türleri ve Farklılıkları

Buğdaylar arasındaki temel farklılıklar aslında her organik bireyde olduğu gibi genomik farklılıklardan ileri gelmektedir. Buna ek olarak gen ekspresyonunun ifadesinde sonra meydana gelen proteinin, sonrasında uğrayacağı post translasyonel modifikasyonlar sitoplazma içerisinde türe özgü mekanizmalar doğrultusunda görevlerini yerine getirmesi ve organizmanın yaşamsal fonksiyonlarını sağlamasına neden olmaktadır. Bu bilgiler ışığında buğdaylar da ihtiyaca göre isimlendirilmiştir. Ekmeklik buğday çoğu buğday ürünüde kullanılır ve "sert" veya "yumuşak" (protein içeriğine bağlıdır), "kışlık" veya "ilkbaharlık" (ne zaman ekildiğine bağlıdır) ve "kırmızı" veya "beyaz" (tanelerin rengine bağlıdır) olarak tanımlanır. Sert buğday, yumuşak buğdaya kıyasla daha fazla protein (gluten dahil) içerir. Kışlık buğday güney bölgelere, ilkbahar buğdayı ise kuzey bölgelere ekilir. Kırmızı buğday, beyaz buğdaya göre daha güçlü aromalı tanenler içerir. Durum buğdayı ise, yüksek protein içeren sert bir buğdaydır ve genellikle makarna ve kuskus için kullanılır (Kumar, Yadava vd. 2011). Bu bağlamda Çizelge 1.9'da farklı buğday türlerinin makro bileşiklerinin kıyaslaması aşağıda verilmiştir.

Çizelge 1.9. Farklı buğday türlerinin içeriğindeki besin makro bileşenlerin ortalama içeriği (Akar, Cengiz vd. 2019), (Hidalgo ve Brandolini 2014), (USDA 2022)

100 gramda bulunan (g)	Siyez buğdayı	Gernik buğdayı	Durum buğdayı
Protein	18,2	17,38	16,93
Yağ	2,48	2,8	2,47
Karbohidrat	65,54	66,32	71,24
Fiber	8,7	12,2	7,3
Nişasta	65,2	66,8	70,2

1.5.1. Siyez buğdayı

Siyez buğdayı, küçük buğday veya kaplıca buğdayı olarak da isimlendirilir. *Triticum monococcum* L.subsp. *monococcum* (2n = 2x = 14) tarımın temelini atan ürünlerinden biridir. Yüzyıllar boyunca Orta Doğu, Orta Asya, Avrupa ve Kuzey Afrika'da farklı isimler altında yetiştirilmiştir. Günümüzde Ülkemiz başta olmak üzere, Kafkasya, Avrupa ve Fas'ın izole, marjinal topraklarında yetiştirilen Atasal bir üründür (Nesbitt ve Samuel 1998). Bazı coğrafyalarda verimliliği nedeniyle kullanımı azalmıştır ancak zararlılara ve hastalıklara karşı direnci, yüksek besin değeri ve çeşitli makro besin öğelerinden fakir topraklarda kabul edilebilir verim sağlama yeteneği nedeniyle yeniden gözde buğday olma adayıdır (Padulosi 1996). Siyez ve diğer tek yıllık tahılların tarımını kolaylaştıran önemli özelliklerden biri de bitkilerin büyük ölçüde kendi kendine tozlaşıyor olmasıdır. Böylece Siyezin arzu edilen özellikleri, daha küçük taneleri ve parçalanmasının kolay oluşu her dönem insanoğlunun ilgisini çekmiştir. Bununla birlikte yabani bitkilerle çapraz döllenme riski daha az olması nedeniyle kendisini korumada öne çıkmaktadır (Brown, Jones vd. 2009).

Bereketli Hilal'in kuzeyinden itibaren Siyez buğdayı ekimi Kafkasya, Balkanlar ve Orta Avrupa'ya kadar yayılmıştır. Siyez buğdayı, diğer ıslah edilmiş bir buğday türü olan Gernik buğdayına göre daha serin iklimlerde daha yaygın olarak yetiştirilmiştir. Orta Doğu'da Siyez ekimi MÖ 2000'lerde Gernik buğdayı lehine azalmaya başlamıştır. İtalya, Güney Fransa ve İspanya'da Siyez ekimi hiçbir zaman yaygın olmamıştır. Siyez, Orta Çağ boyunca ve 20. yüzyılın başlarına kadar Kuzey Avrupa'nın bazı bölgelerinde yetiştirilmeye devam etmiştir (Zohary ve Hopf 2000). Şekil 1.10'da Tez çalışması kapsamında ekilen Siyez buğdayı gösterilmiştir.



Şekil 1.10. Tez çalışması kapsamında ekilen Siyez buğdayı

Siyez buğdayı düşük verimlidir ancak diğer buğday çeşitlerinin yetişemeyeceği fakir, kuru ve marjinal topraklarda hayatta kalabilmesi insanoğlu için bulunmaz bir nimet olmasının yanı sıra daha dayanıklı bireyler için gen havuzu sağlar. *T. monococcum*, dünya çapında hekzaploide aktarılan bir kök pası direnç geni olan Sr21'in kaynağıdır (Roelfs, Singh vd. 1992). Ayrıca sarı pas için bir direnç geni olan Yr34'ün de kaynağıdır (Baranwal 2022). Diğer bir örnek verilmesi gerekirse tuzluluğa tolerans geni makarnalık buğday olarak bilinen *Triticum durum* veya *Triticum turgidum* Siyez buğdayından aktarılmıştır (Munns, James vd. 2016). Diğer eski buğday çeşitlerinde olduğu gibi Siyez buğdayı da taneleri harmanla birlikte tohum kabuğundan (glume) ayrılmadığı ve bu nedenle kabuğu tohumdan ayırmak zor olduğu için "kapalı buğdaylar" olarak gruplandırılır. Siyez buğdayı da gluten içerir ancak modern kırmızı buğdaylardan daha yüksek oranda protein ve daha yüksek oranda yağ, fosfor, potasyum, piridoksin ve beta-karoten içerdiği için daha besleyici olarak kabul edilir (Stallknecht, Gilbertson vd. 1996).

1.5.2. Gernik buğdayı

Gernik buğdayı veya kabuklu buğday bir kılçıklı buğday türüdür. Gernik bir tetraploiddir ($4n = 4x = 28$ kromozom). Evcilleştirilmiş türleri *Triticum turgidum subsp. dicoccum* ve *T. t. conv. durum'dur*. Yabani bitki *T. t. subsp. dicoccoides* olarak adlandırılır. Yabani ve evcil formlar arasındaki temel fark, yabani bitkinin olgunlaşmış tohum başının parçalanması ve tohumu yere saçması, evcilleştirilmiş Gernik buğdayında ise tohum başının sağlam kalması ve böylece insanların tahılı hasat etmesini kolaylaştırmasıdır (Weiss ve Zohary 2011). Gernik, Siyez buğdayı ile Yakın Doğu'da evcilleştirilen ilk ürünlerden biriydi. Antik dünyada yaygın olarak yetiştirilmiştir, ancak günümüzde Avrupa ve Asya'nın dağlık bölgelerinde oldukça seyrek (Jaradat 2019). Şekil 1.11'de Tez çalışması kapsamında ekilen Gernik buğdayı gösterilmiştir.



Şekil 1.11. Tez çalışması kapsamında ekilen Gernik buğdayı

Gernik buğdayı günümüzde dağlık bölgelerde kendi halinde yaşayabilen Atasal bir değerdir. Değeri, fakir topraklarda iyi verim sağlama kabiliyetinde ve ıslak alanlarda yaygın olan kök pası gibi mantar hastalıklarına karşı direncinde yatmaktadır. Gernik ülkemiz başta olmak üzere Fas, İspanya, Çekya ve Slovakya sınırındaki Karpat dağları, Arnavutluk, İsviçre, Almanya, Ermenistan, Yunanistan ve İtalya'da yetiştirilmektedir. ABD'de de özel bir ürün olarak yetiştirilmektedir. Etiyopya'da geleneksel bir gıda bitkisi olan ve nispeten az bilinen bu tahıl, beslenmeyi iyileştirme, gıda güvenliğini artırma, kırsal kalkınmayı teşvik etme ve sürdürülebilir arazi bakımını destekleme potansiyeline sahiptir (Council 1996).

1.6. Fonksiyonel Gıda Üretimi

Fonksiyonel gıdalar, düzenli tüketildiğinde temel besin değerlerinin ötesinde sağlık üzerinde faydalı etkileri olan, endüstriyel olarak işlenmiş veya işlenmemiş doğal gıdalardır (Granato, Barba vd. 2020). Günümüzde tüketiciler giderek daha fazla güvenilirliğinden emin, doğal, Genel Olarak Güvenli (GRAS) statüsüne sahip ve sürdürülebilir ve/veya ekolojik açıdan sağlam teknolojiler kullanılarak üretilen ürünleri aradığımız bir gerçek. Bu nedenle “fonksiyonel gıda”, sosyal ve bilimsel alanlarda giderek daha popüler hale gelen bir terim olduğundan endüstri, tüketici sağlığına ek faydalar sağlayan ürünler sunabilecek bir sektörün geliştirilmesine sürekli yatırım yaptığı bilinmektedir. Burada, ürünlerin sağlık açısından faydalarını ortaya koymak için “işlevsel” olarak etiketlenecek gıdalara yönelik klinik araştırmaların yapılması gerektiğini vurgulamak önemlidir (Granato vd. 2020).

1.6.1. Ekmek

Ekmek, tüm kültüründe önemli bir yere sahiptir. Birçok kültürde ekmek, kutsal bir gıda olarak kabul edilir. Kahvaltı, öğle yemeği, akşam yemeği ve atıştırmalık olarak tüketilebilir. Ekmek, ayrıca çeşitli yemeklerde kullanılır. Çeşitli Şekillerde üretilen en yaygın ekmek türleri arasında beyaz ekmek, tam buğday ekmeği, çavdar ekmeği ve mısır ekmeği yer almaktadır. Ekmek, ayrıca çeşitli malzemelerle zenginleştirilebilir. Örneğin, yulaf, kepekli tahıllar, meyveler, sebzeler ve kuruyemişler eklenebilir. Bileşiminde maya, tuz, un ve hayatın başlangıcı olan sudan ibarettir (ELGÜN 1982). Hamur daha sonra yoğrulur ve belirli bir süre mayalanır ve son olarak pişirilir. Ekmek nötr bir kokuya sahiptir, ucuzdur ve kolaylıkla temin edilebilir, doyurucu ve besleyicidir. Ülkemizde Türk Gıda Kodeksi ekmek üretimi için gerekli olan teknik, hijyenik uygunluk, üretim şartları, saklanması, transportu ve pazarlanmasını nasıl olması gerektiğini 4 Ocak 2012 tarihinde 28163 sayılı tebliğ ile açıklamıştır. Böylelikle halk sağlığını korumak başta olmak üzere ekmek kalitesinin de koruma altına almıştır. Çizelge 1.10'da pişmiş bir ekmeğin ortalama besin değeri sunulmuştur.

Çizelge 1.10. Ekmeğin besin değeri (pişmiş) (ELGÜN 1982)

Besin Değeri	100 gramda içerik
Kalori	256 kcal
Karbohidrat	52,8 g
Lif	3,4 g
Protein	8,1 g
Yağ	0,9 g
Potasyum	125 mg
Kalsiyum	18 mg
Demir	1,3 mg

1.6.2. Kepekli ekmek

Kepekli ekmek, tam buğday unu veya diğer kepekli tahıl unlarından yapılan bir tür ekmektir. Kepekli ekmek, tam buğdayın tüm öğelerini içerir, yani endosperm, kepek ve tohum. Bu, kepekli ekmeği, beyaz ekmekten daha yüksek lif, vitamin ve mineral içeriği ile daha besleyici hale getirir. Çizelge 1.11’de ortalama bir kepekli ekmeğin besin değeri sunulmuştur.

Çizelge 1.11. Kepekli ekmeğin besin değeri (pişmiş) (Özkaya 1986)

Besin Değeri	100 gramda içerik
Kalori	216 kcal
Karbohidrat	44,54 g
Lif	6,5 g
Protein	6 g
Yağ	1,5 g
Potasyum	256 mg
Kalsiyum	235 mg
Demir	5 mg

1.6.3. Bulgur

Bulgur, buğdayın temizlenmesi, kaynatılması, kurutulması ve tanelerinin kabuğunun soyularak öğütülmesi ile elde edilen bir tahıl ürünüdür. Bulgur, kepekli buğdaydan yapıldığı için lif bakımından zengindir. Ayrıca, protein, karbonhidrat, B vitaminleri ve demir bakımından da zengindir. Türk Gıda Kodeksinin belirlediği parametreler doğrultusunda deklare etmiş olduğu 2016/49 No'lu tebliğ ile belirlidir ve kalitesi kontrol altındadır. Bulgur, lif bakımından yüksek olduğu için, tokluk hissini artırmaya ve kilo vermeye yardımcı olabildiği konusunda çalışmalar mevcuttur. Ayrıca, bulgur, B vitaminleri bakımından zengin olduğu için, enerji seviyelerini korumaya yardımcı olabilir (Tacer Caba, Boyacioglu vd. 2012). Pişirme yöntemlerinde oluşan değişiklikler bulgurun içeriğindeki fenolik bileşiklerin değiştiğini göstermiştir. Bunun temel sebeplerinden birinin ısının uygulanma şeklinin materyal içerisindeki kovalent bağlı olan fenolik bileşiklerin serbest forma geçmesinin biyoyararlılığı arttırabileceği ifade edilmiştir (Tekin, Babacan vd. 2022). Çizelge 1.12'de bulgurun ortalama besin değeri sunulmuştur.

Çizelge 1.12. Bulgurun besin değeri (pişmemiş) (Pekmez 2018)

Besin Değeri	100 gramda içerik
Kalori	338 kcal
Karbohidrat	70,2 g
Lif	8,2 g
Protein	12,2 g
Yağ	0,86 g
Potasyum	328,5 mg
Kalsiyum	14,8 mg
Demir	1,3 mg
Fosfor	226 mg

1.6.4. İrmik

İrmik, durum buğdayının öğütülmesiyle elde edilen bir tahıl ürünüdür. İrmik, çoğunlukla kuskus, makarna ve tatlı puding yapımında kullanılan iri öğütülmüş durum buğdayına verilen isimdir. İrmik terimi aynı zamanda diğer buğday çeşitlerinin ve bazen de diğer tahılların (pirinç veya mısır gibi) iri öğütülmesini belirtmek için de kullanılır. İrmik tanecikleri 125-140 mikrometre büyüklüğünde, sarı renkte, parlak ve köşelidir. İrmik yapımında genellikle sert buğday kullanılır (Fois, Campus vd. 2019). İrmik besin değeri Çizelge 1.13'te verilmiştir.

Çizelge 1.13. İrmiğin besin değeri (pişmemiş) (USDA 2021)

Besin Değeri	100 gramda içerik
Kalori	360 kcal
Karbohidrat	72,83 g
Lif	3,9 g
Protein	12,68 g
Yağ	1,05 g
Potasyum	186 mg
Kalsiyum	17 mg
Demir	1,23 mg
Fosfor	136 mg

1.6.5. Erişte

Erişte, un, tuz ve su karışımından yapılan, ince çubuk veya kare şeklinde kesilerek elde edilen bir makarna çeşididir. Erişte, genellikle kurutulmuş olarak satılır ve çeşitli yemeklerde kullanılır. Dünyanın birçok ülkesinde farklı şekillerde yapılmaktadır. Orta Asya, özellikle Türki ülkelerde "kesme" adı ile bilinir. Aynı zamanda Çin ve Türki ülkelerde tüketilen 'lagman' aşına benzerlik gösterir. Ülkemizde ise erişte, genellikle un, tuz ve su ile yapılır. Hamur yoğrulduktan sonra ince çubuk veya kare şeklinde kesilir ve kurutulur. Kurutulmuş erişteler, çeşitli yemeklerde kullanılır. Erişte, çorba, makarna, pilav ve çeşitli yemeklerde kullanılır. Erişte çorbası, erişte pilavı, erişteli güveç, erişteli börek gibi yemekler eriştenin kullanıldığı yaygın yemeklerden bazılarıdır. Erişte, besin değeri yüksek bir gıdadır. Erişte, karbonhidrat, protein, lif ve bazı vitamin ve mineraller bakımından zengindir (Keskin ve Kaplan Evlice 2022). Pişmemiş eriştenin besin değerleri Çizelge 1.14'te verilmiştir.

Çizelge 1.14. Eriştenin besin değeri (pişmemiş)

Besin Değeri	100 gramda içerik
Kalori	384 kcal
Karbohidrat	71,3 g
Lif	3,3 g
Protein	14,2 g
Yağ	4,4 g
Potasyum	244 mg
Kalsiyum	35 mg
Demir	1,9 mg

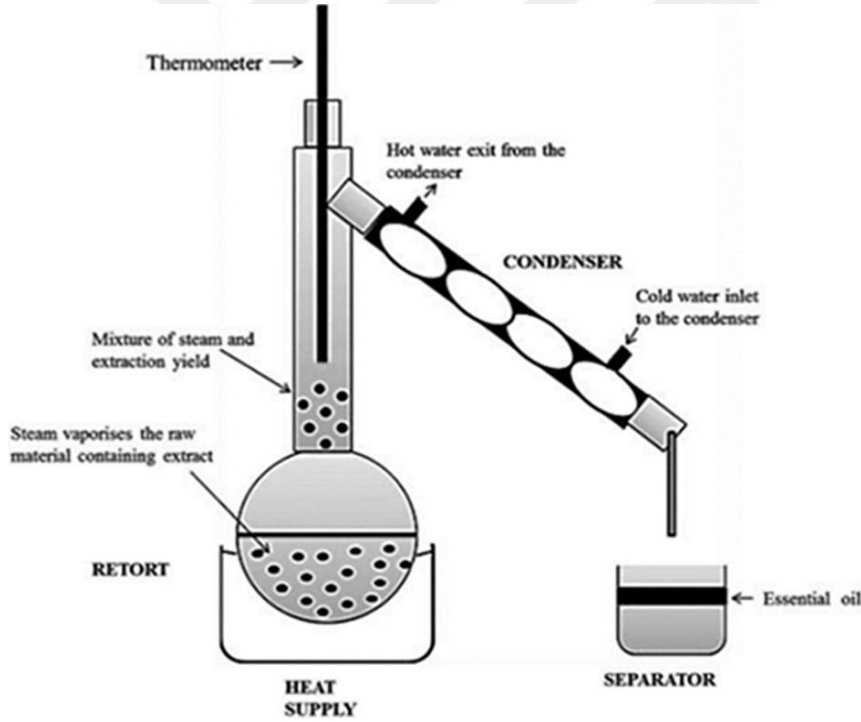
1.7. Ferülik Asidin Buğday Kepeğinden Ekstraksiyon Yöntemleri

Buğday kepeği, buğdaydan un elde edilirken ortaya çıkan ve düşük maliyetli bir yan üründür. Geleneksel olarak hayvan yemi olarak kullanılır, ancak günümüzde kepeğin farklı alanlarda kullanılması amacıyla yeni katma değerli uygulamalar aranmaktadır. Buğday kepeğinde, majör olarak bulunan ferülik asit, oldukça değerlidir. Gıda, sağlık ve kozmetik endüstrilerinde yaygın olarak kullanılır. Ferülik asit buğday kepeğinde ester ve eter bağları aracılığıyla polisakkaritlerle kovalent bağlanarak lignin/fenolik-karbohidrat kompleksleri oluşturur (Buranov ve Mazza 2009). Bu nedenle ferülik asidin bu komplekslerden salınması ve saflaştırılması zordur. Ferülik asit, ferüloil esteraz enzimi kullanılarak ya da 50-70°C'de seyreltik (0,1-4M) NaOH çözeltisi kullanılarak alkali hidroliz yoluyla serbest bırakılabilir (Buranov ve Mazza 2009). Ferülik asidin hidrolizattan saflaştırılması, ekstrakt içerisinden ferülik asidin izole edilmesini etkileyen bileşen (mumsu bileşenler, oligomerik hemiselülozlar) içerdiğinden dolayı zordur. Ferülik asidin enzimatik çözeltiden nasıl ekstrakt edileceğine dair yaklaşımlardan biri de aktif kömür kullanımıdır. Ferülik asidi saflaştırmanın bir başka yolu da ferülik asidi adsorbe etme kapasitesi yüksek olan anyon makro gözenekli reçine kullanmaktır (Ou ve Kwok 2004). Ester ve eter bağı içeren hücresel yapılar, hücre duvarından uzaklaştırabilmesi ve hemiselülozlarla birlikte, hidrolizata %30 etanol konsantrasyonunda çöktürülebilir. Bu yöntemle ferülik asit etanolde çözünürken, diğer bileşenler hidrolizatta çözünmez halde kalabilir (Buranov ve Mazza 2009). Bununla birlikte, bu saflaştırma işlemleri endüstriyel kullanım için pahalıdır, bu nedenle ferülik asidin hidrolizattan nasıl saflaştırılacağına dair alternatif basit ve daha ucuz bir yola ihtiyaç duyulmaktadır. İşlenmiş tahıl atıklarından ferülik asit elde etmek için 0,5M NaOH ve 50°C'de alkali hidroliz kullanmış ve 3,91mg/g ferülik asit elde etmiştir ki bu doktora tezinde yapmış olduğum çalışmadan daha fazladır (Buranov ve Mazza 2009). Yapılan diğer bir çalışmada ilk adımda metanol, ikinci ve üçüncü adımda sodyum hidroksit kullanarak oda sıcaklığında üç aşamalı ekstraksiyon işlemi kullanmışlardır. Tüm aşamalardan elde edilen ferülik asit verimi sırasıyla 3,36mg/g olmuştur. Buhar patlaması tekniğini kullanılmış ve bu işlemin uygulanmadığı birinci ve ikinci ekstraksiyon adımlarından birkaç kat daha yüksek verim elde edildiği deklare edilmiştir. Aksine,

üçüncü adımdan sonra, verimler buhar patlaması işlemi olmadan elde edilenden daha düşük olmuştur (Wu, Li vd. 2017).

1.7.1. Hidrodistilasyon yöntemi ile ferülik asit eldesi

Hidrodistilasyon temel olarak buhar ile distilasyon yönteminin modifiye edilmiş hali olup, aromatik bir bitkinin içeriğinden yağlı bileşikleri almak için tercih edilen yöntemlerden biridir. Bu kapsamda yağ fraksiyonunun ekstrakte edileceği bitki materyali bir süre suda bekletilir ve ardından karışımın ısıtıldığı ve uçucu maddelerin buharla taşındığı, yoğunlaştırıldığı ve ayrıştırıldığı bir buharlı damıtma çeşidi olarak ifade edilebilir. Bu işlemde kaynama işlemi sırasında bitki materyaline su buharı nüfuz eder. Sıcak su buharının etkisiyle uçucu yağ bitki dokusundaki yağ bezlerinden serbest kalır. Su ve yağın buhar karışımı, geri soğutucu yardımıyla yoğunlaştırılır. Yoğunlaşan su separatör yardımı ile farklı bir balon da toplanırken, yağ fazı farklı bir alanda toplanır. Bir miktar özüt içeren su bakımından zengin faza "hidrosol" denir. Bu yöntem aynı zamanda çok basit ve ucuzdur (Gao, Yani vd. 2014). Bu yöntem kullanılarak elde edilen ferülik asit miktarı oldukça düşük olup (Xie, Lu vd. 2009), tez çalışmasında da kullanılmamıştır ancak bu yöntem diğer özütleme yöntemlerinin temeli oluşturması ve kıyaslama yapılması nedeniyle yer verilmiştir. Şekil 1.12’de hidrodistilasyon düzeneği gösterilmiştir.

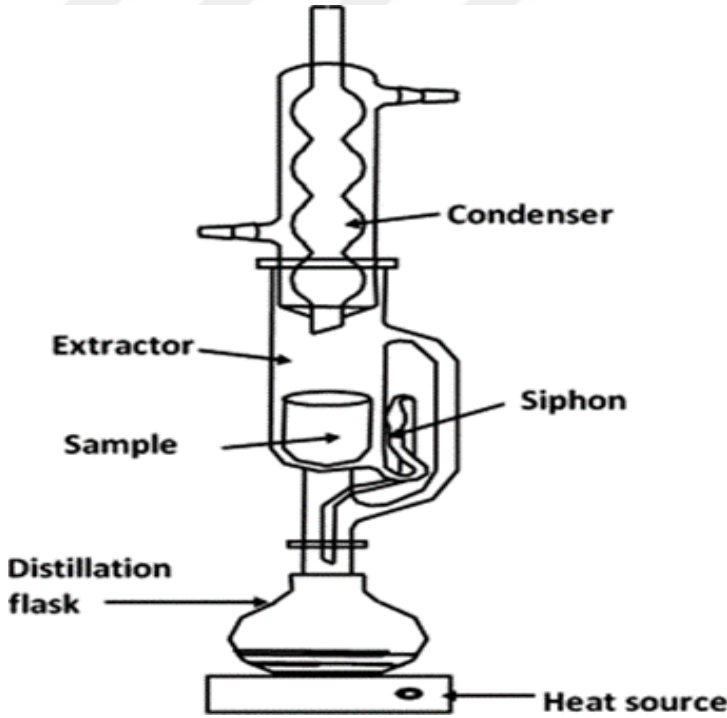


Şekil 1.12. Hidrodistilasyon düzeneği

1.7.2. Soxhlet yöntemi ile ferülik asit eldesi

Soxhlet ekstraksiyonu sadece fitokimyasalların ekstraksiyonu için bir teknik olarak değil, aynı zamanda daha yeni ekstraksiyon tekniklerini karşılaştırmak için bir referans olarak da hizmet etmektedir (Tatke ve Jaiswal 2011). Soxhlet ekstraksiyonu, bitkilerin ekstraksiyonu için bir Soxhlet aparatının kullanılmasını içerir. Numune bir

yüksük tutucuya yerleştirilir ve bu tutucu bir damıtma şişesinden alınan çözücü ile yavaş yavaş doldurulur. Sıvı taşma seviyesine ulaştığında, bir sifon yüksük tutucudaki çözüneni aspire ederek alikuotu damıtma şişesine geri taşır ve ekstrakte edilen analitleri yığın sıvıya taşır. Bu işlem ekstraksiyon işlemi tamamlanana kadar devam eder. Sistem, çözücü numune boyunca yeniden toplanırken sürekli çalışır. Bu yöntemle ekstraktlar filtrelenerek izole edilir ve çözücü bir döner buharlaştırıcıda düşük basınç altında belirli sıcaklıklarda uzaklaştırılır (Lope Pihie, Zakaria vd. 2012). Bu ekstraksiyon tekniği, doğrudan damıtma şişesine uygulanan bir ısı kaynağı aracılığıyla yüksek sistem sıcaklığını (çözücü kaynama noktasında) koruyabilir. Bu yöntem aynı zamanda çok basit ve ucuzdur. Soxhlet ekstraksiyonları, ekstraksiyon işlemi için gereken süre ve fazla miktarlarda gereken çözücü ile sınırlıdır. Elde edilen yağ bazlı özütten çözücülerin uzaklaştırılması pahalı ve çevresel sorunlara neden olabilir. Genel olarak, bileşiğin kaynama noktasının çözücününkinden daha düşük olduğu unutulmaması gereken bir parametredir. Ekstraksiyon işlemi genellikle uzun süreler boyunca çözücünün kaynama noktasında gerçekleştirildiğinden, hedef bileşiklerin termal ayrışması da meydana gelebilmesi beklenen analitik belirsizliklerdendir. Soxhlet ekstraksiyonunda, hedeflenen bileşikler ekstrakt etmek için en uygun çözücü seçmek de gereklidir çünkü farklı çözücü polaritesi farklı bileşikler çözecektir (De Castro ve García-Ayuso 1998). Bu yöntemle elde edilen ferulik asit miktarı, kullanılacak olan bitki materyalinin ya da tarım atıklarının öncesinde soxhlet ile lipit profilinden ayrılmasını hedefler. Böylelikle ferulik asidin saflaştırılmasından önce yağ profilinin ortamdaki uzaklaşması fenolik grubun daha kolay elde edilmesini amaçlar (Pazo-Cepeda, Benito-Román vd. 2019). Dolayısıyla buğday kepeği öncesinde yağdan arındırılıp, kepeğin içerisinde bulunan ferulik asidin saflaştırılması konusunda öncü olabileceği düşünülmüştür. Şekil 1.13'te Soxhlet ekstraksiyonu düzeneği gösterilmiştir.



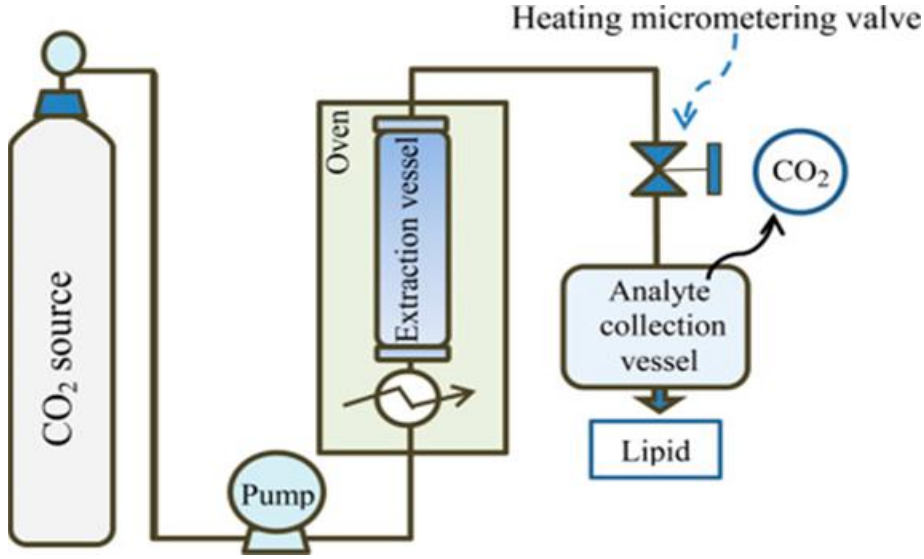
Şekil 1.13. Soxhlet ekstraksiyonu düzeneği (Reeve 2002)

1.7.3. Süperkritik sıvı akışkan karbondioksit ekstraksiyonu ile ferülik asit eldesi

Süperkritik sıvı akışkan karbondioksit ekstraksiyonu (SKA-CO₂), bitkilerden değerli bileşenleri yüksek verim ve iyi kalitede çıkarma kabiliyeti nedeniyle bitkisel işlemede ekstraksiyon yöntemlerinden biridir (Bernardo-Gil, Roque vd. 2011). Olumlu özellikleri arasında, ilgili maddenin termal bozulmasını önleyen, ortama sıcaklığına yakın ya ekstraktörün izin verdiği sıcaklıklarda ekstraksiyon gerçekleştirme yeteneği bulunmaktadır (Karale Chandrakant, Dere Pravin vd. 2011). SKA-CO₂ çözücüler arasında karbondioksit (CO₂) en köklü ve yaygın olarak kullanılan çözücüdür ve SKA-CO₂ ortamında sadece bir akışkan faz mevcuttur; bu akışkanın özellikleri gaz ve sıvı arasında bir ara faza benzemektedir. (Eller 2002). CO₂'nin toksik olmaması, alev almaması, elde edilen ekstrakt içerisinde solvent kalıntısı bırakmaması ve CO₂'nin ekstraksiyon malzemeleri ekipmanıyla reaktivite göstermemesi gibi benzersiz özellikleri vardır. Bu pozitif özellikler sayesinde çok sayıda ekstraksiyon işleminde yaygın olarak kullanılmasını sağlar. Buna ek olarak, bu gaz en yaygın çözücülerden daha ucuzdur, bu da ekstraksiyon işleminin maliyetini düşürür. CO₂'nin SKA-CO₂ süreçlerindeki en önemli faydalarından biri de organik çözücülerin kullanımından kaynaklanan çevre ve sağlık sorunlarının azalmasıdır (Schulz, Martinelli vd. 2017), (Geng, Liu vd. 2007).

SKA-CO₂'in kritik sıcaklık ve basıncı sırasıyla 31,1°C ve 73,8 Bar'dır. Bu koşullar altında CO₂, yüksek difüzyon katsayıları ve düşük viskoziteleri ile hem gaz benzeri özellikler hem de yüksek çözme gücü özellikleri ile sıvı benzeri özellikler sergiler. Bu özellikler süperkritik CO₂'yi iyi bir akışkan çözücü haline getirir (Clifford 1998). Hem viskozite hem de yayılma katsayısı, çözücünün bitkisel materyallere nüfuz etmesini etkileyen faktörlerdir. Çözücünün viskozitesinin azalması ve yayılma katsayısı artması, çözücünün gözenekli katı maddelere nüfuz etmesini kolaylaştırarak SKA-CO₂ 'de kütle transferinin artmasına ve ekstraksiyon sürelerinin kısılmasına neden olur (Guo, Jin vd. 2001). Sıcaklık ve basınçla değişen buzlanma (Çözücü moleküllerin etkileşimi) gücü, SKA-CO₂ yönteminin etkinliğini belirleyebilen bir diğer faktördür. Bitkilerden elde edilecek ekstraksiyonun ürününün yüksek seçiciliğini elde etmek için çözücü gücünün modifikasyonu kullanılabilir. Bu kapsamda bitki materyali Hidroksil grubu donörü ile muamele edilebilir. Etanol bunun için en uygun örneklerden biri olabilir (Lang ve Wai 2001).SKA-CO₂ yöntemi kullanılarak elde edilen ferülik asit miktarı hakkında yapılan bir çalışmada *Angelica sinensis* bitkisinden farklı ekstraktör ve basınç değerlerinde yaklaşık %0,87-4,06 özüt elde edilmiştir. Ancak elde edilen ferülik asit içeriğinin oldukça düşük olduğunu ifade etmişlerdir. Bu yüzden *A. sinensis*'ten ferülik asit içeriğinin artırılması için ekstraktöre etanolde eklenmesi gerektiğini ifade etmişlerdir (Sun, Li vd. 2006). Diğer bir çalışma ise buğday kepeği yağının özütlemesi üzerinedir.

Geleneksel organik çözücüler kullanılarak elde edilenlere benzer verimle, SKA-CO₂'de elde edilebilmiştir. Ekstraksiyon verimi sıcaklığın (95°C) ve basınç arttıkça (55 MPa) en yüksek antioksidan kapasiteye sahip kepek yağı elde edilmiştir (Rebolleda, Beltrán vd. 2014). Bu tez çalışmasında SKA-CO₂ yöntemi kullanılmamasına rağmen ferülik asidin saflaştırma bölümünde bu konuya değinileceğinden dolayı bahsedilmiştir. Şekil 1.14'te tipik bir SKA-CO₂ cihazı gösterilmiştir.



Şekil 1.14. Tipik bir SKA-CO₂ cihazının şematize edilmiş hali (Lari, Moradi-kheibari vd. 2016)

1.7.4. Çözücü ekstraksiyonu

Bu yöntemde, sıvı bir çözücü kullanarak bir katıdan çözünen bir bileşenin çıkarılması işlemi olarak ifade edilse de en uygun tanım, bir çözelti veya süspansiyon içindeki inorganik veya organik bir maddeyi bir başka çözücü yardımıyla ayırma işlemidir. Bu işlem, iki çözücü arasındaki çözünürlüğe dayanır. Bir çözelti içindeki bir madde, içinde daha iyi çözünen bir çözücü ile ekstrakt edilebilir. Bu yöntem Avrupa’da 1780’li yıllarda kullanılmaya başlanarak bir dönemin kapılarını aralamıştır ve insanlık tarihi için en önemli mihenk taşlarından biri olarak kabul edilmektedir (Babazadeh, Ezati vd. 2022). Bu tez çalışmasında birçok aşamada solvent özütleme yöntemi kullanılmış olup, sonuçlar ve bulgular ilgili bölümde tartışılacaktır.

1.7.4.1. Ultrasonik destekli solvent ekstraksiyonu

Bu yöntemde, bir ultra ses dalgasının geçişi ile sıvı ortamda akustik kaviteasyon oluşturduğu bilinmektedir. Kaviteasyon kabarcıkları, sonik dalgaların seyrekleşme döngüsünde üretilerek, bu şekilde oluşan boşluklar kritik bir yarıçapa kadar büyür ve sonunda şişer. Uygulamalı ultrasonik ses dalgaları çözücünün matrise daha fazla nüfuz etmesini sağlayarak sıvı ve katı faz arasındaki temas yüzey alanını artırır; sonuç olarak hücre içinde bulunan materyal katı yada jelimsi fazdan çözücüye hızla difüze olur (Tyśkiewicz, Konkol vd. 2018). Ultrasonik destekli solvent özütleme sistemini kullanarak yapılan çalışmalarda ferülik asidin materyal içerisinden daha kolay alınabildiği rapor edilerek, bu tez çalışmasının bir çıktısı olarak sonuçlar kısmında daha detaylı olarak bahsedilmektedir.

1.7.4.2. Vinterizasyon

Vinterizasyon diğer bir adıyla kışlama, biyoteknolojide yaygın olarak kullanılan bir lipid fraksiyonu ayırma tekniğidir. İşlem, ekstraktın etanol gibi polar bir çözücü içinde çözülmesini ve ardından karışımın soğutulması için dondurucuya yerleştirilmesini içerir.

Herhangi bir çözeltinin kışlama işlemine maruz bırakılması, içerdiği varsa lipitleri ve diğer istenen yağ bileşiklerini mum ya da mumsu yapılardan ayırmak için bir çözücü ve soğuk sıcaklıklar kullanan bir işlemdir. Soğuk, bileşiklerin erime ve çökme noktalarındaki farklılıklara göre ayrılmasını sağlar. Soğutma işleminde, daha yüksek erime noktalarına sahip yağlar ve mumlar (mumsu bileşenler) çöker ve daha sonra filtrasyon, santrifüjleme, dekantasyon veya diğer ayırma işlemleriyle çıkarılabilir (Pérez, Casas vd. 2010).

1.7.5. Enzim kullanılarak ekstraksiyon

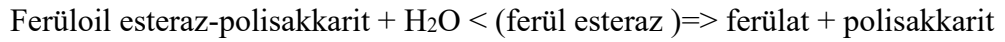
Kimyasal reaksiyonları hızlandırarak biyolojik katalizör görevi gören proteinler olarak ifade edilirler. Enzimlerin etki edebileceği moleküller substrat olarak adlandırılır ve enzim substratları ürün olarak bilinen farklı moleküllere dönüştürür. Hücredeki neredeyse tüm metabolik süreçler, yaşamı sürdürecekt kadar hızlı bir şekilde gerçekleşmek için enzim katalizine ihtiyaç duyar (Berg, Tymoczko vd. 2007). Metabolik yollar, bireysel adımları katalize etmek için enzimlere bağlıdır. 1877'de Alman fizyolog Wilhelm Kühne, Antik Yunanca (ένζυμον) 'mayalanmış, mayada' kelimesinden gelen enzim terimini ilk kez bu süreci tanımlamak için kullanmıştır (Kühne 1976). Enzim kelimesi daha sonra pepsin gibi cansız maddelere atıfta bulunmak için kullanılmasıyla birlikte ayrıca canlı organizmalar tarafından üretilen kimyasal aktiviteye atıfta bulunmak için kullanılmıştır. Enzimlerin incelenmesi enzimoloji olarak adlandırılır ve psödoenzim analizi alanı, evrim sırasında bazı enzimlerin biyolojik kataliz gerçekleştirme yeteneğini kaybettiğini kabul eder, bu da genellikle amino asit dizilerine ve olağandışı 'psödokatalitik' özelliklerine yansır (Murphy, Farhan vd. 2017).

Enzim aktivitesi ise diğer moleküller tarafından etkilenebilir, bu etkilenebilirliğe göre enzimlerin çalışmasını regüle eden moleküller inhibitör veya aktivatör ismini alırlar. İnhibitörler enzim aktivitesini azaltan moleküllerdir ve aktivatörler aktiviteyi artıran moleküller olarak tanımlanır. Birçok terapötik ilaç ve zehir enzim inhibitörüdür. Bir enzimin aktivitesi, optimum sıcaklık ve pH dışında belirgin şekilde azalır ve birçok enzim aşırı ısıya maruz kaldığında (kalıcı olarak) denatüre olur, yapılarını ve katalitik özelliklerini kaybeder (de Réaumur 1752). Fransız kimyager Anselme Payen 1833 yılında diastaz enzimini keşfeden ilk kişidir (Payen ve Persoz 1833). Birkaç on yıl sonra, şekerin maya tarafından alkole fermantasyonunu inceleyen Louis Pasteur, bu fermantasyona maya hücrelerinde bulunan ve sadece canlı organizmalarda işlev gördüğü düşünülen "ferment" adı verilen yaşamsal bir gücün neden olduğu sonucuna varmıştır. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği, enzimler için EC numaraları ("Enzim Komisyonu" için) olarak adlandırılan bir isimlendirme geliştirmiştir. Her enzim "EC" ile tanımlanır ve ardından enzimatik aktivite hiyerarşisini (genelden özele) temsil eden dört sayı dizisi gelir. Yani, ilk rakam enzimi mekanizmasına göre genel olarak sınıflandırırken, diğer rakamlar gittikçe daha fazla özgüllük katmaktadır. Genel olarak enzimlerin sınıflandırılması Çizelge 1.15'te verilmiştir.

Çizelge 1.15. Enzimlerin sınıflandırılması

Enzim Komisyon (EC) numarası	Enzimin ait olduğu grup	Görevi
EC 1	Oksidoredüktazlar	Oksidasyon/redüksiyon reaksiyonlarını katalize eder
EC 2	Transferazlar	Fonksiyonel bir grubu transfer eder.
EC 3	Hidrolazlar	Çeşitli bağların hidrolizini katalize eder.
EC 4	Liyazlar	Hidroliz ve oksidasyon dışındaki yollarla çeşitli bağları ayırır.
EC 5	İzomerazlar	Tek bir molekül içinde izomerizasyon değişikliklerini katalize eder.
EC 6	Ligazlar	İki molekülü kovalent bağlar ya da bağlarla birleştirir.
EC 7	Translokazlar	İyonların veya moleküllerin membranlar boyunca hareketini veya membranlar içinde ayrılmasını katalize eder.

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan ‘feruloil esteraz’ (ferüloil esteraz) isimli enzimin enzim komisyon numarası 3.1.1.73 olarak belirlenmiştir. Karboksilik ester hidrolazlar gurubuna dahildir. Bu enzimin katalizlediği reaksiyon ise aşağıda verilmiştir.



Bu tez çalışmasında bu enzimin kullanılmasının temel amacı, ferülik asidin buğday kepeğinin sitoplazması içerisinde serbest formlarının yanı sıra kovalent bağlar ile bağlı olduğu yapıları parçalayarak bağlı ferülik asidin serbest forma dönüşümünü amaçlar (De Vries, Michelsen vd. 1997), (Faulds ve Williamson 1991), (PA, CB vd. 1996). Bu konuyla ilgili elde edilen verilere bulgular kısmında değinilecektir. Adını Leonor Michaelis ve Maud Menten'den alan Michaelis-Menten kinetiği, bir substrat ve bir ürünün enzim katalizli reaksiyonlarına uygulanan en basit enzim kinetiği durumudur. Reaksiyon hızını tanımlayan bir denklemle bunu ifade ederek biyokimya bilimine en değerli katkılardan birini kazandırmışlardır. Michalis-Menten eşitliği aşağıda bulunan denklemdeki gibi ifade edilir.

$$V = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

V : Reaksiyon hızı

V_m : Maksimum hız

K_m : Michaelis-Menten sabiti

[S] : Substrat konsantrasyonu

K_m değeri, enzimin aktif merkezin yarısını doldurmak için gerekli substrat konsantrasyonudur ve her enzim için farklıdır (Johnson ve Goody 2011). Dolayısıyla bu tez çalışmasında antioksidan kapasite testlerinde k_m'yi belirlemek için bu eşitlikten yararlanılmıştır.

1.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), analitik kimyada karışımlardaki belirli bileşenleri ayırmak, tanımlamak ve miktarını belirlemek için kullanılan bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır. Karışımlar, sıvı çözeltiler halinde çözülmüş herhangi bir numune olabilir. Mobil faz olarak adlandırılan sistem boyunca kaydıran çeşitli sıvı ya da sıvı karışımlarından oluşan, numune ve mobil fazın birleşerek, adsorban malzemeden yapılmış katı parçacıklarla dolu kolon adı verilen bir silindire ileten yüksek basınçlı pompalara dayanır. Numunedeki her bir bileşen (analit) adsorban malzeme ile farklı etkileşime girerek her bir bileşen için farklı hareket hızlarına neden olur. Bu farklı moleküler ağırlıklar, kolondan UV dedektörleri gibi belirli bir dedektöre yol alırken seperasyona açar. Dedektörün çıktısı kromatogram adı verilen bir grafikdir.

Kromatogramlar, numunenin bileşenlerini temsil eden tepe noktalarını gösteren, zamana veya hacme karşı sinyal yoğunluğunun grafiksel gösterimleridir. Her bir numune, kolondan çıkış süresi olarak adlandırılan zaman Çizelgesinde kendi zamanında görünür ve miktarı ile orantılı bir alana sahiptir (Snyder, Kirkland vd. 2012). Dolayısıyla analiz edilen bir maddenin kendine özgü davranışı, analizde uygulanan metodoloji, kullanılan kimyasal solventler, akış hızı, kolonun türü, uzunluğu, çapı ve uygulanan sıcaklığa karşı göstermiş olduğu seperasyon gücüne dayanır. Bununla birlikte dedektörün nanometre bazında taradığı aralıkta maddeye göre spesifik olmalıdır. Kısacası analiz edilen maddenin kolondan çıkış zamanı ve dedektörün nanometre bazında vermiş olduğu sinyal bize o maddenin numune içerisindeki konsantrasyonunu hesaplamada bilgi vermektedir.

1.9. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

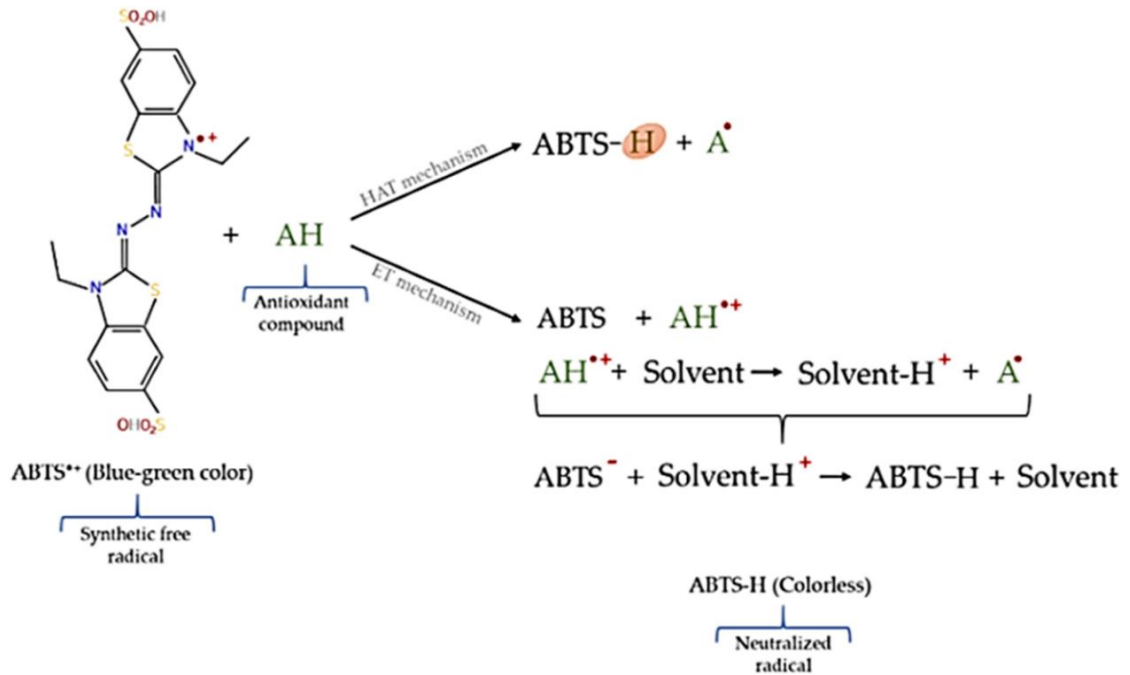
Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), titreşim spektroskopisi olarak bilinmektedir. Bu teknik, bir maddenin kızılötesi ışık soğurmasını ölçerek moleküler yapısını ve kimyasal bileşimini karakterize etmek için kullanılır. Kızılötesi ışık, elektromanyetik spektrumun görünür ışığın altındaki bölgesidir. Kızılötesi ışık, moleküllerin titreşim hareketleri tarafından soğurulur. Bu soğurma, moleküldeki atomların birbirlerine göre mesafelerinin ve açılarının değişmesine neden olur. FTIR spektrometreleri, Fourier dönüşümü adı verilen bir matematiksel işlem kullanarak kızılötesi spektrumlarını elde eder. Fourier dönüşümü, zamana bağlı bir sinyali frekansa bağlı bir sinyale dönüştürür (Berthomieu ve Hienerwadel 2009).

1.10. Kütle Spektrometrik Analizler

Kütle spektrometrisi (MS), bir numunedeki atomların veya moleküllerin kütlelerini ve konsantrasyonlarını ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemden çıkan bilgiler numunenin kimyasal bileşimini, yapısını ve izotop bileşimini belirlemek için kullanılabilir. Kütle spektrometresi, üç temel bileşenden oluşur: İyonlaştırıcı, kütle analizörü ve dedektör (Cooks, Ouyang vd. 2006).

1.11. Antioksidan Aktivite

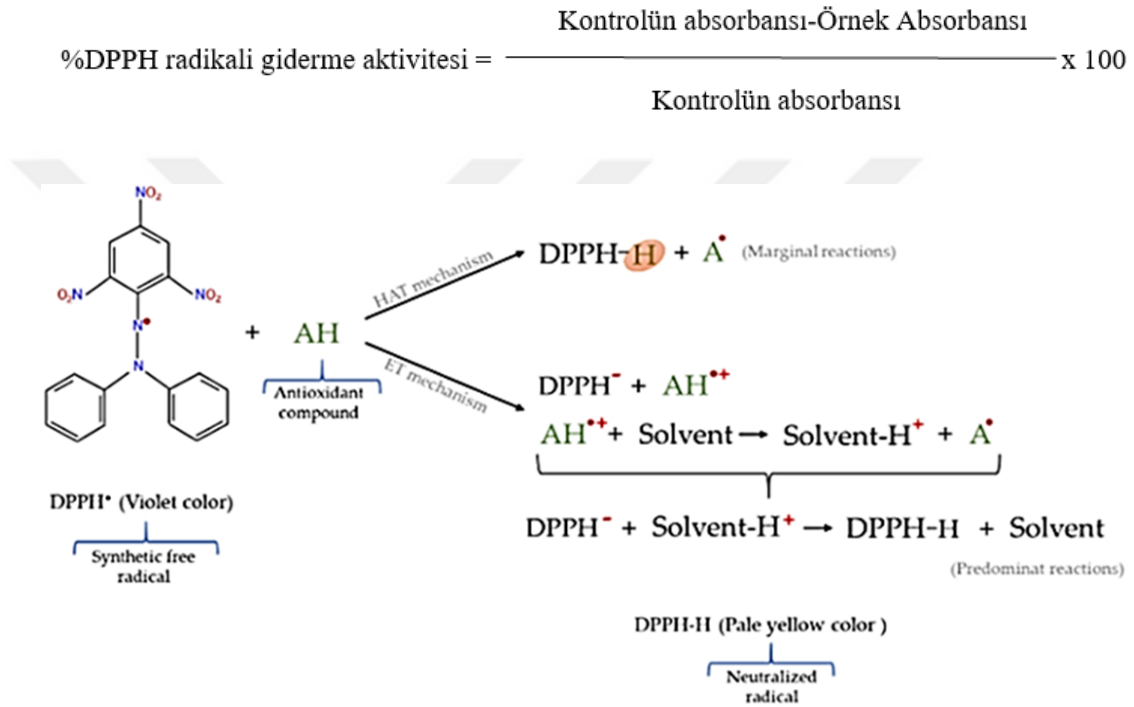
Bu tez çalışmasında antioksidan aktivite testi için ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) yönteminden faydalanılacaktır. Bu yöntemde kullanılan ABTS kimyasalı kısaca spesifik enzimlerin reaksiyon kinetiğini gözlemlemek için kullanılan kimyasal bir bileşiktir. Genellikle bir peroksidaz enzimi için hidrojen peroksit ile veya mavi multikopper olarak geçen kimyasal oksidaz enzimleri (ile tek başına bir substrat olarak kullanılır. Peroksidazların reaksiyon ise enzim kinetiğinin takip edilmesini sağlar. Bu şekilde, herhangi bir hidrojen peroksit üreten enzimin reaksiyon kinetiğini dolaylı olarak takip etmek için veya bir numunedeki hidrojen peroksit miktarını basitçe ölçmek için de kullanılabilir. ABTS için indirgeme potansiyelleri, özellikle biyolojik katalizde karşılaşılan daha az aşırı pH değerlerinde, moleküler oksijen ve hidrojen peroksit gibi okso türlerinin indirgenmesi için bir elektron donörü olarak hareket etmesi için oldukça yeterlidir. Bu koşullar altında, sülfonat grupları tamamen protonlarından uzaklaştırılır ve aracı bir di-anyon olarak bulunur (Re, Pellegrini vd. 1999). Böylelikle elde edilen verileri matematiksel bir denklem sayesinde sayısal verilere dönüştürüp, ölçümü yapılacak olan numune içerisindeki antioksidan kapasite hakkında bilgi almış oluruz. Şekil 1.15'te ABTS testinde meydana gelen reaksiyonlar gösterilmiştir.



Şekil 1.15. ABTS testinde meydana gelen reaksiyonlar (Echegaray, Pateiro vd. 2021).

1.11.1. Serbest radikal analizleri

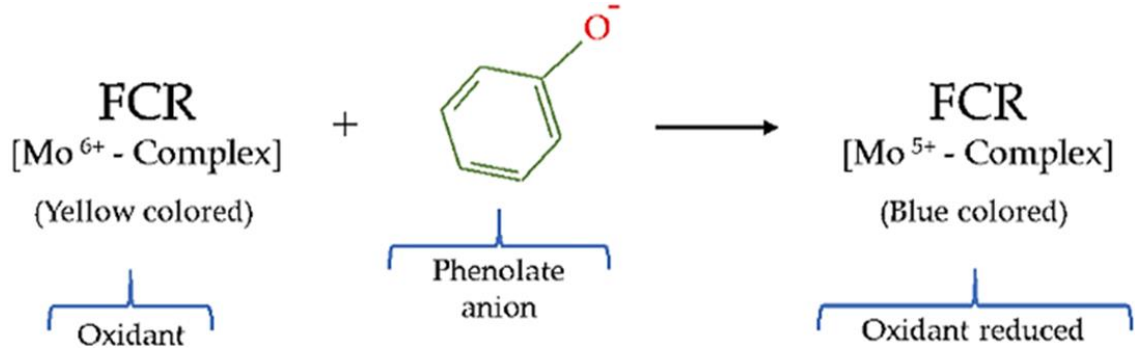
Tez çalışmamda buğday kepeğinden saflaştırılan ferülik asidin ve ticari olarak satın alınan ferülik asidin analitik standardının serbest radikal analizleri için DPPH testi ile yapılacaktır. DPPH, organik kimyasal bileşik ismi olarak 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil şeklinde kısaltılır. Kararlı serbest radikal moleküllerinden oluşan koyu renkli kristal bir tozudur. DPPH'nin iki önemli uygulaması mevcuttur, birincisi antioksidan testidir ve ikincisi ise elektron paramanyetik rezonans sinyallerinin konumu ve yoğunluğunun ölçmek için kullanılan bir standarttır. Şekil 1.16'de DPPH testinde meydana gelen reaksiyonlar gösterilmiştir.



Şekil 1.16. DPPH testinde meydana gelen reaksiyonlar (Echegaray vd. 2021)

1.11.2. Toplam fenolik içerik

Tez çalışması kapsamında toplam fenolik içerik miktar belirlenmesi için Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılacaktır. Gallik asit eşdeğerlik yöntemi (GAE) olarak da adlandırılan fenolik ve polifenolik antioksidanların kolorimetrik in vitro deneyi için kullanılan bir fosfomolibdat ve fosfotungstat karışımıdır. Bununla birlikte, bu tekniğin temel mekanizması redoks tipi bir reaksiyon olduğundan, Folin-Ciocalteu deneyi elektron transferi yoluyla antioksidan kapasiteyi belirlemek için başka bir yöntem olarak düşünülebilir (Yu, Haley vd. 2002). Şekil 1.17'de Folin-Ciocalteu reaktifinin indirgenme reaksiyonu gösterilmiştir.



Şekil 1.17. Folin-Ciocalteu reaktifinin indirgenme reaksiyonu (Echegaray, Pateiro vd. 2021)

1.12. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

Antimikrobiyal duyarlılık testi, test edilmeye aday bir antimikrobiyal ajanın ya da etkinliği kanıtlanmış bir molekülün belli bir bakteri türüne karşı in-vitro etkinliğini saptamak amacıyla uygulanan test olarak ifade edilebilir. Daha açıklayıcı bir ifade ile bulaşıcı hastalıkların kontrolü ve önlenmesi için hastaneler, klinikler ve uluslararası programlar tarafından sağlanan tedavi hizmetlerinin değerlendirilmesine için veri sunar. Sadece tıbbi konularda veri sağlamasının yanı sıra zirai anlamda da kullanılması araştırmacılar için yeni antibiyotiklerin ortaya çıkmasına, var olan antibiyotikler ile farklı maddelerin birleşerek sinerjist yada antagonist etkilerinin belirlenmesinde bununla birlikte antimikrobiyal ajanın mikroorganizma üzerinde kullanılacak konsantrasyonu belirlenmesinde önemli bir rol oynar (Reller, Weinstein vd. 2009).

1.12.1. Kuyucuk difüzyon metodolojisi

Kuyucuk difüzyon metodolojisi, antimikrobiyal duyarlılık testlerinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, antimikrobiyal etkinliği kanıtlanmaya çalışılan ajan ve/veya antimikrobiyal etkinliği kanıtlanmış ajanın 4mm kalınlığında 90mm petrilere dökülmüş ve katılaşmış Müeller Hinton besiyeri yüzeyinde, metal yuvarlak öze yardımıyla ucunun çapı 6 mm olarak ayarlanmış olup, kuyucuklar oluşturulmasıyla hazır hale gelmektedir. Test edilecek mikroorganizma süspansiyonu 0,5 McFarland bulanıklık sabiti dansitometre yardımıyla ayarlanır, eküvyon çubuğu petri kabına yayılır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan antimikrobiyal etkinliği kanıtlanmaya çalışılan ajan kuyucuklara inoküle edilir ve etüve kaldırılır. Bu aşamadan 24 saat sonra kuyucukların etrafında oluşan inhibisyon halkası çapı ölçülerek EUCAST'a göre değerlendirilir. Bu değerlendirme sonucunda kabaca inhibisyon zon çapı ne kadar geniş test edilen mikroorganizmanın büyümesinin inhibe edildiği anlamına gelir. Sonuçları yorumlamak için 3 seçenek mevcuttur bunlar;

- ❖ Duyarlı,
- ❖ Orta derecede duyarlı,
- ❖ Dirençli

şeklinde ifade edilir (Magaldi, Mata-Essayag vd. 2004). Tez çalışması kapsamındaki elde edilen veriler bulgular kısmında sunulmuştur.

1.12.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, *Bacillota*'nın bir üyesi olan Gram-pozitif küresel şekilli bir bakteridir. Sıklıkla üst solunum yollarında ve ciltte bulunan vücut mikrobiyotasının olağan bir üyesidir. Genellikle katalaz ve nitratı indirgeme deneylerinde pozitif sonuç verir ve oksijene ihtiyaç duymadan büyüeyebilen fakültatif bir anaerobdur (Masalha, Borovok vd. 2001). *Staphylococcus aureus*'un insanlardaki doğal yaşam alanı deri ve nazofarenkstir. Deri ve yumuşak dokuları, endovasküler bölgeleri ve iç organları içeren çok çeşitli enfeksiyonlara neden olabilir. *S. aureus* toplumda ve hastanelerde önemli bir patojen olmaya devam etmekte ve yüksek morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Organizma, yüzeysel bir bölgeden kan dolaşımı yoluyla iç organlara yayılabilir ve burada metastatik bir enfeksiyon odağı oluşturabilir. Hastane hastalarında başlıca enfeksiyon bölgeleri cerrahi yaralar ve kalıcı tıbbi cihazlardır. İkincisinde bakteriler implante edilen cihazda kolonize olarak lokal hasara neden olabilir veya yayılabildiği rapor edilmiştir. Buna ek olarak, enterotoksinlerle kontamine olmuş gıdaların yenmesi sonrasında gıda zehirlenmesi meydana gelebilir. *S. aureus* ayrıca ekonomik açıdan önemli olan ruminant mastitisine de neden olmaktadır. Bu sebeplerden ötürü giderek artan antibiyotik dirençlerine karşı alternatif biyomoleküllerin araştırılması devam etmektedir (J. Foster 2002).

1.12.3. *Escherichia coli*

Escherichia coli, sıcakkanlı organizmaların alt bağırsağında yaygın olarak bulunan *Escherichia* cinsine bağlı gram negatif, fakültatif anaerobik, çubuk şeklinde, koliform bir bakteridir. *E. coli* suşlarının çoğu zararsızdır, ancak EPEC (enteropatojen *E. coli* ve ETEC (Enterotoksijenik *E. coli*) gibi bazı serotipler patojeniktir ve konakçılarında ciddi gıda zehirlenmesine neden olabilir. Dünya genelinde gıdalarda problem yaratarak zaman zaman ürünlerin geri çağırılmalarına neden olan gıda kontaminasyonu olaylarından sorumludur (Vogt ve Dippold 2005). *E. coli*, insan bağırsağının baskın patojenik olmayan fakültatif florasıdır. Ancak bazı *E. coli* suşları, en sağlıklı insan konakçılarda bile gastrointestinal, üriner veya merkezi sinir sistemi hastalıklarına neden olma yeteneğini geliştirmiştir. Patojenik *E. coli*'nin şiddetli ishal yaptığı bilinmekle birlikte ciddi antibiyotik direnci gözlenmektedir. Bundan dolayı halk sağlığı için bir tehdit oluşturan bu mikroorganizmanın nötralizasyonu insanlık yaşadığı sürece problem olacaktır (Nataro ve Kaper 1998).

1.13. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, belirli bir ortamda ve kontrollü koşullar altında hücrelerin çoğaltılması ve yetiştirilmesi işlemidir. Pratikte, hücre kültürü terimi çok hücreli ökaryotlardan, özellikle hayvan hücrelerinden kaynaklanan hücrelerin kültürlenmesi için kullanılır. Hücre kültürleri, günümüzde popüler araştırma konularının önemli bir kısmını kapsamaktadır. Örneğin, kanser gibi çeşitli patolojik durumlarda belli bir maddenin etkilerini ya da bir hücre veya dokuda üretilen belli bir maddenin işlevlerini belirlemek amacıyla hücre kültürleri yapılabilmektedir. Hücre kültüründe, belirli bir hücre hattından çoğaltılan hücrelerde çeşitli çalışmalar yapılarak canlı ortamında (in vivo) yapılamayan

denemeler yapılabilir ve buradan yola çıkılarak sonuçlara ulaşılabilir. Hücre karakterinin bilinmesi, hücre kültürü prosedürlerinin başarılı bir şekilde yürütülmesi için önemlidir.

Hücre karakterini belirlemek için kullanılan yöntemler şunlardır:

- ❖ **Histolojik inceleme:** Hücrelerin şekli, boyutu ve yapısının incelenmesi
- ❖ **İmmünohistokimya:** Hücrelerde belirli proteinlerin varlığının veya yokluğunun incelenmesi
- ❖ **Moleküler biyoloji:** Hücrelerde belirli genlerin ekspresyonunun incelenmesi

Hücrelerin daha sağlıklı ve verimli bir şekilde çoğaltılmasını sağlar. Hücre kültürü prosedürlerinin daha başarılı bir şekilde yürütülmesini sağlar. Hücrelerin belirli özelliklerinin incelenmesini kolaylaştırır. Bu nedenle, laboratuvar şartlarında bilimsel çalışmada kullanılan hücrenin karakterinin bilinmesi, oldukça önemlidir (İPLİK ve ÇAKMAKOĞLU 2020).

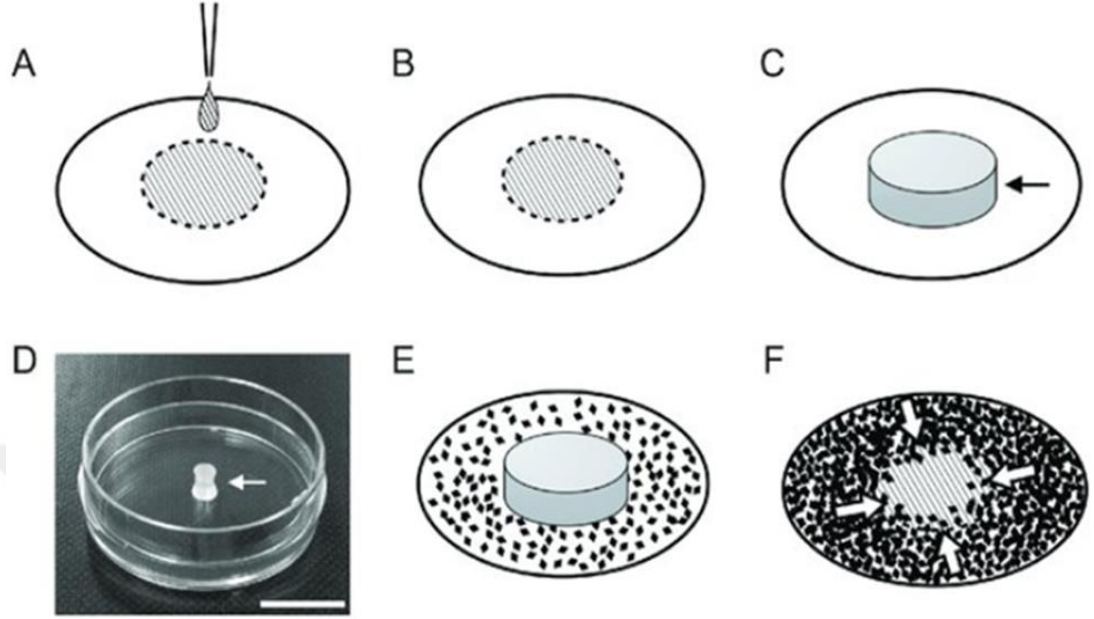
1.13.1. Hücre canlılığı testi (MTT testi)

Tez çalışması kapsamında hücre canlılığı testi için bir tetrazolium kimyasalı olan MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) kullanılmıştır. Redoks potansiyeline bağlı olarak canlı hücrelerin varlığını tespit etmek için kullanılan MTT analizi, fenolik asitlerin hücreler üzerindeki sitostatik ve sitotoksik etkilerini göstermek için yeterli olacaktır. MTT analizi için üretici firmanın talimatları takip edilmiştir. Bu yöntem ile çözünür MTT canlı hücreler tarafından çözünmeyen mor renkli formazana dönüştürülecek ve formazan miktarı spektrofotometre yardımıyla kolorimetrik olarak tespit edilmiştir. MTT testinde hücrelere farklı konstrasyonlarda ferulik asit uygulanmıştır. Fenolik asitlerin uygulamasını takip eden 24, 48 ve 72. saatlerde 570 nm ve 690 nm'deki absorbans değerleri ölçülecektir. Bu konu ile ilgili yayınlanmış makalemizdeki protokolden yararlanacağız (Cengiz, Babacan vd. 2022). Protokol materyal metot bölümünde paylaşılmıştır.

1.13.2. Halka hücre göçü testi (Ring cell migration assay)

Ticari olarak edinilen ferulik asit analitik standardı, Siyez ve Gernik buğdaylarının kepek kısmından saflaştırılacak olan ferulik asit ve kemoterapötik ajan olarak uygulanacak olan paklitakselin insan cilt kanseri (melanoma) (SK-MEL-30) hücre hattının göç etme özelliklerini kısıtlayıp kısıtlamadığının tespiti için hücre göçü testleri gerçekleştirilecektir. Bunun için hücreler 12 kuyucuklu kültür kaplarına klonlama halkasının içine ve etrafında ekilecektir. Ekim esnasında klonlama halkasının iç kısmına 5×10^5 , dış kısmına 2×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapılacaktır. Hücre ekimini takip eden 24 saatte klonlama halkası kültür kaplarından uzaklaştırılacak ve böylece hücreler arasında mikroskop altında gözlenebilir bir boşluk oluşturulacaktır. Klonlama halkalarının uzaklaştırılmasından hemen sonra hücrelere belirlenen konsantrasyonlarda uygulamalar yapılmıştır. Uygulamayı takip eden 24, 48 ve 72. saatlerde hücrelerin faz görüntüleri inverted mikroskop yardımıyla çekilmiştir. Hücreler arasındaki mesafe Leica Las X görüntü programı yardımıyla μm cinsinden hesaplanmıştır. Yukarıda bahsedilen bu yöntemden, ticari olarak edinilen ferulik asit analitik standardı, Siyez ve Gernik buğdaylarının kepek kısmından saflaştırılacak olan ferulik asit ve kemoterapötik ajan

olarak uygulanacak olan paklitakselin insan cilt kanseri (melanoma) (SK-MEL-30) hücre hattının üzerindeki minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değerleri belirlenecektir. Şekil 1.18’de gerçekleştirilen hücre göçü testine ait görsel sunulmuştur.



Şekil 1.18. Halka hücre göçü testi illüstrasyonu (Shiode, Morizane vd. 2017)

2. KAYNAK TARAMASI

İnsanlık tarihinin baş yazarı olan Buğdaygiller (*Poaceae*) familyasının en önemli aktörü olan Buğday (*Triticum spp.*), tarım ürünleri içerisinde hasat edilen alan açısından 220.759.739 ha ekiliş ile birinci, üretim miktarları açısından ise 770.877.072,89 ton ile şeker kamışı, mısır ve pirinçten sonra dördüncü sırada yer aldığı deklare edilmiştir (FAOSTAT 2022). Bünyesinde barındırdığı karbohidrat, vitaminler, aminoasitler, yağ asitleri ve mineraller açısından oldukça besleyici olduğu bilinmektedir (Luthria, Lu vd. 2015). Tüm bu makro ve mikro moleküllere ek olarak, içermiş olduğu fitokimyasallar nedeniyle araştırmacıların sürekli olarak hedefinde olan bir bitki türüdür. Bununla birlikte özellik fenolik asitlerin etkinliği buğdayın hem doğada tutunabilmesi açısından hem de insan sağlığı açısından oldukça önemlidir. Bu fitokimyasallar buğdayın morfolojik yapısının türden türe ve çeşidine göre farklı olmasından dolayı miktarsal farklılıkların yanı sıra lokasyonel değişikliklerde göstermektedir (Klepacka ve Fornal 2006).

Buğday bitkisinin tanesinin içerisinde 3-OH benzoik asit (p-OH benzoik asit, vanilik asit ve siringik asit), 6-OH sinamik asit (p-kumarik asit, ferülik asit ve dört farklı ferülik asit türevi) ve bir flavonoid (apigenin) bulunduğu rapor edilmiş olup, halk sağlığının iyileştirilmesinde yararlı olacağı düşünülerek, daha yüksek fenolik asit seviyelerine sahip buğday hatlarının geliştirilmesi sonucuna varılmıştır (Hernández, Afonso vd. 2011). Epidemiyolojik kanıtlar, yüksek antioksidan kapasitesine sahip olan buğdayların içermiş olduğu serbest fenolik asitlerin kardiyovasküler hastalık, kanser, diyabet, yaşlanma ve diğer bozukluklar dahil olmak üzere çeşitli kronik hastalıkların önlenmesindeki rolünü desteklemiştir (Srinivasan vd. 2007). Bununla birlikte, tam tahıl tanesinin içerdiği fenolik asitlerin hidrofobik özelliğe sahip olanların ve hücre zarına kovalent bağ ile bağlı olan grupların biyoyararlanıma ilişkin verilere ihtiyaç olduğu bilinmektedir.

Buğdayın kepek kısmında ise yüksek miktarda ferülik asit içerdiği ve bu ferülik asidin serbest form ve hücre duvarına bağlı formu olmak üzere iki formundan bahsedilmiştir. Ferülik asidin arabinoksilanlara ester baği ile kovalent olarak bağlı olduğu deklare edilmiştir (Ralet, Faulds vd. 1994). Ferülik asidin kepek fraksiyonunda yaklaşık olarak $1837,05 \pm 72,92$ ppm olduğu bildirilmiştir (Cengiz, Babacan vd. 2021). Bu değerler buğday türlerinin türüne çeşidine göre değişiklik göstermektedir. En temel farklılık ise genetik materyalden kaynaklanmaktadır.

Buğdaydan elde edilen birden fazla fonksiyonel gıda grubunun içeriğinde de ferülik asidin bulunduğu birden fazla çalışma ile rapor edilmiştir. Ekmekte bulunan ferülik asit değerinin 80-200 ppm arasında rapor edilen çalışmalar mevcuttur (Boudaoud, Sicard vd. 2021), (Konopka, Tańska, Faron vd. 2014). Bu miktarlar buğdayın genetik materyali ile elde edilen ekmek ürününün pişirme tekniğinin farklılıkları nedeniyle farklı miktarlarda ferülik asit içerebileceği düşünülmektedir. Buğday kepeğinde yüksek miktarda bulunan ferülik asit, kepekli ekmekte normal ekmeğe kıyasla daha fazla olduğu rapor edilmiş olup bu değerler, 90-600 ppm arasında olduğu ifade edilmiştir. (Moskowitz, Bin vd. 2012), (Konopka, Tańska, Wasilewska vd. 2014), (Lu, Luthria vd. 2014). Buğdaydan elde edilen diğer önemli bir besin olan bulgurda ise yapılan çalışmalarda elde edilen buğday türünün yetiştirilme ve buğday tanesinden bulgur elde edilip, pişirme yöntemi olarak geleneksel ve mikrodalga kıyaslandığında Siyez buğdayı için geleneksel

pişirme yönteminde 763 ppm, mikrodalga ile pişirildiğinde 755 ppm, Gernik buğdayı içirse geleneksel pişirme yönteminde 627 ppm, mikrodalga ile pişirildiğinde 729 ppm ferülik asit saptanmıştır (Tekin vd. 2022). Bulgur ile yapılan diğer çalışmalarda ise bulgurda 1163,2 ppm ferülik asit rapor edilmiştir. Aynı çalışmada bulguru aşırı derecede kaynatmanın fitokimyasalların azalmasına böylelikle biyoyararlılığın düşmesine neden olduğu da deklare edilmiştir (Giambanelli, Ferioli vd. 2020). Diğer bir fonksiyonel gıda olan irmik ise bulgura göre daha küçük partiküler yapısı ve daha az ferülik asit içerdiği rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmada irmiğin 57,6 ppm ferülik asit içerdiği deklare edilmiştir (Menga, Giovanniello vd. 2023).

Sadece buğday kepeğinde bulunmayan çeşitli tohum, kabuklu yemiş, yaprak ve meyvelerden elde edilen bir hidroksisinnamik asit olan ferülik asit (4-hidroksi-3-metoksisinnamik asit), serbest formda bulunmasının yanı sıra polisakkaritler, glikoproteinler, poliaminler, lignin ve bitki hücre duvarlarının hidroksi yağ asitleri ile ester bağıyla kovalent olarak konjuge edilir. Antioksidan, anti-enflamatuvar, vazodilatör, antitrombotik, antimikrobiyal, UV koruyucu etki, anti-alerjik gibi çeşitli farmakolojik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir. Bununla birlikte cildin yaşlanmasını geciktirmesi ve nörodejeneratif rahatsızlıkların tedavisinde rol oynadığı bilinmektedir (Ojha, Javed vd. 2015) (Murray, Burch vd. 2008, Peres, Sarruf vd. 2018).

Yapılan bir çalışmada ferülik asidin orta un fraksiyonunda ferülik asit miktarını 429 ppm olduğunu deklare etmiştir. Fransız buğday çeşidi Ardente'nin kepek fraksiyonlarındaki ferülik asit içeriğinin analiz sonuçlarına göre 780 ppm ile 1980 ppm kadar farklılık saptarken un fraksiyonunda ise 25 ila 177,5 ppm arasında değiştiğini rapor etmişlerdir. Öte yandan yapılan diğer bir çalışmada ise farklı buğday varyetelerinin kepek fraksiyonlarındaki yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak yapılan ferülik asit analizlerinde, Zyta 364,41 ppm, Elena 296,62 ppm, Torka 428,81 ppm, Henika 404,46 ppm, Begra 652,25 ppm, Almari 505,59 ppm, Jasna 490,02 ppm, Ismena 434,44 ppm ve Nawra 399,99 ppm olduğu rapor edilmiştir (Lempereur, Rouau vd. 1997).

Yerli buğdaylar ile yapılan bir çalışmada ise Siyez ve Gernik buğdaylarının farklı hatlarıyla birlikte Zenit, Svevo, Sarıçanak 98 ve Esperia durum buğdaylarından kepek ve bulgur fraksiyonlarından yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak yapılan ferülik asit analizlerde ise Siyez buğday hattının kepek fraksiyonunda ortalama $759,49 \pm 83,74$ ppm, Gernik buğday hattının kepek fraksiyonunda ortalama $678,23 \pm 34,29$ ppm bulunduğu deklare edilmiştir. Zenit, Svevo, Sarıçanak 98 ve Esperia durum buğdaylarından kepek fraksiyonlarından yapılan ferülik asit analizlerinde ise sırasıyla 976,70, 713,96, 855,83 ve 765,80 ppm saptanmıştır. Siyez ve Gernik buğdaylarının farklı hatlarından elde edilen bulgur fraksiyonunda ise sırasıyla $759,49 \pm 27,92$ ve $678,23 \pm 11,43$ olarak bulunmuştur (Tekin vd. 2022).

Antiviral, hepatoprotektif ve antikanser aktivitelerinin olduğu bilinen ferülik asit bunu hücre ekspresyonunu indükleyerek yapar ve p53 ve p21 gibi döngü ile ilişkili proteinler ve siklin D1 ve siklin E seviyelerini azalttığı bilinmektedir. Ayrıca ferülik asit, hücre içi döngüye bağlı olarak apoptoz ve otofajik olarak hücre ölümünü tetiklediği rapor edilmiştir (Chun, Haese vd. 2008), (Ezhuthupurakkal, Ariraman vd. 2018), (Eroğlu vd. 2015).

Çeşitli kanser hücre hatlarında reaktif oksijen türleri üretimi nedeniyle bu etkiye tepki olarak ferülik asidin hücre içerisinde potansiyel apoptotik etkisine prokaspaz-3, prokaspaz-8'in değişen ekspresyonu seviyelerine aracılık ettiği bilinmektedir. Prokaspaz-9, poli (ADP riboz) polimeraz, Bcl-2 ve Bax. aktivasyonu bloke ederek apoptozun altında yatan moleküler mekanizmalar ile ilgili olduğu rapor edilmiştir (Paloza 2005), (Safarzadeh, Shotorbani vd. 2014), (Roy, Narayanankutty vd. 2016).

Ferülik asidi değerli diğer kılan diğer özelliklerden biri ise hücrelere zarar veren serbest radikalleri nötralize ederek hücreleri eski sağlığına kavuşturabildiği gibi var olan rahatsızlıkları geciktirebildiği de rapor edilmiştir. Özellikle kanser gibi sistemik ve sinsi ilerleyen rahatsızlıkların tedavisinde oksidatif stresin giderilmesi gibi önemli bir konuda hücreleri korumaya çalıştığı rapor edilmiştir Ferülik asidin antikanser mekanizması Hela (servikal karsinoma) ve Caski (HPV-16) rahim ağzı kanseri hücre hatlarının otofajisi ve hücre döngüsü ile ilgili olduğu deklare edilmiştir (Gupta, Singh vd. 2021), (Jinhua Gao vd. 2018).

Ferülik asidin antikarsinogenik etkilerinin yanı sıra diyabet, kalp hastalığı ve diğer kronik hastalıklarla ilişki birçok çalışma bulunmaktadır. Diyabetik hayvanlar ile yapılan bir çalışmada antioksidan özelliğinin yanı sıra hem anti hiperglisemik hem de diyabetin şiddetini azaltmakla birlikte diyabet kaynaklı diğer komplikasyonları önlediği rapor edilmiştir (Balasubashini, Rukkumani vd. 2004). Toplumumuzda birçok kişinin muzdarip olduğu, ateroskleroz, lipid oksidasyonu ile yakından ilişkilidir ve anjina pectoris, akut miyokard enfarktüsü, iskemik inme ve diğer akut kardiyovasküler hastalıkların ana patolojik temelini oluşturur. Aterosklerozun patolojik değişiklikleri mitokondri tarafından düzenlenir ve gebelikle ilişkili plazma proteini (PAPP-A) seviyesi ile yansıtılır. PAPP-A, insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteini (IGFBP) spesifik olarak hidrolize edebilir ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) seviyesini düzenleyerek ateroskleroz oluşumuna katılabilir. Trombosit agregasyon inhibitörü olarak görev yapan ferülik asit ise aterosklerozun önlenmesinde önemli bir rol oynayabilir (Hong, Ma vd. 2016).

Ferülik asidin foto koruyucu özellik ile öne çıktığı bilmekle birlikte, cildin güneşin zararlı ışınlarından korunmasına yardımcı olabilir. Güneş ışınları, ciltte oksidatif strese neden olarak cilt yaşlanmasını, kırışıklıkları ve kanseri hızlandırabilir. Ferülik asit, güneş ışınlarının neden olduğu oksidatif stresi azaltarak cildin korunmasına yardımcı olabilir. Biyoaktif güneş bakım ürünleri ve ferülik asidin biyoaktif çok fonksiyonlu güneş kremleri için özel bir platform olarak karakterize edilmesini gündeme alarak, özellikle güneş kremlerinin tahriş edici olmayan profili ile kombinasyonunun insan sağlığına zararının olmadığını belirtmiştir. Ayrıca yapılan in vivo veriler sayesinde ferülik asidin güneşten koruma faktörünü arttırmakla birlikte güneşten gelen zararlı ışınları nötralize ettiği deklare edilmiştir (Peres vd. 2018), (Srinivasan vd. 2007). Böylelikle güneş kremlerinin, foto koruyucu formülasyonların geniş spektrumlu özelliğini güçlendirdiği ifade edilmektedir.

İnsanoğlunun tüm sorunlarına çare olarak yöneldiği doğa ve doğanın kalbinde bulunan bitkiler ve bu bitkilerde bulunan fitokimyasallara olan ilgisi her zaman yüksek olmuştur. Fitokimyasalların etkilerinin keşfedilmesi ve mimikri fikrinin toplum içerisinde benimsenmesi nedeniyle ekstraksiyon yöntemleri de buna paralel olarak yaygınlaşmış ve sanayi devrimi ile pik yaptığı görülmektedir. Bitkilerde bulunan aktif maddelerin analizi

ve saflaştırmasının yanı sıra istenilen aktif bileşiğin çeşitli yöntemler kullanılarak hücre içindeki miktarının artırılmasına yönelik çalışmalar seçilen yöntemlere göre hassasiyet göstermektedir (Olukoga ve Donaldson 1998).

Buğday kepeğinden ferülik asidin ekstraksiyonu oldukça zahmetli olup, birden fazla aşamalar içermektedir. Yapılan çalışmalarda ferülik asidin buğday kepeğinin içerisinde hücre duvarına ester bağı ile kovalent olarak interaksiyon halinde olması ve buğday kepeğinin mumsu bileşenlerinden dolayı ferülik asidin saflaştırılmasını zorlaştırmaktadır. Bu kapsamda, basınçlı su ve etanol kullanılarak yapılan bir çalışmada mumsu maddeleri ihtiva eden alkali çözeltisinde %30 sulu etanol ile kolayca çöktürülebileceği ve bu nedenle, tarım atıklarından ticari ferülik asit üretiminin mümkün olabileceği ifade edilmiştir (Buranov ve Mazza 2009). Öte yandan yapılan diğer bir çalışmada buğday kepeğinin rehidrasyonu, protein ve nişasta kısımlarının uzaklaştırılıp, enzimatik ön işlem uygulanarak ve sadece ferülik aside özgü bir enzimle saflaştırma aşamasına geçilmesi gerektiğini vurgulamışlardır. Sonuç olarak 1,05 g/kg ferülik asidi elde ettiklerini deklare etmişlerdir (Ferri, Happel vd. 2020).

Yapılan diğer bir çalışmada ise kolon kromatografisinden yararlanılmış olup, AMBERLITE XAD 4 adsorbe edilen ferülik asitte neredeyse hiç kayıp göstermediğinden ve ayrıca suya kıyasla daha düşük buhar basıncına sahip bir çözücü olan metanol kullandığından (dolayısıyla çözücü geri dönüşümü ile ferülik asidi saflaştırmak daha kolaydır), AMBERLITE XAD 4'ün ferülik asidin saflaştırılması için daha iyi bir adsorban seçimi olduğuna karar verilmiş olup, bağlama kapasitesi sayesinde 49,9 mg ferülik asit /g reçine ve elüent olarak metanol kullanarak etkileyici bir %99,5 geri kazanım elde ettiklerini rapor etmişlerdir (Gopalan ve Nampoothiri 2018).

Rapor edilen diğer bir çalışmada ise Mısır kepeğinin 75°C'de 2 saat %50 etanol (v/v) içeren 0,25 mol/L NaOH sulu çözeltisi kullanılarak ekstraksiyonu, bağlı ferülik asidin %81'ini serbest bırakmıştır. Ferülik asit ultrafiltrasyon ve ardından nanofiltrasyon ile kolayca ayrıştırılabileceği ifade edilmiştir. Nanofiltrasyondan sonra doğrudan kristalize edilebileceği deklare edilmiştir. Anyon değişim kromatografisinden daha basit olan bu teknikte daha az atık su ve organik çözücü açığa çıktığı ayrıca ksilan gibi bir enzim kullanılarak mısır kepeğinden ferülik asidin salınımı kolaylaştırılmıştır. Bu yöntemin buğday kepeğinde de kullanılabileceği düşünülmektedir (Zhao, Yao vd. 2014).

Öte yandan dia-filtrasyon yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada, pH > 7'de, membran molekülünü ayırtma etme yetkinliği 600 ila 800 g mol⁻¹ arasında olan NTR7450 ve NTR7470 membranları ferülik asidin elektrostatik etki ile tutmayarak ve karbohidrat olan ksilozun yanı sıra arabinoz ve glukozun da geçirilmesine izin verir. Bu durum, şekerleri tutan ve ferülik asidin asidik pH' da (< 3) geçmesine izin veren ve şimdiye kadar dikkatlerin odaklandığı daha düşük membran molekülünü ayırtma etme yetkinliği (< 400 g mol⁻¹) membranlarla karşılaştırıldığında, ferülik asidin yüksek oranda geri kazanımı için umut verici bir potansiyel sunduğu rapor edilmiştir. Bu bilgilere ek olarak bu sistemi 10 barda çalıştırarak elde edilen ferülik asit değeri %85 ve ksiloz için %20 olarak rapor edilmiştir (Domingos, Teixeira vd. 2020).

Yapılan diğer bir çalışmada buğday kepeğinden ferülik asit geri kazanımı için eksiksiz bir strateji geliştirilmiştir. *T. xylanilyticus* hemiselüloz kokteyli ile enzimatik hidroliz, başlangıçta mevcut olan ferulatın %48,5'inin geri kazanılmasını sağlarken,

saflaştırma aşaması hidrolizatlardan ferulatın %44,9'unun geri kazanılmasını sağlamıştır. Ferülik asidin total olarak geri kazanımı %21,8'e ulaştırmayı başarmışlardır. Ayrıca, ferülik asit ve tuzlardan arındırılmış bir karbonhidrat fraksiyonu daha sonraki bir saflaştırma adımı için kullanılabilir. Ferülik asidin geri kazanımını ve saflığını artırmak için, enzimatik kokteyller Ferüloil esterazlar gibi yardımcı enzimlerle tamamlanabilir ve saflaştırma adımından önce asitleştirme, tuz ilavesinden kaçınan alternatif asitleştirme yöntemleri ile sağlanabileceğini ifade etmişlerdir (Dupoirion, Lameloise vd. 2017).

Ferülik aside ait antioksidan kapasite testlerinde elde edilen veriler yöntemle göre farklılık gösterse de toplam fenolik madde miktarı epigenetik faktörlere bağlı olduğundan dolayı farklılıklar mevcuttur. Ayrıca buğday tanesindeki fenolik asitlerin üç fraksiyonunu karakterize etmiştir: serbest asitler, çözünür ester bağlarındaki asitler ve çözünmeyen komplekslerde oluşan asitler. İkincisinde sadece ferülik asit ifade edilir. Buğday çeşidine bağlı olarak, içeriği 274,8 ila 337,6 ppm arasında değiştiği rapor edilmiştir. Serbest fenolik asitler toplam fenolik asitlerin %2-3,5'ini oluşturmuştur. Tüm serbest fenolik asitler arasında ferülik asidin baskın olduğu bilinmektedir. İçeriği buğday çeşidine bağlı olarak 0,2 ila 6,3 ppm arasında değiştiği rapor edilmiştir. Ester bağlarında sinapik, ferülik, vanilik ve şiringik asitler sırasıyla 16,9- 30,5 ppm, 8,6 – 17,6 ppm, 4 – 7,2 ppm ve 1,7 – 6,5 ppm'e ulaşan en yüksek miktarlarda bulunmuştur (Hatcher ve Kruger 1997). Yapılan çalışmaların sonuçları, ferülik asit içeriğinin çeşide bağlı bir özellik olduğu tezini desteklemektedir. Ferülik asidin DPPH yöntemi kullanarak elde edilen veride $27,3 \pm 0,8$ (%) olarak rapor edilmiştir (Kikuzaki, Hisamoto vd. 2002). Yapılan diğer bir çalışmada ferülik asidin DPPH yöntemi ile serbest radikal analizi sonucu $26,9 \pm 0,002$ olarak rapor edilmiştir (Yang, Chen vd. 2021). Ferülik asidin antioksidan kapasite testinin diğer bir yolu ise ABTS yöntemi kullanılmasıdır. Bu kapsamda yapılan bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ferülik asidin, 1 μM konsantrasyonunda $0,593 \pm 0,006$; 5 μM $0,517 \pm 0,007$; 20 μM $0,304 \pm 0,009$ ve 100 μM 'da ise $0,131 \pm 0,002$ şeklinde rapor edilmiştir (Maurya ve Devasagayam 2010). Toplam fenolik içerik analizlerinde sıklıkla tercih edilen yöntemlerden biri ise Folin-Ciocalteu yöntemidir. Bu yöntem kullanılarak ferülik asidin toplam fenolik içerik miktarını 2,54 olarak ifade edilmiştir (Berker, Ozdemir Olgun vd. 2013). Aynı zamanda toplam fenolik indirgeme yeteneği çok yüksek olan ferülik asidin, yapılacak olan deneylerde kalibrasyon denklemleri elde edebilmek içinde kullanıldığı rapor edilmiştir (Danilewicz 2015).

Ferülik asidin antimikrobiyal etkinliği üzerine yapılan çalışmalarda *E. coli* ve *P. aeruginosa* için 100 mg/mL, *S. aureus* ve *L. monocytogenes* için sırasıyla 1100 mg/mL ve 1250 mg/mL şeklinde rapor edilmiştir. Bu etkinliğin temel sebebinin hücre zarındaki hidrofobik etkileşim değişiklikleri, negatif yüzey yükünün azalması ve hücrenin zarında yırtılma veya gözenek oluşumunun meydana gelmesi yoluyla (yük, hücre içi ve dışı geçirgenlik ve fizikokimyasal özellikler) temel hücre içi bileşenlerin sızması sonucunda mikroorganizmanın inaktivasyonu gerçekleşebileceği ifade edilmiştir (Borges vd. 2013). Diğer bir çalışmada ise *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* RSKK 574, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 için 256 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 'de etkinlik gösterirken, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Candida albicans* ATCC 1023, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 90028 için 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak minimum inhibitör konsantrasyonları rapor edilmiştir (Ergün, Çoban vd. 2011).

Bu tez çalışmasının başarıya ulaşabilmesi sonucunda Siyez (*Triticum monococcum*) ve Gernik (*Triticum dicoccum*) buğdaylarından ekstrakt edilecek olan ferulik asidin gıda, kozmetik ve sağlık sektöründeki potansiyel kullanım alanlarının giderek genişlemesi ve birden farklı metabolit ile kombinasyonu sonucunda ortaya çıkabilecek yeni ürünlerin, farmasötik, terapötik, antimikrobiyal ve/veya besin desteği olarak kullanımı teşvik etmeyi amaçlayarak halk sağlığını bir adım ileri taşımayı hedefler. Saflaştırma tekniğinin geliştirilmesi ve ülkemizin dışa bağımlı olan bir kalemini ortadan kaldırarak, istihdam oluşmayı amaçlar. Bu tez çalışması kapsamında Siyez ve Gernik buğdaylarından ekstrakte edilen ferulik asidin fonksiyonel gıda bileşenlerinin analizi HPLC cihazında analiz edilerek, buğday kepeğinden saflaştırılan ferulik asidin antioksidan, antimikrobiyal ve antikarsinojenik testleri ferulik asidin analitik standardı ile kıyaslanarak tamamlanmıştır.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Buğday Çeşitleri

Tez kapsamında kullanılan deneme materyalleri olarak Prof. Dr. Taner Akar'ın yürütücülüğünde gerçekleştirilen 214O401 Tübitak proje numaralı 'Türkiye ve Azerbaycan Kökenli Kavuzlu Buğdayların Genetik Yakınlıklarının Belirlenmesi ve Besin İçeriği Yüksek Genotiplerin Geliştirilmesi' isimli proje kapsamında yetiştirilen buğday materyalleri kullanılmıştır (Çancı, Karhan vd. 2018). İlgili projede Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama arazisine ilgili projede 1 m² sıra olacak şekilde ekilmiş ve hasat sonrası laboratuvara getirilerek denemelere dahil edilmiştir. Şekil 3.1'de tez kapsamında ekilen buğdayların görüntüsü sunulmaktadır. Çalışmalarda ticari ürünlerdeki ferülik asit içerikleri kapsamında kullanılan un, kepek, ırmık ve bulgur numuneleri Antalya Bölgesinde faaliyet gösteren ticari işletmelerden temin edilmiştir.



Şekil 3.1. Tez kapsamında ekilen buğdayların görüntüsü. A: Gernik (*Triticum dicoccum*)
B: Siyez (*Triticum monococcum*)

Tez kapsamında ekilen buğday çeşitlerinin isimleri aşağıdaki Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan Siyez ve Gernik buğday hatları

Buğday türü	Buğday türü
Siyez 1	Gernik 1
Siyez 2	Gernik 3
Siyez 6	Gernik 6
Siyez 8	Gernik 15
Siyez 9	Gernik 17
Siyez 10	Gernik 20
Siyez 12	Gernik 21
Siyez 14	Gernik 25
Siyez 18	Gernik 37
Siyez 19	Gernik 38
Siyez 23	Gernik 39
Siyez 24	Gernik 42
Siyez 25	Gernik 43
Siyez 28	Gernik 45
Siyez 37	Gernik 46

3.2. Kimyasal ve Sarf Malzemeleri

Tez kapsamında kullanılan kimyasal ve sarf malzemelerine yönelik detaylı bilgiler Çizelge 3.2’de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal ve sarf malzemelerine ait bilgiler

Kimyasalın Adı	Marka/Ülke	Kullanım amacı
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Tekkim / Türkiye	Ferülik asit analizlerinde kullanılmıştır.
Hidroklorik asit (HCl) %37	Merck / Almanya	Ferülik asit analizlerinde kullanılmıştır.
Etanol (EtOH) HPLC grade	Tekkim / Türkiye	Ferülik asit analizlerinde kullanılmıştır.
Metanol (MeOH) HPLC grade	Merck / Almanya	HPLC cihazı mobil faz hazırlamada kullanılmıştır.
Potasyum di Hidrojen Fosfat (KH ₂ PO ₄)	Sigma /Almanya	HPLC cihazı mobil faz hazırlamada kullanılmıştır.

(Devamı Arkada)

Kimyasalın Adı	Marka/Ülke	Kullanım amacı
Orto- Fosforik asit, (O- H ₃ PO ₄)	Isolab / Almanya	HPLC cihazı mobil faz hazırlamada kullanılmıştır.
Kloroform (CHCl ₃)	Sigma /Almanya	Saflaştırma çalışmalarında kullanılmıştır.
Hekzan (C ₆ H ₁₄)	Sigma /Almanya	Saflaştırma çalışmalarında kullanılmıştır.
Ferüloil esteraz	Megaenzyme / A.B.D.	Saflaştırma çalışmalarında kullanılmıştır.
ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic)	Sigma / Almanya	Antioksidan aktivite çalışmalarında kullanılmıştır.
Potasyum persülfat (K ₂ S ₂ O ₈)	CarloErba / Almanya	Antioksidan aktivite çalışmalarında kullanılmıştır.
DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)	Sigma /Almanya	Antioksidan aktivite çalışmalarında kullanılmıştır.
Folin-Ciocalteu	Merck / Almanya	Antioksidan aktivite çalışmalarında kullanılmıştır.
Sodyum karbonat (Na ₂ CO ₃)	Tekkim / Türkiye	Antioksidan aktivite çalışmalarında kullanılmıştır.
Gallik asit >%99	Sigma / Almanya	Antioksidan aktivite çalışmalarında kullanılmıştır.
Ferülik asit >%99	Sigma / Almanya	HPLC cihazında ferülik asit validasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.
Piridin >%99 (C ₅ H ₅ N)	Isolab / Almanya	Saflaştırılan ferülik asidin yapısal analizlerinde GC-MS cihazında türevlendirici ajan olarak kullanılmıştır.
N-Metil-N-(trimetilsilil)trifloroasetamid >%99	CarlRoth / Almanya	Saflaştırılan ferülik asidin yapısal analizlerinde GC-MS cihazında türevlendirici ajan olarak kullanılmıştır.
Fetal bovine serum (FBS)	Biological Industries / İsrail	Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
Esansiyel olmayan amino asit (NEAA)	Gibco / İngiltere	Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
Antibiyotik-antimikotik (Anti-Anti)	Gibco / İngiltere	Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
DMEM Yüksek Glikoz Medium	Capricorn / Almanya	Hücre kültürü ortamı olarak kullanılmıştır.
Fosfat tampon çözeltisi (PBS)	Sigma / Almanya	Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
Tripsin (TrypZean)	Merck / Almanya	Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.

(Devamı Arkada)

Kimyasalın Adı	Marka/Ülke	Kullanım amacı
Paklitaksel	Corden Phanna Latina S.p.A Via del Mul'illo / İtalya	Hücre kültürü çalışmalarında kontrol grubu olarak kullanılmıştır.
Bağlanma Faktörü Proteini (Attachment Factor)	Cascade Biologics / İsrail	Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
Dimetil sülfoksit, DMSO>%99	Isolab / Almanya	Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
Nutrient agar	Sigma / Almanya	Mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılmıştır.
Eozin Metilen Blue agar	Sigma / Almanya	Mikrobiyolojik analizlerde kullanılmıştır.
Müeller-Hinton agar	BD-Difco / A.B.D.	Mikrobiyolojik analizlerde kullanılmıştır.

Tez çalışmasında kullanılan tüm plastik malzemeler, cam malzemeler, HPLC analiz şişeleri, metal kaşıklar, tek kullanımlık 10 ml'lik steril pipetler ve şarjlı otomatik pipet ise ISOLAB / Almanya firmasından, mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan 90 mm çapında olan petri kapları Fıratmed / Türkiye firmasından ve hücre kültürü çalışmalarında kullanılan 75 cm² hücre kültür şişesi Corning / A.B.D. firmasından temin edilmiştir. Çizelge 3.3'te doktora tezi kapsamında kullanılan analitik cihazlara yönelik bilgiler sunulmuştur.

3.3. Denemeler Kapsamında Kullanılan Cihazlar

Çizelge 3.3. Doktora tezi kapsamında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

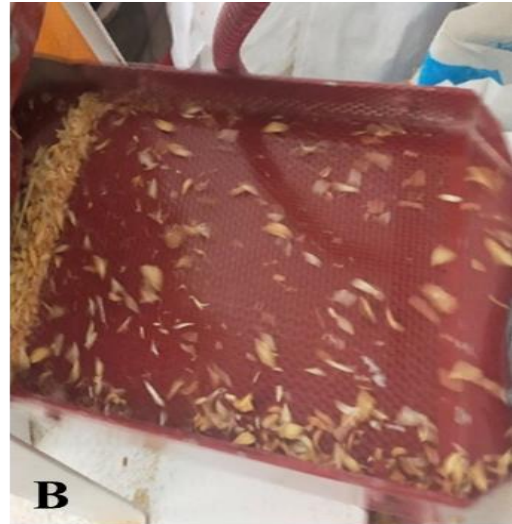
Cihaz	Marka / Model	Kullanım Amacı
pH Metre	Ohaus Starter / 3100M	pH ayarlama çalışmalarında kullanılmıştır.
Ultra Derin Dondurucu Buzdolabı	ThermoScientific / Forma 88000 Series	-80°C’de muhafaza edilmesi gereken numune ve kimyasalların depolanmasında kullanılmıştır.
Steril kabin	Tezsan	Hücre kültürü ve mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılmıştır.
Santrifüj Cihazı	Hettich Rotina / 420R	Numunelerin karıştırılması ya da supernatant kısmının ayrıştırılması çalışmalarda kullanılmıştır.
Santrifüj Cihazı	Hettich Mikro / 120	
Vorteks Cihazı	Dragonlab / MX-S	Numune ve hazırlanan kimyasalların homojenize edilmesi işlemlerinde kullanılmıştır.
Saf Su Cihazı	Mes MP / MiniPure	Çalışmalarda gerekli safve ultra saf su temininde kullanılmıştır.
Tartım cihazı	Ohaus / PA224C	Yapılan çalışmalarda tüm hassas tartım gereken aşamalarda kullanılmıştır.
Soğutucu	HotPoint Ariston	Numunelerin ve kimyasalların saklanması amacıyla kullanılmıştır.
Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon cihazı	SuperEx / F-500	Saflaştırma çalışmalarında kullanılmıştır.
Ultrasonik banyo	ISOLAB	Ekstraksiyon çalışmalarında kullanılmıştır.
Laboratuvar tipi öğütücü	IKA / MF10 Basic	Buğday fraksiyonlarının öğütülmesi için kullanılmıştır.
Laboratuvar tipi valsli un değirmeni	Makswell Innovation / (rollermaks)	Buğdayların kepek ve un fraksiyonlarını ayırmak için kullanılmıştır.
Kavuz soyma makinası	Uğur / Promilling	Buğday numunelerinin kavuz fraksiyonundan ayrılması için kullanılmıştır.
Spektrofotometre	Agilent / Cary60	Antioksidan kapasite testlerinde kullanılmıştır.

(Devamı Arkada)

Cihaz	Marka / Model	Kullanım Amacı
Flöresans Mikroskopi	Leica / DMi8	Hücre kültürü testlerinde kullanılmıştır.
Etüv	Thermo / Water-jacketed	Mikrobiyolojik ve hücre kültürü çalışmalarında inkübasyon aşamasında kullanılmıştır.
Dansitometre	Bio-San / DEN-1	Antimikrobiyal duyarlılık testlerinde mikroorganizmaların 0,5 McFarland değerlerini ölçmek için kullanılmıştır.
Otoklav	Tomy / SX-500E	Deneylerde kullanılan laboratuvar ekipmanlarının sterilizasyonunda kullanılmıştır.
Otoklav	Tomy / SX-500E	Deneylerde kullanılan laboratuvar ekipmanlarının sterilizasyonunda kullanılmıştır.
Döner Buharlaştırıcı	Heidolph / Laborta 4000	Ekstrakte edilen materyaldeki çözücünün uzaklaştırılmasında kullanılmıştır.
Dondurarak Kurutma Cihazı	Deep Dryer / LY05	Safleştirme çalışmalarında kullanılmıştır.
Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi	Agilent / 5975C GC-MS	Safleştirilen ferülik asidin yapı tayini çalışmalarında kullanılmıştır.
FT-IR / FT-NIR Spektrometre	Perkin Elmer / Spektrum 400	Safleştirilen ferülik asidin yapı tayini çalışmalarında kullanılmıştır.

3.4. Buğday Numunelerinin Ön Hazırlık İşlemleri

Hasat edilip laboratuvara getirilen deneme materyallerinin sap ve başak kısımları ayrılmıştır ve ardından her bir buğday hattı laboratuvar tipi kavuz soyma makinası yardımıyla kavuzlarından ayrılmıştır. Şekil 3.2’de tez çalışması kapsamında hasat edilen buğdayların kavuzlarından ayrılma işlemi gösterilmiştir.



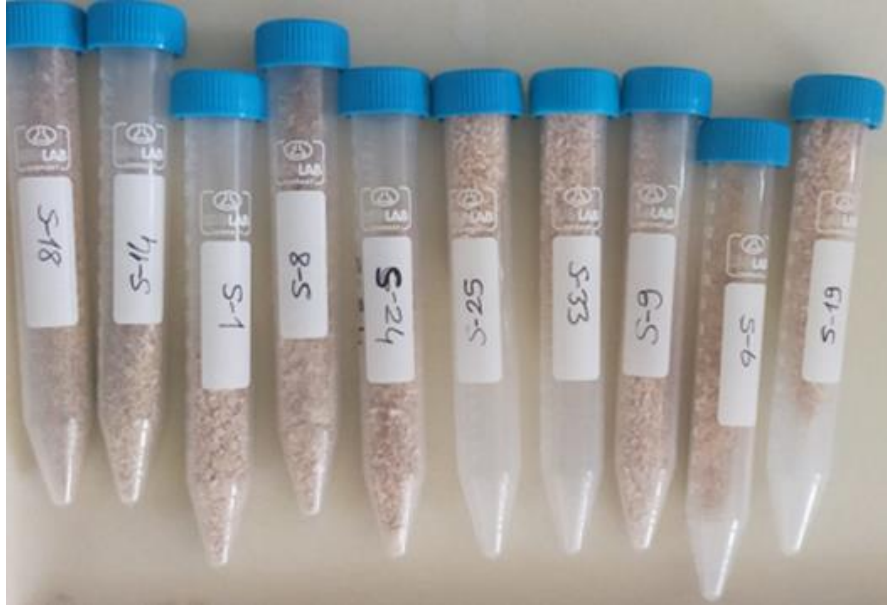
Şekil 3.2. Laboratuvar tipi kavuz soyma makinası

Kavuzlarından ayrılan Siyez ve Gernik buğdayları laboratuvar tipi valsli un değirmeni yardımıyla un ve kepek fraksiyonlarına ayrılmıştır. Bu kapsamda her bir buğday çeşidi ayrımı sonrasında cihaz fırça ile temizlenmiş ve sürtünmeden dolayı ısındığı için uygulamalar arasında soğuması için beklenmiştir. İşlemler sırasında kullanılan laboratuvar tipi valsli un değirmeni Şekil 3.3'te gösterilmiştir.



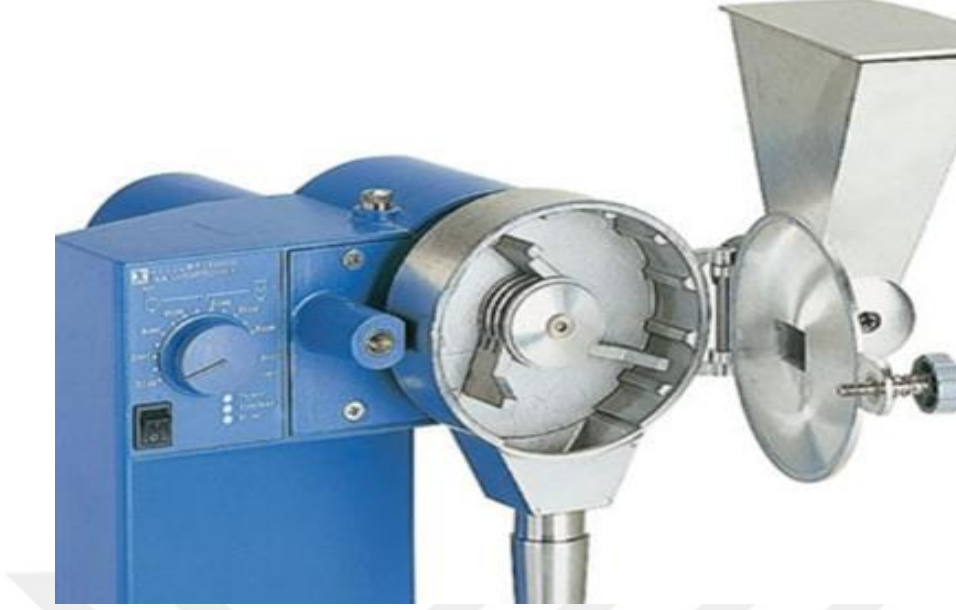
Şekil 3.3. Laboratuvar tipi valsli un değirmeni

Buğdayların ayrılan kepek ve un fraksiyonları steril 15 ml plastik santrifüj tüplere alınmıştır. Şekil 3.4'te tüplere alınarak kodlanan numunelere ait bir görsel sunulmaktadır.



Şekil 3.4. Steril tüplere alınan kepek fraksiyonları

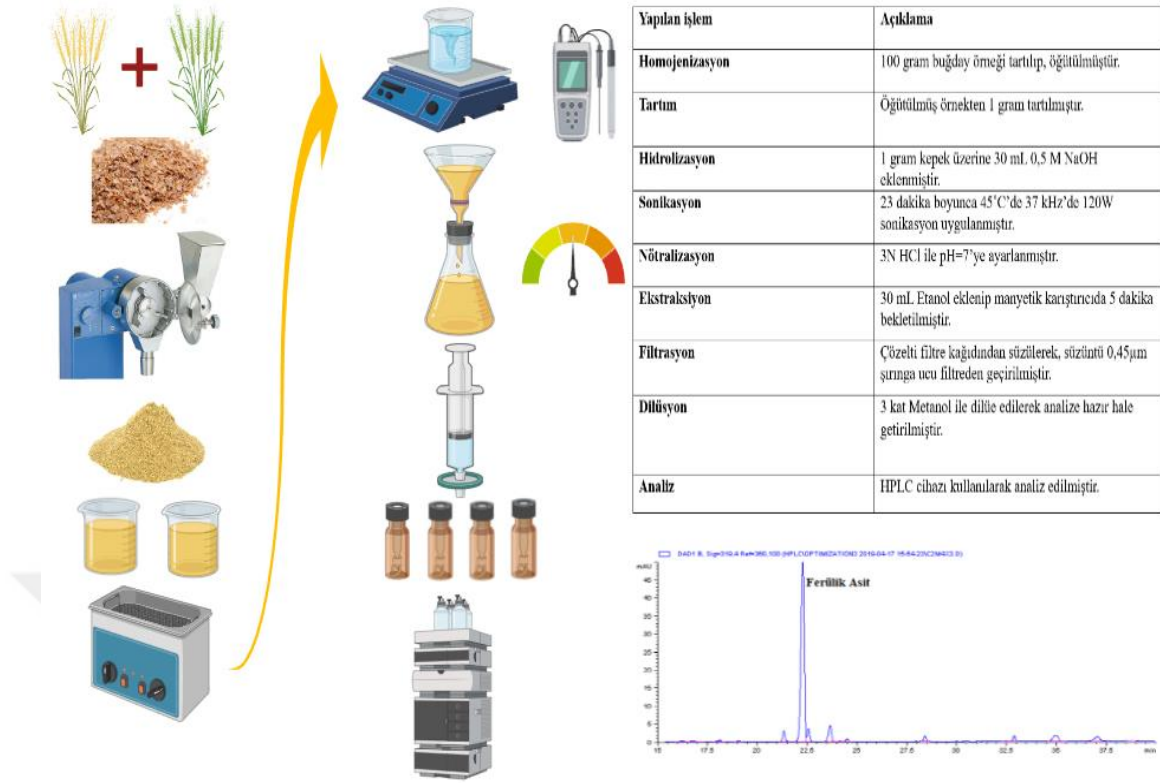
Kodlanan kepek numuneleri laboratuvar tipi bir değirmen kullanılarak öğütülmüş, 80 mesh elekten geçirilerek hazırlanmış ve elde edilen numuneler direk olarak analize alınmıştır. Şekil 3.5'te laboratuvar tipi öğütücü gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Laboratuvar tipi öğütücü

3.5. Ferülik Asit Analizleri için Ekstraksiyon

Hazırlanan numunelerde bulunan ferülik asit düzeylerinin belirlenmesi (Cengiz vd. 2021) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Doktora tezi kapsamında üretilen bu yöntemdeki aşamalar özetle homojenizasyon, tartım, hidrolizasyon, sonikasyon, ekstraksiyon, filtrasyon ve dilüsyon aşamalarını içermekte olup ilgili aşamalar cevap yüzey yöntemi kullanılarak en uygun hale getirilmiştir. Yöntemin uygulanmasına yönelik bir görsel Şekil 3.6'da sunulmaktadır.



Şekil 3.6. Ferülik asit analizi için ekstraksiyon prosedürü

3.6. Ferülik Asidin HPLC Analizi

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ferülik asit analitik standartları ve Şekil 3.6 kapsamında hazırlanan numuneler Çizelge 3.4'te verilen şartlar altında HPLC cihazında analiz edilmiştir.

Çizelge 3.4. HPLC cihazının analitik koşulları

HPLC cihazı	Agilent 1200
Dedektör	Diode Array Detector (DAD)
Kolon tipi	C-18 ODS3 Intersil kolon (250mm x 4,6mm x 5µm)
Akış hızı	1 mL min ⁻¹
Kolon sıcaklığı	30°C
Dalga boyu	319 nm
Elüsyon profili	Izokritik A: %30 MeOH 50mM KH ₂ PO ₄ pH:3 (O-H ₃ PO ₄)
Enjeksiyon hacmi	10 µL

Numunelerdeki ferülik asit düzeylerinin belirlenmesi öncesinde HPLC analiz yöntemi sertifikalı ferülik asit analitik standardı ve kepek numunesi kullanılarak valide edilmiştir.

- **Doğruluk:** Bu çalışmalarda kalibrasyon grafiğinin düşük, orta ve yüksek ölçüm noktalarına uygun gelecek şekilde 6 farklı konsantrasyon denenmiştir. Analitleri içeren standart çözelti geri kazanım çalışma örneklerine eklenecek ve çalışma en az 6 paralel örnek hazırlanarak yapılmıştır. Hazırlanan örnekler HPLC cihazına üç kez enjekte edilmiş ve elde edilen sonuçlardan ortalama, standart sapma, bağıl standart sapma ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Geri kazanım değeri aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (Taverniers, Loose vd. 2004).

$$\% \text{ Geri kazanım} = (C1 - C2) / C3 \times 100$$

[C1 = Analit eklenmiş örnek, C2 = Analit eklenmemiş örnek, C3 = Eklenen miktar.]

- **Kesinlik:** Bu çalışmalarda ferülik asidin çıkış zamanı kesinliği, standart madde ve örnek ile yapılan enjeksiyonlarda elde edilen derişim değerine yönelik tekrarlanabilirlikler değerleri değerlendirilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçların bağıl standart sapma değeri tekrarlanabilirlik kesinliğini belirlemek için kullanılmıştır (Taverniers vd. 2004).
- **Seçicilik:** Bu amaçla HPLC cihazında bir boş enjeksiyon, analitleri içeren çözeltilerin enjeksiyonları ve analit ilave edilmiş örneklerin enjeksiyonları gerçekleştirilerek elde edilen kromatogramlar değerlendirilmiştir. Tespit sınırı ve ölçüm sınırı (LOD ve LOQ) kalibrasyon doğrusunda kullanılan en düşük derişimdeki analiz çözeltilerinin HPLC cihazına 10 kez enjeksiyonu yapılacak ve elde edilen pik alanlarının standart sapması hesaplanmıştır. Standart sapma

değerinin 3 katı tespit sınırı ve 10 katı ise ölçüm sınırı olarak ifade edilmiş olup bu veriler bulgular kısmında verilmiştir (Taverniers, Loose vd. 2004).

- **Doğrusallık:** Bu çalışma için en az 6 farklı derişim noktasında ve üç kez cihaza analitlerin standart çözeltileri enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçlar HPLC cihazına ait Chemstation yazılımı ve Minitab 18 yazılımı ile değerlendirilmiş ve kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur.

3.7. Ferülik Asit Saflaştırma İşlemleri

Saflaştırma çalışmaları kapsamında kromatografik yöntemlerle analiz edilen 15 adet Siyez ve 15 adet Gernik buğday hatları içerisinde en yüksek miktarda ferülik asit içeren hat deneme materyali olarak kullanılmış olup saflaştırma çalışmaları aşağıdaki ana başlıkları içermektedir.

3.7.1. Süper kritik karbondioksit ekstraksiyonu yöntemi kullanılarak saflaştırma

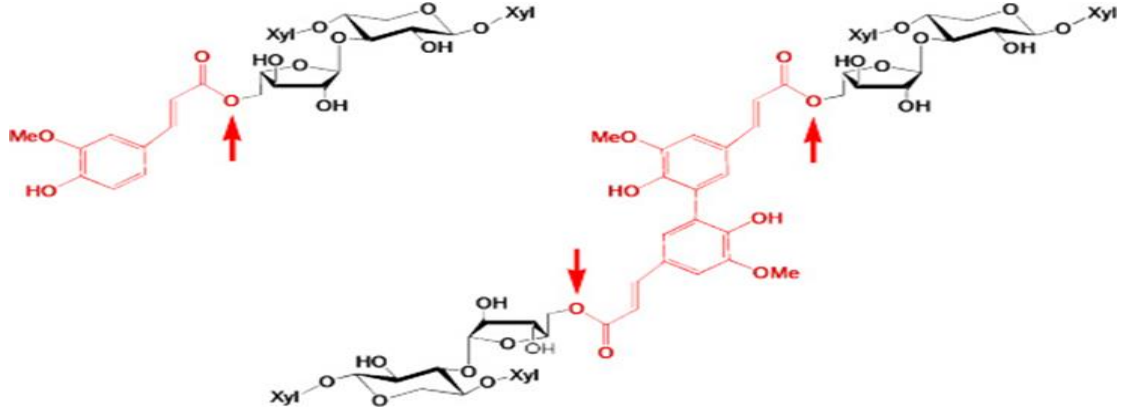
Bu amaçla 50 gram buğday kepeği laboratuvar tipi öğütücüde öğütülerek toz haline getirilmiştir. Bez bir kesenin içerine konulan öğütülmüş buğday kepeği süper kritik karbondioksit ekstraksiyon cihazının ekstraktör haznesine yerleştirilmiştir. Üzerine 5 ml Etanol ekledikten sonra ekstraktörün kapağı kapatılmıştır. Ekstraktör sıcaklığı 50°C ve sistem basıncı 250 bar olacak şekilde 165 dakika sonucunda elde edilen özütten ferülik asit analizi HPLC cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.7.2. Çözücü ekstraksiyonu ile saflaştırma

Bu çalışmalar sırasında Şekil 3.6'da sunulan ferülik asidin HPLC analizi için ekstraksiyonunda kullanılan prosedür esas alınmış ve ilgili prosedür en yüksek ferülik asit ekstraksiyon verimi açısından en uygun hale getirilmiştir.

3.7.2.1. Enzim ilavesi

Enzim ilavesinin ferülik asit saflaştırması üzerine etkisini belirlemek amacıyla Şekil 3.6'da belirtilen ekstraksiyon prosedüründe numunelerin homojenizasyonu ve tartımı işlemlerinden sonra su fazı içine enzim ilave edilmiş ve pH ayarlamasından sonra inkübasyonun ardından ekstraksiyon işlemlerine hidrolizasyon aşaması ile devam edilmiştir. Bu çerçevede kullanılan ezim olan ferüloil esteraz Rumen mikroorganizmalardan (virüs, protozoa ve bakteri) elde edilebilen bir enzim olup, bu enzimin Şekil 3.10'da sunulan mekanizma çerçevesinde bitki hücre duvarlarından esterleşmiş fenolik asitleri hidrolize edebildikleri bildirilmektedir (Faulds ve Williamson 1995). Buğday kepeğinden ferülik asidin saflaştırılmasında hücre duvarına kovalent bağlı olan ferülik asidi bağlı formdan serbest forma dönüştürülmesi amaçlanarak, saflaştırma oranının artırılması hedeflenmiştir. Bu enzimin aktivasyonu için 10 gram buğday kepeği öğütülerek üzerine 100 ml saf su eklenmiş ve karışımın pH'sı 7'ye ayarlanmıştır. Bu işlem sonrasında 10 µl ferüloil esteraz enzimi eklenerek 37°C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Faulds 2010, Faulds ve Williamson 1991, Topakas, Vafiadi vd. 2007). Bu işlemin ardından Şekil 3.7'de belirtilen ekstraksiyon işlemlerine hidrolizasyon aşaması ile devam edilmiştir.



Şekil 3.7. Ferüloil esteraz enziminin arabinoksilan ile ferülik asit arasındaki ester bağlarını kesmesi (Puchart, Šuchová vd. 2023)

3.7.2.2. Ultrasonik koşulların en uygun hale getirilmesi

Bu aşamada ferülik asidin optimum ekstraksiyon koşullarının belirlenebilmesi için yanıt-yüzey metodolojisinden faydalanılmıştır. Minitab 18 programı kullanılarak iki değişkenli merkezi bileşik tasarım (Varsayılan alfa: 1.414, Güven aralığı: %95, Güven aralığı türü: İki taraflı olarak belirlenmiştir.) oluşturulmuştur. Elde edilen deney planı çizelge 3.5'te sunulmuştur.

Çizelge 3. 5. İki değişkenli merkezi bileşik tasarım kullanılarak elde edilen deney planı

Deney No	Sıcaklık (°C)	Süre (dak)
1	21,71	20,00
2	30,00	10,00
3	30,00	30,00
4	50,00	5,86
5	50,00	20,00
6	50,00	34,14
7	70,00	10,00
8	70,00	20,00
9	78,28	30,00

3.7.2.3. Farklı çözenlerin etkisi

Bu çalışmalarda ferülik asidi çözelti ortamında en yüksek düzeyde çözebilecek çözenin belirlenmesi amaçlanmıştır. Şekil 3.6'da kapsamında uygulanan homojenizasyon, tartım, hidrolizasyon ve sonikasyon işlemlerinin ardından ekstraksiyon aşamasında ferülik asidin farklı çözen ortamlarında çözünürlüğünü ve ekstraksiyon verimine etkisini belirlemek amacıyla farklı çözenler (etanol, metanol ve aseton) kullanılmış ve ardından filtrasyon ve dilüsyon işlemleri uygulanarak HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.7.2.4. Mumsu bileşenlerin uzaklaştırılması

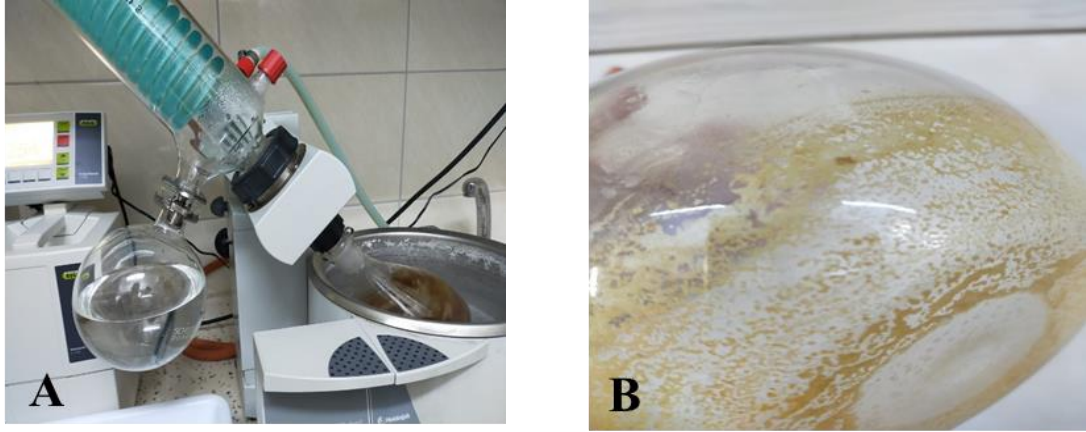
Bu işlem sırasında şartları Bölüm 3.5 kapsamında en uygun hale getirilen ekstraksiyon yöntemi 50 gram numune kullanılarak yeniden hazırlanmış ve elde edilen çözeltide bulunan mumsu bileşenleri uzaklaştırmak amacıyla çözelti 24 saat süresince -20°C'de bekletilmiştir. Süre sonunda buhner hunisi, nüçhe erleni ve vakum pompası yardımıyla çözelti soğuk ortamda süzölmüş ve alt fazda elde edilen berrak çözelti ferülik asit bileşimi açısından analiz edilmiştir. Şekil 3.8'de bu çalışmalara ait görseller sunulmuştur.



Şekil 3.8. Mumsu bileşenlerin filtre edilerek uzaklaştırma işlemi

3.7.2.5. Döner buharlaştırıcı işlemi

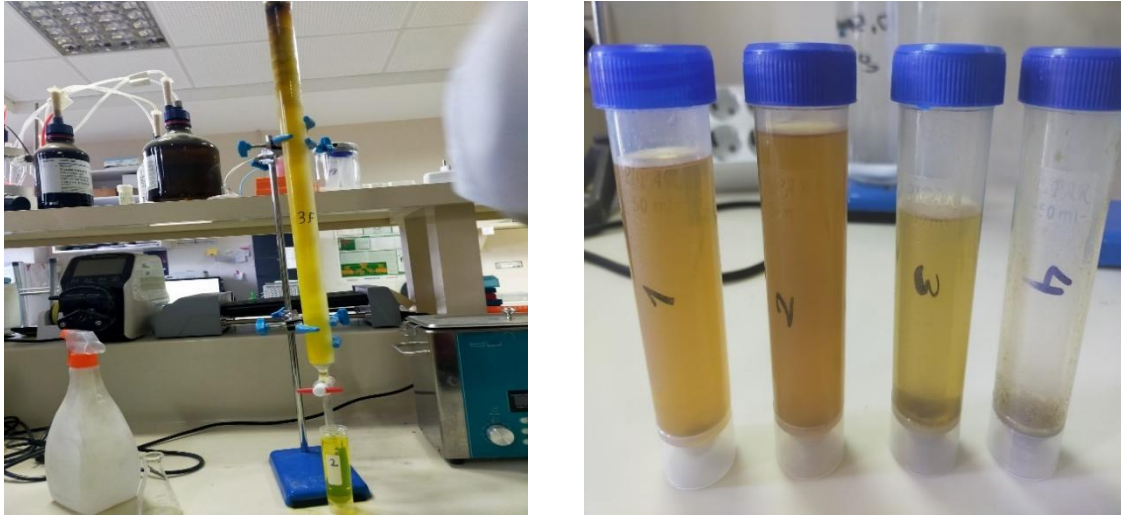
Mumsu bileşenlerden uzaklaştırılan materyalde bulunan ferülik asidin konsantre edilmesi amacıyla bir döner buharlaştırıcı sistemi kullanılmıştır. Bu amaçla döner buharlaştırıcı sıcaklığı 85°C ve vakum değeri 300 mbar ayarlanmış ve 2,5 saat uygulama sonucunda çözeltinin sıvı fazı tamamen uzaklaştırılmıştır. Sıvı fazın uzaklaştırılması sonucu elde edilen katı faz HPLC sisteminin kalibrasyon aralığına düşecek şekilde metanol ile çözöndürölerek Çizelge 3.4'te belirtilen şartlar altında ferülik asit içeriği açısından analiz edilmiştir. Bu kapsamda Şekil 3.9'da görsellerde sunulmuştur.



Şekil 3.9. Döner buharlaştırıcı işlemi sonrasında elde edilen çözelti

3.7.2.6. Kolon kromatografisi ile saflaştırma

Mumsu bileşenlerinden ayrılarak kısmen saflaştırılan deneme materyali öncelikle bir döner buharlaştırıcı yardımıyla çözücüsü uzaklaştırılmış ve ardından içinde bulunan ferülik asidin diğer girişim maddelerinden ayrılması amacıyla 30 mm çapında 100 cm uzunluğunda bir cam kolon temin edilerek içi silika jel dolgu maddesi ile doldurulmuştur. Ardından n-Hekzan ile şartlandırılan kolona hazırlanan materyal yüklenmiştir. Materyalin kolonda yürütülmesi için mobil faz olarak TLC çalışması sonuçlarına göre en yüksek ayrımı sağlayan kompozisyon olan etil asetat ve n-Hekzan içeren çözelti kombinasyonu kullanılmıştır. Çalışmayı özetleyen görseller Şekil 3.10'da sunulmaktadır.



Şekil 3.10. Buğday kepeği ekstraksiyonunun silika jel kolondan yürütülmesi ve toplanan elüatlar

3.7.2.7. Dondurarak kurutma işlemi

Bu yöntemde Şekil 3.6'da belirtilen prosedüre göre, 10 gram buğday kepeği laboratuvar tipi bir öğütücüde öğütüldükten sonra 300 ml Ultra saf su ve 10 µl ferüloil esteraz enzimi eklenerek 24 saat süresince 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 0,5M NaOH elde edilecek şekilde 6 gram NaOH peleti eklenmiştir. NaOH peletleri çözündükten sonra optimize edilen ultrasonik koşullar altında (44.57 °C 'de 23 dakika) ultrasonik ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Ultrasonik ekstraksiyon işlemi sonunda oda sıcaklığına gelen buğday kepeğinin pH değeri 3N HCl ile 7'ye getirilmiştir. Karışıma 300 ml EtOH (%99,9) eklenerek karbonhidrat ve protein yapılarının uzaklaştırılması hedeflenmiştir. Yaklaşık 650 ml olan ferülik asitten zengin olan ekstraksiyon sıvısı buhner hunisi ve vakum pompası yardımıyla katı fazdan ayrıştırılır. Süzüm işlemi gerçekleştirildikten sonra çözeltinin içinde bulunan etanol döner buharlaştırıcı yardımıyla 70 °C'de 300 mbar basınç altında uzaklaştırılmıştır. Geride kalan sıvı faz dondurarak kurutma işleminin gerçekleştirileceği cihazın tepsilerine koyularak 48 saat boyunca -1000 bar basınç altında -25°C'de kurutulmuştur. Süre sonunda katı faz tepside kazınarak steril tüplerin içine alınmıştır. Şekil 3.11'de bu işleme ait görseller sunulmuştur.



Şekil 3.11. Soldaki görüntü dondurarak kurutma işlemi öncesini, sağdaki ise dondurarak kurutma işlemi sonrasını göstermektedir

3.8. Ferülik Asidin Yapısal Analizleri

Tez çalışmasını kapsamında buğday kepeğinden saflaştırılacak olan ferülik asidin yapısal analizleri spektrofotometrik ve kütle spektroskopik teknikler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.8.1. Spektrofotometrik analizler

Buğday örneklerinden ekstrakte edilerek saflaştırılan ferülik asidin spektrofotometrik analizleri Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma çalışmalarından sonra elde edilen ferülik asidin homojen haldeki preparatları bir baget yardımıyla alınarak FTIR cihazının Attenuated Total Reflectance (ATR) kristali üzerine bırakılmış ve baskılama kolu yardımı ile tüm örnekler için aynı oranda ve spektrumu en iyi şekilde açığa çıkaran bir basınç

uygulanmıştır. Her numune taranması öncesinde havaya karşı background spektrumu alınarak temel durum belirlenmiştir. Spektrum oda sıcaklığında numune başına 4 ölçüm olacak şekilde yapılmıştır. Tarama işlemleri $4.000-650\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında ve 4 cm^{-1} çözünürlükte gerçekleştirilmiş olup ve numune her okumada 4 tarama yapılarak spektrumu elde edilmiştir.

3.8.2. Kütle spektrometrik analizler

Ferülik asidin ticari olarak satın alınan standart molekülü gaz kromatografisi kütle spektrometri (GC-MS) cihazında 70 eV değeri uygulanmış olup ve bu voltaj değerlerine ait fragmantasyonu belirlenmiştir. Elde edilen fragmantasyonda her bir fragmanın moleküler ağırlığı, iyon geçişleri, moleküler pik ve base pik oranları dikkate alınarak en uygun fragman kütleleri belirlenmiştir. Saflaştırılan numunelerin GC-MS cihazında yapısal ekstraksiyonu ve analitik koşulları (Razboršek, Ivanović vd. 2021) ve (Kumar, Kk vd. 2009) tarafından bildirilen yöntemlere göre minör değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. İlgili ekstraksiyon yöntemine göre hazırlanan saflaştırılmış materyal 1,5 mL son hacim olacak şekilde metanol içerisinde seyreltilerek üzerine 50 μL piridin ve 100 μL MTSFA eklenerek 85°C 'de 1 saat süresince etüvde bekletilmiştir. Süre sonunda oda sıcaklığına gelen ferülik asit analitik standardı ve saflaştırılan materyal GC-MS sistemine seçilen kütleler üzerinde tarama işlemleri Çizelge 3.6'da belirtilen şartlar altında gerçekleştirilmiştir. Son aşamada materyale ait olan fragmantasyon standarda ait olan fragmanla karşılaştırılmış olup, kütle spektrometrisi yazılımları kullanılarak elde edilen spektrumun yapısal benzerliği ortaya konulmuştur.

Çizelge 3.6. GC-MS cihazına ait analitik koşullar

GC-MS cihazı	Agilent / 5977 GC-MS
Dedektör	Alev İyonizasyon Dedektörü (FID)
Kolon tipi	HP-5MS (30 m x 0,25 mm, %5 fenil metilpolisiloksan sabit faz 0,25 m)
Taşıyıcı Gaz / Akış hızı	He / 1 mL min^{-1}
Fırın sıcaklığı ve Elüsyon profili	40°C 1 dakika, $10^\circ\text{C min}^{-1}$ artışlarla 300°C ve 300°C 'de 8 dakika
Enjeksiyon portu / Transfer hattı	250°C / 170°C
Kütle spektrometrisi / İyonizasyon enerjisi	Tarama modu 50-650 m/z / 70 ev
Enjeksiyon hacmi	1 μL
Bölme oranı	1:10
Analiz süresi	32 dk

3.9. Biyolojik Etkinlik Değerlendirme Çalışmaları

3.9.1. Antioksidan kapasite testleri

Bu kapsamda ABTS yöntemi kullanılmıştır. (Re vd. 1999) İlgili yöntemle göre öncelikle 2,45 mM potasyum persülfat ($K_2S_2O_8$) 100 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu kapsamda 66 mg tartılıp üzerine 100 ml ultra saf su eklenmiş ve ardından manyetik karıştırıcı yardımıyla 5 dakika karıştırılmıştır. Sonrasında bu çözelti içerisine 1 tablet ABTS kimyasalı ilave edilerek 7 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti hazır hale gelebilmesi için 16 saat karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletilmesi gereklidir. ABTS stok çözeltisi kullanılmadan önce su: etanol (1:1, v/v) karışımı ile seyreltilmiştir. Bu hazırlanan çözeltiye ise ABTS çalışma çözeltisi ismi verilmiştir. Sonrasında ferülik asidin farklı konsantrasyonları hazırlanarak, bu çözeltilerden 20 µl alınmıştır ve üzerine 1980 µL ABTS çalışma çözeltisi eklenerek 6 dakika sonrasında 734 nm de absorbansları belirlenmiştir. Sonuçların hesaplanmasında Troloks standart eğrisinden yararlanılmıştır. E vitamininin suda çözülebilir ve antioksidan etkinliği olan troloks, biyokimyasal uygulamalarda yaygınca kullanılmaktadır (van den Berg, Haenen vd. 1999).

Troloks kimyasalı etanolde çözündürülerek, 1000, 500, 250, 125, 62,5 ve 31,25 µM farklı konsantrasyonları hazırlanmış ve 734 nm absorbans değerleri alınmıştır. Böylelikle hem çalışılan cihazın validasyonu hem de inhibisyon değerlerini belirlemek için kıyaslama parametreleri edinilmiştir. Numunelerin antioksidan kapasitesi konsantrasyona karşı absorbans değerleri için oluşturulan kalibrasyon denklemi kullanılarak tespit edilmiştir.

3.9.2. Serbest radikal analizleri

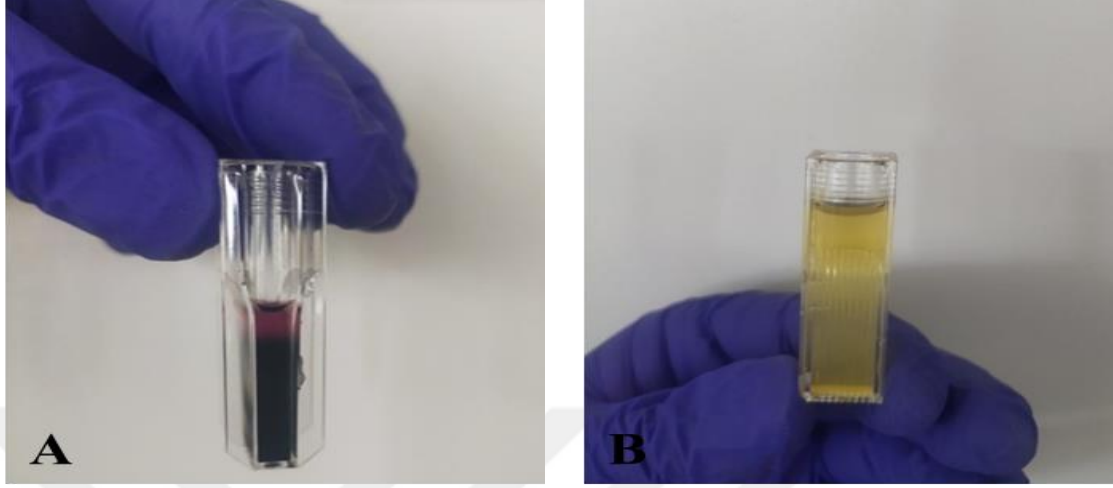
Bu kapsamda DPPH yönteminden yararlanılmıştır. (Yu vd. 2002) İlgili yöntemle göre, 0,1 mM DPPH metanolde hazırlanmıştır. Analiz edilecek ferülik asit içeren çözeltiden 1 ml alınıp, üzerine 0,1 mM 4 ml DPPH çözeltisi eklenmiş ve vorteksleme işleminden sonra oda koşullarında karanlıkta 30 dakika bekletilerek 517 nm'de absorbansları spektrofotometre cihazında okunmuş ve ardından aşağıdaki eşitlik yardımıyla %DPPH radikali giderme aktivitesi hesaplanmıştır.

$$\%DPPH \text{ radikali giderme aktivitesi} = \frac{\text{Kontrolün absorbansı} - \text{Örnek Absorbansı}}{\text{Kontrolün absorbansı}} \times 100$$

3.9.3. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi

Ferülik asidin toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi için Folin-Ciocalteu testi ile yapılmıştır. Bu kapsamda öncelikle %20'lik sodyum karbonat (Na_2CO_3) hazırlanmış olup Folin-Ciocalteu stok çözeltisi hazır olarak temin edilmiştir. Ferülik asidin farklı konsantrasyonları metanol içerisinde hazırlanarak, analiz edilecek çözeltilerden 100 µL, 500 µL Folin-Ciocalteu ve 1,5 mL %20'lik Na_2CO_3 karıştırıldıktan sonra son hacmi 10 ml'ye saf su ile tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında 2 saat karanlıkta bekletilmiş ve bulanıklık oluşması durumunda 4000g'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Sonrasında 765 nm'de spektrofotometre ile absorbans değerleri tespit

edilmiştir (Yu vd. 2002). Şekil 3.12’de antioksidan kapasite testleri ile ilgili görseller sunulmuştur.



Şekil 3.12. Antioksidan kapasite testlerine hazırlanan numunelerin analiz öncesi görüntüsü

3.10. Antimikrobiyal Etkinin Değerlendirilmesi

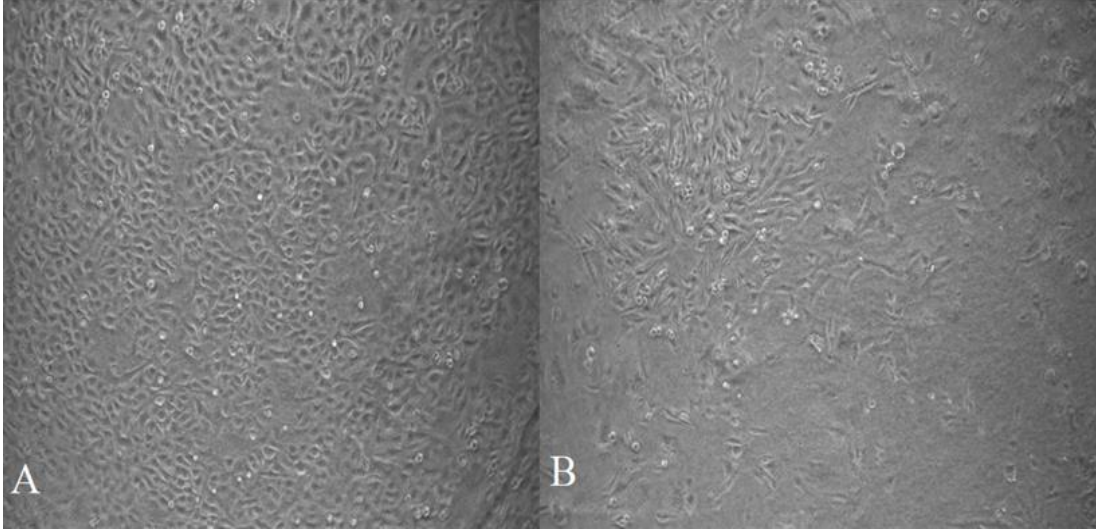
Mikroorganizmaların gelişmesi için Nutrient Agar ve Eozin Metilen Blue agar, antimikrobiyal duyarlılık testlerinde kullanılmak üzere Müeller-Hinton Agar hazırlanmıştır. Bu amaçla üretici firmanın direktiflerine uygun olacak şekilde 1 litre için belirtilen miktar tartılmıştır. Üzerine 1 litre distile su eklenerek, manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme tamamlandıktan sonra 121°C’de 15 dakika boyunca otoklavda steril edilmiştir. Otoklav işlemi bittikten sonra bek alevi ortamında 90 mm çapındaki petri kaplarına kalınlığı 2 mm olacak şekilde dökülmüştür. Besiyerleri kuruduktan sonra +4°C’ye kaldırılmıştır. Deneyler yapılmadan önce steril alanda ve bek alevinin etrafında yuvarlak uçlu metal öze akkor hale getirilerek Müeller-Hinton agar üzerinde 6 mm çapında delikler açılmıştır.

Antimikrobiyal duyarlılık testleri kapsamında kullanılacak olan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterileri uygun koşullarda yetiştirildikten sonra bek alevi etrafında steril bir ortamda, kolonilerden eküvyon çubuğu yardımıyla alınmış ve steril su içeren deney tüplerinin içerisine inoküle edilmiştir. Yukarıdaki inokülasyon işlemi sonrasında bir dansitometre yardımıyla 0,5 McFarland türbidimetri standardı sağlanmıştır. Son olarak 0,5 McFarland türbidimetri standardını sağlayan mikroorganizmalar Müeller-Hinton agar üzerine ekimleri gerçekleştirilmiştir.

3.11. Antikarsinojenik Etkinin Değerlendirilmesi

Belirtilen etkilerin değerlendirilmesinde ferülik asidin Uv koruyucu etkisinin literatürde geniş bir şekilde yer bulması nedeni ile insan melanoma hücre hattı olan SK-MEL-30 ve kontrol grubu olarak insan fibroblast hücre hattı BJ kullanılmıştır. Tez çalışması kapsamında kullanılmış olan SK-MEL-30 ve BJ hücre hattı Akdeniz Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümünden Dr. Öğr. Üyesi Ersin Akıncı'nın hücre koleksiyonundan temin edilmiştir. SK-MEL-30 ve BJ hücre hattı azot tankında -196 °C'de sıvı azot içerisinde muhafaza edilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarındaki tüm işlemler Class-2 biyogüvenlik kabini içerisinde yapılmış olup, kullanılmadan en az 15 dakika önce Uv lambası çalıştırılarak sterilizasyon sağlanmıştır. Tez çalışması kapsamında kullanılan SK-MEL-30 ve BJ hücre hattının gelişmesi için hazırlanan ortamın hazırlanması amacıyla yüksek glikoz (4,5 g/L), sodyum pirüvat ve L-glutamin amino asidinin dahil olduğu ortam şişesinden 60 ml alınmış olup, steril bir tüpe aktarılmıştır. Geride kalan 440 ml üzerine zengin bir protein çözeltisi olan ve 0,22 şırınga ucu filtreden geçirilmiş 50 ml Fetal Bovine Serum (FBS) eklenerek %10 oranında olması sağlanmıştır. Esansiyel olmayan amino asitler (N.E.A.A.) çözeltisi 5 ml eklenerek %1 oranında olması sağlanmıştır. Zararlı mikroorganizmaların üremesini engellemek amacıyla 5 mL penisilin-streptomisin (Pen-Strep) eklenerek %1 oranında olması sağlanmıştır. Son hacmi 500 ml olan ortam homojen olacak şekilde çalkalanıp, +4°C'de muhafaza edilmiştir.

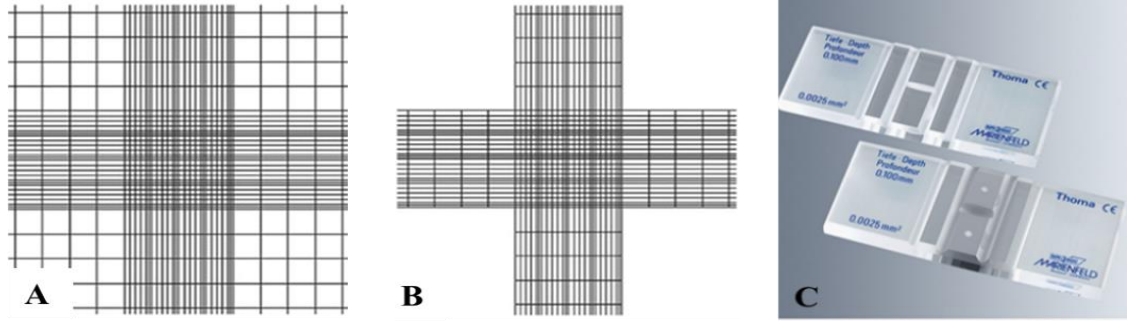
Hücrelerin çözdürülmesi ve ekilmesi kapsamında SK-MEL-30 ve BJ hücre hatları azot tankından alınarak 37°C sıcaklıktaki su banyosuna alınmıştır. Yaklaşık 5 dakika kadar bekletilmiştir. Kriyo tüplerin içerisinde bulunan hücrelerini zaman kaybetmeden Class-2 güvenlik kabini içerisine alarak 15 ml steril tüp içerisine hücreleri isimleri etiketlenerek ayrı ayrı konulmuş ve daha sonra hücre süspansiyonlarının üzerine 10 ml yukarıda belirtilen hücre kültürü ortamı (medium) eklenmiştir. Devamında 500 rpm'de yaklaşık 10 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernatant kısmı uzaklaştırılarak pellet kısmı üzerine önce 3ml hücre kültür ortamı konulmuş ve yavaş yavaş pipetaj yapılmıştır. Sonrasında 7ml daha eklenerek son hacimde 10ml olacak şekilde hücrelerin büyüüp, gelişebilmesi için gerekli ortamı sağlayacak olan 75 cm² hücre kültürü şişelerine alınarak %5 CO₂ ve 37°C sıcaklıktaki etüve kaldırılmıştır. Hücreler gün aşırı kontrol edilmiş olup, hücrelerin metabolik atıklarının uzaklaştırılması için, 3 günde bir hücre kültürü şişesinin içerisinden otomatik pipet yardımıyla tüm sıvı uzaklaştırıp, PBS ile 3 kez yıkanmıştır. Gerekli görüldüğünde tutunmayı arttırmak amacıyla kalsiyum ve magnezyum içeren PBS ile yıkanıp, hücrelerin şişe yüzeyine tutunmaları için gerekli olan kofaktörler de eklenmiştir. Akabinde 13 ml taze hücre kültür ortamı eklenerek ortam yenilenmiştir. Şekil 3.13'te hücrelerin mikroskop altındaki görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.13. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan hücreler A) BJ hücre hattı B) SK-MEL-30 hücre hattı

Hücrelerin büyüyüp gelişmesinin ardından pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hücre kültürü şişesinin zeminini %90 kadarını kapladığında sadece fiziksel olarak zemin yetersizliğinden değil stres faktörlerinden de dolayı hücrelerin yapıları bozulmadan hemen taze bir hücre kültürü şişesine alınması işlemidir. Bu kapsamda öncelikle hücrelerin içinde bulunduğu hücre kültürü sıvısı alındı ve PBS ile yıkanmıştır. Ardından hücre kültürü şişesinin tabanında hücrelerin yapışmasını sağlayan yapısal proteinlerin bağlarını koparmak amacıyla 3ml tripsin uygulanarak tekrar etüve kaldırılmıştır. 5 dakika sonra tabandan kalkın hücreler mikroskop ile gözlemlendikten sonra tripsin enziminin inaktivasyonu için koyulan tripsin miktarının 3 katı kadar 12 ml hücre kültürü sıvısı eklenmiştir. Devamında ise 500 rpm’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılarak pellet kısmı üzerine önce 3ml hücre kültür sıvısı konuldu ve yavaş yavaş pipetaj yapılarak pelletin homojenizasyonu sağlanmıştır. Sonrasında 7 ml daha eklenerek son hacimde 10 ml olacak şekilde 75 cm² hücre kültürü şişelerine alınarak %5 CO₂ ve 37°C sıcaklıktaki etüve kaldırılmıştır. Santrifüj sonrasında 15 ml steril tüp içerisinde bulunan pellet kısmındaki hücreler üzerine 3 ml hücre kültür ortamı eklenerek pipetaj yapılmış ve buradan 10 µl alınarak mikroskop altında sayılabilmesi için ‘thoma’ lamına yerleştirilmiştir. Sayım yapılacak alanlar belirlenerek aşağıdaki formülünden yararlanılmıştır. Şekil 3.14’te Thoma lamı ve mikroskop altındaki görüntüsü verilmiştir.

$$\text{Canlı hücre \%} = \frac{\text{Canlı hücrelerin mililitredeki toplam sayısı}}{\text{Tüm hücrelerin mililitredeki toplam sayısı}} \times 100$$



Şekil 3.14. Hücre sayımı için kullanılan Thoma lamı ve yüzeyinde bulunan kareler

Yukarıda belirtildiği şekliyle hazırlanan hücreler üzerine farklı konsantrasyonlarda saflaştırılan ferülik asit ve/veya ferülik asit analitik standardı uygulanmıştır. Hücre kültürü deneylerinde kullanılacak olan hücrelerin hazırlanmasına paralel olarak ferülik asidin ana stok konsantrasyonu 5000 μM ve 500 μM ara stok olacak şekilde DMSO içinde hazırlanmıştır. Hücre kültürü için kullanılan 96 yuvarlak kuyucuklu plakların son hacmi 200 μl olacak şekilde hazırlanmıştır. Bir kuyucuk içerisinde 100 μl hücre kültürü sıvısı içerisinde dozaj uygulanacak hücreler kalan 100 μl ise ferülik asidin farklı konsantrasyonu olarak uygulama gerçekleştirilmiştir. Deneyde kullanılan ferülik asidin farklı konsantrasyonları aşağıdaki Çizelge 3.7’de verilmiştir.

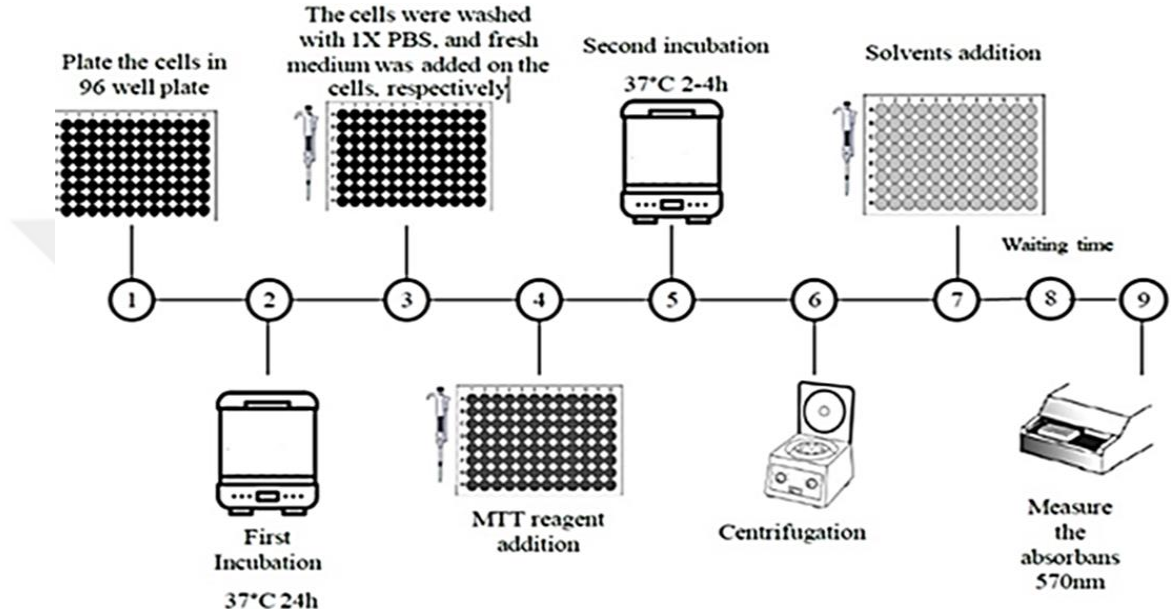
Çizelge 3.7. Ferülik asidin farklı konsantrasyonlarının hazırlanması

Hazırlanan Konsantrasyonlar	Ferülik asidin stok çözeltisinden alınan	Eklenen DMSO
5 μM	1 μl (500 μM ara stoktan alınan)	99 μl
25 μM	5 μl (500 μM ara stoktan alınan)	95 μl
50 μM	10 μl (500 μM ara stoktan alınan)	90 μl
100 μM	20 μl (500 μM ara stoktan alınan)	80 μl
250 μM	50 μl (500 μM ara stoktan alınan)	50 μl
500 μM	10 μl (5000 μM ara stoktan alınan)	90 μl
1000 μM	20 μl (5000 μM ara stoktan alınan)	80 μl
1500 μM	30 μl (5000 μM ara stoktan alınan)	70 μl
2000 μM	40 μl (5000 μM ara stoktan alınan)	60 μl

3.11.1. Hücre canlılığı testi

Üretici firmanın direktiflerine göre 20 mg toz formundaki MTT kimyasalı ışık almayacak şekilde korunan steril bir tüp içerisinde alınarak üzerine 10 ml ultra saf su eklenerek vortekslenme işlemine alınmıştır. Tamamen çözölen MTT kimyasalı karanlık bir ortamda 0,22 μm şırınga ucu filtreden geçirilerek deneyde kullanıma hazır hale getirilmiştir. Deneyde ihtiyaç duyulduğu zamana kadar +4°C’de saklanmıştır. Hücre kültüründe yetiştirilen hücreler yukarıda tarif edilen hücre sayımına paralel olarak

kuyucuklara 1×10^4 olacak şekilde ekilmiştir ve 37°C 'de %5 CO_2 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda tüm kuyucuklarda bulunan hücrelerin hücre kültürü sıvısı PBS ile temizlenmiş ve daha sonrasında deney düzeneğinde belirtilen ferülik asit konsantrasyonları eklenerek 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Belirtilen süre sonunda hazırlanan MTT solüsyonundan her bir kuyucuğa 10 μl eklenmiş ve karanlık ortamda 4 saat beklenerek formazan kristallerinin oluşması beklenmiştir. Süre sonunda formazan kristalleri DMSO ile çözülerek 570 nm'de spektrofotometre yardımıyla absorbans değerleri kaydedilmiştir. Şekil 3.15'te MTT deneyinin akış şeması sunulmaktadır.



Şekil 3.15. MTT deneyinin akış şeması (Babacan, Adem vd. 2021)

MTT deneyinin hesaplama formülü aşağıdaki gibidir.

$$\text{Hücre canlılığı \%} = 100 \times \frac{\text{AB (570-690) ortalama}}{\text{AB kontrol (570-690)}}$$

3.11.2. Halka hücre göçü deneyi

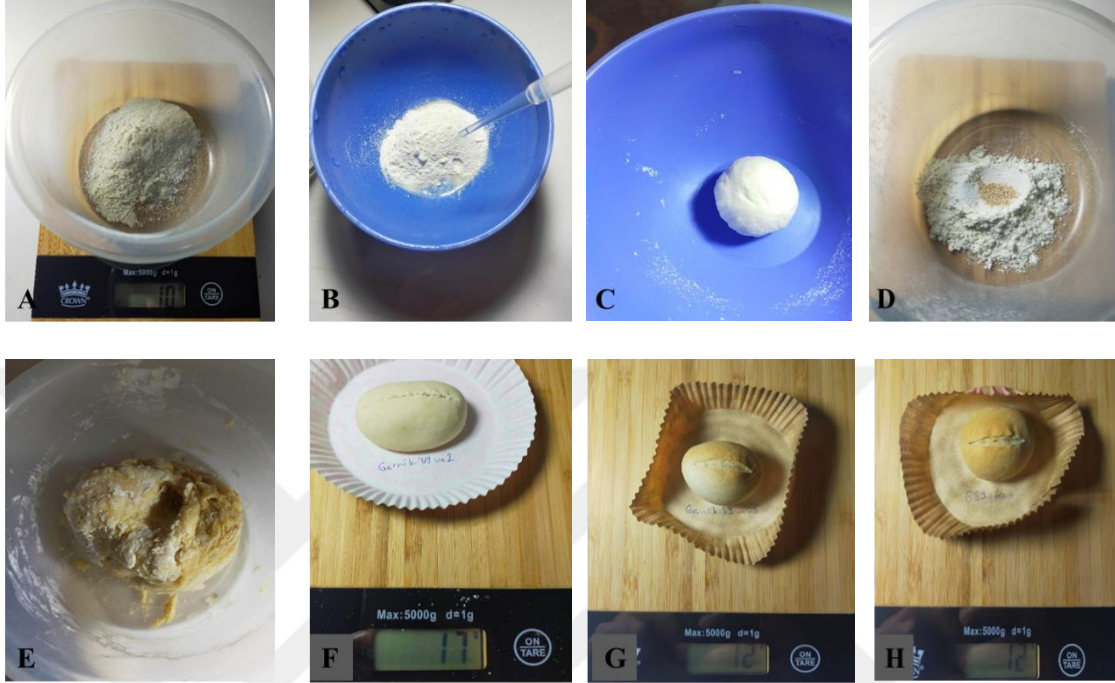
Bu deney kapsamında 6'lı hücre deneyine uygun plaklar ile çalışılmış olup, plakların çapı 20 mm bu plakların içerisine $12,5 \times 10^4$ hücre ekilmiş olup, ekim sonrasında plakların ortasına çapı 15 mm halkalar yerleştirilerek 37°C 'de %5 CO_2 ortamında 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince hücreler hücre sıvısı ortamında olup, analiz edilmeden önce PBS ile temizlenmiştir. Süre sonunda halkalar arasındaki mesafeler mikroskop yardımıyla μm cinsinden ölçümler yapılarak sonuçlar ifade edilmiştir.

3.12. Ferülik Asidin Fonksiyonel Gıda Olarak Kullanabilme Çalışmaları

Bu amaçla proje kapsamındaki deneme materyalleri olan Siyez ve Gernik buğdaylarından, un, kepek, bulgur, erişte ve irmik elde edilmiştir. Elde edilmiş yöntemleri ve elde edilen materyaller aşağıda sunulmuştur.

3.12.1. Ekmek eldesi

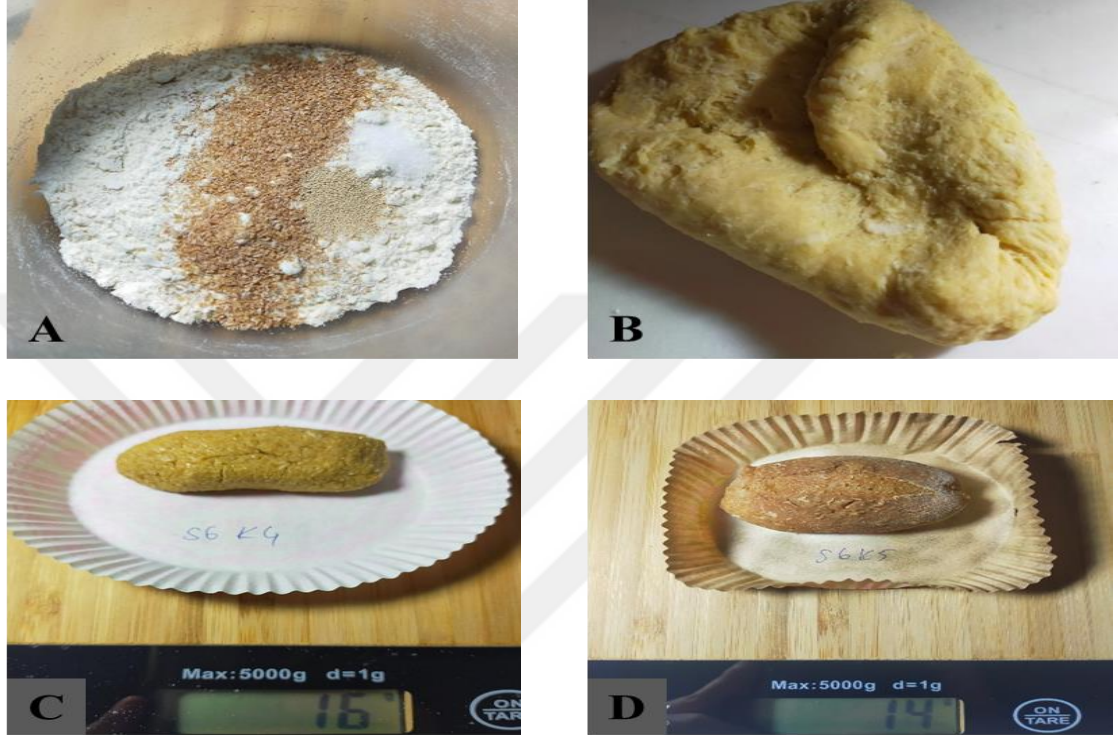
Siyez ve Gernik buğdaylarından elde edilen un fraksiyonu ile Türk Gıda Kodeksinin Ekmek beyanı esas alınarak ekmek elde edilmiştir (TGK 2012). Bu kapsamda ekmek elde edilirken geçirdiği aşamalar Şekil 3.16’da gösterilmiştir.



Şekil 3.16. Ekmek eldesinde meydana gelen aşamalar

3.12.2. Kepek ekmeği eldesi

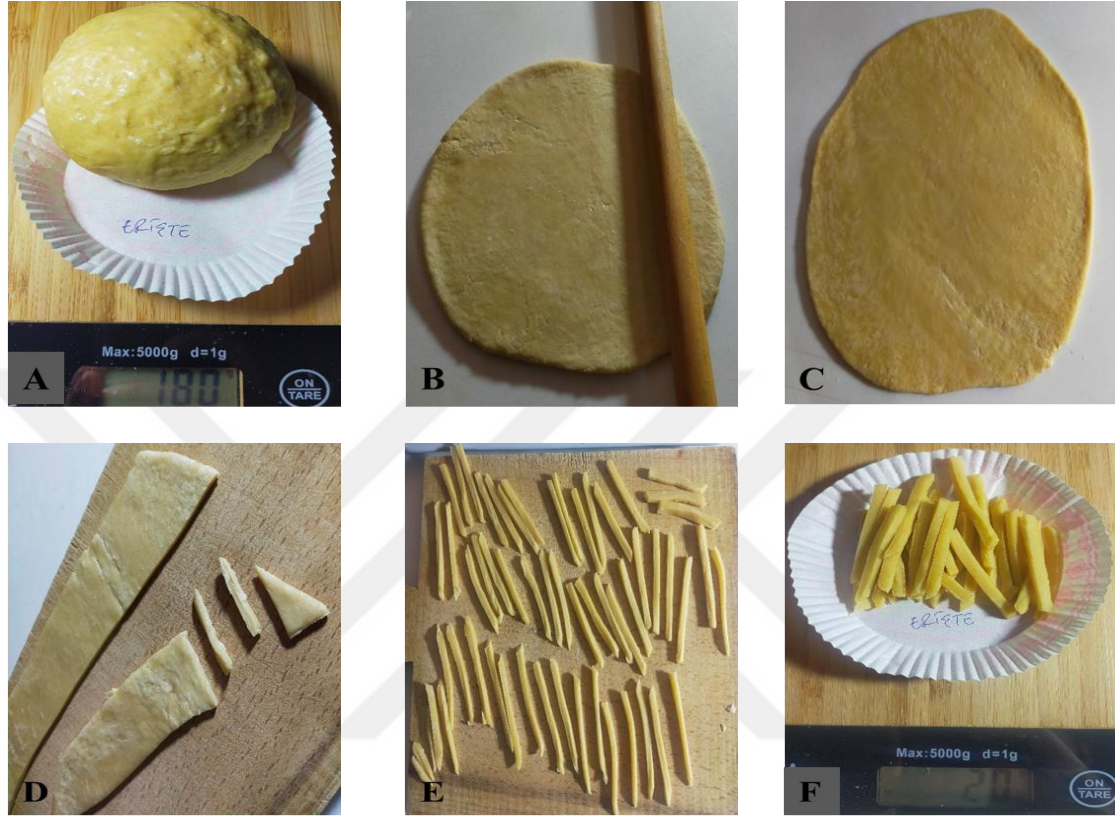
Siyez ve Gernik buğdaylarından elde edilen un ve kepek fraksiyonu ile Türk Gıda Kodeksinin Kepekli Ekmek beyanı esas alınarak kepekli ekmek elde edilmiştir (TGK 2012). Bu kapsamda üretim aşamaları Şekil 3.17’de gösterilmiştir.



Şekil 3.17. Kepekli ekmek eldesinde meydana gelen aşamalar

3.12.3. Erişte eldesi

Türk Gıda Kodeksi Makarna Tebliğini esas alınarak erişte elde edilmiştir (TGK 2002a). Elde edilen eriştenin aşamaları Şekil 3.18’de gösterilmiştir.



Şekil 3.18. Eriştenin elde edilme aşamaları

Ekmek, kepekli ekmek ve erişte yapımında kullanılan maya, un, su ve kepek miktarları Çizelge 3.7’de sunulmuştur.

Çizelge 3.8. Ekmek, kepekli ekmek ve erişte yapımında kullanılan diğer maddelerin gram cinsinden miktarları

Örnek ismi	Tartılan un	Kuru maya	Tuz	Su	Kepek	Hamur tartım	Pişmiş ekmek
Gernik 39 un 1	10	0,2	0,2	6	0	18	11
Gernik 39 un 2	10	0,2	0,2	6	0	17	12
Gernik 39 un 3	10	0,2	0,2	6	0	18	15
Gernik 39 un 4	10	0,2	0,2	6	0	16	13
Gernik 39 un 5	10	0,2	0,2	6	0	16	12
Gernik 39 un 6	10	0,2	0,2	6	0	17	12
Gernik 39 kepekli 1	10	0,2	0,2	7,5	2	19	15
Gernik 39 kepekli 2	10	0,2	0,2	7,5	2	24	20
Gernik 39 kepekli 3	10	0,2	0,2	7,5	2	24	19
Gernik 39 kepekli 4	10	0,2	0,2	7,5	2	24	22
Gernik 39 kepekli 5	10	0,2	0,2	7,5	2	21	16
Gernik 39 kepekli 6	10	0,2	0,2	7,5	2	23	19
Siyez 6 un1	10	0,2	0,2	8	0	18	14
Siyez 6 un2	10	0,2	0,2	8	0	18	14
Siyez 6 un3	10	0,2	0,2	8	0	17	14
Siyez 6 un4	10	0,2	0,2	8	0	19	15
Siyez 6 un 5	10	0,2	0,2	8	0	17	13
Siyez 6 un 6	10	0,2	0,2	8	0	13	10
Siyez 6 kepekli 1	10	0,2	0,2	8,5	2	16	10
Siyez 6 kepekli 2	10	0,2	0,2	8,5	2	19	14
Siyez 6 kepekli 3	10	0,2	0,2	8,5	2	18	12
Siyez 6 kepekli 4	10	0,2	0,2	8,5	2	16	12
Siyez 6 kepekli 5	10	0,2	0,2	8,5	2	19	14

3.12.4. Bulgur eldesi

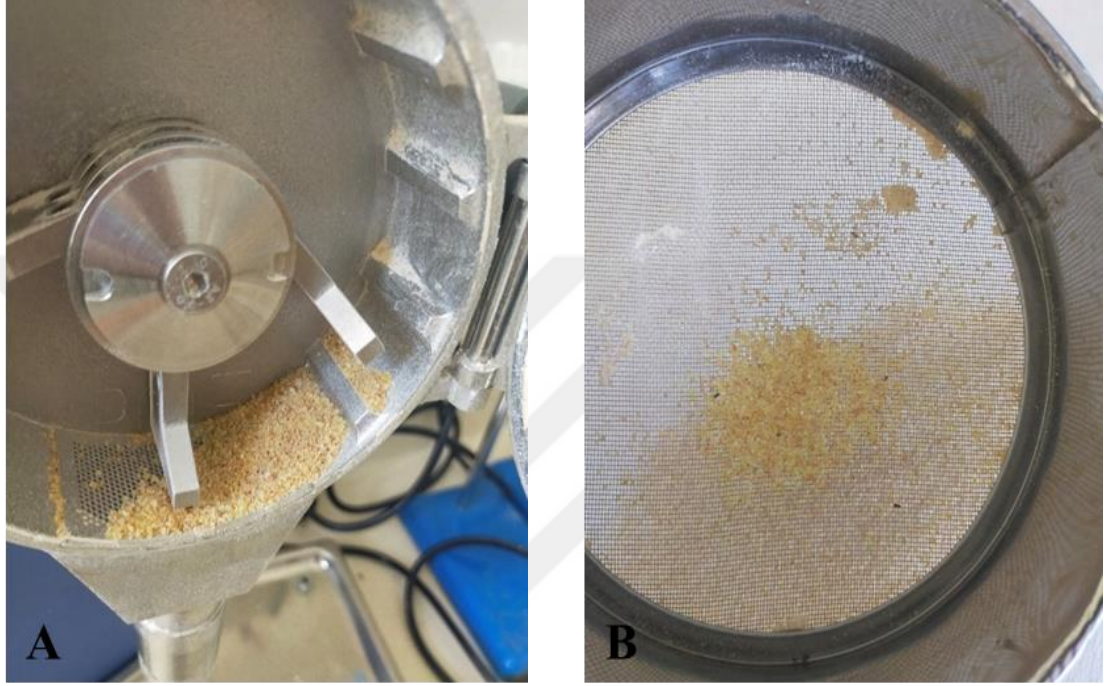
Siyez ve Gernik buğdayları kavuzlarından ayrıldıktan sonra Türk Gıda Kodeksi Bulgur Tebliği'nde beyan edilen kriterler doğrultusunda bulgur elde edilmiştir (TGK 2016). Buğday taneleri önce tencereye alınıp, ardından 250 ml su eklenmiştir. Ardından su kaynadıktan sonra kurutma kâğıdı üzerine serilen materyal kurutmaya alınmıştır. Böylelikle elde edilen bulgur fraksiyonu analiz için hazır hale getirilmiştir. Bulgur fraksiyonunun elde edilişi sırasıyla Şekil 3.19'da gösterilmiştir.



Şekil 3.19. Bulgur üretimine ait görseller

3.12.5. İrmik eldesi

Siyez ve Gernik buğdayları kavuzlarından ayrıldıktan sonra Türk Gıda Kodeksi İrmik Tebliği'nde beyan edilen kriterler doğrultusunda ırmik elde edilmiştir (TGK 2002b). Bu kapsamda laboratuvar tipi bir öğütücü kullanılarak iyice ufalanan buğday taneleri akabinde ince bir elek yardımıyla elenerek ırmik taneciklerinin 120-140 µm olması sağlanarak ırmik elde edilmiştir. Şekil 3.20'de elde edilen ırmik fraksiyonun görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.20. İrmik elde edilme aşamaları

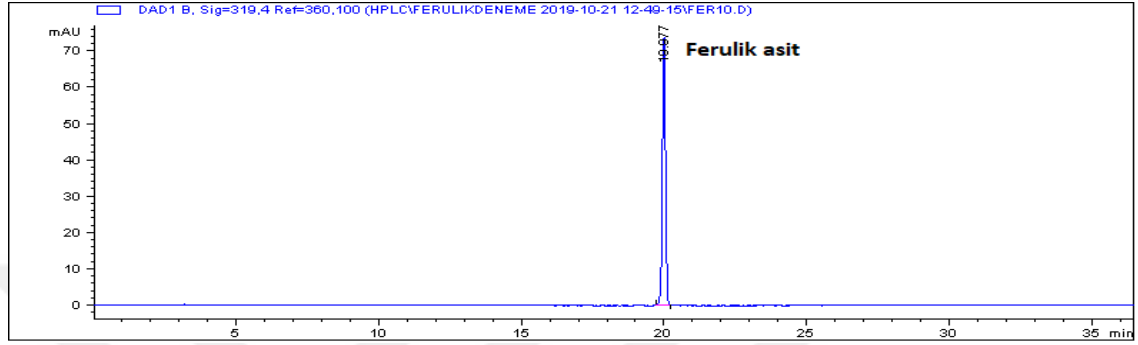
3.13. İstatistiksel Çalışmalar

Araştırmadan elde edilecek tüm veriler, Minitab istatistik analiz paketi kullanılarak üç yinlemeli tesadüf blokları deneme desenine göre analiz edilmiştir. Değişkenlerin analizinde tüm istatistiksel testler 0,05 önemlilik düzeyinde gerçekleştirilmiştir. Veriler varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiş ve istatistiksel analizler Minitab 18 istatistik analiz programı ve/veya Microsoft® Excel 365 kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

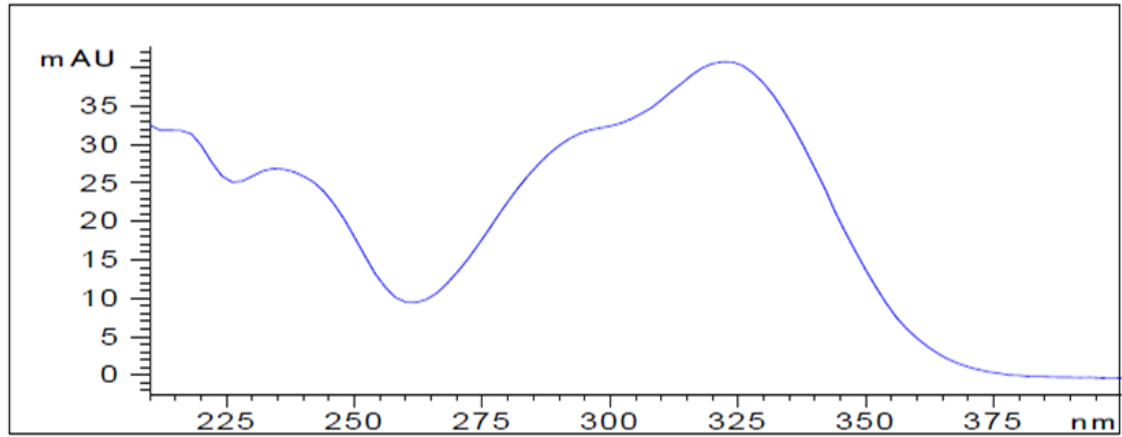
4.1. Ferülik Asidin Kromatografik Yöntemle Tanımlanması ve Validasyonu

Bu kapsamda HPLC cihazı kullanılarak ferülik asidin analitik standardı ve numunelerde bulunan ferülik asidin analizleri materyal metot kısmında belirtilen ve şartları en uygun hale getirilen analiz yöntemi ile analiz edilmiştir. Belirtilen şartlar altında HPLC sisteminden elde edilen kromatogramlar Şekil 4.1’de verilmiştir.



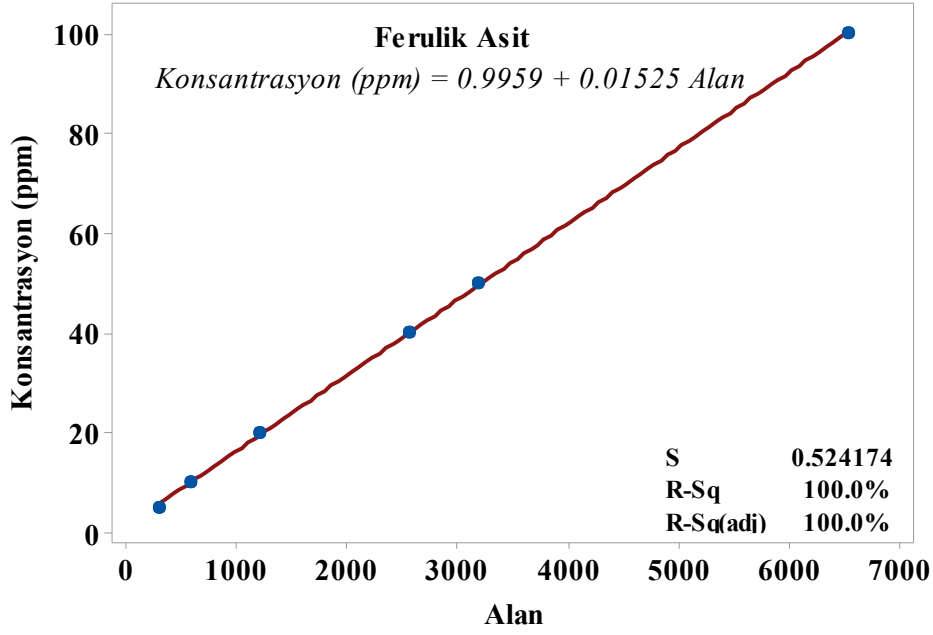
Şekil 4.1. Ferülik asidin HPLC cihazındaki analizi sonucundaki kromatogramı

Ferülik asidin analitik standardının metanol içerisindeki UV spektrumu elde edildiğinde en yüksek absorbans değerinin 319-325 nm dalga boyunda aralığında olduğu anlaşılmıştır ve bu elde edilen absorbans değeri, ferülik asit ile çalışan diğer araştırma sonuçları ile uyumlu olarak bulunmuştur (Tian, Chen vd. 2021). Şekil 4.2’de ferülik asidin HPLC analizinden elde edilen UV spektrumu gösterilmektedir.



Şekil 4.2. Ferülik asidin UV spektrumu

Ferülik asidin kalibrasyon eğrisinin oluşturulabilmesi için farklı derişimlerde hazırlanan ferülik asit çözeltileri HPLC sisteminin optimum şartları altında analizler gerçekleştirilmiş olup, cihazdan alınan pik alanlarına karşılık konsantrasyon değerleri kullanılarak elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.3’te verilmiştir.



Şekil 4.3. Ferulik asidin kalibrasyon denklemi

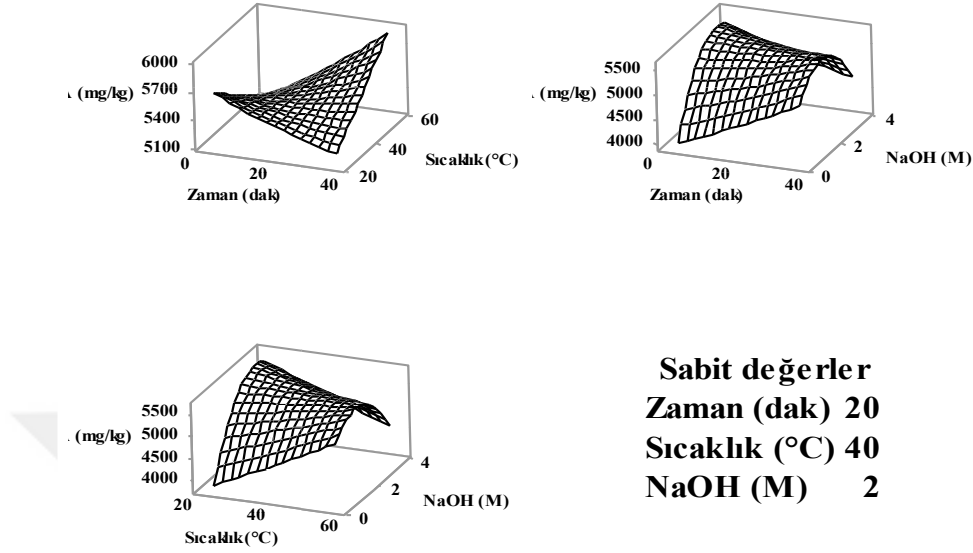
Ferulik aside ait HPLC analizinden elde edilen bazı metot validasyon bulguları Çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Ferulik aside ait validasyon verileri

Kalibrasyon eşitliği	$y = 0,01525 x + 0,9959$
r^2	1
Doğrusal Aralık (ppm)	6,47-100
LOD (ppm)	1.06
LOQ (ppm)	3.18
RSD (%)	2,41

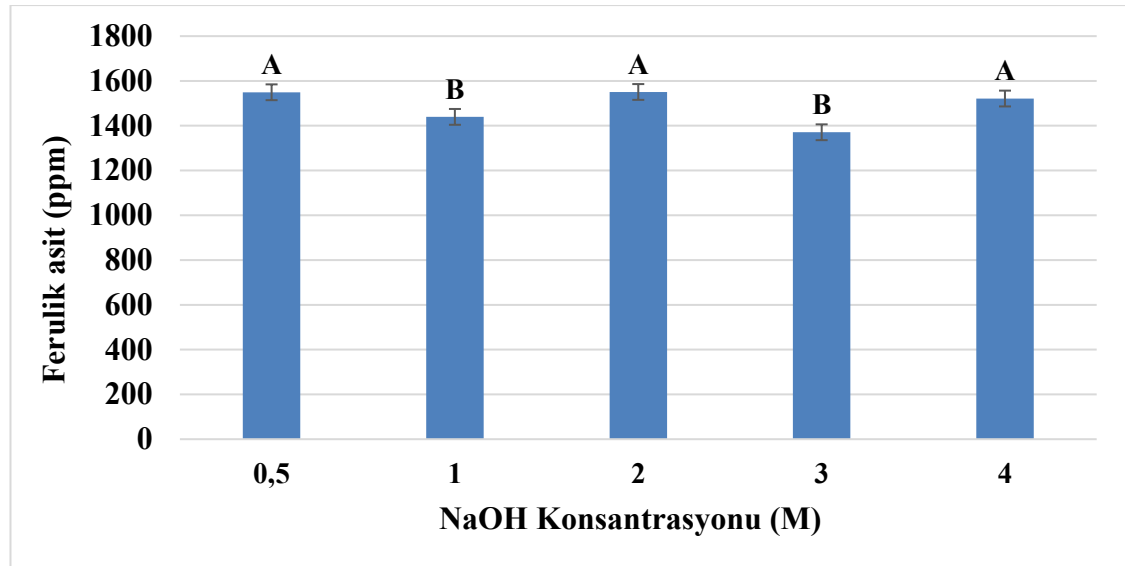
Tez çalışmasında belirlenen analiz parametrelerinden en önemlisi ferulik asidin analiz edilebilmesi için optimum ekstraksiyon şartlarının belirlenmesidir. Bu kapsamda Bölüm 3.5.’te belirtilen ekstraksiyon yöntemindeki hidrolizasyon, sonikasyon, nötralizasyon ve ekstraksiyon aşamalarındaki NaOH molar miktarı, ultrasonik uygulama sıcaklığı, süresi, pH düzeyleri ve kullanılan çözen tipi parametreleri en uygun hale getirilmiştir.

Hidrolizasyon aşamasında gerekli olan NaOH molar miktarı ile uygulanan ultrasonikasyon süresi ve sıcaklığının optimizasyonunda yanıt yüzey metodolojisinden yararlanılmıştır. Elde edilen veriler Şekil 4.4'te sunulmuştur.



Şekil 4. 4. Hidrolizasyon aşamasında kullanılan NaOH miktarları ve ultrasonikasyon sıcaklık ve sürelerine yönelik yanıt yüzey grafikleri

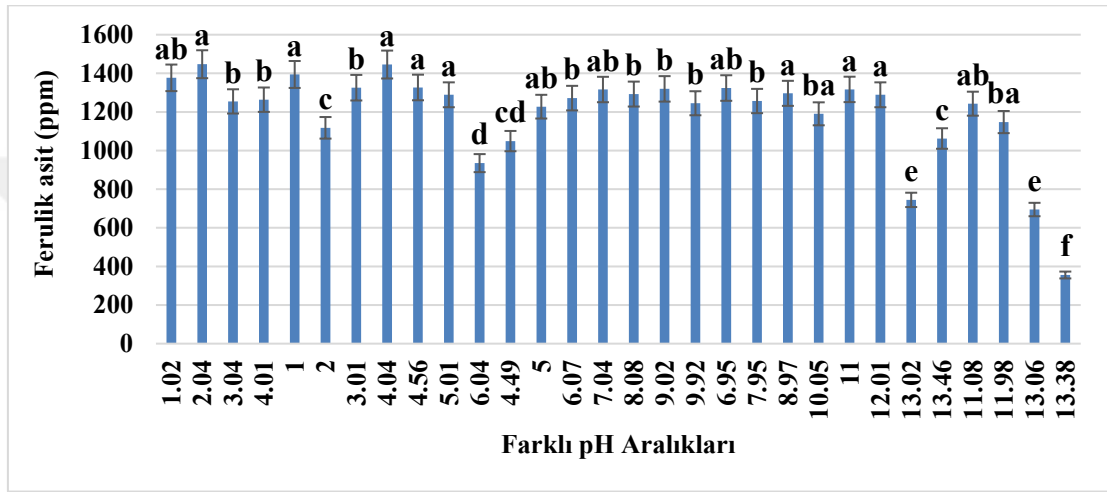
Elde edilen veriler ışığında NaOH miktarının 2M olarak kullanılması, ultrasonikasyonun 23 dakika süreyle uygulanması ve deney süresinde ultrasonik banyonun sıcaklığının 44.57°C olması gerektiği ortaya çıkmıştır. Optimizasyon çalışmalarından elde edilen 2M değerindeki NaOH miktarlarının ferulik asit değişimi üzerine etkilerinin incelenmesi kapsamında NaOH'in molar konsantrasyonu sırasıyla 0,5, 1, 2, 3 ve 4M olacak şekilde ayarlanmış ve Şekil 4.5'te belirtilen sonuçlara ulaşılmıştır.



Şekil 4. 5. Farklı NaOH konsantrasyonlarından elde edilen ortalama ferulik asit miktarları

Elde edilen veriler ışığında 0,5M NaOH için, $1549,35 \pm 43,21$, 1M NaOH için $1439,45 \pm 66,93$, 2M NaOH için $1550,72 \pm 149,56$, 3M NaOH kullanıldığında $1370,78 \pm 128,5$ ve son olarak 4M NaOH için $1521,45 \pm 199,75$ ppm ferülik asit miktarları saptanmıştır. Bunun sonucunda 0,5M ve 2M konsantrasyonda istatistiksel olarak fark bulunmaması nedeniyle NaOH konsantrasyonu 0,5M olarak seçilmiştir.

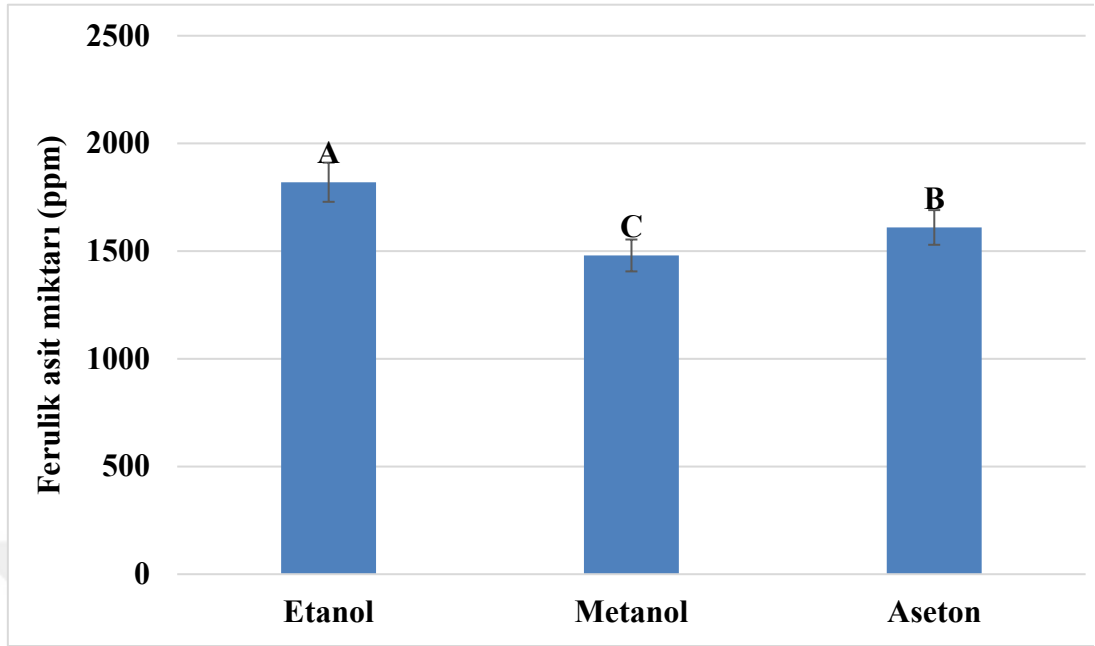
Ekstraksiyon aşamasında hidrolizasyon basamağı için kullanılması gereken NaOH molar konsantrasyon değerinin ve ultrasonik şartların belirlenmesinin ardından nötralizasyon aşamasında pH farklılıklarının ferülik asit analizine olan etkisi araştırılmıştır. Bu kapsamda elde edilen çözeltinin pH değeri HCl kullanılarak farklı değerlere ayarlanmıştır. Çalışmalar sonucu elde edilen veriler Şekil 4.6’da sunulmuştur.



Şekil 4. 6. Farklı pH değerlerinden elde edilen ortalama ferülik asit analizi

Elde edilen veriler ışığında belirli pH değerlerinde ferülik asit analizlerindeki sonucun yüksek çıktığı görülse de pH:7’de aşırı bir farklılık saptanmamıştır. Ayrıca yüksek veya düşük asit baz reaksiyonları özüt içerisinde farklı bileşikler oluşturabilirler. Bu nedenle pH:7 değeri ile deneylere devam edilmiştir. Elde edilen sonuçlar (Stavova, Porizka vd. 2017) tarafından bildirilen çalışma ile uyumlu bulunmuştur.

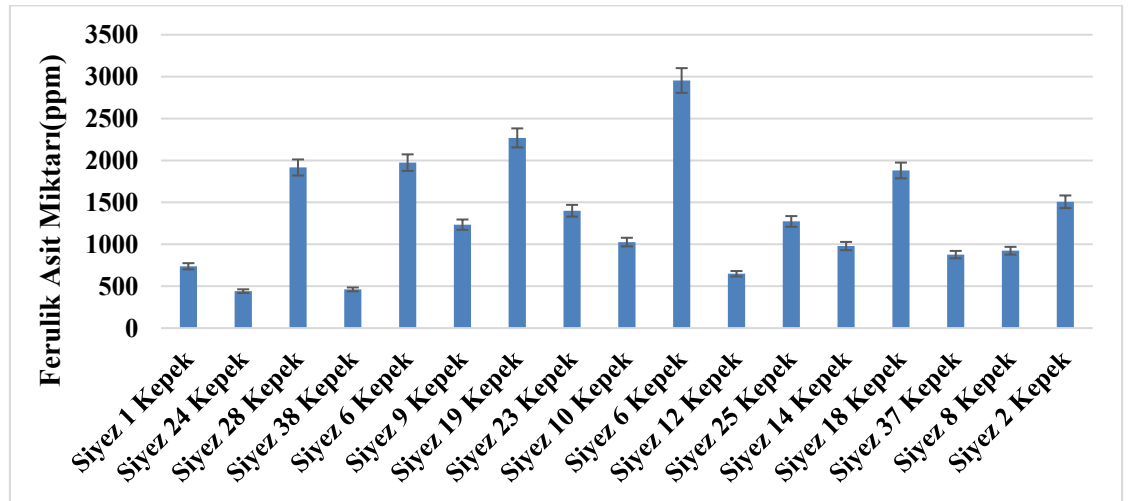
Optimize edilen şartlar atında ferülik asidin farklı çözgen ortamlarında elde edilen konsantrasyon değişiklikleri Şekil 4.7’de sunulmuştur.



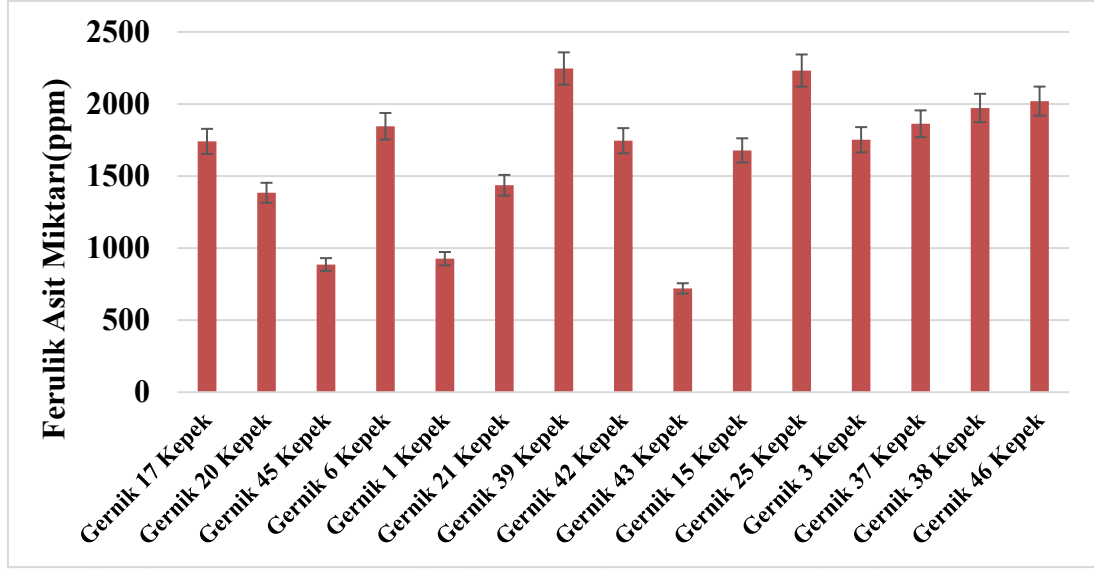
Şekil 4. 7. Ferulik asit ekstraksiyonunda farklı çözenlerin etkileri

4.2. Buğday Numuneleri Fraksiyonlarındaki Ferulik Asit Düzeyleri

Optimize edilen şartlar altında analiz edilen Siyez ve Gernik buğdaylarından elde edilen kepek fraksiyonunun ferulik asit yönünden içerik analizi sonuçları sırasıyla Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da sunulmuştur.

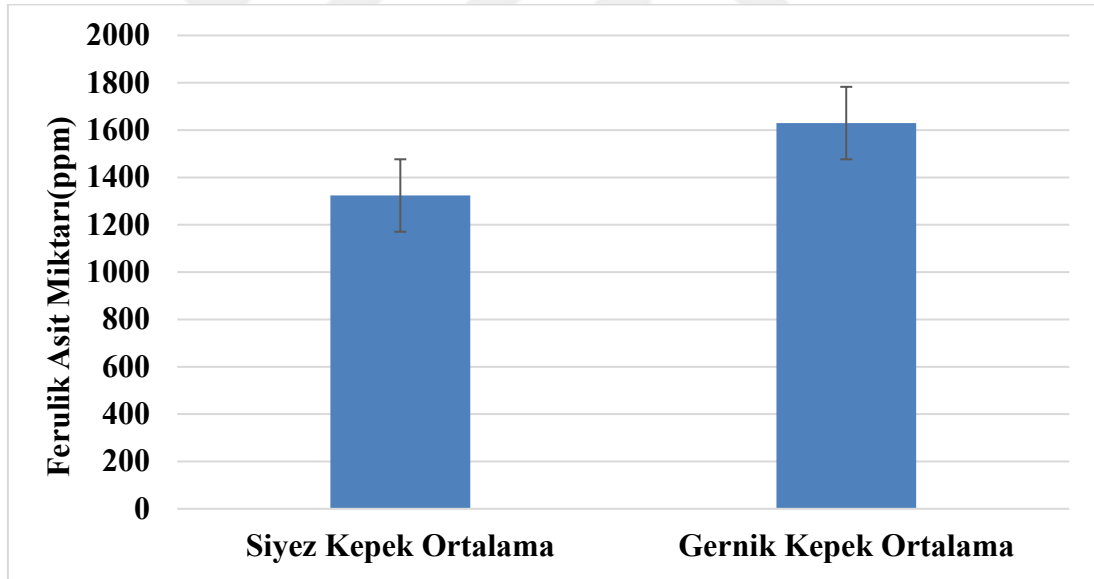


Şekil 4. 8. Ferulik asidin Siyez buğday çeşitlerinin kepek fraksiyonunda saptanan miktarları (ppm)



Şekil 4.9. Ferülik asidin Gernik buğday çeşitlerinin kepek fraksiyonunda saptanan miktarları (ppm)

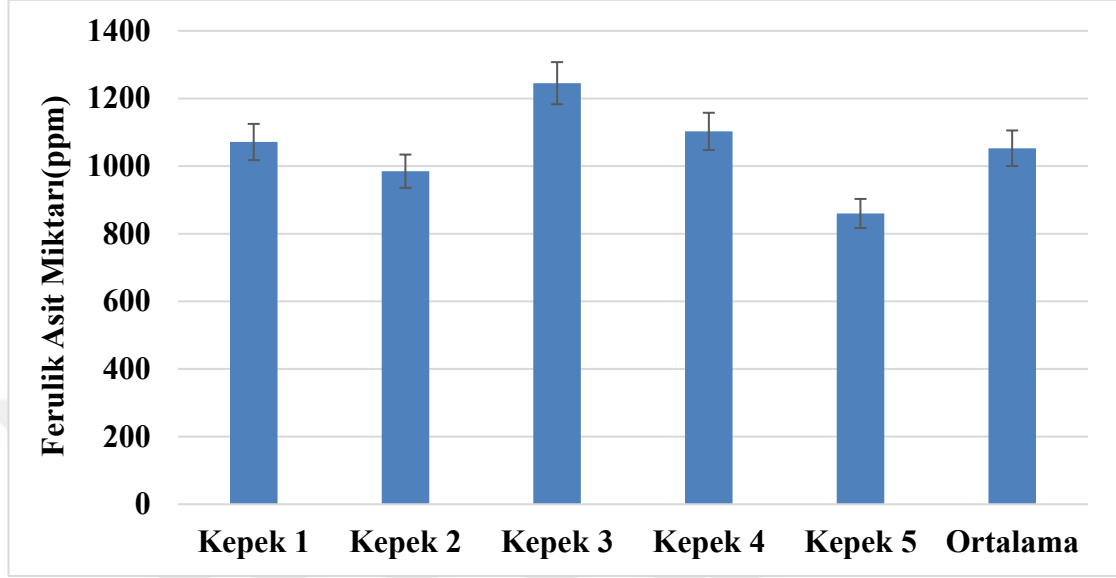
Şekil 4.10'da Siyez ve Gernik buğdaylarının kepek fraksiyonlarından elde edilen ortalama ferülik asit değeri verilmiştir.



Şekil 4.10. Siyez ve Gernik buğdaylarının kepek fraksiyonlarındaki ortalama ferülik asit değeri

Siyez buğdayının kepek fraksiyonunda tespit edilen ferülik asit düzeylerinin 461,74 ile 2268,98 ppm (ortalama 1323,70±667,55 ppm) aralığında değiştiği belirlenirken bu değer Gernik buğdayı kepek fraksiyonu için 720,22 ile 2019,82 ppm (ortalama 1629,87±456,72 ppm) düzeylerinde olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmalar kapsamında en yüksek ferülik asit düzeyi Siyez 6 buğday kepeğinde 2268,98 olarak tespit edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında ayrıca piyasada satılan kepek örneklerindeki ferülik asit düzeylerini belirlemek amacıyla Antalya ili Konyaaltı ilçesi bölgesinde faaliyet gösteren farklı fırınlardan temin edilen kepek örneklerinden numuneler alınmış ve yapılan analizlerde Şekil 4.11’de sunulan verilere ulaşılmıştır.

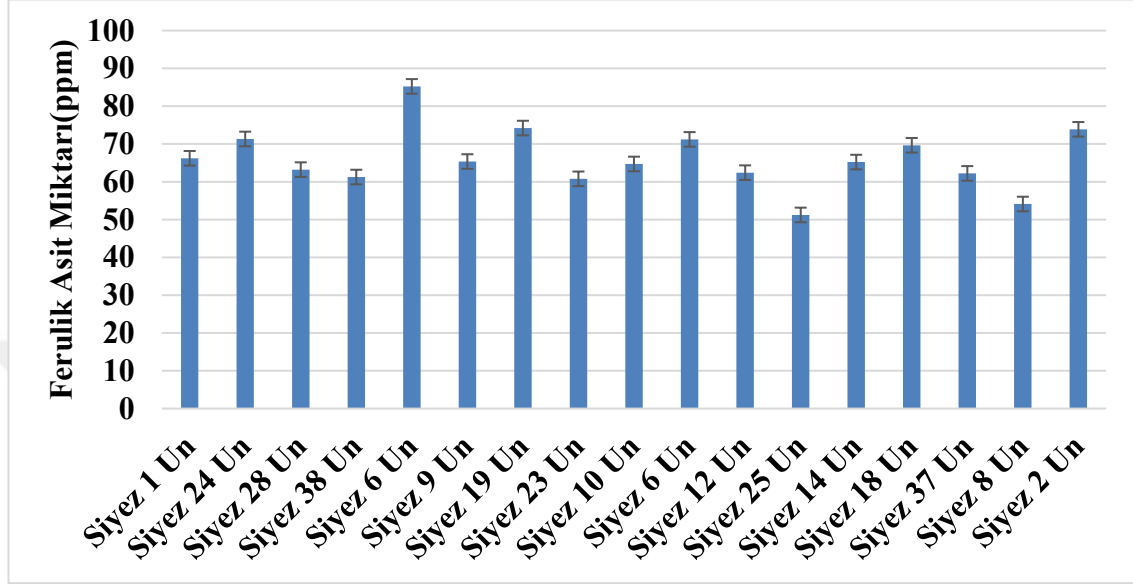


Şekil 4.11. Farklı fırınlardan elde edilen kepek fraksiyonunun ferülik asit miktarları

Farklı fırınlardan elde edilen kepek fraksiyonunda belirlenen ferülik asit düzeyleri 859,9 ile 1245,36 ppm aralığında değiştiği belirlenmiştir. Ortalama ferülik asit değeri ise $1052,82 \pm 127,85$ ppm olarak belirlenmiştir. Tespit edilen en yüksek ferülik asit miktarı ise 1245,36 ppm olarak bulunmuştur. Bununla birlikte tez kapsamında gerçekleştirilen Siyez ve Gernik kepeklerinde tespit edilen ferülik asit değerlerinden düşük olarak belirlenmiştir. Fırınlardan alınan ticari kepek fraksiyonunun orijini hakkında bilgi olmadığı bununla beraber muhtemelen ekmeklik buğday olarak kabul edilen *Triticum aestivum* L. olduğu varsayılmaktadır. Buğday çeşitleri arasındaki ferülik asit miktarlarının başlıca farklılık sebepleri, genetik materyal fiziksel etkiler ve epigenetik değişiklikler olarak sıralanabilir. (Faulds ve Williamson 1995), (Gopalan ve Nampoothiri 2018), (Barberousse, Kamoun vd. 2009b), (Cengiz vd. 2021).

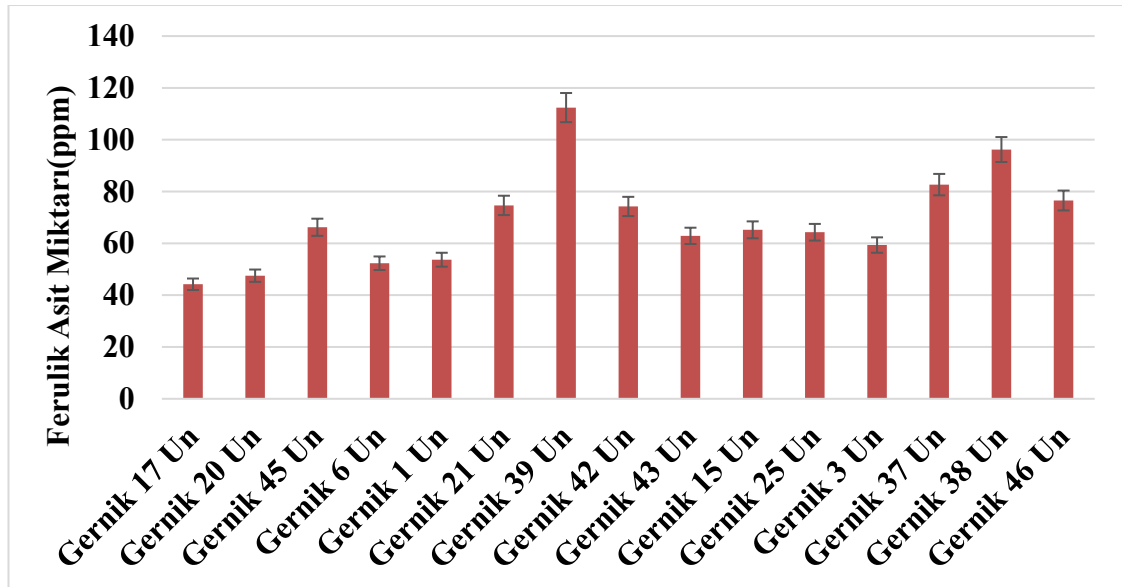
4.2.1. Siyez ve Gernik buğdaylarına ait un fraksiyonunun analizi

Şekil 4.12’de Siyez buğday çeşitlerinin un fraksiyonunda saptanan ferülik asit sonuçlarına yönelik grafik sunulmaktadır.



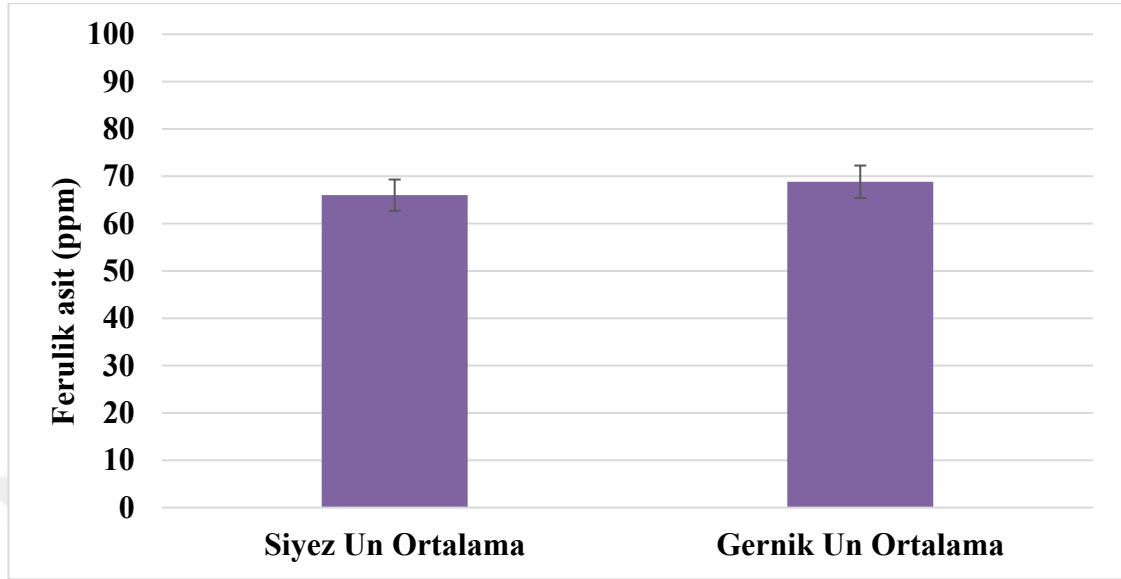
Şekil 4.12. Farklı fırınlardan elde edilen kepek fraksiyonunun ortalama ferülik asit miktarı

Şekil 4.13’te Gernik buğday çeşitlerinin un fraksiyonunda saptanan ferülik asit sonuçlarına yönelik grafik sunulmaktadır.



Şekil 4.13. Gernik buğdayı un fraksiyonunda bulunan ferülik asit içeriği.

Siyez ve Gernik buğdaylarından elde edilen ortalama ferülik asit değerleri Şekil 4.14'te verilmiştir.



Şekil 4.14. Siyez ve Gernik buğdaylarından elde edilen un içeriğinde bulunan ortalama ferülik asit miktarı

Siyez buğdayının un fraksiyonunda tespit edilen ferülik asit düzeylerinin 51,22 ile 85,23 ppm (ortalama 66,01±7,72 ppm) aralığında değiştiği belirlenirken bu değer Gernik buğdayı un fraksiyonu için 44,21 ile 112,40 ppm (ortalama 68,83±17,68 ppm) düzeylerinde olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmalar kapsamında en yüksek ferülik asit düzeyi Gernik 39 un fraksiyonunda 112,40 ppm olarak tespit edilmiştir.

4.3. Ferülik Asidin Saflaştırılması

Ferülik asidin saflaştırılması aşamasında kullanılan yöntemler sonucunda elde edilen veriler sırasıyla sunulmuştur.

4.3.1. Süper kritik karbondioksit ekstraksiyonu yöntemi kullanılarak saflaştırma

50 gram öğütülmüş kepek ile Bölüm 3.7.1'de belirtilen koşullar altında yapılan deneyde 1,58 gram özüt elde edilmiştir. Bu kapsamda ferülik asidin analitik standardı ile kıyaslandığında, elde edilen özüt içerisinde %22 oranında ferülik asit bulunmuştur. Şekil 4.15'te süper kritik karbondioksit ekstraksiyon cihazından elde edilen özütün görseli sunulmuştur.



Şekil 4.15. Süper kritik karbondioksit ekstraksiyon cihazından elde edilen özüte ait görsel

4.3.1. Çözücü ekstraksiyonu ile saflaştırma

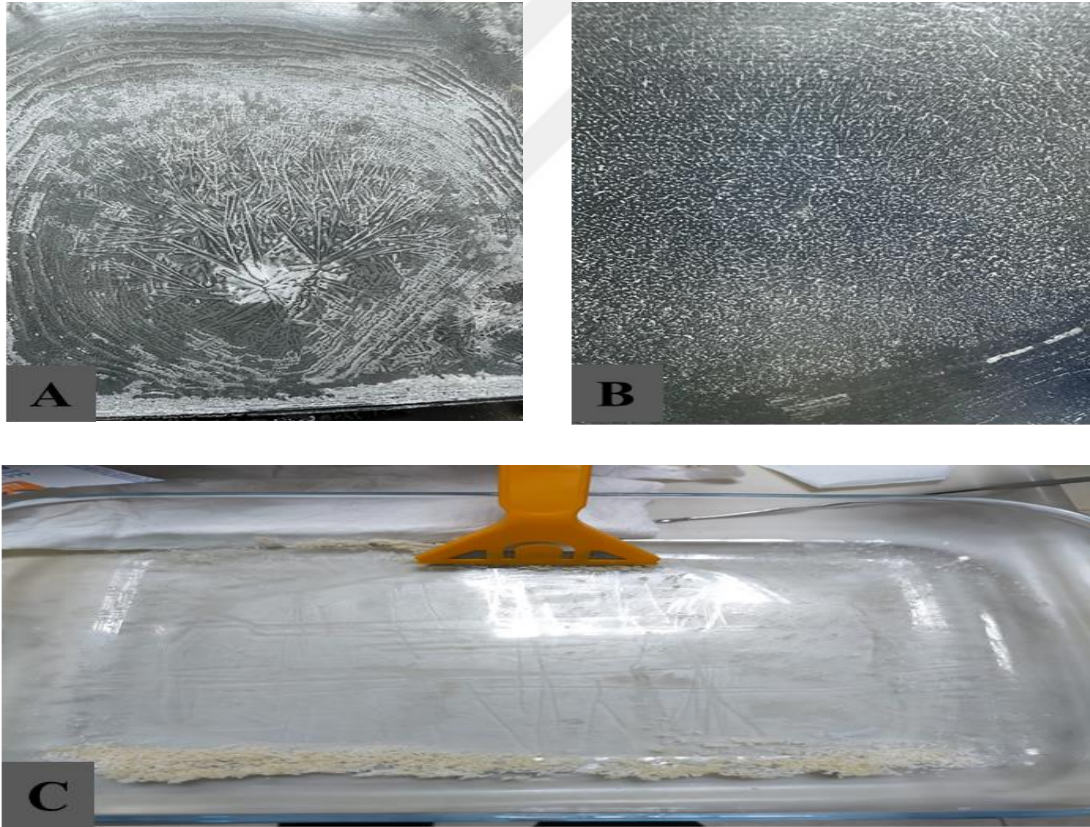
Bu kapsamda Bölüm 3.5’te belirtilen ferülik asit analizleri için belirlenen yöntem esas alınmış ve optimize edilen yöntem üzerinden en yüksek ferülik asit eldesine imkan sağlayan koşullar değerlendirilmiştir. Bu çerçevede ekstraksiyon öncesi enzim ilavesi, vinterizasyon, en yüksek çözünürlüğünü sağlayacak çözgenin belirlenmesi için ekstraksiyon aşamasında farklı çözgenler (etanol, metanol ve aseton) kullanılmış ve sonrasında filtrasyon ve dilüsyon işlemleri ile HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.16’da elde edilen veriler sunulmaktadır. (Buranov ve Mazza 2009) tarafından yapılan bir çalışmada, keten, buğday ve mısır kepeğinden ferülik asit ve vanilin ekstraksiyonu yapılmıştır. Basıncsız alkali hidroliz (0,5 M NaOH) ve basınç işlemi uygulanırken kullanılan çözücüler (0,5 M NaOH, su, etanol ve amonyak) olmak üzere iki ekstraksiyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Basıncsız ve basınçlı 0,5 M NaOH çözeltisi ile ekstrakte edilen ürünlerin içeriğinde bir fark bulunmamış olup, çoğunlukla ferülik asit, p-kumarik asit ve az miktarda vanilin elde edilmiştir. Basınçlı düşük polariteli su, basınçlı sulu etanol (PAE) ve basınçlı sulu amonyak (PAA), keten kepeği, buğday kepeği ve mısır kepeğindeki (ferülik asit bakımından zengin) ferülik asitten tek adımda vanilin üretiminde etkili olmuştur. Alkali ekstraktlardan ferülik asidin saflaştırılması, çözünürlüğünden yararlanılarak büyük ölçüde başarı sağlanarak, esas olarak mumsu olan kahverengi alkali özütler %30 sulu etanol ile kolayca çöktürülebilir ve bu nedenle, bitki artıklarından ticari ferülik asit üretimi mümkün görünmektedir ifadesini kullanmışlardır. Öte yandan farklı solventler ile buğday kepeğinden saflaştırma çalışmalarında, etanol ile derin ötektik çözücü-2 buğday kepeğinden ferülik asidin en yüksek ekstraksiyon verimini sağlamıştır. DES-2’nin optimum ekstraksiyon koşulları (DES’lerin karışık çözeltideki hacim oranı (%50), sıvı/madde oranı (15 mL g⁻¹) ve ekstraksiyon süresi (35 dakika)) yanıt yüzey

metodolojisi kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen ferülik asit verimi $5,86 \text{ mg g}^{-1}$ olmuştur. DES-2 daha sonra silika jeli modifiye edilerek ve buğday kepeğinden ferülik asidi izole etmek için kullanılmıştır. Bu emici madde silika jel ve iyonik bir sıvı ile modifiye edilmiş silika jel ile karşılaştırılmıştır. Ferülik asit için geri kazanımlar sırasıyla %64,1, %89,7 ve %80,3 olmuştur. DES-2 ile modifiye edilmiş silika jel en yüksek geri kazanımı sağlamıştır (Li, Zhu vd. 2017).

Yapılan saflaştırma çalışmalarında buğday kepeğinin ekstraksiyon çözelti renginin amberden renksiz hal bir almasında etanol hem de metanol kullanarak yapılan çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

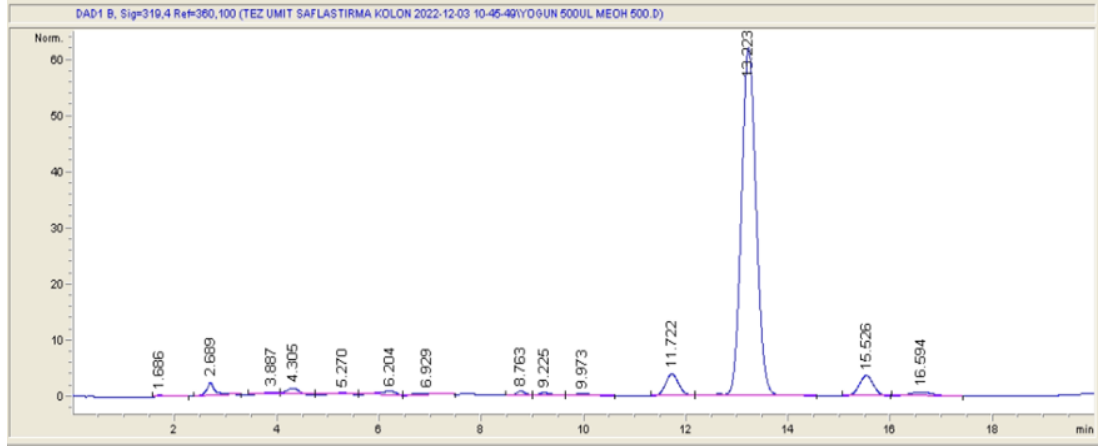
4.3.2. Enzimatik ilavesinin ekstrakte edilen ferülik asit üzerine etkisi

Bu çalışmalarda Bölüm 3.7.2.1 çerçevesinde homojeniz edilen 10 gram öğütülmüş kepek numunesine 100 ml distile su ve pH 7 ayarlamasından sonra 10 μL ferüloil esteraz enzimi ilave edilmiştir. Hazırlanan karışım 37°C 'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmış ve ekstraksiyon işlemlerine hidrolizasyon aşaması ile devam edilmiştir. Şekil 4.16'da bu verilere ait görseller sunulmuştur.



Şekil 4.16. Ferüloil esteraz enzimi kullanıldıktan sonra elde edilen katı faz

Elde edilen kristalden hassas terazi kullanılarak yapılan tartım sonucu analize ait HPLC kromatogramı Şekil 4.17’de sunulmuştur.



Şekil 4.17. Ferüloil esteraz enzimi kullanılarak aktif karbondan süzülen ekstrakta ait kromatogram

Elde edilen veriler ışığında ferülik asidin analitik standardı ile karşılaştırılma yapıldığında %17,2 oranında saflık derecesine ulaşılmıştır.

Enzim kullanılarak gerçekleştirilen bir ferülik asit saflaştırma çalışmasında ferüloil esteraz öğütülmüş buğday kepeğinden ferülik asit elde etmek için kullanılmıştır. Çalışmada, enzim yüklemesi, reaksiyon süresi, pH ve sıcaklık gibi çeşitli parametrelerin ekstrakte edilen ferülik asit miktarı üzerindeki etkileri araştırılmış olup, uygulanan işlemlerin istatistiksel optimizasyonu sonucunda ekstraksiyon verimini 2,5 kat artırmış ve toplam salınabilir ferülik asidin maksimum %34,6'sı ekstrakte edilmiştir. Bu işlemler sonucunda kolon kromatografisi kullanılarak 12 saat içinde %32,5'i ekstrakte edilebilmiştir. Çalışma aynı zamanda ferülik asidin saflaştırılması için iyi bir adsorban bulmaya odaklanılmıştır ve 49,9 mg FA/g reçine bağlama kapasitesi nedeniyle AMBERLITE XAD4 reçinesi kullanılmış ve elüent olarak metanol kullanılarak etkileyici bir %99,5 geri kazanım elde edilmiştir (Gopalan ve Nampoothiri 2018).

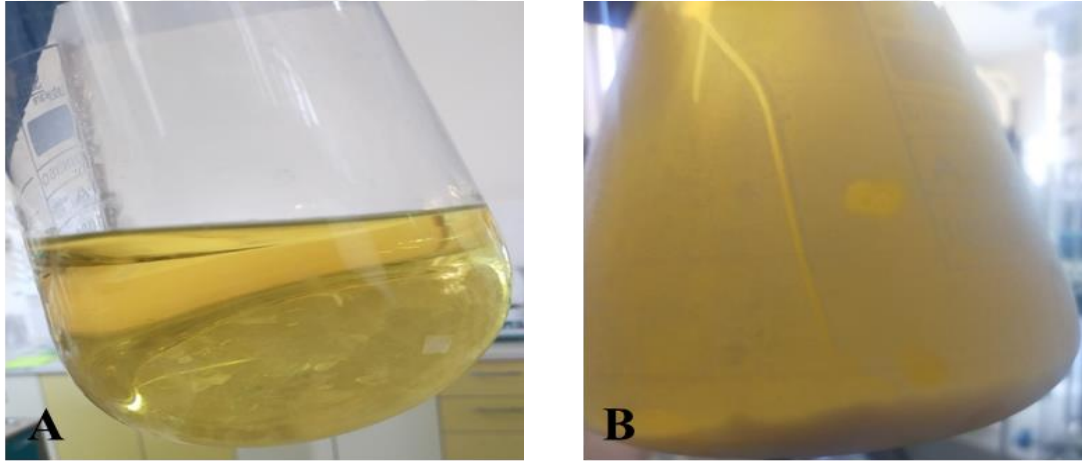
Yapılan diğer bir çalışmada buğday kepeğinden saflaştırılan ferülik asidin kolon kromatografisi kullanılarak Amberlite XAD16 ile saflaştırılmıştır. Ayrıca enzim olarak ksilanaz kullanılmıştır. Buğday kepeğine eklenen ksilanaz miktarı 304 Unit g⁻¹ olacak şekilde, inkübasyon süresi ise, 2 saat ve inkübasyon sıcaklığı 65°C’de gerçekleştirilmiştir. Öngörülen değerle (%51) uyumlu olarak %52,8'lik bir ekstraksiyon verimine yol açmıştır. Saflaştırılmış ferülik asidin antioksidan kapasitesi DPPH temizleme yöntemiyle değerlendirilmiştir. Ferülik asit standardından (EC₅₀ = 13.7 µmol L⁻¹) daha iyi etkinlik (ferülik asitte EC₅₀ = 10.6 µmol L⁻¹) sergilemiştir. Böylelikle DPPH yöntemine dayanarak %77,3 oranında başarılı olduğu rapor edilmiştir (Barberousse, Kamoun vd. 2009a).

Yapılan diğer bir saflaştırma çalışmasında buğday kepeğinin enzimatik hidrolizatının serbest baz formunda zayıf bir anyon değişim reçinesi (Amberlyst A21-Dow) ile saflaştırılması incelenmiş ve çevre dostu koşullarda konsantre ferulat gruplarına

ulaşmak için optimize edildiği ifade edilmiştir. Anyon değişiminden önce homopolar elektrodializ ile yapılan bir demineralizasyon adımı, rakip inorganik anyonların çoğunun hidrolizattan uzaklaştırılmasını sağlamıştır. Sonuç olarak, ferülik asidin reçinenin aktif bölgelerine sabitlenme kapasitesi ve bazik eluatın saflığı ve konsantrasyonunu artmıştır. Ferülik asit kristalize forma geçebilmesi için pH' ayarlanmasının gerekli olduğu vurgulanmıştır ve NMR yöntemi ile yapılan analizlerde %95'e ulaştığı rapor edilmiştir (Dupoirion, Lameloise vd. 2018). En yüksek ferülik asit miktarları baz alındığında buğday kepeğinin hücre sitoplazması içerisinde bağlı formda bulunan ferülik asit ile serbest formda bulunan ferülik asit arasında yaklaşık olarak 250 kat fark bulunmaktadır. Bu kapsamda buğday kepeğinden ferülik asidin saflaştırılması konusunda önem arz etmesi nedeniyle bağlı ferülik asidin, fiziksel bir etki kullanılarak ester bağlarını koparmanın yanı sıra enzim ile bu bağları koparmanın saflaştırma maliyetini ve süresini kısaltacağı düşünülmektedir. Dolayısıyla ferülik asidin bağlı formunun saflaştırma işleminde kazanılması için, buğday kepeğine ön uygulamalar ya da ferüloil esteraz enziminden faydalanılarak ester bağlarının koparılması hedeflenmelidir.

4.3.3. Mumsu bileşenlerin uzaklaştırılmasının ferülik asit üzerine etkileri

Mumsu bileşenlerin uzaklaştırılması konusunda Bölüm 3.7.2.4'te belirtilen prosedür uygulanmış ve ardından çözelti buhner hunisi kullanılarak süzölmüştür. İşlem öncesi homojen amber görüntüsüne sahip olan çözelti, 24 saat boyunca -20°C'de bekletilmesi sonucunda dibinde çökelti ve bulanık bir renge sahip olmuştur. Bu veriye ait görsel Şekil 4.18'de sunulmuştur.



Şekil 4.18. Mumsu bileşenlerin giderimi işlemi öncesi (sol) sonrası (sağ)

Mumsu bileşenlerin giderimi aşması öncesinde 1 gram kepek içerisinde bulunan ortalama ferülik asit miktarı $2953,93 \pm 29,22$ ppm olarak bulunmuştur. Vinterizasyon sonrasında yapılan analizlerde ise ortalama $1354,57 \pm 115,26$ ppm şeklinde belirlenmiştir.

Literatür çalışmalarında buğday kepeğinde bağlı olan ferülik asit miktarı 407-588 ppm şeklinde rapor edilmişken serbest formda bulunan ferülik asit miktarı ise 0,55-2,3 ppm olduğu deklare edilmiştir (Moore vd. 2009). Yapılan diğer bir çalışmada ise 11 adet

farklı buğday çeşidinden yapılan serbest ferulik asit analizi sonucu 0,19-1,4 ppm hücre duvarına veya karbohidrat kısmına bağlı olan ferulik asit ise 288-580 ppm olarak deklare edilmiştir (Adom vd. 2005). Diğer bir çalışmada ise bağlı formda bulunan ferulik asit miktarı 527-936 ppm serbest formda bulunan ferulik asit 8,35-39 ppm olarak rapor edilmiştir (Menteş Yılmaz 2011).

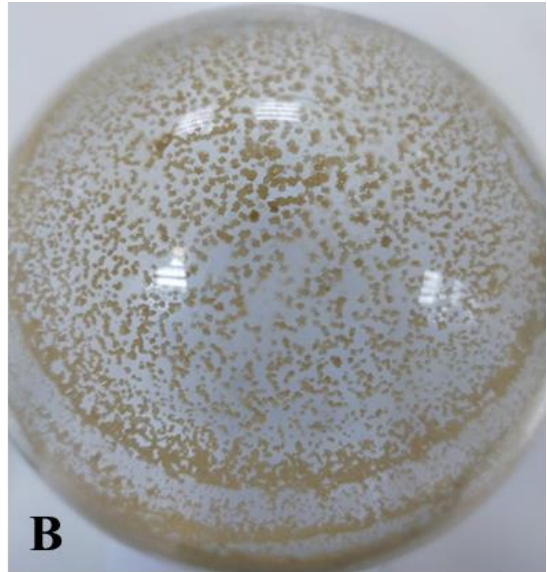
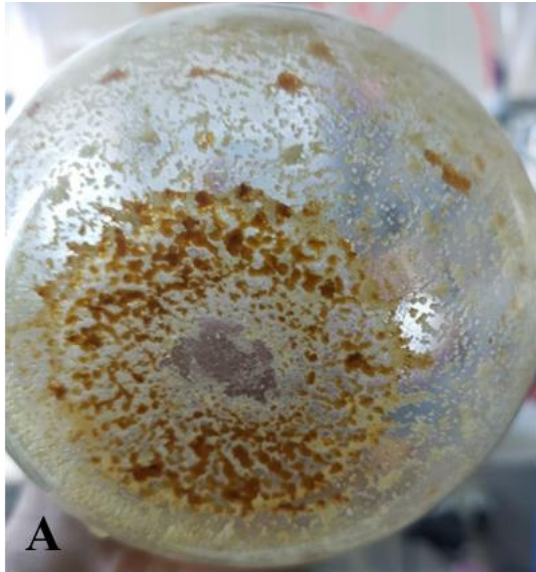
Doktora tezi kapsamında yapılan çalışmada ise serbest ya da bağlı ayırımı yapılmaksızın Siyez 6 buğdayında yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı kullanılarak yapılan analizlerde ferulik asit miktarı 2953,93 ppm olarak saptanmıştır.

4.3.4. Döner buharlaştırıcıda saflaştırma

Ekstraksiyon işlemleri sonrasında elde edilen çözeltide bulunan çözgen bir döner buharlaştırıcı kullanılarak Bölüm 3.7.2.5'te belirtilen şartlar altında evapore edilmiş olup elde edilen kalıntı materyale ait veriler Çizelge 4.2'de çalışmalara ait görseller Şekil 4.19'de gösterilmiştir.

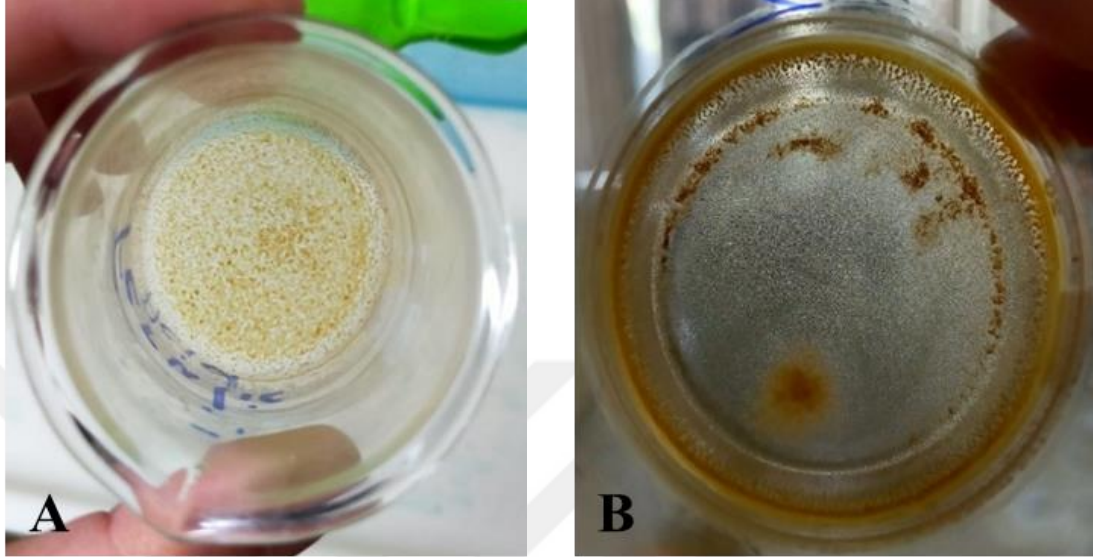
Çizelge 4.2. Buğday kepeğinden hazırlanan ekstraksiyonların döner buharlaştırıcı sonrasındaki ağırlık verileri

Döner buharlaştırıcı öncesi miktar (mL)	Döner buharlaştırıcı sonrasında tartım sonucu (g)
250	6,89
250	5,17
250	4,81
250	7,12
250	6,22



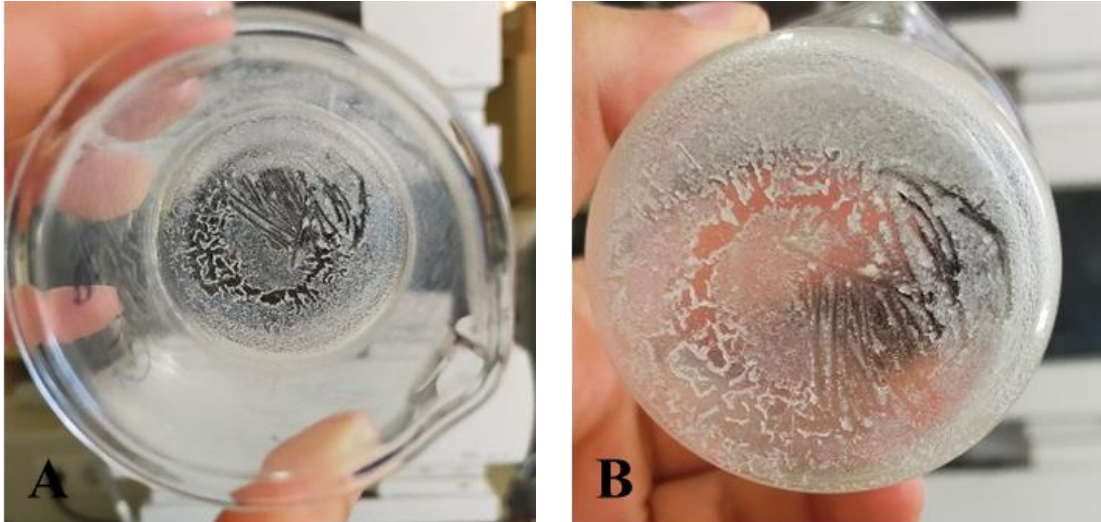
Şekil 4.19. Döner buharlaştırıcı sonucunda elde edilen katı faz

Döner buharlaştırıcı ile uçurulan buğday kepeği ekstraksiyonu çözeltisi, sonrasında katı fazın içinde bulunan ferülik asidi, sadece ferülik asidi çözebilen bir sıvı ile karıştırıp, daha sonra bu sıvıyı uzaklaştırıp, geride kalan rezidüden analiz yaparak ferülik asidin saflık oranını belirlenmiştir. Bu sıvı için %100 metanol kullanılmıştır. Şekil 4.20’de metanolün çözmüş olduğu maddelere ait görseller bulunmaktadır.



Şekil 4.20. Döner buharlaştırıcı sonrasında katı fazdan %100 metanolde çözülen maddeler

Metanolün ferülik asidi çözmesinin yan sıra ekstrakt içerisinde çözdüğü tek maddenin ferülik asit olmadığı ve mumsu maddelerin uzaklaşmadığı görülmektedir. Mumsu maddeleri daha az çözen bir çözücü olarak %30 Metanol konsantrasyonu kullanılmıştır. Bu kapsamda elde edilen bulgular Şekil 4.21’de gösterilmiştir.



Şekil 4.21. Döner buharlaştırıcı sonrasında elde edilen katı fazda %30 metanolde çözülen maddenin görüntüsü

Bu kapsamda yapılan analizler ferülik asidin analitik standardı ile kıyaslandığında %28 saflık oranında başarılı olduğu bulunmuştur. Ancak mumsu bileşenlerden tam anlamıyla uzaklaşmadığı görülmüştür.

4.3.5. Kolon kromatografisi sonuçları

Bu çalışmalarda Bölüm 3.7.2.6'da belirtilen şartlar altında silika jel ile doldurulan kolonun kloroform ve kloroform:hekzan çözeltisi ile şartlandırılmasının ardından kepek ekstraksiyonu çözeltisi döner buharlaştırıcı kullanılarak sıvı fazı uçurulmuştur. Geride kalan katı faz 0,1 gram tartılarak kolonun üst kısmından uygulanmıştır

Ancak uygulanma sonunda kolondan elde edilen fraksiyonların analizlerinde ferülik aside rastlanılmamış olup, elde edilen sonuç kullanılan çözümlerin ferülik asidi taşıması ve kolona tutunmuş olabileceğine bağlanmıştır. Ancak literatürde yapılan bir çalışmada modifiye edilen silika jelin ferülik asidin saflaştırılmasında kullanıldığı rapor edilmiştir. Bu işlemde Silikajel (S-15 µm) etüvde 3 saat kurutulduktan sonra 2 g tartılarak, 8 ml 1:1 metanol:DES (Derin ötektik çözücüler) eklendikten ultrasonikasyon işlemi uygulanarak homojen dağılım sağlanmıştır. Devamında ise toplam 20 g silika jel 8 ml 1:1 metanol:iyonik sıvı içine koyularak, karışım 12 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldıktan sonra her bir karışım su ve etanol ile yıkanarak ve sonrasında 80°C'de kurutulup kullanıldığı ifade edilmiştir (Li vd. 2017). Öte yandan (Petrisor, Motelica vd. 2022) ve (Petrisor, Ficai vd. 2022) yaptıkları çalışmalarda fenolik asitlerin saflaştırılabilmesi için silikajelin farklı çözücülerle muamele edip, sonrasında kullanılması gerektiğini ifade etmişlerdir. MCM-41 ve MCM-48 olmak üzere iki tip mezo-gözenekli silikajel denemiş olup, bu gözeneklerin içine polifenollerin yüklendiği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle BET yüzey alanı 1179'dan 54 m²/g'a (ferülik asit yüklü MCM-41 için) rapor edilmiştir. Polifenolün yapısına ve aynı zamanda mezo-gözenekli silika türüne bağlı olarak, gözenek yapısı, gözenek yükleme kapasitesi ve yüzey morfolojisi gibi önemli farklılıklar göz önünde bulundurulması ifade edilmiştir. Böylelikle kolon kromatografisinin kullanılmasında ferülik asidin saflaştırılmasında 2 yol olduğu anlaşılmış olup, kullanılan kolon dolgu maddesinin türüne göre ferülik asidi absorbe edebilir ya da buğday kepeği matriksi içerisinde ferülik asidi adsorbe edebileceği anlaşılmıştır. Bu kapsamda uygulanacak yöntemin en önemli parametresi ekonomik ve verimliliği yüksek olan protokolün uygulanması daha uygun olacağı düşünülmektedir.

Ferülik asidin saflaştırılması konusunda yapılan diğer bir kolon kromatografisi çalışmasında buğday kepeği 0,1M NaOH ile hidrolize edildikten sonra 20°C'de 24 saat boyunca N₂ gazı ile karalıktta bekletilmiştir. Devamında ise 3 kez etil asetat uygulanarak tamamen kurutularak silika jel 60 F254 kolonu kullanılarak saflaştırma denemesi gerçekleştirilmiştir. Kolonda asetat: metanol 3:2 ve 100 µl trifloroasetik asit ile saflaştırma işlemi yapılmıştır. Böylelikle %75-80 oranında saflık elde edildiği rapor edilmiştir (Garcia-Conesa, Plumb vd. 1997).

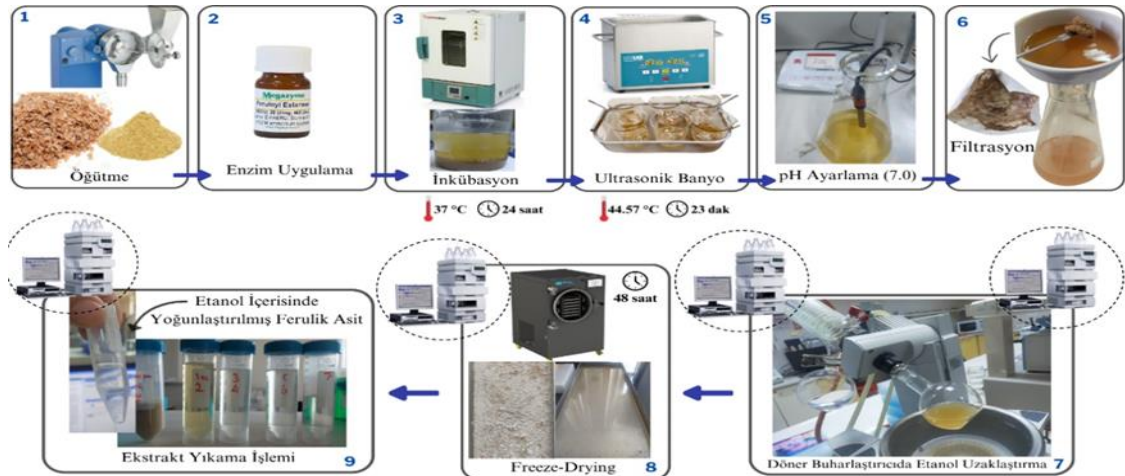
(Tang, Hao vd. 2021) tarafından yapılan çalışmada, buğday kepeğinin ham ekstraktından ferülik asit stereo izomerlerinin preparatif bir ayırma yöntemi

geliştirilmiştir. Yöntem iki aşamalı olacak şekilde ilerlemektedir. Birinci aşama ayrıştırma olarak ifade edilip, geleneksel kolon kromatografisi (CCC, hekzan: etil asetat: metanol: su = 2:5:2:4) pH-zone-rafine edici CCC (hekzan: etil asetat: asetonitril: su = 2:5:2:2, organik sabit fazda 10 mmol L⁻¹ sonrasında ise trifloroasetik asit ve sulu mobil fazda 10 mmol L⁻¹ amonyak) kullanılmıştır. HPLC cihazında yapılan analizlerde %99 ve %98'in üzerinde yüksek saflıkta trans-ferülik asit ve cis-ferülik asit saflaştırıldığı rapor edilmiştir.

Tarım atıklarından saflaştırılmış ferülik asit ile yapılan analizlerde %95,35 saflık oranına ulaşılmıştır. Bu çalışmada, mısır kepeği, pirinç kepeği, buğday kepeği, buğday samanı, şeker kamışı küspesi, ananas kabukları, portakal kabukları ve nar kabukları gibi çeşitli tarımsal atıklar ferülik asit açısından taranmıştır. Taranan kaynaklar arasında mısır kepeğinin en yüksek miktarda ferülik asit içerdiği bulunmuştur. Saflaştırma, Amberlite XAD-16 kullanılarak adsorpsiyon kromatografisi ve ardından preparatif yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) ile gerçekleştirilmiştir. Amberlite XAD-16 ile saflaştırılan ferülik asidin geri kazanımı %57,97'ye kadar çıkarken HPLC cihazı kullanılarak yapılan analizde elde edilen ferülik asidin saflığı %50,89 olmuştur. Elde edilen saflık oranı 1,35 kat olduğu ifade edilmiştir. Ancak HPTLC kullanılarak elde edilen ekstrakta yapılan analizlerde ise %95,35'tir. Saflık oranı ise 2,53 kat arttırıldığı deklare edilmiştir (Tilay, Bule vd. 2008).

4.3.8. Dondurarak kurutma yöntemi kullanılarak saflaştırma sonuçları

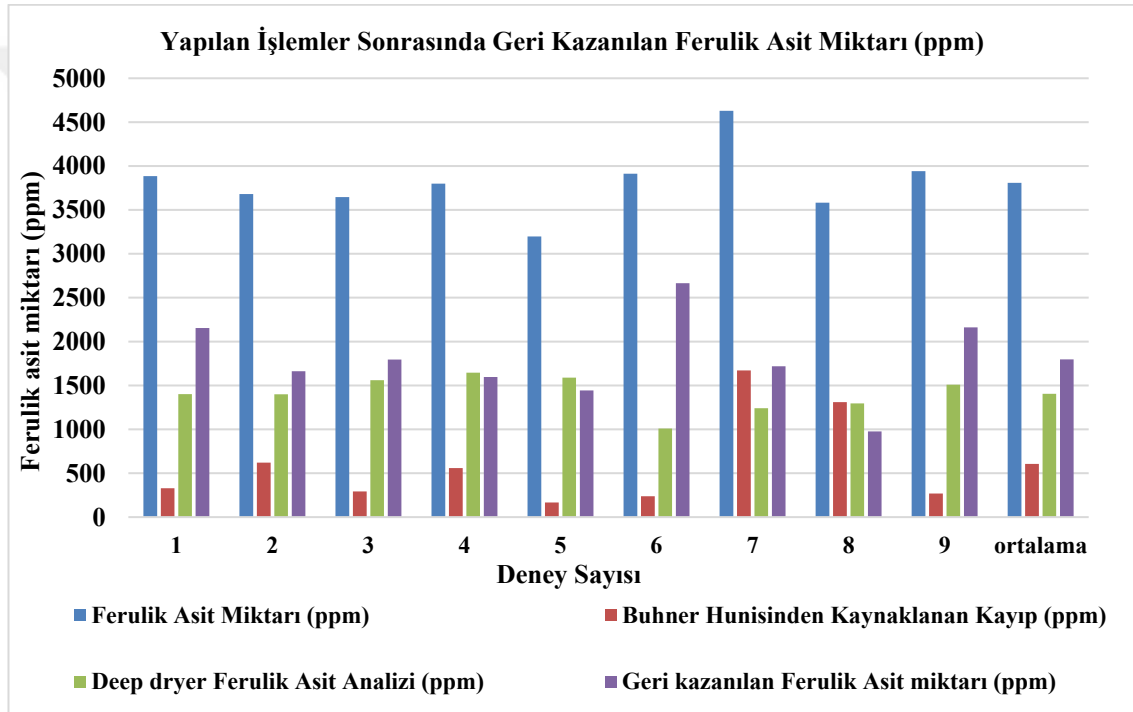
Bu işlemler sırasında ekstraksiyon işlemleri sonrasında elde edilen karışımda bulunan çözgen Bölüm 3.7.2.7'de belirtilen şartlar altında bir deep dryer kullanılarak uzaklaştırılmıştır. İşlem öncesi çözeltide bulunan etanol bir döner buharlaştırıcı yardımıyla evapore edilmiş ve ardından dondurarak kurutma işlemine geçilmiştir. Elde edilen verilere göre ferülik asidin geri kazanımı diğer yöntemlere göre daha yüksek oranda olduğu sonucuna varılmıştır. Bu deneye ait akış şeması Şekil 4.22'de sunulmuştur.



Şekil 4.22. Dondurarak Kurutma Yöntemi Kullanılarak Saflaştırma aşamaları

Dondurarak kurutma çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen 9 deney için kullanılacak olan buğday kepeklerinde ortalama ferülik asit değeri başlangıçta $3808,27 \pm 361,33$ ppm olarak saptanmıştır. Ekstraksiyon sonucunda elde edilen katı-sıvı karışımın, vakum altında buhner hunisinden süzme işlemin sonucunda (Şekil 4.24, 6. Resim) $606,17 \pm 499,99$ ppm ferülik asit kaybı belirlenmiştir.

Döner buharlaştırıcı kullanılarak çözeltide bulunan etanol fazı uzaklaştırılarak dondurup kurutma işlemine geçilmiştir. Bu kapsamda dondurup kurutma işleminden sonra elde edilen katı materyal miktarı (Şekil 4.24, 8. Resim) $11,10 \pm 0,48$ gram olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu katı materyal içerisinde bulunan ferülik asit %99,9 etanol ile toplamda 10 kez yıkanarak alınmış ve ferülik asit haricinde bulunan diğer katı materyalleri çöktürmek için 12500 rpm’de santrifüj edilmiştir. Üst faz steril bir şişede toplanarak, ışık geçirmeyecek şekilde $+4$ °C’de saklanmıştır. Dondurarak kurutma çalışmaları aşamalarında tespit edilen ferülik asit miktarları Şekil 4.23’de sunulmuştur.



Şekil 4.23. Dondurup kurutma yöntemi ile geri kazanılan ferülik asit miktarı

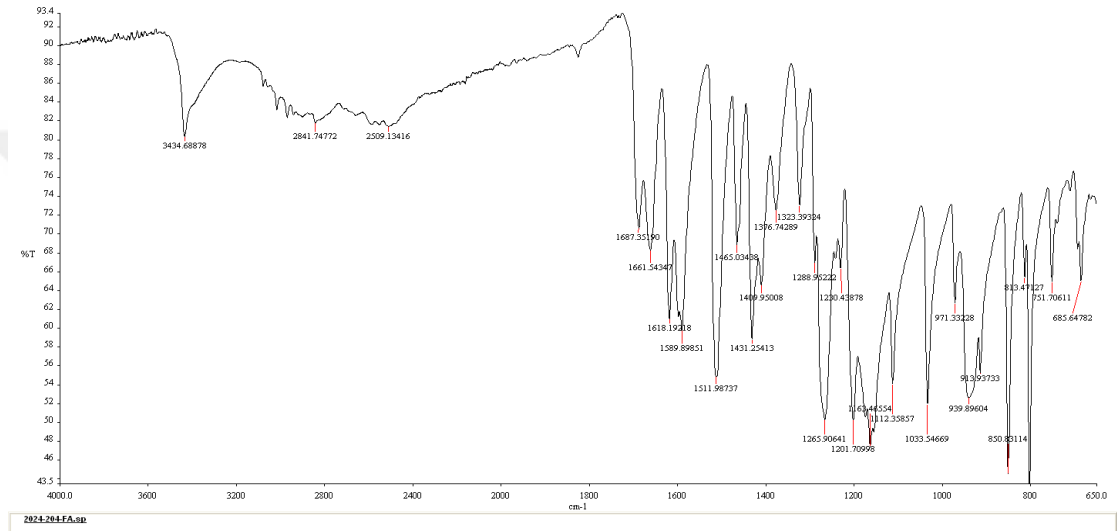
Şekil 4. 23’te sunulan verilere göre, başlangıçta $3808,27 \pm 361,33$ ppm olan ferülik asidin $606,17 \pm 499,99$ ppm’lik kısmı buhner hunisi aşamasında, $1405,17 \pm 325,36$ ’lik kısmı dondurarak kurutma işlemi sırasında azalmış olup toplamda $1796,92 \pm 325,36$ ppm ferülik asit geri kazanılmıştır. Dondurup kurutma işlemi kullanılarak geri kazanılan ferülik asit miktarı %44,02 olarak bulunmuştur.

4.4. Saflaştırılan Materyalin Yapısal Analizleri

Yapılan deneyler sonucunda dondurup kurutma işlemi kullanılarak saflaştırılan materyalin FTIR ve MS analizleri gerçekleştirilmiştir olup bu sonuçlar alt başlıklarda paylaşılmıştır.

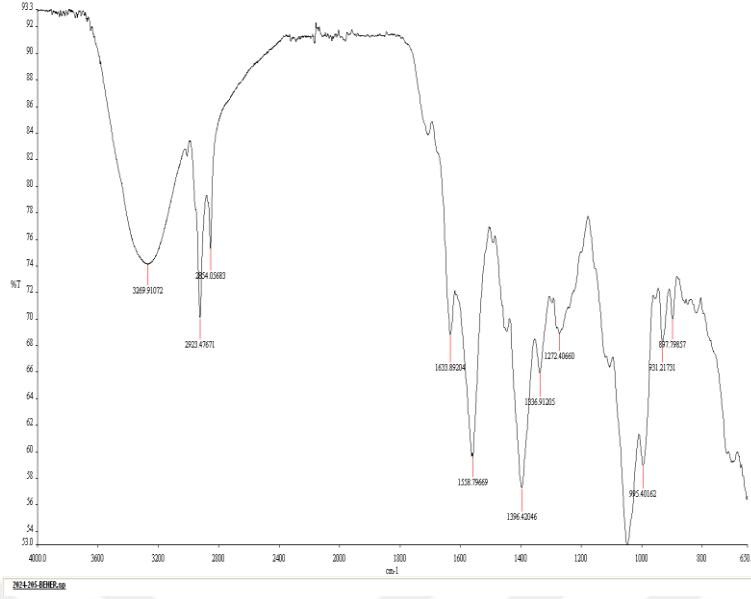
4.4.1. FTIR analizleri

FTIR analizlerinin gerçekleştirilmesi için ferülik asit analitik standardı ve dondurup kurutma işlemi kullanılarak saflaştırılan materyalden iki farklı fazda numune analizi gerçekleştirilmiş olup ferülik asidin analitik standartı ile gerçekleştirilen analize ait görsel şekil 4.24'te paylaşılmıştır.



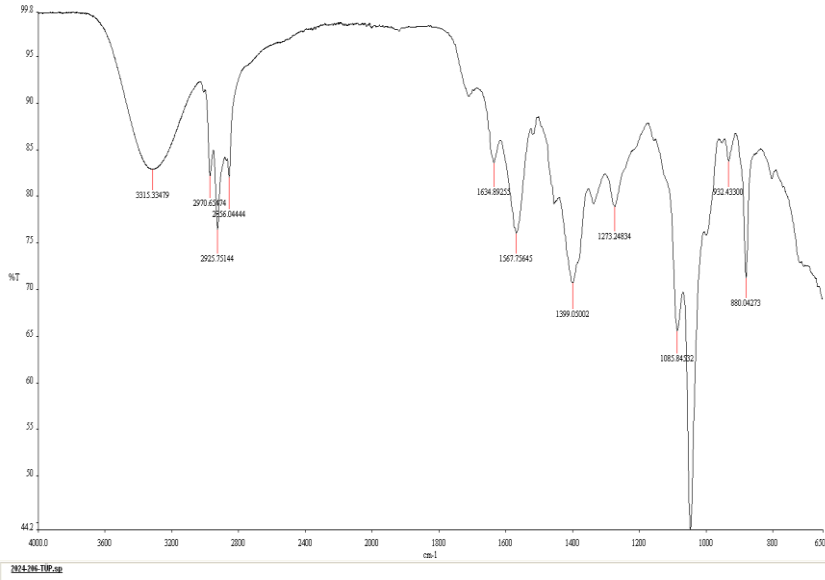
Şekil 4.24. Ferülik asidin FTIR analizi sonucu elde edilen spektrum

Dondurup kurutma işlemi kullanılarak saflaştırılan materyalden iki farklı fazda elde edilen numunelerden ilki olan yarı akışkan faza ait FTIR analizi sonucu şekil 4.25'te paylaşılmıştır.



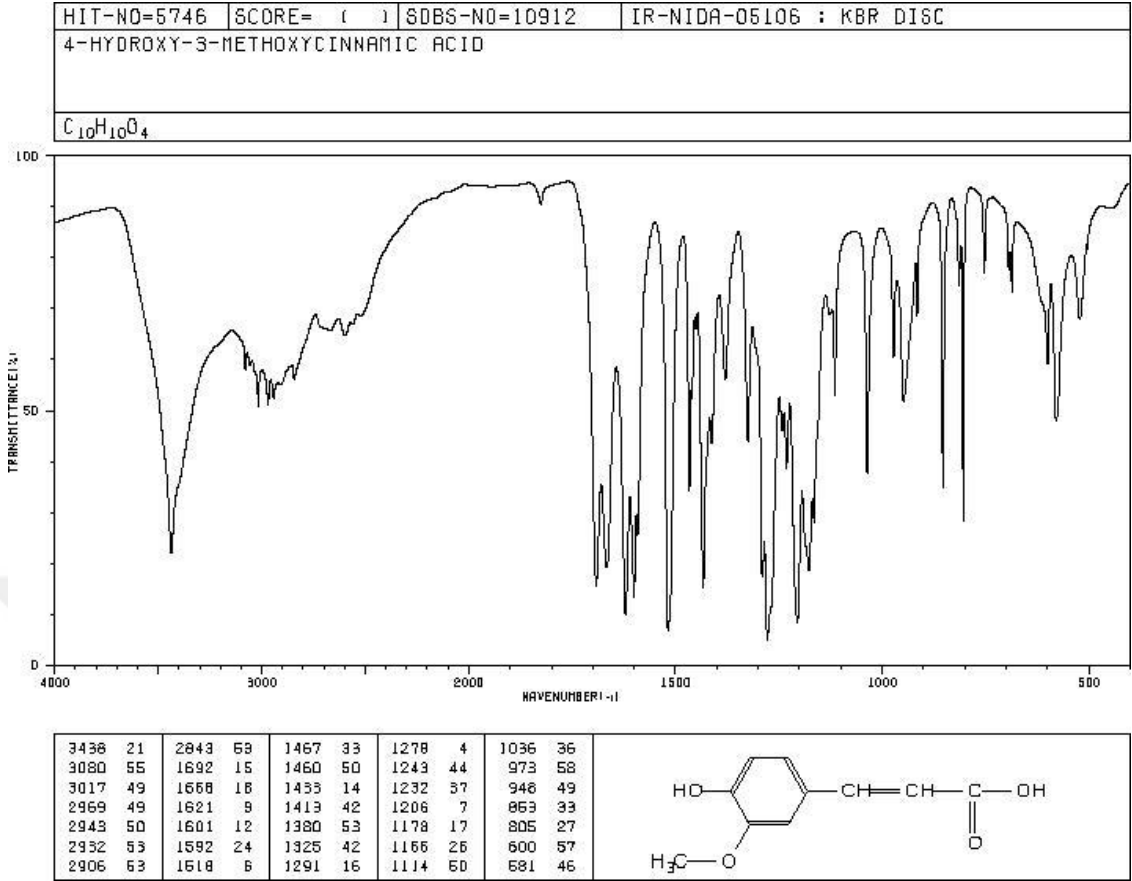
Şekil 4.25. Dondurup kurutma işlemi kullanılarak saflaştırılan yarı akışkan faza ait FTIR analizi sonucu elde edilen spektrum

Dondurup kurutma işlemi kullanılarak saflaştırılan materyalden sıvı olan faza ait FTIR analizi sonucu şekil 4.26’da paylaşılmıştır.



Şekil 4.26. Dondurup kurutma işlemi kullanılarak saflaştırılan yarı akışkan faza ait FTIR analizi sonucu elde edilen spektrum

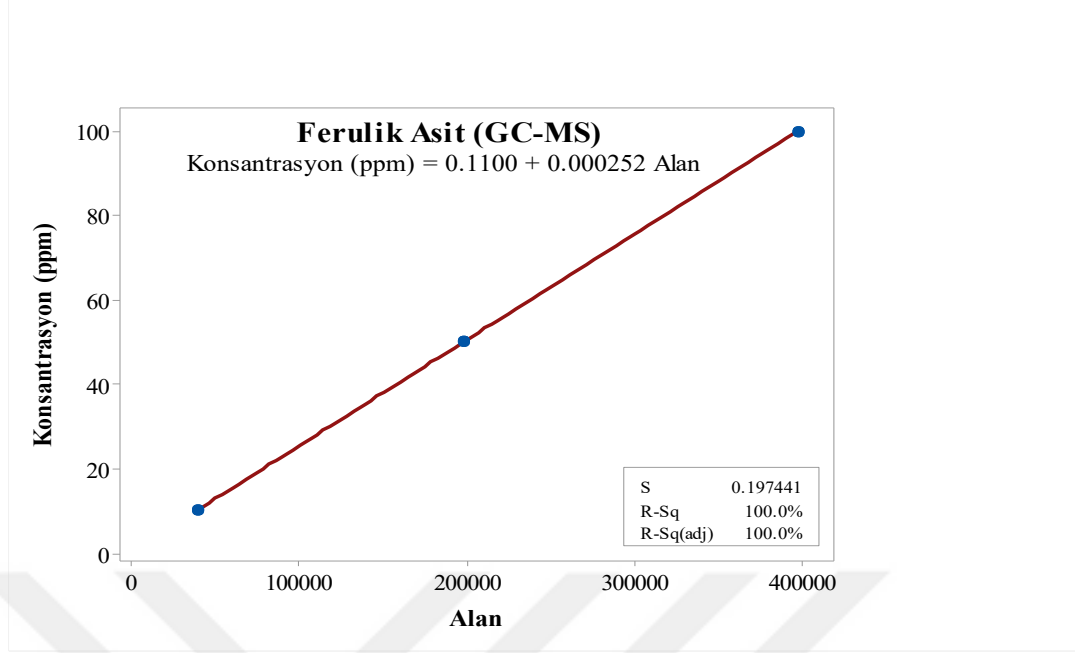
Bu bilgiler ışığında literatürde yapılan ferülik asitin FTIR analiz sonucu Şekil 4.27’de paylaşılmış olup, tez kapsamında elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir.



Şekil 4. 27. Ferülik asite ait FTIR analiz sonucu (ChemicalBook 2017)

4.4.2. MS analizleri

Bu kapsamda GC-MS cihazı kullanılarak materyal metot kısmında belirtilen ve şartları en uygun hale getirilen analiz yöntemi ile analiz edilmiştir. Ferülik asidin kalibrasyon eğrisinin oluşturulabilmesi için farklı konsantrasyonlarda metanol ile hazırlanan ferülik asit çözeltileri GC-MS sisteminin optimum şartları altında analizler gerçekleştirilmiş olup, cihazdan alınan pik alanlarına karşılık konsantrasyon değerleri kullanılarak elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.28’de verilmiştir.



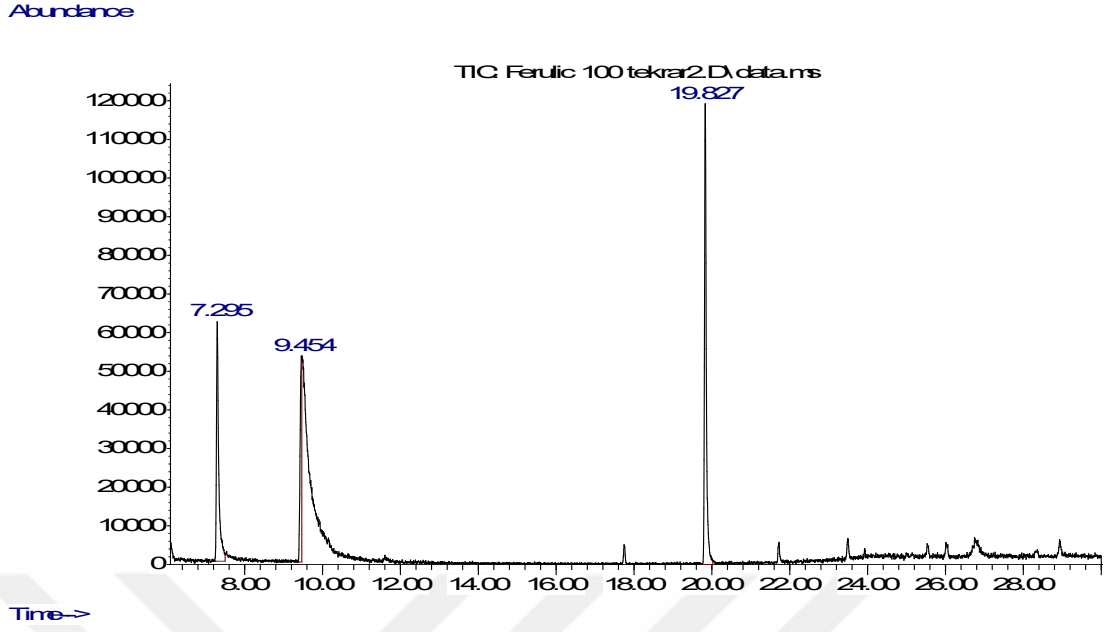
Şekil 4.28. Ferulik asidin GC-MS cihazından elde edilen kalibrasyon denklemi

Ferulik aside ait GC-MS analizinden elde edilen bazı metot validasyon bulguları Çizelge 4.3'te sunulmuştur.

Çizelge 4.3. GC-MS cihazına ait ferulik asidin validasyon verileri

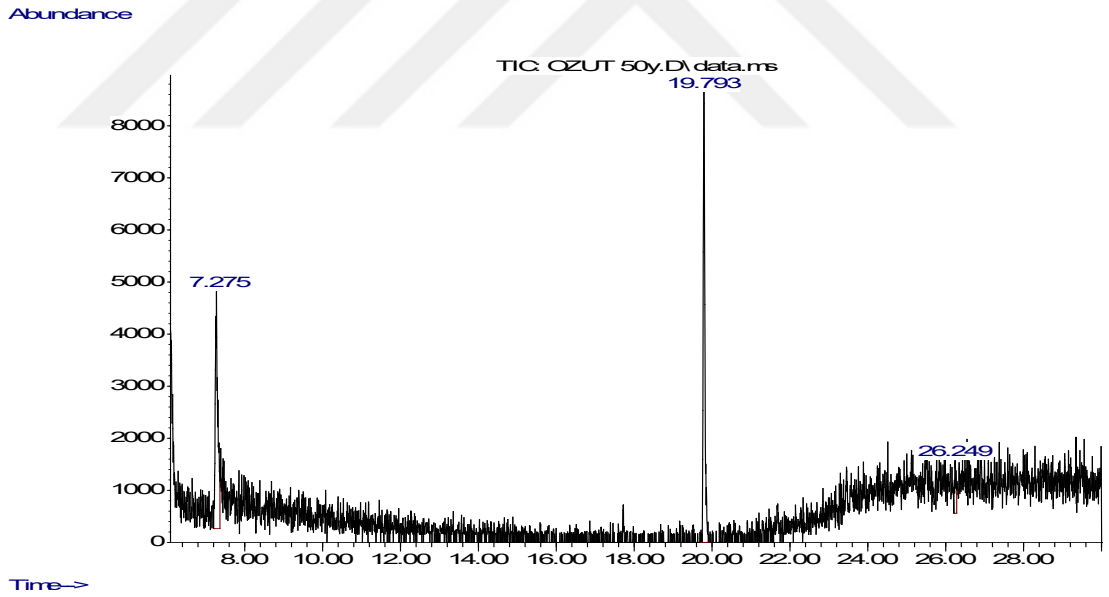
Kalibrasyon eşitliği	$y = 0,000252 x - 0,0965$
r^2	1
Doğrusal aralık (ppm)	1,67 - 100
Standart sapma	0,16
LOD (ppm)	0,50
LOQ (ppm)	1,67
RSD (%)	1,65

Ferulik asidin analitik standardı ile gerçekleştirilen GC-MS analizi sonucunda elde edilen spektruma ait görsel şekil 4.29'da paylaşılmıştır.



Şekil 4.29. Ferülik asidin GC-MS analizi sonucunda elde edilen spektrum

Belirtilen şartlar altında dondurup kurutma işlemi kullanılarak saflaştırılan yarı akışkan faza ait kütle spektrometrik analize ait sonuçlar şekil 4.30’da paylaşılmıştır.

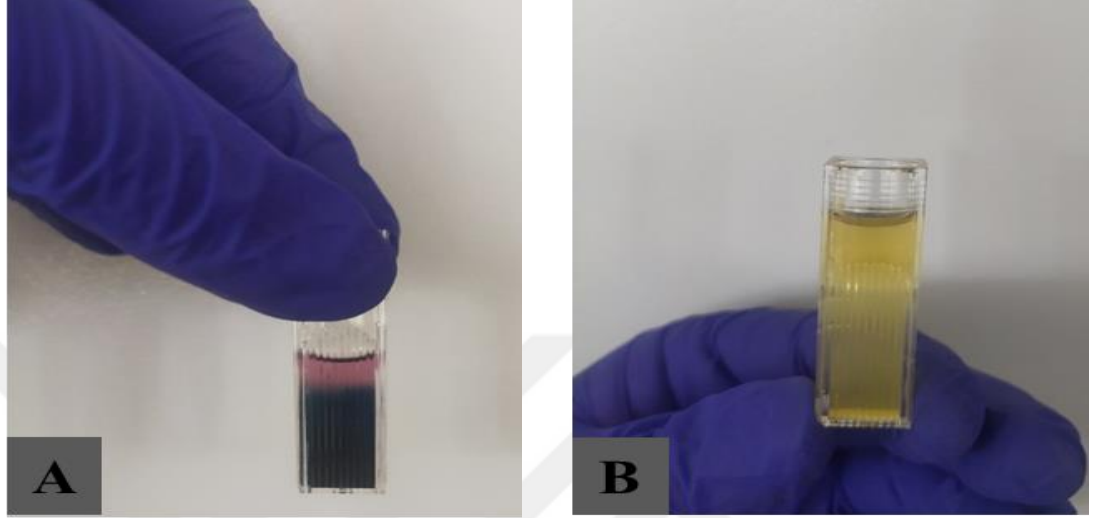


Şekil 4.30. Dondurup kurutma yöntemi ile elde edilen yarı akışkan faza ait GC-MS spektrumu

4.5.Biyolojik Etkinlik Değerlendirme Çalışmaları

4.5.1. Antioksidan kapasite testleri

Ferülik asidin analitik standardı ve saflaştırılan materyalde gerçekleştirilen antioksidan aktivite deneylerinin görselleri Şekil 4.31’de gösterilmiştir.



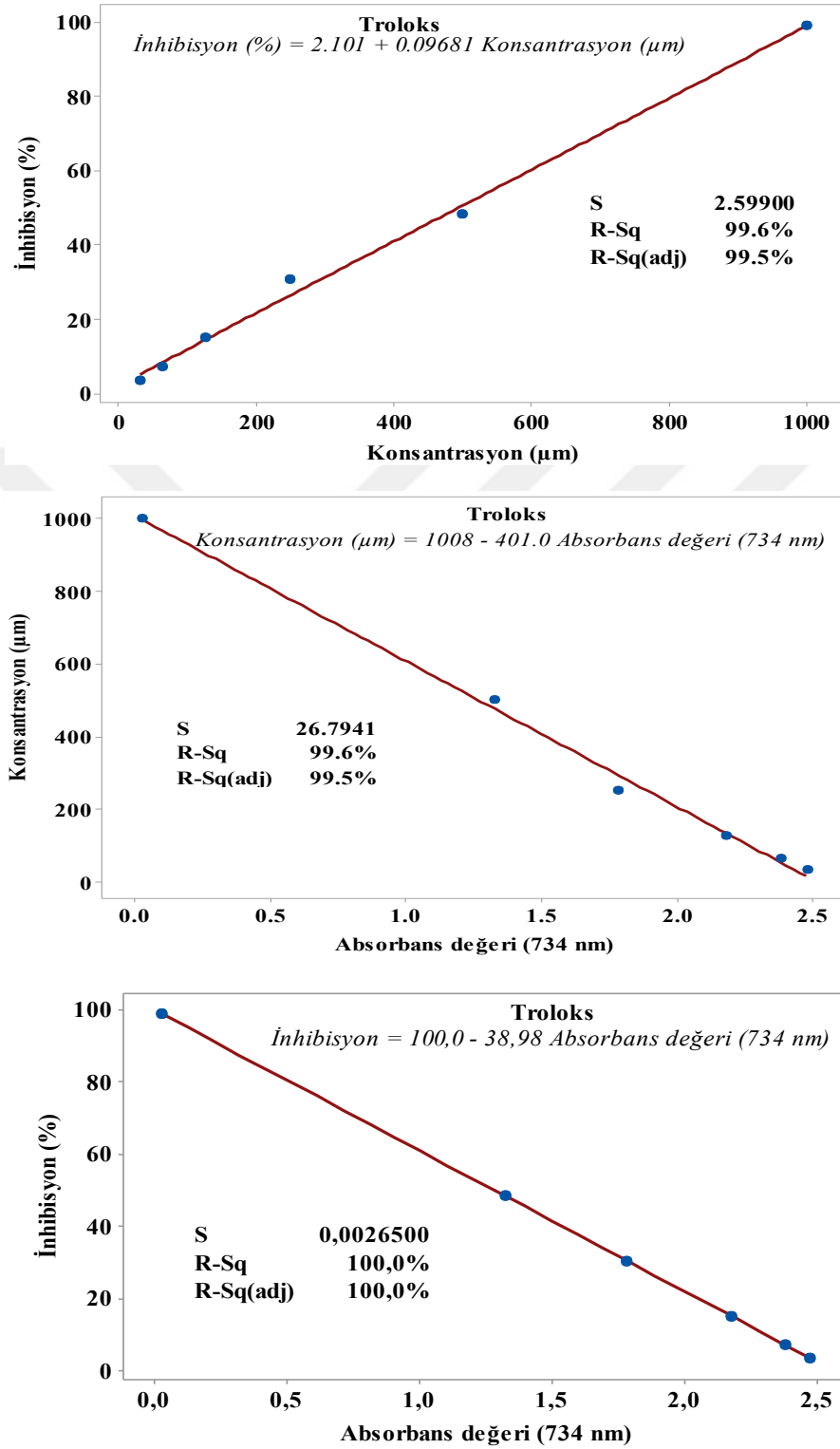
Şekil 4.31. Antioksidan Aktivite deneylerine ait görüntüler

ABTS çözeltisi kullanılarak yapılan çalışmanın yorumlanabilmesi için standart Troloks denkleminin verileri Çizelge 4.4’te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Antioksidan aktivite testinde kullanılacak olan standart Troloks verileri

Örnek Adı	Konsantrasyon (μm)	Kör (EtOH)	Okuma (734nm)	İnhibisyon (%)
TROLOX 1000	1000	0,001	0,02	98,96
TROLOX 500	500	0,002	1,32	48,36
TROLOX 250	250	0,001	1,78	30,49
TROLOX 125	125	0,001	2,18	14,97
TROLOX 62.5	62,5	0,001	2,38	7,02
TROLOX 31.25	31,25	0,002	2,47	3,39

Bu veriler ışığında elde edilen denklemler Şekil 4.32’de verilmiştir. Anlamlılık düzeyi 0,05’tir.



Şekil 4.32. ABTS testinde kullanılacak kalibrasyon denklemleri

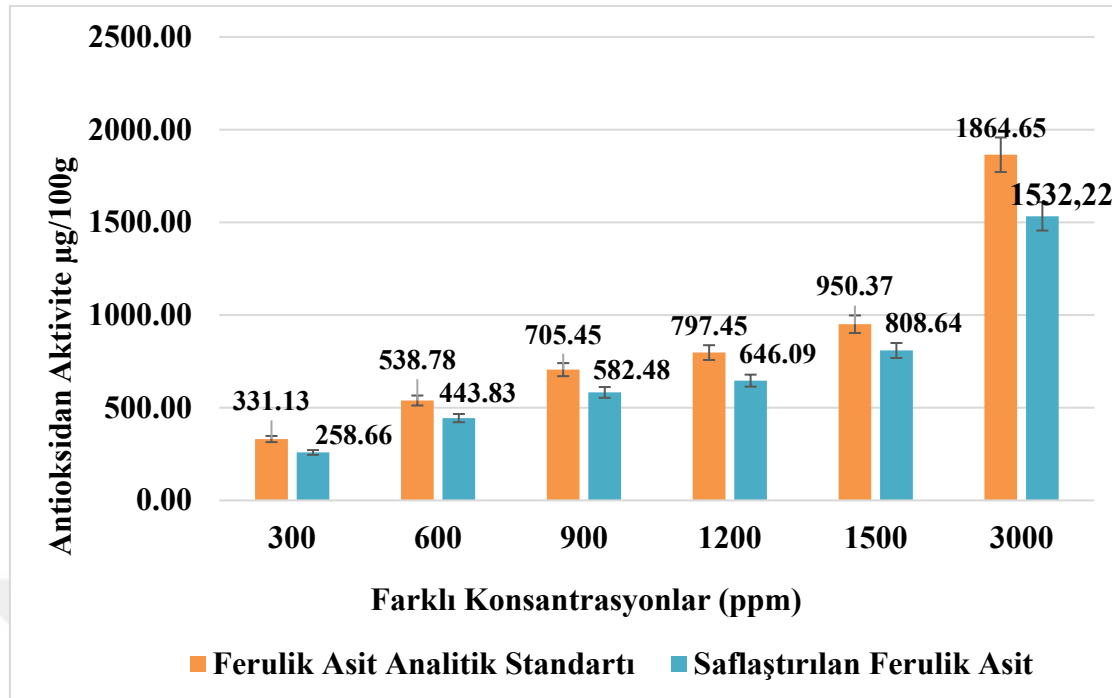
Elde edilen denklemler kullanılarak ferülik asidin analitik standardı ve buğday kepeğinden saflaştırılan ferülik asidin analizlerinden elde edilen bulgular Çizelge 4.5'te verilmiştir. Troloks kimyasalına ait absorbands değeri ise 2,565 olarak okunmuştur.

Çizelge 4.5. ABTS test sonuçları

Ferülik asit analitik standardı	Absorbans değeri (734 nm)	Konsantrasyon
300	0,26	331,13
600	0,47	538,78
900	0,55	705,45
1200	0,62	797,45
1500	0,74	950,37
3000	1,45	1864,65
Saflaştırılan Ferülik asit (ppm)	Absorbans değeri (734 nm)	Konsantrasyon
300	0.20	258.66
600	0.35	443.83
900	0.45	582.48
1200	0.50	646.09
1500	0.63	808.64
3000	1.19	1532.22

Konsantrasyon ve absorbands değeri açısından ferülik asit analitik standardının ve saflaştırılan ferülik asidin verileri gösterilmiştir. Anlamlılık düzeyi 0,05'tir.

Elde edilen veriler ışığında ferülik asidin analitik standardının, saflaştırılan ferülik asidin ABST test sonucu karşılaştırması Şekil 4.33'te gösterilmiştir.



Şekil 4.33. Ferulik asit analitik standardı ve saflaştırılan ferulik asidin konsantrasyon açısından karşılaştırılması

Elde edilen veriler ışığında dondurup kurutma yöntemi kullanılarak elde edilen materyalden yapılan GC-MS analizine göre %17,2 oranında saflaştırılan ferulik asidin ABTS deneyleri sonucunda elde edilen yaklaşık %80 oranında antioksidan aktivitesi olduğu anlaşılmaktadır. Bunun temel sebebinin saflaştırma esnasında oksijen ile oksitlenmesi sonucu olabileceği gibi pH değişimlerinden dolayı antioksidan kapasitesinin azalabileceği düşünülmektedir.

Literatür çalışmalarında ferulik asidin analitik standardı ile yapılan ABTS testlerinde minör farklılıklar görülmüştür. Bunun sebebinin deneyde uygulanan protokolünde uygulanan değişiklikler ve kullanılan spektrometreden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada ABTS testinde ferulik asidin farklı konsantrasyonlarının (μM cinsinden) analizleri yapılmıştır. Rapor edilen verilerin ortalama değerleri ile tez çalışması kapsamında elde edilen verilerin paralel olduğu görülmektedir (Maurya ve Devasagayam 2010).

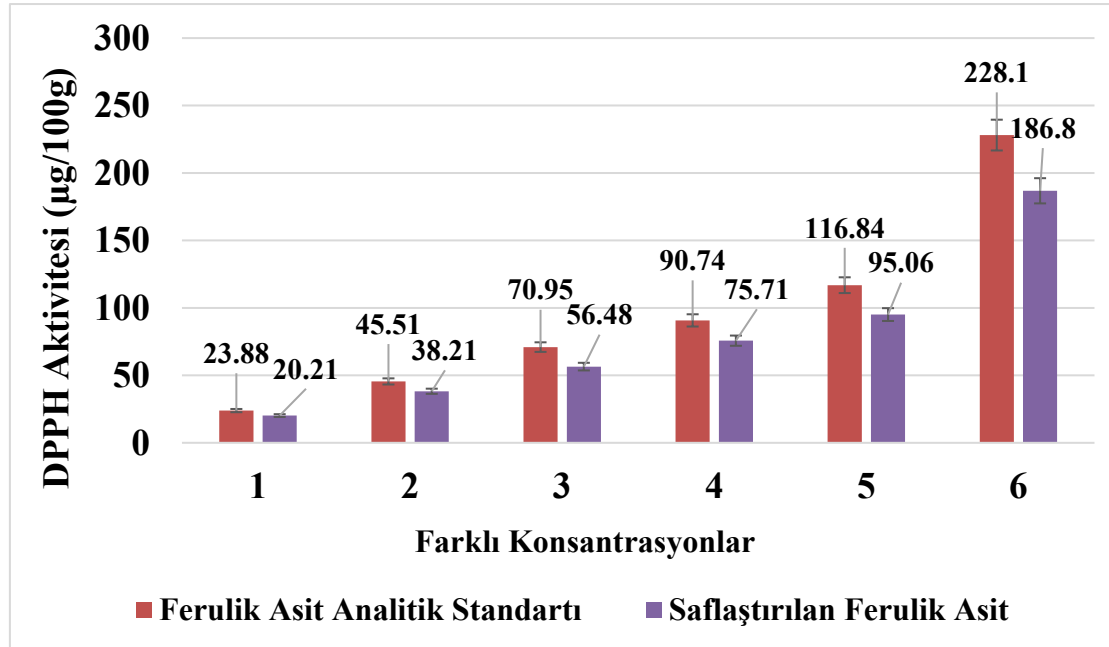
4.5.2. Serbest radikal analizleri

DPPH testi ile serbest radikal analizleri yapılmış olup, bu teste ait veriler Çizelge 4.6'da verilmiştir. DPPH 517 nm elde edilen absorban değerleri 1,3828'dir.

Çizelge 4.6. DPPH testinden elde edilen sonuçlar

Ferulik asit analitik standardı (ppm)	Absorbans değeri (517nm)	DPPH Absorbans değeri ile fark	% inhibisyon
300	0,23	1,14	23,88
600	0,45	0,92	45,51
900	0,71	0,67	70,95
1200	0,91	0,47	90,74
1500	1,16	0,21	116,84
3000	2,28	-0,89	228,11
Saflaştırılan Ferulik asit (ppm)	Absorbans değeri (517nm)	DPPH Absorbans değeri ile fark	% inhibisyon
300	0.21	1,24	20.21
600	0.38	1,11	38.21
900	0.56	0,98	56.48
1200	0.75	0,83	75.71
1500	0.96	0,71	95.06
3000	1.86	0,09	186.81

Elde edilen veriler ışığında ferulik asidin analitik standardının, saflaştırılan ferulik asidin DPPH test sonucu karşılaştırması Şekil 4.34'te gösterilmiştir. Anlamlılık düzeyi 0,05'tir.



Şekil 4.34. Ferulik asit analitik standardının saflaştırılan ferulik asidin DPPH Test sonucu karşılaştırması

Serbest radikal analizleri sonucunda kümülatif bir değerlendirme yapılırken GC-MS analizi ile %17,2 oranında saflaşan ferulik asidin, DPPH testi ile inhibisyon parametresi baz alınarak kıyaslandığında yaklaşık % 81 oranında bir saflaştırma başarısı görülmektedir. Bunun temel sebebinin saflaştırılan materyal içerisinde mumsu bileşenlerden kalan kalıntıların serbest radikalleri tutması ayrıca saflaştırılan materyalde tuz kristalleri bulunması nedeniyle serbest formda olan radikallerin istenmeyen bağlar kurduğu, bu sebepten ötürü DPPH testinde daha az etkinlik gösterdiği saptanmıştır.

Ferulik asidin analitik standardı kullanılarak yapılan çalışmalarda elde edilen veriler tez çalışması kapsamında bulunan sonuçlar ile paralellik göstermektedir. Yapılan bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda yapılan DPPH deneyinde rapor edilen veriler ile benzerlik görülmektedir (K1, Avti vd. 2006).

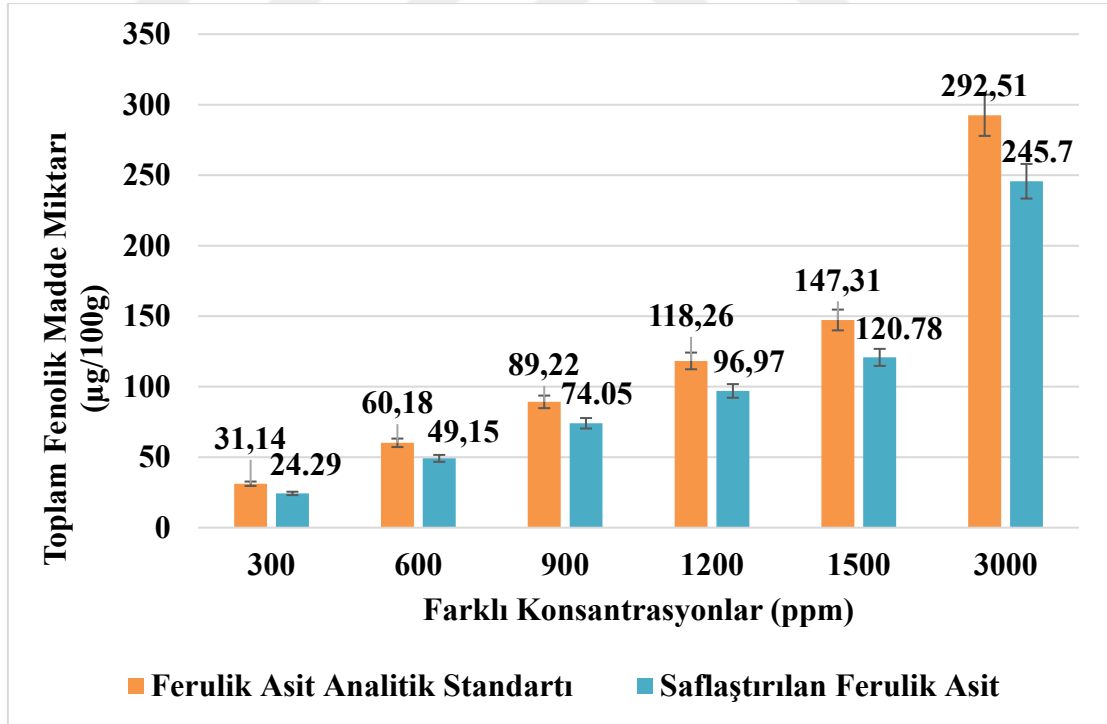
4.5.3. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi

Toplam fenolik içeriğini saptamak için Folin-Ciocalteu yönteminden yararlanılmıştır ve standart olarak troloks eğrisi kullanılmıştır. Bu kapsamda elde edilen veriler Çizelge 4.7’de sunulmuştur.

Çizelge 4.7. Folin-Ciocalteu yönteminden elde edilen absorbans değerleri ve toplam fenolik madde miktarı ($\mu\text{g}/100\text{g}$)

Ferülik asit analitik	Absorbans değeri (765nm)	% inhibisyon
300	0,21	31,14
600	0,43	60,18
900	0,64	89,22
1200	0,86	118,26
1500	1,07	147,31
3000	2,15	292,51
Saflaştırılan Ferülik asit (ppm)	Absorbans değeri (765nm)	% inhibisyon
300	0.16	24.29
600	0.35	49.15
900	0.53	74.05
1200	0.71	96.97
1500	0.88	120.78
3000	1.81	245.71

Şekil 4.35'te ferülik aside ait analitik standardının saflaştırılan ferülik asit içerisinde bulunan toplam fenolik içerik karşılaştırmasının verileri sunulmuş olup, sonuçlara ait anlamlılık düzeyi 0,05'tir.



Şekil 4.35. Ferülik asit analitik standardının saflaştırılan ferülik asidin toplam fenolik içerik karşılaştırması

Toplam fenolik içerik analizlerinin sonucunda ferülik asidin analitik standardının saflaştırılan ferülik asit ile kıyaslandığında %82 oranında fark tespit edilmiştir. Bu farkın oluşmasının temel sebebi saflaştırma sırasında fenolik içeriklerin farklı maddelerle interaksiyona girmesi olarak ifade edilebilir. Öte yandan yapılan ABTS ve DPPH deneylerinde de yaklaşık aynı oranda fark bulunmuştur.

Ferülik asidin analitik standardının Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak rapor edilen çalışmalarda ise (Berker vd. 2013) ferülik asidin 11300 ppm için 559 toplam fenolik içeriği bulmuşken, (Jadhav, Kareparamban vd. 2012) yapmış olduğu çalışmada ferülik asit analitik standardı kullanılarak elde etmiş olduğu kalibrasyon denklemindeki absorbans değerleri ile elde edilen absorbans değerleri karşılaştığında farklılık bulunmuştur. Bu farklılığın temel sebebi ferülik asidin analitik standardının açılış tarihi, saklanma koşulları ve deney kullanımı öncesinde oksijen ile tepkimesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.5.4. Antimikrobiyal etkinin değerlendirilmesi

Ferülik asidin analitik standardı ile *Escherichia coli* ATCC 25922 yapılan antimikrobiyal duyarlılık testi sonuçları Çizelge 4.8’de sunulmuştur.

Çizelge 4.8. *Escherichia coli* ATCC 25922 antimikrobiyal duyarlılık testi sonucu

Kuyucuk 1	Gentamisin	39mm
Kuyucuk 2	Metanol	Zon oluşmadı
Kuyucuk 3	Ferülik asit 2000 ppm	Zon oluşmadı
Kuyucuk 4	Ferülik asit 1000 ppm	Zon oluşmadı
Kuyucuk 5	Ferülik asit 500 ppm	Zon oluşmadı
Kuyucuk 6	Ferülik asit 250 ppm	Zon oluşmadı

Ferülik asidin analitik standardı ile *Escherichia coli* ATCC 25921 yapılan antimikrobiyal duyarlılık testinin görüntüsü Şekil 4.36’da sunulmuştur.



Şekil 4.36. *E. coli* ATCC 25921 suşu üzerinde gentamisin antibiyotiğinin oluşturduğu zon çapı

Ferülik asidin analitik standardı ile *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yapılan antimikrobiyal duyarlılık testi sonuçları Çizelge 4.9’da sunulmuştur.

Çizelge 4.9. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 antimikrobiyal duyarlılık testi sonucu

Kuyucuk 1	Penisilin	44 mm
Kuyucuk 2	Metanol	Zon oluşmadı
Kuyucuk 3	Ferülik asit 2000 ppm	Zon oluşmadı
Kuyucuk 4	Ferülik asit 1000 ppm	Zon oluşmadı
Kuyucuk 5	Ferülik asit 500 ppm	Zon oluşmadı
Kuyucuk 6	Ferülik asit 250 ppm	Zon oluşmadı

Ferülik asidin analitik standardı ile *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 yapılan antimikrobiyal duyarlılık testinin görüntüsü Şekil 4.37’de sunulmuştur.



Şekil 4.37. *S. aureus* ATCC 29213 suşu üzerinde penisilin antibiyotikliğinin oluşturduğu zon çapı

Antimikrobiyal duyarlılık testi sonuçlarında ferülik asidin farklı konsantrasyonlarında denenene her iki mikroorganizma için etkinlik saptanamamıştır. Yapılan çalışmalarda ise gallik ve ferülik asitlerin, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes* üzerinde değerlendirilmiştir. Ferülik asidin test edilen bakterilere karşı *S. aureus* için 5000 µg/mL ve *E. coli* için 2500 µg/mL olacak şekilde rapor edilmiştir.

Ferülik asidin, bakteriler üzerinde hidrofobiklik değişiklikleri, negatif yüzey yükünün azalması ve hücre zarlarında yerel yırtılma veya gözenek oluşumunun meydana gelmesi ve bunun sonucunda temel hücre içi bileşenlerin sızması yoluyla zar özelliklerinde (yük, hücre içi ve dışı geçirgenlik ve fizikokimyasal özellikler) geri dönüşü olmayan değişikliklere yol açtığı ifade edilmiştir (Anabela Borges 2013). Bu çalışmaya göre bizim yapmış olduğumuz çalışmada ferülik asidin doz değerinin yetersiz geldiği anlaşılmaktadır.

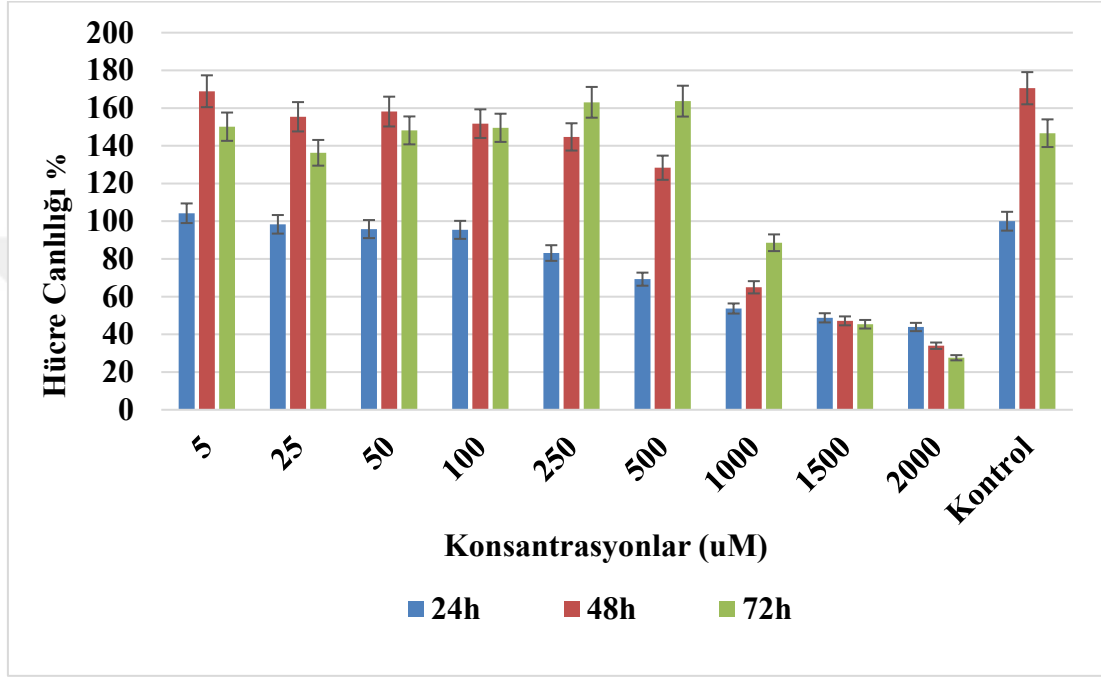
Yapılan diğer bir çalışmada ise Ginseng ekstresi (GE), ferülik asit ($\geq 99\%$) (FA) ve fermente noni suyu tozu (FNJP) in vitro antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri açısından analiz edilmiştir. Antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon deneyi ve mikrodilüsyon deneyi kullanılarak 13 bakteri suşu üzerinde araştırılmıştır. Minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri için *Staphylococcus aureus* 5,0 mg/mL ve *Escherichia coli* için 3,3 mg/mL olarak rapor edilmiştir (Nicolau-Lapeña, Abadias vd. 2021).

Ferülik asidin antimikrobiyal mekanizması, bakterilerdeki arilamin N-asetil transferazı inhibe etmesine bağlanmıştır (Ou ve Kwok 2004).

4.5.5. Antikarsinojenik etkinin değerlendirilmesi

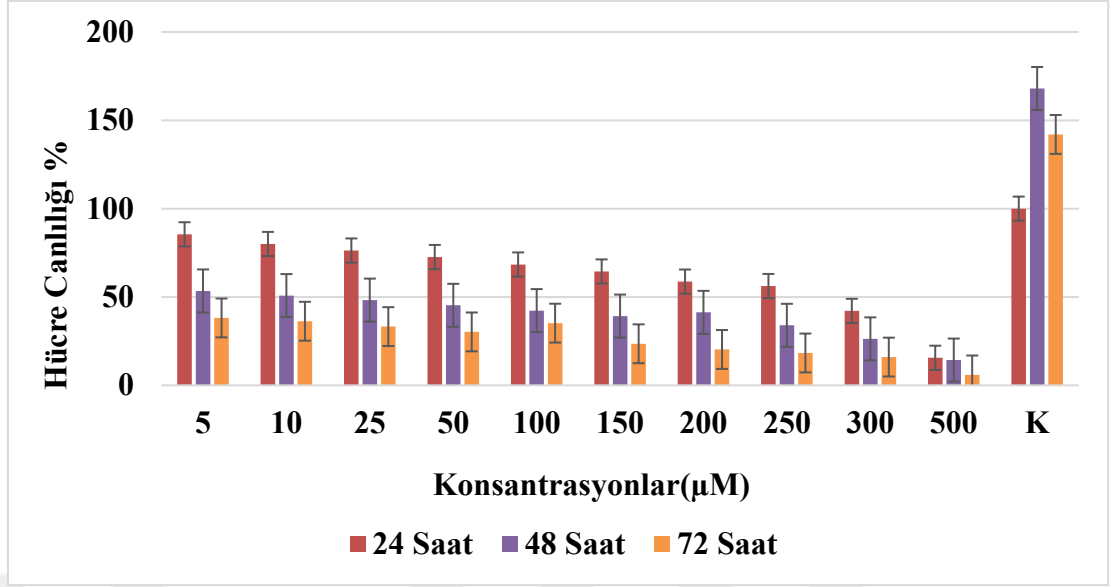
4.5.5.1. Hücre canlılığı testi

Ferülik asidin analitik standardı ile SK-MEL-30 hücreleri üzerine gerçekleştirilen MTT testi sonuçları Şekil 4.38’de sunulmuştur.

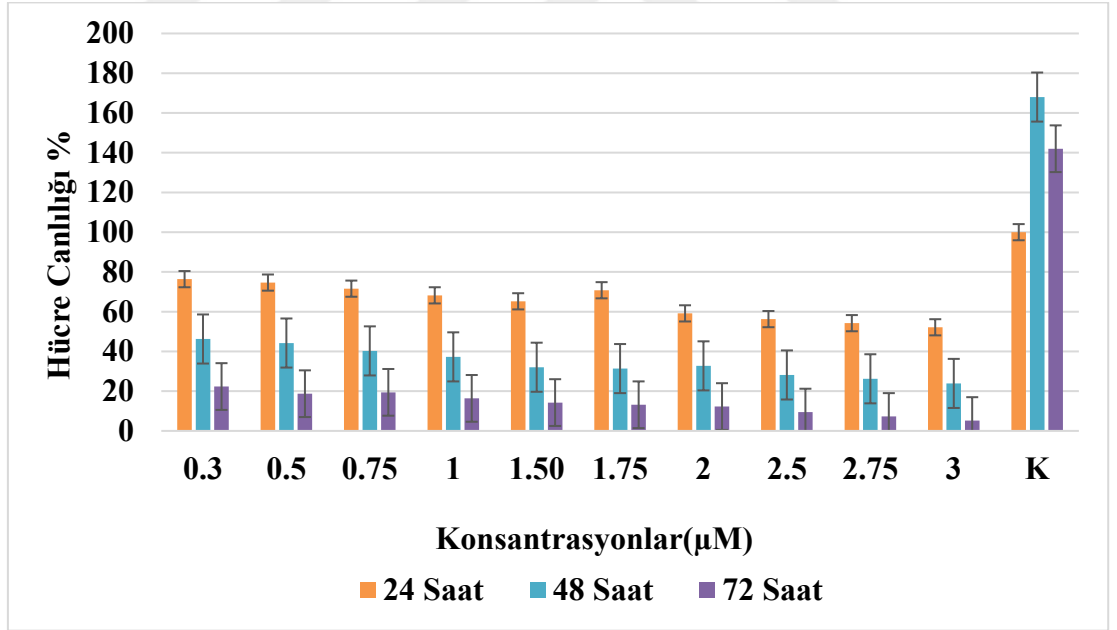


Şekil 4.38. SK-MEL-30 hücre hattı üzerine ferülik asit analitik standardının farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde hücre canlılığı üzerine etkinliği

SK-MEL-30 hücre hattı üzerinde elde edilen veriler ferülik asidin etkinliğini antikarsinojenik etkinliğini ortaya koymaktadır. Buğday kepeği ekstraksiyonundan elde edilen veriler ise 4.47’de bu bulguların karşılaştırılacak olan antikarsinojenik etkinliği kanıtlanmış ajanların epirubisin ve paklitakselin verileri ise Şekil 4.39 ve 4.40’ta sunulmuştur.

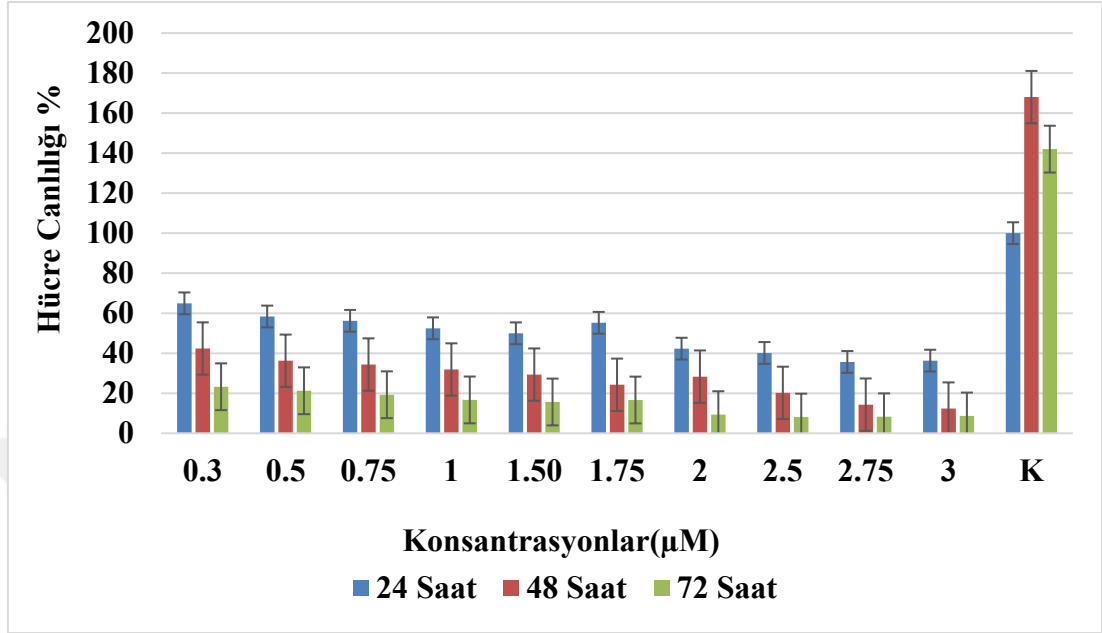


Şekil 4.39. SK-MEL-30 hücre hattı üzerine buğday kepeği ekstraktının farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde hücre canlılığı üzerine etkinliği



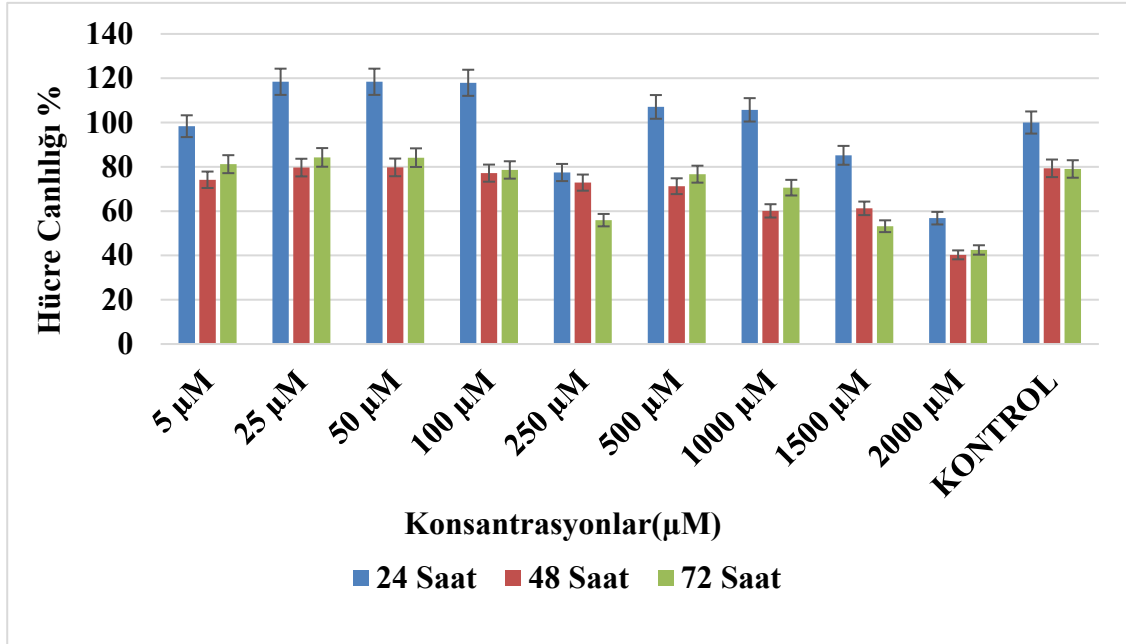
Şekil 4.40. SK-MEL-30 hücre hattı üzerine paklitakselin farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde hücre canlılığı üzerine etkinliği

Pozitif kontrol olarak kullanılarak antikarsinojenik ajan olarak kabul edilen epirubisinin farklı konsantrasyonlardaki SK-MEL-30 hücre hattı üzerine etkisi Şekil 4.41’de verilmiştir.



Şekil 4.41. SK-MEL-30 hücre hattı üzerine epirubisinin farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde hücre canlılığı üzerine etkinliği

Antikarsinojenik etkinin değerlendirilmesi sırasında kontrol olarak seçilen BJ hücre hattı ile ilgili veriler Şekil 4.42’de sunulmuştur.



Şekil 4.42. BJ hücre hattı üzerine ferulik asit analitik standardının farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde hücre canlılığı üzerine etkinliği

Ferülik asit analitik standardının farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde MTT testi bulgularına göre 1500 µM konsantrasyonda SK-MEL-30 insan melanom hücreleri üzerine etkili olduğu görülmektedir. Öte yandan kontrol olarak belirlenen BJ insan fibroblast hücre hattına ise kontrole kıyasla az toksik olduğu bulunmuştur.

Antikarsinojenik etkinliği kanıtlanmış olan paklitaksel ve epirubisin hücre canlılığını %10'nun altına düşürdüğü belirlenmiştir.

Buğday kepeği ekstraktının ise 500 µM konsantrasyonda ferülik asit analitik standardından daha etkili olduğu saptanmıştır. Bunun sebeplerinden ilki yoğun olan her maddenin inhibitör olduğu, ikincisi ise kepek fraksiyonunda ferülik asit ile antioksidan kapasitesine sahip diğer fenolik bileşiklerinde etkisi olduğu düşünülmektedir.

Elde edilen veriler ışığında SK-MEL-30 hücre hattı üzerine literatür üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda ilk defa ferülik asidin analitik standardı kullanılarak MTT tekniği kullanılarak hücre canlılığı testi yapılmıştır. Bu sebepten ötürü literatür ile kıyaslama yapılırken insan melanom hücre hatları baz alınarak yapılmıştır.

(Choi ve Sohn 2006) yapmış olduğu bir çalışmada fenolik bileşiklerin kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Ferülik asidin NIH3T3 fibroblastları ve insan deri melanom hücreleri (SK-MEL-3) üzerindeki antikanser aktivitesini incelenmiş olup antikanser aktivitesi, ferülik asidin bu hücreler üzerindeki sitotoksitesinin belirlenmesi ile ölçülmüştür. Sitotoksite, bu hücrelerde XTT deneyi yoluyla hücre canlılığı ile ölçülmüştür. Bu çalışmada, insan deri melanom hücreleri 48 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda ferülik asit ile muamele edildikten sonra, ferülik asit doza bağlı olarak hücre canlılığını azaltmıştır. Özellikle, ferülik asit insan deri melanom hücrelerinde kontrole kıyasla 120 µM konsantrasyonda hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir. Ferülik asit, NIH3T3 fibroblastlarında 30~120 µM konsantrasyonlarında hücre canlılığında önemli bir azalma göstermemiştir. Bu sonuçlar ferülik asidin insan deri melanom hücreleri gibi kanser hücrelerinde hücre canlılığını önemli ölçüde azaltarak antikanser aktivite gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Yapılan diğer bir çalışmada ise ferülik asit ve kafeik asidin melanin üretimi üzerindeki inhibitör etkileri bir Murin B16 melanoma hücre hattı kullanılarak incelenmiştir. İki asidin melanin üretimini inhibe etme mekanizmaları, melanin biyosentezinin ilk basamağında yer alan tirozinaz aktivitesi üzerindeki etkileri değerlendirilerek sonuca varılmıştır. Ferülik asit melanoma hücrelerine karşı herhangi bir dozda toksisite göstermezken, kafeik asit 0,35 mM'dan daha yüksek konsantrasyonlarda hücresel toksisite göstermiştir. Hem ferülik hem de kafeik asit B16 melanoma hücrelerinde melanin üretimini etkili bir şekilde inhibe etmiştir. Ferülik asit enzime doğrudan bağlanarak tirozin kinaz aktivitesini azaltırken, kafeik asit ve tirozin kinaz arasında herhangi bir bağlanma gözlenmemiştir. Ferülik asidin melanin üretiminin kafeik asitten daha etkili bir inhibitör olduğu belirlenmiştir (Maruyama, Kawakami vd. 2018).

Ferülik asidin antikarsinojenik stratejisinin açığa çıkabilmesi için yapılan diğer bir çalışmada, ferülik asit doğrudan melanom hücrelerinin proliferasyonu inhibe etmiş ve melanom hücresinde PI3K-Akt yolunu bloke ettiği rapor edilmiştir. İn-vivo olarak, bir melanom ksenograft modeli kullanılarak, ferülik asit anjiyogenezin inhibisyonu ile ilişkili büyüme inhibe edici aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu bilgilerin kümülatif değerlendirilmesi sonucunda, ferülik asidin FGFR1 aracılı PI3K-Akt sinyal yolunu

hedeflediğini ve melanom büyümesinin ve anjiyogenezin baskılanmasına yol açtığını göstermektedir (Yang, Jiang vd. 2015).

Öte yandan şaperon proteinlerinin kanser hücrelerindeki etkinliği ve önemini anlamak yeni tedavilerin önünü açacağı düşünülmektedir. Bu kapsamda ferulik asit ile yapılan bir çalışmada ,2-metoksi östradiol ve ferulik asidin moleküler mekanizmasının Hsp60 ve Hsp90 seviyelerinin azalması ve A375 melanoma hücre hattında, nitrik oksit indüksiyonu ile kısmen ilişkili olduğunu, 2-metoksi östradiol ve ferulik asidin ayrı ayrı veya birlikte tedavisinden sonra Hsp70 ekspresyonunda değişiklikler saptandığı rapor edilmiştir (Kamm, Przychodzeń vd. 2019). Bu durum özellikle kemo rezistans mekanizmaları söz konusu olduğunda önemlidir, çünkü Hsp70 birikimi kanser hücresi ölümünün indüksiyonunu azaltır ve böylece doğal olarak antitümör etkinliğini azalır.

(Sioud, Maatouk vd. 2022) yapmış olduğu çalışmada bazı fenolik asitlerin (kafeik, ferulik ve kumarik asit) ve flavonların (luteolin ve apigenin) murin melanom B16-F10 hücrelerinde proliferasyon ve melanogenez etkilerini değerlendirmek için MTT deneyi yaparak 24 ve 48 saat sonucunda akan hücre ölçer (flow cytometry) kullanarak hücre döngüsünü ve tirozin kinaz aktivitesi ölçülmüştür. Rapor edilen verilere göre B16-F10 hücrelerine karşı Luteolin ve apigenin önemli oranda anti-proliferatif etki gösterirken öte yandan kafeik, ferulik ve kumarik asit 24 ve 48 saatlik inkübasyondan sonra hafif derece inhibisyona neden olmuştur. Hücre siklusunda düzensizliğe sebep olarak G1 fazında düşüş ve G1/S ve G2/M fazlarında durdurmaya sebebiyet gösterdiği ifade edilmiştir.

Cilt kanseri ile güneş ışığına maruz kalmanın arasında bir korelasyon bulunmaktadır. UV güneş radyasyonu malign melanom için başlıca çevresel risk faktörü olduğu ifade edilmektedir. UV kaynaklı hücre hasarını önleyebilecek veya azaltabilecek yeni bileşiklerin araştırılması için büyük bir çaba sarf edilmektedir. Ferulik asit ise bu konuda öne çıkmaktadır. Bundan ötürü yapılan bir çalışmada Ferulik asidin etil ester türevinin deri melanositlerini UV kaynaklı oksidatif stres ve hücre hasarından koruyup koruyamayacağını araştırılmıştır. UVB ile ışınlanmış insan melanositleri üzerinde yapılan deneyler sonucunda Ferulik asidin etil ester türevinin farklı dozlarda uygulanıp yapılan analizlerde, protein oksidasyonunda net bir azalma ile ROS oluşumunu indüklediğini saptanmıştır. Ferulik asidin etil ester türevinin HSP70 ve hem oksijenaz indüksiyonu, PARP aktivasyonunun belirgin bir şekilde baskılanması ve apoptozun önemli ölçüde baskılanması eşlik ettiği ifade edilmektedir. Ayrıca ferulik asidin etil ester türevinin iNOS indüksiyonunu önleyerek NO türevi oksitleyici ajanların ikincil oluşumunu baskılamıştır. Ferulik asidin etil ester türevinin, UV radyasyonunun neden olduğu cilt hasarını azaltmak için potansiyel olarak etkili bir farmakolojik bir formülasyonun geliştirilmesinin yararlı olabileceği rapor edilmiştir (Di Domenico, Di Domenico vd. 2009).

Sadece kanser hücrelerinin inaktive etmek, kanserle savaşla yeterli değildir. Yeni yaklaşımların ve yeni terapötik ajanların kombinasyonlarını keşfetmek önemli bir adımdır. Bu kapsamda kemoprevansiyon, yani sağlıklı bir hücrenin tümörleşme aşamasına geçişinin bloklamaya yönelik farmakolojik ajanlar ya da hücre için gerekli olan mikro besinlerin kullanılması gibi yöntemleri içerdiği rapor edilmiştir. Bu sebepten ötürü (Yoon, Lee vd. 2015) yapmış oldukları bir araştırmada kemopreventif ajanları araştırmak için, p-kumarik asit, 3-metoksi-p-kumarik asit (ferulik asit) ve 3,5-dimetoksi-p-kumarik asit (sinapik asit) B16/F10 melanom hücre hatları üzerinde çalışma

gerçekleştirilmiştir. Bununla beraber hücre içi melanin içeriği 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür testi ile belirlenmiş ve bileşiklerin sitotoksitesi laktat dehidrogenaz (LDH) salınımı ile incelenmiştir. p-Kumarik asit melanogenez üzerinde inhibitör etki gösterirken, ferülik asit melanin içeriğini artırmış ve sinapik asit melanogenez üzerinde neredeyse hiçbir etki göstermemiştir. Ferülik asit ile karşılaşan hücrelerde melanin üretiminde 2 ila 3 kat artışla sonuçlanmıştır. Buna paralel olarak, ferülik asit ve hücre canlılığı doza bağlı bir şekilde azalmıştır. Ferülik asit hücrelerden LDH salınımını etkilememiştir ancak melanogenezi indüklediği ortaya çıkmıştır. Bu çalışma metoksillenmiş p-kumarik asit, ferülik asidin kemopreventif ajan olarak kullanılabileceği ihtimalini ortaya koymaktadır.

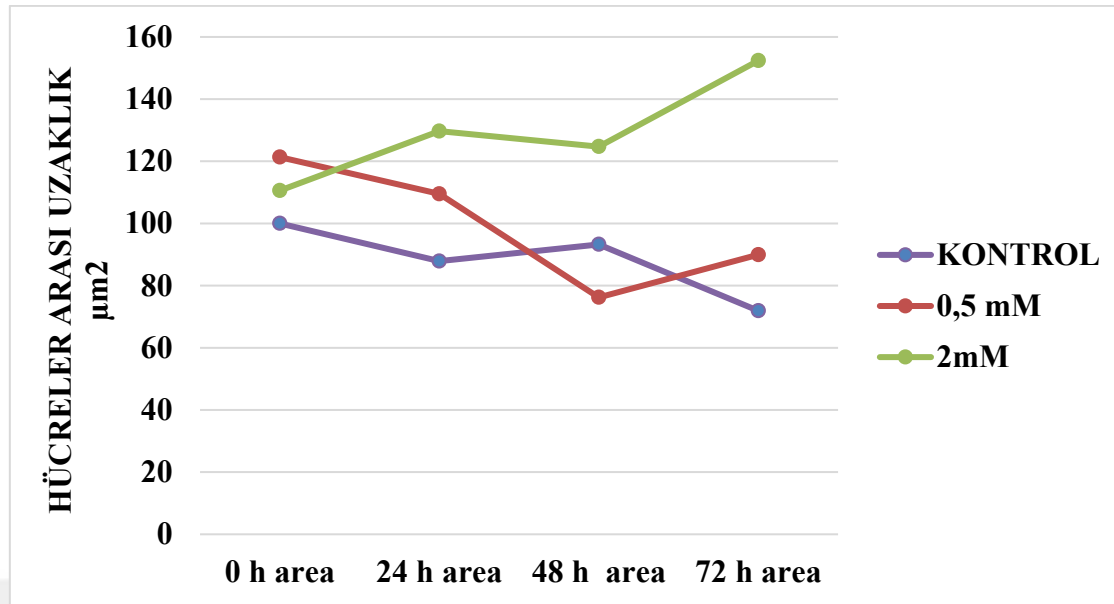
4.5.5.2. Hücre göçü testi

Ferülik asidin analitik standardı ile yapılan hücre göçü testlerine ait veriler Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Hücre göçü testinde yapılan ölçüm sonuçları (alan (μm^2))

	0 h	24 h	48 h	72 h
Kontrol 1	2085931	1868479	2282501	1648629
Kontrol 2	2591414	2463304	2095675	1737930
Kontrol 3	2892604	2319526	2681648	2057089
0.5mM 1	3565215	2895086	2352396	2076898
0.5mM 2	2909332	2318820	1616511	1452073
0.5mM 3	2828870	2423923	1838633	1675129
0.5mM 4	3233064	2506031	1779290	1864422
0.5mM 5	2771715	1994498	1379919	1091386
2mM 1	2946594	3039603	3079709	3021467
2mM 2	2363869	2439285	2447064	2503689
2mM 3	2674427	2775647	2817341	2602719
2mM 4	2965971	3095517	3291905	2886234
2mM 5	2999023	3027754	3039659	2810107

Hücre göçü testinden elde edilen sonuçlara ait görsel Şekil 4.43'te sunulmuştur.



Şekil 4.43. Hücre göçü testine ait uzaklık sonuçlarının karşılaştırılması

Hücre göçü testinden elde edilen veriler ferülik asidin SK-MEL-30 hücrelerinin aralarında oluşturulan mesafenin kapanmamasına, böylelikle hücreler arasında birçok proteinin oluşmasına engel olduğu anlaşılmıştır.

Hücre göçü testi ile ilgili yapılan bir çalışmada, yaralanan cilt doku, keratinlerle ilişkili biyolojik süreç aracılığıyla karmaşık etkileşimleri tetiklediği ifade edilmektedir. Hızlı iyileşme, ikincil enfeksiyona ve iltihaplı ağrıya karşı koruma için çok önemli olduğu bilinmektedir. Buna ek olarak ferülik asidin, keratin 6α (K6α) modülasyonu ve deri eksplant kültürünün birincil keratinositlerinde ve yaralı tam kalınlıktaki deride β-katenin inhibisyonu yoluyla göçü baskıladığı rapor edilmiştir, çünkü β-katenin'in çekirdeğe birikmesi negatif bir düzenleyici olarak rol alır ve insan epidermal keratinositlerinde ilişkiyi bozarak hücrelerin birbirine kavuşmalarını bloklar. Ayrıca ferülik asidin, yara kenarında nükleer faktör eritroid-2 ile ilişkili faktör 2'nin (Nrf2) aktivasyonu yoluyla yara kaynaklı enflamasyonu hafiflettiği rapor edilmiştir. Bu bulgular ferülik asidin keratinositlerde β-katenin inhibisyonunu ve yara kaynaklı inflamasyonda Nrf2 aktivasyonu yoluyla etki eden yara iyileşmesi için yeni bir terapötik ajan olduğunu gösterdiği deklare edilmiştir (Kim, Jung vd. 2021). Yapılan diğer bir araştırmada A549 ve HT29-D4 hücre hatları üzerine yapılan hücre göçü deneyinde ferülik asidin 200 µM konsantrasyonunda hücre yapışması sırasıyla %77,9 ve %79,8 oranında azalmıştır. A549 hücre hattına karşı gerçekleştirilen migrasyon deneyinde ise test edilen bileşiklerin hücre migrasyonunu önemli ölçüde azalttığını ortaya koymuştur. Test edilen en yüksek konsantrasyonda (200 µM), kafeik, kumarik ve ferülik asit için sırasıyla %7,7, %9,5 ve %35 oranında migrasyonu azalttığı rapor edilmiştir. Bu sonuçlar, kafeik, kumarik ve ferülik asitlerin, akciğer ve kolon kanseri gelişimine karşı, tümör ilerlemesinin yapışma ve göç aşamalarında antikanser ajanlarda aktif bileşenler olarak yer alabileceğini göstermektedir (Nasr Bouzaiene, Kilani Jaziri vd. 2015)

4.6. Fonksiyonel Gıda Olarak Kullanım İmkanları

Tez çalışması kapsamında elde edilecek ekmek, kepekli ekmek ve eriştinin ferülik asit yönünden zengin olan buğday çeşidi kullanılarak elde edilmiştir.

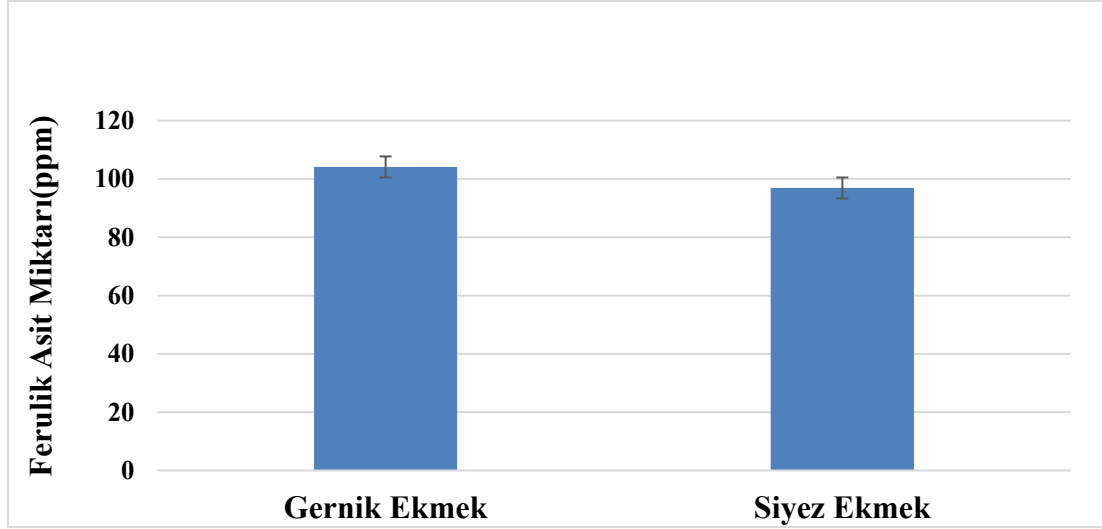
4.6.1. Ekmek

Siyez ve Gernik buğdaylarından elde edilen ekmek içeriğinde bulunan ferülik asit değeri Şekil 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Siyez ve Gernik buğdaylarından elde edilen ekmek içeriğinde bulunan ferülik asit değeri

Örnek ismi	Ferülik asit değeri (ppm)
Gernik 39 Ekmek 1	159,93
Gernik 39 Ekmek 2	133,21
Gernik 39 Ekmek 3	115,69
Gernik 39 Ekmek 4	104,12
Gernik 39 Ekmek 5	124,84
Gernik 39 Ekmek 6	112,85
Siyez 6 Ekmek 1	105,31
Siyez 6 Ekmek 2	85,77
Siyez 6 Ekmek 3	96,91
Siyez 6 Ekmek 4	90,38
Siyez 6 Ekmek 5	109,08
Siyez 6 Ekmek 6	99,01

Yapılan 6 tekrarlı çalışmalarda elde edilen bulguların ortalama değerleri Şekil 4.44’te verilmiştir.



Şekil 4.44. Gernik ve Siyez Unundan Elde Edilen Ekmek İçerisinde Bulunan Ortalama Ferulik Asit İçeriği

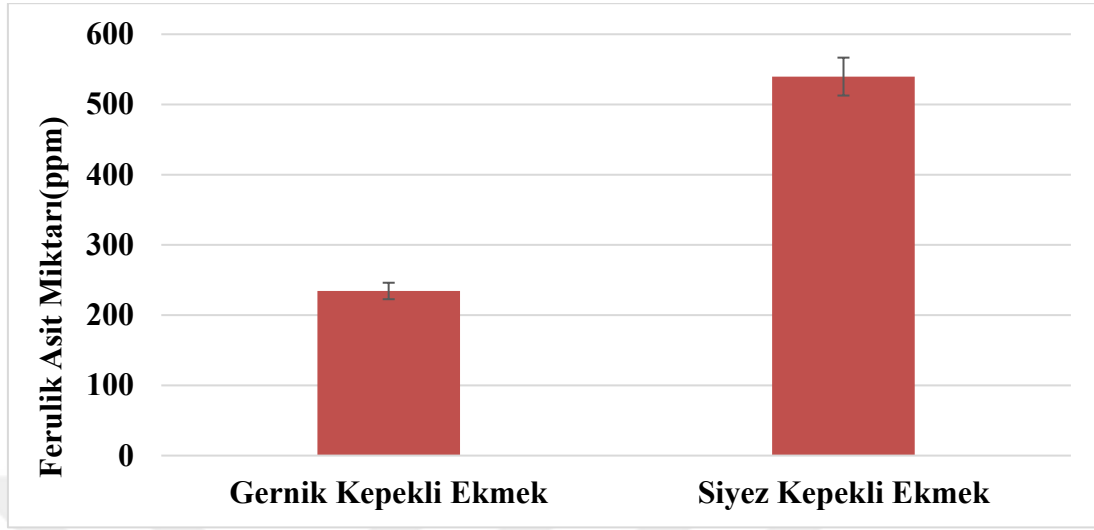
4.6.2. Kepek ekmeği

Siyez ve Gernik buğdaylarından elde edilen kepek ekmeği içeriğinde bulunan ferulik asit değeri Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Siyez ve Gernik buğdaylarından elde edilen kepek ekmeğinin içeriğinde bulunan ferulik asit değeri

Örnek ismi	Ferulik asit değeri (ppm)
Gernik 39 Kepekli Ekmek 1	218,98
Gernik 39 Kepekli Ekmek 2	313,53
Gernik 39 Kepekli Ekmek 3	234,40
Gernik 39 Kepekli Ekmek 4	298,96
Gernik 39 Kepekli Ekmek 5	245,33
Gernik 39 Kepekli Ekmek 6	344,86
Siyez 6 Kepekli Ekmek 1	525,96
Siyez 6 Kepekli Ekmek 2	555,20
Siyez 6 Kepekli Ekmek 3	539,69
Siyez 6 Kepekli Ekmek 4	549,14
Siyez 6 Kepekli Ekmek 5	524,11
Siyez 6 Kepekli Ekmek 6	474,61

Yapılan 6 tekrarlı çalışmalarda kepekli ekmekte elde edilen bulguların ortalama değerleri Şekil 4.45'te verilmiştir.

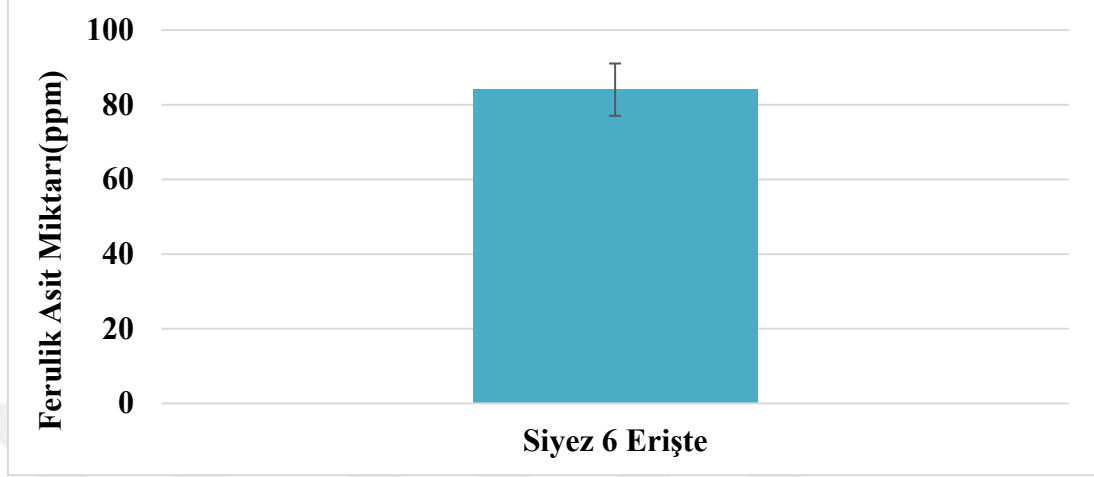


Şekil 4.45. Gernik ve Siyez Kepek Emeği İçerisinde Bulunan Ortalama Ferülik Asit İçeriği

Siyez ve Gernik buğdaylarından elde edilen ekmek ve kepekli ekmek kepekli ekmek ürünlerinde ferülik asidin miktarının buğdayın kavuz ve kepek kısımlarının dahil olduğu ürünlerde daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. Siyez buğdayından elde edilen ekmekte ortalama $96,91 \pm 8,01$ ppm, Gernik buğdayından elde edilen ekmeklerde ise $104,12 \pm 18,065$ ppm ferülik asit saptanmıştır. Bununla beraber Siyez kepek ekmeğinde ortalama $539,70 \pm 26,43$ ppm, Gernik kepek ekmeğinde ise $234,41 \pm 45,82$ ppm olarak bulunmuştur. Bu veriler literatür ile kıyaslandığından yapılan bir çalışmada birden farklı buğday türünden elde edilen ekmek içeriğinde 78,30 ppm rapor edilmiştir (Çelik ve Gökmen 2020). Yapılan diğer bir çalışmada ise *Triticum aestivum*, *T. durum*, ve *T. monococcum* varyeteleri kullanılarak çalışma sonucunda beyan edilen analiz sonuçları, beyaz ekmek içerisindeki ferülik asit miktarının 0,1-0,2 mg/g, tam buğday ekmeği içerisindeki ferülik asit miktarının 0,2-0,5 mg/g, çavdar ekmeği içerisindeki ferülik asit miktarının 0,4-0,7 mg/g ve kepekli ekmek içerisindeki ferülik asit miktarının 0,5-1,0 mg/g olduğunu tespit etmişlerdir (Boudaoud vd. 2021).

4.6.3. Erişte

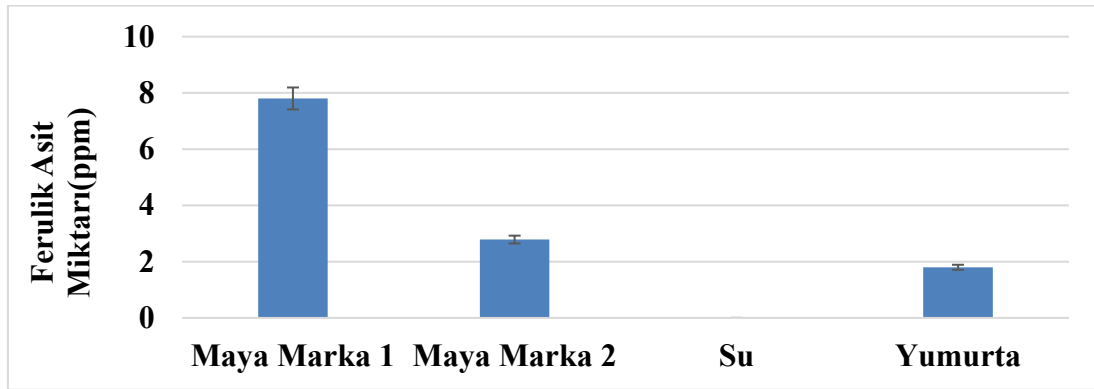
Siyez 6 unu kullanılarak elde edilen erişte içeriğinde analiz edilen ferülik asidin miktarı Şekil 4.46’te sunulmuştur.



Şekil 4.46. Siyez 6 buğdayından elde edilen un kullanılarak üretilen eriştede bulunan ferülik asit miktarı

Tez çalışması kapsamında Siyez 6’un kullanılarak 6 kez elde edilen erişte ürünün de yapılan HPLC analizleri sonucunda ortalama $84,05 \pm 7,02$ ppm ferülik asit saptanmıştır. Literatür bilgileri ışığında eriştenin içeriğinde bulunan ferülik asit miktarının 20-30 ppm arasında, kepekli un kullanılarak elde edilen eriştede ise 50-100 ppm arasında ferülik miktarı tespit edilmiştir. Tüm bu bilgiler ışığında ferülik asit miktarının pişirme faktörleri göz önüne alındığında azaldığı, bunun temel sebebi ise su, oksijen ve ısının oksitleyici reaksiyonları nedeniyle toplam fenolik içeriğinin azalttığı öne sürülmüştür (Fares, Platani vd. 2010).

Tüm bu çalışmalardan elde edilen veriler kapsamında ferülik asidin miktarının analitik belirsizliğinin ortadan kaldırmak amacıyla, elde edilen fonksiyonel gıdaların elde edilme aşamalarında kullanılan su, yumurta ve maya içeriğe dahil olan malzemelerinde ferülik asit analizleri yapılmış olup, bu veriler 4.47’de sunulmuştur.

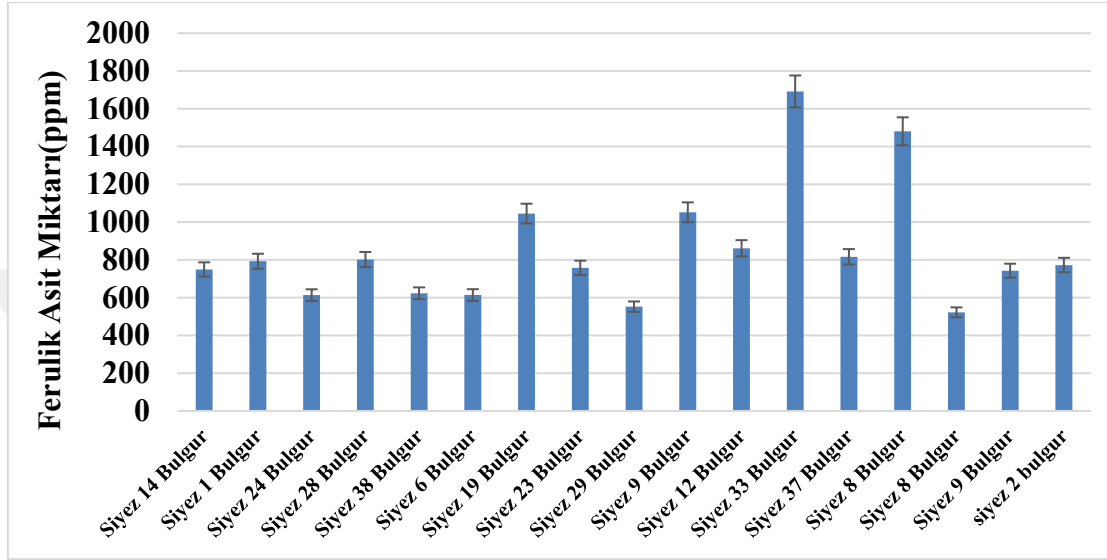


Şekil 4.47. Fonksiyonel Gıdaların Eldesinde Kullanılan Malzemelerin İçerdiği Ferülik Asit Miktarı

Elde edilen veriler ışığında fonksiyonel gıdaların elde ediliş aşamalarının kullanılan su, yumurta ve mayanın analiz edilen ferulik asidin miktarıyla ilgili değişime neden olmadığı bulunmuştur.

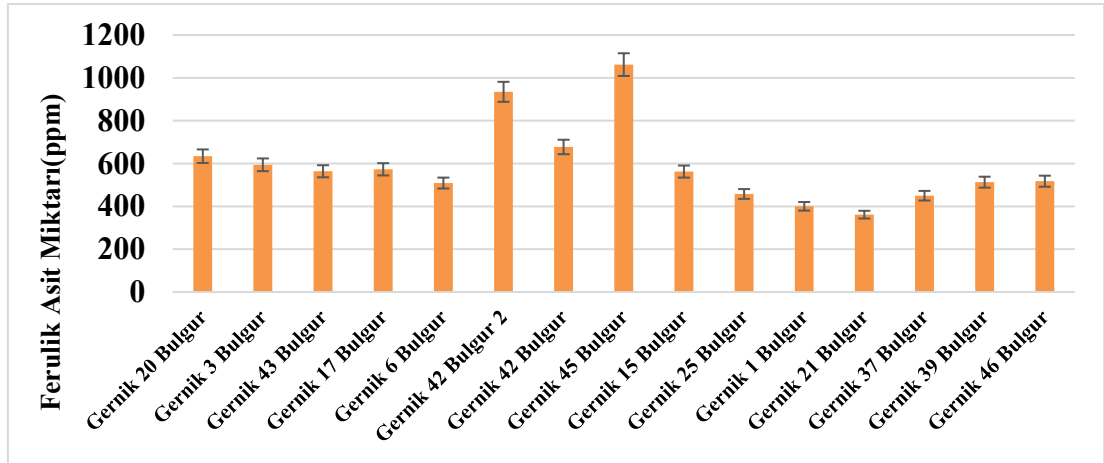
4.6.4. Bulgur

Siyez ve Gernik buğdaylarından elde edilen bulgurda saptanan ferulik asit içeriği Şekil 4.48’de gösterilmiştir.



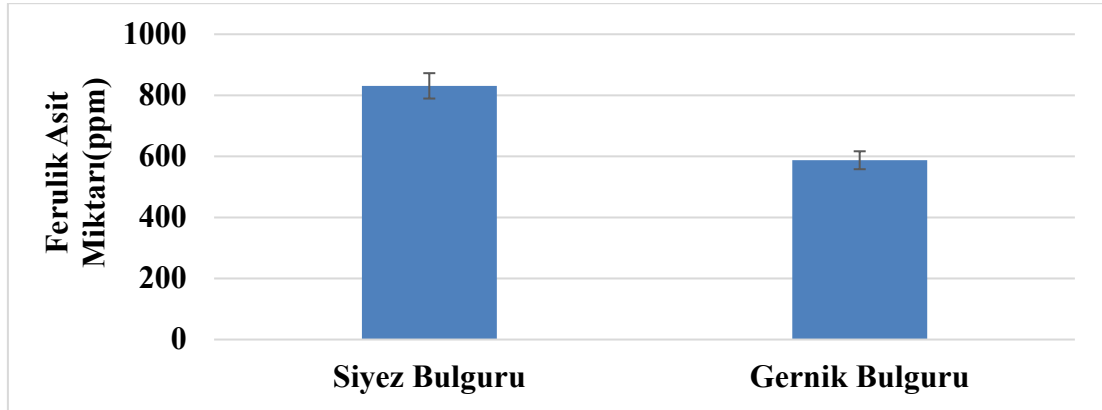
Şekil 4.48. Siyez bulgurunun içeriğinde bulunan ferulik asidin çeşitler arasındaki dağılımı

Gernik buğdayından elde edilen bulgurun içerdiği ferulik asit miktarı Şekil 4.49’de verilmiştir.



Şekil 4.49. Gernik buğdayından elde edilen bulgurun çeşitler arasındaki ferulik asit dağılımı

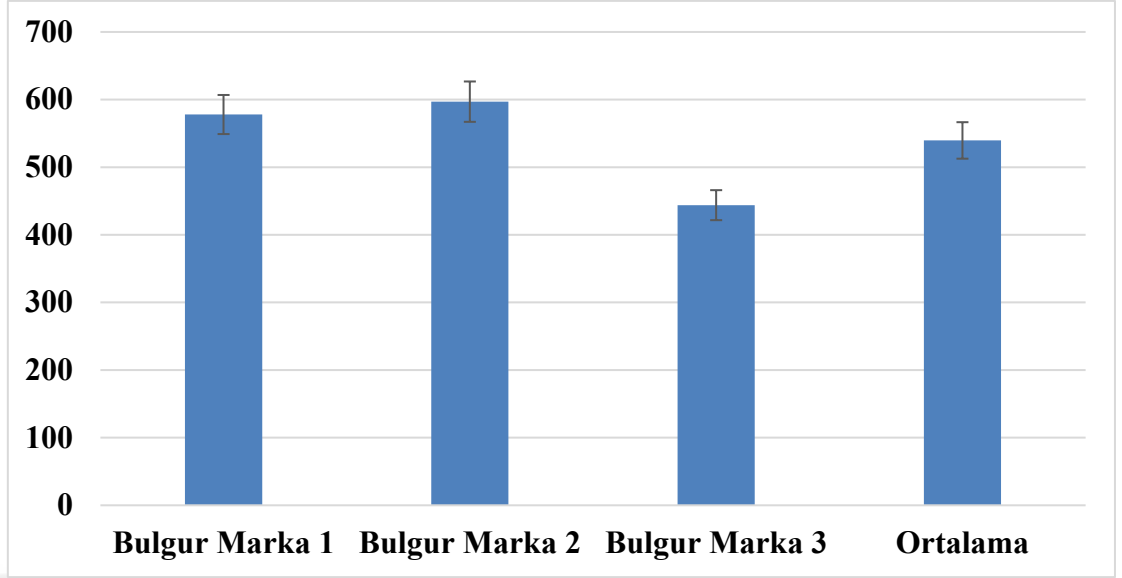
Şekil 4.50’de Siyez ve Gernik buğdaylarından elde edilen bulgur ile yapılan analizler sonucu ortalama ferülik asit değeri verilmiştir.



Şekil 4.50. Siyez ve Gernik buğdaylarından elde edilen bulgur fraksiyonunda bulunan ortalama ferülik asit değeri

Siyez buğdayından üretilen bulgurda tespit edilen ferülik asit düzeylerinin 552,18 ile 1691,57 ppm (ortalama 831,01±309,47 ppm) aralığında değiştiği belirlenirken bu değerlerin Gernik buğdayından üretilen bulgur için 361,28 ile 1061,82 ppm (ortalama 578,31±181,82 ppm) düzeylerinde olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmalar kapsamında üretilen bulgurlarda en yüksek ferülik asit düzeyi Siyez 33 hattında olup, 1691,57 ppm olarak tespit edilmiştir. Elde edilen verilerde Siyez buğday hattından elde edilen bulgurun içeriğinde ferülik asit değeri daha yüksekken, standart sapma değerinin Gernik buğdayına kıyasla daha yüksek olduğu bulunmuştur. Gernik buğday hattından elde edilen bulgur fraksiyonunda ise Siyez buğdayına göre daha az ferülik asit içermesine rağmen standart sapmasının daha düşük olduğu bulunmuştur. (Tekin vd. 2022)’nin yapmış olduğu bir çalışmada yapılan analizler sonucunda Siyez buğdaylarından elde edilen bulgur fraksiyonunda ortalama 763,53 ppm, Gernik buğdayından ise 627,12 ppm ferülik asit içerdiği rapor edilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada ise farklı buğday çeşitlerinden elde edilen bulgurlardan yapılan analiz sonucunda 300-550 ppm arasında farklılık gösterdiğini ve bu farklılığın ise pişirme ile ilintili olduğu vurgulanmıştır (Yılmaz 2019). Ferülik asidin biyoyararlılığı hücre duvarına kovalent bağlı olan ferülik asidin ester bağlarının koparılmasına paralel olduğu düşünülmektedir.

Yerel marketlerden farklı markalara ait bulgurlar temin edilip, içeriğinden yapılan ferülik asit analizine ait veriler Şekil 4.51’de sunulmuştur.

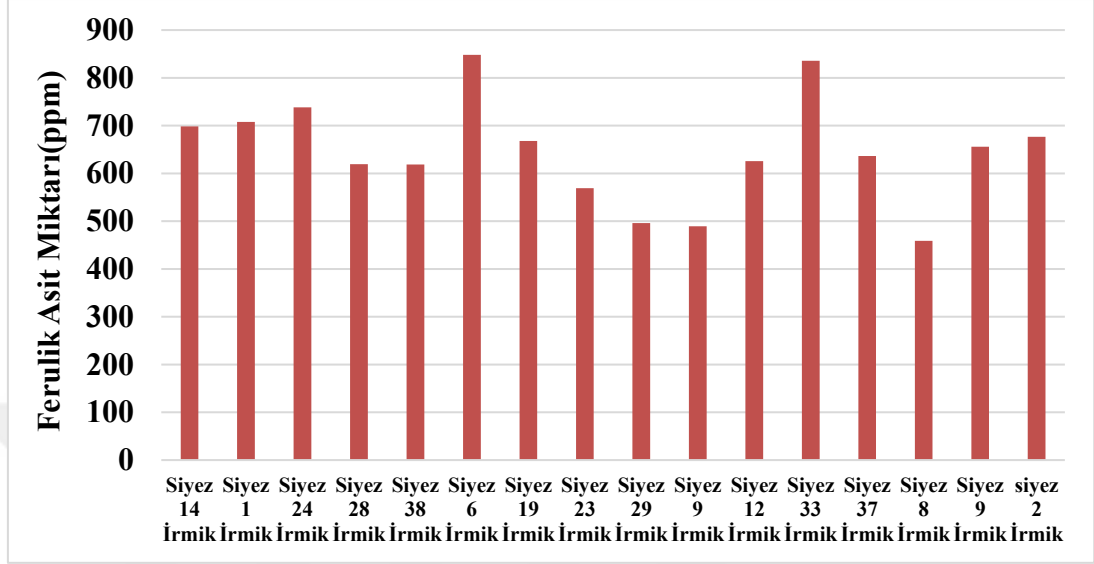


Şekil 4.51. Farklı bulgur markalarının içeriğinde bulunan ferülik asit içeriği

Farklı markalar tarafından üretilen bulgurda tespit edilen ferülik asit düzeylerinin 443,85 ile 596,92 ppm (ortalama $539,56 \pm 68,13$ ppm) aralığında değiştiği belirlenmiştir. Bu veriler ışığında elde edilen veriler ile kıyaslandığında Gernik bulgurunun içeriğinde bulunan ferülik asit miktarına daha yakın bir sonuç elde edilmiştir.

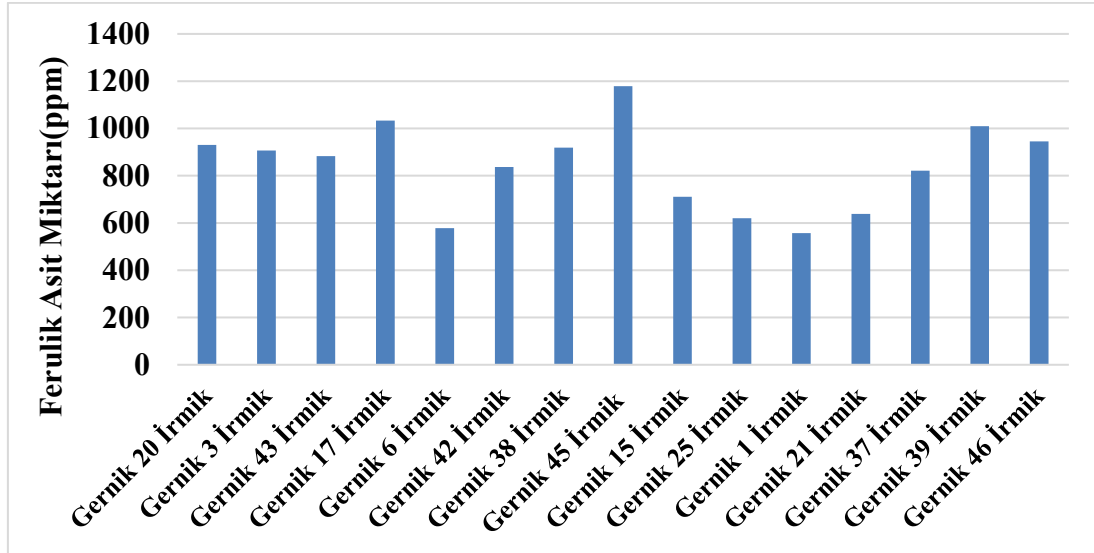
4.6.5. İrmik

Siyez buğdayından elde edilen irmiğin içerdiği ferülik asit miktarı Şekil 4.52’de verilmiştir.



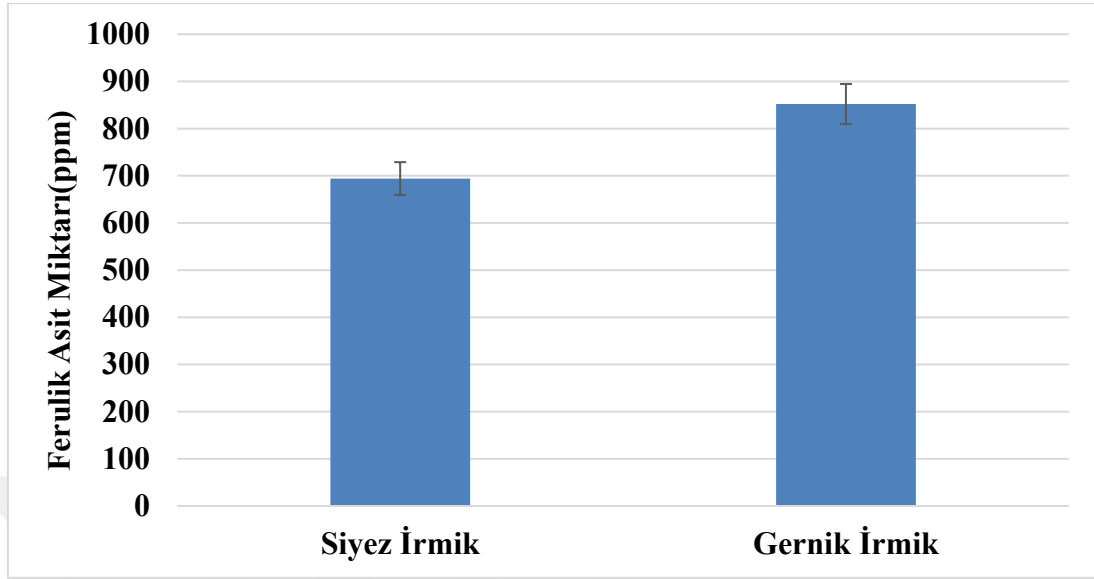
Şekil 4.52. Siyez buğdayından elde edilen irmiğin çeşitler arasındaki ferülik asit dağılımı

Gernik buğdayından elde edilen irmiğin içerdiği ferülik asit miktarı Şekil 4.53’te verilmiştir.



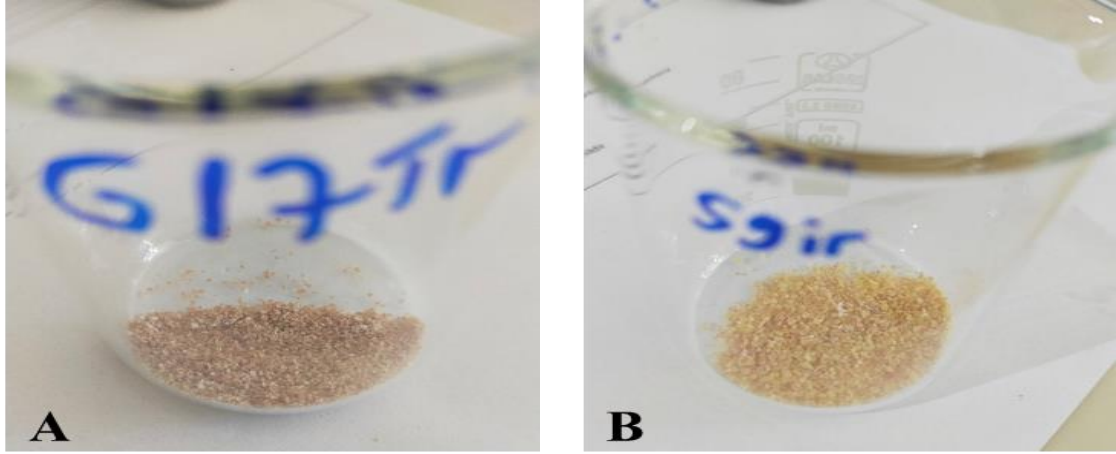
Şekil 4.53. Gernik buğdayından elde edilen irmiğin çeşitler arasındaki ferülik asit dağılımı

Şekil 4.54'te Siyez ve Gernik buğdaylarından elde edilen irmik yapılan analizler sonucu ortalama ferülik asit değeri verilmiştir.



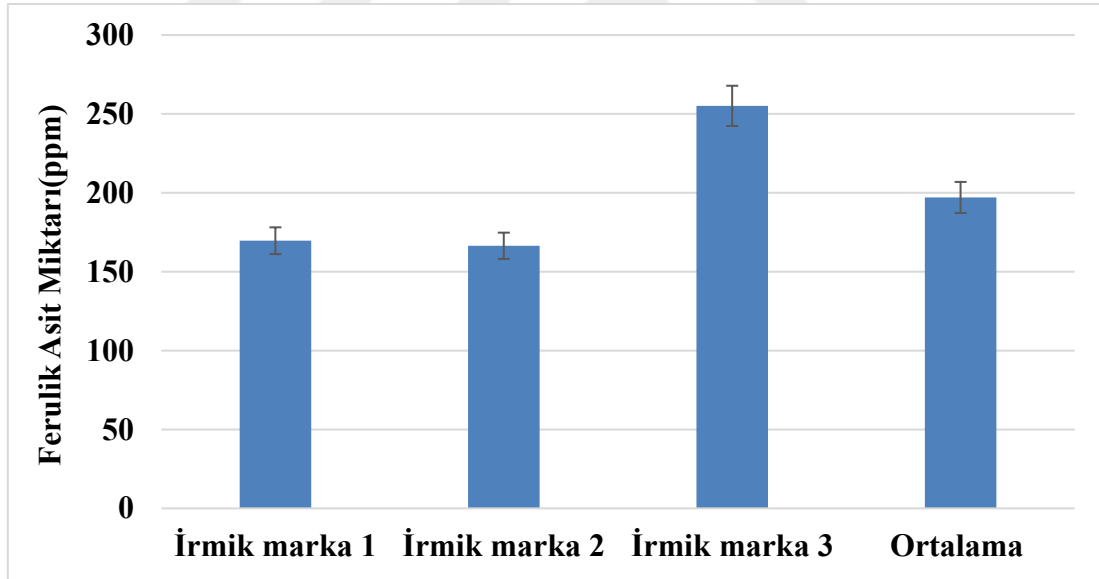
Şekil 4.54. Siyez ve Gernik buğdaylarından elde edilen irmikte bulunan ortalama ferülik asit değeri

Siyez buğdayından üretilen irmikte tespit edilen ferülik asit düzeylerinin 458,77 ile 848,17 ppm (ortalama 694,16±278,25 ppm) aralığında değiştiği belirlenirken bu değer Gernik buğdayından üretilen irmik için 556,99 ile 1179,11 ppm (ortalama 852,08±236,50 ppm) düzeylerinde olduğu sonucuna varılmıştır. Üretilen irmiklerden en yüksek miktarda ferülik asit içeren hattın Gernik 45 olduğu belirlenmiştir. Bu değerlerin öğütme sırasında yaşanacak kepek ve/veya kavuz gibi yapıların karışmasıyla ferülik asit miktarının artabileceği, bulgur yapımı sırasında uygulanan sıcaklığın hücre duvarına bağlı olan ferülik asitlerin salınmasına etki edeceği sonucuna varılmıştır. Bu kapsamda yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, (Tekin vd. 2022) yapmış olduğu çalışmada bulgur içeriğinde ortalama 759,48 ppm ferülik asit içeriği deklare edilirken, pişirmenin ferülik asit içeriği üzerine etkisinin olduğu rapor edilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada ise Gernik buğdayından elde edilen bulgurun içeriğinde 476,58 ppm ferülik asit rapor edilmiş olup, bulgurun elde ediliş yöntemleri yöntemlerinin ferülik asit içeriğini değiştirebileceği üzerinde durulmuştur (Yılmaz 2019). Ferülik asidin tüm buğday kısımlarında incelendiği bir başka çalışmada ise Siyez buğdayından elde edilen bulgurda ortalama değerin 951 ppm olduğu irmiğin ise bu değerden daha az içerebileceği ifade edilmiştir (Klepacka ve Fornal 2006). Yapılan analizlerde irmikte bulunan ferülik asidin yüksek çıkmasının sebebi buğdayların genetik varyasyonlarının yanı sıra kullanılan laboratuvar tipi değirmende eleme esnasında çapraz kontaminasyonun olabileceği öngörülmektedir. Bu kapsamda Şekil 4.55'te irmik fraksiyonun ekstraksiyona alınmadan önceki görüntüleri sunulmuştur.



Şekil 4.55. İrmik ekstraksiyon öncesi görüntüsü A) Gernik B) Siyez

Görüntüler ışığında irmik tanelerinin bir kısmının daha koyu kahverengi ve bir kısmının amber renkli olduğu görülmektedir. Farklı markalardan temin edilen irmik ürünlerinin içeriğinden yapılan ferulik asit analizine ait veriler Şekil 4.56'da gösterilmiştir.



Şekil 4.56. Farklı irmik markalarının içeriğindeki ferulik asit içeriği

Farklı markalara ait irmik ürünlerinin içeriğinde tespit edilen ferulik asit düzeylerinin 166,43 ile 255,17 ppm (ortalama $197,06 \pm 41,06$ ppm) aralığında değiştiği belirlenmiştir. Bu veriler ışığında tez çalışması kapsamında elde edilen irmikler ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu bu düşüklüğünde kullanılan buğday çeşidinin genetik varyasyonundan kaynaklanabileceğinin yanı sıra elde ediliş yöntemleri ele alındığında doktora tezi kapsamında elde edilen irmiklerde ferulik asidin yüksek çıkması buğdaydan geçen kavuz ve / veya kepek gibi kısımların geçebileceği de tahmin edilmektedir.

5. SONUÇLAR

Yapılan bu doktora tez çalışmasında, ülkemizin önemli bir değeri olarak kabul edilen Siyez ve Gernik buğdaylarının özellikle kepek kısımlarında yoğunlaşmış bu değerli molekülün HPLC analizlerinin gerçekleştirilebilmesi için, yanıt yüzey metodolojisinden yararlanılarak optimum ekstraksiyon koşulları belirlenerek validasyonu gerçekleştirilmiştir. Yöntem çalışmalarının ardından Siyez ve Gernik buğdaylarının kepek, un, ekmek, kepekli ekmek, bulgur, ırmik ve erişte ürünlerinde ferulik asidin içeriği belirlenmiştir.

Siyez ve Gernik buğday çeşitlerinin kepek fraksiyonlarında yapılan analizler sonucunda en yüksek ferulik asit değerine sahip olan ilk 3 tür, Siyez 6'da 2953,93 ppm, Siyez 19'da 2268,98 ppm ve Siyez 28 'te ise 1916,43 ppm olarak belirlenmiştir. Öte yandan Gernik hattında ise Gernik 39'da 2246,24 ppm akabinde Gernik 25'te 2232,28 ve Gernik 46 hattında ise 2019,82 ppm olarak ölçülmüştür. Ortalama olarak hesaplandığından Siyez buğdaylarından elde edilen kepek fraksiyonunda $1323,70 \pm 667,55$ ppm ve Gernik buğdaylarında ise $1629,87 \pm 456,72$ ppm ferulik asit tespit edilmiştir. Siyez ve Gernik buğdaylarından elde edilen un fraksiyonlarında yapılan HPLC analizlerinin sonuçlarına göre 74,21 ppm ile en yüksek Siyez 6 hattından elde edilen un fraksiyonunda belirlenmiştir. Gernik buğdayından elde edilen ise 96,21 ppm ile Gernik 38 buğday hattında ferulik asit miktarları saptanmıştır. Siyez buğdayları kullanılarak elde edilen un fraksiyonunun ortalama ferulik asit değeri $66,01 \pm 7,72$ ppm olarak bulunurken, Gernik buğdaylarından elde edilen un fraksiyonunun içeriğinde $68,82 \pm 17,68$ ppm olarak belirlenmiştir.

Ferulik asit düzeyi yüksek olarak tespit edilen Siyez 6 buğdayının kepek fraksiyonunda saflaştırma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çerçevede en uygun hale getirilen yöntemle göre buğday kepeğinden ferulik asit elde etmenin temel aşamaları, numune alma, kepek fraksiyonunu elde etme, homojenizasyon, tartım, enzim ilavesi, hidrolizasyon, sonikasyon, nötralizasyon, ekstraksiyon, filtrasyon ve kurutma aşamalarını içermektedir. İlgili yöntemle göre, ferulik içeriği yüksek olan buğday türünün kepeğinden ferüloil esteraz enzimi ve dondurup kurutma tekniği kullanılarak %44,02 oranında ferulik asit geri kazanılmış olup, saflaştırılan materyalde %17,2 ferulik asit içerdiği saptanmıştır. Önerilen yöntemle kullanılarak saflaştırılan ferulik asidin yapısal analizleri kapsamında FTIR ve kütle spektrometrik yöntemler kullanılmıştır.

Saflaştırılan ferulik asidin fonksiyonel özellikleri çerçevesinde antioksidan aktivite, serbest radikal analizleri, toplam fenolik içeriği, antimikrobiyal ve antikarsinojenik aktivite testleri gerçekleştirilmiştir. Denemelerde ayrıca ferulik asidin analitik standardı kullanılarak sonuçlar kıyaslanmıştır. Antioksidan aktivite sonuçlarına göre ferulik asidin analitik standardı ile saflaştırılan ferulik asit fark bulunmuş olup, ABTS deneyinin hesaplanmasında troloks eğrisinden yararlanılmıştır. En yüksek konsantrasyonda ferulik asidin analitik standardının antioksidan aktivite sonucu $1864,65 \mu\text{g}/100\text{g}$ saflaştırılan ferulik asitte ise $1532,22 \mu\text{g}/100\text{g}$ olarak belirlenmiştir. Ferulik asidin analitik standartı ile kıyaslandığında %80 oranında benzerlik saptanmıştır. Serbest radikallerin hesaplanmasında ferulik asidin analitik standardı ile saflaştırılan ferulik asit fark bulunmuş olup, DPPH testinin sonuçları en yüksek konsantrasyon için sırasıyla $228,1 \mu\text{g}/100\text{g}$, $186,8 \mu\text{g}/100\text{g}$ şeklinde belirlenmiştir. Ferulik asidin analitik standartı ile kıyaslandığında %81 oranında benzerlik saptanmıştır. Toplam fenolik içerik hesaplamasında Folin Ciocalteu yöntemi kullanılmış olup, troloks eğrisinden

yararlanılmıştır. Ferülik asidin analitik standardı ile saflaştırılan ferülik asit fark bulunmuştur. Toplam fenolik bileşik sonuçları en yüksek konsantrasyon için sırasıyla 292,5 µg/100g ve 245,7 µg/100g bulunmuştur. Ferülik asidin analitik standartı ile kıyaslandığında %82 oranında benzerlik saptanmıştır. Antimikrobiyal etkinlik testleri kapsamında kuyucuk difüzyon metodolojisi kullanılarak *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Escherichia coli* ATCC 25921 mikroorganizmaları üzerine EUCAST kılavuzundaki bilgiler kıyaslanarak belirlenmiştir. Antimikrobiyal duyarlılık testleri sonuçlarına göre ferülik asidin etkinliğinin zayıf olduğu, bunun nedeninin ise ferülik asidin konsantrasyonu ve bununla birlikte bir aktivatöre ya da başka bir madde ile patojen mikroorganizmaların hücrelerinin içerisine girmesi gerektiği düşünülmektedir. Bu kapsamda toksisitesinin az olduğu göz önüne alınarak, antibiyotikler ile sinerjist etkiyi tetiklemesi ve bu bilgiye ek olarak antibiyotik kullanımından kaynaklanan yan etkileri minimize edeceği ön görülmektedir. Öte yandan antikarsinojenik etkinlikler kapsamında SK-MEL-30 hücre hattı üzerinde hücre canlılık testi ve halka hücre göçü testi yapılarak, ferülik asidin potansiyel etkinliğini ortaya konulmuştur. Antikarsinojenik etkinlik testleri bakımından ferülik asit ile SK-MEL-30 hücre hattında yapılan hücre canlılığı ve halka hücre göçü testinde olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bu kapsamda MTT deneyinden elde edilen verilere göre etkinliği kanıtlanmış kemoterapötik bir ajan alan paklitaksel ve epirubisin ile ferülik asidin analitik standardının kıyaslaması yapılmış olup 1500 µM konsantrasyon değeri için çok etkili olduğu saptanmıştır. Buğday kepeği ekstraktı ile yapılan deneyde ise 500 µM değerinin çok etkili olduğu belirlenmiştir. Öte yandan halka hücre göçü testinde ise SK-MEL-30 hücreleri arasında oluşturulan mesafenin kapanmasını 2mM bir dozla engelleyerek, melanoma hücrelerinin etkinliğini baskıladığı ortaya konulmuştur.

Gerek saflaştırılan materyalin gerekse ferülik asit analitik standardının fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesinin ardından Siyez ve Gernik buğdayları kullanılarak üretilen ekmek, kepekli ekmek, bulgur, irmik ve erişte üretilmiş ve üretilen bu ürünlerde ferülik ait düzeyleri belirlenmiştir. Siyez ve Gernik buğdaylarından elde edilen ekmeklerde yapılan analizlerde ise en yüksek ferülik asit miktarı Siyez buğdayları için yapılan Siyez için 97,74±8,01 ppm ve Gernik buğdayından üretilen ekmekte ise ortalama 125,11±18,06 ppm olarak bulunmuştur. Siyez buğdayından elde edilen kepekli ekmekte ise 528,12±26,43 ppm, Gernik buğdayından elde edilen kepekli ekmekte ise 276,01±45,82 ppm olarak belirlenmiştir. İlgili buğday çeşitlerinden bulgur üretimi için en uygun buğdaylardan elde edilen bulgurda ise en yüksek değer Siyez 33'te 1691,56 ppm bulunmuştur. Gernik buğday türünde ise Gernik 45'te 1061,81 ppm bulunmuştur. Siyez 6 un fraksiyonundan elde edilen eriştenin içeriğindeki ferülik asit miktarı yapılan 6 tekrarlı deneyler sonucunda 84,05±7,02 ppm olarak belirlenmiştir. Ortalama ferülik asit değeri Siyez buğdayından elde edilen bulgur fraksiyonunda en yüksek ferülik asit içeren Siyez 33 hattında 1691,57 ppm olarak saptanırken, Siyez buğdaylarından elde edilen bulgur fraksiyonunun ortalaması 831,01±309,48 ppm olarak bulunmuştur. Gernik buğdaylarından elde edilen bulgur fraksiyonunun da ise en yüksek ferülik asit içeriği Gernik 45 hattında 1061,82ppm olarak bulunurken, Gernik buğdaylarından elde edilen bulgur fraksiyonunun ortalama ferülik asit değeri 587,32±181,83 ppm olarak bulunmuştur. Diğer bir ürün olan irmikte ise Siyez 6 buğday hattında en yüksek 848,17 ppm olarak bulunmuştur. Gernik'ten elde edilen irmiklerden ise en yüksek Gernik 42 buğday hattından en yüksek 1179,11 ppm olarak bulunmuştur. Kümülatif olarak değerlendirildiğinde ortalama ferülik asit değeri Siyez buğdayından elde edilen irmikte

ortalama $694,16 \pm 278,55$ olarak tespit edilirken, Gernik buğdaylarından elde edilen ırmiklerde ortalama $858,08 \pm 155,08$ ppm olarak bulunmuştur.

Özet olarak ferülik asidin toplumda sık olarak tüketilen gıdaların içerisindeki miktarının arttırılması, sağlık açısından birden fazla pozitif etkiye sahip olacağı düşünülmektedir. Bununla beraber özellikle toksisitesinin az olması farmasötik uygulamalar için umut vaat etmesiyle birlikte, kozmetik endüstrisinde önemli bir ilgi uyandırmış ve foto koruyucu formülasyonlarda potansiyel bir aktif bileşen olarak konumlandırmıştır. Bununla beraber kanser ve diyabet gibi kronik hastalıkların tedavisinde kullanıldığını bilinmekle birlikte, kullanımının daha da yaygınlaştığı rapor edilmektedir. Tez çalışmasının amacı, ferülik asidin ülkemize yurt dışından temin edilmesinin önüne geçmek ve bu değerli bileşiğin ülkemizde üretimini ve kullanım alanını genişletilmesidir. Ferülik asit, bitkilerde doğal olarak bulunan bir fenolik asittir. Yukarıda bahsedilen pozitif etkilerinin nedeniyle, gıda, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Türkiye, ferülik asit açısından zengin bir bitki örtüsüne sahiptir. Ancak, ülkemizde ferülik asit üretimi henüz yeterince gelişmemiştir. Bu tez çalışmasında, ülkemizde ferülik asit üretiminin artırılması için gerekli bilgi ve teknolojilerin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, ferülik asidin farklı kullanım alanlarının belirlenmesi ve bu alanlarda kullanılması için gerekli araştırmaların yapılması uzun dönemde bir gerekliliktir. Tez çalışmasından elde edilen bulguların ülkemizin ferülik asit üretimi ve kullanımında önemli bir ilerleme kaydetmesine katkı sağlaması ve böylelikle ülkemiz ekonomisine ve halk sağlığına önemli faydalar sağlaması ümit edilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Adom, K. K., Sorrells, M. E., & Liu, R. H. (2005). Phytochemicals and Antioxidant Activity of Milled Fractions of Different Wheat Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2297-2306. doi:10.1021/jf048456d
- Akar, T., Cengiz, M., & Tekin, M. (2019). A comparative study of protein and free amino acid contents in some important ancient wheat lines. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 11(2), 191-200.
- Alam, M. A. (2019). Anti-hypertensive effect of cereal antioxidant ferulic acid and its mechanism of action. *Frontiers in nutrition*, 6, 121.
- Anabela Borges, C. F., Maria J. Saavedra, and Manuel Simões. (2013). Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microbial drug resistance*, 19(4), 256-265. doi:10.1089/mdr.2012.0244
- Anson, N. M., Selinheimo, E., Havenaar, R., Aura, A.-M., Mattila, I., Lehtinen, P., . . . Haenen, G. R. M. M. (2009). Bioprocessing of Wheat Bran Improves in vitro Bioaccessibility and Colonic Metabolism of Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 6148-6155. doi:10.1021/jf900492h
- Arranz-Otaegui, A., González Carretero, L., Roe, J., & Richter, T. (2018). “Founder crops” v. wild plants: Assessing the plant-based diet of the last hunter-gatherers in southwest Asia. *Quaternary Science Reviews*, 186, 263-283. doi:<https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2018.02.011>
- Babacan, Ü., Adem, K., Akçakale, F., CENGİZ, M. F., & AKINCI, E. (2021). Optimization of some parametric values of MTT for the determination of human melanoma (SK-Mel-30) cell viability. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 5(1), 9-20.
- Babazadeh, R., Ezati, F., & Arumugam, A. (2022). Non-edible feedstock: necessity and societal implications. In *Production of Biodiesel from Non-Edible Sources* (pp. 81-116): Elsevier.
- Baenziger, P. (2016). Wheat Breeding and Genetics. In.
- Baines, J., Málek, J., & Speake, G. (2000). *Cultural Atlas of Ancient Egypt*: Checkmark Books.
- Balasubashini, M. S., Rukkumani, R., Viswanathan, P., & Menon, V. P. (2004). Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(4), 310-314.
- Baranwal, D. (2022). Genetic and genomic approaches for breeding rust resistance in wheat. *Euphytica*, 218(11), 159.

- Barberousse, H., Kamoun, A., Chaabouni, M., Giet, J.-M., Roiseux, O., Paquot, M., . . . Blecker, C. (2009a). Optimization of enzymatic extraction of ferulic acid from wheat bran, using response surface methodology, and characterization of the resulting fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(10), 1634-1641. doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.3630>
- Barberousse, H., Kamoun, A., Chaabouni, M., Giet, J. M., Roiseux, O., Paquot, M., . . . Blecker, C. (2009b). Optimization of enzymatic extraction of ferulic acid from wheat bran, using response surface methodology, and characterization of the resulting fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(10), 1634-1641.
- Bard, K. A. (2015). *An Introduction to the Archaeology of Ancient Egypt*: Wiley.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2007). *Biochemistry (Loose-Leaf)*: Macmillan.
- Berker, K. I., Ozdemir Olgun, F. A., Ozyurt, D., Demirata, B., & Apak, R. (2013). Modified Folin–Ciocalteu Antioxidant Capacity Assay for Measuring Lipophilic Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(20), 4783-4791. doi:10.1021/jf400249k
- Bernardo-Gil, M. G., Roque, R., Roseiro, L. B., Duarte, L. C., Gírio, F., & Esteves, P. (2011). Supercritical extraction of carob kibbles (*Ceratonia siliqua* L.). *The Journal of Supercritical Fluids*, 59, 36-42.
- Berthomieu, C., & Hienerwadel, R. (2009). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynthesis research*, 101, 157-170.
- Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial drug resistance*, 19(4), 256-265.
- Boudaoud, S., Sicard, D., Suc, L., Conéjéro, G., Second, D., & Aouf, C. (2021). Ferulic acid content variation from wheat to bread. *Food Science & Nutrition*, 9(5), 2446-2457.
- Bourne, L. C., & Rice-Evans, C. (1998). Bioavailability of Ferulic Acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253(2), 222-227. doi:<https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9681>
- Brown, T. A., Jones, M. K., Powell, W., & Allaby, R. G. (2009). The complex origins of domesticated crops in the Fertile Crescent. *Trends in ecology & evolution*, 24(2), 103-109.
- Bumrungpert, A., Lilitchan, S., Tuntipopipat, S., Tirawanchai, N., & Komindr, S. (2018). Ferulic Acid Supplementation Improves Lipid Profiles, Oxidative Stress, and Inflammatory Status in Hyperlipidemic Subjects: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Nutrients*, 10(6), 713. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2072-6643/10/6/713>

- Bunzel, M., Ralph, J., Marita, J. M., Hatfield, R. D., & Steinhart, H. (2001). Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(7), 653-660. doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.861>
- Buranov, A. U., & Mazza, G. (2009). Extraction and purification of ferulic acid from flax shives, wheat and corn bran by alkaline hydrolysis and pressurised solvents. *Food Chemistry*, 115(4), 1542-1548. doi:10.1016/j.foodchem.2009.01.059
- Carson, G. R., & Edwards, N. M. (2009). Criteria of wheat and flour quality. *Wheat: chemistry and technology*(Ed. 4), 97-118.
- Cengiz, M. F., Babacan, U., Akinci, E., Tuncer Kesci, S., & Kaba, A. (2021). Extraction of phenolic acids from ancient wheat bran samples by ultrasound application. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 96(1), 134-141. doi:<https://doi.org/10.1002/jctb.6519>
- Cengiz, M. F., Babacan, Ü., Kaba, A., AkÇAkale, F., & Akinci, E. (2022). Optimization of some parametric values of MTT for the determination of human melanoma (SK-Mel-30) cell viability. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 5(1), 9-20. doi:10.38001/ijlsb.991615
- ChemicalBook. (2017). https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_1135-24-6_IR1.htm.
- Chen, F., Srinivasa Reddy, M. S., Temple, S., Jackson, L., Shadle, G., & Dixon, R. A. (2006). Multi-site genetic modulation of monolignol biosynthesis suggests new routes for formation of syringyl lignin and wall-bound ferulic acid in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *The Plant Journal*, 48(1), 113-124.
- CHEN, Q. M., LIU, J., & MERRETT, J. B. (2000). Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H2O2 response of normal human fibroblasts. *Biochemical Journal*, 347(2), 543-551.
- Chen, T.-C., Huang, H.-J., Wang, T.-Y., Yang, L.-Y., Chen, C.-H., Cheng, Y.-M., . . . Ou, Y.-C. (2015). Primary surgery versus primary radiation therapy for FIGO stages I–II small cell carcinoma of the uterine cervix: A retrospective Taiwanese Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic Oncology*, 137(3), 468-473.
- Choi, J. H., Park, J. K., Kim, K. M., Lee, H. J., & Kim, S. (2018). In vitro and in vivo antithrombotic and cytotoxicity effects of ferulic acid. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(1), e22004.
- Choi, Y.-S., & Sohn, Y.-W. (2006). Anticancer effect of ferulic acid on cultured human skin melanoma cells. *J. Exp. Biomed. Sci.*, 12(4), 457-461.
- Chun, F. K. H., Haese, A., Ahyai, S. A., Walz, J., Suardi, N., Capitanio, U., . . . Karakiewicz, P. I. (2008). Critical assessment of tools to predict clinically insignificant prostate cancer at radical prostatectomy in contemporary men.

- Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 113(4), 701-709.
- Clifford, A. (1998). Introduction to supercritical fluid extraction in analytical science. *Analytical Supercritical Fluid Extraction Techniques*, 1-42.
- Cooks, R. G., Ouyang, Z., Takats, Z., & Wiseman, J. M. (2006). Ambient mass spectrometry. *Science*, 311(5767), 1566-1570.
- Council, N. R. (1996). Lost crops of Africa: volume I: grains. *National Academies Press*, 1, 408.
- Çancı, H., Karhan, M., TEKİN, M., AKAR, T., COŞKUN, İ., AKSOY, A., & UZUN, B. (2018). Türkiye ve Azerbaycan Kökenli Kavuzlu Buğdayların Genetik Yakınlıklarının Belirlenmesi ve Besin İçeriği Yüksek Genotiplerin Geliştirilmesi.
- Çelik, E. E., & Gökmen, V. (2020). Effects of fermentation and heat treatments on bound-ferulic acid content and total antioxidant capacity of bread crust-like systems made of different whole grain flours. *Journal of Cereal Science*, 93, 102978. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.102978>
- Danilewicz, J. C. (2015). Folin-Ciocalteu, FRAP, and DPPH• assays for measuring polyphenol concentration in white wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66(4), 463-471.
- De Castro, M. L., & Garcia-Ayuso, L. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica chimica acta*, 369(1-2), 1-10.
- de Oliveira, D. M., Finger-Teixeira, A., Rodrigues Mota, T., Salvador, V. H., Moreira-Vilar, F. C., Correa Molinari, H. B., . . . Dantas dos Santos, W. (2015). Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. *Plant Biotechnology Journal*, 13(9), 1224-1232. doi:<https://doi.org/10.1111/pbi.12292>
- de Réaumur, R.-A. F. (1752). *Sur la Digestion Des Oisiseaux*: Académie royale des sciences (France).
- De Vries, R. P., Michelsen, B., Poulsen, C., Kroon, P., Van Den Heuvel, R., Faulds, C., . . . Visser, J. (1997). The faeA genes from *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* encode ferulic acid esterases involved in degradation of complex cell wall polysaccharides. *Applied and environmental microbiology*, 63(12), 4638-4644.
- Di Domenico, F., Di Domenico, F., Perluigi, M., Foppoli, C., Blarzino, C., Coccia, R., . . . Cini, C. (2009). Protective effect of ferulic acid ethyl ester against oxidative stress mediated by UVB irradiation in human epidermal melanocytes. *Free Radical Research*, 43(4), 365-375. doi:10.1080/10715760902777329
- Domingos, J. M. B., Teixeira, A. R. S., Dupoirson, S., Allais, F., & Lameloise, M.-L. (2020). Simultaneous recovery of ferulic acid and sugars from wheat bran

- enzymatic hydrolysate by dnanofiltration. *Separation and Purification Technology*, 242, 116755. doi:<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.116755>
- dos Santos, W. D., Ferrarese, M., & Ferrarese-Filho, O. (2008). Ferulic acid: an allelochemical troublemaker. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 2(1), 47-55.
- Dupoiron, S., Lameloise, M.-L., Bedu, M., Lewandowski, R., Fargues, C., Allais, F., . . . Rémond, C. (2018). Recovering ferulic acid from wheat bran enzymatic hydrolysate by a novel and non-thermal process associating weak anion-exchange and electrodialysis. *Separation and Purification Technology*, 200, 75-83. doi:<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.02.031>
- Dupoiron, S., Lameloise, M.-L., Pommet, M., Bennaceur, O., Lewandowski, R., Allais, F., . . . Rakotoarivonina, H. (2017). A novel and integrative process: From enzymatic fractionation of wheat bran with a hemicellulasic cocktail to the recovery of ferulic acid by weak anion exchange resin. *Industrial Crops and Products*, 105, 148-155. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.004>
- Dvorak, J., & Akhunov, E. D. (2005). Tempos of Gene Locus Deletions and Duplications and Their Relationship to Recombination Rate During Diploid and Polyploid Evolution in the Aegilops-Triticum Alliance. *Genetics*, 171(1), 323-332. doi:10.1534/genetics.105.041632
- Echegaray, N., Pateiro, M., Munekata, P., Lorenzo, J. M., Chabani, Z., Farag, M., & Domínguez-Valencia, R. (2021). Measurement of Antioxidant Capacity of Meat and Meat Products: Methods and Applications. 26, 3880. doi:10.3390/molecules26133880
- ELGÜN, A. (1982). EKMEK YAPIM TEKNOLOJİSİ VE EKMEKCİLİĞİMİZ. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 13(1-2).
- Eller, F. (2002). Supercritical carbon dioxide extraction of fat. *Bus. Brief. Food Technol*, 1-4.
- Ergün, B. Ç., Çoban, T., Onurdag, F. K., & Banoglu, E. (2011). Synthesis, antioxidant and antimicrobial evaluation of simple aromatic esters of ferulic acid. *Archives of Pharmacal Research*, 34(8), 1251-1261. doi:10.1007/s12272-011-0803-y
- Eroğlu, C., Seçme, M., Bağcı, G., & Dodurga, Y. (2015). Assessment of the anticancer mechanism of ferulic acid via cell cycle and apoptotic pathways in human prostate cancer cell lines. *Tumor Biology*, 36, 9437-9446.
- Evan, G. I., & Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411(6835), 342-348.
- Ezhuthupurakkal, P. B., Ariraman, S., Arumugam, S., Subramaniyan, N., Muthuvel, S. K., Kumpati, P., . . . Chinnasamy, T. (2018). Anticancer potential of ZnO nanoparticle-ferulic acid conjugate on Huh-7 and HepG2 cells and diethyl nitrosamine induced hepatocellular cancer on Wistar albino rat. *Nanomedicine:*

- Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14(2), 415-428.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.11.003>
- FAOSTAT. (2022). FAOSTAT statistical database: [Rome] : FAO, c1997-2023.
Retrieved from <https://search.library.wisc.edu/catalog/999890171702121>
- Fardet, A. (2010). New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: what is beyond fibre? *Nutrition Research Reviews*, 23(1), 65-134.
doi:10.1017/S0954422410000041
- Fares, C., Platani, C., Baiano, A., & Menga, V. (2010). Effect of processing and cooking on phenolic acid profile and antioxidant capacity of durum wheat pasta enriched with debranning fractions of wheat. *Food Chemistry*, 119(3), 1023-1029.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.006>
- Faulds, C., & Williamson, G. (1995). Release of ferulic acid from wheat bran by a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*. *Applied microbiology and biotechnology*, 43, 1082-1087.
- Faulds, C. B. (2010). What can feruloyl esterases do for us? *Phytochemistry Reviews*, 9(1), 121-132.
- Faulds, C. B., & Williamson, G. (1991). The purification and characterization of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic (ferulic) acid esterase from *Streptomyces olivochromogenes*. *Microbiology*, 137(10), 2339-2345.
- Feldman, M., & Levy, A. A. (2023). Evolution of Wheat Under Cultivation. In M. Feldman & A. A. Levy (Eds.), *Wheat Evolution and Domestication* (pp. 605-663). Cham: Springer International Publishing.
- Ferri, M., Happel, A., Zanaroli, G., Bertolini, M., Chiesa, S., Commisso, M., . . . Tassoni, A. (2020). Advances in combined enzymatic extraction of ferulic acid from wheat bran. *N Biotechnol*, 56, 38-45. doi:10.1016/j.nbt.2019.10.010
- Finocchiaro, F., Ferrari, B., Gianinetti, A., Dall'Asta, C., Galaverna, G., Scazzina, F., & Pellegrini, N. (2007). Characterization of antioxidant compounds of red and white rice and changes in total antioxidant capacity during processing. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(8), 1006-1019.
doi:<https://doi.org/10.1002/mnfr.200700011>
- Fois, S., Campus, M., Piu, P. P., Siliani, S., Sanna, M., Roggio, T., & Catzeddu, P. (2019). Fresh Pasta Manufactured with Fermented Whole Wheat Semolina: Physicochemical, Sensorial, and Nutritional Properties. *Foods*, 8(9), 422.
Retrieved from <https://www.mdpi.com/2304-8158/8/9/422>
- Fuller, D. Q., Willcox, G., & Allaby, R. G. (2011). Cultivation and domestication had multiple origins: arguments against the core area hypothesis for the origins of agriculture in the Near East. *World Archaeology*, 43(4), 628-652.
doi:10.1080/00438243.2011.624747

- Gan, X., Hu, D., Wang, Y., Yu, L., & Song, B. (2017). Novel trans-ferulic acid derivatives containing a chalcone moiety as potential activator for plant resistance induction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(22), 4367-4377.
- Gani, A., Wani, S., & Masoodi, F. A. (2012). Whole-Grain Cereal Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review. *Journal of Food Processing & Technology*, 03. doi:10.4172/2157-7110.1000146
- Gao, J., Yu, H., Guo, W., Kong, Y., Gu, L., Li, Q., . . . Wang, Y. (2018). The anticancer effects of ferulic acid is associated with induction of cell cycle arrest and autophagy in cervical cancer cells. *Cancer Cell Int*, 18, 102. doi:10.1186/s12935-018-0595-y
- Gao, J., Yu, H., Guo, W., Kong, Y., Gu, L., Li, Q., . . . Wang, Y. (2018). The anticancer effects of ferulic acid is associated with induction of cell cycle arrest and autophagy in cervical cancer cells. *Cancer Cell International*, 18(1), 102. doi:10.1186/s12935-018-0595-y
- Gao, X., Yani, S., & Wu, H. (2014). Pyrolysis of spent biomass from mallee leaf steam distillation: Biochar properties and recycling of inherent inorganic nutrients. *Energy & Fuels*, 28(7), 4642-4649.
- Garcia-Conesa, M., Plumb, G., Waldron, K., Ralph, J., & Williamson, G. (1997). Ferulic acid dehydrodimers from wheat bran: isolation, purification and antioxidant properties of 8-0-4-diferulic acid. *Redox Report*, 3(5-6), 319-323.
- Geng, Y., Liu, J., Lv, R., Yuan, J., Lin, Y., & Wang, X. (2007). An efficient method for extraction, separation and purification of eugenol from *Eugenia caryophyllata* by supercritical fluid extraction and high-speed counter-current chromatography. *Separation and Purification Technology*, 57(2), 237-241.
- Giambanelli, E., Ferioli, F., & D'Antuono, L. F. (2020). The fate of bioactive compounds during traditional preparation of einkorn wheat (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) bulgur. *Journal of Cereal Science*, 91, 102890. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.102890>
- Gopalan, N., & Nampoothiri, K. M. (2018). Biorefining of wheat bran for the purification of ferulic acid. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 15, 304-310.
- Granato, D., Barba, F. J., Bursać Kovačević, D., Lorenzo, J. M., Cruz, A. G., & Putnik, P. (2020). Functional foods: Product development, technological trends, efficacy testing, and safety. *Annual review of food science and technology*, 11, 93-118.
- Guo, Z., Jin, Q., Fan, G., Duan, Y., Qin, C., & Wen, M. (2001). Microwave-assisted extraction of effective constituents from a Chinese herbal medicine *Radix puerariae*. *Analytica chimica acta*, 436(1), 41-47.
- Gupta, A., Singh, A. K., Loka, M., Pandey, A. K., & Bishayee, A. (2021). Ferulic acid-mediated modulation of apoptotic signaling pathways in cancer. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 125, 215-257.

- Hatcher, D., & Kruger, J. (1997). Simple phenolic acids in flours prepared from Canadian wheat: relationship to ash content, color, and polyphenol oxidase activity. *Cereal Chemistry*, 74(3), 337-343.
- He, J., Ma, L., Wang, D., Zhang, M., & Zhou, H. (2019). Ferulic acid treatment reinforces the resistance of postharvest apple fruit during gray mold infection. *Journal of Plant Pathology*, 101, 503-511.
- Hernández, L., Afonso, D., Rodríguez, E. M., & Díaz, C. (2011). Phenolic Compounds in Wheat Grain Cultivars. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(4), 408-415. doi:10.1007/s11130-011-0261-1
- Hidalgo, A., & Brandolini, A. (2014). Nutritional properties of einkorn wheat (*Triticum monococcum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(4), 601-612.
- Hirata, A., Murakami, Y., Atsumi, T., Shoji, M., Ogiwara, T., Shibuya, K., . . . Fujisawa, S. (2005). Ferulic acid dimer inhibits lipopolysaccharide-stimulated cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *in vivo*, 19(5), 849-853.
- Hong, Q., Ma, Z.-C., Huang, H., Wang, Y.-G., Tan, H.-L., Xiao, C.-R., . . . Gao, Y. (2016). Antithrombotic activities of ferulic acid via intracellular cyclic nucleotide signaling. *European Journal of Pharmacology*, 777, 1-8.
- Huang, X., Börner, A., Röder, M., & Ganai, M. (2002). Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(5), 699-707. doi:10.1007/s00122-002-0959-4
- Hughes, A., Oliveira, H. R., Fradgley, N., Corke, F. M. K., Cockram, J., Doonan, J. H., & Nibau, C. (2019). μ CT trait analysis reveals morphometric differences between domesticated temperate small grain cereals and their wild relatives. *The Plant Journal*, 99(1), 98-111. doi:<https://doi.org/10.1111/tpj.14312>
- Ibitoye, O., & Ajiboye, T. (2019). Ferulic acid potentiates the antibacterial activity of quinolone-based antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. *Microbial pathogenesis*, 126, 393-398.
- İPLİK, E. S., & ÇAKMAKOĞLU, B. (2020). *Hücre Kültürü Temel Teknikleri*.
- J. Foster, T. (2002). 39 - *Staphylococcus aureus*. In M. Sussman (Ed.), *Molecular Medical Microbiology* (pp. 839-888). London: Academic Press.
- Jadhav, A., Kareparamban, J., Nikam, P., & Kadam, V. (2012). Spectrophotometric estimation of ferulic acid from *Ferula asafoetida* by Folin-ciocalteu's reagent. *Der Pharmacia Sinica*, 3(6), 680-684.
- Jaradat, A. A. (2019). Comparative assessment of einkorn and emmer wheat phenomes: I. Plant architecture. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 66, 491-512.

- Johnson, K. A., & Goody, R. S. (2011). The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis–Menten paper. *Biochemistry*, 50(39), 8264-8269.
- Kamm, A., Przychodzeń, P., Kuban–Jankowska, A., Gammazza, A. M., Cappello, F., Daga, A., . . . Gorska–Ponikowska, M. (2019). 2-Methoxyestradiol and its combination with a natural compound, ferulic acid, induces melanoma cell death via downregulation of Hsp60 and Hsp90. *Journal of Oncology*, 2019.
- Karale Chandrakant, K., Dere Pravin, J., Dhonde, S., Honde Bharat, S., & Kote Amol, P. (2011). An overview on supercritical fluid extraction for herbal drugs. *Pharmacologyonline*, 2, 575-596.
- Karthikeyan, S., Kanimozhi, G., Prasad, N. R., & Mahalakshmi, R. (2011). Radiosensitizing effect of ferulic acid on human cervical carcinoma cells in vitro. *Toxicology in Vitro*, 25(7), 1366-1375.
- Katina, K., Laitila, A., Juvonen, R., Liukkonen, K.-H., Kariluoto, S., Piironen, V., . . . Poutanen, K. (2007). Bran fermentation as a means to enhance technological properties and bioactivity of rye. *Food microbiology*, 24(2), 175-186.
- Keskin, S., & Kaplan Evlice, A. (2022). Zenginleştirilmiş Erişte Üretiminde Yeni Yaklaşımlar. 11, 79-86.
- Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K., & Taniguchi, H. (2002). Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Related Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 2161-2168. doi:10.1021/jf011348w
- Kim, K.-H., Jung, J. H., Chung, W.-S., Lee, C.-H., & Jang, H.-J. (2021). Ferulic Acid Induces Keratin 6a via Inhibition of Nuclear β -Catenin Accumulation and Activation of Nrf2 in Wound-Induced Inflammation. *Biomedicines*, 9(5), 459. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2227-9059/9/5/459>
- Kl, K., Avti, P., Kumar, S., Mittal, N., Sohi, K., & Pathak, C. (2006). Anti-apoptotic activity of caffeic acid, ellagic acid and ferulic acid in normal human peripheral blood mononuclear cells: A Bcl-2 independent mechanism. *Biochimica et biophysica acta*, 1760, 283-289. doi:10.1016/j.bbagen.2005.12.017
- Klepcka, J., & Fornal, Ł. (2006). Ferulic Acid and its Position Among the Phenolic Compounds of Wheat. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(8), 639-647. doi:10.1080/10408390500511821
- Konopka, I., Tańska, M., Faron, A., & Czaplicki, S. (2014). Release of free ferulic acid and changes in antioxidant properties during the wheat and rye bread making process. *Food Science and Biotechnology*, 23(3), 831-840. doi:10.1007/s10068-014-0112-6
- Konopka, I., Tańska, M., Wasilewska, A., & Czaplicki, S. (2014). Release of Free Ferulic Acid and Changes in Antioxidant Properties during the Wheat and Rye Bread Making Process. *Food Science and Biotechnology*, 23, 831-840. doi:10.1007/s10068-014-0112-6

- Kumar, N., Kk, M., Dang, R., Thippenahalli, S., & Das, K. (2009). GC-MS analysis of propolis of Indian origin. *Journal of Young Pharmacists*, 1. doi:10.4103/0975-1483.51876
- Kumar, N., & Pruthi, V. (2014). Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnol Rep (Amst)*, 4, 86-93. doi:10.1016/j.btre.2014.09.002
- Kumar, P., Yadava, R., Gollen, B., Kumar, S., Verma, R. K., & Yadav, S. (2011). Nutritional contents and medicinal properties of wheat: a review. *Life Sciences and Medicine Research*, 22(1), 1-10.
- Kühne, W. (1976). Über das Verhalten verschiedener organisirter und sog. ungeformter Fermente. *FEBS Letters*, 62, E4-E7.
- Lang, Q., & Wai, C. M. (2001). Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—a practical review. *Talanta*, 53(4), 771-782.
- Lari, Z., Moradi-kheibari, N., Ahmadzadeh, H., Abrishamchi, P., Moheimani, N. R., & Murry, M. A. (2016). Bioprocess engineering of microalgae to optimize lipid production through nutrient management. *Journal of Applied Phycology*, 28, 3235-3250.
- Lempereur, I., Rouau, X., & Abecassis, J. (1997). Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (*Triticum durum*L.) grain and its milling fractions. *Journal of Cereal Science*, 25(2), 103-110.
- Li, G., Zhu, T., & Row, K. H. (2017). Isolation of Ferulic Acid from Wheat Bran with a Deep Eutectic Solvent and Modified Silica Gel. *Analytical Letters*, 50(12), 1926-1938. doi:10.1080/00032719.2016.1261879
- Li, X., Wu, J., Xu, F., Chu, C., Li, X., Shi, X., . . . Xiao, W. (2022). Use of Ferulic Acid in the Management of Diabetes Mellitus and Its Complications. *Molecules*, 27(18), 6010. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/18/6010>
- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends in biochemical sciences*, 41(3), 211-218.
- Liu, R. H. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 207-219. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.06.010>
- Lope Pihie, A. H., Zakaria, Z. A., & Othman, F. (2012). Antiproliferative and proapoptotic effects of *Labisia pumila* ethanol extract and its active fraction in human melanoma HM3KO cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- Lu, Y., Luthria, D., Fuerst, E. P., Kiszonas, A. M., Yu, L., & Morris, C. F. (2014). Effect of Processing on Phenolic Composition of Dough and Bread Fractions Made from Refined and Whole Wheat Flour of Three Wheat Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(43), 10431-10436. doi:10.1021/jf501941r

- Luo, M. C., Yang, Z. L., You, F., Kawahara, T., Waines, J., & Dvorak, J. (2007). The structure of wild and domesticated emmer wheat populations, gene flow between them, and the site of emmer domestication. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 114, 947-959. doi:10.1007/s00122-006-0474-0
- Luthria, D., Lu, Y., & John, K. M. (2015). Bioactive phytochemicals in wheat: Extraction, analysis, processing, and functional properties. *Journal of Functional Foods*, 18. doi:10.1016/j.jff.2015.01.001
- Marchini, D., Montanari, R., Bottani, E., Tagliavini, G., & Digiuni, S. (2016). *LIFECYCLE MODELLING OF AN INNOVATIVE DURUM WHEAT DEBRANNER*.
- Markiewicz-Żukowska, R., Naliwajko, S. K., Bartosiuk, E., Moskwa, J., Isidorov, V., Soroczyńska, J., & Borawska, M. H. (2013). Chemical composition and antioxidant activity of beebread, and its influence on the glioblastoma cell line (U87MG). *Journal of Apicultural Science*, 57(2), 147-157.
- Maruyama, H., Kawakami, F., Lwin, T.-T., Imai, M., & Shamsa, F. (2018). Biochemical characterization of ferulic acid and caffeic acid which effectively inhibit melanin synthesis via different mechanisms in B16 melanoma cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 41(5), 806-810.
- Masalha, M., Borovok, I., Schreiber, R., Aharonowitz, Y., & Cohen, G. (2001). Analysis of transcription of the *Staphylococcus aureus* aerobic class Ib and anaerobic class III ribonucleotide reductase genes in response to oxygen. *Journal of bacteriology*, 183(24), 7260-7272.
- Maurya, D. K., & Devasagayam, T. P. A. (2010). Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12), 3369-3373.
- Menga, V., Giovanniello, V., Savino, M., Gallo, A., Colecchia, S. A., De Simone, V., . . . Ficco, D. B. M. (2023). Comparative Analysis of Qualitative and Bioactive Compounds of Whole and Refined Flours in Durum Wheat Grains with Different Year of Release and Yield Potential. *Plants*, 12(6), 1350.
- Menteş Yılmaz, Ö. (2011). Türkiye’de yetiştirilen başlıca buğday çeşitlerinin antioksidan aktivitelerinin ve fenolik asit dağılımlarının belirlenmesi ve ekmeğin nar kabuğu ekstraktı ile zenginleştirilmesi.
- Mikule, K., Delaval, B., Kaldis, P., Jurczyk, A., Hergert, P., & Doxsey, S. (2007). Loss of centrosome integrity induces p38—p53—p21-dependent G1—S arrest. *Nature cell biology*, 9(2), 160-170.
- Moore, J., Luther, M., Cheng, Z., & Yu, L. (2009). Effects of baking conditions, dough fermentation, and bran particle size on antioxidant properties of whole-wheat pizza crusts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(3), 832-839.

- Moskowitz, M. R., Bin, Q., Elias, R. J., & Peterson, D. G. (2012). Influence of Endogenous Ferulic Acid in Whole Wheat Flour on Bread Crust Aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(45), 11245-11252. doi:10.1021/jf303750y
- Munns, R., James, R. A., Gilliam, M., Flowers, T. J., & Colmer, T. D. (2016). Tissue tolerance: an essential but elusive trait for salt-tolerant crops. *Functional Plant Biology*, 43(12), 1103-1113.
- Murphy, J. M., Farhan, H., & Evers, P. A. (2017). Bio-Zombie: the rise of pseudoenzymes in biology. *Biochemical Society Transactions*, 45(2), 537-544.
- Murray, J. C., Burch, J. A., Streilein, R. D., Iannacchione, M. A., Hall, R. P., & Pinnell, S. R. (2008). A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 59(3), 418-425.
- Muscarella, O. W. (2013). *Archaeology, Artifacts and Antiquities of the Ancient Near East: Sites, Cultures, and Proveniences*: Brill.
- Napolitano, A., Costabile, A., Martin-Pelaez, S., Vitaglione, P., Klinder, A., Gibson, G. R., & Fogliano, V. (2009). Potential prebiotic activity of oligosaccharides obtained by enzymatic conversion of durum wheat insoluble dietary fibre into soluble dietary fibre. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 19(4), 283-290.
- Nasr Bouzaiene, N., Kilani Jaziri, S., Kovacic, H., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K., & Luis, J. (2015). The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. *European Journal of Pharmacology*, 766, 99-105. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.09.044>
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic escherichia coli. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142-201.
- Ndolo, V., & Beta, T. (2014). Comparative Studies on Composition and Distribution of Phenolic Acids in Cereal Grain Botanical Fractions. *Cereal Chemistry*, 91, 522-530. doi:10.1094/CCHEM-10-13-0225-R
- Nesbitt, M., & Samuel, D. (1998). Wheat domestication: archaeobotanical evidence. *Science*, 279(5356), 1431-1431.
- Nicolau-Lapeña, I., Abadias, M., Bobo, G., Lafarga, T., Viñas, I., & Aguiló-Aguayo, I. (2021). Antioxidant and antimicrobial activities of ginseng extract, ferulic acid, and noni juice: Evaluation of their potential to be incorporated in food. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(12), e16041. doi:<https://doi.org/10.1111/jfpp.16041>

- Ojha, S., Javed, H., Azimullah, S., Abul Khair, S. B., & Haque, M. E. (2015). Neuroprotective potential of ferulic acid in the rotenone model of Parkinson's disease. *Drug design, development and therapy*, 5499-5510.
- Olukoga, A., & Donaldson, D. (1998). Historical perspectives on health The history of liquorice: the plant, its extract, cultivation, commercialisation and etymology. *The journal of the Royal Society for the Promotion of Health*, 118(5), 300-304.
- Ou, S., & Kwok, K. C. (2004). Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(11), 1261-1269.
- Ozberk, I. (2018). *TÜRKİYE'NİN BUĞDAY ATLASI*.
- Özkan, H., Brandolini, A., Schäfer-Pregl, R., & Salamini, F. (2002). AFLP Analysis of a Collection of Tetraploid Wheats Indicates the Origin of Emmer and Hard Wheat Domestication in Southeast Turkey. *Molecular Biology and Evolution*, 19(10), 1797-1801. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a004002
- Özkaya, H. (1986). Buğday, un ve ekmeğin besin değeri ve ekmeğin zenginleştirilmesi. *Gıda*, 11(3).
- PA, K., CB, F., & Williamson, G. (1996). Purification and characterization of a novel esterase induced by growth of *Aspergillus niger* on sugar-beet pulp. *Biotechnology and applied biochemistry*, 23(3), 255-262.
- Padulosi, S. (1996). *Hulled Wheats: Proceedings of the First International Workshop on Hulled Wheats, 21-22 July 1995, Castelvecchio Pascoli, Tuscany, Italy* (Vol. 4): Bioversity International.
- Palozza, P. (2005). Can β -carotene regulate cell growth by a redox mechanism? An answer from cultured cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1740(2), 215-221. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.12.008>
- Payen, A., & Persoz, J.-F. (1833). Mémoire sur la diastase, les principaux produits de ses réactions, et leurs applications aux arts industriels. *Ann. chim. phys.*, 53(2), 73-92.
- Pazo-Cepeda, V., Benito-Román, Ó., Navarrete, A., & Alonso, E. (2019). Valorization of Wheat Bran: Ferulic Acid Recovery Using Pressurized Aqueous Ethanol Solutions. *Waste and Biomass Valorization*, 11(9), 4701-4710. doi:10.1007/s12649-019-00787-7
- Pekmez, H. (2018). *Wheat to Bulgur*.
- Peng, J., Sun, D., & Nevo, E. (2011). Wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, occupies a pivotal position in wheat domestication process. *Australian Journal of Crop Science*, 5, 1127-1143.

- Peres, D. D., Sarruf, F. D., de Oliveira, C. A., Velasco, M. V. R., & Baby, A. R. (2018). Ferulic acid photoprotective properties in association with UV filters: multifunctional sunscreen with improved SPF and UVA-PF. *J Photochem Photobiol B*, 185, 46-49. doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.05.026
- Pérez, Á., Casas, A., Fernández, C. M., Ramos, M. J., & Rodríguez, L. (2010). Winterization of peanut biodiesel to improve the cold flow properties. *Bioresource technology*, 101(19), 7375-7381.
- Petrisor, G., Fica, D., Motelica, L., Trusca, R. D., Bîrcă, A. C., Vasile, B. S., . . . Fica, A. (2022). Mesoporous silica materials loaded with gallic acid with antimicrobial potential. *Nanomaterials*, 12(10), 1648.
- Petrisor, G., Motelica, L., Fica, D., Trusca, R. D., Surdu, V.-A., Voicu, G., . . . Andronescu, E. (2022). New Mesoporous Silica Materials Loaded with Polyphenols: Caffeic Acid, Ferulic Acid and p-Coumaric Acid as Dietary Supplements for Oral Administration. *Materials*, 15(22), 7982. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1996-1944/15/22/7982>
- Piperno, D. R., Weiss, E., Holst, I., & Nadel, D. (2004). Processing of wild cereal grains in the Upper Palaeolithic revealed by starch grain analysis. *Nature*, 430(7000), 670-673. doi:10.1038/nature02734
- Poutanen, K. S., Kårlund, A. O., Gómez-Gallego, C., Johansson, D. P., Scheers, N. M., Marklinder, I. M., . . . Landberg, R. (2022). Grains – a major source of sustainable protein for health. *Nutrition Reviews*, 80(6), 1648-1663. doi:10.1093/nutrit/nuab084
- PubChem. (2004). Retrieved from PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 445858, Ferulic acid; [cited 2023 Dec. 28]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ferulic-acid>
- Puchart, V., Šuchová, K., & Biely, P. (2023). Importance of accessory enzymes in hemicellulose degradation. *Polysaccharide Degrading Biocatalysts*, 139-176.
- Ralet, M.-C., Faulds, C. B., Williamson, G., & Thibault, J.-F. (1994). Degradation of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp and wheat bran by ferulic acid esterases from *Aspergillus niger*. *Carbohydrate research*, 263(2), 257-269.
- Razboršek, M. I., Ivanović, M., & Kolar, M. (2021). Validated Stability-Indicating GC-MS Method for Characterization of Forced Degradation Products of Trans-Caffeic Acid and Trans-Ferulic Acid. *Molecules*, 26(9), 2475. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/9/2475>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

- Rebolleda, S., Beltrán, S., Sanz, M. T., & González-SanJosé, M. L. (2014). Supercritical fluid extraction of wheat bran oil: study of extraction yield and oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(3), 319-327.
- Reeve, R. N. (2002). *Introduction to environmental analysis* (Vol. 5): John Wiley & Sons.
- Reller, L. B., Weinstein, M., Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases*, 49(11), 1749-1755.
- Richter, T., & Maher, L. A. (2013). Terminology, process and change: reflections on the Epipalaeolithic of South-west Asia. *Levant*, 45(2), 121-132. doi:10.1179/0075891413Z.000000000020
- Roelfs, A. P., Singh, R. P., & Saari, E. (1992). *Rust diseases of wheat: concepts and methods of disease management*: Cimmyt.
- Rosazza, J., Huang, Z., Dostal, L., Volm, T., & Rousseau, B. (1995). Biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 15(6), 457-471.
- Roy, N., Narayanankutty, A., Nazeem, P., Valsalan, R., Babu, T., & Mathew, D. (2016). Plant phenolics ferulic acid and p-coumaric acid inhibit colorectal cancer cell proliferation through EGFR down-regulation. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(8), 4019-4023.
- Safarzadeh, E., Shotorbani, S. S., & Baradaran, B. (2014). Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 4(Suppl 1), 421.
- Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., De Pasquale, A., Uccella, N., Barbuzzi, T., . . . Bonina, F. (2000). In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *International journal of pharmaceuticals*, 199(1), 39-47.
- Saura-Calixto, F. (2011). Dietary Fiber as a Carrier of Dietary Antioxidants: An Essential Physiological Function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 43-49. doi:10.1021/jf1036596
- Schärer, E., & Ligo, R. (1992). Mammalian p53 can function as a transcription factor in yeast. *Nucleic acids research*, 20(7), 1539-1545.
- Schulz, K., Martinelli, E. E., & Mansoori, G. A. (2017). Supercritical fluid extraction and retrograde condensation (SFE/RC) applications in biotechnology. *Supercritical fluid technology*, 451-478.
- Sgarbossa, A., Giacomazza, D., & Di Carlo, M. (2015). Ferulic acid: a hope for Alzheimer's disease therapy from plants. *Nutrients*, 7(7), 5764-5782.

- Shewry, P. (2009). The HEALTHGRAIN programme opens new opportunities for improving wheat for nutrition and health. *Nutrition Bulletin*, 34, 225-231. doi:10.1111/j.1467-3010.2009.01747.x
- Sights, F. M. (2023). future marketin sights ferulic acid market. Retrieved from <https://www.futuremarketinsights.com/reports/ferulic-acid-market>
- Singh Tuli, H., Kumar, A., Ramniwas, S., Coudhary, R., Aggarwal, D., Kumar, M., . . . Sak, K. (2022). Ferulic Acid: A Natural Phenol That Inhibits Neoplastic Events through Modulation of Oncogenic Signaling. *Molecules*, 27(21), 7653. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/21/7653>
- Sioud, F., Maatouk, M., Bzeouich, I. M., Ghedira, L. C., & Kilani-Jaziri, S. (2022). In vitro anti-melanoma effect of polyphenolic compounds. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 12(10), 446-452.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Glajch, J. L. (2012). *Practical HPLC method development*: John Wiley & Sons.
- Šramková, Z., Gregová, E., & Šturdík, E. (2009). Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta Chimica Slovaca*, 2(1), 115-138.
- Sri Balasubashini, M., Rukkumani, R., & Menon, V. (2003). Protective effects of ferulic acid on hyperlipidemic diabetic rats. *Acta Diabetologica*, 40, 118-122.
- Srinivasan, M., Sudheer, A. R., & Menon, V. P. (2007). Ferulic Acid: Therapeutic Potential Through Its Antioxidant Property. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 40(2), 92-100. doi:10.3164/jcbn.40.92
- Stallknecht, G., Gilbertson, K., & Ranney, J. (1996). Alternative wheat cereals as food grains: Einkorn, emmer, spelt, kamut, and triticale. *Progress in new crops*, 1996, 156-170.
- Stavova, E., Porizka, J., Stursa, V., Enev, V., & Divis, P. (2017). Extraction of ferulic acid from wheat bran by alkaline hydrolysis. *MendelNet*, 24(1), 2017.2000.
- Sun, Y., Li, S., Song, H., & Tian, S. (2006). Extraction of ferulic acid from *Angelica sinensis* with supercritical CO₂. *Natural Product Research*, 20(9), 835-841. doi:10.1080/14786410500462579
- Tacer Caba, Z., Boyacioglu, M. H., & Boyacioglu, D. (2012). Bioactive healthy components of bulgur. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(2), 250-256.
- Tang, Y., Hao, J., Fan, C., & Cao, X. (2021). Preparative separation of high-purity trans- and cis-ferulic acid from wheat bran by pH-zone-refining counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1636, 461772. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461772>

- Tatke, P., & Jaiswal, Y. (2011). An overview of microwave assisted extraction and its applications in herbal drug research. *Research journal of medicinal plant*, 5(1), 21-31.
- Taverniers, I., Loose, M. D., & Bockstaele, E. V. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory, II: analytical method validation and quality assurance. *Trends in quality in the analytical l.*, 23(8), 535 - 552.
- Tekin, M., Babacan, U., Batu, O., Akar, T., & Cengiz, M. F. (2022). The effects of genotypic variation in hulled wheat species and cooking methods on some quality parameters of bulgur. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(6), e15979.
- Tekin, M., Cengiz, M. F., Abbasov, M., Aksoy, A., Canci, H., & Akar, T. (2018). Comparison of some mineral nutrients and vitamins in advanced hulled wheat lines. *Cereal Chemistry*, 95(3), 436-444. doi:10.1002/cche.10045
- TGK. (2002a). TGK-MAKARNA TEBLİĞİ (Tebliğ No: 2002/20) Retrieved from https://www.etuder.org.tr/wp-content/uploads/etudermevzuatlar/tebligler/2002-20_makarna.pdf
- TGK. (2002b). TÜRK GIDA KODEKSİ İRMİK TEBLİĞİ 2002/21. Retrieved from https://www.etuder.org.tr/wp-content/uploads/etudermevzuatlar/tebligler/2002-21_irmik.pdf
- TGK. (2012). TÜRK GIDA KODEKSİ EKMEK VE EKMEK ÇEŞİTLERİ TEBLİĞİ 2012/2. Retrieved from <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2012/01/20120104-6.htm>
- TGK. (2016). TÜRK GIDA KODEKSİ BULGUR TEBLİĞİ (TEBLİĞ NO: 2016/49). Retrieved from <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2017/01/20170126M1-7.htm>
- Tian, W., Chen, G., Gui, Y., Zhang, G., & Li, Y. (2021). Rapid quantification of total phenolics and ferulic acid in whole wheat using UV–Vis spectrophotometry. *Food Control*, 123, 107691.
- Tilay, A., Bule, M., Kishenkumar, J., & Annapure, U. (2008). Preparation of Ferulic Acid from Agricultural Wastes: Its Improved Extraction and Purification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7644-7648. doi:10.1021/jf801536t
- Topakas, E., Vafiadi, C., & Christakopoulos, P. (2007). Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. *Process Biochemistry*, 42(4), 497-509.
- Tyśkiewicz, K., Konkol, M., & Rój, E. (2018). The application of supercritical fluid extraction in phenolic compounds isolation from natural plant materials. *Molecules*, 23(10), 2625.

- USDA. (2021). <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/2003589/nutrients>. Retrieved from <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/2003589/nutrients>
- USDA. (2022). <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/169721/nutrients>. Retrieved from <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/169721/nutrients>
- USDA. (2023). USDA Natural Resources Conservation Service 2023 Classification of Wheat. *USDA Natural Resources Conservation Service 2023* Retrieved from <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=TRAE&displ>
- van den Berg, R., Haenen, G. R., van den Berg, H., & Bast, A. (1999). Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, 66(4), 511-517.
- Venske, E., dos Santos, R. S., Busanello, C., Gustafson, P., & Costa de Oliveira, A. (2019). Bread wheat: a role model for plant domestication and breeding. *Hereditas*, 156(1), 16. doi:10.1186/s41065-019-0093-9
- Vogt, R. L., & Dippold, L. (2005). Escherichia Coli O157:H7 Outbreak Associated with Consumption of Ground Beef, June–July 2002. *Public Health Reports*, 120(2), 174-178. doi:10.1177/003335490512000211
- Weiss, E., & Zohary, D. (2011). The Neolithic Southwest Asian founder crops: their biology and archaeobotany. *Current Anthropology*, 52(S4), S237-S254.
- Wu, H., Li, H., Xue, Y., Luo, G., Gan, L., Liu, J., . . . Long, M. (2017). High efficiency co-production of ferulic acid and xylooligosaccharides from wheat bran by recombinant xylanase and feruloyl esterase. *Biochemical Engineering Journal*, 120, 41-48.
- Xie, J.-J., Lu, J., Qian, Z.-M., Yu, Y., Duan, J.-A., & Li, S.-P. (2009). Optimization and comparison of five methods for extraction of coniferyl ferulate from *Angelica sinensis*. *Molecules*, 14(1), 555-565.
- Yang, G. W., Jiang, J. S., & Lu, W. Q. (2015). Ferulic Acid Exerts Anti-Angiogenic and Anti-Tumor Activity by Targeting Fibroblast Growth Factor Receptor 1-Mediated Angiogenesis. *Int J Mol Sci*, 16(10), 24011-24031. doi:10.3390/ijms161024011
- Yang, J., Chen, J., Hao, Y., & Liu, Y. (2021). Identification of the DPPH radical scavenging reaction adducts of ferulic acid and sinapic acid and their structure-antioxidant activity relationship. *LWT*, 146, 111411. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111411>
- Yang, T. K. B. B. O. F. (2001). Studies on germination conditions and antioxidant contents of wheat grain. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 52(4), 319-330. doi:10.1080/09637480120057567

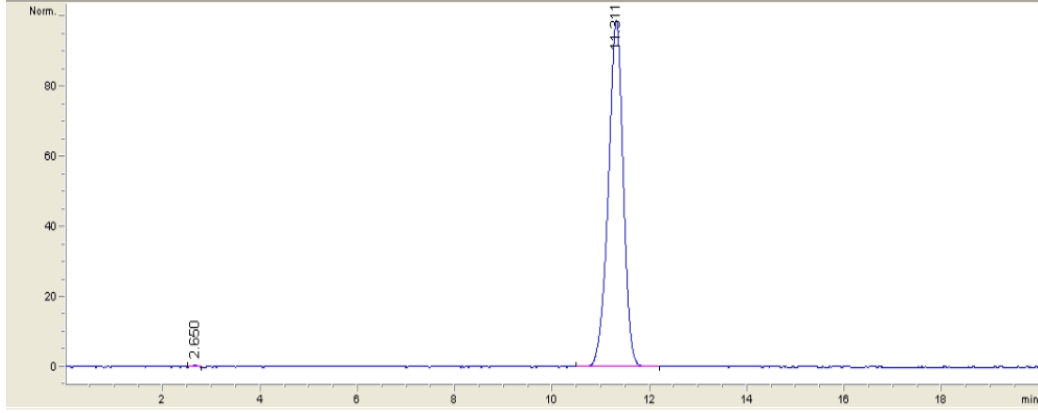
- Yao, W., Gong, Y., Li, L., Hu, X., & You, L. (2022). The effects of dietary fibers from rice bran and wheat bran on gut microbiota: An overview. *Food Chemistry: X*, 13, 100252. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100252>
- Yilmaz, V. A. (2019). Effects of different cooking and drying methods on phenolic acids, carotenoids, and antioxidant activity of emmer (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccum*) bulgur. *Cereal Chemistry*, 96(6), 1093-1102.
- Yoon, H. S., Lee, N.-H., Hyun, C.-G., & Shin, D.-B. (2015). Differential effects of methoxylated p-coumaric acids on melanoma in B16/F10 cells. *Preventive Nutrition and Food Science*, 20(1), 73.
- Yoshida, G. J., Fuchimoto, Y., Osumi, T., Shimada, H., Hosaka, S., Morioka, H., . . . Kuroda, T. (2012). Li-Fraumeni syndrome with simultaneous osteosarcoma and liver cancer: increased expression of a CD44 variant isoform after chemotherapy. *BMC cancer*, 12(1), 1-5.
- Yoshida, G. J., & Saya, H. (2014). Inversed relationship between CD44 variant and c-Myc due to oxidative stress-induced canonical Wnt activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(2), 622-627.
- Young, I., & Woodside, J. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 54(3), 176-186.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., & Qian, M. (2002). Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1619-1624.
- Zdunska, K., Dana, A., Kolodziejczak, A., & Rotsztejn, H. (2018). Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application. *Skin Pharmacol Physiol*, 31(6), 332-336. doi:10.1159/000491755
- Zhang, X.-d., Wu, Q., & Yang, S.-h. (2017). Ferulic acid promoting apoptosis in human osteosarcoma cell lines. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 33(1), 127.
- Zhang, X.-j., Cui, Z.-h., Zhao, Y.-x., He, T.-t., Wang, L., & Liang, X.-w. (2021). Ferulic acid ameliorates isoproterenol-induced heart failure by decreasing oxidative stress and inhibiting cardiocyte apoptosis via activating Nrf2 signaling pathway in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 44(3), 396-403.
- Zhang, Z., Wei, T., Hou, J., Li, G., Yu, S., & Xin, W. (2003). Iron-induced oxidative damage and apoptosis in cerebellar granule cells: attenuation by tetramethylpyrazine and ferulic acid. *European Journal of Pharmacology*, 467(1-3), 41-47.
- Zhao, S., Yao, S., Ou, S., Lin, J., Wang, Y., Peng, X., . . . Yu, B. (2014). Preparation of ferulic acid from corn bran: Its improved extraction and purification by membrane separation. *Food and Bioprocess Processing*, 92(3), 309-313. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.09.004>

- Zhao, Z., & Moghadasian, M. H. (2008). Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry*, 109(4), 691-702.
- Zohary, D., & Hopf, M. (2000). *Domestication of plants in the Old World: The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley*: Oxford university press.
- Zohary, D., Hopf, M., & Weiss, E. (2012). *Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin*: Oxford University Press.

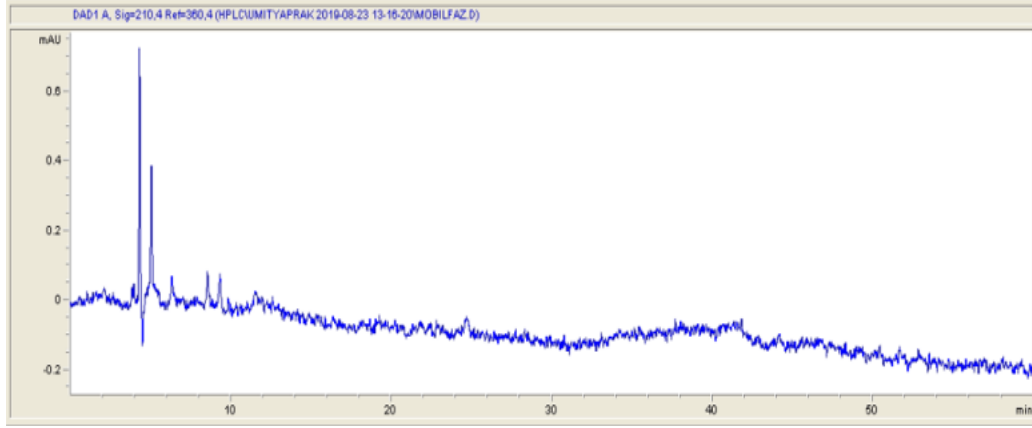


7. EKLER

EK.7.1. Ferülik asit analitik standart piki ve mobil faz piki

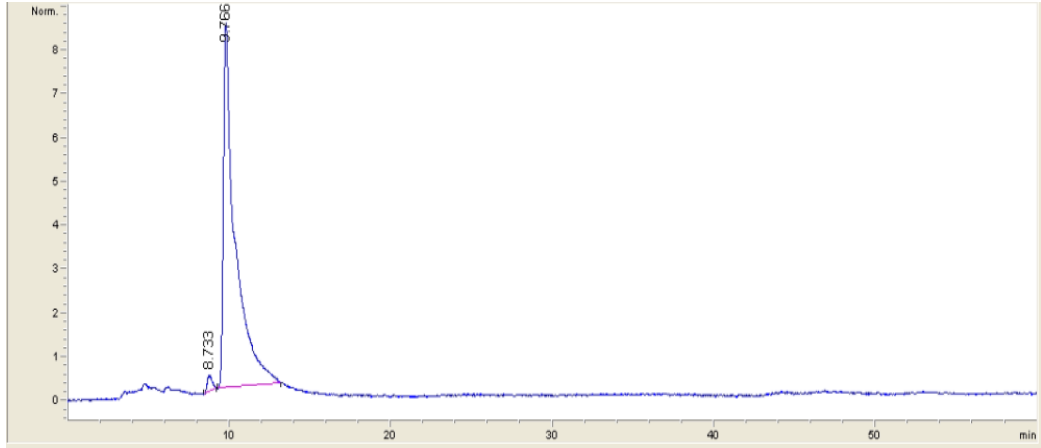


Ferülik asidin analitik standardının (50 ppm) kromatogramı

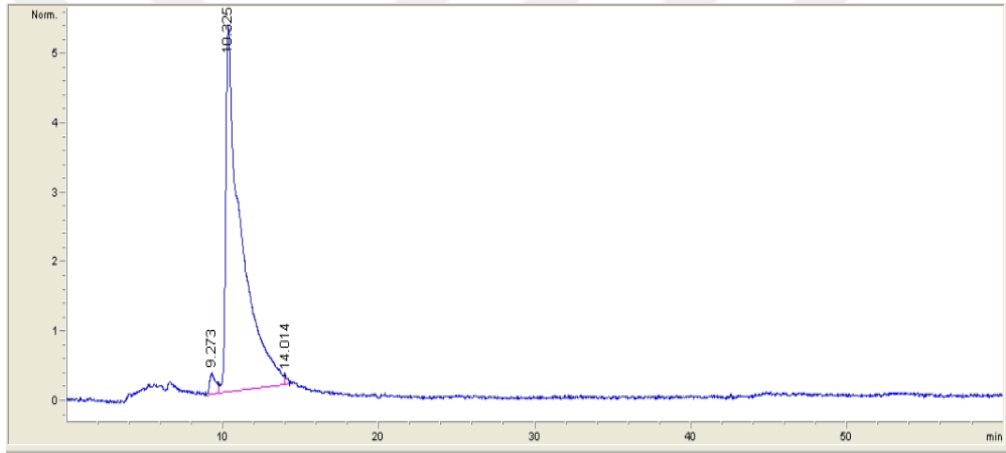


Ferülik asit analizlerinde kullanılan HPLC cihazının mobil fazına ait olan kromatogram

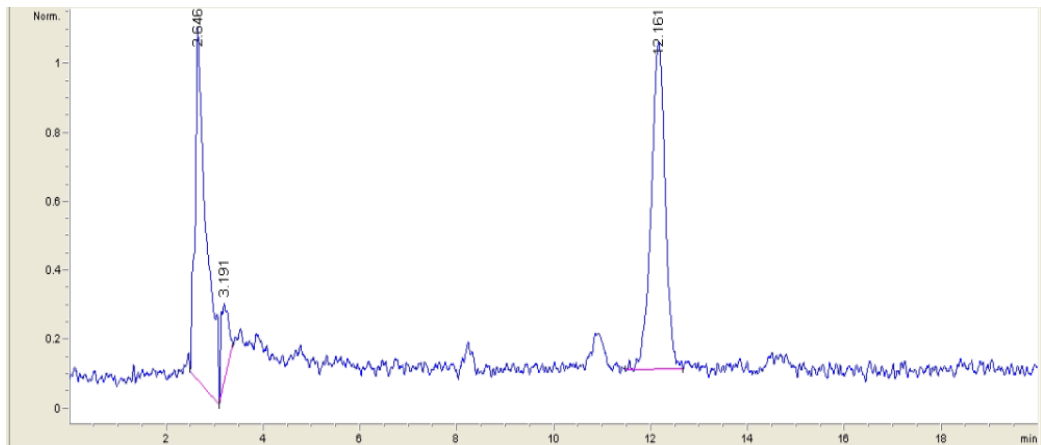
EK.7.2. Tez çalışması kapsamında analiz edilen fonksiyonel gıdalara ait pikler



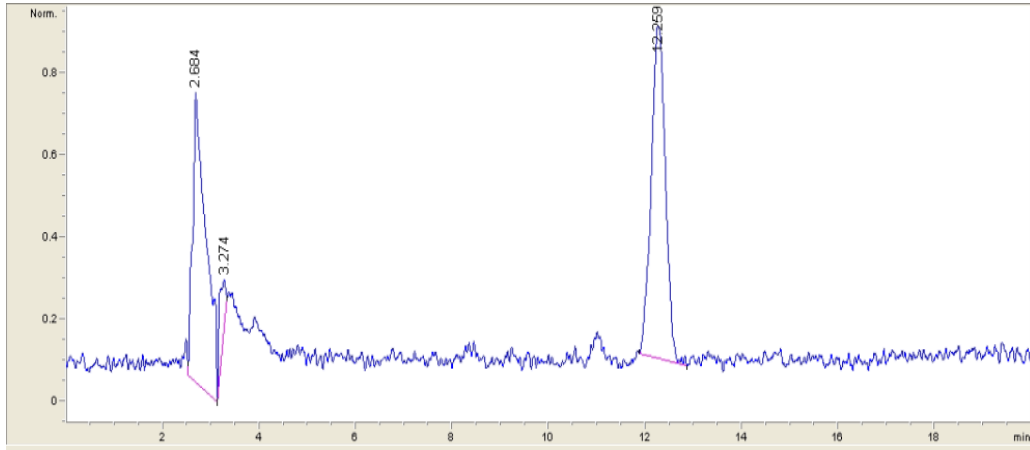
Gernik buğday hattından elde edilen kepekte bulunan ferülik asit piki



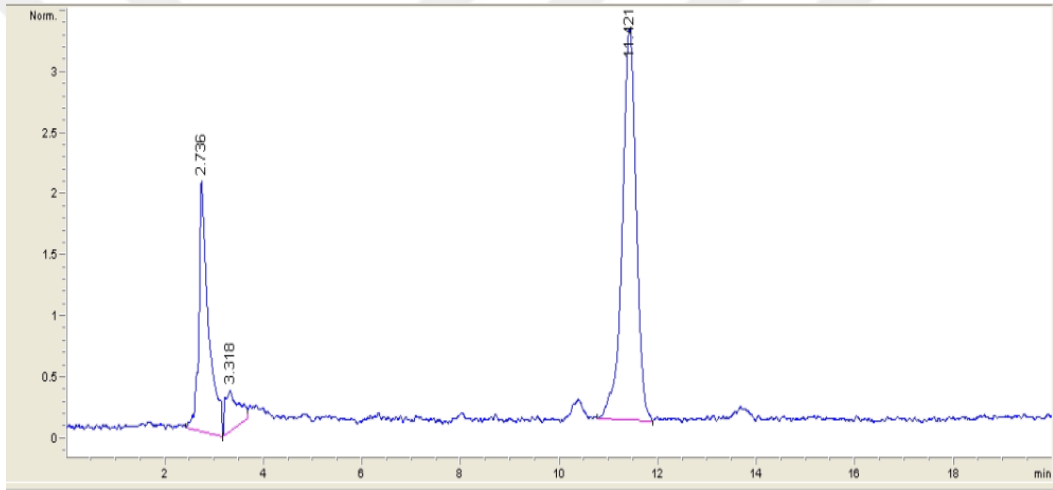
Siyez buğday hattından elde edilen kepekte bulunan ferülik asit piki



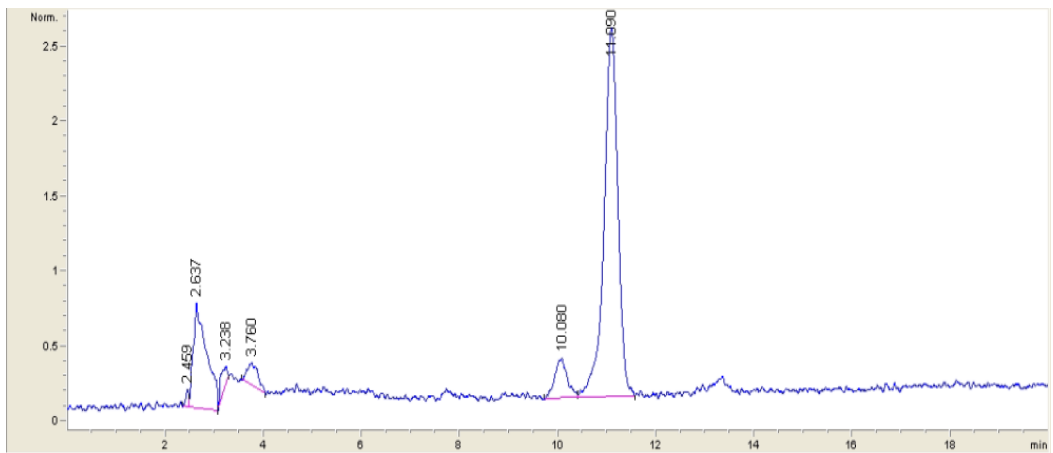
Gernik buğdayından elde edilen ekmekte bulunan ferülik asit piki



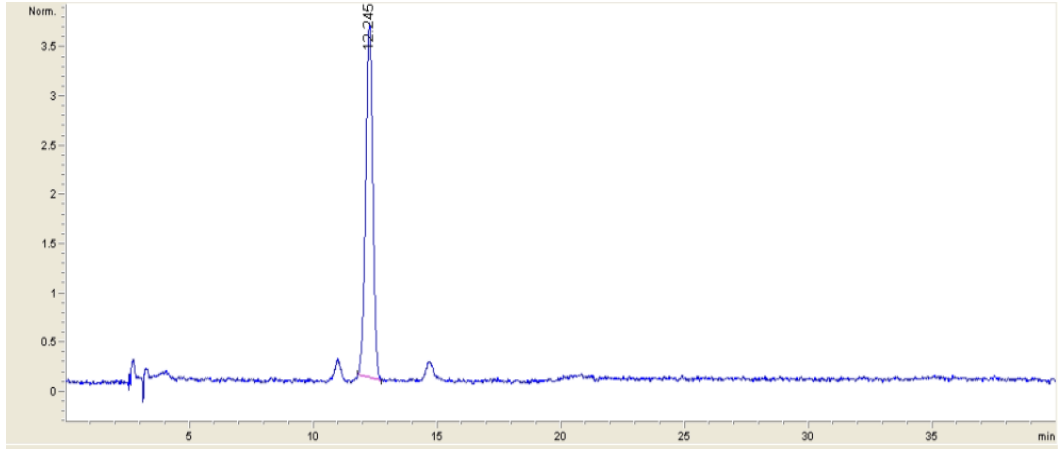
Siyez buğdayından elde edilen ekmekte bulunan ferülik asit piki



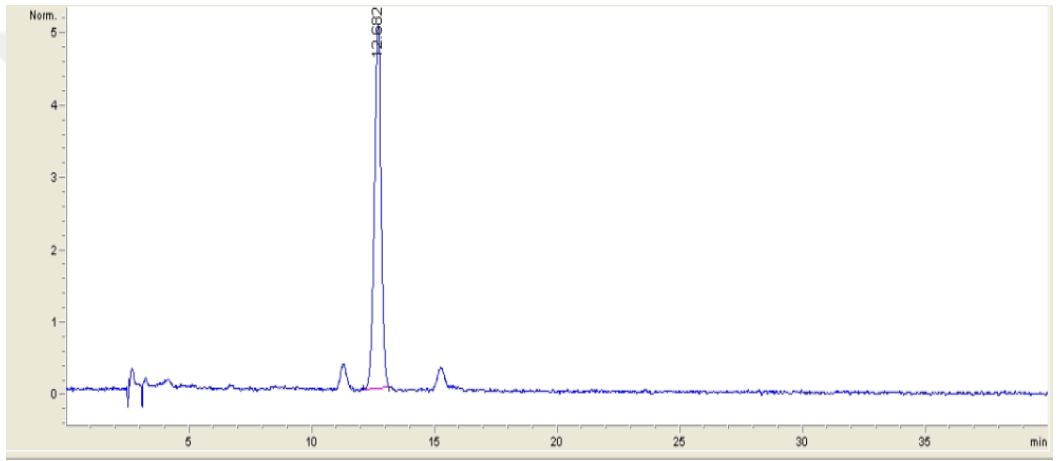
Gernik buğdayından elde edilen kepekli ekmekte bulunan ferülik asit piki



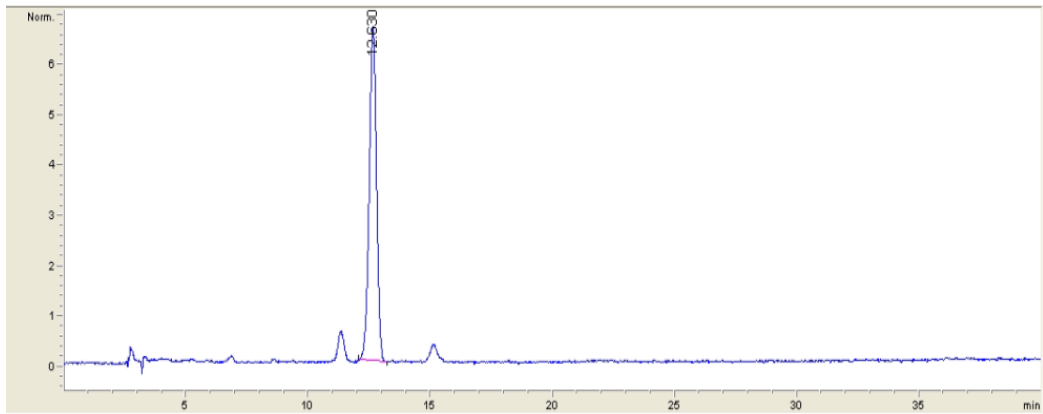
Siyez buğdayından elde edilen kepekli ekmekte bulunan ferülik asit piki



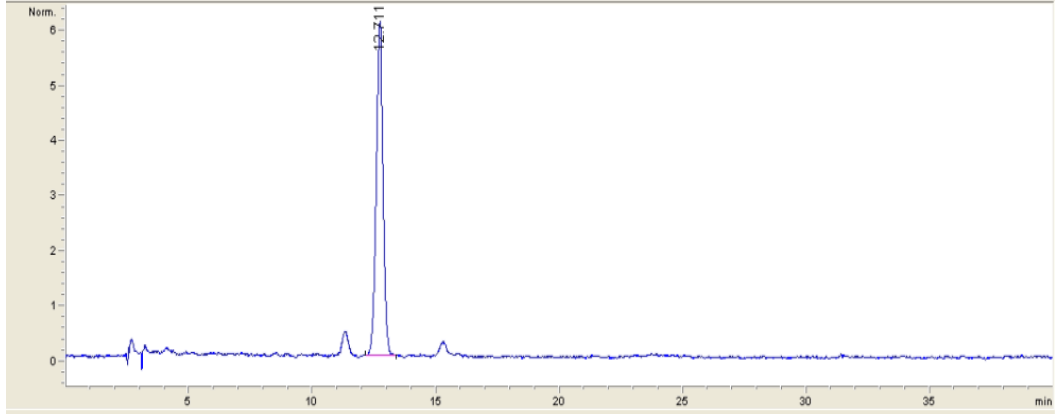
Gernik buğdayından elde edilen bulgurda bulunan ferülik asit piki



Siyez buğdayından elde edilen bulgurda bulunan ferülik asit piki

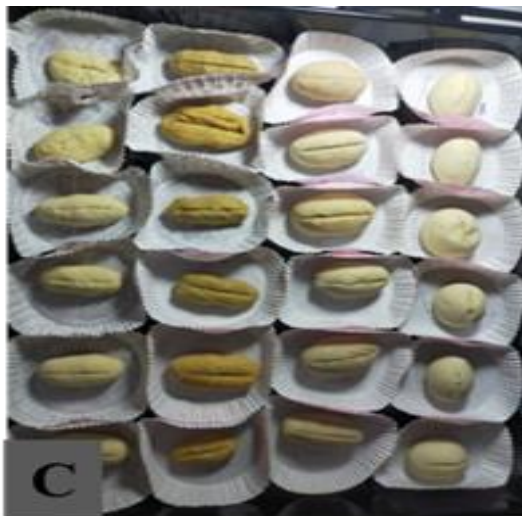
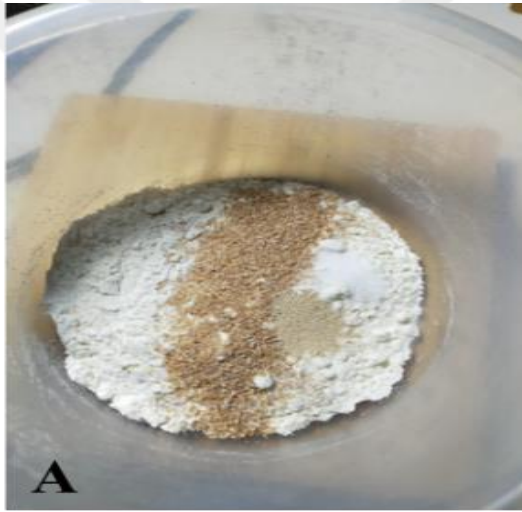


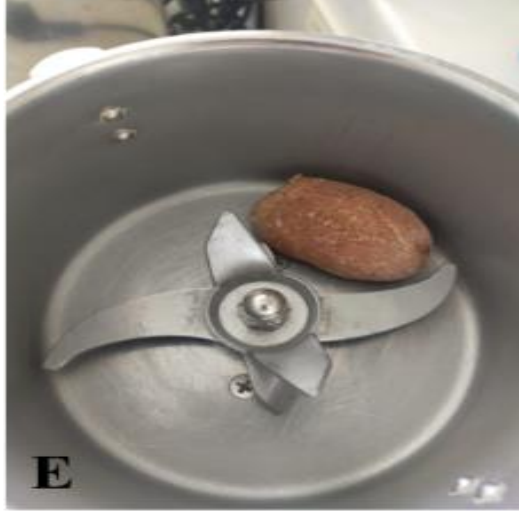
Gernik buğdayından elde edilen ırmikte bulunan ferülik asit piki

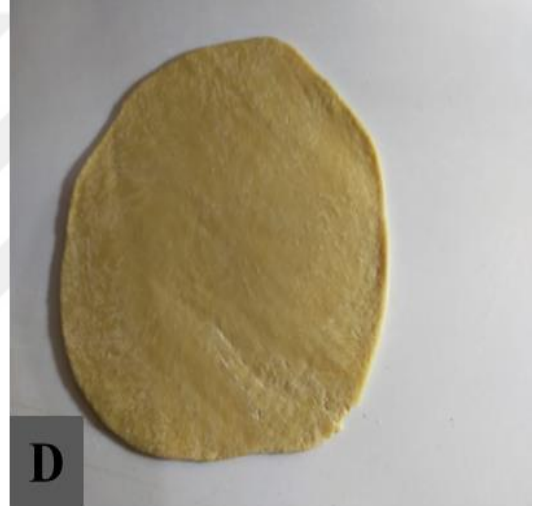
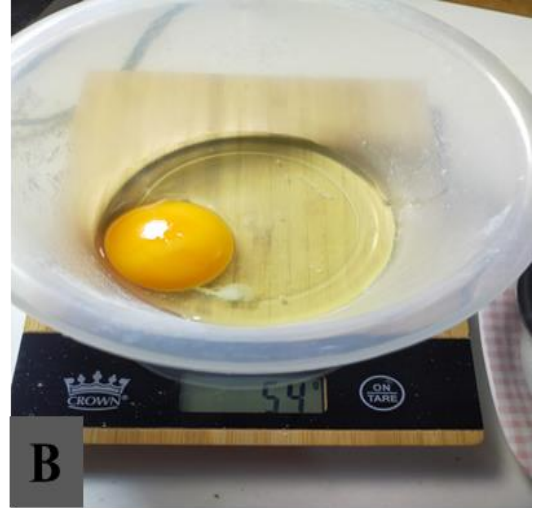


Siyez buğdayından elde edilen irmikte bulunan ferülik asit piki

EK.7.3. Fonksiyonel gıdaların elde edilme aşamalarına ait görseller



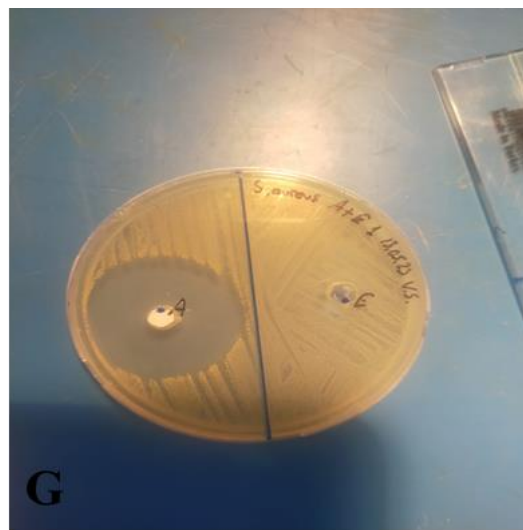
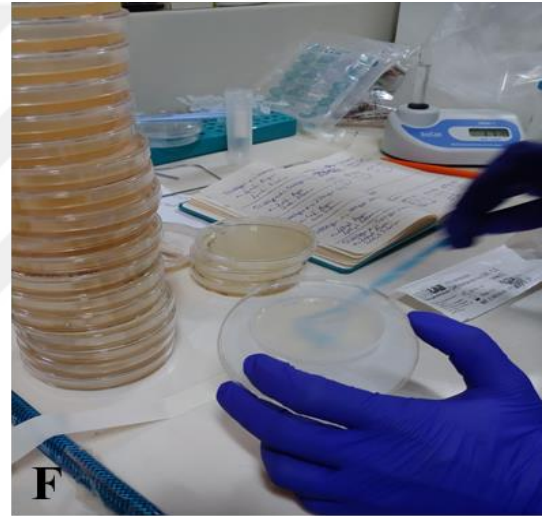
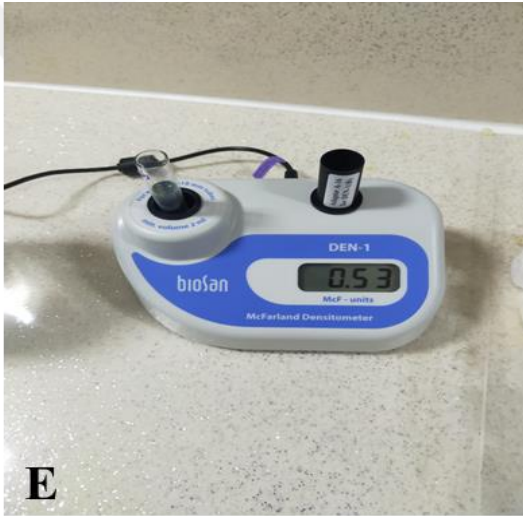
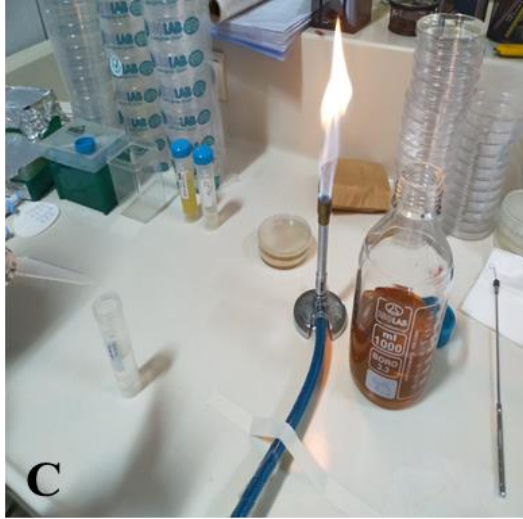


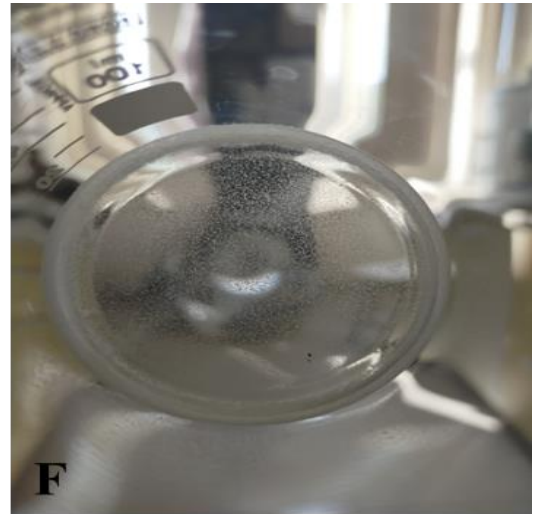
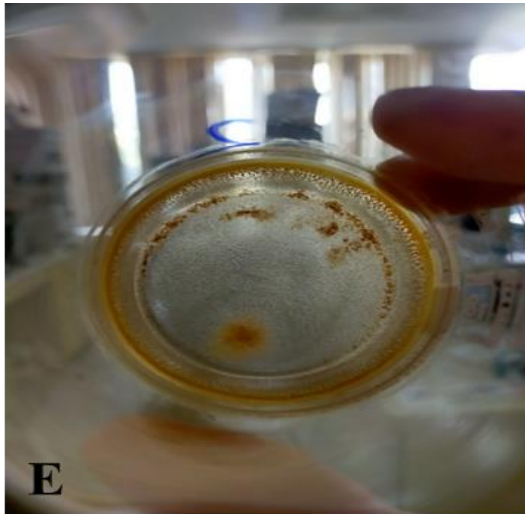
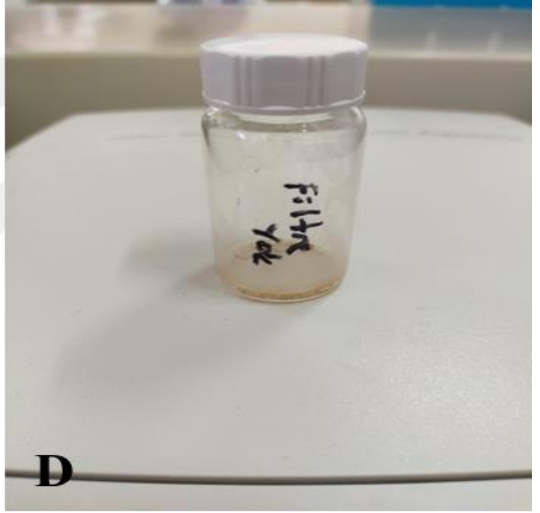
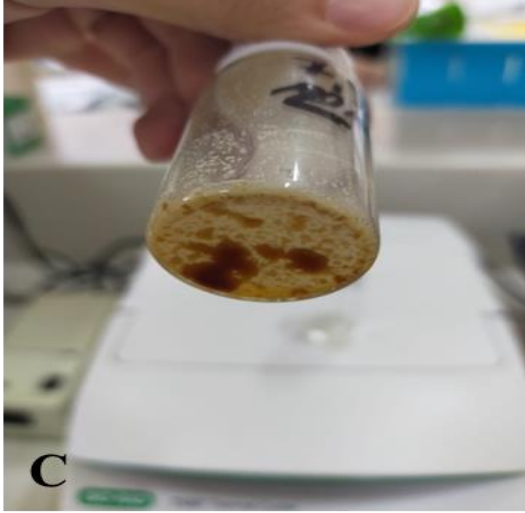
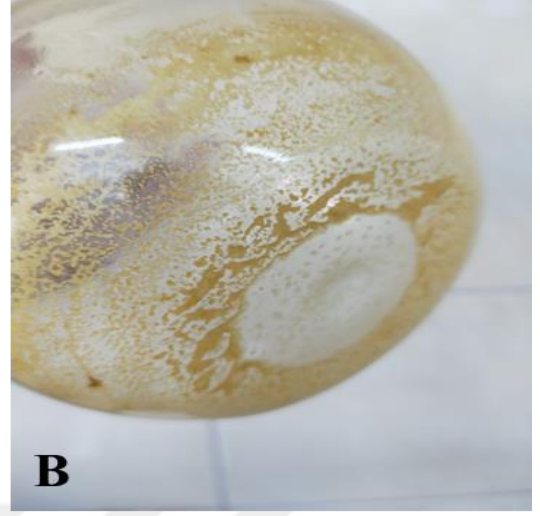


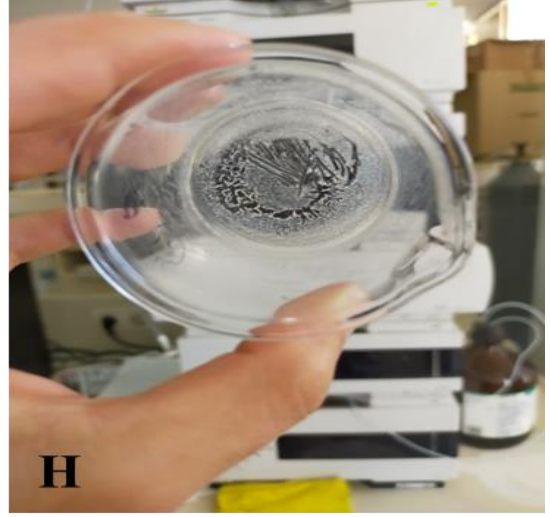
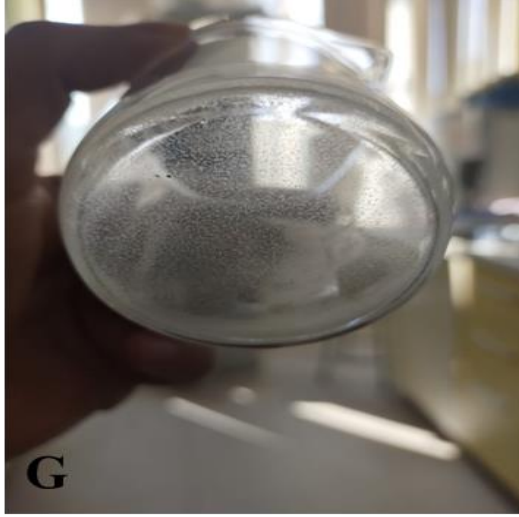


EK.7.4. Antimikrobiyal duyarlılık testlerine ait görseller





EK.7.5. Ferulik asidin saflaştırma aşamasında elde edilen diğer verilere ait görseller



ÖZGEÇMİŞ

Ümit BABACAN

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2018-2024	AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ A.B.D. BİYOTEKNOLOJİ (DR) ANTALYA
Yüksek Lisans 2014-2017	ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MİKROBİYOLOJİ A.B.D. MİKROBİYOLOJİ AYDIN
Lisans 2010-2014	ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ PR, AYDIN

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. MF Cengiz, U **Babacan**, E Akinci, S Tuncer Kesci, A Kaba 2021, *Extraction of phenolic acids from ancient wheat bran samples by ultrasound application* Journal of Chemical Technology & Biotechnology 96 (1), 134-141
2. Ü. **BABACAN**, Determination, solvent extraction, and purification of artemisinin from *Artemisia annua* L., Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 2021, 2214-7861, 28, 28, 100363.
3. Ü. **BABACAN**, A. KABA, F. AKÇAKALE, M. F. CENGİZ & E. AKINCI, Optimization of some parametric values of MTT for the determination of human melanoma (SK-Mel-30) cell viability, International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2021, 1449-2288, 5, 1, 9-20.
4. M. TEKİN, Ü. **BABACAN**, O. BATU, T. AKAR & M. F. CENGİZ, The effects of genotypic variation in hulled wheat species and cooking methods on some quality parameters of bulgur, Journal of Food Processing and Preservation, 2021, 1745-4549, 46, 2, e15979.
5. H. HALİL BIYIK, Ü. **BABACAN**, E. P. ÇOBAN, B. TÖRÜN, Z. ERÇİN & N. AYDIN, Investigation of Antimicrobial Effect by Improving Various Compounds in *Padina pavonica* (Aydın, Turkey), Journal of Applied Biological Sciences, 2019, 2146-0108, 11, 3, 33-38

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. **Ü. BABACAN**, Purification of Ferulic Acid from Wheat Bran, Poster Sunumu, 9th The International Drug Chemistry Congress, 08 Nisan 2022, 11 Nisan 2022.

2. **Ü. BABACAN**, M. H. M. A. BAYATİ, M. BOUALİ & M. F. CENGİZ, Determination of optimum extraction parameters of supercritical fluid carbon dioxide extractor for the extraction of Clove (*Syzygium aromaticum*), Thyme (*Thymus vulgaris*) Lavender (*Lavandula L.*) Sage (*Salvia officinalis*), Poster Sunumu, The International 10th Drug Chemistry Congress, 10 Mart 2022, 13 Mart 2022.

3. **Ü. BABACAN**, M. BOUALİ, E. GÜLMEZ, M. H. M. A. BAYATİ & M. F. CENGİZ, Effects of Cannabis sativa L. extract obtained by supercritical fluid carbon dioxide extraction method on A549 and SKMEL30 cell lines, Poster Sunumu, The International 10th Drug Chemistry Congress, 10 Mart 2022, 13 Mart 2022.

4. **Ü. BABACAN**, M. BOUALİ, M. H. M. A. BAYATİ & M. F. CENGİZ, Investigation of the effects of extracts obtained from 4 different plants on A549 and SK-MEL30 cells using a supercritical carbon dioxide extractor, Poster Sunumu, The International 10th Drug Chemistry Congress, 10 Mart 2022, 13 Mart 2022.

5. **Ü. BABACAN**, Effects of Different Cooking Methods on Quality of Bulgur Produced from Emmer and Einkorn Lines, Sözlü Sunum, 2ND INTERNATIONAL VIRTUAL CONFERENCE ON RAW MATERIALS TO PROCESSED FOODS, 03 Haziran 2021, 04 Haziran 2021.

6. **Ü. BABACAN**, Evaluation of plant ingredients obtained from cannabis species for use as food additives, Sözlü Sunum, 2ND INTERNATIONAL VIRTUAL CONFERENCE ON RAW MATERIALS TO PROCESSED FOODS, 03 Haziran 2021, 04 Haziran 2021.

7. **Ü. BABACAN**, Antimicrobial Activity of Various Precious Oils, Poster Sunumu, 9th The International Drug Chemistry Congress, 08 Nisan 2021, 11 Nisan 2021.

8. **Ü. BABACAN**, S. KEŞÇİ, E. GÜLMEZ & M. F. CENGİZ, A Sensitive Determination of Cannabidiol (CBD) by HPLC, Poster Sunumu, 8th INTERNATIONAL DRUG CHEMISTRY CONGRESS, 27 Şubat 2020, 01 Mart 2020.

9. Ü. BABACAN, E. AKINCI, A. KABA, F. AKÇAKALE KABA & M. F. CENGİZ, Cell Viability Effects of Ferulic Acid on Melanoma Cell Line (SK-MEL-30), Poster Sunumu, 8th INTERNATIONAL DRUG CHEMISTRY CONGRESS, 27 Şubat 2020, 01 Mart 2020.

10. Ü. BABACAN, E. AKINCI, S. KEŞÇİ, A. KABA, M. F. CENGİZ & T. AKAR, Variations of Ferulic Acid in Traditional Turkish Wheat Species, Poster Sunumu, 8th Drug Chemistry Conference, 27 Şubat 2020, 01 Mart 2020.

11. Ü. BABACAN, G. ÖZÇOLPAN & N. AYDIN, Padina pavonica'nın antifungal etkinliğinin araştırılması, Poster Sunumu, 4. ULUSAL KLİNİK MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ, 08 Kasım 2017, 12 Kasım 2017.

PROJELER

1. 1512 BİGG İKİNCİ AŞAMA, PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ, DOĞAL NEMLENDİRİCİ İÇEREN UV KORUYUCULUĞA SAHİP EL DEZENFEKTANI, Yürütülen Kurusu's: PALİNDROMİCS ARGE YAZILIM SANAYİ VE TİCARET LİMİTED ŞİRKETİ, Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK BAŞKANLIK (Yurt İçi) (Devam ediyor).

2. ANSİAD 21. 'Girişimcilik Günleri' kapsamında Habitat Derneği iş birliğiyle ve "Güvenli Yaşam İçin Sürdürülebilir Yeni Nesil Teknolojiler" teması ile gerçekleştirilen #Bidüşünsenbulursun 11. İş Fikri Yarışmasında birincilik ödülü

PATENTLER

1. Süperkritik akışkan özütlemesi yöntemi ile karanfil, lavanta, kekik, Citrus, gibi değerli bitkilerden elde edilen özütler kullanılarak buğday kepeğinden elde edilen ferulik asit ile cilt dostu el dezenfektanı üretimi, Buluş, patojen mikroorganizma gruplarından (bakteri, mantar ve virüs) etkili olup, ayrıca cilt nemlendirici ve yüzey temizleyicisi olarak kullanılan ürünler ile ilgilidir.

Patent Başvurusu, Uluslararası (PCT), Başvuru No: 2022/004872, 29 Mart 2022

2. Endüstriyel kenevir bitkisinden kannabidiol (CBD) saflaştırması, Patent başvurusu yapılmıştır.