

T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ KULLANILARAK MISIRDA KAROTENOİD VE TOKOFEROL BİLEŞENLERİNİN ANALİZİ

Oğuz ORDU

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ KULLANILARAK MISIRDA KAROTENOİD VE TOKOFEROL BİLEŞENLERİNİN ANALİZİ

Oğuz ORDU

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: **29/08/2018**

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Cem Ömer EGESEL

ÇANAKKALE

Oğuz ORDU tarafından Doç. Dr. Cem Ömer EGESEL yönetiminde hazırlanan ve **29/08/2018** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan "**Farklı Ekstraksiyon Yöntemleri Kullanılarak Mısırda Karotenoid ve Tokoferol Bileşenlerinin Analizi**" başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Doç. Dr. Cem Ömer EGESEL ……

Başkan

Prof. Dr. Sedat SERÇE ……

Üye

Doç. Dr. Fatih KAHRIMAN ……

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ
Müdür
Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:……

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: FYL-2017-1262

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Oğuz ORDU

TEŞEKKÜR

Üniversite hayatım boyunca her zorlukta yanımda olan ve bu tezin gerçekleştirilmesinde bilgisi, tecrübesi ve yol göstericiliği ile benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışmanım Doç. Dr. Cem Ömer EGESEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışmayı gerçekleştirdiğimiz laboratuvarın oluşmasında büyük emeği olan bölüm kurucumuz saygıdeğer Prof. Dr. Hakan TURHAN'a ve bu tezin her aşamasında bana yardımcı olan çalışma içerisinde gerçekleşen bazı teknik zorlukları aşmamda bana yardımcı olan Tarla Bitkileri Bölümünden Doç. Dr. Fatih KAHRIMAN'a, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın belirli bölümlerinde önemli katkılar sağlayarak bana yardımcı olan lisans öğrencileri Ebru DÜZEN'e, Ayşenur GÖKÇE'ye, Eda ZEKAİ'ye ve yüksek lisans öğrencisi Fatma AKTAŞ'a teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmasındaki tüm zorlukları benimle birlikte göğüsleyen Melike GÜNER'e ve hayatımın her evresinde bana maddi manevi destek olan değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmaya FYL-2017-1262 no'lu proje kapsamında maddi destek veren ÇOMÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca tez çalışmasında kullanılan materyalin ve yağ oranlarına ait verilerin alındığı TÜBİTAK 215O867 nolu projeyle tez çalışmasının gerçekleşmesine katkı sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Oğuz ORDU

Çanakkale, Ağustos 2018

SİMGELER VE KISALTMALAR

nm	Nanometre
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
g	Gram
%	Yüzde oranı
kg	Kilogram
da	Dekar
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
γ	Gama
mg	Miligram
SOD	Süperoksit Dismutaz
GSH-Px	Glutatyon Peroksidaz
GST	Glutatyon S-Transferazlar
CAT	Katalaz
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
O_2	Oksijen
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
OH	Hidroksil
NO	Nitrik Oksit
LPO	Lipit Peroksidasyonu
UV	Ultraviyole
SFE	Süper Kritik Ekstraksiyonu
DGF	Yağ Bilimi Derneği
RE	Retinol Eşdeğerleri
UHPLC	Ultra Yüksek Performans Likit Kromotografisi
HPLC	Yüksek Performans Likit Kromotografisi
P	Hata Miktarı
°C	Santigrat Derece
mm	Milimetre
mL	Mililitre

µL	Mikrolitre
KOH	Potasyum Hidroksit
BHT	Bütil Hidroksi Toluen
dk	Dakika
sn	Saniye
H_2O	Su
W	Örnek ağırlığı/Hacmi
A1	Absorbans Değeri
$FeCl_3$	Demir Klorür

ÖZET

FARKLI EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ KULLANILARAK MISIRDA KAROTENOİD VE TOKOFEROL BİLEŞENLERİNİN ANALİZİ

Oğuz ORDU
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Doç. Dr. Cem Ömer EGESEL
29/08/2018, 34

Mısır tanesinde bulunan karotenoid ve tokoferollerin insan sağlığı üzerine olan etkileri birçok çalışma ile ortaya konulmuştur. Mısırda karotenoid ve tokoferol miktarının tespiti ya da artırılması üzerine yürütülen araştırmalarda bu bileşenlerin analizi için farklı yöntemlerden faydalanılmaktadır. Bu çalışma üç farklı ekstraksiyon yönteminin mısırda karotenoid ve tokoferol içeriğini tespit etmeye yönelik yapılan analiz sonuçlarına etkisini belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Çalışmada bitkisel materyal olarak 150 farklı mısır genotipi kullanılmıştır. Bu genotipler; Karadeniz Bölgesinden toplanmış olan 50 adet köy popülasyonu, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü'nde yürütülen ıslah çalışmalarından sağlanan 80 farklı materyal (biyokimyasal içerik bakımından farklılık gösteren ebeveyn ve hibrit genotipler) ile ülkemizde tane mısır için ticari amaçlı yetiştiriciliği yapılan atdişi ve sert tane yapısına sahip 20 hibrit çeşitten oluşmuştur. Ekstraksiyon yöntemi olarak Soxhlet (sıcak ekstraksiyon), doğrudan ekstraksiyon ve soğuk (solvent) ekstraksiyon yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemler ile elde edilen yağların analizi UV-Spektrofotometre cihazı ile karotenoidler için 450 nm, tokoferoller için ise 520 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon yöntemlerine ait ortalamalar Kruskal-Wallis testi ile kıyaslanmıştır. Farklı ekstraksiyon yöntemleriyle tespit edilen analiz sonuçları arasındaki ilişkiler basit doğrusal regresyon analizine tabi tutulmuştur. Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen yağlar hem karotenoid hem de tokoferol içerikleri bakımından diğer yöntemlerden daha yüksek değerler vermiştir. Regresyon analizi sonuçlarına göre yağ oranı için Soxhlet ekstraksiyonu ve soğuk ekstraksiyon ile elde edilen sonuçlar arasında doğrusal ve yüksek önemli bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir. Karotenoid ve tokoferol içeriği bakımından karşılaştırılan bu üç yöntem arasındaki

regresyon katsayısının oldukça düşük çıktığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen yağlar üzerinden yapılan analizler sonucu bulunan değerlerin karotenoid ve tokoferol içeriği tahminlerinde birbirleri yerine kullanılmasının doğru olmadığını göstermektedir.

Anahtar sözcükler: UV-Spektrofotometre, Antioksidanlar, *Zea mays*, Soxhlet, Solvent.

ABSTRACT

ANALYSIS OF CAROTENOID AND TOCOPHEROL COMPOUNDS IN MAIZE USING DIFFERENT EXTRACTION METHODS

Oğuz ORDU

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Agricultural Biotechnology

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Cem Ömer EGESEL

29/08/2018, 34

Health benefits of carotenoids and tocopherols embedded in maize kernel have been shown with numerous studies. Different methods are utilized for the analysis of carotenoids and tocopherols in research studies targeting to determine or increase their amounts in maize. This thesis study was carried out to determine the effects of three different extraction methods on the results of analyses performed to quantify carotenoid and tocopherol contents in maize. 150 different maize genotypes were used as plant material in the study. These genotypes were 50 landraces collected from Black Sea Region, 80 different materials (parents and hybrids varied in biochemical constitution) selected from the breeding studies carried in Field Crops Department, Faculty of Agriculture, Çanakkale Onsekiz Mart University, and 20 hybrid varieties commercially cultivated in Turkey which possess dent or flint endosperm structure. Soxhlet (hot extraction), direct extraction, and cold extraction (solvent) methods were used as the extraction treatments. The oil samples extracted with these methods were analyzed with UV-Spectrophotometer, at a wavelength of 450 nm for carotenoids and 520 nm for tocopherols. The means from the extraction methods were compared by Kruskal-Wallis test. The relationships among the analyses results obtained with different extraction methods were subjected to simple linear regression analysis. The oil samples extracted with Soxhlet method yielded higher values for both carotenoids and tocopherols as compared to the other methods. According to the regression analysis, there was a linear and highly significant relation between Soxhlet and cold extraction results. For carotenoids and tocopherols, the regression coefficients among the three methods came out to be rather low. These results indicate that the values acquired from the analyses on oil samples

obtained through the use of different extraction methods do not provide operational interchangeability in carotenoid and tocopherol analyses.

Keywords: UV-Spectrophotometry, Antioxidants, *Zea mays*, Soxhlet, Solvent.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI iii
TEŞEKKÜR iv
SİMGELER VE KISALTMALAR v
ÖZET viii
ABSTRACT ixx
ŞEKİLLER DİZİNİ xiiii
ÇİZELGELER DİZİNİ xivv
BÖLÜM 1
GİRİŞ 1
1.1. Mısır Yağı 1
1.2. Mısırın Karotenoid ve Tokoferol Açısından Önemi 2
1.3. Mısır Bitkisinin Hayvan Yemi Açısından Önemi 3
1.4. Antioksidanlar 4
1.5. Reaktif Oksijen Türleri (Serbest Radikaller) 5
BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 8
BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM 11
3.1. Materyal 11
3.2. Ekstraksiyon Yöntemleri 16
3.2.1. Soxhlet Yöntemi 16
3.2.2. Soğuk Ekstraksiyon 16
3.2.3. Doğrudan Ekstraksiyon 16
3.3. Spektrofotometrik Tayinler 17
3.3.1. Karotenoid Ölçümleri 17
3.3.2. Tokoferol Ölçümleri 17
3.4. İstatistik Analizler 18
BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 20
4.1. Yağ Oranı 20
4.2. Karotenoid İçeriği 22
4.3. Tokoferol İçeriği 25

BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER....29
KAYNAKLAR....30
ÖZGEÇMİŞ.... I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 3.1. Çalışmada izlenilen yolun ana hatları…….....15
Şekil 3.2. Vitamin E standart eğrisi.....18
Şekil 4.1. Soxhlet ve soğuk ekstraksiyona ait yağ oranı…….…….20
Şekil 4.2. Soxhlet (Sıcak) - soğuk ekstraksiyon yöntemleri arasındaki regresyon analizi...21
Şekil 4.3. Ekstraksiyon yönteminin karotenoid içeriğine etkisi……...23
Şekil 4.4. Karotenoid içeriği için soğuk ve doğrudan ekstraksiyon yöntemleri arasındaki regresyon analizi…….....24
Şekil 4.5. Karotenoid içeriği için Soxhlet ve soğuk ekstraksiyon yöntemleri arasındaki regresyon analizi……...24
Şekil 4.6. Karotenoid içeriği için Soxhlet ve doğrudan ekstraksiyon yöntemleri arasındaki regresyon analizi…….....25
Şekil 4.7. Ekstraksiyon yönteminin tokoferol içeriğine etkisi…...…….26
Şekil 4.8. Tokoferol içeriği için soğuk ve doğrudan ekstraksiyon yöntemleri arasındaki regresyon analizi…….....27
Şekil 4.9. Tokoferol içeriği için Soxhlet ve soğuk ekstraksiyon yöntemleri arasındaki regresyon analizi…….……...27
Şekil 4.10. Tokoferol içeriği için Soxhlet ve doğrudan ekstraksiyon yöntemleri arasındaki regresyon analizi……...……..…28

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. Projede materyal olarak kullanılan genotiplere ait genel bilgiler.....11

BÖLÜM 1
GİRİŞ

Mısır buğdaygiller familyasına bağlı yüksek verim kabiliyeti gösteren önemli bir C4 bitkisidir (Kırtok, 1998). Çevre şartlarına uyum sağlayabilme yeteneği, çeşit zenginliği ve yüksek verim potansiyeline sahip olması nedeni ile dünya üzerinde geniş bir yayılma alanı bulmuştur (Yaşak ve ark., 2003, Alan ve ark., 2005). Dünyada tahıl ekim alanları bakımından mısır, buğdaydan sonra ikinci sırada bulunurken üretim miktarı bakımından ise birinci sırada yer almaktadır. FAO verilerine göre dünya genelinde 2015 yılında 182,4 milyon hektarlık ekiliş alanında 1,01 milyar ton üretime sahiptir ve 553 kg/da'lık verim elde edilmiştir (Anonim, 2015). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2016 verilerine göre ülkemizde mısır dane üretimi 680,019 hektarlık ekiliş alanında 6,40 milyon ton üretime sahip olup 942 kg/da'lık bir verim değeri ortaya koymuştur. Silajlık mısır üretimi bakımından ise TUİK verilerine göre 4868 kg/da'lık verim elde edilmiştir (Anonim, 2016). Ülkemizde endüstriyel tarım ürünleri içerisinde iyi bir konumda bulunan mısırın ekonomik payı gün geçtikçe artmaktadır (Turgut ve ark., 1999).

1.1. Mısır Yağı

Yıllardır yapılan ıslah çalışmaları ile mısır, kullanım amacına göre bazı besin değerleri bakımından geliştirilerek önemli bir tahıl durumuna gelmiş bulunmaktadır. Mısır tanesinin içeriğinde %70 nişasta, %10 protein, %5 yağ, %2 şeker, %2 kül ve pentozanlar bulunmaktadır (Koçak, 1987 ve Kırtok, 1998). Mısır embriyosunun yaklaşık %70-80'ninde yağ, şeker ve kül yer almaktadır. Yağ bakımından en zengin kısım embriyodur. Yağ mısır genotiplerinin tanelerinde embriyo büyüktür. Toplam tanedeki yağ oranı %4-7 arasında değişmektedir (Koçak, 1987 ve Kırtok, 1998). Tanesinde %7'nin üzerinde yağ içeren mısırlar "yüksek yağlı mısır" olarak tanımlanırlar (Lambert, 1994).

Ülkemizde mısır yağı, toplam sıvı yağ pazarı içinde ayçiçeği ve zeytinyağından sonra üçüncü sırada yaklaşık %7-8'lik pay ile yer almaktadır. Mısır yağı son dönemlerde özellikle bitkisel yağlar arasında en çok talep edilen yağ olarak karşımıza çıkmaktadır. Mısır yağının %80'i kentsel nüfus tarafından tüketilmekte, bölgesel anlamda bakıldığında Marmara bölgesi %50 tüketim ile zirvede bulunmaktadır (Öz ve Kapar, 2007). Vücut için yoğun enerji kaynağı olan yağlar, insanların kalori ihtiyacının yaklaşık üçte birini karşılamaktadırlar (Karaali, 1981).

1.2. Mısırın Karotenoid ve Tokoferol Açısından Önemi

Dünya üzerinde mısırın bu kadar yaygın olarak tarımının yapılmasının bir diğer sebebi ise içerdiği besin değerleridir. Mısır yapısında bulunan nişasta, protein ve yağ dışında vitamin bakımından da önemli bileşenler barındırmaktadır. Bunlar arasından bu çalışmada önem arz eden bileşenler A ve E vitaminlerinin ön maddesi olan karotenoidler ve tokoferollerdir.

Karotenoidler, bitkisel ve hayvansal materyallere sarıdan turuncuya çeşitli tonlarda renk veren ve yağda çözünür özellik gösteren bileşiklerdir (Cemeroğlu, 2013). Bu bileşikler dokuz veya daha fazla konjuge çift bağ içeren 40 karbon atomundan meydana gelen yapılardır (Koca ve Karadeniz, 2005). Karotenoidler sekiz izopren ünitesinin kondensasyonuyla meydana gelmişlerdir. Bütün karotenoid formlarının uzamış konjuge bağları ve elementel yapıları onların renklerini belirler ve onların biyolojik aktiviteleri ile antioksidan kapasitelerini ortaya koyar (Egesel, 2001). Son yıllarda yapılmış olan çalışmalar, bazı karotenoidlerin A-vitamininin ön maddesi olmasının yanı sıra, hücreler arası boşlukta iletişimi geliştirme, bağışıklık sistemini güçlendirme, görme fonksiyonlarına önemli etkide bulunma ve antioksidan aktivite gösterme gibi insan sağlığı açısından önemli diğer bazı özelliklerini de ortaya koymuştur (Murakami ve ark., 2000). Karotenoidler, kanseri önleme yeteneği de gösterebilir. Zira hayvanlar üzerinde yapılan incelemeler neticesinde karotenoidlerin antioksidan özelliklerinin, DNA'ya zarar veren ve kanserin henüz başlangıç aşamasında etkili olan serbest radikallerin etkisini yok ettiği ve böylelikle kanser hücrelerinin oluşmasına neden olan zincir reaksiyonlarının meydana gelmesini önlediği anlaşılmıştır (Ötleş ve Atlı, 1997). Lutein ve zeaksantin karotenoidlerin mısır bitkisinde en çok bulunan alt fraksiyonlarıdır (Egesel, 2001). Mısırda yapılan ıslah çalışmalarında da özellikle bu iki bileşenin dane içerisindeki miktarı arttırılmaya çalışılmıştır.

Mısır yağında önem arz eden bir diğer bileşen de yağda çözünebilen, antioksidan özellik gösteren tokoferollerdir. Toplu olarak vitamin E olarak bilinirler, daha genel bir terim olan tokol, vitamin E'nin sekiz izomeri ile ilişkili olarak tanımlanmıştır. Tokoferoller ve tokotrienoller, tokollerin iki sınıfıdır ve her ikisi de dört homolog bileşen içerir. Tokoferoller, α, β, γ ve δ olarak sınıflandırılmaktadır. Bunlar sadece izoprenoid yan zincirindeki üç çift bağın yokluğundan dolayı tokotrienollerden farklıdır ve dört homolog, tokoferol metil gruplarının sayısına göre farklılık gösterir. Bir tokoferolün antioksidan değeri vitamin değerinden farklı olabilir. Vitamin E aktivitesi bakımından en değerli form α-tokoferoldür, ancak antioksidan aktivitesi bakımından araştırmacılar arasında bir fikir

birliği yoktur (Egesel, 2001). Yüz gram mısır rüşeymi yağında 87-250 mg tokoferol bulunmaktadır. İnsanlarda günlük E vitamini ihtiyacı 10-25 mg α-tokoferol düzeyindedir (Cemeroğlu, 2013).

Geniş bir antioksidan etkiye sahip olan E vitamini, çocukluk, ergenlik ve yaşlılık dönemlerinde fiziksel ve mental aktivite, direnç, hafıza gibi pek çok fizyolojik fonksiyon ile ilişki içindedir. Hücrenin oksidasyon riskini önleyerek hücrelerdeki protein sentezi, membran oluşumu gibi önemli yaşamsal olayların gerçekleşmesini kolaylaştırır (Dündar, ve Aslan, 1999). Tokoferoller kuvvetli antioksidanlardan oldukları için insan diyetlerinde önemli bir yere sahiptirler (Cemeroğlu, 2013).

1.3. Mısır Bitkisinin Hayvan Yemi Açısından Önemi

Mısır bitkisi sahip olduğu besin değerleri sebebi ile dünya üzerinde talebi sürekli artan bir bitki haline gelmiştir. Mısır direkt olarak insan beslenmesinde kullanılmasından ziyade endüstri alanında da ham madde oluşturmaktadır. Birim alandan yüksek düzeyde kuru madde miktarı elde edilmesi ve değerli besin içerikleri nedeniyle yem üreticilerinin oldukça tercih ettiği bir yem bitkisi konumundadır. Mısır tanesi içerisinde bulunan yüksek miktardaki enerji değeri, düşük selüloz, yüksek yağ içeriği ve karotenoid bakımından zengin olması yem olarak kullanılmasında oldukça etkilidir. Tanesinden elde edilen nişasta ve yağ nedeniyle de şeker ve yağ sanayisinin vazgeçilmez ürünü haline gelmiş bulunmaktadır. Tüm bunların yanı sıra son yıllarda bitkisel yağların dizel yakıtı olarak kullanılması ile birlikte mısır bitkisinin tercih edilme sebepleri daha da artmaktadır (Koca ve ark., 2009).

Dünyada üretilen mısırın %65-70'i hayvan yemi olarak kullanılırken yaklaşık %8-10'luk kısmı ise sanayi anlamında değerlendirilmektedir (Atay, 2013). Önümüzdeki senelerde, dünyadaki nüfus artışına bağlı olarak başta gıda maddeleri olmak üzere ihtiyaçların artması beklenmektedir. Bunun yanı sıra bilim ve teknoloji alanındaki gelişmeler neticesinde mısırın yeni kullanım alanlarının ortaya çıkacağı ve tüketim alışkanlıklarının değişeceği düşünüldüğünde, başta nişasta ve yem sanayi olmak üzere mısır ve türevlerini kullanan kesimlerin mısır ürününe olan ihtiyacı mutlak suret ile artacaktır (Halkman ve ark., 2005). İnsan beslenmesi, hayvan yemi ve sanayinin değişik kollarında hammadde olarak kullanılabilmesinden ötürü, pek çok ülkenin tarımsal ürün deseninde kolayca yerini bulabilmiştir (Atay, 2013).

1.4. Antioksidanlar

Biyolojik sistemleri, oksidasyon reaksiyonları ve bunların meydana getirdiği zararlı etkilerinden koruyan ya da oksidasyon reaksiyonlarını tamamen engelleyen maddelere antioksidan denir (Decker, 2002). Bir başka tanım ile ifade etmek gerekir ise; antioksidanlar, oksitleyici bir maddenin dozuna kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda, bu maddenin oksitleyici etkisinden muhafaza eden veya okside olmasını engelleyen maddelerdir (Halliwell ve Whiteman, 2004). İnsan vücudunun antioksidan savunma sistemi farklı antioksidan bileşiklerden oluşmaktadır. Bu bileşiklerin antioksidan kapasiteleri vücutta üretilen serbest radikaller ve gıdalarla alınan antioksidanlar arasındaki dengeye göre değişmektedir. Meyve ve sebzeler yüksek antioksidan aktiviteye sahip gıda maddeleridir. Bu gıda maddeleri içerisinde karşımıza çıkan vitaminler E vitamini, C vitamini ve karotenoid bileşiklerdir (Koca ve Karadeniz, 2005). Antioksidan özellik gösteren β-karoten, hücre membranlarının fiziksel bütünlüğünün artmasına ve normal membranların oluşumuna yardım eder. Gıda maddelerinin oksidasyona maruz kalmamaları için korunmasının en tesirli yolu antioksidanların kullanılması ile gerçekleşmektedir (Pokorny ve Korczak, 2001). Antioksidanlar serbest radikalleri temizleyerek DNA ile etkileşimi önlerler ayrıca farklı kimyasal yapılarda farklı antioksidatif etki mekanizmalarına da sahiptirler (Gürbüz, 2006).

Antioksidanlar, toplayıcı etki, bastırıcı etki, zincir kırıcı etki ve onarıcı etki olmak üzere dört ayrı şekilde etki göstermektedir.

1) Toplayıcı Etki: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek o molekülleri tutmakta veya daha zayıf yeni moleküllere çevirmektedirler.
2) Bastırıcı Etki: Serbest oksijen radikalleri ile etkileşime girip daha sonra onlara bir hidrojen aktararak hareketlerini azaltmakta veya inaktif bir hale dönüştürmektedirler.
3) Zincir Kırıcı Etki: Serbest oksijen radikallerini etki altına alarak zincirlerini kırıp fonksiyon mekanizmalarını engellemektedirler.
4) Onarıcı etki: Serbest radikallerin meydana getirdikleri hasarı onarmaktadırlar (Baskin ve Salem 1997).

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonlara engel olan, serbest radikal yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip antioksidanlar endojen veya eksojen kaynaklı olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar (Filiz, 2011).

A) Endojen Antioksidanlar

Bu antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadırlar.

1) Enzim olan endojen antioksidanlar:
   a) Süperoksit dismutaz (SOD)
   b) Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)
   c) Glutatyon S-Transferazlar (GST)
   d) Katalaz (CAT)
   e) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi
   f) Hidroperoksidaz (Harold, 2006).
2) Enzim olmayan endojen antioksidanlar:

Melatonin, Seruloplazmin, Transferin, Miyoglobin, Hemoglobin, Ferritin,Bilirubin, Glutatyon, Sistein, Metiyonin, Ürat, Laktoferrin, Albümin (Harold, 2006).

B) Eksojen Antioksidanlar

Bu antioksidanlar ise vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları şeklinde sınıflandırılmaktadır (Harold, 2006).

Vitamin olan eksojen antioksidanlar: 1) α-tokoferol (E vitamini), 2) retinol (A vitamini), 3) β-karoten, 4) Askorbik asit (C vitamini), 5) Folik asit (folat), 6) Ürik asit, 7) Glutatyon (Harold, 2006).

1.5. Reaktif Oksijen Türleri (Serbest Radikaller)

Reaktif oksijen türleri bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kararsız, molekül ağırlığı düşük, kısa ömürlü ve çok aktif moleküller şeklinde ifade edilmektedir (Abdollahi, 2003). Serbest radikaller süperoksit, hidroksil, lipid peroksit ve nitrik oksit radikalleri gibi farklı kimyasal yapılara sahiptir (Cochranc, 1991). En önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, süperoksit grubuna (O_2^-) flavoproteinler ve bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri etkisiyle indirgenir. Süperoksit grubu, bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene çevrilir. Süperoksit grubundan daha düşük bir etki gösteren hidrojen peroksit, dokularda bulunan katalaz (CAT), peroksidaz ve glutasyon peroksidaz (GPx) gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha düşük etkili ürünlere çevrilerek etkisiz kılınır (Kaya ve ark., 1998). Reaktif oksijen türleri çoğu biyomoleküle kolayca reaksiyona girerek zincir reaksiyonlarını başlatır. Serbest radikal ile reaksiyona giren

moleküller bir elektronunu kaybettiğinden, etrafındaki moleküllerden bir elektron alacak derecede reaktif hale gelir ve böylece radikaller zincir reaksiyonu ile çoğalırlar. Zincir reaksiyonlarını durdurmak için, eşleşmemiş elektronu elimine etmede yeni şekillenen radikal, ya diğer bir serbest radikal ile ya da serbest radikal temizleyen zincir kıran bir antioksidan ile reaksiyona girmelidir (Nordberg ve Arner, 2001). Belirli bir miktara kadar artan reaktif türler vücutta bulunan doğal endojen antioksidanlar tarafından etkisiz hale getirilir. Bu neden ile sağlıklı bir organizmada reaktif oksijen türleri ile antioksidanların etkileri arasında bir denge söz konusudur (Lanhance ve ark., 2001; Nordberg ve Arner, 2001).

Başlıca reaktif oksijen türleri; süperoksit radikali, hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH), nitrik oksit (NO) radikali, lipid peroksidasyonu (LPO) şeklindedir. Biyolojik sistemlerde, ekzojen ve endojen kökenli stres faktörleri nedeniyle devamlı olarak serbest radikaller ve diğer oksijen kökenli türler üretilmektedir. Buna karşılık hücre bu stres faktörlerinden kurtulmak için güçlü ve kompleks bir antioksidan savunma sistemi geliştirmiştir (Miller ve Slebodzinska, 1993; Lanhance ve ark., 2001). Antioksidanlar, serbest radikal oluşumunu geciktiren veya ortadan kaldıran tüm işlemleri kapsar. Etkili bir antioksidanın iki özelliği vardır. Bunlardan birincisi, serbest radikallerle hızlı bir şekilde reaksiyona girip yeni bir radikal oluşturması, ikincisi ise oluşan bu yeni radikale, komşu dokulara zarar vermeyen ve reaktif olmayan özellik kazandırmasıdır (Thomas, 2000).

Antioksidanların biyolojik sistemlerde ne kadar önemli olduğu yapılan birçok akademik çalışma ile ortaya konulmuştur. Antioksidan etkiye sahip birçok gıda maddesi bulunmaktadır. Bu gıda maddelerinden biri de çalışmamız ile doğrudan ilgili olan mısır ürünüdür.

Mısır tanesinde bulunan karotenoid ve tokoferollerin insan sağlığı açısından önemli özellikleri birçok çalışma ile ortaya konulmuştur. Mısırda karotenoid ve tokoferol miktarının tespiti ya da artırılması üzerine yürütülen araştırmalarda bu bileşenlerin analizi için farklı yöntemlerden faydalanılmaktadır. Bu yöntemlerde daha çok öğütülmüş numuneden doğrudan karotenoid ve tokoferollerin ekstraksiyonu ve miktar tayini gerçekleştirilmektedir. Ancak yağda çözünen bu bileşenlerin yağ içerisindeki miktarları ile doğrudan ekstraksiyon ile elde edilen miktarları arasında farklılıklar olabilir. Ayrıca yağın öğütülmüş numuneden ayrılması için uygulanılan yöntemin de (sıcak veya soğuk ekstraksiyon) uygulama şartları bakımından bu bileşenlerin miktarına etkisi olabilir. Yapılan literatür taramasında yağ asitleri gibi farklı bileşenlerin analizinde ekstraksiyon yönteminin etkisinin araştırıldığı ve yöntemlere göre önemli değişimlerin olduğu

saptanmıştır (Maurer ve ark., 2014). Karotenoid ve tokoferol içeriğinin ise farklı solventler kullanılarak yapılan analizindeki değişimleri bazı araştırmalara konu olmuştur (Rutkowski ve Grzegorczyk, 2007). Kullanılan ekstraksiyon yönteminin mısır tanesinden elde edilen karotenoid ve tokoferol miktarına etkisi araştırmaya muhtaç bir konudur. Ayrıca farklı yöntemlerden elde edilen sonuçların birbirleri ile olan ilişkisini ele almak suretiyle uygun ekstraksiyon yöntemlerinin tespiti ve sonuçlar üzerinden tahmini mümkün olabilir. Bu noktadan hareketle bu çalışmanın amacı;

Üç farklı ekstraksiyon yönteminin (sıcak, soğuk ve doğrudan ekstraksiyon) mısırda karotenoid ve tokoferol içeriğini tespit etmeye yönelik yapılan analiz sonuçlarına etkisini belirlemek; farklı örneklerden alınan sonuçlar arasındaki ilişkileri inceleyerek ekstraksiyon yöntemlerinden birbirlerine muadil olanları tespit etmektir.

BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kurilich ve Juvik, 1999 yılında yapmış oldukları çalışmada mısırdaki karotenoid ve tokoferollerin eş zamanlı analizi için 22 dakikadan kısa sürede çalışan, izokratik yüksek performanslı sıvı kromotografisi (HPLC) metodunu geliştirmişlerdir. Metoda göre ters faz sistemi; tokoferollerin, α-, δ- ve γ- formları ve lutein, zeaksantin, β-kriptoksantin, α-karoten, β-karoteni ayırmak için C18 monomerik ve C18 polimerik kolon kombinasyonunda suda çözünmeyen mobil faz kullanmışlardır. Çok kanallı UV-VIS dedektörü kullanarak bir kanalda 450 nm'de karotenoid adsorbsiyonunu belirlerken diğer kanalda 290 nm'de tokoferolleri belirlemişlerdir. Bu çalışmada daha az zaman harcayarak tokoferol ve karotenoidlerin birlikte belirlenebildiğini ortaya koymuşlardır.

Matthäus ve Brühl (2001) yağlı tohumların yağ içeriğinin incelenmesi ve değerlendirilmesi gerektiğini, bu hususların özellikle yağlı tohumların ticareti için önemli bir kriter olduğunu savunmuşlardır. Yağlı tohumların yağ içeriğini belirlemek için kullanılan standart yöntemlerin, 4 ile 8 saat arasında olduğunu ve bu sürelerin de çok zaman alıcı olduğunu ifade etmektedirler. Yaptıkları çalışmalarda 4 saatten daha kısa sürede yağ içeriklerini belirledikleri gözlemlenmiştir. Üç farklı yağlı tohum olan kolza tohumu, ayçiçeği ve soya fasulyesini, süper kritik akışkan ekstraksiyonu (SFE), hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu, mikrodalga yardımı ile ekstraksiyon, katı akışkan vorteks ekstraksiyonu ve soxtherm gibi farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanarak analiz etmişlerdir. Elde edilen sonuçları Alman Yağ Bilim Derneği (DGF) standart metodu sonuçlarıyla karşılaştırmışlar ve bu farklı yöntemler arasında önemli bir fark olmadığı sonucuna ulaşmışlardır. Tokoferollerin içeriğinin, ekstraksiyon yöntemine ve yağlı tohumun türüne bağlı olduğunu ve en yüksek içeriğin SFE yöntemiyle elde edildiği, digliseridler ve serbest yağ asitlerinin içeriğinin bitki türüne bağlı olarak değiştiği sonucuna ulaşmışlardır.

Panfili ve ark. (2004) yaptıkları çalışma ile tahıllardan ve tahıl yan ürünlerinden karotenoidlerin ekstraksiyonu ve belirlenmesi için seçici hassas ve hızlı bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem numunenin; sabunlaştırılmasını, ekstrakte edilmesini ve normal faz HPLC analizinin uygulanmasını içermektedir. Çeşitli tahıl (mısır, arpa, buğday, yulaf, kavuzlu buğday) ve tahıl yan ürünlerine uygulandıktan sonra en yüksek karotenoid seviyelerinin mısırda olduğu görülmüştür. Mısırda ortalama toplam karotenoid miktarı

11,14 mg/kg kuru ağırlık olarak bulunmuştur. Karotenoidler içerisin-de ise β-kriptoksantin miktarı 2,40 mg/kg kuru ağırlık olarak rapor edilmiştir.

Howe ve Anumihardjo (2006) içerik olarak iyileştirilmiş mısırda karotenoidleri ayırmak ve kromotografik analizi engelleyen diğer yağları uzaklaştırmak için ısı ve sabunlaştırma işlemi uygulamışlardır. Sabunlaştırmayı tam olarak sağlamak için baz ilave etmişlerdir. Bu çalışmada birçok yöntemi incelenmişlerdir ve en güvenilir yöntemin Kurilich ve Juvik'in (1999) kullandığı yöntem olduğunu belirlemişlerdir. Bu yöntemde mısırdan karotenoidlerin en iyi şekilde ekstraksiyonunu sağlamışlardır. Mısır matrisindeki karotenoidleri uzaklaştırmadan önce sabunlaştırma işlemi yapıldığında karotenoidlerin konsantrasyonu, ekstraksiyon yapıldıktan sonra sabunlaştırma yapılmış karotenoidlerin konsantrasyonundan daha yüksek bulunmuştur.

Hulshof ve ark. (2007) yapmış oldukları çalışmada, mısır bitkisinde bulunan A vitaminine bağlı karotenoidlerin seviyesini belirlemek için bir metot oluşturmuşlardır. Bu metot ile mısırdaki vitamin A karotenoidlerinin yarı, düşük ve orta düzeyleri ile yüksek seviyeleri arasında yarı-kantitatif analiz yapılmasını sağlayan hızlı bir tarama yöntemi geliştirmişlerdir. 13 mısır hattındaki karotenoidler aseton/hekzan ile ekstrakte edilerek karotenler ve monohidroksi karotenoidler aktif olmayan alüminyum kolon üzerinde ayrılmıştır. İki fraksiyon 450 nm'de absorpsiyon ile ayrı ayrı belirlenmiş daha sonra fraksiyonlardan spektrofotometrik olarak belirlenmiş karotenoidler ve ekstraksiyon ile HPLC marifetiyle belirlenen retinol eşdeğerleri (RE) miktarı arasında regresyon çizgileri oluşturulmuştur. Oluşturulan metot ile tüm numunelerin tam bir HPLC analizine ihtiyaç duymadan, mısır tohumlarının pro-vitamin A seviyeleri üzerinden hızlı taramaya izin veren bir yöntem geliştirmişlerdir ve dolayısıyla analizlerin maliyetini düşürmüşlerdir.

Biehler ve ark. (2009), 28 farklı meyve ve sebzede bulunan toplam karotenoid miktarını belirlemek için spektrofotometrik ölçümler ve hızlı bir ekstraksiyon protokolünü temel alarak üç farklı yöntemi karşılaştırarak bu gıdalardaki beş baskın karotenoid fraksiyonunu (beta-karoten, zeaksantin, likopen, lutein, betakriptoksantin) incelemişler ve tüm sonuçları HPLC ile karşılaştırmışlardır. Genel olarak, sabunlaşma önemli karotenoid kayıplarına yol açmıştır. En yüksek değerlerin elde edildiği yöntem ile HPLC arasındaki farkın önemli olduğu, diğer yöntemlerin ise istatistiki olarak önemli bir fark yaratmadığı sonucuna ulaşmışlardır.

Rivera ve Canela (2012) mısırdaki karotenoidlerin analizi için etkili bir ekstraksiyon metodunun geliştirilmesi amacıyla sıvı kromotografisi kullanmışlardır. Farklı solventler kullanarak ekstrasyon işlemini gerçekleştiren araştırmacılar karotenoid tayininde çözücü

olarak kullanılan solventin etkisini incelemişlerdir. Metanol-etil asetat ve metanol-tetrahidrofuran karışımını mısır endosperminden karotenoidlerin ekstraksyonu için en etkili solvent sistemi olarak belirlemişlerdir. Uygun solvent enjeksiyonunun seçiminde önemli olabilecek üç anahtar faktörü mobil faz ve enjeksiyon solvent arasındaki uyumluluk, karotenoid polaritesi ve yapıdaki (matristeki) içerik olarak belirlemişlerdir.

Maurer ve ark. (2014) mevcut karotenoid analizi için yapılan kromatografik yöntemlerin, düşük verim nedeniyle tüm endüstriyel bileşiklerin tamamen ayrılması için 60 dakika gibi uzun bir süre gerektirdiğini ve endüstriyel uygulamaları kısıtladığını söylemişlerdir. Brokoli (*Brassica oleracea* L. *var*), havuç (*Daucus carota*), mısır (*Zea mays*) ve domates (*Solanum lycopersicum*) içerisinde bulunan tüm büyük karotenoidleri ayıran gelişmiş bir UHPLC-UV yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik yöntemin, yapısal izomerler lutein / zeaksantin ve α- / β-karoten de dahil olmak üzere, ilgili 11 karotenoidin çözünürlüğüne izin vererek 13,5 dakika içinde tamamladığını ortaya koymuşlardır.

Konuşkan ve Canbaş (2014) yapmış oldukları çalışmada, çeşit ve ekstraksiyon yöntemlerinin zeytinyağlarının fenolik bileşikleri ve kimyasal bileşimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. İki ekstraksiyon yöntemini karşılaştırmışlardır (üç fazlı santrifüjleme sistemi ve çözücü ekstraksiyon) ve varyans analizi sonucunda ekstraksiyon sistemleri arasında istatistiki açıdan önemli bir fark olduğu ($p \leq 0.05$) sonucuna ulaşmışlardır. Fenolik bileşikler, toplam tokoferol, klorofil, karotenoid içeriği ve zeytinyağının acı indeksi olmak üzere bazı kalite parametrelerinin ekstraksiyon yönteminden etkilendiği sonucuna ulaşmışlardır.

BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada materyal olarak 150 farklı mısır genotipi kullanılmıştır. Bu genotipler; Karadeniz bölgesinden toplanmış olan 50 adet köy popülasyonu, ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nde yürütülen ıslah çalışmalarından sağlanan 80 farklı materyal (biyokimyasal içerik bakımından farklılık gösteren ebeveyn ve hibrit genotipler) ile ülkemizde tane mısır için ticari amaçlı yetiştiriciliği yapılan atdişi ve sert tane yapısına sahip 20 hibrit çeşitten oluşmuştur (Çizelge 1). ÇOMÜ ıslah materyalleri 2013 ile 2015 yılları arasında yapılan çalışma ile materyal değerlendirmelerinden elde edilmiş ve uygun şartlarda (+4 °C'de) muhafaza edilmiş örneklerdir. Çalışma için kullanılan ticari hibritler ise Bursa ve Çanakkale bölgesindeki tohumluk şirketlerinden temin edilmiştir. Ticari hibritlere ait materyaller 2015 yılında üretimi yapılan verim denemeleri ve sözleşmeli üretim yapan çiftçilerin yetiştiricilik yaptığı tarlalardan temin edilen örneklerdir. Bu ticari örnekler izole alanlarda yetiştirilen genotiplerden alınmış olup genotipik olarak homojen yapıya sahiptirler. Bu örnekler de temin edildiğinden itibaren uygun şartlarda saklanmıştır. Yerel genotipler Ordu Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nde 2013 yılında yürütülen denemelerden temin edilmiş ve uygun şartlarda saklanan materyallerdir. Köy popülasyonlarının incelenecek özellik bakımından yüksek bir değişkenliğe sahip olması beklenmekte ancak bu örnekler içerisinde grup içi değişkenliğin de yüksek olabileceği öngörülmüştür. Köy popülasyonlarının elde edildiği denemede de örnekler kontrollü tozlama uygulamaları ile elde edildiğinden grup içi değişimin deneme amaçlarını olumsuz şekilde etkilemeyeceği düşünülmüştür. Deneme materyalinin tamamı aynı zamanda TÜBİTAK 2150867 nolu projeye ait materyallerdir.

Çizelge 3.1. Projede materyal olarak kullanılan genotiplere ait genel bilgiler

Grup	**Kod**	**Kaynak**	**İlçe**	**Mahalle/Köy**	**Varyete Grubu**
KöyPopülasyonu	TP1	Karabük	Merkez	-	Atdişi
KöyPopülasyonu	TP2	Trabzon	Of	Eskipazar	Atdişi
KöyPopülasyonu	TP3	Trabzon	Beşikdüzü	Türkelli bld.	Atdişi
KöyPopülasyonu	TP4	Trabzon	Akçaabat	Düzköy	Atdişi
KöyPopülasyonu	TP5	Samsun	Merkez	-	Atdişi
KöyPopülasyonu	TP6	Kastamonu	Merkez	Kurtköy	Atdişi

Çizelge 3.1.'in devamı

KöyPopülasyonu	TP7	Artvin	Arhavi	Kavak	Atdişi
KöyPopülasyonu	TP8	Samsun	Merkez	-	Atdişi
KöyPopülasyonu	TP9	Ordu	Ilıca	-	Atdişi
KöyPopülasyonu	TP10	Samsun	Takum	Kayagüney	Atdişi
KöyPopülasyonu	TP11	Giresun	Çavuşlu bld.	-	Atdişi
KöyPopülasyonu	TP12	Ordu	Ilıca	-	Atdişi
KöyPopülasyonu	TP15	Zonguldak	Ormanlı	Ortacı	Atdişi
KöyPopülasyonu	TP16	Tokat	-	-	Atdişi
KöyPopülasyonu	TP17	Giresun	-	Mesudiye	Atdişi
KöyPopülasyonu	TP18	Trabzon	Akçaabat	Demirkapı	Atdişi
KöyPopülasyonu	TP19	Tokat	Erbaa	-	Atdişi
KöyPopülasyonu	TP22	Samsun	-	-	Atdişi
KöyPopülasyonu	TP28	Kastamonu	Taşköprü	Çepni	Sert
TescilliÇeşit/Hat	TP33	Mısır Araştırma İstasyonu	-	-	Atdişi
KöyPopülasyonu	TP39	Giresun	-	-	Sert
KöyPopülasyonu	TP40	Karabük	Eskipazar	Ovaköy	Sert
KöyPopülasyonu	TP41	Zonguldak	Devrek	Özpınar	Sert
KöyPopülasyonu	TP42	Ordu	-	Ilıca	Sert
KöyPopülasyonu	TP43	Giresun	-	Kışla	Sert
KöyPopülasyonu	TP44	Amasya	Merkez	Torkuncak	Sert
KöyPopülasyonu	TP46	Zonguldak	Ereğli	Dağlıca	Sert
KöyPopülasyonu	TP47	Giresun	Bulancak	Kışla	Sert
KöyPopülasyonu	TP51	Zonguldak	Devrek	Eğerci	Sert
KöyPopülasyonu	TP52	Karabük	Eskipazar	Ovaköy	Sert
KöyPopülasyonu	TP 5	Karabük	-	-	Sert
KöyPopülasyonu	TP56	Zonguldak	Devrek	Üstpınar	Sert
KöyPopülasyonu	TP60	Ordu	-	Ilıca	Sert
KöyPopülasyonu	TP61	Kastamonu	Taşköprü	Çepni	Sert
KöyPopülasyonu	TP62	Giresun	-	-	Sert
KöyPopülasyonu	TP63	Samsun	Vezirköprü	İncesu	Sert
KöyPopülasyonu	TP66	Ordu	Gölköy	Süleymaniye	Sert
KöyPopülasyonu	TP68	Tokat	Turhal	-	Sert
KöyPopülasyonu	TP69	Ordu	-	Ilıca	Sert
KöyPopülasyonu	TP70	Kastamonu	İhsangazi	Beşköy	Sert
KöyPopülasyonu	TP72	Karabük	Safranbolu	Düzce	Sert
KöyPopülasyonu	TP73	Giresun	Görele	-	Sert
KöyPopülasyonu	TP81	Kastamonu	-	Çavundur	Sert
KöyPopülasyonu	TP82	Kastamonu	Araç	Vakıfakkeçi	Sert
KöyPopülasyonu	TP87	Sinop	Erfelek	-	Sert
KöyPopülasyonu	TP88	Ordu	Aybastı	SağlıkMah.	Sert
KöyPopülasyonu	TP89	Karabük	Eskipazar	Kabaarmut	Sert
KöyPopülasyonu	TP90	Samsun	Vezirköprü	İncesu	Atdişi
KöyPopülasyonu	TP91	Tokat	-	-	Atdişi

Çizelge 3.1.'in devamı

KöyPopülasyonu	TP92	Zonguldak	Devrek	Üstpınar	Atdişi
KöyPopülasyonu	TP95	Tokat	Merkez	-	Atdişi
IslahMateryali	TP113	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
TescilliÇeşit/Hat	TP121	MısırAraştırmaİstasyonu	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP123	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP125	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Sert
IslahMateryali	TP128	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP129	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP131	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP133	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP134	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP137	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Sert
IslahMateryali	TP138	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP139	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP140	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP141	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP145	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Sert
IslahMateryali	TP146	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP147	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMa eryali	TP149	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Sert
IslahMateryali	TP151	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP153	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
TescilliÇeşit/Hat	TP154	May Tohum	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP155	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP156	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Sert
IslahMateryali	TP159	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Sert
IslahMateryali	TP160	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
TescilliÇeşit/Hat	TP162	May Tohum	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP163	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP164	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP165	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP166	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP167	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP168	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Sert
IslahMateryali	TP169	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Sert
IslahMateryali	TP170	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Sert
IslahMateryali	TP171	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP172	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP173	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP174	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP175	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Sert
IslahMateryali	TP176	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP177	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert

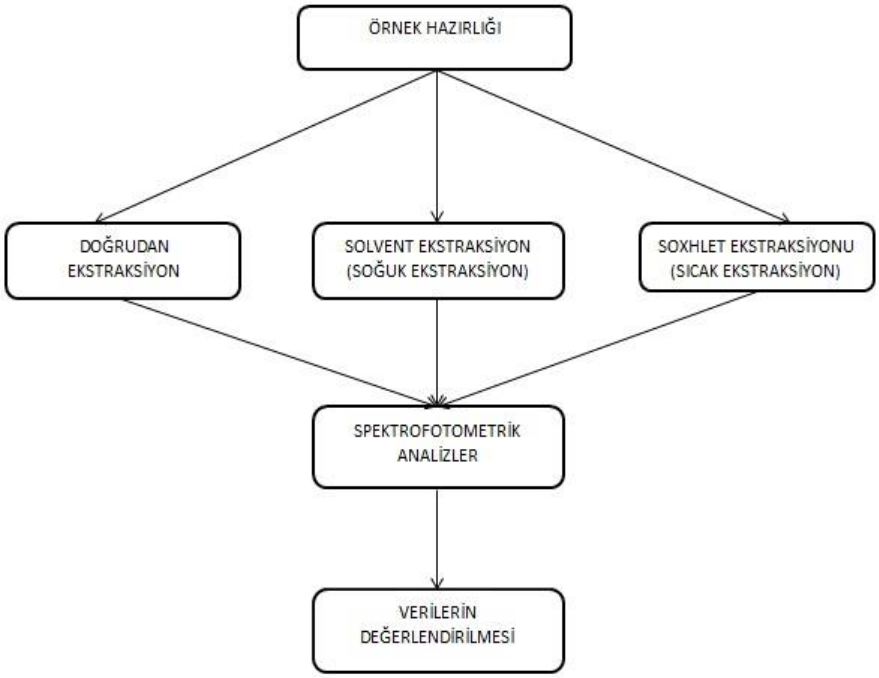
Çizelge 3.1.'in devamı

IslahMateryali	TP178	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP179	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP182	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP183	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP184	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP185	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP186	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Sert
IslahMateryali	TP187	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP188	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP189	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP190	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP191	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Sert
IslahMateryali	TP192	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Sert
IslahMateryali	TP193	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP194	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP195	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Sert
IslahMateryali	TP196	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
TescilliÇeşit/Hat	TP201	Progen	-	-	Atdişi
TescilliÇeşit/Hat	TP202	Progen	-	-	Atdişi
TescilliÇeşit/Hat	TP203	Progen	-	-	Atdişi
TescilliÇeşit/Hat	TP204	Monsanto	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP205	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP206	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP207	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP209	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP210	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP211	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP212	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP213	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP214	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP216	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP217	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP219	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP220	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP221	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP222	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP223	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Sert
IslahMateryali	TP225	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Sert
TescilliÇeşit/Hat	TP226	Limagrain	-	-	Sert
TescilliÇeşit/Hat	TP227	Limagrain	-	-	Atdişi
TescilliÇeşit/Hat	TP228	Limagrain	-	-	Atdişi
TescilliÇeşit/Hat	TP229	Monsanto	-	-	Atdişi

Çizelge 3.1.'in devamı

TescilliÇeşit/Hat	TP230	Limagrain	-	-	Atdişi
TescilliÇeşit/Hat	TP231	Limagrain	-	-	Atdişi
TescilliÇeşit/Hat	TP232	Monsanto	-	-	Atdişi
TescilliÇeşit/Hat	TP233	Monsanto	-	-	Atdişi
TescilliÇeşit/Hat	TP234	Monsanto	-	-	Atdişi
TescilliÇeşit/Hat	TP235	Limagrain	-	-	Atdişi
TescilliÇeşit/Hat	TP236	Monsanto	-	-	Atdişi
TescilliÇeşit/Hat	TP237	Monsanto	-	-	Sert
IslahMateryali	TP238	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP239	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi
IslahMateryali	TP242	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Sert
IslahMateryali	TP244	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Sert
IslahMateryali	TP246	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Sert
IslahMateryali	TP247	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Atdişi-Sert
IslahMateryali	TP248	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Sert
IslahMateryali	TP250	ÇanakkaleOnsekiz Mart Ü.	-	-	Sert

Çalışmaya materyal teşkil eden genotip örnekleri Şekil 3.1'de şematize edilen adımlar ile analize tabi tutulmuştur. Örnek hazırlığı aşamasında temizlenen yaklaşık 50 gr mısır taneleri laboratuvar tipi değirmende (Fritsch, pulverisette 14, Almanya) 0,5 mm'lik elek ile öğütülmüştür.



Şekil 3.1. Çalışmada izlenilen yolun ana hatları

3.2. Ekstraksiyon Yöntemleri

Öğütülen örnekler üç farklı ekstraksiyon yöntemine tabi tutulmuştur. Bunlar;

1- Soxhlet Ekstraksiyonu
2- Soğuk Ekstraksiyon
3- Doğrudan Ekstraksiyon

3.2.1. Soxhlet Ekstraksiyonu

Isıl işlem ile yağ ekstraksiyonu Soxhlet yöntemi ile AOAC (2005) metoduna uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre 10 gr öğütülmüş numune Soxhlet kartuşlarına konulduktan sonra cihaza yerleştirilip dietil eter kullanarak (yaklaşık 180 mL) 6 saat süresince ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Bu işlem sonrasında ham yağ + çözücü karışımı döner evaporatörde 40 °C'de ayrılarak ham yağ örnekleri elde edilmiştir. Bu örnekler, karotenoid ve tokoferol analizleri yapılıncaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Soğuk ektraksiyon

Soğuk ektraksiyon yönteminde yaklaşık 10 gr öğütülmüş numune Soxhlet kartuşlarına konularak 100 mL dietil eter içerisinde 16 saat süre ile bekletilmiştir. Ardından ham yağ ve çözücü olarak kullanılan eter döner evaporatörde 40 °C'de ayrılmıştır. Elde edilen ham yağlar ependorf tüplerine alınarak uygun şartlarda muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Doğrudan ektraksiyon

Doğrudan ekstraksiyona dayalı analizlerde Kurilich ve Juvik (1999) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Örneklerin hazırlanması amacıyla 600 mg örnek cam tüp içerisine tartılıp örnek üzerine 6 mL etanol ve %0,1lik BHT karışımı eklenmiştir. Daha sonra örnekler 85 °C'de 5 dk bekletilmiştir. Örnekler su banyosundan alındıktan sonra 120 µL %80'lik KOH eklemesi yapılıp, 20 sn vortekslendikten sonra 10 dk su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra su banyosundan alınan örnekler hemen buz küvetine yerleştirilip üzerlerine 3 mL deiyonize su ilave edilmiştir. Daha sonra örneklere 3 mL hekzan eklenip, örnekler vortekslendikten sonra 1200 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir test tüpüne alındıktan sonra kalan kısım iki kez daha hekzan ile ekstrakte edilip toplanan kısım 3 mL H_2O ile yıkanmıştır. Santrifüjleme sonrasında üst faz yeni tüpe aktarılmıştır.

3.3. Spektrofotometrik Tayinler

3.3.1. Karotenoid Ölçümleri

Soxhlet, soğuk ve doğrudan ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen yağ örneklerinin spektrofotometrik okumaları 450 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

Soxhlet yöntemi ve soğuk ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen örneklerden 50 µL'lik yağ alınarak 10 mL hekzan içerisinde çözülmüştür. Daha sonra 20 saniye süre ile vortekslenip ve kuvartz küvet içerisine 3 mL örnek alınarak UV-Spektrofotometre cihazında 450 nm dalga boyunda absorbans değeri kaydedilmiştir.

Doğrudan ektraksiyon yönteminden sonra elde edilen hekzan ve yağ karışımından 3 mL örnek kuvars küvet içerisine alınmış ve örneğe ait absorbans değeri UV-Spektrofotometre cihazında (PG Instruments, İngiltere) 450 nm dalga boyunda kayıt edilmiştir. Elde edilen absorbans değerlerinden karotenoid içeriğinin hesaplanması için Rodriguez-Amaya ve Kimura (2004) tarafından önerilen aşağıdaki formülden yararlanılmıştır.

$$TCC\ (\mu g\ g^{-1}) = \frac{25\ x\ A1\ x\ 10^4}{2500\ x\ W} \qquad (3.1)$$

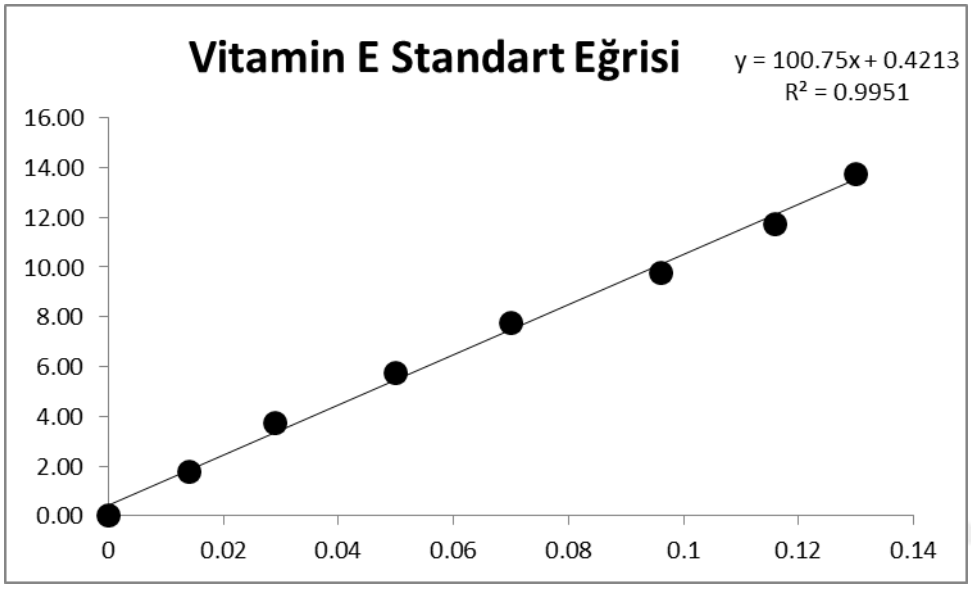
Formülde; A1: absorbans değerini, W: örnek ağırlığı/hacmini göstermektedir. Doğrudan ektraksiyonda hesaplama sonucunda 1 gr numunede mikrogram cinsinden karotenoid içeriği tespit edilmektedir. Yağ örneklerinden elde edilen sonuçları öğütülmüş numunedeki karotenoid içeriğine dönüştürmek için ektraksiyon yönteminden elde edilen yağ oranı değerleri ve analizlerde kullanılan yağ örneğinin ağırlığı (~0,035 gr) kullanılmıştır.

3.3.2. Tokoferol Ölçümleri

Tokoferol ölçümleri Baker ve Frank (1968) tarafından önerilen spektrofometrik yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde tokoferol içeriği demir çözeltisi ile demir iyonlarına indirgendikten sonra dipyridyl ile kırmızı renkte bir kompleks oluşturmak ve bu solüsyonun 520 nm'de absorbans değişiminden yararlanmak suretiyle tespit edilmektedir. Soxhlet ve soğuk ektraksiyon yönteminden elde edilen örneklerden 20 µL yağ örneği, doğrudan ektraksiyonda ise ektraksiyon sonrasında kalan yağ artığı alınmış ve 3 mL etanol içerisinde çözülmüştür. 1,5 mL ksilen eklenerek daha sonra 20 saniye vortekslenerek 30 dk süresince santrifüj edilmiştir. Santrifüjden çıkarılan örneklerden yeni bir tüp içerisine 1

mL'lik faz alınmış, daha sonra üzerine 2-2 bipyridyl çözeltisi (%0,2) ve 330 µL $FeCl_3$ (demir klorür) (%0,5) ilave edilmiştir. Daha sonra örnekler vortekslenmiş ve 3 mL kuvars küvet içerisine alınarak a UV-Spektrofotometre cihazında (PG Instruments, İngiltere) 520 nm dalga boyunda absorbans değeri kaydedilmiştir.

Örneklerin tokoferol içeriklerini tespit etmek amacıyla Vitamin E standardı ile (Sigma, ABD) ile oluşturulan aşağıdaki kurveden (0 ile 14 migrogram/mL arası) yararlanılmıştır.



Şekil 3.2. Vitamin E Standart Eğrisi

Kürveden elde edilen sonuçlar aşağıdaki formüle uygulanarak 100 mL örnek içerisindeki tokoferol içeriği mg cinsinden hesaplanmıştır.

$$TC\ (mg\ 100\ mL^{-1}) = \frac{A1\ x\ 100}{1{,}5\ x\ 1000} \qquad (3.2)$$

Formülde; A1 kürveden elde edilen konsantrasyon değerini göstermektedir. Bu hesaplamadan elde edilen değer ile örnek ağırlıklarına ait kaydedilen değerler kullanılarak örnek içerisindeki tokoferol miktarı belirlenmiştir.

3.4. İstatistik Analizler

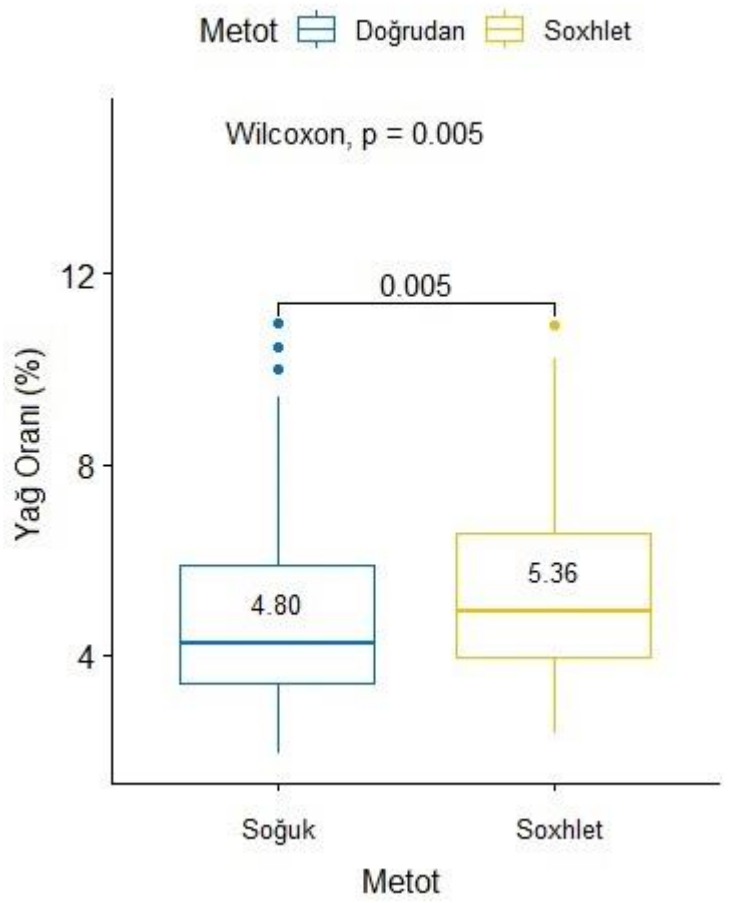
Yağ içeriği, karotenoid ve tokoferol içerikleri bakımından ekstraksiyon yöntemlerinin kıyaslanması amacıyla Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Farklı

ekstraksiyon yöntemlerinden (Doğrudan öğütülmüş örnek, Soğuk ekstraksiyon, Soxhlet ekstaksiyonu) elde edilen sonuçlar arasındaki ilişkiler basit doğrusal regresyon yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Yağ Oranı

Soxhlet yöntemi ile tespit edilen yağ oranlarına ait ortalama değer (%5,36), soğuk ekstraksiyon ile tespit edilen yağ oranı ortalamasından (%4,80) yüksek bulunmuştur.

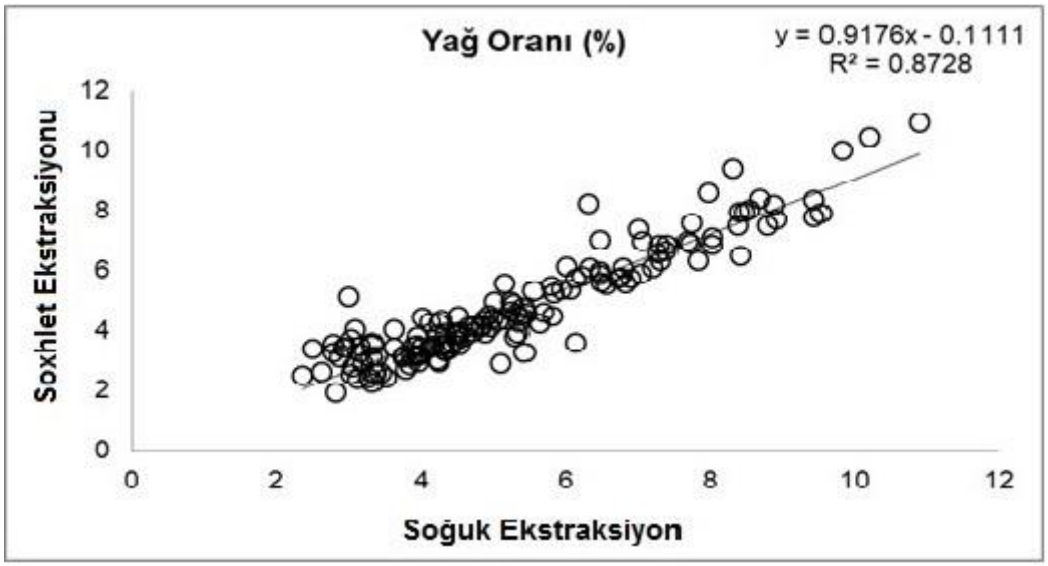


Şekil 4.1. Soxhlet ve soğuk ekstraksiyona ait yağ oranı (Örnek Sayısı: 150)

İstatistik analiz sonuçlarına göre Soğuk ekstraksiyon ve Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen yağ oranı değerleri arasında istatistiki olarak önemli ($P<0,05$) bir fark olduğu saptanmıştır (Şekil 4.1). Soğuk ekstraksiyon yönteminin Soxhlet yöntemine göre nispeten ucuz ve hızlı bir yöntem olduğu düşünülürse, araştırıcıların soğuk ekstraksiyonu tercih etme yönünde bir eğilimleri olması kaçınılmazdır. Soğuk ekstraksiyonun tercih edilmesi ile kaybedilecek hassasiyetin çok önemli olmadığı durumlar olabilir. Örneğin, çok sayıda genotipin birbirlerinden olan farklarının tespit edilmesinin gerektiği, fakat bu genotiplerin sahip olduğu yağ oranlarının yüksek hassasiyetle tespit edilmesinin çok da elzem olmadığı

ıslah çalışmaları gibi durumlarda soğuk ektraksiyon yöntemi herhangi bir sorun yaratmaksızın Soxhlet yöntemini ikame edebilir. Buna karşın yağ oranın daha hassas belirlenmesi gerekiyorsa Soxhlet (sıcak ekstraksiyon) yönteminin kullanılması daha doğru olacaktır.

Yağ içeriği analizinden elde edilen veriler basit doğrusal regresyon analizine tabi tutulmuş ve farklı ektraksiyon yöntemleri arasında farklılıkların olup olmadığı test edilmiştir. Soxhlet (sıcak ekstraksiyon) ve soğuk ekstraksiyon yöntemlerinden elde edilen yağ oranları arasındaki ilişki Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



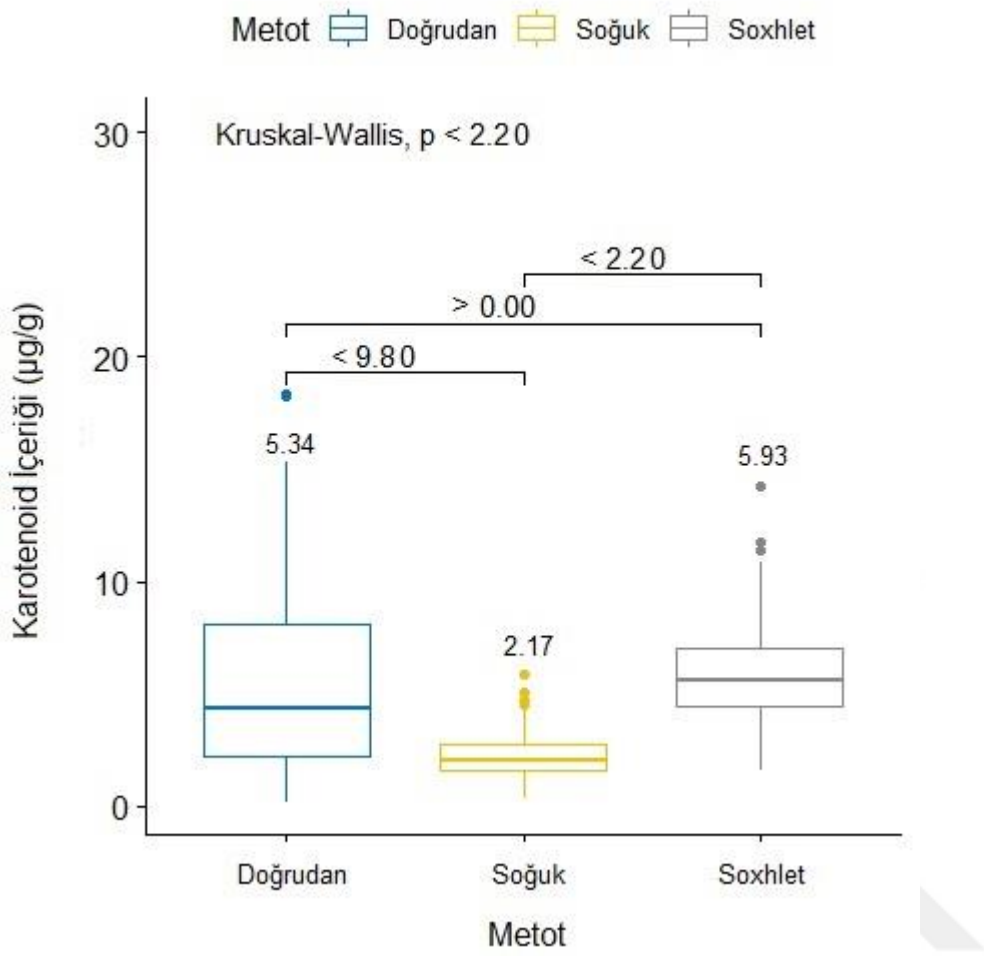
Şekil 4.2. Soxhlet (Sıcak) - Soğuk ekstraksiyon yöntemleri arasındaki regresyon analizi (Örnek Sayısı: 150)

Bağımlı değişkendeki varyasyonun bağımlı değişken ya da model tarafından açıklanabilen payı R^2=0,873 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla genotiplerin sıcak ekstraksiyon değerlerindeki değişimin %87,3'lük kısmı bu genotiplerin soğuk ekstraksiyon değerleri tarafından açıklanabilmektedir. Soğuk ekstraksiyon ile sıcak ekstraksiyon arasında %87,3'lük pozitif yönde doğrusal bir ilişki vardır (Şekil 4.2). Yani soğuk ve sıcak ekstraksiyon sonuçları önemli seviyede bir benzerlik göstermektedir. *Soğuk ekstraksiyon değeri= 0,5340 + 1,009 Soxhlet ekstraksiyon değeri* şeklinde hesaplanan regresyon denkleminden yararlanılarak Soxhlet ekstraksiyon değerleri belli olan genotiplerin soğuk ekstraksiyon değerleri makul bir hassasiyet ile tahmin edilebilir. Ancak, burada dikkat edilmesi gereken nokta, oluşturulan regresyon denkleminden yararlanılarak yapılacak tahminlerin sadece bağımsız değişken olan Soxhlet ekstraksiyon değerlerinin analiz

sınırları içinde bir anlamının olduğudur (Mendeş, 2013). Bu veriler ışığında, çok fazla örnek (genotip) sayısına sahip olan kişi veya kurumların ekstraksiyon analizlerini daha hızlı yapabilmeleri için sıcak ekstraksiyon yerine soğuk ekstraksiyon kullanılmasının uygun olacağı ifade edilebilir. Zira soğuk ekstraksiyon ile bir günde muamele edilen örnek sayısı Soxhlet yöntemi ile muamele edilen örnek sayısının üç katına kadar çıkmaktadır.

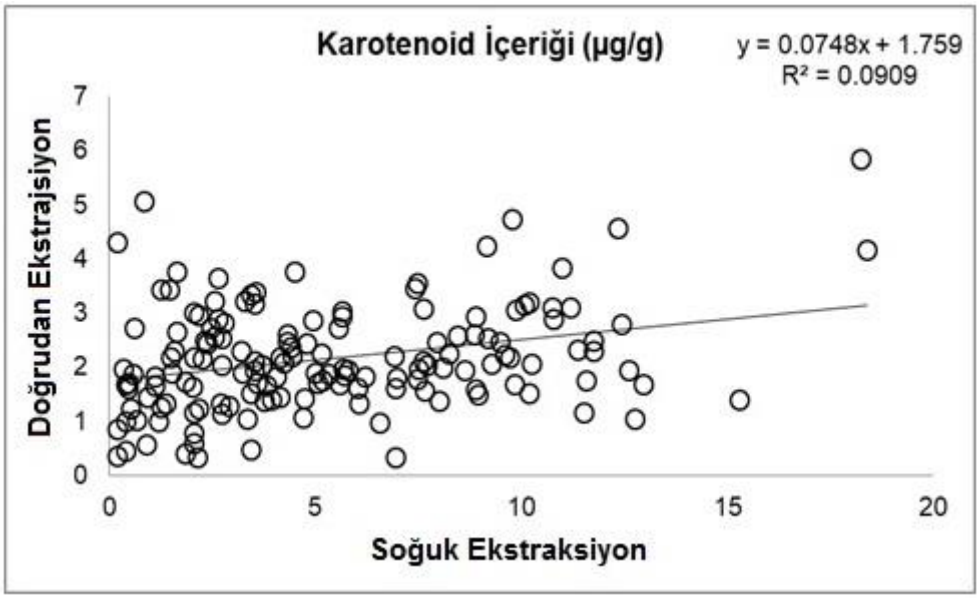
4.2. Karotenoid İçeriği

Yapılan istatistiki analiz sonuçlarına göre, karotenoid içerikleri bakımından var olan varyasyon üzerinde yağ ekstraksiyonu yönteminin önemli bir faktör olduğu ortaya çıkmıştır ($P<0,05$). Ekstraksiyon yöntemlerinin birbirleri ile kıyaslanması sonucunda her üç yönteminden elde edilen karotenoid miktarlarının istatistiki açıdan önemli farka sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3). Karotenoid içeriği ile yöntemler arası miktarların birimlerini eşleştirmek amacıyla 1 gram öğütülmüş numuneden çıkan yağ içerisindeki karotenoid miktarı hesaplanmıştır. Bu hesaplama sonucunda doğrudan ekstraksiyon yönteminde 5,34 µg/g, soğuk ekstraksiyon yönteminde 2,17 µg/g ve Soxhlet yönteminde 5,93 µg/g karotenoid içeriği saptanmıştır. Maarasyid ve ark. (2014) yapmış oldukları çalışmada Soxhlet yöntemi ile elde edilen karotenoid miktarını diğer yöntemlere göre daha yüksek bularak yapmış olduğumuz çalışmayı destekler nitelikte bir sonuca ulaşmışlardır. Buna sebep olarak da doğrudan ekstraksiyon yönteminde gerçekleşen sabunlaşma işlemi sonrası meydana gelen karotenoid kayıpları gösterilmiştir. Benzer şekilde Lim ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada; A vitamini elde etmek için Soxhlet ekstraksiyonunun doğrudan ekstraksiyona göre %13 daha yüksek karotenoid verimine sahip olduğu belirlemişlerdir. Çalışmamızda da Soxhlet ekstraksiyonunun en yüksek karotenoid içeriklerini ortaya koyduğu görülmüştür (Şekil 4.3.). Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular da geçmişte yapılan araştırmaların bulgularını doğrular niteliktedir. Soxhlet ekstraksiyonundan soğuk ekstraksiyona göre 1,12 kat daha fazla yağ elde edilmesine rağmen bu iki yöntem arasında mukayese edilen karotenoid miktarı bakımından ise Soxhlet ekstraksiyonundan soğuk ekstraksiyona göre 2,73 kat daha fazla karotenoid elde edildiği sonucu karşımıza çıkmaktadır. Bu bulguya dayanarak Soxhlet ektraksiyonunda daha yüksek karatenoid ekstrakte edilebildiği söylenebilir. (Şekil 4.1.). Diğer taraftan karotenoidler yağda çözünen bileşenler olduğundan ötürü yüksek yağ elde edilen ekstraksiyon yöntemlerinde karotenoid veriminin de yüksek olacağı ifade edilebilir.

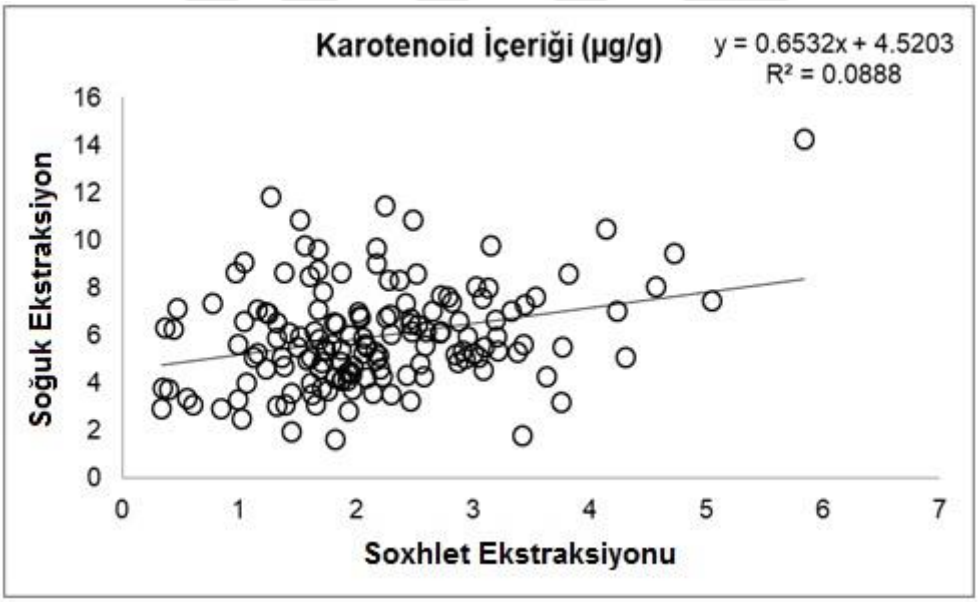


Şekil 4.3. Ekstraksiyon yönteminin karotenoid içeriğine etkisi (Örnek Sayısı: 150)

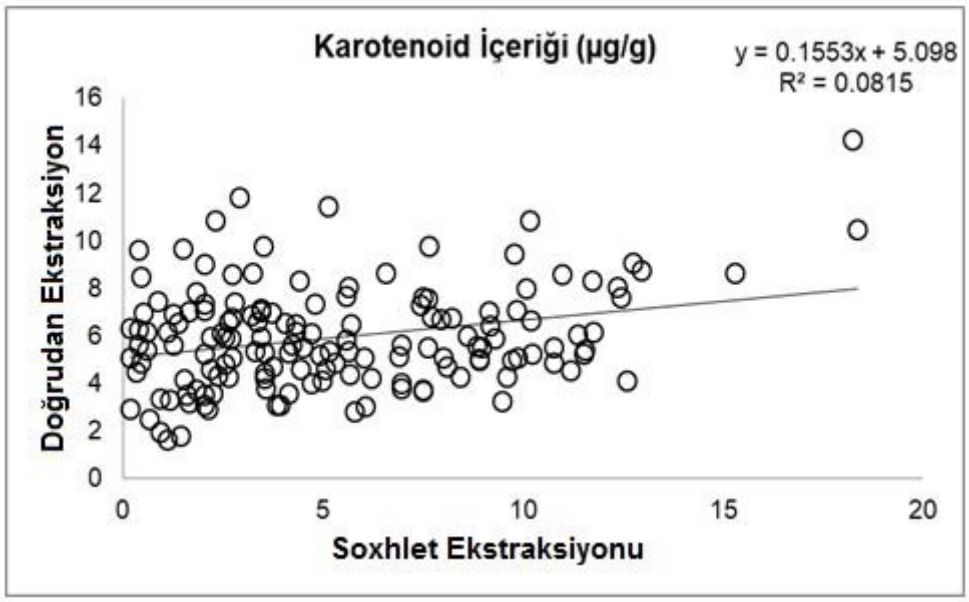
Bu çalışmada ekstraksiyon yöntemi olarak denenen üç metot ile tespit edilen karotenoid değerleri arasındaki ilişkiler Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da sunulmuştur. Her üç yöntemden elde edilen karotenoid içeriği değerleri arasındaki regresyon katsayılarının oldukça düşük olduğu dikkat çekmiştir. Soğuk ekstraksiyon ile doğrudan ekstraksiyon arasında yapılan regresyon analizi sonucunda R^2=0,090, Soxhlet ekstraksiyonu ile soğuk ekstraksiyon R^2 değeri 0,088, Soxhlet ve doğrudan ekstraksiyon arasındaki R^2 değeri ise 0,081 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.4. Karotenoid içeriği için soğuk ve doğrudan ekstraksiyon yöntemleri arasındaki regresyon analizi (Örnek Sayısı: 150)



Şekil 4.5. Karotenoid içeriği için Soxhlet ve soğuk ekstraksiyon yöntemleri arasındaki regresyon analizi (Örnek Sayısı: 150)



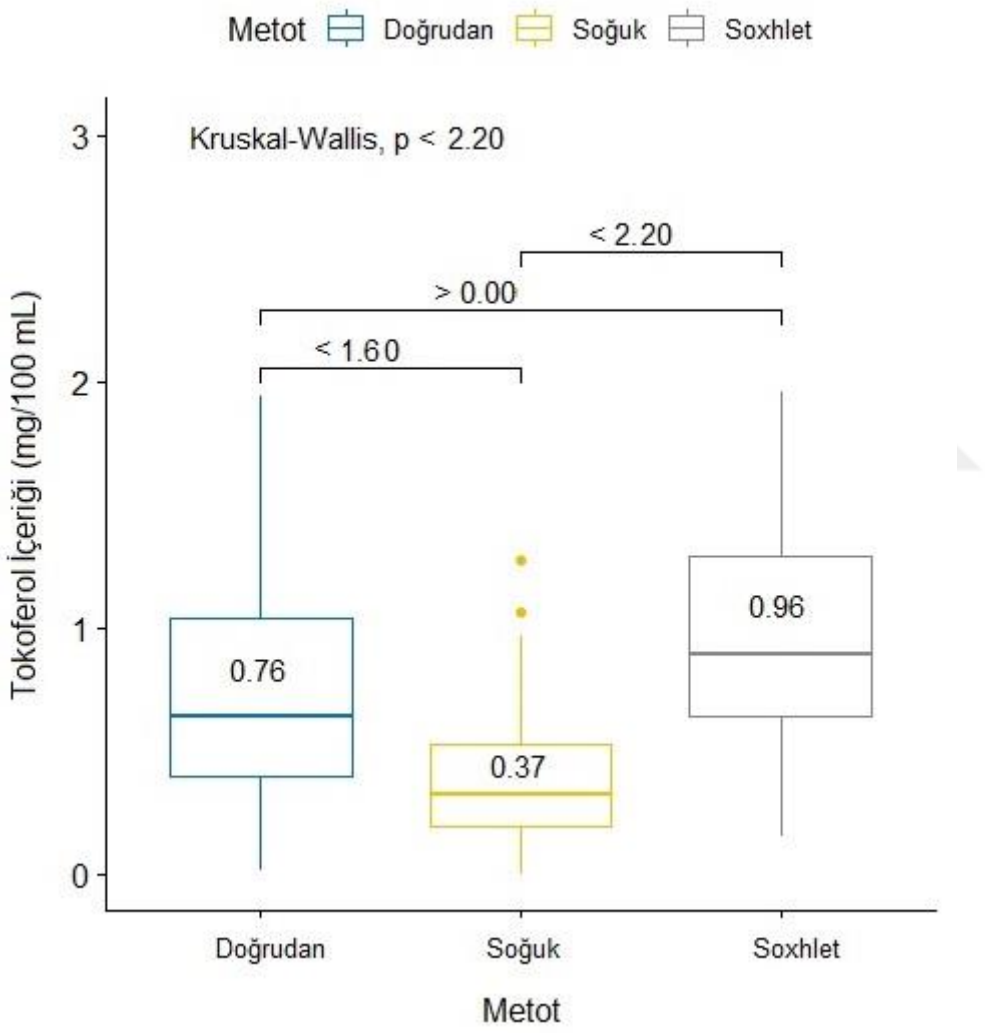
Şekil 4.6. Karotenoid içeriği için Soxhlet ve doğrudan ekstraksiyon yöntemleri arasındaki regresyon analizi (Örnek Sayısı: 150)

Bu bulgular farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen yağlar üzerinden yapılan analizler sonucu bulunan değerlerin karotenoid içeriği tahminlerinde birbirleri yerine kullanılmasının doğru olmadığını göstermektedir (Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6).

4.3. Tokoferol İçeriği

UV-Spektrofotometre ile elde edilen absorbans değerleri basit doğrusal regresyon analizine tabi tutulmuştur. Bunun neticesinde ekstraksiyon yöntemleri arasındaki tokoferol analizine ait P-değeri 0,000 bulunmuştur. Bu değer yöntemler arasında istatistiki olarak önemli bir fark olduğunu ifade etmektedir. Tokoferol içeriğinin ekstraksiyon yöntemlerine ait istatistik analizinde ise Soxhlet yönteminin diğer yöntemlere nazaran birim miktarda daha yüksek tokoferol içeriği sunduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.7). Soğuk ekstraksiyon ile elde edilen 150 örnek içerisindeki ortalama tokoferol içeriği 0,37 mg/100mL, doğrudan ekstraksiyon ile elde edilen 0,76 mg/100mL ve Soxhlet yöntemi ile elde edilen değer ise 0,96 mg/100mL olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.7). Tokoferol içeriğindeki bu farklılıkları karotenoid içeriğinde olduğu gibi ekstraksiyon yöntemlerinden elde edilen yağ miktarına bağlamak mümkündür. Ekstrakte edilen tokoferol miktarının Soxhlet ekstraksiyonu>Doğrudan ekstraksiyon>Soğuk ekstraksiyon şeklinde sıralandığı görülmektedir. Isıl işlem uygulamasının ekstrakte edilen tokoferol miktarının artışına neden olduğu dikkat çekmektedir (Şekil 4.7). Soxhlet yönteminde var olan ısıl işlemin

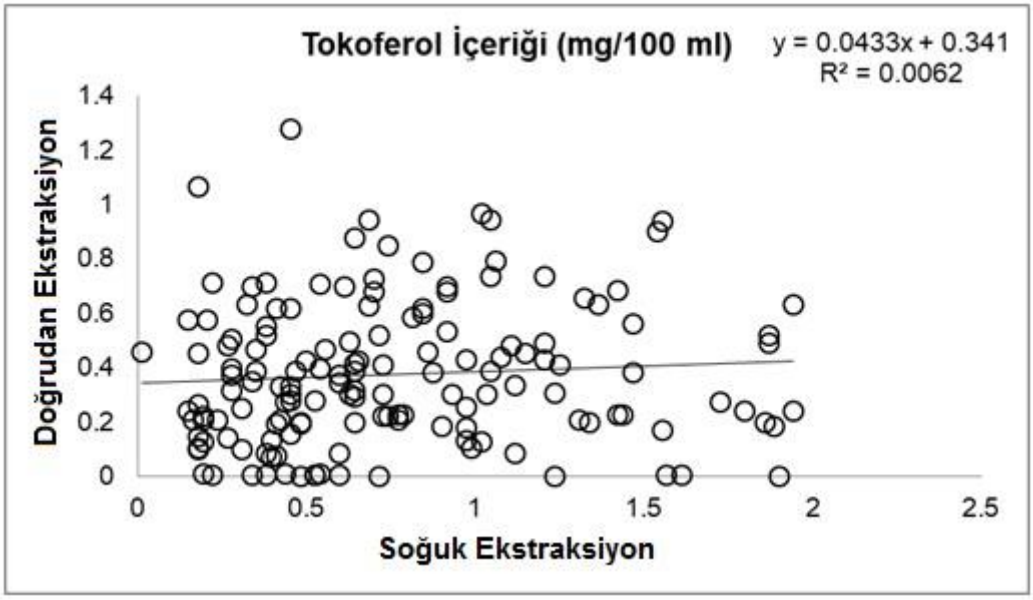
tokoferol içeriğine olumsuz bir etkisi bu çalışmada elde edilen verilere yansımamıştır. Üzerinde çalışmış olduğumuz değişkenlerin (karotenoid ve tokoferoller) yağda çözünen bileşikler olduğu düşünülürse tohumdan elde edilen yağ miktarı ile beraber dolaylı olarak bu bileşiklerin de miktarının artması beklenebilir. Elde edilen yağ oranları Soxhlet yönteminde daha fazla yağ ekstrakte edildiğini ortaya koymaktadır. Bunun yanı sıra doğrudan ekstraksiyon sürecinde sabunlaşma neticesinde gerçekleşen karotenoid kayıpları da göz önüne alındığı zaman Soxhlet yöntemi ile elde edilen karotenoid ve tokoferol miktarlarının diğer yöntemlere kıyasla daha yüksek olması anlaşılabilir.



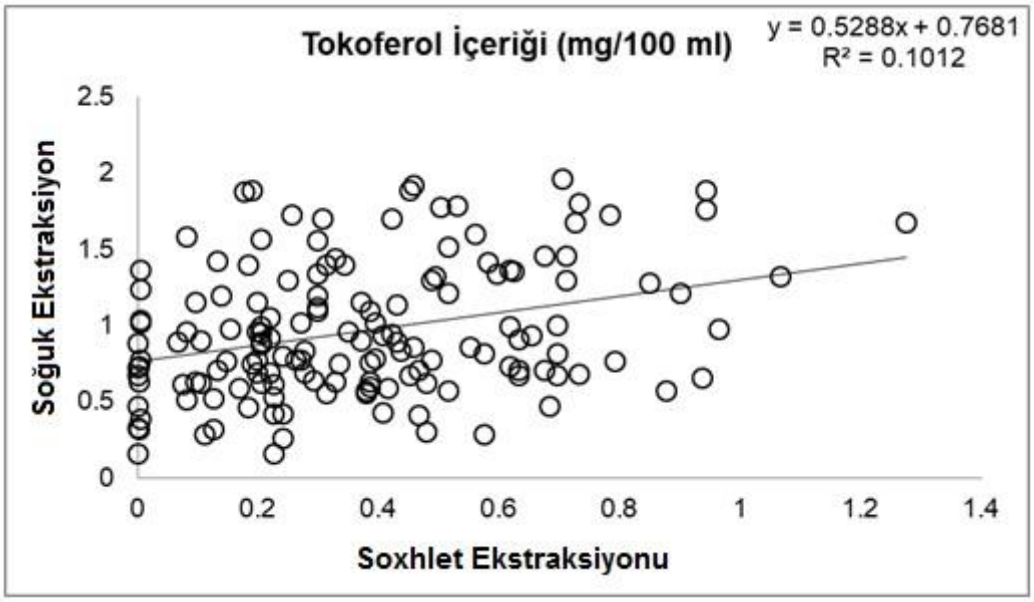
Şekil 4.7. Ekstraksiyon yönteminin tokoferol içeriğine etkisi (Örnek Sayısı: 150)

Ekstraksiyon yöntemlerine ait tokoferol içerikleri basit doğrusal regresyon analizine tabi tutulmuştur. Üç farklı yöntemin birbirleri ile olan regresyon analiz sonuçlarına ait R^2 değerlerinin oldukça düşük çıktığı gözlemlenmiştir. Soğuk ekstrasiyon ile doğrudan

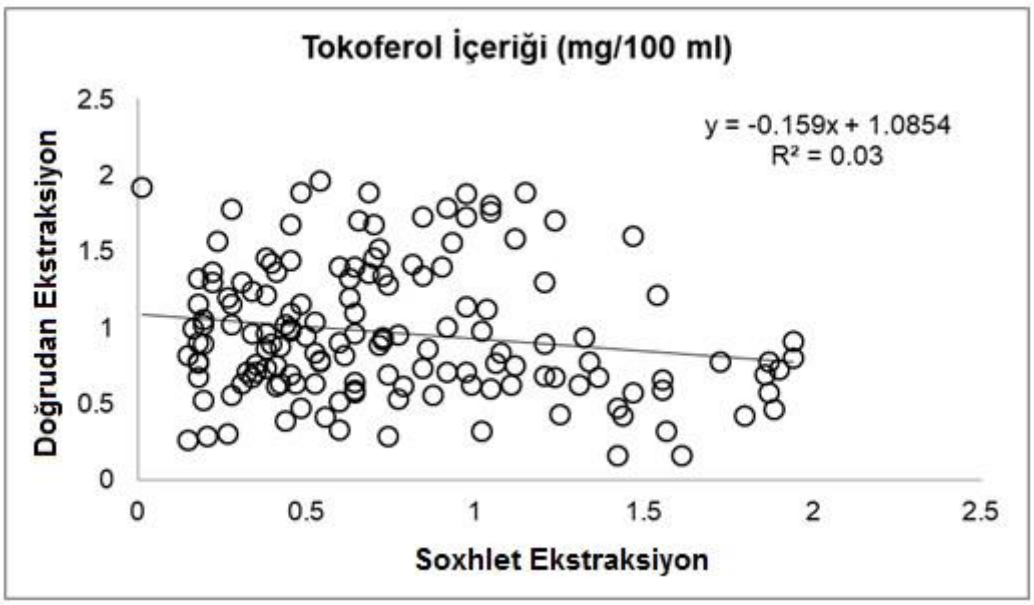
ekstraksiyona ait R^2 değeri 0,006, Soxhlet ile soğuk ekstraksiyona ait R^2 değeri 0,101, Soxhlet ekstrasiyonu ile doğrudan ekstraksiyon arasındaki R^2 değeri de 0,030 olarak elde edilmiştir (Şekil 4.8, 4.9, 4.10).



Şekil 4.8. Tokoferol içeriği için soğuk ve doğrudan ekstraksiyon yöntemleri arasındaki regresyon analizi (Örnek Sayısı: 150).



Şekil 4.9. Tokoferol içeriği için Soxhlet ve soğuk ekstraksiyon yöntemleri arasındaki regresyon analizi (Örnek Sayısı: 150)



Şekil 4.10. Tokoferol içeriği için Soxhlet ve doğrudan ekstraksiyon yöntemleri arasındaki regresyon analizi (Örnek Sayısı: 150)

Karotenoid içeriğinde olduğu gibi, kullanılan örneklerin farklı ekstraksiyon yöntemlerine göre tokoferol içeriklerinde önemli değişimler meydana geldiği görülmüştür. Yapılan analiz sonuçları göz önüne alındığında farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen yağlar üzerinden bulunan değerlerin tokoferol içeriği tahminlerinde birbirleri yerine kullanılmasının doğru olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu durum genotipik değerlendirme çalışmalarında uygulanacak ekstraksiyon yönteminin tespit edilmesinde mutlak suretle göz önünde bulundurulmalıdır.

BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada ulaşılan sonuçlar dikkate alındığında Soxhlet (sıcak ekstraksiyon) ve soğuk ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen yağ oranları karşılaştırıldığında Soxhlet yöntemiyle daha yüksek miktarlarda yağ elde edilirken, soğuk ekstraksiyon yönteminde yağ veriminin bir miktar düşük olduğu tespit edilmiştir. Hem karotenoid hem de tokoferol içerikleri bakımından Soxhlet ekstraksiyonun diğer yöntemlerden daha yüksek değerler verdiği görülmüştür. Ayrıca bu bileşenler için genotipik farklılıkların ekstraksiyon yöntemine göre değiştiği anlaşılmıştır.

Regresyon analizi sonuçlarına göre yağ oranı için Soxhlet ekstraksiyonu ve soğuk ekstraksiyon ile elde edilen sonuçlar arasında doğrusal ve yüksek önemli bir ilişki olduğunu göstermiştir. Yani yöntemler arasında önemli bir fark bulunsa da aralarında mevcut olan bu ilişki sayesinde yöntemlerden biri kullanılarak elde edilen sonuçlar ile diğer yöntemin vermesi beklenen sonuçları tahmin etmek mümkün olabilir. Bu iki yöntemin yağ oranı için gerçek değerlerin yüksek derecede hassasiyet ile belirlenmesinin mutlak gerekli olmadığı genotipik karşılaştırmalarda birbirinin yerine kullanılabileceği ifade edilebilir. Soğuk ekstraksiyon yöntemi yağ çıkarmada Soxhlet yöntemi kadar yüksek yağ oranı vermese de, zaman açısından tercih edilen yöntemdir. Soğuk ekstraksiyon ile günde 20 örnek analiz edilebilir iken bu rakam Soxhlet ile ancak altı adettir. Bu durumlar dikkate alınarak yağ oranının tespitinde soğuk ekstraksiyonun da çok sayıda örnekle çalışılması durumunda tercih edilebileceği söylenebilir. Çalışmada ele alınan diğer bileşenlerden tokoferol ve karotenoid içeriklerinde ise regresyon analizi sonuçları ekstraksiyon yöntemlerinin birbiri yerine kullanılmayacağını göstermiştir. Zira her iki bileşen için de kullanılan örneklere ait değerler arasındaki regresyon katsayıları oldukça düşük bulunmuştur. Bu durum dikkate alınarak genotipik karşılaştırmaları konu edinen araştırmalarda ekstraksiyon etkinliği bakımından Soxhlet ekstraksiyonun tercih edilmesinin uygun olacağı düşünülmektedir. Ancak bu yöntemin uygulama süresi, kullanılan kimyasal miktarı bakımından önemli dezavantajları bulunmaktadır. Diğer taraftan ekstrakte edilen karotenoid ve tokoferol bileşenlerinin, ekstraksiyon esnasında yapısal bozulmaya maruz kalıp kalmadıkları araştırmaya muhtaç bir konudur. Bu nedenle ileri araştırmalarda gerek yağ oranı gerekse yağda çözünen bileşenler üzerine ekstraksiyon metotlarının etkisini kapsamlı şekilde ele alacak araştırmaların yapılması yararlı olabilir.

KAYNAKLAR

Abdollahi M., Bahreini-Moghadam A., Emmami B., Fooladian F., Zafariet K., 2003. Increasing İntracellular Camp And Cgmp İnhibits Cadmium-İnduced Oxidative Stress İn Rat Submandibular Saliva. Comp. Biochem. Physol. C, 135: 331-336.

Anonim 1993. Anticarcinogenic Effect of Carotenoids: Two Reviews, Antioxidant Vitamins Newsletter, (Ed. Langesth, L.), (7), 4 -7.

AOAC Official Method of Analysis, 2005. Method 920.39, Fat (crude) or ether extract in animal feed. 18th ed., AOAC International, Gaithersburg, MD.

Alan Ö., Akdemir H., Budak B. 2005. Küçük Menderes Koşullarında Bazı Melez Mısır (*Zea Mays* L.) Çeşitlerinin Tane Verimi Üzerine Bir Araştırma. Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi, Türkiye.

Anonim 2015. FAO İnternet Sitesi, http://faostat.fao.org/faostat (Erişim tarihi: 03.08.2018).

Anonim 2016. Türkiye İstatistik Kurumu Sitesi, http://tuik.gov.tr (Erişim tarihi: 03.08.2018).

Atay E., 2013. Farklı Olgunlaşma Grubundaki Melez Mısır (*Zea mays indentata* Sturt.) Çeşitlerinin Verim ve Morfolojik Özellikleri Yönünden Değerlendirilmesi. Namık Kemal Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Türkiye

Baker H., Frank O., 1968. Tocopherol. Methods and Interpretation, NewYork Interscience Publisher, John Wiley and Sons,Inc, Clinical Vitaminology.172-3.

Baskın I.S., Salem H., 1997. Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals, Taylor & Francis (Ed.,), CRC Press, 1-20.

Biehler E., Mayer F., Hoffmann L., Krause E., Bohn T., 2009. Comparison of 3 Spectrophotometric Methods for Carotenoid Determination in Frequently Consumed Fruits and Vegetables. Journal of Food Science, 75 (1), 55-61.

Cemeroğlu B.S., 2013. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi Cilt 1. Bizim Grup Basımevi, 707s, Türkiye.

Cochranc C.G, 1991. Cellular İnjury by Oxidants. Am. J. Med., 92: 235-305.

Dündar Y., Aslan R., 1999. Bir Antioksidan Olarak Vitamin E. Genel Tıp Dergisi 9 (3):109-16, Türkiye.

Decker E.A. 2002. Antioxidant Mechanism. In: Food Lipids. CRC Press.

Egesel C.O., 2001. Genetic Variation Among Maize Genotypes for Carotenoid and Tocopherol Compounds. Ph.D. Thesis. University of Illinois at Urbana-Champaign.

Ferruzzi M.G., Sander L.C., Rock C.L., Schwartz S.J. 1998. Carotenoid Determination in Biological Microsamples Using Liquid Chromatography with a Coulometric Electrochemical Array Detector, Anal. Biochem., 256, 74–81.

Filiz F., 2011. Retinol (A Vitamini) ve Alfa Tokoferol (E Vitamini)' ün Genotoksik ve Antigenotoksik Etkileri, Gazi Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Türkiye.

Gürbüz N., 2006. Antimutajenler ve Antikarsinojenler (Kanser Gelişiminin Kimyasal Bileşiklerle Önlenmesi, Türkiye Klinikleri, Journal of Medical Sciences, 26, 312-318.

Halliwell B., Whiteman M., 2004. Measuring Reactive Species and Oxidative Damage İn Vivo And İn Cell Culture: How Should You Do İt And What Do The Results Mean?, British Journal of Pharmacology, 142, 231-255.

Halkman A.K., Ergun M.E., Öztan A., Koçak C., Yıldız F., Erdogan S., 2005. Gıda Endüstrisinde Hammadde Üretiminde İleriye Dönük Yaklasımlar. Türkiye Ziraat Mühendisligi VI. Teknik Kongresi, 987-999, Türkiye.

Harold V., 2006. Panglossi Antioxidants: New Research, Nova Publishers, 9-13.

Howe J.U.A.H., Anumihardjo S.H.A.T. 2006. Evaluation of Analytical Methods for Carotenoid Extraction from Biofortified Maize (*Zea mays* sp.), 7992–7997.

Hulshof P.J.M., Schuil T.K., West C.E., Hollman P.C.H., 2007. Quick screening of maize kernels for provitamin A content. Journal of Food Composition and Analysis 20, 655–661.

Karaali A. 1981. Yemeklik Yağ Sanayisinde Yeni Ürünler, Gıda Sanayii Dergisi, 2, 49-52.

Kaya S., Pirinççi İ., Bilgili A. 1998. Veteriner Hekimliginde Toksikoloji. Medisan Yayın Serisi: 35, 222-355, Türkiye.

Kırtok Y. 1998. Mısır Üretimi ve Kullanımı. Kocaoluk Basım ve Yayınevi, 445s., Türkiye.

Kurilich A.C., Juvik J.A., 1999. Simultaneous Quantification of Carotenoids and Tocopherols in Corn Kernel Extracts by HPLC. J. LIQ. CHROM. & REL. TECHNOL., 22(19), 2925–2934, USA.

Koca N., Karadeniz, F., 2005. Gıdalardaki Doğal Antioksidan Bileşikler. Ankara Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Türkiye.

Koca Y.O., Erekul O., Ünay, A., Turgut İ., 2009. Bazı Melez Mısır *(Zea mays* L.*)* Çeşitlerinin Aydın İlinde Birinci ve İkinci Ürün Performanslarının Değerlendirilmesi. ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi 6(1):41-52.

Koçak A.N., 1987. Mısırın İnsan Gıdası Olarak Önemi ve Gıda Endüstrisindeki Yeri. Türkiye'de Mısır Üretiminin Geliştirilmesi, Problemler ve Çözüm Yolları Sempozyumu. 23-26 Mart, 1987. Türkiye.

Konuşkan D.B., Canbaş A. 2014. Effects of Variety and Extraction Methods on Phenolic Compounds and Chemical Composition of Olive Oils, (7), 7–10.

Lambert R.J., 1994. Specialty Corns/High Oil Corn Hibrids. Edited by A.R. Hallauer, CRC Presss, 123-146.

Lanhance P.A., Nakat Zeina, B.S. Woo-Sik, Jeong M.S., 2001. Antioxidants: An İntegrative Approach, Journal of Nutrition, 17: 835-838.

Lim H., S. Woo H. S. Kim S. Jong and J. Lee. 2007. Comparison of Extraction Methods for Determining Tocopherols in Soybeans. European Journal of Lipid Science and Technology. 109: 1124–1127.

Maarasyid C., Supriyanto E., Muhamad I.I. 2014. Potential Source and Extraction of Vitamin E From Palm-Based Oils : A Review Jurnal Teknologi Full Paper Potential Source and Extraction of Vitamin E From Palm-Based Oils : A, (July). https://doi.org/10.11113/jt.v69.3172.

Matés J.M., 2000. Effects of Antioxidant Enzymes in the Molecular Control of Reactive Oxygen Species Toxicology. Toxicology, 153: 83-104.

Matthäus B. Brühl L., 2001. Comparison of Different Methods for the Determination of the Oil Content in Oilseeds. Journal of the American Oil Chemists' Society, 78: 95.

doi: 10.1007 / s11746-001-0226-y.

Maurer M.M., Mein J.R., Chaudhuri S.K., Constant H.L. 2014. An İmproved UHPLC-UV Method For Separation and Quantification of Carotenoids in Vegetable Crops. Food Chemıstry, 165, 475–482, https://doi.org/10.1016/j.foodchem .2014.05.038.

Mendeş M. 2013. Uygulamalı Bilimler İçin İstatistik ve Araştırma Yöntemleri. Kriter Yayınevi. Türkiye.

Miller J.K., Slebodzinska E.B., 1993. Oxidative Stres, Antioxidants and Animal Functions, Journal of Dairy Science, 76, 2812-2823.

Murakami A, Nakashima M, Koshiba T, Maoka T, Nishino H, Yano M, Sumida T, Kim OK, Koshimizu K, Ohigashi H. 2000. Modifying Effect of Carotenoids on Superoxide and Nitric Oxide Generation from Stimulated Leukocytes. Cancer Letters, 149, 115-123.

Nadeem R., Iqbal A., Abid M., Akhtar N., Anwar F., Mahmood Z., Shahid S.A., Shafeeq A., 2015. Effect of Cold-Pressing and Soxhlet Extraction on the Physico-Chemical Attributes of Sunflower (Helianthus annuus L.) Seed Oil. International Journal of Chemical and Biochemical Sciences, 7(2015), 41-46.

Nordberg J., Arner E.S.J., 2001. Reactive Oxigen Species, Antioxidants and The Mammalian Thioredoxin System, Free Radical Biiology and Medicine, 31(11), 1287-1312.

Ötleş S., Atlı Y., 1997. Karotenoidlerin İnsan Sağlığı Açısından Önemi. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi 3(1), 249-254, Türkiye.

Öz A., Kapar H., 2007. Mısırın Yağ İçeriği ve Yağ Sanayi Açısından Önemi. 1.Ulusal Yağlı Tohumlu Bitkiler ve Biyodizel Sempozyumu, 28-31 Mayıs 2007, Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Türkiye.

Panfili G., Fratianni A., Irano M., 2004. Improved Normal-Phase High-Performance Liquid Chromatography Procedure for the Determination of Carotenoids in Cereals, 6373–6377.

Pokorny J., Korczak J. 2001. Preparation of Natural Antioxidants. In J. Pokony, N. Yanishlieva, M. Gordon, eds. Antioxidants in food, Practical applications.

Woodhead Publishing Limited, Cambride. pp. 311-330.

Puspitasari-Nienaber N.L., Ferruzzi M.G., Schwarts S.J., 2002. J Amer Oil Chem Soc 79: 633. doi: 10.1007 / s11746-002-0536-0.

Rivera S., Canela R., 2012. Influence of Sample Processing on the Analysis of Carotenoids in Maize. Department of Chemistry, Lleida University, Alcalde Rovira Roure, 191, Lleida 25198, Spain.

Rodriguez-Amaya D.B., Kimura M., 2004. Harvestplus Handbook For Carotenoid Analysis. Harvestplus Technical Monograph 2.

Rutkowski M., Grezegorczyk K., 2007. Modifications of Spectrophotometric Methods For Antioxidative Vitamins Determination Convenient In Analytic Practice. Acta Sci., Pol., Technol, Aliment, 6(3), 17-28.

Thomas M.J., 2000. The Role of Free Radicals and Antioxidants, Nutrition, 16 (7-8): 716-718.

Turgut İ., Doğan R, Yürür N., 1997. Bursa Koşullarında Yetiştirilen Bazı Atdişi Hibrid Mısır *(Zea mays L indentata Sturt.)* Çeşitlerinde Bitki Sıklığının Verim ve Verim Ögelerine Etkisi. Türkiye II. Tarla Bitkileri Kongresi, Türkiye.

Yaşak S., Çınar A., Tugay M.E. 2003. Mısırda (*Zea mays* L.) Ekim Zamanının Tohum Tutma ve Diğer Bazı Özellikler Üzerine Etkileri. Türkiye 5. Tarla Bitkileri Kongresi 13-17 Ekim 2003, 352-357, Türkiye.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Oğuz ORDU

Doğum Yeri: Fatih/İstanbul

Doğum Tarihi: 14/12/1991

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü (2011-2015)

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı (2015-2018)

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI -Diğer

b) Bildiriler -Uluslararası –Ulusal

Oğuz Ordu, Fatma Aktaş, Cem Ömer Egesel. (2017). Farklı Ekstraksiyon Yöntemlerinin Mısırda Yağ İçeriğinin Tespitine Etkisi. Trakya Üniversiteler Birliği Lisansüstü Öğrenci Kongresi. 15-16 Mayıs 2017.

c) Katıldığı Projeler

Proje Yürütücüsü: Doç. Dr. Cem Ömer EGESEL, Farklı Ekstraksiyon Yöntemleri Kullanılarak Mısırda Karotenoid ve Tokoferol Bileşenlerinin Analizi. Proje No: 1262, Bilimsel Araştırma Projesi (BAP), 2017.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: Kepez Meyvecilik Tarım Taş. Tic. ve San. Ltd. Şti. (2yıl)
Pozisyon: Ziraat Mühendisi

İLETİŞİM

E-posta Adresi: oguzzordu@gmail.com