

Gama-orizanol

Neşe Yılmaz Tuncel ✉

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Çanakkale

Geliş Tarihi (Received): 15.05.2014, Kabul Tarihi (Accepted): 10.01.2015

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): neseyilmaz@comu.edu.tr (N. Yılmaz Tuncel)

☎ 0 286 218 00 18 / 22 71 📠 0 286 218 05 41

ÖZ

Gama-orizanol önemli bir biyoaktif madde olup, temel kaynağı pirinç kepeğidir. Bu makalede gama-orizanolün yapısı, kaynakları, fizyolojik etkileri, kullanım alanları, tayin metotları, işleme metotlarının etkisi ve toksisitesine ait bilgiler derlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Gama-orizanol, Pirinç kepeği, Steril ferulat, Fitosterol

Gamma-oryzanol

ABSTRACT

Gamma-oryzanol is an important bioactive compound, and its main source is rice bran. In this study, the chemical structure, sources, physiological effects, uses and toxicity of gamma-oryzanol, the methods of its determination and effect of processing on gamma-oryzanol were reviewed.

Keywords: Gamma-oryzanol, Rice bran, Steryl ferulate, Phytosterol

GİRİŞ

Gama-orizanol ilk defa pirinç kepeği yağının sabunlaşmayan kısmından elde edilmiş [1], ismini de elde edildiği kaynak (*Oryza sativa L.*) ve bir hidroksil grubu içermesi dolayısıyla almıştır. Önceleri tek bir madde olduğu düşünülen orizanolün, sterollerin (kampesterol, stigmasterol, β -sitosterol) hidroksil gruplarının esterleşmesi ile oluşan steril ferulatların veya triterpen alkollerin (sikloartanol, sikloartenol, 24-metilsikloartenol, siklobranol), ferulik asidin karboksilik asit grubu ile birleşmesinden oluşan kompleks bir bileşik olduğu ve pek çok bileşen barındırdığı sonradan anlaşılmıştır [2, 3]. Kompozisyonuna göre alfa, beta ve gama olmak üzere ayrılan orizanolün, en iyi karakterize edilen ve üzerinde en çok durulan formu gama-orizanol olup, özellikle pirinçte bulunan tüm fitosteril ferulatlar için genel bir isim olarak kullanılmaktadır [4].

GAMA-ORİZANOL'ÜN YAPISI ve KAYNAKLARI

Bugüne kadar gama-orizanolün en az 25 bileşeni tanımlanmış olmakla birlikte bunlardan 5 tanesi toplam gama-orizanolün yaklaşık %95'ini oluşturmaktadır. Bu bileşenler; 24-metilsikloartenil ferulat (%34-44), sikloartenil ferulat (%19-26), kampesteril ferulat (%15-23), β -sitosteril ferulate (%7-17) ve stigmasteril ferulat (%1-7) [5]. Sterollerin ferulik asit esterleri olan steril ferulatlar; pirinç, çavdar, mısır, arpa, tritikale ve buğday gibi çeşitli tahıllarda bulunmaktadır [6-8]. Pirinçte bulunan steril ferulatların diğer tahıllarda bulunanlardan en önemli farkı, pirinçte bulunan ve gama-orizanol olarak bilinen steril ferulat karışımının sikloartenol ve 24-metilsikloartenol gibi dimetilsterol gruplarına; diğer tahıl kaynaklarında bulunan sitosterol ve kampesterol gibi desmetilsterol gruplarına kıyasla daha zengin olmasıdır. Desmetilsterollerin C4 noktasında metil grubu bulunmazken, dimetilsterollerde 2 metil grubu bulunmaktadır [9].

Pirinç kepeği yağındaki gama-orizanol miktarı çeşit ve tayin için kullanılan analitik metoda bağlı olarak %1-3 arasında değişkenlik göstermektedir [10]. Pirinç kepeği yağının sabunlaşmayan madde miktarının yaklaşık %20'sini gama-orizanol oluşturmaktadır [11]. Yoshie ve ark. (2009) pirinç kepeği yağında %1.4-2.9 arasında, mısır yağında ise %0.5 civarında gama-orizanol bulunduğunu, bununla birlikte soya fasülyesi, kanola, palm ve pamuk yağlarında gama-orizanol bulunmadığını belirtmişlerdir [12].

Miller ve Engel [8], Avrupa'nın çeşitli bölgelerinde yetişmiş kahverengi pirinçleri kompozisyon bakımından incelemiş ve tüm örneklerde sikloartenil ferulat ile 24-metilensikloartenil ferulat bileşenlerinin baskın olduğunu ancak gama-orizanol miktarı ile steril ferulatların kompozisyonu arasında bir korelasyon tespit edilemediğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte, yine tüm örneklerde kampesteril ferulat, kampestanil ferulat ve β -sitosteril ferulatın söz konusu diğer 2 bileşene kıyasla daha az miktarda bulunduğu belirtilmektedir. Araştırmacılar, incelenen tüm örneklerde bireysel olarak steril ferulat miktarının yüksek derecede varyasyon gösterdiğini, ancak 4,4-dimetilsteril ferulatların (sikloartenil ferulat, 24-metilensikloartenil ferulat) toplamı ile 4-desmetil steril ferulatların (kampesteril ferulat, kampestanil ferulat ve β -sitosteril ferulat) toplamının neredeyse tüm örneklerde benzer aralıkta olduğu gözlemlenmiş ve sırasıyla %68-76 ile %24-32 oranında bulunduğunu tespit etmiştir. [8]. Lerma-Garcia ve ark. [13] da en baskın gama-orizanol bileşeninin 24-metilensikloartenil ferulat olduğunu bildirmiştir.

Pirinç kepeğindeki gama-orizanol miktarının hem genetik hem de çevresel faktörlerden etkilendiği tespit edilmiştir [13]. Heinemann ve ark. [14], 10'u *japonica* ve 22'si *indica* çeşidinin alt türleri olmak üzere Brezilya'da yetişen 32 örnekte gama-orizanol miktarının genotipten önemli derecede etkilendiğini belirtmişlerdir ($P<0.05$). Miller ve Engel [8] ise aynı sezonda İtalya ve İspanya'da yetişen aynı çeltik çeşidinden İtalya'da yetişenin daha yüksek gama-orizanol içeriğine sahip olduğunu, ayrıca, İtalya'da 2000 ve 2001 yıllarında ekilen aynı çeşit çeltiklerin gama-orizanol miktarlarının da birbirinden farklı olduğunu tespit etmiştir ($P<0.05$). Mandak ve Nyström [15], *Basmati* çeşidi için, Hindistan'da yetişen çeltiğin Pakistan'da yetişen çeltiğe göre 3 kat daha fazla gama-orizanol içerdiğini bildirmişlerdir. Diğer yandan, araştırmacılar *Jasmine* çeşidi için, yetiştirme bölgesinin gama-orizanol miktarı bakımından bir farklılığa neden olmadığını gözlemlenmiştir. Britz ve ark. [16], çeltiğin büyüme sıcaklığı arttığında özellikle 24-metilensikloartenil ferulat ve daha az olmakla beraber sikloartenil ferulat bileşenlerinin miktarında önemli bir artış olduğunu tespit etmişlerdir ($P<0.05$).

Çeltikteki gama-orizanol miktarının tane yapısına (kısa, orta ve uzun taneli) göre önemli bir değişim göstermediği bildirilmiştir [8, 15]. Yu ve ark., [3] pirinç kepeğindeki gama-orizanol miktarının, pirinç embriyosundakinden 5 kat daha fazla olduğunu; bununla birlikte E vitamini için durumun tam tersi olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, çeltik kırma işlemi esnasında ayrılan olmamış yeşil taneler ile olgunlaşmış

kahverengi pirinç arasında gama-orizanol miktarı arasında önemli bir farklılık bulunmadığı tespit edilmiştir ($P>0.05$) [8, 17]. Cho ve ark. [18] ise organik olarak yetiştirilen çeltiklerin gama-orizanol miktarını, geleneksel metotlarla yetiştirilenlere kıyasla daha yüksek (50 ppm) bulduklarını ($P<0.05$) ancak; bu farkın pratikte önemsenecek kadar büyük olmadığını ve gama-orizanol miktarı çok sayıda çevresel faktöre bağlı olduğundan bu sonucun genellenemeyeceğini belirtmişlerdir. Tuncel ve Yılmaz [17], pirinç kepeği, kahverengi pirinç, fırçalanmamış pirinç (tamamen beyazlatılmamış) ve beyaz pirinçte sırasıyla 3296, 408, 152 ve 26 mg/kg gama-orizanol tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, ayrıca tebeşirli tanede de 12 mg/kg gama-orizanol bulduklarını bildirmişlerdir. Benzer biçimde Mandak ve Nyström [15] de pirinç kepeğindeki gama-orizanol miktarının kahverengi pirinçten 12 kat daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte pirinç kepeği katmanları da farklı düzeyde gama-orizanol içermektedir. Pirinç kepeğinin en dış katmanının gama-orizanol içeriği bakımından en zengin tabaka olduğu belirtilmiştir [19,20].

ÖZELLİKLERİ ve FİZYOLOJİK ETKİLERİ

Gama-orizanolün kolesterol düşürücü [11, 21-23], antioksidan [24-27], trombosit kümeleşmesini azaltıcı [28], sinirsel dengesizlikleri ve menapoz sıkıntılarını azaltıcı [29], kas kütesini artırıcı [30], fekal safra asidi atımını artırıcı [11], tümör büyümesini engelleyici [31] ve UV ışığına karşı koruyucu [32] etkileri rapor edilmiştir.

Steril ferulatların kolesterol düşürücü etkileri, sindirim sırasında bağırsak enzimlerince ve muhtemelen de kolesterol esteraz enzimi tarafından hidrolize edilmesi ve hidroliz sonucu serbest sterollerin açığa çıkarak kolesterol düşürücü olarak davranmalarına dayanmaktadır [15]. Bununla birlikte hidrolizin kapsamı tam olarak açıklanamamış değildir. Farklı sindirim sistemi enzimlerinin (pankreatik enzimler ve farklı kaynaklardan elde edilen kolesterol esterazlar), çeşitli steril ferulat substratlarına karşı affinitesini araştıran *in-vitro* çalışmalar, 4-desmetil sterollerin (C4 pozisyonunda metil grubu taşımayanlar), 4,4-dimetil sterollere (C4 pozisyonunda 3 metil grubu bulunduranlar) göre seçici olarak daha iyi hidrolize edildiğini göstermektedir. Bu nedenle 4-desmetil sterollerin kolesterol düşürücü etkisinin 4,4-dimetil sterollere kıyasla daha fazla olduğu söylenebilir [15]. Berger ve ark. [33] da kolesterol düşürücü etkinin bağırsakta gama-orizanol serbest hale geçen 4-desmetilsterollerden kaynaklandığını belirtmiştir. Genel olarak, serbest sterollerin plazma kolesterolünü, absorpsiyonunu inhibe ederek düşürdüğü kabul edilmektedir. Bu inhibisyon mekanizması ile ilişkili 3 temel teori mevcuttur. Birincisi, serbest sterollerin kolesterol ester hidrolizini bloke etmesi; ikincisi, serbest sterollerin kolesterol ile birlikte çökerek absorbe edilemeyen birleşik kristaller oluşturmaları ve üçüncüsü serbest sterollerin absorpsiyon için kolesterol ile yarışmasıdır. Güncel çalışmalar üçüncü teoriyi destekleyen bulgular içermektedir [15]. Gama-orizanolün kolesterol düşürücü etkisi kompozisyonuna bağlıdır [34]. *In vitro* çalışmalarda pankreatik kolesterol esteraz ve yapay bağırsak suyu ortamında gama-

orizanolden salınan bileşikler arasında β -sitosterol ve kampesterol tespit edilirken sikloartenol ve 24-metilensikloartenol tespit edilememiştir [8].

Steril ferulatların antioksidan aktivite gösterme nedeni ise yapılarındaki ferulik asidin hidrojen verme yeteneği ile ilgilidir [9]. Gama-orizanol bileşenleri, farklı düzeyde antioksidan aktivite gösterdiğinden ayrı ayrı tanımlanmaları önem arz etmektedir. Örneğin 24-metilensikloartenil ferulat, linoleik asidin otoksidasyonuna karşı sikloartenil ferulata kıyasla daha yüksek antioksidan aktivite göstermektedir [8]. Nyström ve ark. [9] da sitosterol ve kampesterol gibi desmetilsterollerin, sikloartenol ve 24-metilensikloartenol gibi dimetilsterollere göre daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Xu ve ark. [35], kolesterolün oksidasyon ürünlerine karşı gösterilen antioksidan aktivite bakımından pirinç kepeğinde bulunan E vitamini ve gama-orizanol bileşenlerini karşılaştırmışlar ve en yüksek antioksidan aktiviteyi 24-metilensikloartenil ferulata gösterdiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bu durumu 24-metilensikloartenil ferulata 24. karbonunda ve iki alkil grubuna bağlı bulunan metilen grubuna atfetmişlerdir. Araştırmacılar, ayrıca, pirinç kepeğindeki baskın vitamin E bileşenleri α -tokoferol, α -tokotrienol, γ -tokoferol ve γ -tokotrienol ile gama-orizanolün baskın bileşenleri olan 24-metilensikloartenil ferulat, sikloartenil ferulat ve kampesterol ferulata karşılaştırmışlar ve söz konusu bu 3 gama-orizanol bileşeni toplamının bahsi geçen tüm E vitamini homologlarından bireysel olarak daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir [35]. Pirinç kepeğindeki gama-orizanol miktarı, toplam E vitamini miktarının yaklaşık 10 katıdır [36-38]. Bu açıdan, pirinç kepeğindeki başat antioksidanın gama-orizanol olduğu söylenebilir [35].

KULLANIM ALANLARI

Pirinç kepeği, yağı ya da doğrudan gama-orizanol belirtilen olumlu etkilerden dolayı pek çok ürün içerisinde çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Tahıl bazıları bazı gıdalar ve margarinlerde kolesterol düşürücü ve antioksidan etkisi sebebiyle, kızartma yağlarına oksidatif stabilitenin artırılması amacıyla, gıda kaplama materyalleri ve bazı ambalaj materyallerine de raf ömrünü arttırmak amacıyla kullanıldığı belirtilmiştir [2]. Gama-orizanolün gıda dışı kullanımları da mevcuttur. Kozmetik amaçlı olarak gama-orizanol içeren ve göz çevresini oksidatif zarara karşı koruyan kremler ve tırnaklardaki renk bozulmalarını önleyen cıllar geliştirilmiştir [32, 38]. Melanin ile ilgili cilt rahatsızlıkları ve kırışıklıkların giderilmesi amacıyla çeşitli kremler ve UV ışınlarına karşı koruyucu ve cilt onarımına yardımcı olduğu gerekçeleriyle kozmetik amaçlı patentli ürünler üretilmiştir [2, 32, 39].

Gama-orizanol suda çözünmez. Gıda, kozmetik ve farmasötik amaçlı kullanımlarında suda çözünebilir olması önem arz ettiğinden bu amaçla pek çok yol denenmiştir. Gama-orizanol, üre, nikotinamid ve/veya aseton ya da etanol-aseton karışımında çözünmüş 'thioctamide' ile muamele edildiğinde suda çözünür özellik kazanmaktadır. Tıbbi içeceklerde ise, suda

çözünürlük, sukroz yağ asidi esterleri ve etilen oksit ile muamele edilmiş HCO ile sağlanmaktadır [32]. Japonya, çeltik üretimi bakımından Çin ve Hindistan gibi ülkelerden çok daha alt sıralarda olmasına ve dünya üretiminin sadece %2'sini karşılmasına rağmen çeltik ürünlerinden pek çok katma değeri yüksek ürün ve nütrosötik üretmektedir [32].

TAYİN METOTLARI

Gama-orizanol ($C_{40}H_{58}O_4$) beyaz veya hafif sarımsı renkte kristal bir toz olup, oda sıcaklığında stabildir [40]. 137.5 ile 138.5°C arasında erime noktasına sahiptir ve 231, 290 ve 315 nm'de UV absorpsiyonu maksimumdur [41]. Suda çözünmez, dietil eter ve n-heptanda zayıf çözünürlük gösterir, kloroformda iyi çözünür [42]. Metilen klorid, aseton, alkol ve petrol eter ve hegzan gibi apolar solventlerde de çözünür [41]. Gama-orizanol tayininde kullanılan en yaygın metot, ters faz likit kromatografi (LC)-UV dedeksiyon [17, 20, 37] olmakla birlikte, normal faz LC-UV dedeksiyon [43] ve spektrofotometrik (UV-VIS) [44-47] metotlar da kullanılmıştır. Gama-orizanolün molar absorpsiyon katsayısı 358.9 olarak belirtilmiştir [45].

Gama-orizanol tayini için kullanılan teknikler genellikle çok adımlı kromatografik teknikler ile bileşenlerinin bireysel olarak gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS), kimyasal iyonizasyon-kütle spektrometresi, nükleer manyetik rezonans ile tanımlanmasını içermektedir. Miller ve Engel [8] ise, gama-orizanol bileşenlerini bireysel olarak tayin etmek için likit kromatografi-gaz kromatografi (LC-GC) tekniğini önermiştir. Normal faz HPLC sisteminde gama-orizanol bileşenlerini ayırmak mümkün değildir, en fazla 2 bileşene kadar ayırım sağlanabilir. Ayırım, ters faz kromatografi ile sağlanabilmektedir [48]. Xu ve Godber [49] gama-orizanolü normal faz preparatif HPLC ile konsantre edip, analitik ters faz HPLC ile bileşenlerine ayırmışlar ve bileşenleri GC-MS ile bireysel olarak tanımlayarak 10 gama-orizanol bileşeni tespit etmişlerdir. Bunlar: Δ^7 -stigmastenil ferulat, stigmasteril ferulat, sikloartenil ferulat, 24-metilensikloartenil ferulat, Δ^7 -kampestenil ferulat, kampesterol ferulat, Δ^7 -sitostenil ferulat, sitosteril ferulat, kompestanil ferulat ve sitostanil ferulattır. Araştırmacılar söz konusu bu 10 bileşenin molekül ağırlıklarının birbirine çok yakın olduğunu ve kromatografik ayırmada molekül ağırlığının alkonma zamanı üzerinde önemli bir etkisi olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca, analitik ters faz kromatografideki ayırımın bileşenlerdeki çift bağların sayısına ve pozisyonuna göre belirlendiğini, bunun çok güçlü bir ilişki olamamakla birlikte polariteyi etkilediği belirtilmiştir. Araştırmacılar, iki çift bağ içeren bileşenlerin alkonma zamanının bir çift bağ içeren veya hiç çift bağ içermeyen bileşenlere göre daha kısa olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca, triterpen yapısının yan zincirinde çift bağ içeren bileşenlerin, triterpen yapısının içerisinde çift bağ içeren bileşenlerden daha kısa sürede elue olduğu da bildirilmiştir [49].

Kimyasal olarak pirinç kepeğinden yağ ekstraksiyonunda genellikle hegzan, kullanılmaktadır [32]. Bununla birlikte gama-orizanolü oluşturan

bileşenler incelendiğinde her birinin ferulat kısmında bir alkol grubu içerdiği görülür ve bu yapının polaritesini arttırır. Bu nedenle, bu bileşenler hegzan ve heptan gibi apolar çözücülerde çözünebildikleri gibi izopropanol ve etil asetat gibi nispeten daha polar çözücülerde de çözünebilirler. Ekstraksiyon çözeltisinin polaritesi, gama-orizanol ekstraksiyonunu önemli derecede etkiler [50]. Doğrudan çözücü ekstraksiyonu yolu ile izopropanol veya izopropanol:hegzan karışımın tek başına hegzana göre daha fazla gama-orizanol ve tokoferol ekstrakte ettiğini; buna karşılık, pirinç kepeği yağı veriminin hegzan ekstraksiyonu ile daha yüksek olduğunu belirtilmiştir [25, 37]. Ayrıca, Chen ve Bergman [37] izopropanol ile ekstrakte ettikleri pirinç kepeği yağının, hegzan ile ekstrakte edilene kıyasla ısı ile oksidasyona daha dayanıklı olduğunu, bunun da izopropanol ile daha fazla antioksidan ekstrakte edilmesinden kaynaklandığını bildirmiştir. Araştırmacılar bu durumun, E vitamini homologlarının kroman halkasındaki ve ferulat esterlerinin benzen halkasındaki hidroksil gruplarının hegzana kıyasla alkolde (izopropanol veya metanol) daha iyi çözümlenmesine atfetmiştir. Araştırmacılar ayrıca, pirinç kepeğinin çeltik kırma esnasında yeterince hücre zararı gördüğüne ve partikül çapının küçüklüğü de göz önüne alınarak daha fazla parçalama veya homojenizasyon işlemi gerekmeksizin doğrudan çözücü ekstraksiyonu ile 1 dakika içerisinde gama-orizanol ve E vitamininin neredeyse tamamının ekstrakte edilebildiğini, ekstraksiyon süresini uzatmanın hedef maddelerin ekstraksiyon verimini arttırmadığını rapor etmiştir [37]. Lilitchan ve ark., [44] gama-orizanolü farklı çözücüler içerisinde çözerek en yüksek absorpsiyon verdiği dalga boyunu incelemiş aralarında büyük bir fark olmadığını tespit etmişlerdir. Kumar ve ark. [51] bilinen miktarda gama-orizanol standardını çeşitli çözücülere doyma noktasına kadar ekleyerek maddenin çözünebilirliğini incelemişler ve çözücülerini bu bakımdan yüksekten düşüğe göre etil metil keton, diklorometan, etil asetat, aseton, izopropanol ve hegzan olarak sıralamışlardır. Bununla birlikte, araştırmacılar düşük çözünürlüğün ekstrakte edilebilirliği etkilemediğini bildirmişlerdir. Ayrıca, Soxhlet ile yapılan ekstraksiyonda geri kazanımın, oda sıcaklığında yapılına kıyasla daha yüksek olduğu da tespit edilmiştir. Aynı araştırmacılar, belirledikleri 4 temel gama-orizanol bileşeninin ekstrakte edilebilirliğini de bireysel olarak değerlendirmişler ve sikloartenil ferulatın, etil metil keton; 24-metilen sikloartenil ferulatın, aseton; kampesteril ferulatın, diklorometan ve β -sitosteril ferulatın da etil asetat çözücülerini ile daha yüksek miktarda ekstrakte edilebildiğini bildirmişlerdir [51]. Diğer yandan, süperkritik-CO₂ ile ekstraksiyonun, en uygun şartlardaki çözücü ekstraksiyonundan dahi önemli düzeyde daha verimli olduğu bildirilmiştir [50, 52]. Saponifikasyon, genel olarak ekstraksiyon işlemlerinde girişim yapan yağların uzaklaştırılmasını sağladığından ekstrakte edilen maddenin saflığını arttırmaktadır. Bununla birlikte, ferulat ve triterpen alkoller arasındaki ester bağı, saponifikasyondaki alkali koşullarda parçalanabileceğinden gama-orizanol ekstraksiyonu için saponifikasyon işlemi önerilmemektedir [49, 50]. Xu ve Godber, [50] saponifikasyon işleminin ekstrakte edilen gama-orizanolün miktarını yarı yarıya azalttığını bildirmiştir.

İŞLEME METOTLARININ ETKİSİ

Pirinç kepeği ve pirinç kepeği yağının insan tüketimine uygun hale gelmesi ve belli bir raf ömrü kazanması için çeşitli işlemlerden geçmesi gereklidir. Pirinç kepeği için bu, acılaştırmaya neden olan başlıca hidrolitik enzimlerin inaktive edilmesini sağlayan ve stabilizasyon adı verilen işlem olup, pirinç kepeği yağı için ise rafinasyondur. Farklı stabilizasyon metotlarının pirinç kepeğindeki gama-orizanol miktarı üzerindeki etkisini inceleyen Thanonkaew ve ark. [53] en yüksek gama-orizanol miktarının sırasıyla sıcak hava, mikrodalga, kavurma ve buhar verme işlemleri ile stabilize edilen kepeklerde olduğunu tespit etmiş ve söz konusu tüm metotlarla stabilize edilen kepeklerin gama-orizanol miktarının ham pirinç kepeğine göre daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Shin ve Godber [54] 5, 10 ve 15 kGy dozda gama-ışınlamaya tabi tutulan pirinç kepeklerinin gama-orizanol miktarlarında sırasıyla %11, 18 ve 22 oranında azalma tespit etmişlerdir. Kim ve ark. [55] 160, 170 ve 180°C sıcaklıklarda 5, 10 ve 15 dakika kavurdıkları pirinç ruşeymlerinin yağındaki gama-orizanol miktarının kavrulmamışa göre düşük ancak kavurulmuşlar arasında birbirlerinden farklı olmadığını bildirmişlerdir. Kumar ve ark. [56] de pirinç kepeğine belli oranlarda su ekleyerek 20 dakika boyunca 105-110°C'de pişirme işlemi uygulamış ve daha sonra kuruttukları kepeklerin gama-orizanol miktarında önemli bir azalma tespit etmediklerini belirtmişlerdir ($P>0.05$). Yılmaz ve ark. [57], 500, 600 ve 700 W infrared gücünde sırasıyla 8, 5 ve 3 dakikaya kadar uyguladıkları infrared stabilizasyonun pirinç kepeğinin gama-orizanol miktarı üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir ($P>0.05$). Bununla birlikte araştırmacılar, aynı işleme tabi tutulmuş pirinç kepeklerinin toplam tokoferol miktarında %50'ye varan azalma tespit etmiş ve gama-orizanolün tokoferollere göre daha stabil olduğunu rapor etmiştir. Benzer biçimde Shin ve ark. [36] da 140°C'deki ekstrüzyon sıcaklığında 6 dakika işlenen pirinç kepeklerinde sadece %10 düzeyinde gama-orizanol kaybı olduğunu ancak aynı şartlardaki stabilizasyon işleminin daha yüksek tokoferol kaybına neden olduğunu belirterek gama-orizanolün ısıl stabilitesinin tokoferolden yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, ayrıca 1 yıl depolama sonunda ham pirinç kepeğindeki gama-orizanolün yaklaşık % 63'ünün kaybolduğunu da tespit etmiştir. Dahası, çeltik formundaki tanenin belli bir süre sıcak su ile muamelesini ifade eden "parboiling" işleminin çelik tanesindeki tokoferol ve tokotrienollerin miktarında azalmaya neden olurken gama-orizanol miktarını etkilemediği bildirilmiştir [47].

Pirinç kepeği yağı ise fiziksel ya da kimyasal olarak rafine edilmektedir. Tipik olarak kimyasal rafinasyonda serbest yağ asitlerini uzaklaştırmak için sodyum hidroksit kullanılırken, fiziksel rafinasyonda da vakum altında kuru buhar verme işlemi uygulanmaktadır [46]. Kimyasal rafinasyonda serbest yağ asitlerinin sodyum hidroksit ile nötralizasyonu sonucunda oluşan sabunun yağdaki gama-orizanolün yaklaşık %90'ını içerdiği ve en büyük gama-orizanol kaybının bu aşamada gerçekleştiği bildirilmiştir [46]. Krishna ve ark. [45] ise rafinasyon aşamalarının gama-orizanol miktarı üzerine etkisini

araştırmışlar ve zambak giderme (degumming) ve mum giderme (dewax) işlemlerinin ham pirinç kepeği yağındaki gama-orizanolün sadece %1.1 ve %5.9'unun kaybına neden olurken, alkali nötralizasyon işleminin yağdaki gama-orizanolün %93-94.6'sını uzaklaştırdığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, kullanılan alkalinin gücünden bağımsız olarak alkali rafinasyonun ham yağdaki gama-orizanolün %85'ten fazlasının kaybına neden olduğunu belirtmişlerdir. Van Hoed ve ark. [58] da ham pirinç kepeği yağında 1.8 g / 100 g gama-orizanol tespit ederken, nötralizasyon, ağartma, kışlama ve koku giderme işlemleri sonucunda sırasıyla 0.4, 0.4, 0.3 ve 0.3g/100 g gama-orizanol tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Kimyasal rafinasyon sonucu oluşan atıklar, sadece gama-orizanol değil aynı zamanda yüksek oranda tokoferol, ferulik asit, fitik asit, inositol ve wax da içermektedir [32]. Bununla birlikte fiziksel rafinasyonun gama-orizanol miktarında önemli bir değişime neden olmadığı, işlem sonucunda gama-orizanolün yaklaşık %90'ının yağda kaldığını bildirilmiştir [45, 46].

TOKSİSİTE

Gama-orizanol, gıda güvenliği açısından da pek çok toksikolojik çalışma ile test edilmiştir. %10 düzeyinde pirinç kepeği yağı ile beslenen fareler üzerinde 3 nesil boyunca yapılan testler sonucunda büyüme ve üreme performansı, kilo artışı, yağ absorpsiyonu, azot ve kalsiyum tutunması bakımından önemli bir farklılık gözlenmemiştir [2]. Gama-orizanolün kısa dönemli güvenilirliği ise Rec testi (bakteriyel DNA onarımı testi), Ames testi (bakteriyel ters mutasyon testi), sıçanlarda kemik iliği kromozom sapması testi ve metabolik işbirliği inhibisyonu testi ile değerlendirilmiş ve tüm bu testlerden olumsuz bir sonuç elde edilmemiştir. Buna ek olarak gama-orizanolün kanserojenik potansiyelinin değerlendirildiği çalışmalarda da herhangi bir olumsuz bulguya rastlanmamıştır [2]. Fareler üzerinde yapılan bir araştırmada diyete eklenen 2 g/kg vücut ağırlığı / gün dozundaki gama-orizanolün 2 yıl boyunca farelerin genel durumlarında, ölüm oranlarında, organ ağırlıklarında ve hematolojik değerlerinde kontrol gruba karşı negatif bir değişim saptanmamıştır. Ayrıca genotoksik etkisi olmadığı ve hücreler arası iletişimi inhibe etmemesi nedeniyle tıbbi amaçlı kullanımında sakınca olmadığı bildirilmiştir [40, 59]. Pirinç kepeği yağının tekrarlı olarak kızartma işleminde kullanılarak mutajenik potansiyelini araştıran çalışmaların da negatif sonuç verdiği ve pirinç kepeği yağının dikkate değer bir oksidatif stabiliteye sahip olduğunu belirtilmiştir [2].

Gama-orizanol Japonya gibi bazı ülkelerde ticari olarak da mevcut olup, güvenilirliği bu ülkelerin ilgili yasalarınca onaylanmıştır. Gama-orizanolün hayvanlarda kanserojenik etki göstermediği, pirinç kepeği yağının insan beslenmesi için uygun ve güvenilir olduğu pek çok çalışmada belirtilmiştir. Doğrudan gama-orizanol kaynaklı akut ya da kronik negatif etki içeren bir çalışmaya rastlanmamıştır [2].

SONUÇ

Sonuç olarak, gama-orizanol yapısı halen tam olarak aydınlatılmamış olmakla beraber, sağlığa yararlı pek çok etkisi olduğu tespit edilmiş önemli bir biyoaktif maddedir. Türkiye de dâhil olmak üzere pek çok ülkede değerlendirilmeyen pirinç kepeği ve ham çeltik tanesi gibi yan ürünler, temel kaynağıdır. Toksikite, günlük tüketim miktarı gibi konularda yasal düzenlemeler yapılması ihtiyacı mevcut olmakla beraber, özellikle söz konusu yan ürünlerden etkin ve düşük maliyetli metotlarla elde edilerek katma değeri yüksek ürün bileşenlerine dönüştürülmesi ve insan tüketimine sunulması önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Kaneko, R., Tsuchiya, T., 1954. New compound in rice bran and germ oils. *Journal of the Chemistry Society of Japan* 57: 526.
- [2] Jean Huang, C.C., 2003. Potential functionality and digestibility of oryzanol as determined using in vitro cell culture models. Ph.D. Dissertation, Louisiana State University, Louisiana, USA, 170 p.
- [3] Yu, S., Nehus, Z.T., Badger, T.M., Fang, N., 2007. Quantification of vitamin E and γ -oryzanol components in rice germ and bran. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 55: 7308-7313.
- [4] Lubinus, T., 2013. Fate of dietary phytosteryl/stanyl esters upon digestion by humans: Analysis of individual intact esters in feces. Ph.D. Dissertation, Munich Technical University, Munich, Germany, 150 p.
- [5] Goufo, P., Trindade, H., 2014. Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, γ -oryzanol, and phytic acid. *Food Science and Nutrition* 2(2): 75-104.
- [6] Moreau, R.A., Powell, M.J., Hicks, K.B., Norton, R.A., 1998. A comparison of the levels of ferulate-phytosterol esters in corn and other seeds. In *Advances in Plant Lipid Research*, Edited by J. Sanchez, E. Cerda-Olmedo, E. Martinez-Force, Universidad de Sevilla, Spain, pp. 472-474.
- [7] Hakala, P., Lampi, A., Ollilainen, V., Werner, U., Murkovic, M., Wahala, K., Karkola, S., Piironen, V., 2002. Steryl phenolic acid esters in cereals and their milling fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(19): 5300-5307.
- [8] Miller, A., Engel, K.H., 2006. Content of γ -oryzanol and composition of steryl ferulates in Brown rice (*Oryza sativa* L.) of European origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8127-8133.
- [9] Nyström, L., Achrenius, T., Lampi, A.M., Moreau, R.A., Piironen, V., 2007. A comparison of the antioxidant properties of steryl ferulates with tocopherol at high temperatures. *Food Chemistry* 101: 947-954.
- [10] Seetharamaiah, G.S., Prabhakar, J.V., 1986. Oryzanol content of Indian rice bran oil and its extraction from soap stock. *Journal of Food Science and Technology* 23: 270.

- [11] Rong, N., Ausman, L.M., Nicolosi, R.J., 1997. Oryzanol decreases cholesterol absorption and aortic fatty streaks in hamsters. *Lipids* 32: 303-309.
- [12] Yoshie, A., Kanda, A., Nakamura, T., Igusa, H., Hara, S., 2009. Comparison of gamma-oryzanol contents in crude rice bran oils from different sources by various determination methods. *Journal of Oleo Science* 58(10): 511-518.
- [13] Lerma-Garcia, M.J., Herrero-Martinez, J.M., Simo-Alfonso, E.F., Mendonça, C.R.B., Ramis-Ramos, G., 2009. Composition, industrial processing and applications of rice bran γ -oryzanol. *Food Chemistry* 115: 389-404.
- [14] Heinemann, R.J.B., Xu, Z., Godber, J.S., Lanfer-Marquez, U.M., 2008. Tocopherols, Tocotrienols, and γ -oryzanol contents in Japonica and Indica subspecies of rice (*Oryza sativa* L.) cultivated in Brazil. *Cereal Chemistry* 85(2): 243-247.
- [15] Mandak, E., Nyström, L., 2012. The effect of in vitro digestion on steryl ferulates from rice (*Oryza sativa* L.) and other grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 6123-6130.
- [16] Britz, S.J., Prasad, P.V.V., Moreau, R.A., Allen, L.H., Kremer, D.F., Boote, K.J., 2007. Influence of growth temperature on the amounts of tocopherols, tocotrienols, and γ -oryzanol in brown rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 7559-7565.
- [17] Tuncel, N.B., Yilmaz, N., 2011. Gamma-oryzanol content, phenolic acid profiles and antioxidant activity of rice milling fractions. *European Food Research and Technology* 233: 577-585.
- [18] Cho, J.Y., Lee, H.J., Kim, G.A., Kim, G.D., Lee, Y.S., Shin, S.C., Park, K.H., Moon, J.H., 2012. Quantitative analyses of individual γ -oryzanol (steryl ferulates) in conventional and organic brown rice. *Journal of Cereal Science* 55: 337-343.
- [19] Lloyd, B.J., Siebenmorgen, T., Beers, K.W., 2000. Effects of commercial processing on antioxidants in rice bran. *Cereal Chemistry* 77: 551-555.
- [20] Rohrer, C.A., Siebenmorgen, T.J., 2004. Nutraceutical concentrations within the bran of various rice kernel thickness fractions. *Biosystems Engineering* 88 (4): 453-460.
- [21] Sugano, M., Tsuji, E., 1997. Rice bran oil and cholesterol metabolism. *Journal of Nutrition* 127: 521-524.
- [22] Gerhardt, A.L., Gallo, N.B., 1998. Full fat rice bran and oat bran similarly reduce hypercholesterolemia in humans. *Journal of Nutrition* 128: 865-869.
- [23] Yokoyama, W.H., 2004. Plasma LDL cholesterol lowering by plant phytosterols in a hamster model. *Trends in Food Science and Technology* 15: 528-531.
- [24] Kim, J., Godber, J.S., Prinyawiwatkul, W., 2001. Inhibition of cholesterol autoxidation by the nanosaponifiable fraction in rice bran in an aqueous model system. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78(7): 685-689.
- [25] Xu, Z., Godber, J.S., 2001. Antioxidant activities of major components of γ -oryzanol from rice bran using a linoleic acid model. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78(6): 645-649.
- [26] Wang, T., Hicks, K.B., Moreau, R.A., 2002. Antioxidant activity of phytosterols, oryzanol, and other phytosterol conjugates. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79(12): 1201-1206.
- [27] Juliano, C., Cossu, M., Alamanni, M.C., Piu, L., 2005. Antioxidant activity of γ -oryzanol: Mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. *International Journal of Pharmaceutics* 299: 146-154.
- [28] Seetharamaiah, G.S., Krishnakantha, T.P., Chandrasekhara, N., 1990. Influence of oryzanol on platelet aggregation in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 36: 291-297.
- [29] Murase, Y., Lishima, H., 1963. Clinical studies of oral administration of gamma-oryzanol on climacteric complaints and its syndrome. *Obstetrics and Gynecology Practice* 12: 147-149.
- [30] Bonner, B., Warren, B., Bucci, L., 1990. Influence of ferulate supplementatiton on postexercise stress hormone levels after repeated exercise stress. *The Journal of Applied Sport Science Research* 4: 110.
- [31] Yasukawa, K., Akihisa, T., Kimura, Y., Tamura, T., Takido, M., 1998. Inhibitory effect of cycloartenol ferulate, a component of rice bran, on tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 21: 1072-1076.
- [32] Patel, M., Naik, S.N., 2004. Gamma-oryzanol from rice bran oil. A review. *Journal of Scientific and Industrial Research* 63: 569-578.
- [33] Berger, A., Rein, D., Schafer, A., Monnard, I., Gremaud, G., Lambelet, P., Bertoli, C., 2005. Similar cholesterol lowering properties of rice bran oil with varied γ -oryzanol, in mildly hypercholesterolemic men. *European Journal of Nutrition* 44: 163-173.
- [34] Nakayama, S., Manabe, A., Suzuki, J., Sakamoto, K., Inagaki, T., 1987. Comparative effects of two forms of γ -oryzanol in different sterol compositions on hyperlipidemia induced by cholesterol diet in rats. *Japanese Journal of Pharmacy* 44: 135-143.
- [35] Xu, Z., Hua, N., Godber, J.S., 2001. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and γ -oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2077-2081.
- [36] Shin, T.S., Godber, J.S., Martin, D.E., Wells, J.H., 1997. Hydrolytic stability and changes in E vitamers and oryzanol of extruded rice bran during storage. *Journal of Food Science* 62(4): 704-728.
- [37] Chen, M.H., Bergman, C.J., 2005. A rapid procedure for analysing rice bran tocopherol, tocotrienol and γ -oryzanol contents. *Journal of Food Composition and Analysis* 18: 139-151.
- [38] Tangprawat, C., 2006. Determination of total lipid content and gamma-oryzanol in rice bran. Master of Science Thesis, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand, 117 p.
- [39] Indira, T.N., Narayan, A.V., Barhate, R.S., Raghavarao, K.S., Khaton, S., Channaiah, G. (September 2004, May 2005, October 2004). Production of oryzanol-enriched fraction useful in the treatment of melanin related disorders and for minimizing wrinkles involves saponification; dehydration and leaching of RBO soapstock. US

- Patents US2004192948-A1, US6896911-B2, JP2004300034-A.
- [40] Tamagawa, M., Otaki, Y., Takahshi, T., Otaka, T., Kimura, S., Miwa, T., 1992. Carcinogenicity study of γ -oryzanol in B6C3F mice. *Food and Chemical Toxicology* 30(1): 49-56.
- [41] Karan, A., 1998. Separation of oryzanol from crude rice bran oil. Master of Applied Sciences, University of Toronto, Toronto, Canada, 122 p.
- [42] Bucci, R., Magri, A.D., Magri, A.L., Marini, F., 2003. Comparison of three spectrophotometric methods for the determination of γ -oryzanol in rice bran oil. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 375: 1254-1259.
- [43] Bergman, C.J., Xu, Z., 2003. Genotype and environment effects on tocopherol, tocotrienol, and γ -oryzanol contents of Southern US rice. *Cereal Chemistry* 80: 446-449.
- [44] Lilitchan, S., Tangprawat, C., Aryasuk, K., Krisnangkura, S., Chokmoh, S., Krisnangkura, K., 2008. Partial extraction method for the rapid analysis of total lipids and γ -oryzanol contents in rice bran. *Food Chemistry* 106: 752-759.
- [45] Krishna, A.G.G., Khatoon, S., Shiela, P.M., Sarmandal, C.V., Indira, T.N., Mishra, A., 2001. Effect of refining of crude rice bran oil on the retention of oryzanol in the refined oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78: 127-131.
- [46] Krishna, A.G.G., Hemakumar, K.H., Khatoon, S., 2006. Study on the composition of rice bran oil and its higher free fatty acids value. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 83: 117-120.
- [47] Khatoon, S., Gopalakrishna, A.G., 2004. Fat-soluble nutraceuticals and fatty acid composition of selected Indian rice varieties. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 81(10): 939-943.
- [48] Miller, A., Frenzel, T., Schmarr, H.G., Engel, K.H., 2003. Coupled liquid chromatography-gas chromatography for the rapid analysis of γ -oryzanol in rice lipids. *Journal of Chromatography A* 985: 403-410.
- [49] Xu, Z., Godber, J.S., 1999. Purification and identification of components of γ -oryzanol in rice bran oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 2724-2728.
- [50] Xu, Z.M., Godber, J.S., 2000. Comparison of supercritical fluid and solvent extraction methods in extracting γ -oryzanol from rice bran. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77: 547-551.
- [51] Kumar, R.R., Tiku, P.K., Prakash, V., 2009. Preferential extractability of γ -oryzanol from dried soapstock using different solvents. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 195-200.
- [52] Imsanguan, P., Roaysubtawee, A., Borirak, R., Pongamphai, S., Douglas, S., Douglas, P.L., 2008. Extraction of α -tocopherol and γ -oryzanol from rice bran. *LWT-Food Science and Technology* 41: 1417-1424.
- [53] Thanonkaew, A., Wongyai, S., McClements, D.J., Decker, E.A., 2012. Effect of stabilization of rice bran by domestic heating on mechanical extraction yield, quality, and antioxidant properties of cold-pressed rice bran oil (*Oryza sativa* L.). *LWT-Food Sci Technology* 48: 231-236.
- [54] Shin, T.S., Godber, J.S., 1996. Changes of endogenous antioxidants and fatty acid composition in irradiated rice bran during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(2): 567-573.
- [55] Kim, I.H., Kim, C.J., You, J.M., Lee, K.W., Kim, C.T., Chung, S.H., Tae, B.S., 2002. Effect of roasting temperature and time on the chemical composition of rice germ oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79(5): 413-418.
- [56] Kumar, H.G.A., Khatoon, S., Prabhakar, D.S., Krishna, A.G.G., 2006. Effect of cooking of rice bran on the quality of extracted oil. *Journal of Food Lipids* 13: 341-353.
- [57] Yılmaz, N., Tuncel, N.B., Kocabıyık, H., 2014. Infrared stabilization of rice bran and its effects on γ -oryzanol content, tocopherols and fatty acid composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94: 1568-1576.
- [58] Van Hoed, V., Depaemelaere, G., Vila Ayala, J., Santiwattana, P., Verhe, R., De Greyt, W., 2006. Influence of chemical refining on the major and minor components of rice bran oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 83(4): 315-321.
- [59] Tamagawa, M., Otaki, Y., Takahshi, T., Otaka, T., Kimura, S., Miwa, T., 1992b. Carcinogenicity study of γ -oryzanol in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology* 30(1): 41-48.