

**MİKRODALGA UYGULANAN MIR604 VE MON810
MISIR UNLARININ OMİK YAKLAŞIM İLE
KARAKTERİZASYONU**

**CHARACTERIZATION OF MICROWAVE-TREATED
MIR604 AND MON810 MAIZE FLOURS WITH OMICS
APPROACH**

BEGÜM ZEYNEP HANÇERLİOĞULLARI

PROF. DR. REMZİYE YILMAZ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

MİKRODALGA UYGULANAN MIR604 VE MON810 MISIR UNLARININ OMİK YAKLAŞIM İLE KARAKTERİZASYONU

Begüm Zeynep HANÇERLİOĞULLARI

Doktora, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Remziye YILMAZ

Eş Danışman: Dr. Umut TOPRAK

Ocak 2024, 200 sayfa

Gıda biliminde omik yaklaşım, günümüzde, araştırmacılara gıda bileşenlerini ve besin maddelerini karakterize etme ve değerlendirme konusunda sağlam, verimli ve hassas analitik araçlar sunmaktadır. Mikrodalga teknolojisi gibi işleme teknolojilerinin uygulanması ve gıda bileşenleri üzerindeki etkileri, gıda bilimi ve endüstrisi tarafından incelenip benimsenmiştir. Bu tez çalışmasında, mikrodalga uygulaması öncesi ve sonrasında, MIR604 ve MON810 mısır unları ile genetik modifiye (GM) olmayan muadillerinin moleküler ve kimyasal karakterizasyonunun, genomik, transkriptomik, metabolomik ve lipidomik gibi omik yaklaşımlar kullanılarak gerçekleştirilmesi ve elde edilen yüksek teknolojiye bağlı verilerin uygun istatistiksel araçlarla değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmadaki bulgularla, proses etkisine bağlı mısır unu örneklerinde hem moleküler hem de kimyasal bileşenlerin karakterizasyonu için bir arka plan oluşturulmasına yönelik önemli bilgiler sunulmuştur.

Genomik kapsamında, DNA'ya dayalı teknikler ile genetik modifiye organizma (GMO) tespiti amacıyla örneklere tarama yöntemleri uygulanmıştır. Örneklerde Karnabahar mozaik virüsü (CaMV) 35S promotörü (P-35S), Figwort mozaik virüsü promotörü (P-

FMV) ve T-NOS (nopalin sentaz terminatörü) dizilerinin tespiti için kalitatif polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bazlı tarama yöntemi kullanılmıştır. DNA ekstraksiyonunun etkinliği, bitki spesifik Aktin (ACT) geni için yapılan inhibisyon çalışmasıyla doğrulanmıştır. Tarama analizlerinin doğrulama çalışmaları hem mutlak tespit limiti (LOD_{abs}) hem de tip 1 (yanlış pozitif) ve tip 2 (yanlış negatif) hata oranı parametrelerinin belirlenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Transkriptomik kapsamında, mikrodalga uygulamasının etkisini incelemek için RNA'ya dayalı analizler ile Argonot (*ZmAGO1a*) ve Reseptör benzeri protein kinaz (*ZmRLK9*) enzim genlerinin ekspresyon profili ortaya konmuştur. EvaGreen bazlı revers transkriptaz-kantitatif PCR (RT-qPCR) analizleri ile tüm örneklerde bu iki gen tespit edilip, genlerin mutlak gen ekspresyon profilleri incelenmiştir. RNA ekstraksiyonu yönteminin etkinliği, mısır referans geni (Alkol dehidrogenaz, *ZmADH1*) için yapılan doğrulama çalışmasıyla belirlenmiştir. İki gen için kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve her analiz için amplifikasyon verimi, özgüllük, laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik standart sapması (S_R), bağıl tekrar üretilebilirlik standart sapması (RSD_R), tespit limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) gibi doğrulama parametreleri değerlendirilmiştir.

Metabolomik çalışmalar kapsamında, mikrodalga uygulaması sonrasında mısır ununun kimyasal bileşenleriyle ilgili detaylı bilgiler elde etmek amacıyla, tüm örneklerin birincil metabolit profilleri (yağ asitleri, amino asitler, şekerler, organik asitler vb.) gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) kullanılarak belirlenmiş ve aynı zamanda GC-alev iyonizasyon dedektörü (FID) analizi ile fitosterol bileşikleri tespit edilmiştir. Örneklerin birincil metabolitlerinin tanımlanmasında kütle spektral kütüphanelerinden yararlanılmış, fitosterol bileşikleri ise standartların alıkonma süreleriyle karşılaştırılarak doğrulanmıştır. Birincil metabolitlerin çeşitli metabolik yollardaki biyolojik işlevlerini daha iyi anlamak için KEGG yolak analizi gerçekleştirilmiştir. Lipidomik kapsamında ise, mikrodalga uygulamasının örneklerin yağ asidi kompozisyonları üzerindeki etkisini incelemek için GC-FID sistemi kullanılmıştır. Tespit edilen yağ asidi bileşikleri, yağ asidi metil esterleri (FAME) standardındaki bileşiklerin alıkonma süreleriyle karşılaştırılarak doğrulanmıştır. Doymamış yağ asitlerinin (UFA) doymuş yağ asitlerine (SFA) oranı belirlenerek, örneklerin yağ asidi kompozisyonlarının besinsel kalitesi değerlendirilmiştir. Mikrodalga uygulaması öncesinde ve sonrasında, GC teknikleri ile

elde edilen veri setlerini yorumlamak ve karşılaştırmak için Hiyerarşık Kümeleme Analizi (HCA) ve Temel Bileşen Analizi (PCA) gerçekleştirilmiştir.

Bulgular, omik teknolojilerin mikrodalga uygulanan GM gıda ürünleri için gıda kompozisyonu açısından risk değerlendirme yaklaşımı oluşturulmasına zemin hazırlayarak, araştırmacılar ve düzenleyici sistemler tarafından yapılacak olan kapsamlı çalışmalara temel sağlaması nedeni ile önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Mikrodalga uygulaması, Mısıır unu, Genetik modifiye organizma (GMO), Moleküler ve kimyasal karakterizasyon, Genomik, Transkriptomik, Metabolomik, Lipidomik

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF MICROWAVE-TREATED MIR604 AND MON810 MAIZE FLOURS WITH OMICS APPROACH

Begüm Zeynep HANÇERLİOĞULLARI

Doctor of Philosophy, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Remziye YILMAZ

Co-Supervisor: Dr. Umut TOPRAK

January 2024, 200 pages

The omics approach in food science provides researchers with robust, efficient, and sensitive analytical tools for characterizing and evaluating food components and nutrients. The application of processing technologies, such as microwave technology, and their effects on food components have been studied and adopted by the food science and industry. In this thesis, the aim was to perform the molecular and chemical characterization of MIR604 and MON810 maize flours, along with their non-genetically modified (GM) counterparts, before and after microwave treatment, using omics approaches (genomics, transcriptomics, metabolomics, and lipidomics), and to evaluate the obtained data with appropriate statistical tools. With the findings, important information has been presented to establish a background for the characterization of molecular and chemical components in maize flour samples, depending on the process effect.

In genomics, screening methods were applied to samples for the detection of GMOs using DNA-based techniques. Qualitative polymerase chain reaction (PCR)-based screening method was used to detect *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S promoter (P-35S),

Figwort mosaic virus promoter (P-FMV), and T-NOS (nopaline synthase terminator) sequences in the samples. The effectiveness of DNA extraction was confirmed by an inhibition study for Actin (ACT) gene. Verification studies of screening analyses were performed by determining both the absolute limit of detection (LOD_{abs}) and the type 1, type 2 error rate parameters. In transcriptomics, the expression profiles of the Argonaute (*ZmAGO1a*) and Receptor-like protein kinase (*ZmRLK9*) enzyme genes were revealed by RNA-based analysis to examine the effect of microwave treatment. These two genes were detected with EvaGreen-based reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) analyses, and their absolute gene expression profiles were examined. The effectiveness of RNA extraction method was determined by verification study for Alcohol dehydrogenase (*ZmADH1*) gene. Calibration curves were constructed, and verification parameters (amplification efficiency, specificity, reproducibility standard deviations, limit of detection (LOD), and quantification (LOQ)) were evaluated.

In metabolomics, to obtain detailed information about the chemical components of samples following microwave treatment, the primary metabolite profiles were determined using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and phytosterol compounds were detected through GC-flame ionization detector (FID) analysis. Mass spectral libraries were used to identify the primary metabolites and phytosterol compounds were confirmed by comparing the retention times of the standards. To better understand the biological functions of primary metabolites in various metabolic pathways, KEGG pathway analysis was performed. In lipidomics, GC-FID system was employed to investigate the effect of microwave treatment on the fatty acid compositions of the samples. The detected compounds were confirmed by comparing them with the retention times of the FAME standard. The nutritional quality of the composition in the samples was assessed by determining the ratio of unsaturated fatty acids (UFA) to saturated fatty acids (SFA). Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and Principal Component Analysis (PCA) were conducted to interpret and compare data sets obtained through GC techniques.

The findings are important as they provide a foundation for a risk assessment approach regarding the food composition of microwave-treated GM food products using omics

technologies, thereby supporting comprehensive studies to be undertaken by researchers and regulatory systems.

Keywords: Microwave treatment, Maize flour, Genetically modified organism (GMO), Molecular and chemical characterization, Genomics, Transcriptomics, Metabolomics, Lipidomics

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca, bana bilimsel fikir ve bakış açısı kazandıran, bir görevi yerine getirmenin ve bir işi analiz etmenin bütün inceliklerini öğreten, karşılaştığım sorunlarda bana yol gösteren, akademik vizyonu ile beni her aşamada cesaretlendiren, tez sürecimin başarılı bir şekilde ilerlemesi için bana yardımcı olan, desteğini benden esirgemeyerek her zaman yanımda olduğunu hissettiren saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Remziye YILMAZ'a ve bilimsel uzmanlığını benimle paylaşan, yapıcı eleştirileriyle beni yönlendiren, veri analizlerinde bana yardımcı olan ve tez sürecimin nitelikli bir şekilde ilerlemesine katkı sağlayan değerli eş danışman hocam Dr. Umut TOPRAK'a,

Tez İzleme Komitesi'nde yer alan, akademik bilgi birikimleri ve uzmanlıklarıyla tez çalışmamı katkı sağlayan ve sundukları önerilerle çalışmamı zenginleştiren saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Ümran UYGUN ve Prof. Dr. Füsun İnci EYİDOĞAN'a,

Çalışmalarımın yürütülmesinde laboratuvar ve araç gereçlerinin kullanımı için yardımcı olan ve aynı zamanda lisansüstü eğitim hayatım süresince desteklerini esirgemeyen saygıdeğer hocam Doç. Dr. Fahriye Ceyda DUDAK ŞEKER'e ve sağlanan diğer teknik altyapı ve destekleri için Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne,

Çalışmamın Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) analizlerini gerçekleştirmem için altyapı sunan Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM, Ankara, Türkiye)'ne, cihaz kullanımı ve veri analizine yönelik bana eğitim veren Mühendis Zeynep ERDOĞAN'a, analizler için altyapı sağlayan Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (HÜNİTEK, Ankara, Türkiye)'ne ve teknik destekleri için Öğr. Gör. Dr. Melis Şardan EKİZ'e,

Çalışmalarına sağladıkları sarf malzeme desteğinden dolayı BMLabosis BM Lab. Sist. Ltd. Şti. (Ankara, Türkiye) firmasına ve çalışmamın spektrofotometrik analizlerini gerçekleştirmem için Nanodrop cihazı kullanımında yardımcı olan Dr. Humen CEBBARI'ye, Bioanalizer sisteminde analizlerimi gerçekleştirmem için imkân sağlayan Altium International Laboratuvar Cihazları-Sem A.Ş. (İstanbul, Türkiye) firmasına,

Doktora yolculuğumda beni motive eden, yardımlarını ve manevi desteklerini her zaman hissettiren değerli arkadaşlarım, Yüksek Mühendis Sena ÇAKIR'a, Dr. Muhammad Usman AKRAM'a, Yüksek Mühendis Ayşegül Bilge UĞUZ'a, Yüksek Mühendis Elif Bircan MUYANLI'ya, Yüksek Mühendis Yeşim TAŞKIN'a ve ayrıca Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü FoodOmics Laboratuvarı araştırma ekibi arkadaşlarıma ve Temel İşlemler Araştırma Laboratuvarı'nda çalışan arkadaşlarıma,

Bana her konuda güvenen ve inanan, maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan, bu günlere ulaşmamda ve bu dereceyi almamda büyük emekleri olan, hayatta en çok değer verdiğim ve sevdiğim aileme, canım annem Meltem HANÇERLİOĞULLARI'na, canım babam Prof. Dr. Aybaba HANÇERLİOĞULLARI'na, canım anneannem Aysel KESEN'e ve canım kardeşim Yiğit HANÇERLİOĞULLARI'na tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Bu tez çalışması FHD-2021-19443 numaralı proje ile Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Begüm Zeynep HANÇERLİOĞULLARI

Ocak 2024, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Gıda Analizinde Omik Yaklaşımlar	5
2.1.1. Genomik Uygulamaların Temeli: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	6
2.1.2. Transkriptomik Çalışmalarda qPCR'nin Rolü ve Gen Ekspresyon Analizi	10
2.1.3. Metabolomik ve Metabolik Profilleme Yöntemleri.....	14
2.1.4. Lipidomik Kapsamında Yağ Asidi Kompozisyonunun Belirlenmesi	19
2.2. Gıda İşleme Yöntemleri ve Mikrodalga Teknolojisi	23
2.3. Bitki Biyoteknolojisi ve Genetik Modifiye (GM) Mısır.....	27
2.3.1. MIR604 GM Mısır Çeşidi.....	32
2.3.2. MON810 GM Mısır Çeşidi.....	33
2.4. GM Gıda Ürünlerinin Kompozisyon Analizi Açısından Risk Değerlendirmesi	34
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	39
3.1. Materyal	39
3.2. Metot.....	40
3.2.1. Mikrodalga Uygulaması	40
3.2.2. Nükleik Aside Dayalı Analizler: Genomik ve Transkriptomik	41
3.2.2.1. Genomik Analizler.....	41
3.2.2.1.1. DNA Ekstraksiyonu	41
3.2.2.1.2. DNA Kalitesi	42
3.2.2.1.3. DNA Ekstraksiyon Yönteminin Doğrulanması	42

3.2.2.1.4. Kalitatif PCR ile GMO Tarama Analizlerinin Yapılması	43
3.2.2.1.5. Kalitatif PCR Analizlerinin Doğrulanması	44
3.2.2.2. Transkriptomik Analizler	45
3.2.2.2.1. RNA Ekstraksiyonu.....	45
3.2.2.2.2. RNA Kalitesi ve Bütünlüğü	50
3.2.2.2.3. RNA Örnekleri için DNaz Uygulaması	51
3.2.2.2.4. cDNA Sentezi.....	51
3.2.2.2.5. RNA Ekstraksiyon Yönteminin Doğrulanması.....	52
3.2.2.2.6. Hedeflenen İki Mısır Geni için Standart Eğrilerin Oluşturulması ve RT-qPCR Analizlerinin Doğrulanması	53
3.2.2.2.7. Mikrodalga Uygulanan Mısır Örnekleri için RT-qPCR Analizlerinin Uygulanabilirliği	55
3.2.3. Metabolit Analizleri: Metabolomik ve Lipidomik	56
3.2.3.1. Metabolomik Analizler	56
3.2.3.1.1. Birincil Metabolitlerin GC-MS ile Analizi	56
3.2.3.1.2. Fitosterollerin GC-FID ile Analizi	59
3.2.3.2. Lipidomik Analizler	60
3.2.3.2.1. Yağ Asitlerinin GC-FID ile Analizi	60
3.2.4. İstatistiksel Analizler.....	61
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	63
4.1. Genomik Analiz Sonuçları	64
4.1.1. Uygulanan DNA Ekstraksiyon Yönteminin Doğrulanması	64
4.1.2. Kalitatif PCR Yönteminin Doğrulanması	66
4.1.2.1. Mikrodalga Uygulaması Sonrasında DNA Ekstraksiyonu.....	69
4.1.3. Bitkiye Özgü ve GM Elementlerin Taranması.....	71
4.2. Transkriptomik Analiz Sonuçları	74
4.2.1. RNA Ekstraksiyon Sonuçları	74
4.2.2. DNaz Uygulaması Sonuçları.....	82
4.2.3. Seçilen RNA Ekstraksiyon Yönteminin Doğrulanması	87
4.2.4. İki Mısır Geninin Tespiti ve Miktarının Belirlenmesi için RT-qPCR Analizlerinin Doğrulanması.....	89
4.2.5. İki Mısır Geninin Mutlak Gen Ekspresyon Profili.....	92
4.3. Metabolomik Analiz Sonuçları	99

4.3.1. GC-MS Analizi ile Tanımlanan Birincil Metabolitler	99
4.3.2. GC-FID Analizi ile Tanımlanan Fitosteroller.....	119
4.4. Lipidomik Analiz Sonuçları.....	125
4.4.1. GC-FID Analizi ile Tanımlanan Yağ Asitleri.....	125
4.5. HCA ve PCA Analizleri	130
5. YORUM.....	135
6. KAYNAKLAR	140
EKLER.....	172
EK 1 - Genomik Analizler Kapsamında Elde Edilen İnhibisyon Eğrileri	172
EK 1-A. MF1 (%< 0.1 GM MIR604) örneğinin inhibisyon eğrisi.....	172
EK 1-B. MF3 (%<0.02 GM MON810) örneğinin inhibisyon eğrisi	172
EK 2 - MIR604 ve MON810 Örnekleri için GMO Taramasına Ait Tipik Gerçek Zamanlı PCR Görüntüleri	173
EK 3 - Mikrodalga Uygulanmayan Ticari Mısırın (C1) Seyreltilmiş cDNA Örneklerinde <i>ZmADHI</i> Amplifikasyonundan Sonra Elde Edilen Cq Değerleri 174	
EK 4 - EvaGreen Bazlı RT-qPCR Analizleri Sonrasında Oluşturulan Standart Eğriler 175	
EK 4-A. <i>ZmAGO1a</i> amplifikasyonu sonrasında elde edilen standart eğri	175
EK 4-B. <i>ZmRLK9</i> amplifikasyonu sonrasında elde edilen standart eğri	175
EK 5 - Mutlak Standart Belirsizlik (u_0) Değerlerini Belirlemek için Oluşturulan Doğrusal Regresyon Grafikleri	176
EK 5-A. <i>ZmAGO1a</i> genine ait doğrusal regresyon çizgisi.....	176
EK 5-B. <i>ZmRLK9</i> genine ait doğrusal regresyon çizgisi	176
EK 6 - Mikrodalga Uygulanmayan ve Mikrodalga Uygulanan Mısır cDNA Örneklerinde İki Gen Amplifikasyonundan Sonra Elde Edilen Cq Değerleri..	177
EK 7 - Mikrodalga Uygulanmayan ve Mikrodalga Uygulanan Mısır cDNA Örneklerinde İki Gen Amplifikasyonundan Sonra Hesaplanan RNA Seviyeleri 178	
EK 8- Mikrodalga Uygulanmayan ve Mikrodalga Uygulanan Mısır Unu Örneklerinde GC-MS ile Tespit Edilen Birincil Metabolitler.....	179

EK 9 - Mikrodalga Uygulanmayan ve Mikrodalga Uygulanan Mısır Unu	
Örneklerinden Elde Edilen Birincil Metabolitlerinin Normalleştirilmiş Miktarları	
181	
EK 9-A. MF1, MF1T, MF2 ve MF2T örneklerinin birincil metabolit normalize	
değerleri	181
EK 9-B. MF3, MF3T, MF4 ve MF4T örneklerinin birincil metabolit normalize	
değerleri	184
EK 10 - Birincil Metabolitlerin KEGG Veri Tabanı ile Analizi	187
EK 10-A. Birincil Metabolitlerin KEGG Giriş Numaraları ve Katıldıkları	
Metabolik Yolaklar	187
EK 10-B. Birincil Metabolitleri İçeren Metabolik Yolakların Listesi	190
EK 11 - Fitosterollerin Tanımlanmasında Kullanılan Standartlara Ait Kalibrasyon	
Eğrisi Grafikleri.....	192
EK 12 - Mikrodalga Uygulanmayan ve Mikrodalga Uygulanan Mısır Unu	
Örneklerinin Yağ Asidi Profillerine Ait GC-FID Kromatogram Görüntüleri...	193
EK 12-A. MF1, MF1T, MF2 ve MF2T örneklerine ait model kromatogramlar	
(Minör pikler şekillerde gösterilmemiştir).....	193
EK 12-B. MF3, MF3T, MF4 ve MF4T örneklerine ait model kromatogramlar	
(Minör pikler şekillerde gösterilmemiştir).....	194
EK 13 - Mikrodalga Uygulanmayan ve Mikrodalga Uygulanan Mısır Unu	
Örneklerinden Elde Edilen Yağ Asitlerinin Normalleştirilmiş Miktarları	195
EK 13-A. MF1, MF1T, MF2 ve MF2T örneklerine ait yağ asidi normalize	
değerleri	195
EK 13-B. MF3, MF3T, MF4 ve MF4T örneklerine ait yağ asidi normalize	
değerleri	196
EK 14 - Tezden Türetilmiş Yayınlar	197
EK 15 - Tezden Türetilmiş Bildiriler	198
EK 16 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	199
ÖZGEÇMİŞ.....	200

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Mikrodalga teknolojisinin gıda endüstrisindeki uygulamaları.	26
Şekil 2.2. GM MIR604 mısır çeşidinin gen kaseti.	32
Şekil 2.3. GM MON810 mısır çeşidinin gen kaseti.....	34
Şekil 4.1. Modifiye RNA Extracol yöntemi kullanılarak örneklerden ekstrakte edilen RNA'ların Bioanalyzer elektroferogram görüntüleri. X eksenini nt (Nükleotidler) ve Y eksenini FU (Floresans Birimleri), RIN: RNA Bütünlük Numarası.....	78
Şekil 4.2. Modifiye CTAB ekstraksiyon yöntemi kullanılarak örneklerden ekstrakte edilen RNA'ların Bioanalyzer elektroferogram görüntüleri. X eksenini nt (Nükleotidler) ve Y eksenini FU (Floresans Birimleri), RIN: RNA Bütünlük Numarası.....	81
Şekil 4.3. <i>ZmADH1</i> amplifikasyonundan sonra oluşturulan inhibisyon eğrisi.....	89
Şekil 4.4. Erime eğrisi analizi. a) <i>ZmAGO1a</i> geninden, b) <i>ZmRLK9</i> geninden elde edilen ampliconlar. Gözlemlenen tek tepe noktaları tipik olarak saf, tek ampliconları temsil etmektedir. Spesifik sinyallerin erime sıcaklıkları sırasıyla 80 °C ve 90.5 °C'dir.	91
Şekil 4.5. Mikrodalga uygulanmayan ve uygulanan örneklerde iki mısır geninin mutlak gen ekspresyon profilleri. a) MF1, MF1T, MF2 ve MF2T ve b) MF3, MF3T, MF4 ve MF4T örneklerinin sütun grafikleri. Grafiklerin x eksenini mısır genlerini, y eksenini ise log ₂ ile dönüştürülmüş gen ekspresyon değerlerini temsil etmektedir. Sütunlardaki çubuklar n=3 ile ortalama ± standart sapmayı ve farklı küçük harfler ise ortalama değerler arasındaki anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p < 0.05$). ..	97
Şekil 4.6. Mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örnekleri için 2.00 - 45.00 dk arasında elde edilen birincil metabolitlerin GC-MS toplam iyon akımı (TIC) kromatogram görüntüleri. a) MF1, MF1T, MF2 ve MF2T örneklerine ait kromatogramlar; b) MF3, MF3T, MF4 ve MF4T örneklerine ait kromatogramlar.	100
Şekil 4.7. Linoleik asidin (9,12-Oktadekadienoik asit) kütle spektrumu. a) Analiz edilen örneklere ait Enhanced Data Analysis programından alınan örnek spektrum, b) NIST kütüphanesinde mevcut olan spektrum, c) Golm Metabolome veri tabanında bulunan spektrum.....	108
Şekil 4.8. Oleik asidin (9-Oktadesenoik asit) kütle spektrumu. a) Analiz edilen örneklere ait Enhanced Data Analysis programından alınan örnek spektrum, b) NIST	

kütüphanesinde mevcut olan spektrum, c) Golm Metabolome veri tabanında bulunan spektrum.	109
Şekil 4.9. Prolinin kütle spektrumu. a) Analiz edilen örneklere ait Enhanced Data Analysis programından alınan örnek spektrum, b) NIST kütüphanesinde mevcut olan spektrum, c) Golm Metabolome veri tabanında bulunan spektrum.	111
Şekil 4.10. Sakkarozun (sükroz) kütle spektrumu. a) Analiz edilen örneklere ait Enhanced Data Analysis programından alınan örnek spektrum, b) NIST kütüphanesinde mevcut olan spektrum, c) Golm Metabolome veri tabanında bulunan spektrum.	112
Şekil 4.11. Gliserolün kütle spektrumu. a) Analiz edilen örneklere ait Enhanced Data Analysis programından alınan örnek spektrum, b) NIST kütüphanesinde mevcut olan spektrum, c) Golm Metabolome veri tabanında bulunan spektrum.	113
Şekil 4.12. Glikolik asitin kütle spektrumu. a) Analiz edilen örneklere ait Enhanced Data Analysis programından alınan örnek spektrum, b) NIST kütüphanesinde mevcut olan spektrum, c) Golm Metabolome veri tabanında bulunan spektrum.	114
Şekil 4.13. Malik asitin kütle spektrumu. a) Analiz edilen örneklere ait Enhanced Data Analysis programından alınan örnek spektrum, b) NIST kütüphanesinde mevcut olan spektrum, c) Golm Metabolome veri tabanında bulunan spektrum.	115
Şekil 4.14. Silanol, trimetil-, fosfat (3:1)in (fosforik asit (3TMS)) kütle spektrumu. a) Analiz edilen örneklere ait Enhanced Data Analysis programından alınan örnek spektrum, b) NIST kütüphanesinde mevcut olan spektrum, c) Golm Metabolome veri tabanında bulunan spektrum.	116
Şekil 4.15. Mısır unlarında tespit edilen birincil metabolitlerin KEGG yolak analizi. Dikey eksen fonksiyonel sınıflandırma, yatay eksen birincil metabolitlerin yolaklarda bulunma yüzdelerini gösterir. Farklı renkler, mevcut analizde belirlenen biyolojik yolakların dahil olduğu metabolizma sınıfını temsil eder: (A) Karbonhidrat metabolizması, (B) Lipid metabolizması, (C) Amino asit metabolizması, (D) Diğer amino asitlerin metabolizması.....	118
Şekil 4.16. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan fitosterol standartlarının GC-FID kromatogram görüntüleri.....	119
Şekil 4.17. Mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örneklerinde tanımlanan fitosterollerin miktarlarının karşılaştırılması. a) MF1, MF1T, MF2 ve MF2T örneklerinin sütun grafikleri; b) MF3, MF3T, MF4 ve MF4T örneklerinin sütun grafikleri. Sütunların x ekseni fitosterol bileşiklerini ve y ekseni log ₂ ile	

dönüştürülmüş fitosterol miktarlarını ($\mu\text{g/g}$) temsil eder. Sütunlardaki çubuklar, $n=3$ ile ortalama \pm standart hatayı (SE) gösterir, aynı küçük harfler, ortalama değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını gösterir ($p<0.05$).....	123
Şekil 4.18. Mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örneklerinde doymamış (UFA) ve doymuş yağ asitlerinin (SFA) yağ asidi oranları (%).	129
Şekil 4.19. Mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örneklerindeki bileşiklerin normalize edilmiş miktarlarına dayanan hiyerarşik kümelemenin ısı haritası: (a) GC-MS ile elde edilen birincil metabolitlerin HCA'sı; (b) GC-FID ile elde edilen yağ asitlerin HCA'sı.	132
Şekil 4.20. Mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örneklerindeki bileşiklerin normalize edilmiş miktarlarına dayanan PCA görüntüleri: (a) GC-MS ile elde edilen birincil metabolitlerin PCA'sı; (b) GC-FID ile elde edilen yağ asitlerin PCA'sı. Mavi Nokta: MF1, Kırmızı Nokta: MF1T; Mavi Üçgen: MF2 ve Kırmızı Üçgen: MF2T örneklerinin verileri.....	133
Şekil 4.21. Gıda kompozisyonu açısından risk değerlendirme yaklaşımı	138

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Türkiye’de onaylanan GM mısır çeşitleri.	30
Çizelge 3.1. Mısır unu materyalleri ve örnek kodları.	40
Çizelge 3.2. Bitki spesifik gen (ACT) için qPCR döngü programı.....	43
Çizelge 3.3. P-35S, P-FMV ve T-NOS için qPCR döngü programı.....	44
Çizelge 3.4. <i>ZmADH1</i> geni için seçilen primer ve prob dizileri.	53
Çizelge 3.5. <i>ZmADH1</i> için RT-qPCR döngü programı.....	53
Çizelge 3.6. RT-qPCR için kullanılan oligonükleotit primer setleri.....	54
Çizelge 4.1. Üç farklı günde altı tekrarlı çalışılarak MF1 ve MF3 örneklerinden ekstrakte edilen DNA’ların konsantrasyonu ve saflığı.....	64
Çizelge 4.2. Mikrodalga uygulanmayan ve GM olmayan mısır unlarının inhibisyon testleri.....	65
Çizelge 4.3. MF2 ve MF4 örneklerinden ekstrakte edilen DNA’ların konsantrasyonu ve saflığı.....	67
Çizelge 4.4. GMO tarama analizinin LOD _{abs} değerleri.....	67
Çizelge 4.5. Mikrodalga uygulanmayan ve uygulanan örneklerden ekstrakte edilen DNA'ların konsantrasyonu ve saflığı.	69
Çizelge 4.6. Gerçek zamanlı PCR sisteminde bulunan kanallardan elde edilen verilerin yorumlanması.....	71
Çizelge 4.7. Mikrodalga uygulanmayan ve uygulanan örneklerde genetik elementlerin taranması.	72
Çizelge 4.8. RNA Extracol yöntemi kullanılarak örneklerden ekstrakte edilen RNA için Nanodrop ölçümleri sonucunda elde edilen RNA verim, varyasyon katsayısı ve saflık (A260/280) değerleri.	74
Çizelge 4.9. Modifiye RNA Extracol yöntemi kullanılarak örneklerden ekstrakte edilen RNA için Nanodrop ölçümleri sonucunda elde edilen RNA verim, varyasyon katsayısı ve saflık (A260/280) değerleri.	76
Çizelge 4.10. Modifiye SDS-LiCl ekstraksiyon yöntemi uygulanarak elde edilen RNA’nın kalite kontrol değerlendirme sonuçları.....	79
Çizelge 4.11. Modifiye CTAB ekstraksiyon yöntemi kullanılarak örneklerden ekstrakte edilen RNA için Nanodrop ölçümleri sonucunda elde edilen RNA verim, varyasyon katsayısı ve saflık (A260/280) değerleri.	79

Çizelge 4.12. Modifiye RNA Extracol yöntemi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan C1 örneklerinden ekstrakte edilen RNA için Nanodrop sonucunda elde edilen RNA verim değerlerinin karşılaştırılması.	82
Çizelge 4.13. Modifiye RNA Extracol yöntemi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan C1 örneklerinden ekstrakte edilen RNA'nın (A) DNaz uygulaması sonrasında elde edilen RNA kalite ölçümleri.	83
Çizelge 4.14. Modifiye RNA Extracol yöntemi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan C1 örneklerinden ekstrakte edilen RNA'nın (B) DNaz uygulaması sonrasında elde edilen RNA kalite ölçümleri.	83
Çizelge 4.15. Modifiye CTAB ekstraksiyon yöntemi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan C1 örneklerinden ekstrakte edilen RNA için Nanodrop sonucunda elde edilen RNA verim değerlerinin karşılaştırılması.	84
Çizelge 4.16. Modifiye CTAB ekstraksiyon yöntemi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan C1 örneklerinden ekstrakte edilen RNA'nın (A) DNaz uygulaması sonrasında elde edilen RNA kalite ölçümleri.	84
Çizelge 4.17. Modifiye CTAB ekstraksiyon yöntemi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan C1 örneklerinden ekstrakte edilen RNA'nın (B) DNaz uygulaması sonrasında elde edilen RNA kalite ölçümleri.	85
Çizelge 4.18. RNA ekstraksiyon metotlarının karşılaştırılması.	86
Çizelge 4.19. İki farklı günde beş tekrarlı çalışılarak C1 örneğinden ekstrakte edilen RNA'ların miktar ve kalite değerleri.	88
Çizelge 4.20. RT-qPCR testlerinin doğrusalığı, amplifikasyon verimliliği ve özgüllüğü.	90
Çizelge 4.21. RT-qPCR analizleri için doğrulama parametreleri.	92
Çizelge 4.22. Mısır örnekleri için RNA miktar ve kalite verilerinin değerlendirilmesi.	94
Çizelge 4.23. Mısır RNA örneklerinden sentezlenen cDNA'ların nanospektrofotometrik analizleri.....	95
Çizelge 4.24. Mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örneklerinden elde edilen birincil metabolitlerin metabolit miktarları (mg/kg) (Normalleştirilmiş veriler EK 9-A'da gösterilmiştir).	102
Çizelge 4.25. Mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örneklerinden elde edilen birincil metabolitlerin metabolit miktarları (mg/kg) (Normalleştirilmiş veriler EK 9-B'de gösterilmiştir).	105

Çizelge 4.26. GC-FID ile analiz edilen fitosterol standartlarının doğrusallık ve duyarlılık verileri.	120
Çizelge 4.27. Mısır unlarının (MF1 ve MF2) mikrodalga uygulaması sonrasında elde edilen fitosterol içerikleri.	121
Çizelge 4.28. Mısır unlarının (MF3 ve MF4) mikrodalga uygulaması sonrasında elde edilen fitosterol içerikleri.	122
Çizelge 4.29. Mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örneklerinin yağ asidi içerikleri (%) (Normalleştirilmiş veriler EK 13-A'da gösterilmiştir)...	127
Çizelge 4.30. Mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örneklerinin yağ asidi içerikleri (%) (Normalleştirilmiş veriler EK 13-B'de gösterilmiştir)...	128

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

kg	Kilogram
g	Gram
mg	Miligram
m	Metre
mm	Milimetre
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
mM	Milimolar
α	Alfa
β	Beta
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
GHz	Gigahertz
W	Watt
dk	Dakika
°C	Santigrat Derece

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ACT	Aktin
ADH	Alkol Dehidrogenaz
AGO	Argonot
AOCS	Amerikan Yağ Kimyagerleri Birliği
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i> (Karnabahar mozaik virüsü)
cDNA	Tamamlayıcı / Komplementer Deoksiribonükleik Asit
Cq (Ct)	Eşik Döngüsü
CRM	Sertifikalı Referans Materyal
CTAB	Hekzadesiltrimetilamonyum Bromür

DEPC	Dietil Pirokarbonat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
dNTP	Deoksinükleotit Trifosfat
EC	Enzim Komisyonu
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
ENGL	Avrupa GMO Laboratuvarları Ağı
ERM	Avrupa Referans Materyali
FAME	Yağ Asidi Metil Esterleri
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FMV	<i>Figwort mosaic virus</i> (Figwort mozaik virüsü)
GC-FID	Gaz Kromatografisi-Alev İyonizasyon Dedektörü
GC-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
GM	Genetik Modifiye
GMO	Genetik Modifiye Organizma
HCA	Hiyerarşik Kümeleme Analizi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IRMM	Referans Materyaller ve Ölçümler Enstitüsü
JRC	Ortak Araştırma Merkezi
KEGG	Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi
LC-MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
LOD _{abs}	Mutlak Tespit Limiti
LOD	Tespit Limiti
LOQ	Ölçüm Limiti
MIQE	Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Deneylelerinin Yayınlanması için Minimum Bilgi
mRNA	Haberci, Mesajcı (Messenger) RNA
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil) trifloroasetamid
OECD	Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
PCA	Temel Bileşen Analizi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
P-FMV	FMV Promotörü

P-35S	CaMV 35S Promotörü
PUFA	Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
PVP	Polivinilpirolidon
qPCR	Kantitatif/Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RIN	RNA Bütünlük Numarası
RLK	Reseptör Benzeri Kinaz
RNA	Ribonükleik Asit
RNaz	Ribonükleaz
rRNA	Ribozomal RNA
RSD _R	Laboratuvar İçi Bağlı Tekrar Üretilebilirlik Standart Sapması
RT-qPCR	Revers Transkriptaz-Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SFA	Doymuş Yağ Asitleri
S _R	Laboratuvar İçi Tekrar Üretilebilirlik Standart Sapması
TCA	Trikarboksilik asit
T-NOS	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Nopalin Sentaz Terminatörü
TOF-MS	Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
tRNA	Taşıyıcı RNA
UFA	Doymamış Yağ Asitleri
UNG	Urasil N-glikozilaz
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Gıda biliminde omik yaklaşımı, gıda bileşenlerini ve besin maddelerini incelemeye, karakterize etmeye ve değerlendirmeye olanak sağlayan genomik, transkriptomik, metabolomik, lipidomik, proteomik ve metagenomik gibi farklı omik teknolojilerinin uygulanmasını ve entegrasyonunu kapsayan güçlü bir disiplin olarak tanımlanmıştır. Günümüzde omik teknolojileri gıda biliminde sağlam, verimli ve hassas analitik araçlar olarak yer bulmakta; araştırmacılar da özellikle yeni gıdaların gıda kalitesini ve gıda izlenebilirliğini iyileştirmek, gıda güvenliği sorunlarının çözümünü hızlandırmak ve gıda işleme yöntemlerini değerlendirmek için bu analizleri uygulamaktadır [1, 2].

Gıdaların işlenmesine yönelik kullanılan geleneksel yaklaşımların güvenli ürünler sunduğu kanıtlanmıştır; ancak bazı durumlarda son ürünün kalitesi, orijinal üründen tat, aroma, tekstür, besin değeri gibi özellikler bakımından daha düşüktür. Bu nedenle son yıllarda gıdaların işlenmesine yönelik alternatif teknolojiler araştırılmıştır. Söz konusu tekniklerden bazıları vurgulu/darbeli elektrik alan, yüksek basınç uygulaması ve mikrodalga teknolojileridir. Bu işleme teknolojilerinin uygulanması ve gıda bileşenleri üzerindeki etkileri, gıda bilimi ve endüstrisi tarafından incelenip benimsenmiştir [3]. Gıda işleme teknikleri arasında yer alan mikrodalga uygulamasının, geleneksel ısıtma yöntemleriyle kıyaslandığında ısıtma hızı yüksek ve işlem süresi kısadır. Ayrıca, mikrodalga uygulaması homojen bir sıcaklık dağılımı ve enerji tasarrufu sağlamaktadır. Mikrodalga ile işlem gören gıda bileşenlerinin besin değerleri geleneksel ısıtmaya kıyasla daha az oranda değişmektedir. Bunun yanı sıra, mikrodalga uygulaması güvenli kullanım ve kolay temizlenme gibi avantajlarıyla gıda işleme alanında uzun süredir yaygın olarak kullanılmaktadır [4].

Bu tez çalışmasında, mikrodalga uygulanmayan ve uygulanan genetik modifiye (GM) ve GM olmayan mısır unlarının moleküler ve kimyasal profillerinin genomik, transkriptomik, metabolomik ve lipidomik gibi omik yaklaşımlar kullanılarak incelenmesi, karakterize edilmesi ve bulguların uygun istatistiksel araçlarla değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmada, mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan MIR604 ve MON810 mısır unları ile eşdeğerleri, GM olmayan muadilleri deney materyali olarak kullanılmıştır. Elde edilen bulgularla, proses etkisine bağlı mısır

unu örneklerinde hem moleküler hem de kimyasal bileşenlerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Genomik çalışmalar kapsamında, mikrodalga uygulaması sonrasında genetik modifikasyonun saptanmasına yönelik tarama analizleri gerçekleştirilmiştir. Mikrodalga uygulanmayan ve uygulanan mısır unu örneklerinden ekstrakte edilen DNA'larda Karnabahar mozaik virüsü (CaMV) 35S promotörü (P-35S), Figwort mozaik virüsü promotörü (P-FMV) ve T-NOS (nopalın sentaz terminatörü) genetik elementlerinin, kalitatif polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bazlı tarama yöntemi kullanılarak tespit edilmesi amaçlanmıştır. Uygulanan DNA ekstraksiyonunun etkinliğini doğrulamak için bitki spesifik Aktin (ACT) geni için inhibisyon çalışması yapılmıştır. LightCycler 480 qPCR (Roche Diagnostics International AG, İsviçre) sistemi kullanılarak gerçekleştirilen kalitatif PCR bazlı tarama analizlerinin doğrulama çalışmaları için mutlak tespit limiti (LOD_{abs}), tip 1 hata oranı (yanlış pozitif) ve tip 2 hata oranı (yanlış negatif) parametreleri gibi yöntem performans kriterleri belirlenmiştir.

Mikrodalga uygulanmayan ve uygulanan mısır unu örneklerinden RNA ekstraksiyonu ve gen ekspresyon analizlerinin başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmesi amacıyla revers transkriptaz-kantitatif PCR (RT-qPCR) temelli transkriptomik analizler yapılmıştır. Bu çalışmalar kapsamında, LightCycler 96 qPCR (Roche Diagnostics International AG, İsviçre) sistemi kullanılarak, EvaGreen bazlı RT-qPCR analizleri ile tüm mısır örneklerinde iki hedef gen (Argonot, *ZmAGO1a* ve Reseptör benzeri protein kinaz, *ZmRLK9*) tespit edilip, bu genlerin mutlak gen ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. İlk olarak, mısır referans geni (Alkol dehidrogenaz, *ZmADH1*) için bir inhibisyon kontrol testi gerçekleştirilmiş, RNA ekstraksiyon ve cDNA sentezi yöntemlerinin etkinliği doğrulanmıştır. Hedeflenen *ZmAGO1a* ve *ZmRLK9* genlerinin analizleri için kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve her RT-qPCR analizi için amplifikasyon verimi, erime eğrisi analizi yoluyla özgüllük, laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik standart sapması (S_R), laboratuvar içi bağıl tekrar üretilebilirlik standart sapması (RSD_R), tespit limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) gibi hassasiyet ölçümleri dahil olmak üzere doğrulama parametreleri belirlenmiştir.

Metabolomik kapsamında, gaz kromatografisi teknikleri kullanılarak mikrodalga uygulanmayan ve uygulanan örneklerin hem birincil metabolit profilleri oluşturulmuş hem de fitosterol gibi önemli ikincil metabolit grubu belirlenmiştir. Birincil metabolit analizleri için gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) sistemi olarak 7890A GC/5975C serisi MSD sistemi (Agilent J&W Scientific, ABD) kullanılmış ve metabolitlerin kromatografik ayrımı 0.25 mm iç çapa (ID) ve 0.25 µm partikül boyutuna sahip, 30 m uzunluğundaki (L) HP-5 ms kolonunda (Agilent J&W Scientific, ABD) gerçekleştirilmiştir. Örneklerdeki birincil metabolitler, Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü (NIST) MS Search 2.4 /Wiley W10N14 (John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, ABD) kütle spektral kütüphaneleri aracılığıyla tanımlanmıştır. İç standarda dayalı yarı kantifikasyon yöntemi uygulanarak birincil metabolitlerin miktarları belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca, tanımlanan birincil metabolitlerin metabolik yolak analizleri, KEGG bileşik ve KEGG yolağı veri tabanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Türevlendirilmiş örneklerdeki fitosterol bileşikleri ise, GC-alev iyonizasyon dedektörü (FID) Trace GC Ultra (Thermo Fisher Scientific Inc., ABD) cihazında, Alltech Associates, Inc. (Deerfield, Illinois, ABD) firmasından sağlanan EC-1 (30 m L x 0.32 mm ID, 0.25 µm partikül boyutu) kolonu kullanılarak tespit edilmiş ve fitosterol bileşikleri dış standartların alıkonma süreleriyle karşılaştırılarak doğrulanmıştır. Bileşiklerin her biri için elde edilen pik alanları ve dış standartların doğrusal denklemleri kullanılarak kantitatif analizler gerçekleştirilmiştir.

Metabolomiklerin alt kategorisi olarak sınıflandırılan lipidomik analizler kapsamında ise, mikrodalga uygulanmayan ve uygulanan örneklerin yağ asidi kompozisyonları GC-FID analizleriyle belirlenmiştir. Analizler, Trace GC Ultra (Thermo Fisher Scientific Inc., ABD) cihazında, OPTIMA-WAX (30 m L x 0.25 mm ID, 0.25 µm partikül boyutu, Macherey-Nagel, Düren, Almanya) kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerdeki yağ asidi bileşikleri, yağ asidi metil esterleri (FAME) standardındaki bileşiklerin alıkonma süreleriyle karşılaştırılarak doğrulanmıştır. Mikrodalga uygulanan ve uygulanmayan örneklerden elde edilen her bir yağ asidi bileşiğinin yüzdesi, ilgili pik alanının toplam yağ asidi pik alanına olan oranı kullanılarak hesaplanmıştır. Ek olarak, doymamış yağ asitlerinin (UFA) doymuş yağ asitlerine (SFA) oranı belirlenerek, örneklerin yağ asidi kompozisyonlarının besinsel kalitesi değerlendirilmiştir. Mikrodalga uygulaması öncesinde ve sonrasında, GC teknikleri kullanılarak elde edilen veri setlerini

değerlendirmek ve karşılaştırmak amacıyla Hiyerarşik Kümeleme Analizi (HCA) ve Temel Bileşen Analizi (PCA) gibi çok değişkenli analiz yöntemleri uygulanmıştır.

Bu çalışma, mikrodalga uygulanan mısır ununun hem moleküler hem de kimyasal profilinin omik araçları kullanılarak karakterizasyonuna, analizler sonrasında elde edilen verilerin yorumlanmasına ve mısır ununun mikrodalgada işlenmesine ilişkin araştırmalardaki boşluğun moleküler ve kimyasal bileşim açısından doldurulmasına katkı sağlamaktadır. Bu çalışmada kullanılan kalitatif PCR tekniği, araştırmacıların mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan GM mısır unu örneklerindeki genetik elementleri tarayabilmesine olanak tanıyacak niteliktedir. RT-qPCR analizlerinden elde edilen güvenilir sonuçlar, hem mikrodalga uygulanmayan hem de mikrodalga uygulanan mısır unu örneklerinde iki hedef genin tespitini ve mutlak gen ekspresyon analizleri kapsamında örneklerin RNA seviyelerinin belirlenmesini mümkün kılmıştır.

Çalışma, mikrodalga uygulaması sonrasında mısır unu metabolit profillerinin incelenmesi, gözlemlenmesi ve kontrol edilmesi için metabolik profil araçlarının kullanımını ortaya koymuştur. Çalışmada karakterizasyon amacıyla kullanılan yöntemler, birincil ve ikincil metabolitlerin anlaşılmasına ve bunların gıda ve sağlık üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesine, gıda besin değerlerinin incelenmesine ve gıda gerçekliğinin (otantisite ya da otantiklik) ortaya konmasına ilişkin gelecekteki çalışmalar için de önem arz etmektedir. Çalışma, mısır unu ve diğer tahıl unlarının mikrodalgada işlenmesine ilişkin gelecekteki çalışmalar için temel oluşturmasının yanı sıra, mikrodalga uygulanan GM gıda ürünlerinin gıda kompozisyonu açısından risk değerlendirmesinde omik yaklaşımların uygulanabilirliği hakkında da bir rehberlik sağlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gıda Analizinde Omik Yaklaşımlar

Uzun yıllardır, gıda kalitesinin değerlendirilmesi, gıda güvenliğinin yasal düzenlemelere uygunluğunu garanti etmek için büyük bir öneme sahiptir. Bu, teknolojik süreçlerin kontrolünü ve bunların gıda üzerindeki etkilerini, gıda bileşiminin karakterizasyonunu, gıda besin değerinin belirlenmesini vb. içermektedir. Bu klasik konular, gıda bilimi ve teknolojisi alanında çalışan araştırma kurumları, endüstriler ve düzenleyici laboratuvarlar için büyük bir öneme sahip olmuştur. İnsan sağlığına faydalı etkileri gösterilen gıda bileşenlerinin tespiti ve karakterizasyonu, modern gıda bilimi alanındaki önemli bir konu olarak öne çıkmaktadır. Bu konu, gıda ve beslenme alanlarını omik teknolojilerin uygulanmasıyla inceleyen bir disiplin olan “Foodomics (Gıda omik)” adı verilen gıda biliminde büyük ölçekli veri elde edilen yaklaşımı tanımlayan yeni bir alandaki büyümeyle gösterilmiştir [5].

Klasik hedefe yönelik analitik prosedürler hâlâ baskındır; ancak gıda ürünlerinin omik yaklaşım aracılığıyla bütünsel karakterizasyonu ilgi ve uygulanabilirlik kazanmaktadır. Bu tür yeni yaklaşımlar, coğrafi ve/veya genetik köken, işleme yöntemleri, taşıma, organoleptik özellikler vb. gibi gıda kalitesine ilişkin yeni göstergeler sağlayabilmektedir. Gıda bilimi alanında, omik yaklaşımın potansiyel uygulamaları oldukça geniştir; bunlar arasında yer alan temel konular şu şekilde özetlenebilir: (1) Gıda bileşiminin karşılaştırılması; (2) Gıdanın izlenebilirliği ve özgünlüğü için ileri kontrol; (3) olgunlaşmanın, depolamanın veya gıda üretiminde uygulanan çeşitli teknolojik süreçlerin ve etkilerinin etkin bir şekilde izlenmesi; (4) Organoleptik özelliklerin moleküler içerikle bağlantısı; (5) İnsan sağlığı için fonksiyonel gıdaların incelenmesi; (6) Gıda işleme öncesi ve sonrasında gıda ürünlerinin karakterize edilmesi; (7) Gıda güvenliğine ilişkin çalışmalar. Genel olarak, gıda biliminde omik yaklaşım yeni bilgiler sağlayabilmekte ve gıda bileşenlerinin avantajlı veya olumsuz etkilerini tetikleyen biyokimyasal, moleküler ve hücrel mekanizmaların anlaşılmasını teşvik edebilmektedir [6, 7].

Gıda biliminde omik terimi, ilk olarak 2009’da ortaya çıkmıştır ve son yirmi yılda geliştirilen genomik (genlerin tespiti), transkriptomik (RNA), nutrigenomik (besin

maddeleri), proteomik (proteinler), metabolomik (metabolitler) gibi farklı omik teknolojilere dayalı yaklaşımları kullanarak çeşitli gıda ürünlerinin karakterizasyonunu ve kontrolünü ifade etmektedir. Omik teriminin yorumlanabilmesi için -omik ekinin çağrışımının açıkça anlaşılması gerekmektedir. “Omik” kelimesi Latince her şey, bütünlük ve tüm anlamına gelen “omne” kelimesinden türetilmiş olup, disiplinler arası etkileşimlere atıfta bulunarak ek olarak kullanılmaktadır [8]. Gıda biliminde omik terimini daha iyi anlayabilmek için, onu oluşturan tüm omik disiplinlerin detaylı bir şekilde incelenmesi gerekmektedir.

Genomik, temel olarak DNA’yı yansıtmakta ve genlerin ve genomların yapısının, fonksiyonunun, evriminin, haritalanmasının, epigenomik ve mutagenomisinin incelenmesini ele almaktadır. Genomik, genetik çeşitliliğin aydınlatılmasında vazgeçilmez bir rol oynamakla birlikte, ürün yetiştirme verimliliğinin artırılmasına ve ürün türlerinin genetik olarak iyileştirilmesine yardımcı olmaktadır [9]. Transkriptomik, belirli bir hücre, doku, organ veya bütün organizmanın belirli bir zamana, gelişimsel aşamaya veya belirli fizyolojik koşullara karşılık gelen bütün transkript setlerinin detaylı bir analizini tanımlamaktadır. Transkriptomik yaklaşım, genlerin transkripsiyonel yapısına ilişkin bir anlayış oluşturmayı, her türlü transkriptin kataloglanmasını (mRNA, tRNA, rRNA gibi) ve diferansiyel olarak ifade edilen genlerin aydınlatılmasını sağlamaktadır [10]. Metabolomik, belirli bir zaman diliminde hücreler, biyosıvılar, dokular veya organizmalar içindeki, genellikle metabolitler olarak bilinen, 50 - 1500 dalton (Da) kütle aralığına sahip küçük moleküllerin büyük ölçekli çalışması olarak bilinmektedir. Metabolomik diğer omik yöntemlerin aksine, temel biyokimyasal aktiviteyi ve hücre / dokuların durumunu doğrudan yansıtmaktadır [11]. Lipidomik ise, herhangi bir biyolojik sistemdeki lipid bileşenlerini büyük ölçekte inceleyen bir disiplin olarak yer almaktadır. Lipidomik, genellikle doku, vücut sıvıları, bitkiler veya işlenmiş gıdalar gibi çeşitli biyolojik örneklerden elde edilen organik ekstraktlardaki yağların kapsamlı analizini ifade etmektedir [12].

2.1.1. Genomik Uygulamaların Temeli: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

“Genomik” terimi, bir organizmanın DNA’sında depolanan kalıtsal bilgilerin eksiksiz koleksiyonunu ifade etmektedir. Modern genomik teknolojileri, bu bilgileri incelemek ve

bireyler, popülasyonlar ve türler arasındaki genom içeriğindeki farklılıkları ortaya çıkarabilmek için çeşitli araçlar sunmaktadır [13]. Bu araçların çoğu, başlangıçta yüksek kaliteli bir DNA şablonunun elde edilmesini gerektirmektedir. Genomik çalışmalarda kullanılan teknolojilere örnek olarak; elektroforez ve saflaştırma sistemleri kullanılarak DNA şablonlarını hazırlama, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve dizileme araçları kullanılarak DNA baz kodunun dizisini ve haritasını belirleme, mikroarrayler ve genotipleme yöntemleri kullanılarak diziler arasındaki benzerlikleri ve farklılıkları tespit etme, oligonükleotidlerin analizi için kütle spektrometresini kullanma ve tüm genomları analiz etmek için yeni nesil sekanslama (next-generation sequencing, NGS) cihazları verilebilir [14]. 1983 yılında Kary Mullis tarafından keşfedilen PCR, biyolojideki birçok alt disiplini etkileyerek moleküler bilimin gidişatını değiştiren önemli bir yenilik olarak kabul edilmektedir. PCR, bir DNA şablonundan hedef dizilerin çoğaltılması için kullanılan güçlü bir amplifikasyon tekniğidir. Amplifikasyonun doğasından dolayı, başarılı bir amplifikasyon için DNA örneğinin çok az kopyasına ihtiyaç vardır ve bu teknik adli kanıtların analizi, antik DNA'nın amplifikasyonu ve yalnızca birkaç hücreden oluşan örneklerin incelenmesi dahil birçok uygulamada çok değerlidir [15].

PCR analizinin gerçekleştirilebilmesi için gerekli olan başlıca bileşenler, şablon DNA, primerler, nükleotidler (dNTP'ler) ve DNA polimerazdır. DNA polimeraz, nükleotidleri birleştirerek PCR ürününü oluşturan temel enzimdir. Nükleotidler, DNA'da mevcut olan adenin (A), timin (T), sitozin (C) ve guanin (G) bazlarını içermektedir. Primerler ise, hedeflenen ve amplifiye edilecek DNA ile tamamen uyumlu bir diziye sahip kısa DNA parçacıkları olup, amplifiye edilecek tam DNA ürününü belirlemektedir. Primerler ayrıca, DNA polimerazın üzerine inşa etmesi için bir uzantı noktası olarak görev yapmaktadır [16]. PCR, herhangi bir DNA sentezi reaksiyonu için gereken üç basit adıma dayanmaktadır: (1) şablonun tek iplikli hale getirilmesi (denatürasyon); (2) yeni iplik sentezi için her orijinal ipliğe primerlerin bağlanması (bağlanma) ve (3) yeni DNA ipliklerinin primerlerden uzatılması (uzama) [17]. PCR reaksiyonunun başlangıcını oluşturan denatürasyon basamağında, reaksiyon karışımı yüksek sıcaklığa ısıtılır (genellikle 90-95 °C) ve bu sıcaklık, çift iplikli DNA molekülünü ayrıştırarak tek iplikli hale getirir. Bu aşama, hidrojen bağlarını kırarak DNA'nın iki ipliğini ayırmak için kullanılır. İkinci basamakta, reaksiyon karışımı sıcaklığı belirli bir derecede düşürülür

(genellikle 50-65°C). Bu sıcaklık, primer adı verilen kısa tek iplikli DNA parçalarının hedef bölgeye bağlanmasını sağlar. Primerler, yeni DNA sentezi için başlangıç noktalarını belirler ve çift iplikli DNA'nın üzerine bağlanarak genetik materyalin kopyalanmasını başlatır. Üçüncü ve son basamak ise, reaksiyon karışımının sıcaklığının DNA polimerazın optimum çalışma sıcaklığına yükseltilmesini içerir (genellikle 68-72°C). Bu sıcaklıkta, DNA polimeraz enzimi, primerlere bağlı olan başlangıç noktalarından başlayarak çift iplikli DNA üzerinde yeni nükleotidleri ekleyerek yeni DNA ipliklerini sentezler. Bu süreç, hedef DNA bölgesinin çoğaltılmasını sağlar. En yaygın kullanılan polimeraz, *Thermus Aquaticus*'tan izole edilen enzim olan Taq DNA polimerazdır. Birbirini takip eden her döngü, DNA ürününün miktarını etkili bir şekilde iki katına çıkarır. Tipik bir PCR prosedüründe üç aşamalı denatürasyon, bağlanma ve primer uzatma döngüsü 25-40 kez tekrarlanır. Genellikle, PCR ürünleri 100 ile 3000 baz çifti uzunluğundadır, ancak belirli koşullar altında çok daha uzun (yaklaşık 50000 baz çiftine kadar) amplifikasyonlar mümkündür. PCR ürünleri, elektroforezi takiben floresans boyalarla boyanarak veya etiketli oligonükleotid problemlerine hibridizasyon yapılarak görselleştirilir ve karakterize edilir [18].

Gerçek zamanlı PCR (Real-time PCR) ise literatürde aynı zamanda kantitatif PCR (qPCR) olarak da isimlendirilmekte ve geleneksel PCR'da kullanılan DNA amplifikasyon koşullarını benimsemektedir. Gerçek zamanlı PCR teknolojisi, PCR'ın kinetik kazanımına dayanarak ortaya çıkmıştır. Agaroz jel elektroforezi gerekmeden PCR ürününü gerçek zamanlı olarak tespit etme yeteneğine sahiptir ve hedef DNA'nın miktarını nicel olarak ölçebilir. qPCR, geleneksel PCR'ın sınırlarını genişletirken, aynı zamanda bir dizi laboratuvar zorluğuna çözüm getirmiştir. qPCR teknolojisi, DNA örneklerini kalitatif ve kantitatif olarak analiz etmek amacıyla kullanılabilir; bu özellik, onu geniş bir uygulama yelpazesi için daha esnek ve dinamik kılmaktadır [19].

Gerçek zamanlı PCR cihazı, bir dizi önemli bileşeni içermektedir; bunlar arasında ısı döngü cihazı başta olmak üzere, eksitasyon ışık kaynağı, floresans algılama sistemi ve yazılım bulunmaktadır. qPCR teknolojisinde, hedef DNA'nın amplifikasyonu dört ayrı fazda (doğrusal zemin, erken üssel, üssel ve düz fazlar) gerçekleşmekte ve bu fazlar eş zamanlı olarak takip edilebilmektedir. Doğrusal zemin fazında PCR başlamış olmasına

rağmen, floresans yayılmasında belirgin bir artış gözlenmemektedir. Erken üssel fazda, floresans miktarı belirli bir eşik değerine ulaşmakta ve bu eşik değerine ulaşan döngü sayısı eşik değeri döngüsü (Cq, Ct) olarak tanımlanmaktadır. Üssel fazda, her döngüde PCR ürünü ikiye katlanarak optimal amplifikasyon seviyesine ulaşmaktadır. Düz fazda ise, reaksiyon bileşenleri sınırlı hale gelmekte ve floresans yoğunluğu, analiz için yeterli olmayacak şekilde azalmaktadır [20]. qPCR’da, DNA amplifikasyonunun ilerlemesini gerçek zamanlı olarak izleme belirli kimyasallar aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Genellikle, Etidyum bromür (EtBr) veya SYBR green I gibi DNA bağlayıcı boyar maddeler, hidroliz problemleri (5'-nükleaz problemleri, Taqman problemleri) ve hibridizasyon problemleri gibi çeşitli floresans sinyali oluşturan prob türleri kullanılmaktadır [21].

DNA, proteinler gibi diğer moleküllere göre fiziksel ve kimyasal gıda işleme teknolojilerine karşı daha stabil olduğundan, DNA bazlı tekniklerin gıda maddeleri üretiminde kullanılan türlerin kimliğini doğrulamak için çok yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Özellikle qPCR, tüm süreç boyunca floresans tespiti yoluyla ürün artışını izleyerek nükleik asitlerin miktarının belirlenmesine yönelik güçlü, spesifik, doğru ve hassas bir araç olduğu için çeşitli bitki türlerinin (pirinç, mısır, soya, kanola, pamuk, domates ve patates) analizinde, gıda ve yemlerdeki genetik modifiye organizmaların (GMO) tespitinde ve miktarlarının belirlenmesinde kullanılmıştır [22-24].

Genetik modifiye (GM) materyalinin varlığını belirlemek için qPCR tabanlı testlerin hedef dizileri dört kategoriye ayrılmaktadır: (i) genellikle tanımlanmış transgen yapısının yanında yer alan düzenleyici diziler, (ii) spesifik bir transgen içindeki diziler, (iii) yapıya özgü diziler ve (iv) çeşide özgü diziler. İlk kategoriye ilişkin olarak, GMO yapılarının veya çeşitlerinin düzenleyici genetik elementlerinin hedef alınması, GM materyallerinin tespiti için yaygın bir prosedürdür. Kullanılan birçok düzenleyici element arasında; Karnabahar mozaik virüsü (CaMV)’ne ait 35S gen promotörü (P-35S), CaMV 35S gen terminatörü (T-35S), β -laktamaz (bla), neomisin fosfotransferaz II (nptII) ve *Agrobacterium tumefaciens* Ti plazmid nopalın sentaz geninin terminatörü (T-NOS) bulunmaktadır [25, 26]. CaMV’de bulunan 35S promotörü, her zaman aktif olan, güvenilir ve kapsamlı bir şekilde çalışılmış bir promotördür ve birçok genetik mühendisliği projesinde kullanılmıştır. Bu promotör, çeşitli genetik yapılara dahil

edilmiş ve mısır, kanola, soya ve papaya gibi ticari olarak temin edilebilen, genetik modifiye birçok ürünün üretimine yardımcı olmuştur [27]. *Agrobacterium tumefaciens*'ten türetilen ve nopalin sentezini kodlayan T-NOS geni, bir analizde transgenik elementlerin saptanması için sıklıkla bir markör olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, küresel olarak tüm izin verilen GMO'ların %70'inden fazlasının hem P-35S hem de T-NOS bölgelerini içerdiği doğrulanmıştır [28]. P-35S ve T-NOS dizileri, GMO tarama ve tanımlama analizlerinde sıklıkla hedef olarak kullanılmaktadır. Gıda ve yem materyallerinde GMO elementlerinin qPCR ile taranması çeşitli çalışmalarda ele alınmıştır [29-32]. Ayrıca, Avrupa Birliği'nde onaylanmış veya yetkilendirme için değerlendirme aşamasında olan, mısır ve soya da dahil olmak üzere çeşitli GM bitkiler Figwort mozaik virüsü (FMV) promotörünü (P-FMV) de kullanmaktadır. Bu nedenle, GM varlığını test eden araştırmacılar, P-35S ve T-NOS'a ek olarak P-FMV'yi de tespit edebilen çeşitli qPCR bazlı tarama yöntemleri yayınlamıştır [33].

2.1.2. Transkriptomik Çalışmalarda qPCR'nin Rolü ve Gen Ekspresyon Analizi

Transkriptomik araçlar, günümüzde hücre ve dokuların moleküler bileşenlerinin incelenmesine ve mRNA (haberci RNA), miRNA (mikroRNA), lncRNA (long non-coding RNA) ve sRNA (küçük RNA) olmak üzere RNA moleküllerinin kapsamlı transkripsiyonel karakterizasyonunun sağlam ve başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesine olanak tanımaktadır [34]. Transkriptomik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan teknikler, eksprese (ifade) edilmiş dizi etiketi (EST) tabanlı yöntemler, gen ekspresyonunun seri analizi (SAGE), hibridizasyon tabanlı mikroarray, gerçek zamanlı PCR (qPCR), yeni nesil sekanslama (NGS) tabanlı RNA sekanslama (RNA-seq) yöntemleri ve transkriptom analizi için biyoinformatik araçlardır [10].

Gen ekspresyonu analizleri, belirli koşullar altında belirli dokuların transkripsiyon aktivitesine bir bakış sunduğundan çok önemlidir. Gen ekspresyonunun incelenmesi genellikle RNA ekstraksiyonu ve saflaştırılması, RNA miktarı ve kalite kontrolü, ters transkripsiyon/komplementer DNA (complementary DNA, cDNA) sentezi ve revers transkriptaz-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) performansı (özellik, tekrar üretilebilirlik, duyarlılık açısından) ve qPCR analiz sonrası veri işleme (veri toplama, değerlendirme, hesaplama ve istatistik) dahil olmak üzere çeşitli prosedür

adımlarını gerektirmektedir [35, 36]. RT-qPCR, özellikle düşük RNA konsantrasyonlu dokularda düşük bolluktaki transkriptler için en duyarlı ve güvenilir yöntemdir. Kısmen degrade olmuş RNA ve sınırlı doku örneklerinden elde edilen RNA'lar için özellikle uygundur. Hassasiyeti ve dinamik aralığı nedeniyle RT-qPCR, hedef genin fonksiyonel araştırılmasında güçlü ve yaygın olarak kullanılabilen bir yöntemdir [36, 37].

RT-qPCR, transkriptom analizinde analitik ve nicel uygulamalar için büyük bir potansiyele sahiptir; analiz sonrasında elde edilen verilerin değerlendirilmesi için ölçüm prensiplerinin kapsamlı bir anlayışı önem arz etmektedir. RT-qPCR verilerinin analizi için, mutlak ve göreceli (bağıl) ölçüm yöntemleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Mutlak ölçüm, hedef genin gerçek kopya sayılarını belirlemek için bilinen standart konsantrasyonlardan oluşturulan standart bir eğriye dayanmaktadır. Bu yöntem, hedef genin belirli bir referans noktasına göre nicel olarak ölçülmesine olanak tanıyarak elde edilen verilerin daha doğru ve güvenilir bir şekilde değerlendirilmesini sağlamaktadır [38]. Mutlak ölçüm yöntemi avantajlarından biri, örnekler arasında gereken tek normalizasyonun toplam RNA'nın başlangıç miktarı için olmasıdır, bu da potansiyel hata kaynaklarını azaltmaktadır [39]. Bu yöntem, viral yükü ölçme ve gen ekspresyonunu inceleme gibi çeşitli uygulamalarda güçlü bir araç olmuştur. Ancak, mutlak ölçüm yönteminin doğruluğu kullanılan standartların uygunluğuna bağlıdır. Farklı materyaller standart olarak kullanılabilir; bunlar arasında PCR-amplifiye edilmiş hedef diziler, hedef diziyi içeren plazmidler veya ticari olarak hazırlanmış DNA/cDNA bulunmaktadır [38]. Göreceli ölçüm yöntemi ise, bir hedef genin qPCR analizi sonuçlarıyla elde edilen verilerinin referans genlerle karşılaştırılması temeline dayanmaktadır. Bu yaklaşım, hedef genin ekspresyonunu belirlemek için bir iç kontrol geni veya referans gen kullanarak genler arası varyasyonu düzeltmeyi amaçlamaktadır. Eğilimler göreceli ölçümle daha iyi açıklanabilse de, sonuçlar büyük ölçüde referans gene ve kullanılan normalizasyon prosedürüne bağlıdır [40]. Genel olarak, mutlak ve göreceli (bağıl) ölçüm yöntemleri, RT-qPCR verilerinin doğru bir şekilde değerlendirilmesi ve deneysel sonuçların güvenilir bir biçimde yorumlanması için araştırmacılara esneklik sağlamaktadır. Bu yöntemlerin öne çıkan avantajları arasında yüksek duyarlılık ve özgüllük, geniş dinamik ölçüm aralığı, yaygın ekipman bulunabilirliği, düşük maliyetli malzemeler, sınırlı genom bilgisi gerektirmesi ve düşük teknik zorluk sunması bulunmaktadır. Her bir yöntemin avantajları

ve sınırlamaları göz önüne alındığında, uygun olan yöntemin seçilmesi, çözülmek istenen bilimsel soruna ve deneysel tasarıma bağlı olarak değişebilmektedir [41].

Bitki gelişim süreçleri için gerekli olan Argonot (AGO) ve Reseptör benzeri protein kinaz (RLK) gibi mısır gen ailelerinin incelenmesi, bunların moleküler mekanizmaları hakkında değerli bilgiler sağlayabilir. Bu tez çalışmasında, transkriptomik çalışmalar kapsamında RT-qPCR’da analiz edilmek üzere seçilen hedef genlerden biri olan Argonot proteini, küçük RNA’lar (sRNA’lar) tarafından yönlendirilen gen susturma yollarında önemli bir rol oynayan bir tür RNA bağlayıcı proteindir. Birçok çalışma, sRNA’ların tüm bitkilerde gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli işlevlere sahip olduğunu göstermektedir [42]. AGO proteinleri, ökaryotik gen ekspresyonunun düzenlenmesinde kritik roller oynayarak, genellikle gelişimsel zamanlama, hücre farklılaşması, hücre ölümü, metabolik kontrol, bağışıklık ve DNA onarımı gibi birçok biyolojik süreçte geniş bir katılıma sahiptir. Argonot proteinleri, yaklaşık olarak 90–100 kDa büyüklüğünde olan büyük proteinlerdir [43]. Fonksiyonel alanlarına dayanarak, ökaryotik AGO proteinleri genellikle AGO ve PIWI alt aileleri olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Bitki genomları, tümü AGO alt ailesinde bulunan birden çok AGO proteinini kodlamaktadır. İlk kez *Arabidopsis thaliana*’da tanımlanan AGO proteinleri, fenotipik olarak küçük mürekkep balığı Argonauta’ya benzeyen bir mutantının adını almışlardır. *Arabidopsis* genomu toplamda 10 AGO proteinini kodlamakta ve bu sayı diğer çiçekli bitkilerde artış göstermektedir. Soyada (*Glycine max*) 22 AGO proteini, pirinçte (*Oryza sativa*) 19 AGO proteini ve mısırdaki (*Zea mays*) ise toplam 17 AGO proteini bulunmaktadır. AGO proteinlerinden biri olan AGO1 grubu, öncelikle 5’ üridin içeren sRNA’lar ile birleşerek bitkilerde miRNA (mikroRNA) aracılığıyla gelişim ve stres yanıtlarının düzenlenmesinde görev almaktadır [44]. AGO1’in oto regülasyonu, hücre içindeki düzeyinin dinamik olabileceğini göstermekte ve bu dinamikler, bir bitkinin biyolojik aktivitelerini önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Mısırdaki AGO1 gen ailesinin bir üyesi olarak, *ZmAGO1a*, hem gelişimde hem de çevresel değişikliklere yanıtlarda önemli bir rol oynamaktadır [43].

RT-qPCR’da analiz edilmek üzere, tez çalışması için seçilen bir diğer hedef gen ailesi olan reseptör benzeri protein kinazlar (RLK’lar) ise, bitkilerde büyüme, gelişim süreçleri

ile çevresel koşullara olan tepkilerin düzenlenmesinde görev almaktadır [45]. 1990 yılında, Walker ve Zhang, mısırdan elde ettikleri bir bitki genini başlangıçta serin/treonin spesifik bir protein kinazını kodlamak amacıyla klonlamayı başarmışlardır. Bu gen, bir reseptör benzeri protein kinazı (RLK) olarak adlandırılmıştır [46]. RLK, bitkilerde transmembran sinyal algılama ve iletimi fonksiyonları için farklı bir kinaz sınıfının devralındığını göstermektedir. RLK gen ailesi, bitkilerde en büyük gen ailelerinden biridir ve *Arabidopsis*'te 600'den fazla üyeye sahiptir [47]. Son yıllarda, *Arabidopsis* ve pirinçten, kuraklık, yüksek tuz ve düşük sıcaklık tarafından uyarılan birçok protein kinaz (PK) geni izole edilmiştir. Bu PK'lar arasında reseptör benzeri protein kinaz (RLK), mitojen-aktive protein kinaz (MAPK) sinyal bileşenleri, ribozomal protein kinaz ve transkripsiyon düzenleme protein kinaz bulunmaktadır. Bitki protein kinazlarının büyük önemi ve son birkaç yılda ortaya çıkan büyük yapısal bilgi miktarının bulunabilirliği nedeniyle, protein kinazlar bir enzim ailesini detaylı bir şekilde araştırmak ve analiz etmek için büyük bir fırsat sunmaktadır. Daha önceki araştırmalarda, mısır genomunda toplam 1241 protein kinaz tespit edilmiştir [48]. Tamamen sıralanmış mısır genomlarının mevcudiyeti, mısır gelişiminde protein kinazların ekspresyon modelleri ve işlevleri üzerine genomik ve transkriptomik çalışmaların başlatılmasına zemin hazırlamıştır [47].

Literatürde, Argonaute (AGO) ve Reseptör benzeri protein kinaz (RLK) genlerinin gen ekspresyonu analizleri için qPCR'nin kullanımını bildiren farklı çalışmalar rapor edilmiştir. Zhai ve arkadaşları [42], mısırdaki 17 *ZmAGO*'nun farklı koşullar altındaki (ısı, soğuk, tuzluluk, kuraklık ve ABA) gen ekspresyonlarını qPCR kullanarak incelemiş ve *ZmAGO18*'in potansiyel kuraklık direnç fonksiyonunu araştırmıştır. Başka bir çalışmada, 18 tane *ZmAGO* geni belirlenmiş ve bu genlerin transkriptleri mısır yapraklarında iki ayrı faktör (kuraklık ve NaCl) kullanılarak yarı-kantitatif RT-PCR ile analiz edilmiştir [49]. Mısır inbred hattı B73'te bulunan *ZmRLK7* geni için başka bir doku-spesifik gen ekspresyon analizi, RT-qPCR kullanılarak sera koşullarında çeşitli sıcaklık, nem seviyeleri ve sürelerde gerçekleştirilmiştir [50]. Yang ve arkadaşları [51], mısırdaki *ZmRLK* dahil üç genin, düşük sıcaklık koşulu sırasında dört ayrı zaman diliminde gen ekspresyon desenlerini hem yarı-kantitatif RT-PCR hem de RT-qPCR ile değerlendirmiştir. Başka bir çalışmada ise, MON810 mısır çeşidi ve yarı-izojenik çeşidi üzerinde *ZmRLK9* dahil

farklı genlerin ekspresyonunu incelemek amacıyla mRNA sekanslama (mRNA-seq) ve RT-qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir [52].

2.1.3. Metabolomik ve Metabolik Profilleme Yöntemleri

Metabolomik, düşük molekül ağırlığına sahip küçük moleküller olan metabolitlerin (aminoasitler, şekerler, organik asitler, alkaloidler gibi) kapsamlı bir görünümünü sunmakta ve hücrelerin mutlak fizyolojik durumunu temsil etmektedir [53]. Bu kapsamda, metabolomik, biyomoleküler etkileşimleri açığa çıkarmayı hedefleyerek, genotip ile fenotip arasındaki ilişkiyi daha derinlemesine anlamamıza katkı sağlamaktadır. Aynı zamanda, biyokimyasal ve moleküler mekanizmaların daha etkili bir şekilde incelenmesine izin vermektedir [54].

Metabolomik, tek bir ekstraktan çok çeşitli metabolitleri tespit etme yeteneğine sahiptir, bu da metabolitlerin hızlı ve hassas analizine olanak tanımaktadır. Metabolitler, bitki metabolizmasındaki etkileri nedeniyle bitki biyokütlesi ve mimarisi için vazgeçilmez bir bileşendir [55]. Metabolitler, bir organizmanın metabolik reaksiyonlarının bir parçası olan ve hücre fonksiyonların sürdürülmesi için gerekli olan küçük moleküller olup, onları üreten metabolizmaya bağlı olarak birincil ve ikincil metabolitler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır [56]. Birincil metabolitler canlılık için esastır, organizmaların temel faaliyetlerinde (büyüme, gelişme ve üreme) doğrudan rol oynayan ve her tür organizmada bulunan moleküllerdir. Örnek olarak amino asitler, nükleotidler, vitaminler, organik asitler ve şekerler bu grupta yer almaktadır. İkincil metabolitler ise, organizmanın koruyucu işlevlerine katılan, birincil metabolizma yollarının ana ürünlerinden özel metabolik yollarla üretilen moleküllerdir. Örnek olarak alkaloidler, terpenoidler, fitosteroller, fenolik bileşikler, glikozitler gibi bileşikler gösterilebilir [57-60].

Metabolomik yaklaşımlar, temel olarak hedefe yönelik (targeted) ve hedefe yönelik olmayan (non-targeted ya da untargeted) olarak sınıflandırılmaktadır. Hedefe yönelik metabolomik çalışmalar, spesifik metabolik yolları araştırmak veya hedefe yönelik olmayan metabolik profilleme kullanılarak tanımlanan biyomolekülleri doğrulamak amacıyla seçilmiş bir grup metabolitin (örn. amino asitler, lipitler, şekerler ve/veya yağ asitleri) kantitatif ölçümünü ifade etmektedir [61]. Hedefe yönelik yaklaşımlar, ilgilenilen

metabolitler ve bilinen bileşikler hakkında önceden bilgi gerektirmekte, metabolite özgü sinyallere dayanmakta ve genel bir kapsam sağlamamaktadır [62]. Buna karşılık, hedefe yönelik olmayan metabolomik yaklaşımlar, metabolomun genel profillemesini içermektedir. Bu yaklaşım tipik olarak, hipotez oluşturma amaçlı çalışmalarda kullanılmaktadır. Dolayısıyla, hedefe yönelik olmayan metabolomik yaklaşımlar, genellikle hedefe yönelik metabolomikten daha fazla bilgi sağlamaktadır, ancak hedefe yönelik metabolomik çalışmalar genellikle daha nicel ölçümler sunmaktadır [63, 64]. Günümüzde ayrıca, hedefe yönelik ve hedefe yönelik olmayan metabolomik yaklaşımlar dışında yeni bir entegre yöntem olan “geniş çaplı hedefe yönelik metabolomik” anlayışı ortaya çıkmıştır. Bu yeni teknoloji sayesinde hedefe yönelik profillemenin sağladığı hassas tespit avantajları ile hedefe yönelik olmayan analizle elde edilen geniş kapsama avantajları birleştirilebilmektedir [65]. Bu teknoloji, literatürde çeşitli fonksiyonel gıdalardaki aktif bileşenlerin farklı prosesler sırasında olası değişikliklerinin incelenmesinde yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Örnek olarak, Çin su kestanesi işlenirken flavonoid ve fenilpropanoid bileşiklerinin karakterizasyonu, pirincin sararması sürecindeki sararma mekanizmasının araştırılması ve Oolong çayı üretim sürecinde karakteristik uçucu olmayan kimyasal bileşenlerin oluşma mekanizmasının incelenmesi gibi konularda yapılan araştırmalarda bu yeni metabolomik yaklaşımı uygulanmıştır [66].

Metabolomik, farklı organizmalarda doğru metabolit profili oluşturmanın yolunu açarak bilim dünyasındaki en önemli atılımlardan biri olarak tanınmıştır [67]. Metabolik profillemeye teknikleri, belli bir zamanda (canlı) organizmaların biyokimyasal bileşimini daha kapsamlı bir biçimde anlamamıza yardımcı olmak için kullanılmaktadır. Temelde hedefe yönelik olmayan bir şekilde uygulanan bu teknikler, genellikle gaz kromatografisi (GC) veya sıvı kromatografisi (LC) ile bağlantılı kütle spektrometresi (MS) kullanarak, ekstrakte edilen metabolitlerin karmaşık karışımlarını kromatografik olarak ayırarak analiz etmeye dayanmaktadır [68]. Metabolik profillemeye, günümüzde bir organizmanın değişen çevresel koşullara olan sistemik tepkilerini anlamak ve işlevsel gen anotasyonunu kolaylaştırmak için önemli bir araç haline gelmiştir [69]. “Metabolik profil” terimi, ilk kez 1971 yılında Horning ve ekibi tarafından, GC-MS’in insan idrarında ve doku ekstraktlarında bulunan bileşikler analiz etmek amacıyla kullanılabileceğini gösterdikten sonra ortaya çıkmıştır. Horning grubu ve L. Pauling ile A. Robinson’ın grupları,

1970'lerde idrarda bulunan metabolitleri izlemek için GC-MS yöntemlerini daha da geliştirmişlerdir. Bu, metabolik profillemenin ilk açık örneği olarak rapor edilmiştir [70]. O zamandan beri, metabolomik araştırmalar ön plana çıkmaya başlamıştır. 1998'de, genomik ve transkriptomikle benzerlik kurarak, Steven Oliver ve arkadaşları ilk kez "metabolomik" kavramını ortaya atarak, bunu metabolitlerin ve genlerin fonksiyonlarına bağlamıştır. İlerleyen yıllarda ise bu yeni alanın kullanıldığı, bitki metabolik çeşitliliğinin karakterizasyonuna dayanan ilk araştırma makaleleri yayımlanmıştır; Fiehn ve arkadaşları *Arabidopsis* mutantlarının metabolizmasını incelemiş, Roessner ve ekibi ise transgenik patates yumrularını karakterize etmeye odaklanmıştır [65].

Metabolomik, gıda biliminde güçlü, verimli ve hassas bir araç olarak geniş bir şekilde tanınmakta, gıda işleme ve gıdanın insan sağlığı üzerindeki etkileri gibi farklı araştırma konularında uygulanmaktadır [71, 72]. Gıda matrisinde bulunan birçok bileşen, hasat, işleme ve depolama sırasında dışsal (sıcaklık, nem, basınç değişimleri, oksijen ve ışık gibi) ve içsel (pH, su aktivitesi, kompozisyon gibi) faktörler nedeniyle fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik değişikliklere uğramaktadır. Bu değişiklikler, ürünlerin besin kalitesi, güvenilirlik ve duyuşsal kabul edilebilirlik gibi son özelliklerini belirlemektedir. Bu nedenle metabolomik yaklaşım, kimyasal değişiklikleri tanımlamak ve istenen son ürün kalite özellikleriyle ilişkilendirmek için büyük önem taşımaktadır [73]. Metabolitlerin kapsamlı bir analizi, genellikle uygulanan teknolojilerin gıdanın besin değerleri ve duyuşsal özellikleri üzerindeki etkilerini anlamak açısından esastır. Metabolomik ve omik teknolojileri, çeşitli gıda işleme teknikleri sırasında potansiyel değişiklikleri izleme ve kontrol etme konusunda giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Bu teknolojiler, gıda kalitesi ve işleme arasındaki ilişkiyi daha ayrıntılı bir şekilde anlamamıza olanak tanımaktadır. Bu nedenle, gıda biliminde metabolik profilleme tekniklerinin kullanımı, gıda üretiminin kalitesini arttırmak ve tüketicilere daha sağlıklı ürünler sunmak için önemli bir araç haline gelmektedir [74].

Metabolomik, biyolojik bilimler, analitik kimya, kemometri ve biyoinformatik gibi çeşitli disiplinlerle yakından ilişkili olan ve sistem biyolojisi çalışmalarında önemli bir köprü görevi üstlenen disiplinler arası bir alan olarak öne çıkmaktadır. Hızla gelişen bu alanda, biyolojik sistemlerde metabolitleri tanımlama ve ölçme amacıyla analitik biyokimya

yaklaşımı benimsenirken; aynı zamanda, yüksek verimli teknolojiler kullanılarak ileri düzey bilgi işlem ve biyoinformatik araçlarının entegrasyonu ile biyolojik süreçlerin kapsamlı bir şekilde anlaşılması kolaylaştırılmaktadır [75]. Metabolomik çalışmalarda en yaygın kullanılan analitik platformlar, spektroskopik olan nükleer manyetik rezonans (NMR) ve spektrometrik olan kütle spektrometresi (MS) ile birleştirilmiş ayırma teknikleri (sıvı kromatografi (LC), gaz kromatografi (GC), süperkritik akışkan kromatografisi (SFC)) sistemleridir [76]. Analitik tekniklerin, özellikle de MS ve NMR temelli metabolik profillemenin gelişmesiyle birlikte, metabolomik araştırma alanı hızla genişlemektedir. NMR oldukça seçicidir ve genellikle metabolit yapısının aydınlatılmasında altın standart olarak kabul edilmektedir, ancak nispeten daha düşük hassasiyete sahiptir [77]. Buna karşılık MS, duyarlılık ve seçiciliğin iyi bir kombinasyonunu sunmaktadır. Modern MS, doğru kütle, element formüllerinin belirlenmesi için izotop dağılım desenleri ve özgün bileşik verileriyle spektral eşleştirme yoluyla yapısal açıklama veya tanımlama için karakteristik parça iyonları gibi kimyasal yapıyla doğrudan ilgili son derece spesifik kimyasal bilgiler sağlamaktadır. Ayrıca MS'in yüksek hassasiyeti, birçok birincil ve ikincil metabolitin pikomol ile femtomol düzeylerinin saptanmasına ve ölçülmesine olanak tanımaktadır. Bu benzersiz avantajlar MS'i metabolomikte önemli bir araç haline getirmektedir [78, 79].

Sıvı kromatografisi (LC) veya gaz kromatografisi (GC) ile kütle spektrometresi (MS) kombinasyonu, özellikle biyolojik örneklerde bulunan metabolitlerin hızlı ve hassas bir şekilde tanımlanmasını mümkün kılan etkileyici bir yaklaşımdır. Bu entegre yöntem, veri tabanlarından elde edilen bilgilerle desteklenerek, karmaşık metabolit profillerinin çözümlenmesini sağlamaktadır. MS yöntemleri, güçlü ayırma yetenekleri gibi avantajlar sunsa da, metabolitlerin daha spesifik bir şekilde tanımlanması için türevlendirme (derivatizasyon) işlemine başvurmak gerekebilir [80]. Metabolitlerin analitik duyarlılığını arttırmak için kullanılan türevlendirme yöntemi, metabolitlerin belirgin bir şekilde ayrılmasını sağlayarak daha kesin sonuçların elde edilmesine ve metabolitlerin güvenilir bir şekilde karakterize edilmesine olanak tanımaktadır [81]. Uçucu, düşük moleküler ağırlıklı metabolitlerin türetilmeden örneklenip analiz edilebileceğini belirtmek önemlidir. Ancak birçok metabolitin yüksek sıcaklıklarda uçucu olmaması ve kararsızlığı nedeniyle GC analizinden önce türevlendirme yapılması gerekmektedir.

Farklı reaktiflerle metabolitlerin çeşitli türevlendirme yöntemleri rapor edilmiştir. Karboksilik asitler (-COOH), alkoller (OH), aminler (-NH₂) ve tiyoller (-SH) içeren moleküllerin aktif hidrojenleri, asilasyon, alkilasyon veya sililasyon yoluyla türetilmektedir [82]. Metabolomiklerde türevlendirme için en popüler yöntem, metoksiamin hidroklorür (MeOX) ile oksimasyonu ve ardından sililasyonu içeren iki aşamalı bir prosedürdür. En sık kullanılan sililasyon ajanları ise N-metil-N-(trimetilsilil) trifloroasetamid (MSTFA) ve N,O-bis-(trimetilsilil) trifloroasetamiddir (BSTFA) [82, 83]. MSTFA'dan türevlerin oluşumu, bir N-metiltrifloroasetamid ayrılan grubun analit tarafından yer değiştirmesini içermektedir [84].

MS dışında alev iyonizasyon dedektörü (FID) gibi evrensel bir dedektöre sahip gaz kromatografisi sistemi, karbon içeren bileşiklerin yüksek verimli analizini kapsayabilen uygun maliyetli bir analitik sistem olarak kendisini kanıtlamıştır [85]. Çeşitli bitkilerin ve yeşil çay gibi gıda ürünlerinin kalite kontrolü için metabolomik çalışmalarda gaz kromatografisi-alev iyonizasyon dedektörünün (GC-FID) birkaç uygulaması rapor edilmiştir [86, 87]. GC-MS, nispeten geniş bir analitik bileşik kapsamı ve kolay pik tanımlaması ile bitki metabolik profillemeye çalışmaları için uzun süredir kullanılsa da, tam tarama izleme modundaki GC-MS ile karşılaştırıldığında, GC-FID'nin daha yüksek hassasiyete, daha güvenilir tekrarlanabilirliğe ve daha geniş dinamik aralığa sahip olduğu genel kabul görmektedir. Bu nedenle, GC-FID sistemi niceliksel analizlerde daha iyi benimsenebilmektedir. Her iki dedektörün de avantajlarından yararlanmak için, GC-MS ve GC-FID'nin entegrasyonu daha fazla tercih edilen bir yöntem olmuş ve bu birleşik sistem, farklı numune türlerine başarıyla uygulanmıştır [88, 89]. 2009'da Zhou ve arkadaşları, transgenik pirinçte bulunan *sck* ve *cryIAc* genlerinin metabolik düzeydeki istenmeyen etkilerini araştırmak amacıyla, genetik modifiye (GM) ve GM olmayan öğütülmüş pirinç örnekleri arasındaki metabolik varyasyonu belirlemek için GC-FID ve çok değişkenli analiz yöntemlerine dayalı bir metabolik profillemeye çalışması gerçekleştirmiştir [90]. Gaz kromatografisi, aynı zamanda gıdalardaki önemli biyoaktif ikincil metabolit grubu olan sterollerin toplam miktarının belirlenmesi için sıkça başvurulan bir tekniktir. Genellikle, fitosterol bileşiklerinin analizlerinde algılama için alev iyonizasyonu (FID) tercih edilen dedektördür; ancak yapısal tanı veya bazı

örneklerde benzer kolon afinitesine sahip hedef bileşiklerin birlikte elüsyonunu (koelüsyon) çözebilmek amacıyla kütle spektrometresi (MS) de kullanılmaktadır [91, 92].

Literatürde, mısır unundaki birincil ve ikincil metabolitleri karakterize etmek amacıyla kullanılan çeşitli platformları içeren metabolik profillemeye çalışmaları rapor edilmiştir. Bu çalışmalarda, GC-MS [93-97], GC-FID [98, 99], LC-MS [95, 100-102], LC-tandem kütle spektrometresi (MS/MS) [102, 103] ve GC-uçuş zamanlı kütle spektrometresi (TOF-MS) [104] gibi çeşitli sistemler kullanılmıştır. Bu çalışmalarda, mısır ununda amino asitler, karbohidratlar (monosakkaritler, disakkaritler, trisakkaritler ve şeker alkolleri), lipitler (yağ asitleri), organik asitler ve fitosteroller gibi diğer küçük bileşikler tanımlanmıştır.

Metabolomik analizler sonunda elde edilen metabolitlerin sayısı fazla olduğu için bu verilerin anlaşılmasında çeşitli çok değişkenli analiz yöntemlerine başvurulmaktadır. Bu matematiksel araçlar, veri setindeki yüksek sayıdaki değişkenleri değiştirmeden, boyutlarını azaltan bir dönüşüm tekniği olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin temel hedefi, var olan veriyi mümkün olan en az değişkenle ifade ederek, verilerin hızlı bir biçimde görselleştirilmesini ve değerlendirilmesini sağlamaktır [105]. Bu sayede, karmaşık veri setleri daha anlamlı hale getirilerek, veri analizi süreci daha etkili bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Bu amaçla, veri analizlerinde denetimsiz (unsupervised) kemometrik yöntemler olan, Hiyerarşik Kümeleme Analizi (HCA) ve Temel Bileşen Analizi (PCA) gibi çok değişkenli analiz yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır [106]. Kümeleme veya gösterim yöntemleri olarak da adlandırılan denetimsiz yöntemler, veri yapısını incelemek, birden çok nesne arasında benzerlikleri aramak ve veri setinde aykırı değerleri kontrol etmek için kullanılmaktadır. Bunlardan HCA ve PCA ise, gıda bilimi alanında metabolomik veri setlerinin analiz edilmesi ve yorumlanması amacıyla en çok kullanılanlar olarak öne çıkmaktadır [107].

2.1.4. Lipidomik Kapsamında Yağ Asidi Kompozisyonunun Belirlenmesi

Lipidomik alanı, özellikle kütle spektrometresi teknolojisinin önemli gelişmeleri ve biyoinformatikle birlikte son zamanlarda hızla ilerlemiştir. Lipidomik, hücrelerden veya biyolojik sıvılardan, dokulardan veya hatta bütün organizmalardan sistemik bir lipid profili oluşturmayı mümkün kılmaktadır. Bu nedenle, lipidomik, metabolomun tam

anlamıyla karakterize edilmesine imkan tanıyan olgun bir alt alan olarak öne çıkmaktadır [108].

Lipidomik alanını geliştirmeyi hedefleyen ve 2003 yılında lipitleri incelemek için Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) hibesinin büyük bir parçası olarak kurulan LIPID Metabolites and Pathways Strategy (LIPID MAPS) konsorsiyumu, çok sayıda yazılım aracı ve eğitim kaynağına ek olarak, farklı karakterizasyon seviyelerinde lipitlerin kataloglanması, yeni lipit yapılarının tanımlanması ve lipit yapıları hakkındaki verilerin zenginleştirilmesine yönelik katkı sağlamıştır [109, 110]. Bu konsorsiyumun önerdiği sınıflandırma ve isimlendirme sistemine göre, lipid molekülleri, kimyasal ve moleküler yapıları açısından geniş bir çeşitlilik sergilemekte, yağ asitleri, yağ alkolleri, yağ aldehitleri gibi fonksiyonel yapıları da içeren yağ açilleri başta olmak üzere gliserolipitler, gliserofosfolipitler, sfingolipitler gibi farklı ana kategorilerde gruplanmaktadır [111]. Lipid sınıfları arasındaki bu çeşitlilik, lipitlerin gliserol omurgalarına esterleştirilmiş yağ asitlerinin doymamışlık, karbon uzunluğu veya diğer modifikasyonlar bakımından çeşitliliği yansıtan geniş bir aralıkta kendini göstermektedir [112]. Yağ asitleri, tüm organizmalarda bulunan ve çeşitli işlevleri yerine getiren lipit biyomolekülleridir. Bununla birlikte, amino asitler gibi diğer biyomoleküllerin aksine, yağ asitlerinin sayısı daha fazladır ve taksonlara göre büyük ölçüde değişen kompozisyonlara sahiptir [113]. Literatürde karboksilik alifatik asitler olarak da isimlendirilen yağ asitleri, karbon (C) atomu sayısı ve zincirdeki çift bağların sayısı bakımından birbirlerinden farklılık göstermektedir [114]. Yağ asitleri, bir ucunda bir metil grubu (omega veya *n*-ucu) ve diğer ucunda bir asit grubu bulunan uzun hidrokarbon zincirleri olup, yapılarındaki çift bağların sayısı ile karakterize edilmektedirler. Doymuş yağ asitleri (SFA), yapısında çift bağ içermeyen, doymamış yağ asitleri (UFA) ise en az bir karbon–karbon çift bağ içeren hidrokarbon zincirleridir. Tekli doymamış yağ asitlerinin (MUFA) yapısında bir çift bağ bulunurken, çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) yapısında ise en az iki çift bağ mevcuttur. Çift bağın omega ucuna olan konumu, bir çoklu doymamış yağ asidinin *n*-3 (omega 3) veya *n*-6 (omega 6) yağ asidi olup olmadığını belirlemektedir [115]. Ayrıca, çift bağlar *cis* veya *trans* konfigürasyonuna sahiptir; diyetdeki doymamış yağ asitlerinin çoğu *cis* konfigürasyonuna sahip olmasına rağmen, *trans*-yağ asitleri de bulunabilmektedir. Yağ asitleri farklı zincir uzunluklarına sahiptir; ancak genellikle

karbon atomları çift sayıdır. Diyetle en çok bulunan doymuş yağ asitleri genellikle 16 (C16:0-palmitik asit) veya 18 (C18:0-stearik asit) karbon atomuna sahiptir. Daha küçük oranlarda ise 12 (C12:0-laurik asit) veya 14 (C14:0-miristik asit) karbon atomu bulunabilmektedir. En yaygın *cis*-MUFA, oleik asit (C18:1) iken, en bol bulunan *cis*-PUFA'lar ise linoleik asit (C18:2n-6) ve α -linolenik asittir (C18:3n-3) [116].

Lipidler, biyolojik materyallerden doğrudan analiz edilebileceği gibi (örneğin, kütle spektrometresi görüntüleme-MSI) organik çözücülerle ekstrakte edildikten sonra da analiz edilebilmektedir. Biyolojik lipid ekstraktları genellikle karmaşıktır. Bu karmaşıklık, lipidlerin farklı sınıfları, alt sınıfları ve moleküler türlerdeki çeşitlilikten kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, lipid ekstraktlarının karmaşıklığını azaltmak, bileşik türlerini güvenilir ve doğru bir şekilde tanımlamak ve miktarlarını belirlemek karakterizasyon açısından önemlidir [117]. Kütle spektrometresi (MS), nükleer manyetik rezonans (NMR) ve diğer spektroskopik yaklaşımlar, lipid karakterizasyonu için güçlü yöntemler haline gelmiştir. Ayrıca, ince tabaka kromatografisi (TLC) ve gaz/sıvı kromatografi sistemleri (GC ve LC) başta olmak üzere, süperkritik akışkan kromatografisi (SFC) ve kapiler elektroforez (CE) gibi çeşitli ayırma teknolojileri, kompleks örneklerde lipidlerin kapsamlı analizi için temel araçlar olarak öne çıkmaktadır. Bunlar MS ile eşleştirildiğinde, farklı hibritleştirilmiş teknikler lipidomik üzerine büyük miktarda bilgi sağlayabilmektedir [118]. Geleneksel olarak, TLC, steroidler, trigliseridler, serbest yağ asitleri ve fosfolipitler gibi farklı lipid sınıflarını ham lipid karışımlarından ayırmak için kullanılmaktadır. Ancak, TLC çözünürlük, duyarlılık ve bileşik tanıma konularında sınırlı özelliklere sahip olduğu için yerini giderek artan bir şekilde GC ve LC sistemlerine bırakmaktadır. Alev iyonizasyon dedektörü (FID) veya MS dedektörü ile birleştirildiğinde, GC'nin özellikle metil esterleştirme gibi türevlendirmeye tabi tutulduktan sonra yağ asitlerinin kompozisyonunu analiz etmek için çok etkili olduğu bildirilmiştir [119]. C8-C26 zincir uzunluğundaki yağ asitlerini belirlemek için GC-MS ve diğer teknik yöntemler geliştirilmiş olsa da, yağ asitlerinin GC analizlerinde FID dedektörünün kullanımı hala en sık tercih edilen yöntem olmaya devam etmektedir [120].

Yağ asitlerinin GC-FID ile analizinden önce, gıda ürünlerinden lipid ekstraksiyonu yapıldıktan sonra analitlerin uçuculuğunu arttırmak ve kromatografik ayrımını iyileştirmek için polar olmayan türevlere dönüştürülmesi gerekmektedir. Türevlendirme aşamasıyla birlikte GC’de hem analiz hızı hem de hassasiyet ve doğruluk parametreleri iyileştirilebilmektedir [121-123]. Türevlendirme için kullanılan en yaygın yöntem, yağ asitlerinin karşılık gelen metil esterlerine (FAME’ler) dönüştürülmesidir. Yağ asidi kompozisyonunun esterifikasyon yoluyla FAME’ye dönüştürülmesi ve ardından GC ile belirlenmesi, lipid araştırma laboratuvarlarında en yaygın yapılan analizlerden biri haline gelmiş ve biyokimyasal, biyomedikal, mikrobiyolojik, tarımsal ve ekolojik araştırmalarda geniş bir uygulama bulmuştur [124]. Literatürde birçok farklı metilasyon yaklaşımı tanımlanmış ve çeşitli gıda örneklerinden ekstrakte edilen lipitlerden FAME’lerin hazırlanması için bazı yöntemler oluşturulmuştur. Örnek olarak, asit veya baz katalizli transesterifikasyon, hidroliz sonrası boron triflorür (BF₃) metilasyonu, diazometan ile metilasyon ve sililasyon yöntemleri sıralanabilir [120]. Genel olarak, lipitlerin doğrudan transesterifikasyonu için kullanılan baz katalizli yöntem, kullanımı kolay olması ve diğer yöntemlere göre daha az agresif reaktifler içermesi nedeniyle beslenme analizi için daha uygulanabilir olarak belirtilmiştir [125-127]. Metal hidroksitler, GC analizleri için temel türevlendirme yöntemlerinde kullanılan yaygın homojen baz katalizörleridir. Potasyum hidroksitinin (KOH) metanolde çözünürlüğü biraz daha yüksek olduğundan türevlendirme işlemlerinde tercih edilebilmektedir. Bu özellik, uygulanan protokolün basitliğini ve reaksiyon süresinin kısalığını da beraberinde getirmektedir [128, 129]. Yağ asitlerinin türevlendirilmesinde asit katalizli yöntemler ise genellikle tercih edilmemektedir; bu tür yöntemler çift bağ özelliklerinde değişikliklere yol açarak istenmeyen bileşiklerin oluşumuna neden olabilmektedir [120].

Tahıl taneleri ve ürünleri, hem insanlar için hem de hayvanlar için temel besin öğeleri ve yağ asidi kaynakları arasında yer almaktadır. Tahıl lipidlerinde genellikle; palmitik asit, stearik asit, oleik asit, linoleik asit ve α -linolenik asit temel yağ asitleri bulunmakta ve diğer yağ asitleri de iz düzeyde bulunabilmektedir. Tahılların, özellikle mısır, buğday, pirinç, arpa gibi çeşitli türleri, dünya genelinde yaygın olarak tüketilmektedir. Bu nedenle, tahıl taneleri ve ürünlerinin kimyasal karakterizasyonu besinsel kalite belirleme ve tüketici sağlığına katkı sağlama açısından önem arz etmektedir [130, 131]. Bu

doğrultuda, literatürde mısır dahil farklı tahıllardaki lipitlerin içeriğini ve yağ asidi kompozisyonlarını belirlemek için GC yöntemlerine dayalı çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir [132-135]. Yapılan bu çalışmalarda, tahıl taneleri ve ürünlerinin besin değerlerinin incelenmesinin ve ayrıca gıda gerçekliğinin ve kalitesinin belirlenmesi için standart analitik yöntemlerinin geliştirilmesinin literatüre önemli bir katkı sağlayabileceği, aynı zamanda, mısır ve buğday tanelerine uygulanacak olan proseslerin yağ asidi kompozisyonlarına etkisini daha iyi anlamak amacıyla ileri araştırmaların yapılması gerekliliği vurgulanmıştır.

2.2. Gıda İşleme Yöntemleri ve Mikrodalga Teknolojisi

Gıda işleme, ham gıdanın kimyasal ve/veya fiziksel dönüşümünü içeren bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Bu sayede, tüketici tarafından kolayca hazırlanabilir ve servis edilebilir ürünler elde etmek mümkün olmaktadır. Aynı zamanda, gıda işleme yöntemi uygulanan gıda ürünleri genellikle daha uzun süre depolanabilmekte, bu da küresel bir nüfusa daha geniş bir şekilde ulaşmayı kolaylaştırmaktadır [136]. Gıda işleme süreçleri günümüzde gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmakta ve taze ürünlerin raf ömrünü uzatma, mevsim dışı ürünleri temin etme, ev tüketimi için uygun ürünler üretme, çeşitli tat, doku ve renk seçenekleri sunma veya besin özelliklerini iyileştirme gibi farklı amaçlarla uygulanmaktadır [137].

Gıda işleme alanında kullanılan geleneksel işleme yöntemleri güvenilir gıda ürünleri sunsa da, gıda endüstrisinde üretim süreçlerini geliştirmek, tüketici beklentilerini daha iyi karşılamak ve gıda kalitesini iyileştirebilmek amacıyla alternatif gıda işleme teknolojileri ortaya çıkmıştır [138]. Ohmik ısıtma ve dielektrik ısıtma yöntemleri, evaporasyon, pastörizasyon, kurutma ve sterilizasyon gibi geleneksel işleme yöntemlerine alternatif olarak değerlendirilen ve gelecek vaat eden yenilikçi termal teknolojiler arasındadır; bu teknolojiler, radyo frekansı ve mikrodalga teknolojisi gibi yöntemleri içermektedir. Aynı zamanda, ultrason (ultrases), yüksek basınç uygulaması, vurgulu/darbeleri elektrik alan ve vurgulu/darbeleri ışık teknolojileri gibi yenilikçi termal olmayan teknolojiler de geliştirilmiştir. Bu modern termal ve termal olmayan teknolojilerin çeşitli gıda ürünlerinin muhafaza edilmesi ve kalitesi üzerindeki etkileri, araştırmacılar tarafından detaylı bir şekilde incelenmiş; elde edilen bilgiler, gıda işleme alanı için düzenleyici onay

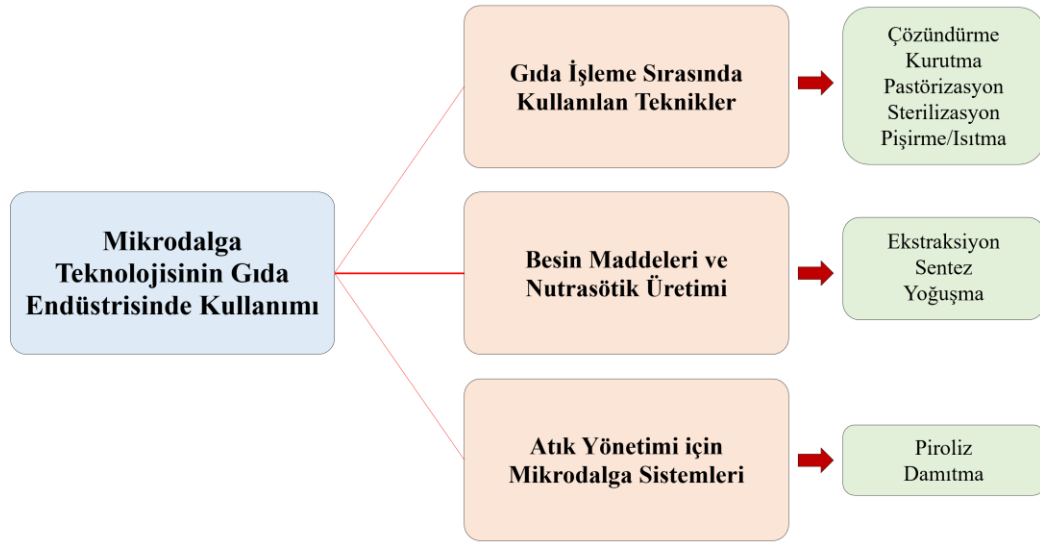
ve yatırım kararlarına destek sağlamak amacıyla değerli birer kaynak oluşturmuştur [139, 140]. Mikrodalga teknolojileri gibi minimal işleme teknikleri, tüketicilerin daha uzun raf ömrüne sahip gıda ürünlerine ulaşabilmelerine olanak tanımaktadır. Mikrodalga teknolojisinin gıda işleme sürecindeki büyük faydalarından biri, ürünlerin geleneksel konveksiyon ve iletim ısıtma yöntemleri yerine doğrudan ısıtılmasıdır. Bu yaklaşım, toplam işlem süresini kısaltmanın yanı sıra, ürünün dış kısmının aşırı ısınmasını engelleyerek taze ürün kalitesini muhafaza etme avantajına sahiptir [141]. Tüketicilerin güvenli, taze, sağlıklı, lezzetli ve yeni ürünlere olan artan talebi, yenilikçi gıda işleme teknolojilerinin sürekli olarak geliştirilmesini teşvik etmektedir. Bu bağlamda, mikrodalga teknolojisinin küresel olarak çeşitli ev, ticari ve endüstriyel gıda işleme alanlarında giderek daha fazla uygulanmaya başlandığı ve umut verici bir teknoloji olarak öne çıktığı belirtilmektedir [142, 143].

Elektromanyetik spektrum, iyonlaştırıcı ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyonları içermektedir. Gama ışınları ve X ışınları, bunun iyonlaştırıcı kısmına düşer, ancak ultraviyole (UV) ışınları, görünür ışık, kızılötesi, mikrodalgalar ve radyo dalgaları iyonlaştırıcı olmayan radyasyonun bir parçasıdır. Mikrodalgalar, iyon göçü ve dipol rotasyonu aracılığıyla moleküler hareketi tetikler, ancak moleküllerin kompozisyonunu değiştirmez. Mikrodalga enerjisi, elektromanyetik spektrumun bir parçasıdır ve dalga boyu aralığı 1 mm ile 1 m arasında, frekans aralığı ise 300 MHz ile 300 GHz arasındadır. Genellikle, ev tipi mikrodalga fırınlar için 2450 MHz frekansı kullanılırken, gıdanın endüstriyel işlenmesi için 915 MHz ile 2450 MHz aralığı kullanılmaktadır [144]. Bir mikrodalga sistemi, magnetron, arttırıcı transformatör, fırın boşluğu, dalga kılavuzu, uygulayıcı ve işlenmesi gereken örnek içermektedir. Mikrodalga sistemlerinin temel prensibi benzerdir. Transformatör, ev elektriği hattından gelen 50-60 Hz frekansındaki alternatif akımı 2450 MHz frekansına çıkarmak için kullanılır. Arttırıcı transformatör, mikrodalga fırınının ağırlığının yarısından fazlasını oluşturmakta ve magnetronu beslemektedir. Magnetron, 4000 Volt'ta çalışmakta ve elektrik enerjisini mikrodalga enerjisine dönüştürmektedir. Magnetron tarafından üretilen mikrodalgalar, bir dalga kılavuzundan geçerek mikrodalga boşluğuna ulaşmaktadır. Mikrodalga boşluğu, ısıtılacak ürünü tutan ve mikrodalga ısınmasının verimliliğini maksimize etmek için yansıtıcı duvarlardan oluşmaktadır. Ortak ev tipi mikrodalga fırını için dikdörtgen bir

boşluk, mikrodalga uygulayıcıyı temsil etmektedir. Kullanılan uygulayıcılar çok modlu, tek modlu ve seyahat eden dalga cihazlarıdır [145].

Mikrodalga teknolojisinin kullanımı, konveksiyon ve iletim ısıtma yöntemlerine göre birçok avantaj sunmaktadır: (1) daha hızlı ısı transferi ve daha kısa ısı işlem süresi; (2) ısıtma dielektriktir, hacimseldir (tüm malzemenin etrafında) ve ısıtmanın dipollü moleküllere özgü olması nedeniyle seçicidir; (3) enerji tasarruflu bir ısıtma yolu sunar ve dolayısıyla uygun maliyetlidir; (4) ısıtma doğrudan karışımın içerisinde gerçekleştirilir, ısı kaynağı ile doğrudan temas olmaz, bu sayede yüzeylerin aşırı ısınması önlenir; (5) yüksek ürün verimi elde edilmesini sağlar; (6) ekipmanın kompaktlığı iyidir, bu özellik ekipmanın yer değiştirmesine izin verir, ayrıca açma ve kapama anında gerçekleşir; (7) ısıtma için kullanılan yalıtkan kap ısı kaybını önler, çünkü mikrodalgalar ısıtmadan kap duvarından geçerler; (8) çevre dostu bir işleme yöntemi olarak değerlendirilebilir; (9) kısa reaksiyon süreleri nedeniyle düşük derecede bozunma veya yan ürün oluşumu gözlenir; (10) kaynama noktası tarafından sınırlanmadığından maksimum sıcaklık elde etmeyi sağlar; (11) nem azalımını iyileştirir, bu nokta, prosesin türüne bağlı olarak bir avantaj veya dezavantaj olarak değerlendirilebilir [146].

Mikrodalgalar, dielektrik özelliklere sahip bir materyali ısıtma yeteneğine sahiptir. Materyal, mikrodalga enerjisini emer ve ardından onu ısıya dönüştürür, bu da mikrodalgaların birçok endüstri sektöründe veya tarım bilimlerinde geniş bir kullanım potansiyelini beraberinde getirmektedir [147]. Mikrodalga uygulaması, gıda işleme, kağıt üretimi, tıp, kimya mühendisliği ve metalurji dahil olmak üzere hem tarımda hem de sanayide yoğun ilgi görmekte ve özellikle gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda işleme amacıyla mikrodalga teknolojileri pastörizasyon, haşlama, pişirme/ısıtma, kurutma, sterilizasyon, çözündürme ve ekstraksiyon gibi uygulamalarda yer bulmaktadır [148]. Mikrodalga teknolojisinin gıda endüstrisindeki kullanımına yönelik farklı uygulamalar Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Mikrodalga teknolojisinin gıda endüstrisindeki uygulamaları.

Gıda endüstrisinde mikrodalga kullanımı, sadece geleneksel yöntemleri kullanmaya kıyasla işlem süresini ve maliyetleri azaltmakta, yüksek duyu kaliteyi korumakta ve besin değerinde minimal değişikliklere neden olmaktadır [149]. İncelenen birçok çalışmada, mikrodalga gıda işleme yönteminin, geleneksel ısıtma yöntemlerine göre hem gıda kalitesi (daha iyi yapı, daha iyi doku, daha düşük ağırlık kaybı, daha iyi renk parametreleri) hem de besin değeri (daha yüksek vitamin ve biyoaktif bileşik korunumu) açısından üstünlüğü doğrulanmıştır. Mikrodalgaların gıda işlemede kullanılması, yüksek antioksidan özelliklere sahip uçucu yağların daha yüksek ekstraksiyon verimi elde edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca, mikrodalga uygulaması, gıda işleme atıklarından değerli bileşiklerin geri kazanılması için atık yönetiminde de yaygın olarak kullanılmaktadır [147]. Mikrodalga teknolojisinin kullanımıyla gıda işleminin kolaylığına yönelik olumlu yaklaşım, mikrodalga fırının hemen hemen her evde bulunmasıyla sonuçlanmıştır [149, 150]. Mikrodalga teknolojisinin daha düşük enerji tüketimi ve üretim maliyeti sunması, endüstri uygulamaları için önem arz etmektedir. Bu avantajların, özellikle gıda endüstrisinin artan enerji talebi göz önüne alındığında oldukça değerli olduğu bildirilmiştir. Gelecekte birçok sorunu çözen yeni mikrodalga

teknolojilerinin geliştirilmesiyle birlikte mikrodalgaların giderek daha popüler hale geleceği öngörülmektedir [147].

Mikrodalga uygulaması, gama radyasyonu ve etilen oksit sterilizasyonu, gıda bileşenleri üzerindeki etkileri en aza indirerek farklı un türlerinin raf ömrünü uzatmak için yaygın olarak kullanılan tekniklerdir [151]. Mikrodalga işleme, işlenmiş gıdaların besin değerlerini arttırmak amacıyla fitokimyasal bileşimini koruma veya değiştirme aracı olarak özel bir ilgi görmüştür [152]. Yulaf ve pirinç unu gibi farklı tahıl unlarının ve meyve örneklerinin kimyasal bileşimleri, antioksidan kapasiteleri, duyuşal nitelikleri, fitokimyasal içerikleri (toplam fenolik, toplam flavonoid içerikleri) ve depolama özellikleri üzerinde mikrodalga uygulamasının etkisine odaklanan birçok çalışma bulunmaktadır [153-158]. Bu çalışmalarda araştırmacılar, gıda ürünlerinin besin değerinin arttırılması, tüketicilere sunulan seçeneklerin genişletilmesi ve özellikle mikrodalga işleme teknikleriyle ilgili olarak gıda ürünlerinin raf ömrünün uzatılması konusunda değerli bilgiler sunmaktadır. Ek olarak, bazı araştırmacılar mikrodalga işleminin mısır ununun fizikokimyasal, reolojik ve fonksiyonel özellikleri üzerindeki etkisini araştırmıştır [159-162]. Bu işlemin mısır ununun fizikokimyasal ve fonksiyonel özelliklerini değiştirmede etkili olduğu belirtilmiştir.

2.3. Bitki Biyoteknolojisi ve Genetik Modifiye (GM) Mısır

Biyoteknoloji, tarımsal kalkınmada büyük potansiyele sahip güçlü bir araçtır ve diğer teknolojilerle birleştiğinde, biyoteknoloji, sürdürülebilir kırsal kalkınmayı ve gıda güvenliğinin sağlanmasını engelleyen eski sorunların bazıları için yeni çözümler sağlamaktadır. Biyoteknoloji ayrıca, tarımsal ve endüstriyel uygulamalardan kaynaklanan çevresel sorunları çözmek için benzersiz fırsatlar sunmaktadır. Bitki biyoteknolojisi, belirli bir tarımsal problemi ele almak için birbiriyle yarışan teknolojik yaklaşımlardan birini temsil etmektedir [163]. Bitki biyoteknolojisi alanı, gıda bitkilerinin verimliliğini önemli ölçüde etkileyebilecek yeni bir araç olmakla birlikte sürdürülebilir, çevreye duyarlı tarım uygulamalarıyla uyumlu, çiftçi üretkenliğini ve kârlılığını arttıracak katma değerli genlerin ve özelliklerin kaynağı olarak benzersiz bir konumdadır. Ayrıca, yeni çeşitlerin ve hibritlerin üretimi için gereken süreyi önemli ölçüde kısaltarak bitki yetiştirme çabalarını tamamlamaktadır. Ekonomik açıdan

bakıldığında, bitki biyoteknolojisi tohum, tarım kimyası, gıda işleme, özel kimya ve ilaç endüstrileri için yeni ürünler ve üretim süreçleri geliştirmek için önemli bir potansiyel sunmaktadır [164].

Günümüzde modern tarım, haşere ve hastalık stresinin artması, aşırı hava koşullarının su yüzüne çıkması, iklim değişikliğinin etkileri nedeniyle gıda, yem ve gıda dışı ürünlere yönelik artan talebi çevresel olarak sürdürülebilir bir şekilde karşılamamanın büyük zorluğuyla karşı karşıyadır. Artan insan nüfusuna yönelik bu talepleri karşılamak için, bitki yetiştiricilerinin mevcut tüm teknolojilerden yararlanma araçlarına ve sonuçları ticarileştirme fırsatına sahip olması gerekmektedir. Son 25 yılda, bitki biyoteknolojisi alanı, genetik modifiye (GM) çeşitlerin üretiminin bu zorlukların bazılarını ele almaya başlamasına izin vermiştir. GM özelliklerinin tarla denemeleri 130 bitki türü için yapılmış olmasına rağmen, sadece 4 gıda bitkisi (soya, mısır, pamuk ve kolza tohumu veya kanola), ekilen tüm arazi alanlarının çoğunluğunu oluşturmaktadır [165]. 2019 yılında biyoteknoloji/GM ürünlerinin ticarileşmesinin 24. yılında, 29 ülke toplam 190.4 milyon hektar alanda biyoteknoloji ürünü yetiştirmiştir. ABD (%95), Brezilya (%94), Arjantin (~%100), Kanada (%90) ve Hindistan (%94) GM gıda bitkisi yetiştiren ilk 5 ülke konumundadır. 29 ülke tarafından en çok yetiştirilen biyoteknolojik ürünler soya, mısır, pamuk ve kanola olup, soya 91.9 milyon hektarlık alan ile küresel biyoteknolojik gıda bitkisi alanının ~%48'ini kaplayan gıda bitkisi olmuştur. Bunu sırasıyla mısır (60.9 milyon hektar) ile pamuk (25.7 milyon hektar) GM gıda bitkileri takip etmiştir. Avrupa Birliği ekim için biyoteknolojik ürünlerin kabulünde son 24 yılda iyileşmeye gitmemekle birlikte, iki ülke, Avrupa mısır kurdu istilası nedeniyle biyoteknolojik mısır ekime başlamıştır. 2016'dan beri sadece İspanya ve Portekiz'de GM Bt mısır ekimi yapılmakta olup, 2019 yılında İspanya ve Portekiz tarafından sırasıyla 107.130 hektar ve 4.753 hektar alan olmak üzere toplamda 111.883 hektar alanda GM mısır ekilmiştir [166].

Güncel verilere bakıldığında, toplam 72 ülke (29 ekim yapan ve 43 ekim yapmayan) insan gıdası, hayvan yemi ve ticari yetiştiricilik olarak tüketilmek üzere genetik modifiye (GM) veya biyoteknolojik ürünler için düzenleyici onaylar yayınlamıştır. Mısır hala en fazla onaylanan çeşide (35 ülkede 146 çeşit) sahiptir; bunu pamuk (27 ülkede 66 çeşit), patates (13 ülkede 49 çeşit), soya (31 ülkede 38 çeşit) ve kanola (15 ülkede 38 çeşit) izlemektedir

[166]. Türkiye’de, 5977 sayılı Biyogüvenlik Kanunu’nun 26 Mart 2010 tarihinde Resmi Gazete’de yayınlanmasının ardından [167], Türkiye Biyogüvenlik Bilgi Değişim Mekanizması’nın güncel onaylı GMO listesine göre, toplamda 21 GM mısır çeşidinin kullanımına kanun kapsamında izin verilmiştir (Çizelge 2.1) [168]. Bu ürünler, sadece hayvan yemi uygulamaları için son ürün olarak ithal edilmekte olup, ülkemizde tarla denemelerinde araştırma yetiştiriciliği yasaktır.

Çizelge 2.1. Türkiye’de onaylanan GM mısır çeşitleri.

#	GM Mısır Çeşidi	Ayırt Edici Kimlik	Resmi Gazete Onay Tarihleri
1	Bt11	SYN-BTØ11-1	24 Aralık 2011 tarih ve 28152 sayılı
2	DAS1507	DAS-Ø15Ø7-1	24 Aralık 2011 tarih ve 28152 sayılı
3	DAS59122	DAS-59122-7	24 Aralık 2011 tarih ve 28152 sayılı
4	NK603	MON-ØØ6Ø3-6	24 Aralık 2011 tarih ve 28152 sayılı
5	GA21	MON-ØØØ21-9	24 Aralık 2011 tarih ve 28152 sayılı
6	MON89034	MON-89Ø34-3	24 Aralık 2011 tarih ve 28152 sayılı
7	MON88017	MON-88Ø17-3	21 Nisan 2012 tarih ve 28271 sayılı
8	MIR604	SYN-IR6Ø4-5	16 Temmuz 2015 tarih ve 29418 sayılı
9	MON863	MON-ØØ863-5	16 Temmuz 2015 tarih ve 29418 sayılı
10	T25	ACS-ZMØØ3-2	16 Temmuz 2015 tarih ve 29418 sayılı
11	Bt11 x MIR604	SYN-BTØ11-1 x SYN-IR6Ø4-5	5 Kasım 2015 tarih ve 29523 sayılı
12	MIR162	SYN-IR162-4	5 Kasım 2015 tarih ve 29523 sayılı
13	MIR604 x GA21	SYN-IR6Ø4-5 x MON-ØØØ21-9	5 Kasım 2015 tarih ve 29523 sayılı
14	MON87460	MON 8746Ø-4	2 Ağustos 2017 tarih ve 30142 sayılı

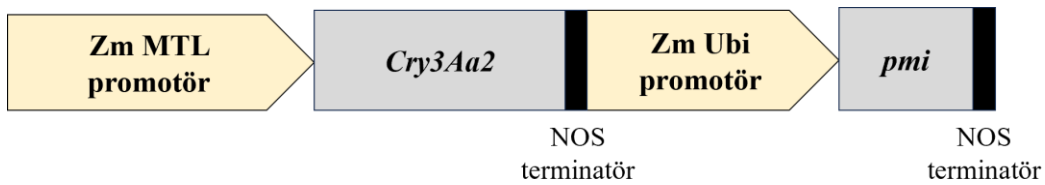
15	MON87427	MON-87427-7	23 Ocak 2021 tarih ve 31373 sayılı
16	DAS40278-9	DAS-40278-9	27 Şubat 2021 tarih ve 31408 sayılı
17	4114	DP-004114-3	07 Ocak 2022 tarih ve 31712 sayılı
18	MON87411	MON-87411-9	27 Nisan 2022 tarih ve 31822 sayılı
19	MZIR098	SYN-00098-3	27 Nisan 2022 tarih ve 31822 sayılı
20	5307	SYN-05307-1	13 Ekim 2022 tarih ve 31982 sayılı
21	NK603 x MON810	MON-00603-6 x MON-00810-6	30 Aralık 2022 tarih ve 32059 sayılı

Tarımsal verimliliği arttırmak, üretim maliyetlerini azaltmak ve ürünlerin dayanıklılığını arttırmak amacıyla üreticiler, 21. yüzyılda ortaya çıkan biyoteknolojik gelişmelerin etkisiyle genetik modifiye organizmaları (GMO'lar) tercih etmektedir [169]. Genetik modifikasyon da dahil olmak üzere biyoteknoloji, mısır bitkisinin çevresel faktörlere uyum sağlamasına yardımcı olmak ve gıda kalitesini arttırmak gibi mısır üretim verimini ve özelliklerini geliştirmek için birçok fırsat sunmaktadır [170, 171].

Mısır, tüm dünyada yaygın olarak yetiştirilen, oldukça önemli bir kültür bitkisi olup, tarımsal değerinin yanı sıra olağanüstü genotipik ve fenotipik değişkenliği nedeniyle temel araştırmalar için model organizma görevi görmektedir [172]. *Poaceae* bitki ailesinin bir üyesi olan ve aslen Orta Amerika kökenli olan mısır (*Zea mays* L.), pirinç (*Oryza sativa*) ve buğday (*Triticum* spp.) gibi diğer bitki türlerini içeren tahıllar arasında en kapsamlı şekilde incelenen genetik sistemdir [173]. Ayrıca, bu çok yönlü tahıl, yağ, un, kepek, nişasta, kahvaltılık tahıllar, unlu mamuller ve daha fazlasını içeren çeşitli gıda maddeleri için de hammadde görevi görmektedir. Mısır unu özellikle karbonhidratlar, lif ve protein dahil olmak üzere çeşitli önemli besinleri içeren bir gıda ürünüdür [174, 175].

2.3.1. MIR604 GM Mısır Çeşidi

Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD)'nün "BioTrack Product" isimli veri tabanında yer alan bilgilere göre, genetik modifiye (GM) MIR604 (SYN-IR604-5) mısır çeşidi, Coleoptera takımından zararlı böceklere karşı direnç kazandırmak için Syngenta firması tarafından geliştirilmiştir [176]. Şekil 2.2'de GM MIR604 mısır çeşidinin geliştirilmesinde kullanılan mısır genomuna yerleştirilmiş rekombinant yapılar şematize edilmiştir.



Şekil 2.2. GM MIR604 mısır çeşidinin gen kaseti.

Agrobacterium aracılığıyla gerçekleştirilen bir genetik transformasyon yöntemi kullanılarak üretilen GM MIR604 mısır çeşidi, yapısında iki farklı transgen içermektedir:

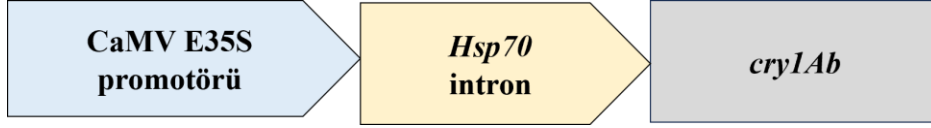
(1) mCry3Aa2 böcek kontrol (insektisidal) proteinini kodlayan modifiye edilmiş *Cry3Aa2* geni ve (2) *Escherichia coli*'den gelen, fosfomanoz izomeraz (PMI) enzimini kodlayan seçici bir markör olarak *pmi* geni [177]. MIR604'teki *Cry3Aa2* geninin ekspresyonu, bir metallothionein-benzeri (MTL) genin mısır (*Zea mays*) promotörü tarafından sürdürülmekte ve *pmi* geni ise mısır (*Zea mays*) poli-übikutin promotörü tarafından sürdürülmektedir. Aktarılan her iki genin ekspresyonunun sonlandırılmasında ise nopaline sentaz (NOS) geninin 3' UTR (untranslated, çevrilmemiş) bölgesi kullanılmıştır [178, 179].

GM MIR604 mısır çeşidinin, Türkiye'de Bilimsel Risk Değerlendirme Komitesi ve Sosyo-ekonomik Değerlendirme Komitesi tarafından yayınlanan raporların değerlendirilmesinin ardından 16 Temmuz 2015 tarihinde, 23 No'lu Biyogüvenlik Kurulu Kararı kapsamında hayvan yemi için kullanılması onaylanmıştır [180]. MIR604 çeşidi ve ürünlerinin yem olarak kullanımının güvenliği, bu çeşidin geliştirilmesinde kullanılan gen transfer yöntemi ile aktarılan genlerin moleküler özelliklerinin incelenmesi, ürettiği protein ve besin değeri, potansiyel alerjenik, toksik ve çevresel riskler gibi faktörler göz önüne alınarak değerlendirilmiştir. Çeşidin moleküler karakterizasyonu ve biyoinformatik analizleri sonucunda ise herhangi bir olumsuz sonuca rastlanmamıştır. Güncel bilgiler doğrultusunda, MIR604 ve ürünlerinin yem olarak kullanılmasının, hem insan ve hayvan sağlığı hem de çevre sağlığı açısından potansiyel risk oluşturmayacağı konusunda genel bir görüş birliği sağlanmıştır [181].

2.3.2. MON810 GM Mısır Çeşidi

Genetik modifiye (GM) mısır çeşitlerinden biri olan MON810 (MON-ØØ81Ø-6) ise, Avrupa mısır kurdu (*Ostrinia nubilalis*) gibi Lepidoptera takımına bağlı hedef zararlılara ve *Sesamia* cinsine ait türlere karşı dayanıklılık gösteren ve Avrupa'da en çok yetiştirilen GM mısır çeşididir [182, 183]. Monsanto firması tarafından geliştirilen MON810 mısır çeşidi, partikül bombardımanı yöntemi (gen tabancası, biyolistik) kullanılarak elde edilmiştir [184]. Bu mısır çeşidi, *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (strain HD-1)'ye ait *cryIAb* geninin ekspresyonunu yönlendiren, Karnabahar mozaik virüsüne (CaMV) ait güçlendirilmiş (enhanced) 35S (E35S) promotörü ve bir ısı şok protein olan *Hsp70* mısır (*Zea mays*) intron dizisinden oluşan stabil, genomla entegre bir bitki ekspresyon kaseti

içermektedir [185]. Şekil 2.3'te GM MON810 mısır çeşidinin geliştirilmesinde kullanılan *cryIAb* transgen kasetinin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.3. GM MON810 mısır çeşidinin gen kaseti.

Türkiye’de, 2022 yılında, GM MON810 mısır çeşidi ve ürünlerinin hayvan yemi olarak kullanım izni kaldırılmış olmasına rağmen, Monsanto firması tarafından geliştirilen hem GM NK603 hem de GM MON810 mısır hatlarının klasik ıslah yöntemleri kullanılarak melezlenmesi sonucunda elde edilen NK603 x MON810 (MON-ØØ6Ø3-6 x MON-ØØ81Ø-6) genetik modifiye mısır çeşidi ve ürünleri, 30 Aralık 2022 tarihinde 32059 sayılı Resmi Gazete ile onaylanmıştır (Çizelge 2.1).

Bilimsel Risk Değerlendirme Komitesi tarafından hazırlanan rapora göre [186], GM NK603 x MON810 mısır çeşidi ve ürünleri, güvenlik, alerjenite, besin içeriği ve tarımsal özellikler açısından geleneksel mısır çeşitleriyle benzerlik göstermektedir. Ayrıca, bu raporda belirtilen genel görüş ve öneriler doğrultusunda, *Agrobacterium tumefaciens*’ten izole edilen ve glifosat herbisitine tolerans sağlayan *cp4 epsps* geni ile Lepidoptera takımında bulunan mısır kurtlarına karşı dayanıklılığı sağlayan *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*’den elde edilen *cryIAb* genini içeren GM NK603 x MON810 mısır çeşidi ve ürünlerinin yem olarak kullanılmasının, hem insan hem de hayvan sağlığı ile çevre açısından istenmeyen etkilere neden olma olasılığının, genetik modifiye olmayan eşdeğer çeşitlerden farklı olmadığı sonucuna varılmıştır.

2.4. GM Gıda Ürünlerinin Kompozisyon Analizi Açısından Risk Değerlendirmesi

Dünya genelinde, gen teknolojisi kullanılarak elde edilen gıdalar ve yemler ile genetik modifiye organizmaların (GMO) çevresel etkilerinin değerlendirilmesi ve gözetimi için sorumlu otoriteler, GM gıda ve ürünlerinin güvenliğini değerlendirmek için belirli stratejiler benimsemişlerdir [187]. GM gıda ve ürünlerinin güvenlik değerlendirmelerini gerçekleştirmek için uygulanan stratejiler ile kullanılan veri ve metodolojiler, uzun yıllar

boyunca birçok bilimsel otorite tarafından geliştirilmiştir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) başta olmak üzere farklı uluslararası kuruluşlar, gıda ve yem risk değerlendirme metodolojilerinin uyumlaştırılmasını kolaylaştırmıştır. FAO ve WHO tarafından 1963 yılında kurulan Kodeks Alimentarius Komisyonu (Codex Alimentarius Commission), uyumlu uluslararası gıda standartları, kılavuzlar ve uygulama kuralları geliştirmiş ve uluslararası hükümet ve hükümet dışı tüm gıda standartları çalışmalarını koordine etmeyi teşvik etmiştir. GM bitkilerinin gıda ve yemde kullanımının güvenliğini değerlendirmek için yapılan risk değerlendirmeleri, bu standartları takip etmektedir [188]. GM bitkileri ve bunlardan elde edilen gıda ve yemler için önerilen risk değerlendirme stratejisi, ilgili karşılaştırma öğeleriyle GM bitkilerini ve türetilmiş gıda ve yemleri karşılaştırmak için uygun yaklaşımları kullanmayı amaçlamaktadır [189].

Risk değerlendirme, risk analizini oluşturan önemli bileşenlerden biridir ve bu süreç, risk yönetimi ve risk iletişimi ile etkileşimde bulunarak gıda güvenliğini sağlama konusunda önemli bir stratejik rol üstlenmektedir. Risk analizi, riskin değerlendirilmesine ve azaltılmasına yardımcı olmak için yapılandırılmış, çok disiplinli ve tekrarlanabilir bir yaklaşım olup, bu yaklaşımı oluşturan üç ana bileşenin etkileşimi, gıdaların güvenli bir şekilde işlenmesinin sağlanmasına ve tüketici sağlığının korunmasına katkıda bulunabilmektedir [190]. Risk değerlendirmesi, genetik modifikasyondan kaynaklanan potansiyel zarar olasılığını dikkate almak için yapılandırılmış, gerekçeli bir yaklaşımdır. Bu yaklaşım, insan sağlığı ve güvenliğine veya çevreye yönelik ilgili riskleri tanımlamayı, karakterize etmeyi ve değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Risk değerlendirmesi süreci, bilimsel ve teknik kanıtlara dayalı olarak şekillendirilmeli, tekrarlanabilir ve karşılaştırmalı olmalıdır. Ayrıca, vaka bazında (case by case basis) adım adım gerçekleştirilen bu süreç, her durumu ayrıntılı bir şekilde ele alarak güvenilir sonuçlar elde etmeyi amaçlamaktadır [191, 192]. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından sağlanan ilgili rehberlere göre, GMO'ların risk değerlendirmesinin temel unsurlarından biri kompozisyonel ve tarımsal özelliklerinin karşılaştırmalı analizidir. EFSA rehber dokümanları, GMO risk değerlendirmesinin dört temel unsura dayandığını belirtmiştir: (i) moleküler karakterizasyon; amaçlanan değişikliğin moleküler yapısının yanı sıra GMO'da meydana gelen istenmeyen herhangi bir değişikliğin değerlendirilmesi, (ii) karşılaştırmalı analiz; kompozisyonel, besinsel ve tarımsal özelliklere odaklanan bir

değerlendirme, (iii) potansiyel toksisite ve alerjeniklik değerlendirmesi ve (iv) GMO'nun potansiyel çevresel etkisinin değerlendirmesi [189].

Risk değerlendirmesi, pazarlama, etiketleme ve izlenebilirlik de dahil olmak üzere GMO'ların çeşitli yönleri Avrupa Birliği'nde ve diğer ülkelerde sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Bu tür düzenlemelerde GMO'ların risk değerlendirmesinde başlangıç noktası, değerlendirmeye alınan GMO'nun geleneksel çeşitlerle karşılaştırılmasını içeren "temel eşdeğerlik (substantial equivalence)" kavramına dayanmaktadır. Temel eşdeğerlik kavramı, ticarileştirilmiş geleneksel gıda bitkilerinin onlarca yıldır tüketildiği ve güvenli bir kullanım geçmişi kazandığı varsayımına dayanmaktadır. Bu nedenle, geleneksel bitki çeşitlerinden elde edilen yeni gıdaların (örn; GMO'lar) güvenlik değerlendirmesinde karşılaştırmacı olarak kullanılabilirler [193]. Temel eşdeğerlik değerlendirmeleri genellikle, Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) belgelerindeki önerilere uygun olarak, doğal toksinler, makro, mikro ve anti-besinleri içeren önceden tanımlanmış bileşiklerin hedefe yönelik analizi kullanılarak gerçekleştirilmektedir [194]. Bu hedefe yönelik yaklaşım, bazı durumlarda istenmeyen etkilerin tespit edilmesine imkan sağlamış olsa da, temel eşdeğerlik çerçevesinde benimsenmesi bir dizi eleştiriyi beraberinde getirmiştir. Özellikle, bu hedefe yönelik yaklaşımın önyargılı olduğu ve bazı öngörülemeyen, istenmeyen etkilerin tespit edilebileceği savunulmuştur [195]. GMO'ların karşılaştırmalı kompozisyonel değerlendirmesinde hedefe yönelik analizle ilişkilendirilen önyargı ve belirsizliklere yanıt olarak, EFSA tarafından oluşturulan bir panelin raporu, omik teknolojiler gibi profil oluşturma teknolojilerinin geliştirilmesini ve kullanılmasını önermiştir. Bu teknolojilerin kullanımının, karşılaştırmalı kompozisyonel analizlerin kapsamını genişletme potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir [193].

Gıda güvenliği açısından, birçok genin, proteinin veya metabolitin paralel ve hedefe yönelik olmayan geniş ölçekli analizine izin veren omik teknolojilerinin, GM gıda bitkilerinin risk değerlendirmesi için fırsatlar sunduğu bildirilmiştir [196]. EFSA, Nisan 2018'de, GM gıda ve yem ürünlerinin risk değerlendirmesi de dahil olmak üzere çeşitli alanlardaki risk değerlendirme yaklaşımları kapsamında omik teknolojilerinin kullanılabilirliğine odaklanan 24. Bilimsel Kolokyumu'nu düzenlemiştir [197]. Kolokyumdaki görüşler, bilimsel güvenlik değerlendirmesini desteklemek için omik veri kümelerinin potansiyel kullanımının keşfedilmesini ve omik araçlarını risk değerlendirmesine dahil etme sürecinde, risk değerlendiricilerini desteklemek için somut

uygulama yolları üzerinde ilerlenilmesi gerektiğini vurgulamıştır. Ayrıca, otorite, risk değerlendirmesinde omik veri setlerinin kullanımına olan güveni arttırmak için test edilebilecek vaka örneklerinin kullanılmasını önermiştir [198]. EFSA'ya benzer şekilde ABD Ulusal Bilim, Mühendislik ve Tıp Akademileri (NASEM) de bitki biyoteknolojisi çalışmalarında karakterizasyon ve risk değerlendirme amaçlı omik teknolojilerinin yararlılığını kabul etmektedir. Bu tekniklerin GM gıdalar gibi yeni gıdalar kapsamında GMO'ları analiz etmek ve genetik mühendisliği sürecinin neden olduğu değişiklikleri test etmek için de kullanımını beklenmektedir [199].

Bu tez çalışmasında, mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan genetik modifiye (GM) MIR604 ve MON810 içeren mısır unları ile GM içermeyen muadillerinin moleküler ve kimyasal profillerinin genomik, transkriptomik, metabolomik ve lipidomik gibi omik yaklaşımlar aracılığıyla incelenmesi, karakterize edilmesi ve bulguların uygun istatistiksel araçlarla değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla, %<0.1 ve %75 GM MIR604 ile %<0.02 ve %5 GM MON810 sertifikalı referans materyalleri (CRM) deney materyali olarak kullanılmıştır. Bu mısır unu örnekleri, 600 W'da 2 dk boyunca (2450 MHz) mikrodalga uygulamasına tabii tutulmuştur. Hazırlanan mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örnekleri, omik teknolojileri kullanılarak ayrı ayrı analiz edilmiş ve analizler sonrasında elde edilen bulgularla, proses etkisine bağlı olarak hem moleküler hem de kimyasal bileşenlerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, çalışmada, farklı omik teknolojileri kullanılarak elde edilen verilerin gıda prosesleri uygulanmış yeni gıdaların gıda kompozisyonu açısından risk değerlendirmesi aşamasında düzenleyiciler tarafından kolayca uygulanabilir olmasını amaçlayan bir yaklaşım önerilmiştir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Materyal

Bu çalışmada sertifikalı referans materyal (CRM) olarak Amerikan Yağ Kimyagerleri Birliği (AOCS, Urbana, Illinois, ABD) ve Referans Materyaller ve Ölçümler Enstitüsü (IRMM, Ortak Araştırma Merkezi (JRC), Geel, Belçika)'den ticari olarak sağlanan GM ve GM olmayan mısır unu örnekleri kullanılmıştır. Aşağıda sıralanan materyaller tüm çalışma süresi boyunca 4 °C'de depolanmıştır:

- CRM 0407-A (%<0.1), AOCS tarafından Syngenta Crop Protection, LLC (Basel, İsviçre) için modifiye olmayan mısır tohumundan hazırlanmıştır. Ticari firma tarafından bu CRM hazırlanırken, toplam 3000 tohum (300 tohumdan 10 kısım) değerlendirilmiş ve tüm kısımlar GA21, MIR162, MIR604 ve MZHG0JG mısır için negatif olarak test edilmiştir.
- CRM 0607-A2 (%75), AOCS tarafından Syngenta Crop Protection, LLC (Basel, İsviçre) için MIR604 mısır tohumu tozundan hazırlanmıştır. Bu CRM'in hazırlanmasında kullanılan MIR604 mısır, üç farklı tohum materyalinin 1:2:1 oranında karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Bu tohum materyalleri, sırasıyla GM tohum MIR604 male donör (NP2222/NP2391 (MIR604)), GM tohum MIR604 female donör (NP2222 (MIR604) /NP2391) ve GM olmayan tohumdur (NP2222/NP2391).
- ERM-BF413a (%<0.02), Monsanto Company (St. Louis, MO, ABD) tarafından teslim edilen modifiye olmayan bir mısırın (çeşit EXP258B) bütün tohumlarından hazırlanan kurutulmuş bir mısır tozudur.
- ERM-BF413f (%5), Monsanto Company (St. Louis, MO, ABD) tarafından teslim edilen, modifiye olmayan bir mısırın (EXP258B çeşidi) ve genetik modifiye MON810 mısırın (DKC57-84 çeşidi) bütün tohumlarından hazırlanan kurutulmuş bir mısır tozu karışımıdır.

GM olmayan ticari mısır unları (Ankara, Türkiye) ise transkriptomik analizlerde RNA ekstraksiyon yöntemlerinin optimizasyonu, seçilen ekstraksiyon yönteminin doğrulanması ve mutlak RT-qPCR analizlerinde standart eğrilerin oluşturulmasında kullanılmıştır. Ayrıca, Tarım ve Orman Bakanlığı, Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (Bursa, Türkiye)'nden 2021 Temmuz ayında yeni hasat

edilmiş GM olmayan mısır koçanları temin edilmiştir. Bu koçanlardan ayrılan mısır tohumları havan ve tokmak yardımıyla sıvı nitrojen içinde öğütüldükten sonra elde edilen örnekler, transkriptomik analizlerde RNA ekstraksiyon yöntemlerinin optimizasyonu amacıyla kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Mikrodalga Uygulaması

CRM mısır unu materyalleri ayrı ayrı cam petri kutularına aktarılmıştır. Daha sonra, kapakları kapatılan cam petri kutuları mikrodalga fırının (MD1500 mikrodalga fırın, Beko, İstanbul, Türkiye) döner tablalı cam plakasına yerleştirilmiştir [200]. Örnekler, 2450 MHz frekans ve 600 W sabit güçte 2 dk boyunca mikrodalga uygulamasına tabii tutulmuştur [201]. Mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan materyaller için oluşturulan örnek kodları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Mısır unu materyalleri ve örnek kodları.

Örnek Adı	Mikrodalga Uygulaması	Örnek Kodu
Mikrodalga uygulanmayan ticari mısır unu	-	C1
Mikrodalga uygulanmayan mısır unu1 (CRM 0407-A, % <0.1 GM MIR604)	-	MF1
Mikrodalga uygulanan mısır unu1 (CRM 0407-A, % <0.1 GM MIR604)	600 W, 2 dk	MF1T
Mikrodalga uygulanmayan mısır unu2 (CRM 0607-A2, % 75 GM MIR604)	-	MF2
Mikrodalga uygulanan mısır unu2 (CRM 0607-A2, % 75 GM MIR604)	600 W, 2 dk	MF2T
Mikrodalga uygulanmayan mısır unu3 (ERM-BF413a, % <0.02 GM MON810)	-	MF3
Mikrodalga uygulanan mısır unu3 (ERM-BF413a, % <0.02 GM MON810)	600 W, 2 dk	MF3T
Mikrodalga uygulanmayan mısır unu4 (ERM-BF413f, % 5 GM MON810)	-	MF4
Mikrodalga uygulanan mısır unu4 (ERM-BF413f, % 5 GM MON810)	600 W, 2 dk	MF4T

3.2.2. Nükleik Aside Dayalı Analizler: Genomik ve Transkriptomik

3.2.2.1. Genomik Analizler

3.2.2.1.1. DNA Ekstraksiyonu

Mikrodalga uygulanmayan ve uygulanan CRM'lerden Unio Food Genomic DNA Extraction Kit (A. Geneworks, İstanbul, Türkiye) yöntemine göre DNA ekstrakte edilmiştir. Yöntem, bitki orijinli gıda hammaddesi, işlenmiş ve/veya işlenmemiş gıda, yem ve tohum örneklerini kapsamaktadır. DNA ekstraksiyonunda Adana Gıda Kontrol Laboratuvarı'nda (Adana, Türkiye) yer alan Unio B24 ekstraksiyon sistemi (A. Geneworks, İstanbul, Türkiye) kullanılmıştır. DNA ekstraksiyonunun sağlanması için ilk aşamada hücre duvarı, hücre zarı ve çekirdek zarının parçalanması gereklidir. Bu amaçla, 2 mL'lik eppendorf tüplerde tartılan 100'er mg örnekler 800 µL Buffer LTX (Buffer 1, Lysis) solüsyonu ile muamele edilmiştir. Mısır unlarının nişasta içeriği yüksek olduğu için, lysis aşamasında örneklere 30 µL α -Amilaz (10 mg/mL) ilave edilmiştir. Sonrasında örneklere 40 µL Proteinaz K eklenmiş ve örnekler 30 dk 65°C'de bekletilip, 12000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir. 600 µL süpernatant yeni bir 1.5 mL'lik eppendorf tüpe konulmuştur. Süpernatanta 0.5 µL RNAz A (50 mg/mL) ilave edilip, karışım vortekslenmiştir. 10 dk oda sıcaklığında inkübasyon gerçekleşmiştir. Serbest haldeki DNA, uygun bir taşıyıcı olan manyetik partiküllere bağlanarak manyetik bir kompleks oluşturmuştur.

İstenmeyen kirleticilerin, ortamdaki tuz, protein vb. istenmeyen kontaminantların uzaklaştırılması için manyetik kompleksin solüsyonlar ile yıkanması gerçekleştirilmiştir. Yıkamalar Unio B24 ekstraksiyon sisteminde (A. Geneworks, İstanbul, Türkiye) yer alan izolasyon robotunda yapılmıştır. İçerisinde yıkama bufferlarının bulunduğu kartuşlar, çalışılan örnek sayısına eşit olacak şekilde, kartuş çerçevesi yardımıyla yükseklik farkı oluşmayacak şekilde, izolasyon robotunun kartuş rafına yerleştirilmiştir. Kartuş rafları, üzerlerinde yer alan ok işaretleri dikkate alınarak yerleştirilmiştir. Süpernatantların bulunduğu 1.5 mL tüplerin kapakları kırıldıktan sonra tüpler kartuş rafına yerleştirilmiştir. Geri alma (elüsyon aşaması) için boş 1.5 mL tüplere örnek numaraları yazılmış ve tüpler Unio ekstraksiyon cihazının metal raklarına yerleştirilmiştir. Cihazın kapağı kapatıldıktan sonra, cihaz panelinden istenen protokol seçilmiş ve cihaz ilk işlemlerini tamamlayıncaya kadar (süpernatantı çekinceye kadar) takip edilmiştir. Protokol tamamlanınca, DNA bulunan geri alma tüplerinin kapakları kapatılıp, tüpler

cihazdan alınmıştır. DNA örnekleri ileri analizlerde kullanılmak üzere -20°C’de saklanmıştır. İzolasyon robotunda UV süresi belirlenerek (en az 15 dk), kartuşlar UV işlemine tabii tutulmuştur. UV aşaması tamamlanınca kartuşlar tıbbi atığa atılmıştır. Örneklerin robota yüklenmesinden önceki aşamalarda kullanılan malzemeler ve yüzeyler %10’luk çamaşır suyu ile silinip kurulanmıştır.

3.2.2.1.2. DNA Kalitesi

Mikrodalga uygulanmayan ve uygulanan CRM’lerden elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı (A260/A280), BMLabosis BM Lab. Sist. Ltd. Şti. (Ankara, Türkiye) firmasında bulunan Nanodrop 2000c spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak ölçülmüştür. Yoğun örneklerin DNA miktarı, kullanılan tarama kitine uygun olacak şekilde PCR grade su ile seyreltilmiştir.

3.2.2.1.3. DNA Ekstraksiyon Yönteminin Doğrulanması

Unio® Food Genomic DNA Extraction Kit (A. Geneworks, İstanbul, Türkiye) yöntemine göre, mikrodalga uygulanmayan ve GM olmayan CRM mısır unu örnekleri (MF1 ve MF3) için altı test tekrarlı DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon üç farklı günde tekrarlanarak her örnek için toplam 18 DNA ekstraktı elde edilmiştir. DNA’ların konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop 2000c spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile belirlenmiştir. Verim, sırasıyla ortalama DNA konsantrasyonu, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri ile temsil edilmiştir. Saflığı ve inhibitör kontrolünü değerlendirmek için seçilen DNA ekstraktları, 20 ng/µL’lik bir konsantrasyona ayarlanmıştır. Ardından, bitki ACT genini saptamak için seçilen ekstraktların dört katlı seri dilüsyonları (1:4, 1:16, 1:64, 1:256) hazırlanmıştır. Amplifikasyonlar, gerekli primer ve prob dizilerini içeren Bosphore® Plant Detection Kit v3 (A. Geneworks, İstanbul, Türkiye) kullanılarak, LightCycler® 480 Real-Time PCR (qPCR) (Roche Diagnostics International AG, İsviçre) sisteminde Cy5 filtresi seçilerek gerçekleştirilmiştir [202]. Dahili kontrolün amplifikasyon verileri HEX kanalı ile belirlenmiştir. Çizelge 3.2’de bitkiye özgü gen ACT için qPCR koşulları özetlenmiştir.

Çizelge 3.2. Bitki spesifik gen (ACT) için qPCR döngü programı.

Basamak	Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Döngüler
1	Başlangıç	95	600	1
	Aktivasyonu			
2	Amplifikasyon	Denatürasyon	95	10
		Bağlanma	60	20
		Uzama	72	10
3	Soğutma	40	30	1

Seyreltme faktörünün logaritmasına karşı seyreltilmiş dört örneğin ortalama eşik döngüsü (Cq) değerleri grafiği çizilmiş ve inhibitörlerin varlığını belirlemek için doğrusal regresyon kullanılarak her örnek için bir denklem oluşturulmuştur. Aynı örnekten hesaplanan Cq değeri ile doğrusal regresyondan elde edilen seyreltilmemiş örneğin Cq değeri arasında karşılaştırmalar yapılmıştır [203]. Veriler, her dilüsyon için ölçülen Cq değerlerini, ΔCq 'yu, grafiğin eğimini, amplifikasyon verimini ve R^2 değerlerini içeren yöntemin kabul edilebilirlik kriterlerini belirlemek için kullanılmıştır. Reaksiyonun verimi ve ΔCq 'si aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır:

$$\text{Verim} = (10^{(-\frac{1}{\text{eğim}})} - 1) \times 100 \quad (1)$$

$$\Delta Cq = (\text{seyreltme serisinin ort. Cq'si} - \text{önceki seyreltme serilerinin ort. Cq'si}) \quad (2)$$

3.2.2.1.4. Kalitatif PCR ile GMO Tarama Analizlerinin Yapılması

Foodproof® GMO Tarama Kiti (GMO Screening 1 LyoKit-5' Nuclease, BIOTECON Diagnostics GmbH, Almanya), GMO hedef dizilerinin (P-35S, P-FMV ve T-NOS) ve dahili kontrolün amplifikasyonu ve tespiti için gerekli tüm reaktifleri, primer ve hidroliz prob dizilerini sağlamıştır. Ayrıca kit içerisinde bulunan kullanıma hazır PCR karışımı içerisinde carry-over kontaminasyonları önlemek için Taq DNA Polimeraz ve ısıya duyarlı UNG enzimleri bulunmaktadır [204]. Son reaksiyon karışımlarına yalnızca tüm örneklerden elde edilen DNA'lar eklenmiştir. Tüm deneylerin sonuçlarının doğru ve tekrarlanabilir olmasını sağlamak için kitle birlikte bir pozitif kontrol DNA'sı da sağlanmıştır.

Kit performansı, FAM, HEX, ROX ve Cy5 algılama kanallarına sahip gerçek zamanlı PCR cihazları (örneğin; LightCycler 480, LightCycler 96) için uygundur [204]. Üç genetik elementin eş zamanlı saptanması için bir LightCycler 480 Real-Time PCR (qPCR) (Roche Diagnostics International AG, İsviçre) sistemi kullanılmıştır. P-35S sekansının amplifikasyonu, qPCR sisteminde bulunan FAM kanalında, P-FMV sekansının amplifikasyonu ROX kanalında, T-NOS sekansının amplifikasyonu HEX kanalında ve dahili kontrolün spesifik amplifikasyonu ise Cy5 kanalında gerçekleştirilmiştir [204]. PCR, reaksiyon karışımının son hacmi 20 µL olacak şekilde tedarikçilerin talimatlarına göre kurulmuştur. Güvenilir sonuçlar elde etmek için, PCR reaksiyonları sırasında pozitif, negatif, çevre kontrol seti ve farklı bir CRM (MON89034) materyali kullanılmıştır. Termal döngü programı Çizelge 3.3'te gösterilmiştir. Tüm PCR reaksiyonları iki tekrarlı gerçekleştirilmiştir [203].

Çizelge 3.3. P-35S, P-FMV ve T-NOS için qPCR döngü programı.

Basamak	Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Döngüler	
1	Başlangıç	37	240	1	
	Aktivasyonu	95	600		
2	Amplifikasyon	Denatürasyon	95	5	
		Bağlanma	60	60	50
		Uzama	60	60	

3.2.2.1.5. Kalitatif PCR Analizlerinin Doğrulanması

Elde edilen mikrodalga uygulanmayan %75 MIR604 (MF2) ve %5 MON810 (MF4) DNA ekstraktları kullanılarak PCR analizi ile bir doğrulama çalışması gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, LOD, tip 1 hata oranı (yanlış pozitif) ve tip 2 hata oranı (yanlış negatif) parametreleri gibi yöntem performans testlerine göre değerlendirilmiştir [205]. Yöntemin mutlak LOD'sini (LOD_{abs}) belirlemek için, MF2 ve MF4 örneklerinin DNA ekstraktları ile iki farklı seyreltme seviyesinde (20 ve 10 kopya/reaksiyon) on paralel PCR analizi yapılmıştır. Yöntem performans kriterleri olarak, kalitatif analiz yaklaşımı için tip 1 (α) ve tip 2 (β) hata oranları %95 güven aralığında Denklem (3) ve Denklem (4)'te yer alan formüllere göre hesaplanmıştır:

$$\alpha (\%) = \frac{\text{Yanlış sınıflandırılmış bilinen negatif örnek sayısı}}{\text{Bilinen negatif örneklerin toplam sayısı}} \times 100 \quad (3)$$

$$\beta (\%) = \frac{\text{Yanlış sınıflandırılmış bilinen pozitif örnek sayısı}}{\text{Bilinen pozitif örneklerin toplam sayısı}} \times 100 \quad (4)$$

3.2.2.2. Transkriptomik Analizler

3.2.2.2.1. RNA Ekstraksiyonu

RNA Extracol Metodu (Metot A):

Mısır unu materyallerinin RNA ekstraksiyonu için “E3700” katalog numaralı RNA Extracol (EURx, Gdańsk, Polonya) kit protokolü [206] uygulanmıştır. RNA Extracol'un oldukça etkili RNaz inhibe edici özelliği, lizis sırasında RNA'nın bütünlüğünü korur ve yüksek kaliteli materyalin ekstraksiyonuyla sonuçlanır. RNA, izopropanol ile çöktürülür ve çöken RNA, safsızlıkları gidermek için yıkanır ve daha sonraki uygulamalarda kullanılmak üzere yeniden süspansedilir. Uygulanan yöntem detaylı olarak bakıldığında;

1. 2 mL eppendorf tüplerde 0.03 g mısır unu örnekleri tartılmıştır.
2. Örnekler 1 mL RNA Extracol (Katalog No: E3700, EURx, Gdańsk, Polonya) içinde homojenize edilmiştir.
3. 12000xg'de 10 dk 4 °C'de santrifüj (Sigma 3-18K, Sartorius AG, Göttingen, Almanya) işleminden sonra süpernatantlar yeni bir tüpe aktarılmıştır.
4. Oda sıcaklığında 5 dk inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
5. Homojenizasyon için kullanılan 1 mL RNA Extracol için örnekler 0.2 mL kloroform (Ürün No: 24216, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) eklenmiştir.
6. Örnekler sıkıca kapatılarak, 15 sn kuvvetlice çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir.
7. Örnekler 12000xg'de 15 dk 4 °C'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi karışımı 3 faza ayırmıştır: pembe organik faz, bir ara faz ve renksiz bir üst sulu faz (RNA içeren). Üst sulu faz, toplam hacmin ~%50'sini oluşturmuştur.
8. Arayüzü bozmadan sulu faz çok dikkatli bir şekilde yeni tüpe yerleştirilmiştir.
9. Homojenizasyon için kullanılan 1 mL RNA Extracol için sulu faza 0.5 ml %100 izopropanol (Ürün No: 24137, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) eklenmiştir.
10. Örnekler oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir.
11. 12000xg'de 10 dk 4 °C'de santrifüj uygulanmıştır.

12. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, kalan pelet ilk homojenizasyonda kullanılan 1 mL RNA Extracol başına 1 mL %75 etanol (Ürün No: 1.00983, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) ile bir kez yıkanmış ve vortekslenmiştir (V-1plus vorteks, Biosan Medical-Biological Research and Technologies, Letonya).

13. 10000xg'de 5 dk 4 °C'de santrifüj uygulanmıştır. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, kalan pelet kurumaya bırakılmış ve daha sonra 60 µL RNaz içermeyen suda (Steril filtrelili, DNaz/RNaz/proteaz içermeyen su, Katalog No: WAT333.500, BioShop Canada Inc., Burlington, Ontario, Kanada) çözülmüştür.

Uygulama sırasında, otomatik pipetler, laboratuvar tezgahları, eldivenler ve cam malzemeler RNazZAP solüsyonu (RNaz enzimini uzaklaştırmak için kullanılan temizlik ajanı, Ürün No: R2020, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) ile muamele edilerek örneklerin olası kontaminasyonu önlenmiştir.

Modifiye RNA Extracol Metodu (Metot B):

RNA Extracol yöntemi, Dutta ve arkadaşlarının [207] mısır tohumlarından yüksek kaliteli RNA ekstraksiyonu için uyguladığı iki aşamalı yöntem esas alınıp modifiye edilmiştir. Mısır tohumu, ticari mısır unu (C1), MIR604 (MF2) ve GM olmayan izojenik örneklerine (MF1) bu yöntem uygulanmıştır. Modifiye edilen SDS bazlı RNA Extracol protokolü detaylı olarak incelendiğinde;

1. Önceden soğutulmuş 1.5 mL eppendorf tüplerde 0.1 g mısır örnekleri tartılmıştır.
2. Örnekler 600'er µL SDS ekstraksiyon tamponu ilave edilmiştir. Tampon pH'sı 1100L pH metre (VWR International, Radnor, Pensilvanya, ABD) ile belirlenmiştir.

SDS ekstraksiyon tamponu;

- 100 mM Tris (pH 8, Trizma base, Ürün No: T1503, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD),
- 150 mM NaCl (Sodyum klorür, Ürün No: 31434, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD),
- 50 mM EDTA (pH 8, 0.5 M, Ürün Kodu: A4892,0100, AppliChem GmbH, Ottoweg, Darmstadt, Almanya),
- %1.5 SDS (Katalog No: 1610302, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kaliforniya, ABD) ve
- %2 β-merkaptetanol (2-merkaptetanol, Ürün No: M6250, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) içermiştir.

3. Vorteks (V-1plus vorteks, Biosan Medical-Biological Research and Technologies, Letonya) yapıldıktan sonra buz banyosunda örnekler 10 dk inkübasyona bırakılmıştır.
4. 12000xg'de 12 dk 4 °C'de santrifüj (Sigma 3-18K, Sartorius AG, Göttingen, Almanya) işleminden sonra süpernatantlar yeni 1.5 mL tüplere aktarılmıştır.
5. Eşit miktarda RNA Extracol (Katalog No: E3700, EURx, Gdańsk, Polonya) ilavesi yapılmış ve tüpler 30'ar sn vortekslenmiştir.
6. Örnekler oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir.
7. Toplam hacmin yarısı kadar örneklere kloroform (Ürün No: 24216, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) eklenmiştir.
8. 10 dk buz banyosunda inkübasyon yapılmıştır.
9. Örnekler 21000xg'de 15 dk 4 °C'de santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra faz ayrımı gerçekleşmiştir.
10. Ara fazı bozmadan elde edilen üst sulu faz çok dikkatli bir şekilde yeni tüpe yerleştirilmiştir.
11. Toplam hacmin yarısı kadar örneklere tekrar kloroform eklenmiştir.
12. 10 dk buz banyosunda inkübasyon yapılmıştır.
13. Örnekler 21000xg'de 5 dk 4 °C'de santrifüjlenmiş ve elde edilen üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.
14. Örnekler eşit hacimde önceden dondurulmuş %100 izopropanol (Ürün No: 24137, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) eklenmiş ve örnekler iyice vortekslenmiştir.
15. -20 °C'de 45 dk inkübasyon gerçekleşmiştir (RNA çöktürme basamağı).
16. 21000xg'de 10 dk 4 °C'de santrifüj uygulanmıştır.
17. Süpernatant uzaklaştırılmış, kalan pelet baştaki RNA Extracol hacmi kadar %75 etanol (Ürün No: 1.00983, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) ile yıkayıp vortekslenmiştir.
18. 21000xg'de 5 dk 4 °C'de santrifüj uygulanmıştır. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan pelet buz üstünde tüplerin kapakları açık bir şekilde 30 dk bekletilerek kurumaya bırakılmıştır.
19. RNA peletleri tamamen kurutulmadan 50'şer µL %0.1 DEPC-suda (DEPC, Ürün Kodu: A0881,0100, AppliChem GmbH, Ottoweg, Darmstadt, Almanya; Steril filtreli, DNaz/RNaz/proteaz içermeyen su, Katalog No: WAT333.500, BioShop Canada Inc., Burlington, Ontario, Kanada) çözülmüştür.
20. Örnekler 4 °C'de 40 dk inkübe edilmiş ve ileriki uygulamalar için alikotlara ayrılarak -80 °C'ye alınmıştır.

Uygulama sırasında, otomatik pipetler, laboratuvar tezgahları, eldivenler ve cam malzemeler RNazZAP solüsyonu (Ürün No: R2020, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) ile muamele edilerek örneklerin olası kontaminasyonu önlenmiştir.

Modifiye SDS-LiCl Metodu (Metot C):

Mısır tohumu, MIR604 (MF2) ve GM olmayan izojenik mısır unu örneklerine (MF1), literatürde yer alan nişasta, protein ve lif bakımından zengin bitki dokularından yüksek kaliteli RNA ekstraksiyonu için evrensel bir yöntem olarak sunulan modifiye SDS-LiCl metodu uygulanmıştır [208]. Bu metot, SDS-Fenol bazlı ekstraksiyona dayanır ve sodyum asetat ve LiCl ile RNA'nın çöktürülmesi sağlanır. Uygulama sırasında kullanılan kimyasallar ise aşağıda sıralanmıştır:

- Trizma base (Ürün No: T1503, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD)
- EDTA disodyum tuzu, EDTA-Na₂ (Ürün No: E5134, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD)
- PVP (Katalog No: PVP504.250, BioShop Canada Inc., Burlington, Ontario, Kanada)
- Sodyum klorür, NaCl (Ürün No: 31434, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD)
- DEPC (Ürün Kodu: A0881,0100, AppliChem GmbH, Ottoweg, Darmstadt, Almanya)
- Steril filtreli, DNaz/RNaz/proteaz içermeyen su (Katalog No: WAT333.500, BioShop Canada Inc., Burlington, Ontario, Kanada)
- 2-merkaptoetanol (Ürün No: M6250, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD)
- SDS (Katalog No: 1610302, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kaliforniya, ABD)
- Fenol (Ürün Kodu: A1624,0100, AppliChem GmbH, Ottoweg, Darmstadt, Almanya)
- Kloroform (Ürün No: 24216, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD)
- İzomil alkol (Katalog No: ISO900.500, BioShop Canada Inc., Burlington, Ontario, Kanada)
- Lityum klorür, LiCl (Ürün No: L9650, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD)
- Sodyum asetat tampon solüsyonu, pH 5.2 ± 0.1 (Ürün No: S7899, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD)
- Etanol (Ürün No: 1.00983, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya)

Uygulama sırasında, otomatik pipetler, laboratuvar tezgahları, eldivenler ve cam malzemeler RNazZAP solüsyonu (Ürün No: R2020, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) ile muamele edilerek örneklerin olası kontaminasyonu önlenmiştir.

Modifiye CTAB Ekstraksiyon Metodu (Metot D):

Bitki dokularından yüksek kaliteli RNA ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılan CTAB-LiCl yöntemi [209] sırasıyla mısır tohumu, ticari mısır unu örnekleri (C1), MIR604 (MF2) ve GM olmayan izojenik mısır unu örneklerine (MF1) uygulanmıştır. Yönteme ait protokol detaylı olarak incelendiğinde;

1. Her örnek için, 2 mL eppendorf tüpte bulunan önceden otoklavlanmış 1.2 mL ekstraksiyon tamponuna 65 °C su banyosunda (NB20 su banyosu, Nuve Laboratory and Sterilization Tech., Ankara, Türkiye) ön ısıtma uygulanmıştır. Tampon pH'sı 1100L pH metre (VWR International, Radnor, Pensilvanya, ABD) ile belirlenmiştir.

Ekstraksiyon tamponu;

- %2 CTAB (Ürün No: H6269, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD),
- %2 PVP (Katalog No: PVP504.250, BioShop Canada Inc., Burlington, Ontario, Kanada),
- 25 mM EDTA (pH 8, 0.5 M, Ürün Kodu: A4892,0100, AppliChem GmbH, Ottoweg, Darmstadt, Almanya),
- 100 mM Tris-HCl (pH 8, Trizma hidroklorür, Ürün No: T5941, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD),
- 2 M NaCl (Sodyum klorür, Ürün No: 31434, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) ve
- %3 β-merkaptoetanol (2-merkaptoetanol, Ürün No: M6250, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) içermiştir. β-merkaptoetanol, ekstraksiyondan hemen önce otoklavlanmış tampona eklenmiştir.

2. 0.25 g örnekler önceden ısıtılmış tüplerde bulunan ekstraksiyon tamponlarına ilave edilmiştir.

3. 1 dk vorteks (V-1plus vorteks, Biosan Medical-Biological Research and Technologies, Letonya) yapıp, su banyosuna tekrar yerleştirilmiştir; 5 dk'da bir vorteks işlemiyle en az 30 dk 65 °C su banyosunda tutulmuştur.

4. Örnekler 16000xg'de 10 dk oda sıcaklığında santrifüjlendikten sonra, süpernatantlar yeni 2 mL tüplere aktarılmıştır.

5. Eşit hacimde Kloroform:İzoamilalkol, C:I (24:1) ilavesi yapıp, tüpler 30'ar sn vortekslenmiştir (Kloroform, Ürün No: 24216, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD; İzoamil alkol, Katalog No: ISO900.500, BioShop Canada Inc., Burlington, Ontario, Kanada).

6. Örnekler 16000xg'de 15 dk 4 °C'de santrifüjlenmiştir (Sigma 3-18K, Sartorius AG, Göttingen, Almanya). Santrifüj sonrasında faz ayrımı gerçekleşmiştir.
7. Elde edilen üst sulu faz beyaz ara fazı bozmadan çok dikkatli bir şekilde yeni 2 mL tüpe yerleştirilmiştir.
8. Eşit hacimde tekrar Kloroform:İzoamilalkol, C:I (24:1) ilavesi yapıp, tüpler 30'ar sn vortekslenmiştir.
9. Örnekler 16000xg'de 15 dk 4 °C'de santrifüjlenmiştir.
10. Sulu faz yeni 2 mL eppendorf tüpe aktarılmıştır. 1/3 hacim 8 M LiCl (Lityum klorür, Ürün No: L9650, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) ilave edilmiş, pipetleme ile karıştırılmıştır.
11. Örnekler 4 °C overnight inkübasyona bırakılmıştır (RNA çöktürme basamağı).
12. 16000xg'de 60 dk 4 °C'de santrifüj uygulanmıştır.
13. Süpernatant uzaklaştırılmış ve her bir pelet 800 µL %70 etanol (Ürün No: 1.00983, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) ile yıkanmıştır.
14. 16000xg'de 5 dk 4 °C'de santrifüj uygulanmıştır. Süpernatant pipetle uzaklaştırılmış ve kalan pelet tüplerin kapakları açık bir şekilde 10 dk boyunca kurumaya bırakılmıştır.
15. RNA peletleri (beyaz pelet) tamamen kurutulmadan 50'şer µL steril UP-suda çözülmüştür.
16. Elde edilen RNA örnekleri, ileriki uygulamalar için alikotlara ayrılarak -80 °C'ye alınmıştır.

Uygulama sırasında, otomatik pipetler, laboratuvar tezgahları, eldivenler ve cam malzemeler RNazZAP solüsyonu (Ürün No: R2020, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) ile muamele edilerek örneklerin olası kontaminasyonu önlenmiştir.

3.2.2.2.2. RNA Kalitesi ve Bütünlüğü

RNA ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları ile 260 ve 280 nm'de (A260/280) OD oranları BMLabosis BM Lab. Sist. Ltd. Şti. (Ankara, Türkiye) firmasında bulunan NanoDrop 2000c (ThermoScientific) cihazı ile ölçülmüştür. RNA bütünlüğünü belirlemek için Altium International Laboratuvar Cihazları-Sem A.Ş. (İstanbul, Türkiye) firmasında bulunan Agilent 2100 Bioanalyzer sistemi ve ilgili RNA 6000 Nano LabChip kiti ([210], Agilent Technologies, Santa Clara, Kaliforniya, ABD) kullanılmıştır.

3.2.2.2.3. RNA Örnekleri için DNaz Uygulaması

Çalışmada, Metot B ve Metot D kullanılarak 4 ayrı konsantrasyon değerinde hazırlanan ticari mısır unlarından ekstrakte edilen RNA örnekleri için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu doğrultuda, iki farklı DNaz I enzim uygulaması yapılarak ortamda var olan DNA'ları inhibe etmek ve kontaminasyonları minimuma indirmek amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında bu enzimler (A) DNaz (Katalog No: E1345-01, EURx, Gdańsk, Polonya) ve (B) DNaz (Ürün No: D5025-150KU, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) olarak isimlendirilmiştir. Böylelikle bu iki enzim uygulamasının, RNA bütünlüğünü iyileştirebilme üzerindeki etkisi incelenmiştir.

3.2.2.2.4. cDNA Sentezi

Çalışmada Metot A ile elde edilen RNA örnekleri için cDNA sentezi amacıyla "smART First Strand cDNA Synthesis" kit (Katalog No: E0804-02, EURx, Gdańsk, Polonya) prosedürü uygulanmıştır [211]. smART First Strand cDNA Sentez Kiti, birinci iplik cDNA'nın verimli sentezi için eksiksiz bir sistemdir. Kit, azaltılmış RNase H aktivitesi, artırılmış termostabilite ve işlenebilirliğe sahip smART Ters Transkriptazdan oluşmaktadır. smART Ters Transkriptaz, tamamlayıcı bir DNA sarmalını sentezlemek için tek sarmallı RNA, DNA veya bir RNA-DNA hibriti (bir primer kullanarak) kullanan bir DNA polimeraz olarak işlev görmektedir. smART, cDNA kütüphanelerinin hazırlanmasında veya RT-PCR ve RT-qPCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere birinci sarmal cDNA sentezi için kullanılmaktadır. Uygulanan prosedüre bakıldığında;

1. Oda sıcaklığında 5 x cDNA Tamponu çözülüp ve yavaşça vortekslenmiştir (V-1plus vorteks, Biosan Medical-Biological Research and Technologies, Letonya).
2. 0.5 mL eppendorf tüpe sırasıyla,
 - İzole edilen RNA (10 ng-5 µg), 10 µL
 - Oligo (dT)20 Primer (50 µM), 1 µL
 - dNTP Karışımı (10 mM), 1 µL
 - RNaz içermeyen su 0.5 µL ilave edilmiştir.
3. Örnekler 5 dk 60 x 100 rpm'de santrifüjlenmiş (iFuge BL08VT akıllı kişisel mikrosantrifüj, Neuation Technologies Pvt., Gandhinagar, Gujarat, Hindistan) ve 65 °C'de 5 dk boyunca MD-01N kuru banyo inkübatöründe (Major Science Co. Ltd, Taoyuan, Tayvan) inkübe edilmiştir.

4. Toplam örnek hacmi 20 µL olacak şekilde, örneklere belirtilen sırayla aşağıdaki bileşenler eklenmiştir:

- 5 x cDNA Tamponu, 4 µL
- DTT 0.1 M, 2 µL
- RNaz İnhibitörü 50 U/µL, 0.5 µL
- smART (200 U/µL), 1 µL

5. Örnekler 45 dk 65 °C’de tekrar inkübe edilmiştir.

6. 85 °C’de 5 dk örnekler inkübe edilerek reaksiyon sonlandırılmıştır.

7. Hazırlanan cDNA, -20 °C’de saklanmıştır.

cDNA miktar ve kaliteleri BMLabosis BM Lab. Sist. Ltd. Şti. (Ankara, Türkiye) firmasında bulunan Nanodrop 2000c spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazı ile belirlenmiştir.

3.2.2.2.5. RNA Ekstraksiyon Yönteminin Doğrulanması

RNA Extracol (Metot A) prosedürüne [206] göre mikrodalga uygulanmayan ticari mısır unu örneği (C1) için beş test tekrarında RNA ekstraksiyonu yapılmış ve ekstraksiyon iki farklı günde tekrarlanarak toplam 10 RNA ekstraktı elde edilmiştir. Elde edilen RNA ekstraktlarının konsantrasyon ve saflık değerlerini ölçmek için bir Nanodrop 2000c spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır. Yöntem verimini belirtmek için ortalama RNA konsantrasyonu, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri kullanılmıştır. Ardından, seçilen RNA ekstraktına cDNA protokolü [211] uygulanmıştır. Saflığı ve inhibitör kontrolünü değerlendirmek için, seçilen RNA ekstraktının iki katlı seri cDNA dilüsyonları (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16) hazırlanmıştır. RT-qPCR analizleri için LightCycler 96 Real-Time PCR (qPCR) (Roche Diagnostics International AG, İsviçre) sistemi kullanılmıştır. RT-qPCR reaksiyonları, 20 µL son hacim/reaksiyon ile LightCycler 480 Probes Master kit (2x conc., Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, İsviçre) protokolü [212] kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her reaksiyon karışımı 10 µL qPCR karışımı, *ZmADHI* primerlerinin her birinden 0.5 µL (0.5 µM son konsantrasyon) ve 0.3 µL prob (0.3 µM son konsantrasyon) (Çizelge 3.4), 3.7 µL PCR grade su ve 5 µL cDNA şablonu içermiştir. Negatif kontrol olarak PCR grade su kullanılmıştır. *ZmADHI* geni (EC:1.1.1.1 [213]) için kullanılan termal döngü programı ise Çizelge 3.5’te gösterilmiştir. Tüm RT-qPCR reaksiyonları iki tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.4. *ZmADH1* geni için seçilen primer ve prob dizileri.

ADH1 Hedef Bölge	Oligonükleotit Dizisi (5'-3')
<i>ZmADH1</i> -F (ileri primer)	5'-CGT CGT TTC CCA TCT CTT CCT CC -3'
<i>ZmADH1</i> -R (geri primer)	5'-CCA CTC CGA GAC CCT CAG TC -3'
<i>ZmADH1</i> -P (prob)*	YAKIMA YELLOW 5'-AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA -3' TAMRA

*: Bu çalışmada, raportör boya olarak VIC yerine Yakima Yellow kullanılmıştır [214].

Çizelge 3.5. *ZmADH1* için RT-qPCR döngü programı.

Basamak	Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Döngüler
1	Başlangıç	95	600	1
	Aktivasyonu			
2	Amplifikasyon	Denatürasyon	15	45
		Bağlanma	60	
		Uzama	60	

Toplanan veriler, LightCycler 96 yazılım sürümü SW 1.1 (Roche, Mannheim, Almanya) kullanılarak analiz edilmiştir. İnhibitörlerin varlığı, seri olarak seyreltilmiş beş C1 örneğinin ortalama C_q değerlerinin cDNA konsantrasyonunun logaritmasına karşı çizilmesi ve doğrusal regresyon kullanılarak bir denklem elde edilmesiyle belirlenmiştir. Her dilüsyon için ölçülen C_q değerleri, grafiğin eğimi, amplifikasyon verimi ve R² değerleri, yöntemin kabul edilebilirlik kriterlerini değerlendirmek için kullanılmıştır. Reaksiyonun verimi Denklem (1) yardımıyla belirlenmiştir.

3.2.2.2.6. Hedeflenen İki Mısır Geni için Standart Eğrilerin Oluşturulması ve RT-qPCR Analizlerinin Doğrulanması

C1 örneğinin RNA ekstraktından sentezlenen cDNA, beş konsantrasyon noktasına kadar seyreltilmiş ve elde edilen şablonlar, iki hedeflenen mısır geni, *ZmAGO1a* ve *ZmRLK9* için ilgili primer setleriyle (Çizelge 3.6) amplifiye edilmiştir. Her seyreltme iki tekrarlı hazırlanmış, amplifikasyonlar LightCycler 96 Real-Time PCR (qPCR) (Roche Diagnostics International AG, İsviçre) sistemi aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.6. RT-qPCR için kullanılan oligonükleotit primer setleri.

Hedef Gen	Gen Adı		Oligonükleotit Dizisi (5'–3')*	Kaynak
<i>ZmAGO1a</i>	Argonot1a	F	ACACCGTTATGCACCGGTAA	[215]
		R	AATCCACGACAAGCCCATCTT	
<i>ZmRLK9</i>	Reseptör Benzeri Kinaz9	F	AAGCGATTGCAATAGGGACCTC	[52]
		R	GGACTCCATGTCAGTGCTACC	

*: İleri (F) ve Geri (R) primer dizileri gösterilmektedir.

Amplifikasyon reaksiyonları, üreticinin protokolüne (Solis BioDyne 2023 [216]) göre 5x HOT FIREPol EvaGreen® qPCR Mix Plus kiti (no ROX, Solis BioDyne, Estonya) kullanılarak toplam 20 µL hacimde gerçekleştirilmiştir. Her reaksiyon karışımı 4 µL qPCR karışımı, ilgili ileri ve geri primerlerin her birinden 0.2 µL (100 nM son konsantrasyon), 10.6 µL PCR grade su ve 5 µL cDNA şablonu içermiştir. Negatif kontrol olarak, karışıma cDNA yerine PCR grade su ilave edilmiştir. İki gen bölgesi için kullanılan termal döngü programı Çizelge 3.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. *ZmAGO1a* ve *ZmRLK9* için RT-qPCR döngü programı.

Basamak	Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Döngüler
1	Başlangıç	95	900	1
	Aktivasyonu			
2	Amplifikasyon	Denatürasyon	15	40
		Bağlanma (AGO1a)	20	
		Bağlanma (RLK9)	35	
	Uzama	72	20	

RT-qPCR ürünlerinin özgüllüğünün belirlenmesi için erime basamağı olarak 95 °C 1 s, 65 °C 15 s ve 95 °C 1 s parametreleri eklenmiştir. Elde edilen veriler, LightCycler 96 yazılım sürümü SW 1.1 (Roche, Mannheim, Almanya) kullanılarak analiz edilmiştir. Ortalama C_q değerleri, her primer seti için standart eğriler oluşturmak üzere C1 örneğinin seyreltilmiş cDNA konsantrasyonlarının logaritmasına karşı çizilmiştir.

Doğrulama çalışmaları, RT-qPCR testlerinin amplifikasyon verimlerinin (Denklem 1) belirlenmesini ve reaksiyonların özgüllüğünü değerlendirmek için erime eğrisi analizlerini içermiştir. Ayrıca kılavuz dokümanda [217] belirtilen ilkelere göre, laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik standart sapması (S_R), laboratuvar içi bağıl tekrar üretilebilirlik standart sapması (RSD_R), tespit limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ), her PCR analizi için aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır:

$$S_R = \frac{\bar{d}}{d_2} \quad (5)$$

$$RSD_R = \frac{\overline{rad}}{d_2} \quad (6)$$

$$LOD = u_0 \times 4 \quad (7)$$

$$LOQ = u_0 \times 9 \quad (8)$$

burada \bar{d} iki analitik sonuç arasındaki ortalama fark, d_2 bağımsız ölçüm sayısına bağlı sabit ($d_2 = 1.13$) ve \overline{rad} ortalama bağıl farktır (%). “ u_0 ” bileşeni ise, S_R değerlerinin ortalama cDNA konsantrasyon noktalarına karşı grafiğinin çizilmesiyle elde edilen doğrusal denklemin kesişimi olarak belirlenen mutlak standart belirsizliği temsil etmektedir.

3.2.2.2.7. Mikrodalga Uygulanan Mısır Örnekleri için RT-qPCR Analizlerinin Uygulanabilirliği

Hem mikrodalga uygulanmayan örnekler (MF1, MF2, MF3 ve MF4) hem de mikrodalga uygulanan örnekler (MF1T, MF2T, MF3T ve MF4T) için RNA ekstraksiyonu ve cDNA sentezi, daha önce açıklanan yöntemler izlenerek iki tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Daha sonra reaksiyon karışımında son konsantrasyon $75 \text{ ng}/\mu\text{L}$ olacak şekilde cDNA örnekleri hazırlanmıştır. Her örnek üç tekrarlı elde edilmiş ve şablonlar, ilgili primerler (Çizelge 3.6) kullanılarak EvaGreen bazlı RT-qPCR analizlerinde amplifiye edilmiştir. C1 örneğinin RNA'sından sentezlenen cDNA, PCR reaksiyonları sırasında pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Tüm örneklerin C_q değerleri elde edildikten sonra, hedeflenen iki mısır geni için gen ekspresyon analizleri kapsamında, örneklerin RNA seviyeleri mutlak ölçüm yöntemi (Denklem 9) [218] kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, mikrodalga uygulanmayan örneklerde bulunan mısır genlerinin ekspresyon seviyeleri, mikrodalga uygulanan örneklerden elde edilen verilerle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

$$Q = 10^{(Cq-b/m)} \quad (9)$$

burada Q, gen ekspresyon seviyesini; Cq, niceleme eşik döngüsünü; b, iki mısır geninin standart eğrilerinden elde edilen doğrusal denklemlerin kesişim noktasını ve m, doğrusal denklemlerin eğimini ifade etmektedir.

3.2.3. Metabolit Analizleri: Metabolomik ve Lipidomik

3.2.3.1. Metabolomik Analizler

3.2.3.1.1. Birincil Metabolitlerin GC-MS ile Analizi

Birincil Metabolitlerin Ekstraksiyonu ve Derivatizasyonu

Mikrodalga uygulanan ve uygulanmayan mısır unu örneklerinden birincil metabolitlerin ekstraksiyonu ve derivatizasyonu (türevlendirilmesi), Hançerlioğulları ve arkadaşları tarafından bildirilen yöntem [219] göre gerçekleştirilmiştir:

1. 0.1 g örnek, 800 µL ekstraksiyon solventi %100 metanol (Ürün No: 1.06007.2500, Supelco, Bellefonte, ABD), 100 µL dahili (iç) standart adonitol (1 mg/mL, ribitol, Ürün No: A5502, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) ve kromatografi analizine uygun 100 µL deiyonize su (Ürün No: 1.15333.2500, Supelco, Bellefonte, ABD) sırasıyla bir Eppendorf tüpüne konulmuştur.
2. Tüp, 1 dk süreyle vortekslenmiştir (V-1plus vorteks, Biosan Medical-Biological Research and Technologies, Letonya). Ekstraksiyon verimini arttırmak için, karıştırılmış çözeltiyi içeren tüp, 35 °C'de 60 dk ultrasonik banyoya (VWR International, Radnor, Pensilvanya, ABD) daldırılmış ve ultrasonik işlem sırasında her 10 dakikada bir vorteksle kuvvetlice çalkalanmıştır.
3. Daha sonra karışık solüsyon 10000xg'de 15 dk 4 °C'de santrifüjlenmiştir (Sigma 3-18K santrifüj, Sartorius AG, Göttingen, Almanya). Santrifüjlemeden sonra, süpernatantın tamamı yeni bir Eppendorf tüpüne aktarılmıştır.
4. Ardından kalan pelete tekrar 800 µL %100 metanol ve 200 µL deiyonize su eklenmiştir. Tüp vorteks ile 1 dk süreyle karıştırılmıştır.
5. Ultrasonik banyo işlemi ve santrifüj işleminden sonra süpernatantın tamamı bir önceki adımda elde edilen süpernatant içeren Eppendorf tüpüne aktarılmış ve daha sonra çözelti 1 dk vorteksle iyice karıştırılmıştır.
6. Daha sonra karıştırılan solüsyon 10000xg'de 15 dk 4 °C'de santrifüjlenmiştir.

7. Santrifüjlemeden sonra, 1 mL sıvı süpernatant, bir GC vial (1.5 mL) aktarılmış ve daha sonra süpernatant, bir Azot gazı akışı altında kurutulmuştur. Ekstraktların kurutulması amacıyla kullanılan yüksek saflıktaki Azot (N₂) gazı Hat Sınai ve Tıbbi Gazlar A.Ş. (Hat Grup, Ankara, Türkiye)'den sağlanmıştır.
8. Kurutulan örnek 200 µL piridin (Ürün No: 270970, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) içerisinde çözünen metoksiamin hidroklorür (20 mg/mL, Ürün No: 89803, Supelco, Bellefonte, ABD) içinde çözülmüştür ve 37 °C'de (MIR-154-PE inkübatör, PHC Europe B.V., Etten-Leur, Hollanda) 90 dk çalkalanarak (Confido-S50 New4 karıştırıcı, FINEPCR, Gyeonggi-do, Kore) inkübe edilmiştir.
9. Ardından 200 µL N-metil-N-(trimetilsilil) trifloroasetamid (MSTFA, Ürün No: 69479, Supelco, Bellefonte, ABD) ilave edilerek tekrar 37 °C'de 90 dk çalkalanarak reaksiyon gerçekleşmiştir. Türevlendirme sonrasında elde edilen çözelti GC analizleri yapılmadan önce -20 °C'de saklanmıştır.

Birincil metabolitlerin ekstraksiyonu aşamasındaki optimizasyon çalışmaları için Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (HÜNİTEK, Ankara, Türkiye) altyapısında bulunan 7890B GC/5977A serisi MSD sistemi (Agilent J&W Scientific, ABD) kullanılmıştır. Metabolitlerin ayrımı için 30 m uzunluğuna (L) x 0.32 mm iç çapa (ID) ve 0.25 µm partikül boyutuna sahip HP-5 ms kolonu (19091S-413, Agilent J&W Scientific, ABD) kullanılmıştır.

GC-MS Analizi

Birincil metabolitlerin GC-MS analizleri Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM, Ankara, Türkiye) altyapısında bulunan 7890A GC/5975C serisi MSD sisteminde (Agilent J&W Scientific, ABD) gerçekleştirilmiştir. Metabolitlerin kromatografik ayrımı için 0.25 mm iç çapa (ID) ve 0.25 µm partikül boyutuna sahip, 30 m uzunluğunda (L) olan HP-5 ms kolonu (19091S-433:1077.39745, Agilent J&W Scientific, ABD) kullanılmıştır. Analiz, 240 °C'de (enjektör sıcaklığı) 50:1 split modda 0.5 µL örnek çözeltisi enjekte edilerek gerçekleştirilmiştir. Taşıyıcı gaz Helyum 1 mL/dk sabit akış hızında ayarlanmıştır. Fırın sıcaklık programı başlangıçta 80°C'ye ayarlanarak (bekleme süresi 1 dk), 5 °C/dk hızla 290 °C'ye yükseltilmiş ve son olarak 290 °C'ye ayarlanmıştır (bekleme süresi 7 dk). Yöntemin toplam çalışma süresi 50 dk ve çözücü gecikmesi (solvent delay) 2 dakikadır. Tam tarama modu kullanılmış ve

kütle spektrum aralığı 10-600 (m/z) arasında ayarlanmıştır. Tüm analizler üç teknik okumayla gerçekleştirilmiştir [219].

GC-MS toplam iyon kromatogram görüntüleri ve kromatogramlardaki piklere ait kütle spektrumları Enhanced Data Analysis (Agilent J&W Scientific, ABD) programında incelenmiştir. Kromatogramlara ait ham veriler CSV dosyasına dönüştürülmüş ve elde edilen değerler OriginLab Data Analyzes and Graphing Software (OriginPro 2023b, Learning Edition, Northampton, Massachusetts, ABD) programına aktarılmıştır. Çalışmada sunulan GC-MS kromatogram görüntüleri OriginLab programı ile elde edilmiştir. Pik tanımlama ise Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü (NIST) MS Search 2.4 /Wiley W10N14 (John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, ABD) kütle spektral kütüphanelerindeki spektrum verileri karşılaştırılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, belirlenen metabolit gruplarındaki majör piklerin doğrulaması için Golm Metabolome Database (Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Potsdam, Almanya) referans veri tabanından yararlanılmıştır. Piklerin integrasyonu ise, Enhanced Data Analysis (Agilent J&W Scientific, ABD) programında bulunan RTE Integrator aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Kantitatif değerlendirme için tek bir dahili (iç) standart pikine dayalı yarı kantifikasyon uygulanmış ve tanımlanan metabolitlerin miktarı aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır:

$$Q = \frac{A_{\text{metabolit}}}{A_{\text{IS}}} \times \frac{m_{\text{IS}}}{m_{\text{materyal}}} \quad (10)$$

burada Q metabolit miktarını, $A_{\text{metabolit}}$ bir örnekten elde edilen metabolitin pik alanını, A_{IS} dahili (iç) standardın pik alanını, m_{IS} dahili standardın kütlesini (0.1 mg) ve m_{materyal} mısır unu örneğinin kütlesini (100 mg) göstermektedir. Denklemden elde edilen değerler 1000 ile çarpılarak verilmiştir. GC-MS analizlerinin sonuçları, analiz edilen mısır unu örneğinin kg'ı başına mg adonitol eşdeğeri cinsinden ifade edilmiştir. Çalışmada ayrıca, tanımlanan metabolitlerin metabolik yolak analizleri KEGG bileşik [220] ve KEGG yolağı [221] veri tabanları aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. KEGG yolak analizi kapsamında elde edilen metabolik yolaklar ile metabolizma sınıflarına ait sütun grafikleri ise OriginLab programı ile elde edilmiştir.

3.2.3.1.2. Fitosterollerin GC-FID ile Analizi

Türevlendirilmiş mikrodalga uygulanan ve uygulanmayan mısır unu ekstraktlarında bulunan fitosterollerin analizi için Akram ve arkadaşlarının uyguladığı yöntem modifiye edilmiştir [222]. Analizler için Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde (Ankara, Türkiye) yer alan GC-FID Trace GC Ultra cihazı (Thermo Fisher Scientific Inc., ABD) kullanılmıştır. Fitosterollerin ayrımı ise Alltech Associates, Inc. (Deerfield, Illinois, ABD) firmasından sağlanan EC-1 (30 m L x 0.32 mm ID, 0.25 µm partikül boyutu) kolonunda gerçekleştirilmiştir. Sistem iç (inlet) sıcaklığı 280 °C olarak ayarlanmıştır. Örnekler 1 µL enjeksiyon hacmi ile 20:1 split oranında ve taşıyıcı gaz Helyum (He) ile 1 mL/dk akış hızında sisteme enjekte edilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak kullanılan kuru hava akış hızı 350 mL/dk ve H₂ gazı akış hızı 35 mL/dk şeklinde ayarlanmıştır. GC-FID analizinde kullanılan Helyum (He), kuru hava ve Hidrojen (H₂) gazları Hat Sınai ve Tıbbi Gazlar A.Ş. (Hat Grup, Ankara, Türkiye)'den sağlanmıştır. Fırın sıcaklığı başlangıçta 240 °C'de 1 dk olarak ayarlanmış ve 4°C/dk sıcaklık artış hızıyla 280 °C'ye çıktıktan sonra 4 dk 280 °C'de kalacak şekilde programlanmıştır. Toplam analiz süresi her bir örnek için 15 dk'dır. Analizler üç teknik okumayla gerçekleştirilmiştir.

Analiz sonrasında elde edilen kromatogramlar, ChromQuest 5.0 yazılım programında (Thermo Fisher Scientific Inc., ABD) değerlendirilmiştir. Mısır unu örneklerinde fitosterollerini kalitatif olarak tanımlamak için bilinen dört konsantrasyon değeriyle (25, 50, 100 ve 200 µg/mL) kampesterol (Ürün No: C5157, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD), stigmasterol (Ürün No: 47132, Supelco, Bellefonte, ABD), β-sitosterol (Ürün No: 43623, Supelco, Bellefonte, ABD) ve sikloartenol (Ürün No: 08172, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) dış standart çözeltileri kullanılmıştır. Her bir dış standarda ait kalibrasyon eğri grafikleri konsantrasyon değerlerine karşı ortalama pik alanı olacak şekilde oluşturulmuştur. Doğrusal regresyon analizi için kalibrasyon eğrilerinin eğimi, kesim noktası ve belirleme katsayıları (R²) bulunmuştur. Tespit limitleri (LOD), Denklem (11) kullanılarak, regresyon çizgilerinin y-kesişimlerinin standart hata değerine (σ) ve eğim değerine (S) bağlı olarak hesaplanmıştır [223].

$$\text{LOD} = 3.3 \frac{\sigma}{S} \quad (11)$$

GC-FID analizi sonucu örneklere ait kromatogramlardaki pikler, dış standartların alıkonma süreleriyle karşılaştırılarak doğrulanmıştır. Her bir fitosterol bileşiği için elde edilen pik alanları ve dış standartların doğrusal denklemleri kullanılarak kantitatif analizler gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.2. Lipidomik Analizler

3.2.3.2.1. Yağ Asitlerinin GC-FID ile Analizi

Yağ Asidi Ekstraksiyonu

Tüm örneklerden yağ asitlerinin ekstraksiyonu, Hançerlioğulları ve arkadaşları tarafından açıklanan yöntem [219] izlenerek gerçekleştirilmiştir: 0.2 g örnek 15 mL santrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra, tüplere 5 mL hekzan (Ürün Kodu: 930.027.2501, ISOLAB GmbH, Eschau, Almanya) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 18 saat 250 rpm'de çalkalama (NB-101MC kombine çalkalayıcı, N-Biotek Inc., Gyeonggi-do, Kore) yapılmıştır. Örnekler, 10000g'de 15 dk boyunca 4 °C'de bir Mega Star 1.6R yüksek hızlı santrifüj (VWR International, Radnor, Pensilvanya, ABD) kullanılarak santrifüjlenmiş ve sonrasında yaklaşık 5 mL süpernatant yeni tüplere aktarılmıştır. Yağ asidi metil esterlerinin (FAME'ler) elde edilmesi için ekstraktlara 500 µL 2 N metanolik KOH (potasyum hidroksit, Ürün No: 06005, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) çözeltisi ilave edilmiştir. Tüpler, 2 dk süreyle çalkalandıktan sonra, sabunlaştırılmış kısmın çöktürülmesi için oda sıcaklığında 15 dk boyunca 8000 rpm'de santrifüjlenmiştir (NF 800 santrifüj, Nuve Laboratory and Sterilization Tech., Ankara, Türkiye). Daha sonra elde edilen 1 mL süpernatant, bir GC vialine (1.5 mL) aktarılmıştır.

GC-FID Analizi

Yağ asitlerinin GC-FID analizlerinde Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde (Ankara, Türkiye) yer alan Trace GC Ultra cihazı (Thermo Fisher Scientific Inc., ABD) kullanılmıştır. Ekstraktlardan elde edilen yağ asitleri OPTIMA-WAX (30 m L x 0.25 mm ID, 0.25 µm partikül boyutu, Macherey-Nagel, Düren, Almanya) kolonu ile incelenmiştir. Yağ asitlerinin ayrılması ve tespiti için kullanılan giriş ve dedektör sıcaklığı 250 °C olarak ayarlanmıştır. Fırın sıcaklık programı ise şu şekilde programlanmıştır: ilk sıcaklık 140 °C (bekleme süresi 5 dk), daha sonra sıcaklık 4 °C/dk artış olacak şekilde 240 °C'ye yükseltilmiştir (bekleme süresi 10 dk). Örnekler 1 µL enjeksiyon hacmi ile 40:1 split oranında ve taşıyıcı gaz Helyum (He) ile 1 mL/dk akış hızında sisteme enjekte edilmiştir. Dedektör gazları olarak kullanılan kuru hava akış hızı 350 mL/dk ve H₂ gazı

akış hızı 35 mL/dk şeklinde ayarlanmıştır. Yağ asitlerinin GC-FID analizinde kullanılan Helyum (He), kuru hava ve Hidrojen (H₂) gazları ise Hat Sınai ve Tıbbi Gazlar A.Ş. (Hat Grup, Ankara, Türkiye)'den sağlanmıştır. Toplam analiz süresi her bir örnek için 40 dk'dır. Analizler dört teknik okumayla gerçekleştirilmiştir [219].

Kromatogramlar, ChromQuest 5.0 yazılımı (Thermo Fisher Scientific Inc., ABD) kullanılarak değerlendirilmiş ve örneklerin analizi sonucu elde edilen kromatogramlardaki pikler, FAME karışımı (37 Bileşen, Ürün No: CRM47885, Supelco, Bellefonte, ABD) standardındaki bileşiklerin alıkonma süreleriyle karşılaştırılarak doğrulanmıştır. Kromatogramlarda yer alan kimyasal yapıların oluşturulmasında ChemSpider (Royal Society of Chemistry, Londra, Birleşik Krallık) veri tabanından yararlanılmıştır. Mikrodalga uygulanan ve uygulanmayan örneklerden elde edilen her bir yağ asidi bileşiğinin yüzdesi, ilgili pik alanının toplam yağ asidi pik alanına olan oranı kullanılarak hesaplanmıştır (Denklem 12).

$$\text{Yağ asidi x (\%)} = \frac{A_x}{\sum A} \times 100 \quad (12)$$

burada A_x, bir örnekten elde edilen yağ asidi x'in pik alanını; $\sum A$ ise örneklerde bulunan yağ asitlerinin toplam pik alanını göstermektedir.

3.2.4. İstatistiksel Analizler

RT-qPCR analizleri sonrasında elde edilen mutlak gen ekspresyon verilerine log₂ normalizasyonu uygulanmıştır. Log₂-dönüştürülmüş gen ekspresyon ortalama değerleri arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar, IBM SPSS Statistics v.26.0 (International Business Machines Corporation (IBM), New York, ABD) programında bulunan tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kapsamında, Tukey'in Dürüstçe Anlamlı Fark (Honest Significant Difference, HSD) post hoc çoklu karşılaştırmalar testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışmada elde edilen gen ekspresyon seviyeleri ise OriginLab Data Analysis and Graphing Software (OriginPro 2023b, Learning Edition, Northampton, ABD) programı kullanılarak sütun grafikleri şeklinde sunulmuştur.

GC-MS ve GC-FID analizleri sonucu elde edilen ham verilerin istatistiksel değerlendirmesi için Tukey HSD post hoc testi kullanılmıştır. Daha sonra, verilerin

tamamına log2 normalizasyonu uygulanmış ve elde edilen verilerin sütun grafiklerinin oluşturulmasında OriginLab programından yararlanılmıştır. Normalize edilen birincil metabolit ve yağ asidi veri kümelerini incelemek için ise Hiyerarşik Kümeleme Analizi (HCA) ve Temel Bileşen Analizi (PCA) dahil olmak üzere çok değişkenli veri analiz yöntemleri kullanılmıştır. HCA analizinin sonuçlarını gösteren ısı haritaları, R v4.2.2 üzerinde çalışan ComplexHeatmap paketi v2.14.0 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Log2-dönüştürülmüş birincil metabolit ve yağ asidi miktarları, varsayılan parametrelerle ölçek fonksiyonu kullanılarak ölçeklendirilmiştir. Isı haritası, varsayılan hiyerarşik kümeleme parametreleri kullanılarak ölçeklendirilmiş veriler üzerinde oluşturulmuştur. PCA analizi ise Python v3.10.8 üzerinde çalışan scikit-learn paketi v1.1.3 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Log2-dönüştürülmüş birincil metabolit ve yağ asidi miktarları, varsayılan ayarlar kullanılarak StandardScaler yardımıyla ölçeklendirilmiş ve PCA iki boyutta gerçekleştirilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Genomik, transkriptomik ve metabolomik gibi omik bilimlerdeki son gelişmeler, mısır gibi gıda bitkilerinin işlenmesi sonrası karakterizasyonuna sistematik bir bakış açısı ile olanak sağlamaktadır. Bu çalışma, mikrodalga uygulanan mısır unununun hem moleküler hem de kimyasal profilinin bazı omik araçlar kullanılarak karakterizasyonuna, analizler sonrasında elde edilen verilerin yorumlanmasına ve mısır ununun mikrodalgada işlenmesine ilişkin araştırmalardaki boşluğun moleküler ve kimyasal bileşim açısından doldurulmasına katkı sağlamaktadır. Çalışmada kullanılan mısır unu örnekleri özellikle genetik modifiye (GM) olmayan ve GM olan mısır örneklerinden seçilmiştir. GM MIR604 mısır çeşidi ile GM MON810 mısır çeşidi kullanılarak gerçekleştirilen denemeler sonucunda elde edilen sonuçlar çalışma boyunca ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

Çalışmada DNA'ya dayalı genomik yaklaşım, hem GMO tarama analizinin (P-35S, P-FMV, T-NOS) hem de GM bitki tarama analizinin (bitki referans/spesifik gen analizi) uygulanan mikrodalga işleme yöntemine rağmen gerçekleştirilmesinin ortaya konması için kullanılmıştır. RNA'ya dayalı transkriptomik kapsamında değerlendirilen RT-qPCR analizleri ile mikrodalga uygulanan mısır örneklerinde iki farklı genin (*ZmAGO1a* ve *ZmRLK9*) hem tespit edilmesi hem de mutlak niceliğinin belirlenmesi için metod geliştirilmiş ve doğrulanmıştır. Metabolomik çalışmalar ise mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örneklerinde birincil metabolitlerin karakterizasyonu için GC-MS'e dayalı, ayrıca fitosterol bileşimlerinin belirlenmesi için ise GC-FID'ye dayalı metabolik profil analizlerini içermektedir. Yağ asitlerinin gıda kalitesi üzerindeki önemli etkileri nedeniyle bu bileşenlerin ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmesini sağlayan lipidomik kapsamında ise mısır unu örneklerindeki yağ asidi kompozisyonlarının belirlenmesi amacıyla güçlü bir analitik teknik olan GC-FID sistemi kullanılmıştır. Ayrıca hem GC-MS ile elde edilen birincil metabolit profiline hem de GC-FID ile elde edilen yağ asidi bileşimlerine ait normalize veri setlerini değerlendirmek için Hiyerarşik Kümeleme Analizi (HCA) ve Temel Bileşen Analizi (PCA) teknikleri kullanılmıştır. Son olarak, henüz standart düzenleyici bilgi gereksinimlerini karşılamak için uygulanmasa da, omik teknolojilerle elde edilen verilerin gıda prosesleri uygulanmış yeni gıdaların gıda kompozisyonu açısından risk değerlendirmesi aşamasında düzenleyiciler tarafından kolayca uygulanabilir olmasını amaçlayan bir yaklaşım önerilmiştir.

4.1. Genomik Analiz Sonuçları

4.1.1. Uygulanan DNA Ekstraksiyon Yönteminin Doğrulanması

Mikrodalga uygulanmayan ve GM olmayan mısır unu örneklerinden 3 ayrı günde aynı yöntem ve operatör tarafından her gün 6 tekrar olmak üzere elde edilen DNA ekstraktlarının konsantrasyon ve saflık değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Üç farklı günde altı tekrarlı çalışılarak MF1 ve MF3 örneklerinden ekstrakte edilen DNA’ların konsantrasyonu ve saflığı.

#	MF1 (%<0.1 GM MIR604)		MF3 (%<0.02 GM MON810)	
	DNA Konsantrasyon (ng/µL)	DNA Saflık (A260/A280)	DNA Konsantrasyon (ng/µL)	DNA Saflık (A260/A280)
1	97.05	1.80	204.50	1.80
2	92.18	1.85	217.70	1.80
3	75.08	1.84	173.50	1.76
4	102.75	1.91	199.90	1.76
5	90.45	1.87	202.00	1.79
6	97.35	1.90	191.60	1.81
1	69.75	1.83	171.10	1.82
2	67.78	1.81	200.20	1.80
3	73.94	1.82	193.90	1.81
4	85.62	1.85	204.45	1.81
5	92.54	1.84	111.60	1.81
6	92.25	1.81	125.30	1.81
1	88.56	1.84	198.90	1.83
2	85.86	1.90	118.90	1.78
3	82.78	1.85	105.60	1.80
4	107.64	1.85	108.58	1.80
5	92.28	1.85	140.40	1.79
6	74.75	1.88	150.30	1.80

A260/A280 ~1.8 olan DNA örnekleri saf kabul edilir ve aşağı akış uygulamalarında kullanım için uygundur. 10’dan küçük bir varyasyon katsayısı çok iyi olarak kabul edilirken, 30’dan büyük değerler kabul edilmemektedir [224, 225]. Genel ortalama,

standart sapma ve varyasyon katsayısı dahil verim değerleri ayrı ayrı MF1 için 87.15 µg, 11.27 µg ve %12.93 ve MF3 için 167.69 µg, 39.46 µg ve %23.53 olarak hesaplanmıştır. Hem nükleik asit konsantrasyonu ve saflık değerleri hem de varyasyon katsayısı değerleri ileri PCR analizi için uygun bulunmuştur. Bu nedenle DNA inhibisyon kontrol testleri için 73.94 ng/µL konsantrasyon ve 1.82 saflık ile MF1 ekstraktı ve ayrıca 105.60 ng/µL konsantrasyon ve 1.80 saflık ile MF3 ekstraktı kullanılmıştır. Daha sonra bu ekstraktların her ikisi için de ayrı ayrı dilüsyon serisi (1:4, 1:16, 1:64, 1:256) ile bitki geni (ACT) amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Her dilüsyon faktörü için ölçülen Cq değerleri ve inhibisyon testlerinden elde edilen ΔCq değerleri Çizelge 4.2’te verilmiştir.

Çizelge 4.2. Mikrodalga uygulanmayan ve GM olmayan mısır unlarının inhibisyon testleri.

Örnek Kodu: MF1 (%<0.1 GM MIR604)					
Seyreltme Faktörü	Ölçülen Cq	Cq Ortalaması	ΔCq	Beklenen ΔCq	Log. Değeri
1:4	19.42	19.39	2.04	2	-0.6021
	19.36				
1:16	21.56	21.58	2.19	2	-1.2041
	21.59				
1:64	23.53	23.55	1.97	2	-1.8062
	23.56				
1:256	25.84	25.85	2.31	2	-2.4082
	25.86				
Seyreltme Faktörü	Ölçülen Cq	Cq Ortalaması	Hesaplanan Cq	Hesaplanan – Ölçülen Cq	
1:1	17.32	17.35	17.25	0.10	UYGUN
	17.38				
Örnek Kodu: MF3 (%<0.02 GM MON810)					
Seyreltme Faktörü	Ölçülen Cq	Cq Ortalaması	ΔCq	Beklenen ΔCq	Log. Değeri
1:4	24.63	24.65	1.86	2	-0.6021
	24.66				
1:16	26.92	26.95	2.30	2	-1.2041
	26.97				
1:64	28.65	28.64	1.69	2	-1.8062

	28.62				
1:256	31.04	31.00	2.36	2	-2.4082
	30.95				
Seyreltme Faktörü	Ölçülen C _q	C _q Ortalaması	Hesaplanan C _q	Hesaplanan – Ölçülen C _q	
1:1	22.78	22.79	22.62	0.16	UYGUN
	22.79				

Kabul kriteri olarak, örneğin ölçülen ΔC_q değeri ile teorik ΔC_q (2.0) değeri arasındaki fark 0.5'ten fazla olmamalıdır. Yöntem doğrulama çalışmasından elde edilen C_q değerlerinin GMO Testi için Analitik Yöntemlerin Doğrulanması Raporu'na [226] göre uygun olduğu görülmüştür. Ayrıca, JRC'nin analitik yöntemleri için minimum performans gereksinimlerine yönelik yayınladığı teknik rapora göre, inhibisyon eğrisinin eğim değeri $-3.1 \leq \text{eğim} \leq -3.6$ aralığında, R² değeri ≥ 0.98 olmalıdır, bu da %110 ila %90 amplifikasyon verimlerine karşılık gelir [205]. MF1 örneği için doğrusallık grafiğinin (EK 1-A) eğiminin -3.546 ve R²'nin 0.999 olduğu bulunmuştur. Amplifikasyon verimi ise MF1 için %91.42 olarak hesaplanmıştır.

Ayrıca MF3 örneği için eğim ve R² değerleri sırasıyla -3.445 ve 0.996 olarak elde edilmiştir (EK 1-B). Amplifikasyon verimi ise MF3 için %95.12 olarak hesaplanmıştır.

Sonuçlar, çalışmada kullanılan her iki mısır unu örneğinde de DNA ekstrakte etme yaklaşımının, kalitatif PCR tabanlı çalışmalar için miktar ve kalite açısından yeterli DNA sağladığını göstermektedir.

4.1.2. Kalitatif PCR Yönteminin Doğrulanması

Kalitatif PCR yönteminin doğrulanması için çalışmada kullanılan ve mikrodalga uygulanmayan GM içeren MF2 ve MF4 örnekleri için ayrı ayrı DNA ekstraksiyonu ve GMO tarama analizleri uygulanmıştır. Buna göre mikrodalga uygulanmayan %75 GM MIR604 çeşidi içeren MF2 ve %5 GM MON810 içeren MF4 örneklerinden ekstrakte edilen DNA'nın nükleik asit konsantrasyonu ve saflık değerleri Çizelge 4.3'te ayrı ayrı verilmiştir. A260/A280'in 1.7'den yüksek olması, örnekte protein kontaminasyonunun olmadığını gösterir [227]. Bu çalışmada elde edilen DNA saflığı (A260/A280) değerleri tüm örnekler için yüksek kaliteli DNA üretebildiğini göstermiştir.

Çizelge 4.3. MF2 ve MF4 örneklerinden ekstrakte edilen DNA'ların konsantrasyonu ve saflığı.

Örnek	DNA Konsantrasyon (ng/μL)	Ortalama Değer (ng/μL)*	Saflık (A260/280)	Ortalama Saflık*
MF2 (mikrodalga uygulanmayan %75 GM MIR604)	37.09	38.76 ± 2.35	1.82	1.85 ± 0.04
	40.42		1.88	
Örnek	DNA Konsantrasyon (ng/μL)	Ortalama Değer (ng/μL)*	Saflık (A260/280)	Ortalama Saflık*
MF4 (mikrodalga uygulanmayan %5 GM MON810)	37.12	38.08 ± 1.36	1.86	1.93 ± 0.10
	39.04		2.00	

*: Değerler ortalama ± SD, n=2 olarak ifade edilmiştir.

Örneklerin varyasyon katsayısı MF2 için %6.063 ve MF4 için %3.571 olarak bulunmuştur. Bulgular sonucunda DNA ekstraktlarının PCR amplifikasyonu için uygun olduğu görülmektedir. MF2 ve ayrıca MF4 örnekleri için 2 farklı kopya seviyesinde 10 PCR tekrarı olarak test edilen analizler için elde edilen LOD_{abs} değerleri ise Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. GMO tarama analizinin LOD_{abs} değerleri.

Örnek	Kopya	Genetik Element	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	%
MF2 (mikrodalga uygulanmayan %75 GM MIR604)	20 kopya DNA	P-35S	- ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
		T-NOS	+ ²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
	P-FMV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
	10 kopya DNA	P-35S	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
T-NOS		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100

Örnek	Kopya	Genetik Element	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	%	
		P-FMV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	
MF4 (mikrodalga uygulanmayan %5 GM MON810)	20 kopya DNA	P-35S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	
		T-NOS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
		P-FMV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	
		P-35S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	
	10 kopya DNA	T-NOS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
		P-FMV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100

¹: Negatif sonuç, ²: Pozitif sonuç

Bir örnekte doğru bir şekilde tanımlanabilen ancak mutlaka ölçülmeyen en düşük analit miktarı veya konsantrasyonu, tespit limiti (LOD) olarak adlandırılır. LOD kabul kriteri için tipik kural, en fazla 25 kopya, %95 güven düzeyi ve %5'ten fazla yanlış negatif sonuç olmamasıdır [205]. Hesaplanan LOD değeri, üç farklı genetik elementi eş zamanlı saptamak için kullanılan kalitatif PCR yönteminin mutlak LOD'sini (LOD_{abs}) göstermiştir. Bu çalışmada GMO tarama analizi sonucunda, MF2'deki tüm genetik elementler için LOD_{abs} değeri ≥ 20 kopya, MF4'teki LOD_{abs} değeri ise ≥ 10 kopya olarak belirlenmiştir.

Gerçek durum negatif olduğunda (GM hedefi veya spesifik GMO yoksa), ancak test sonucu pozitif olarak sınıflandırıldığında (GM hedefi veya spesifik GMO varsa), bu tip 1 hata oranı veya yanlış pozitif oranı olarak bilinir. Ek olarak, bir test sonucu negatif olduğunda (GM hedefi veya spesifik GMO yoksa), ancak gerçek durum pozitif olduğunda (GM hedefi veya spesifik GMO $\geq LOD$ konsantrasyonda mevcutsa), bu tip 2 hata oranı veya yanlış negatif oranı olarak bilinir. %75 GM MIR604 mısır çeşidi içeren MF2 örneği için, hem 20 hem de 10 kopya DNA örneğinin tüm kopyalarında FMV genlerinin negatif olduğu gözlemlenmiştir. Birinci tip hata oranı sıfır olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde P-35S 20 kopya DNA örneği için tip 1 hata oranı sıfır bulunmuştur. P-35S 10 kopya DNA örneği için bu hata değeri %10 olarak hesaplanmıştır (kabul kriteri: $\alpha \leq \%5$), çünkü P-

35S için 4. kopyada bir adet pozitif test sonucu tespit edilmiştir. T -NOS tüm kopyalar için pozitif olarak gözlemlenmiş ve yanlış sınıflandırılmış bilinen bir negatif olmadığından dolayı MF2 örneği için tip 2 hata oranı sıfır olarak hesaplanmıştır.

%5 GM MON810 çeşidi içeren MF4 mısır unu örneği için, 20 kopya ve 10 kopya DNA örneklerinin tüm kopyalarının hem P-FMV hem de T-NOS genetik elementleri için negatif olduğu belirlenmiştir. Yanlış sınıflandırılan bilinen bir pozitif olmadığı için 1. tip hata oranı sıfır olarak hesaplanmıştır. P-35S tüm kopyalar için pozitif olarak gözlemlenmiş ve P-35S için bilinen bir negatif test sonucu olmadığı için MF4 örneği için tip 2 hata oranı sıfır olarak bulunmuştur. Bu çalışmada, hem MF2 ve hem de MF4 örnekleri için tip 1 ve tip 2 hata oranları, PCR tabanlı kalitatif yöntemin performans gereksinimlerini karşılamıştır.

4.1.2.1. Mikrodalga Uygulaması Sonrasında DNA Ekstraksiyonu

Kalitatif PCR sonuçlarının güvenilirliğini daha fazla doğrulamak için, mikrodalga uygulanmayan ve uygulanan bütün mısır unu örneklerinden DNA'lar, üreticinin protokolüne göre ayrı ayrı ekstrakte edildikten sonra elde edilen DNA konsantrasyon ve saflık değerleri Çizelge 4.5'te verilmiştir. Hem MF1, MF1T, MF2 ve MF2T hem de MF3, MF3T, MF4 ve MF4T örneklerine ait DNA konsantrasyonları spektrofotometrik ölçümler sonucunda belirlenmiştir. Bulgular, tüm örneklerin kalitatif PCR tabanlı tarama yöntemi için yeterli miktarda DNA'ya sahip olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.5. Mikrodalga uygulanmayan ve uygulanan örneklerden ekstrakte edilen DNA'ların konsantrasyonu ve saflığı.

Örnek Adı	Örnek Kodu	DNA	Varyasyon	A260/A280**	A260/A230**
		Konsantrasyon (ng/μL)**	Katsayısı (%)		
Mikrodalga uygulanmayan mısır unu 1	MF1 (%<0.1 GM MIR604)	50.53 ± 0.10	0.198	1.73 ± 0.02	1.28 ± 0.01
Mikrodalga uygulanan mısır unu 1	MF1T* (%<0.1 GM MIR604)	43.61 ± 0.09	0.206	1.73 ± 0.02	1.15 ± 0.02

Mikrodalga uygulanmayan mısır unu2	MF2 (%75 GM MIR604)	46.24 ± 0.10	0.216	1.72 ± 0.02	1.02 ± 0.14
Mikrodalga uygulanan mısır unu2	MF2T* (%75 GM MIR604)	52.21 ± 0.11	0.211	1.75 ± 0.02	1.10 ± 0.01
Örnek Adı	Örnek Kodu	DNA Konsantrasyonu (ng/μL)**	Varyasyon Katsayısı (%)	A260/A280**	A260/A230**
Mikrodalga uygulanmayan mısır unu3	MF3 (%<0.02 GM MON810)	33.92 ± 0.07	0.206	1.71 ± 0.02	0.64 ± 0.01
Mikrodalga uygulanan mısır unu3	MF3T* (%<0.02 GM MON810)	26.89 ± 0.06	0.223	1.61 ± 0.02	0.56 ± 0.02
Mikrodalga uygulanmayan mısır unu4	MF4 (%5 GM MON810)	51.54 ± 0.10	0.194	1.81 ± 0.02	0.87 ± 0.02
Mikrodalga uygulanan mısır unu4	MF4T* (%5 GM MON810)	44.43 ± 0.09	0.203	1.74 ± 0.01	1.12 ± 0.01

*: Mikrodalga işlemi (600 W, 2 dk)

** : Değerler ortalama ± SD, n=2 olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.5'te hem MF1, MF1T, MF2 ve MF2T hem de MF3, MF3T, MF4 ve MF4T örneklerine ait varyasyon katsayıları incelendiğinde, bu değerlerin ENGL Raporlarına [228, 229] göre uygun olduğu bulunmuştur. Kaliteli DNA'nın A260/A280 nm'de ~1.8-2 absorbansa sahip olması ve 260/230 nm'de beklenen absorbans değerinin 2 ile 2.2 arasında olması önerilir [230]. Hem mikrodalga uygulanmayan hem de uygulanan tüm örnekler için A260/A280 değerlerinin ~1.8'e yakın çıktığı gözlemlenmiştir. A260/A230 değerleri ise 2'den düşük bulunmuştur. DNA'nın düşük absorbans değerleri, ortamda az ya da çok şeker, tuz ya da inorganik tuzun varlığını gösterebilir [231]. Sonuçlar, tüm mısır unu örneklerinden DNA ekstraksiyonu için kullanılan yöntemin, kalitatif PCR tabanlı tarama testleri için miktar ve kalite bakımından yeterli DNA sağladığını göstermektedir.

4.1.3. Bitkiye Özgü ve GM Elementlerin Taranması

Çalışmada GMO tarama kiti (BIOTECON Diagnostics GmbH, Potsdam, Almanya) kullanılarak, P-35S dizisinin amplifikasyonu FAM floresans kanalında, P-FMV dizisinin amplifikasyonu ROX kanalında ve T-NOS dizisinin amplifikasyonu ise HEX kanalında analiz edilmiştir. Dahili kontrolün spesifik amplifikasyonu Cy5 floresans kanalında gerçekleştirilmiştir. Her örnek için kanal FAM (P-35S), kanal ROX (P-FMV), kanal HEX (T-NOS) ve kanal Cy5'ten (Dahili kontrol) elde edilen sonuçlar karşılaştırılmış ve sonuçlar Çizelge 4.6'da açıklandığı şekilde yorumlanmıştır.

Çizelge 4.6. Gerçek zamanlı PCR sisteminde bulunan kanallardan elde edilen verilerin yorumlanması.

Kanal FAM (P-35S)	Kanal ROX (P-FMV)	Kanal HEX (T-NOS)	Kanal Cy5 (Dahili kontrol)	Sonuç Yorumlama
Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif veya Negatif	P-35S, T-NOS ve P-FMV için Pozitif
Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif veya Negatif	T-NOS ve P-FMV için Pozitif
Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif veya Negatif	P-35S ve P-FMV için Pozitif
Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif veya Negatif	P-35S ve T-NOS için Pozitif
Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif veya Negatif	T-NOS için Pozitif
Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif veya Negatif	P-35S için Pozitif
Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif veya Negatif	P-FMV için Pozitif
Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif	P-35S, T-NOS ve P-FMV için Negatif
Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Geçersiz

Genomik analizler kapsamında çalışmada kullanılan örneklerin GM profilini ortaya koymak için kalitatif PCR yöntemi kullanılarak ACT, P-35S, P-FMV ve T-NOS genetik elementlerinin taraması yapılmış ve elde edilen tarama test sonuçları Çizelge 4.7'de

gösterilmiştir. Ayrıca, örneklerin analizi sonucunda elde edilen GMO taramasına ait tipik gerçek zamanlı PCR görüntüleri EK 2’de sunulmuştur.

Çizelge 4.7. Mikrodalga uygulanmayan ve uygulanan örneklerde genetik elementlerin taranması.

Örnek Adı	Örnek Kodu	Bitkiye Özgü Element	GMO Tarama Elementleri		
		ACT	P-35S	P-FMV	T-NOS
Mikrodalga uygulanmayan mısır unu1	MF1 (%<0.1 GM MIR604)	+	-	-	-
Mikrodalga uygulanan mısır unu1	MF1T* (%<0.1 GM MIR604)	+	-	-	-
Mikrodalga uygulanmayan mısır unu2	MF2 (%75 GM MIR604)	+	-	-	+
Mikrodalga uygulanan mısır unu2	MF2T* (%75 GM MIR604)	+	-	-	+
Örnek Adı	Örnek Kodu	Bitkiye Özgü Element	GMO Tarama Elementleri		
		ACT	P-35S	P-FMV	T-NOS
Mikrodalga uygulanmayan mısır unu3	MF3 (%<0.02 GM MON810)	+	-	-	-
Mikrodalga uygulanan mısır unu3	MF3T* (%<0.02 GM MON810)	+	-	-	-
Mikrodalga uygulanmayan mısır unu4	MF4 (%5 GM MON810)	+	+	-	-
Mikrodalga uygulanan mısır unu4	MF4T* (%5 GM MON810)	+	+	-	-

*: Mikrodalga işlemi (600 W, 2 dk)

Test edilen tüm mikrodalga uygulanmayan ve uygulanan referans materyalleri, P-35S, P-FMV, T-NOS ve bitkiye özgü ACT genleri için beklenen sonuçları vermiştir. Tüm CRM'lerde, bitkiye özgü analizler kapsamında pozitif sonuçlar elde edilmiştir.

Mikrodalga uygulanmayan MF1 ve mikrodalga uygulanan MF1T mısır unu örnekleri için 35S, FMV ve NOS genetik elementleri için test sonuçlarının negatif olduğu bulunmuştur. Mikrodalga uygulanmayan MF2 ve mikrodalga uygulanan MF2T mısır unu örneklerinde ise beklenildiği gibi T-NOS bölgesi için pozitif sinyaller alınmıştır.

Ayrıca, mikrodalga uygulanmayan MF3 ve MF4 ile bunların mikrodalga uygulamasına tabi tutulan örneklerinde (MF3T ve MF4T) FMV ve T-NOS için negatif sonuçlar belirlenmiştir. 35S elementi için beklenildiği gibi mikrodalga uygulanmayan MF4 ve mikrodalga uygulanan MF4T örneklerinde pozitif saptama gözlemlenmiştir.

Genel olarak gıda, yem ve tohum/tohumlarda GMO testine yönelik yaklaşım, DNA ekstraksiyonu ve saflaştırmasını, GMO tarama analizini (P-35S, P-FMV, T-NOS, bar), GM bitki tarama analizini (bitki referans/spesifik gen analizi), GMO tanımlamasını ve kantifikasyon analizini içermektedir [232]. GMO test prosedürünün en önemli adımı genellikle tarama tespiti olarak kabul edilmektedir [233, 234]. Yaygın GMO tarama teknolojileri, PCR tabanlı tekniklerdir, ancak veri karşılaştırması dikkatle yapılmalıdır. PCR testiyle ilgili hususlara ek olarak, PCR inhibitörlerinin amplifikasyon işleminin sonucu üzerinde bir etkisi olabileceğinden, ürünle ilgili çeşitli özellikler de dikkate alınmalıdır. Bu durumların üstesinden gelmek için, PCR tabanlı tarama analizini iyileştirebilecek doğrulama deneyleri bu çalışmada gerçekleştirilmiştir. Hem mikrodalga uygulanmayan hem de mikrodalga uygulanan örneklerden ekstrakte edilen DNA'nın yüksek kalitede olduğu, bitki ACT geninin amplifiye edilmesiyle doğrulanmıştır.

Yöntem performans testine göre sonuçlar, mutlak tespit limiti (LOD_{abs}), tip 1 hata oranı (yanlış pozitif) ve tip 2 hata oranı (yanlış negatif) gibi kriterler kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada GMO tarama analizi sonucunda, mikrodalga uygulanmayan ve GM olan mısır unu2 (MF2)'deki tüm genetik elementler için LOD_{abs} değeri ≥ 20 kopya, mikrodalga uygulanmayan ve GM olan mısır unu4 (MF4)'teki LOD_{abs} değeri ise ≥ 10 kopya olarak belirlenmiştir. Bu değerler %95 güven aralığı içerisindedir [205]. Bu araştırmada, hem MF2 hem de MF4 örnekleri için hesaplanan tip 1 ve tip 2 hata

oranları da, PCR tabanlı kalitatif yaklaşım için kabul edilebilir aralık içerisinde bulunmuştur. Sonuçlar, DNA'nın hem mikrodalga uygulanmayan hem de mikrodalga uygulanan un örneklerinde tespit edilebileceğini göstermiştir (Çizelge 4.5). Spektrofotometrik analiz bulguları, kalitatif PCR tabanlı tarama teknikleri için uygundur. Benzer şekilde, çalışmalar, dokuyu mikrodalga uygulaması ile işledikten sonra iyi kalitede ve miktarda DNA'yı başarılı bir şekilde ekstrakte edebilmiş ve PCR ile saptanabilir hale getirmiştir [235, 236]. Kalitatif tarama analizi sonucunda, mikrodalga uygulamasının GMO taraması veya bitkiye özgü elementler üzerinde gözle görülür bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir.

4.2. Transkriptomik Analiz Sonuçları

4.2.1. RNA Ekstraksiyon Sonuçları

RNA Extracol Metodu (Metot A):

RNA Extracol yöntemi kullanılarak örneklerden ekstrakte edilen RNA için spektrofotometrik okumalar sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. RNA Extracol yöntemi kullanılarak örneklerden ekstrakte edilen RNA için Nanodrop ölçümleri sonucunda elde edilen RNA verim, varyasyon katsayısı ve saflık (A260/280) değerleri.

Örnek	RNA Verimi ($\mu\text{g/g un}$)**	Varyasyon Katsayısı (%)	RNA Saflığı (A260/280)**
C1 (%0 GM)	136.00 \pm 1.40	1.03	1.87 \pm 0.10
MF1 (%<0.1 GM MIR604)	259.60 \pm 43.60	16.80	1.78 \pm 0.01
MF1T* (%<0.1 GM MIR604)	255.40 \pm 15.60	6.11	1.81 \pm 0.02

MF2 (%75 GM MIR604)	182.40 ± 6.60	3.62	1.77 ± 0.02
MF2T* (%75 GM MIR604)	202.70 ± 30.10	14.86	1.73 ± 0.01
MF3 (%<0.02 GM MON810)	529.40 ± 141.20	26.67	1.69 ± 0.01
MF3T* (%<0.02 GM MON810)	511.50 ± 2.90	0.57	1.71 ± 0.00
MF4 (%5 GM MON810)	328.90 ± 64.90	19.73	1.70 ± 0.00
MF4T* (%5 GM MON810)	302.50 ± 67.70	22.38	1.69 ± 0.00

*: Mikrodalga işlemleri (600 W, 2 dk)

** : Verilen değerler, üç biyolojik tekrar örneklerinin ortalama ± standart sapma değerleridir.

Çizelge 4.8 incelendiğinde, her bir mısır unu örneğinde A260/280 değerlerinin yaklaşık 1.8'e yakın çıktığı görülmektedir. Bu değerler elde edilen RNA'nın saf olduğunu ve qPCR gibi teknikler için uygun olduğunu göstermektedir [237]. Varyasyon katsayısı uygulanan yöntemin tutarlılığı ve istikrarlılığına yönelik bir parametre olup, "standart sapma/ortalama nükleik asit konsantrasyonu x 100" formülüyle hesaplanmaktadır. 10'dan küçük değerler çok iyi olarak kabul edilirken, 30'dan büyük değerler kabul edilmemektedir [225]. Çizelge 4.8'de varyasyon katsayısı değerlerinin uygun olduğu, 30'dan küçük olduğu görülmektedir.

RNA'nın bütünlüğü RNA kalitesinin belirlenmesinde önemli bir kriterdir. RNA bütünlüğü, ribozomal RNA (rRNA)'ların 28S:18S oranı kullanılarak değerlendirilmektedir. RNA bütünlük numarası (RNA Integrity Number, RIN), RNA'nın kalitesini degradasyona bağlı olarak sağlayan bir sayısal puan (1-10 aralığı) içermektedir; daha yüksek bir RIN, daha iyi bir RNA bütünlüğünü göstermektedir. Genel olarak, RIN değeri >7, RNA sekanslama gibi akış aşağı uygulamalar için uygun kabul edilmektedir [238]. RT-qPCR gibi moleküler teknikler ise ortalama 2 gibi düşük RIN değerlerine sahip örnekleri tolere edebilmektedir [239]. RNA kalitesini değerlendirmek için Çizelge 4.8'de yer alan, mikrodalga uygulanmayan MF1 ile mikrodalga uygulanan MF2T örneklerine ait RNA örnekleri seçilmiştir. Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, ABD) ile gerçekleştirilen analiz sonucunda örneklerin RIN değerleri sırasıyla, 2.75 ± 0.35 (n=2) ve 2.30 ± 0.71 (n=2) olarak hesaplanmıştır. Bu analiz, cDNA sentezi ve RT-qPCR gibi sonraki uygulamalar için RNA Extracol yöntemi kullanılarak mısır unundan yeterli kalitede RNA'nın ekstrakte edilebileceğini doğrulamıştır.

Modifiye RNA Extracol Metodu (Metot B):

RNA kalitesinin iyileştirilmesine yönelik farklı bir ekstraksiyon yöntemi olarak modifiye RNA Extracol yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemle ekstrakte edilen RNA örneklerinin Nanodrop absorban ölçümlerine ait sonuçlar Çizelge 4.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. Modifiye RNA Extracol yöntemi kullanılarak örneklerden ekstrakte edilen RNA için Nanodrop ölçümleri sonucunda elde edilen RNA verim, varyasyon katsayısı ve saflık (A260/280) değerleri.

Örnek	RNA Verimi ($\mu\text{g/g un}$)*	Varyasyon Katsayısı (%)	RNA Saflığı (A260/280)*
Mısır Tohumu	275.71 ± 48.86	17.72	2.01 ± 0.01
C1 (%0 GM)	441.93 ± 27.89	6.31	2.03 ± 0.01
MF1 (%<0.1 GM MIR604)	747.47 ± 245.71	32.87	2.06 ± 0.03

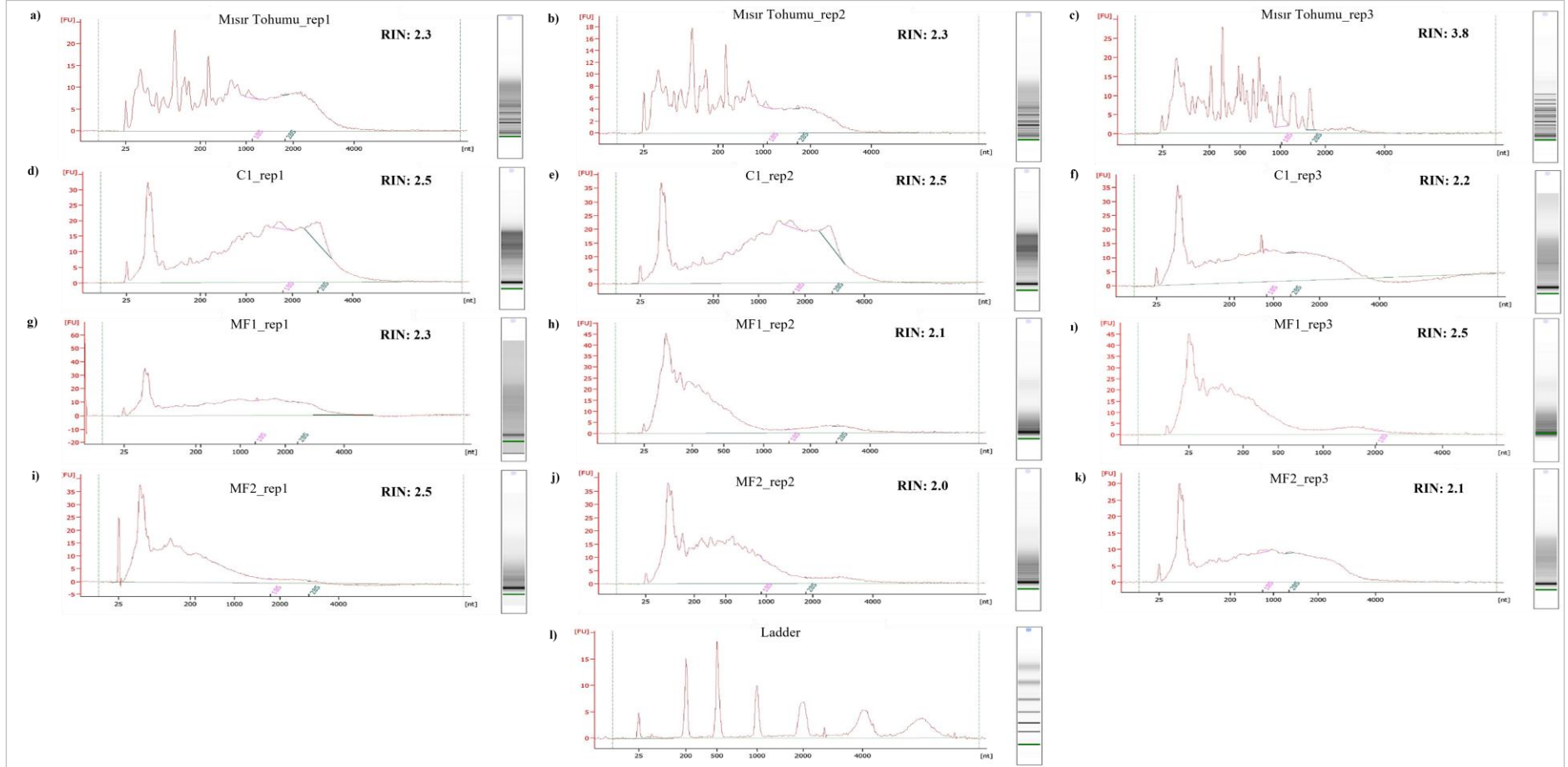
MF2			
(%75 GM	461.57 ± 94.53	20.48	2.03 ± 0.06
MIR604)			

*: Verilen değerler, üç biyolojik tekrar örneklerinin ortalama ± standart sapma değerleridir.

Yukarıdaki sonuçlar Çizelge 4.8 ile karşılaştırıldığında, C1, MF1 ve MF2 örnekleri için elde edilen RNA verim ve saflık değerlerinin arttığı ve yöntemin değerleri iyileştirmeye yardımcı olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca taze mısır tohumlarının öğütülmesi sonrasında elde edilen örneğe ait RNA verim, varyasyon katsayısı ve saflık değerleri de uygun bulunmuştur. Örneklerden elde edilen RNA örneklerinin RIN değerleri ise 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, ABD) sistemiyle belirlenmiş ve analizle ilişkili elektroferogramlar ile jel benzeri görüntüler Şekil 4.1’de sunulmuştur.

Modifiye SDS-LiCl Metodu (Metot C):

Mısır tohumu, MF1, MF2 ve MF2T örneklerine modifiye SDS-LiCl metodu uygulanmıştır. Daha sonra bu yöntemden elde edilen RNA örnekleri için kalite kontrol değerlendirilmesi yapılmıştır. Kalite kontrole yönelik elde edilen sonuçlar ise Çizelge 4.10’da gösterilmiştir. Çizelge 4.10’da elde edilen RIN değerlerine bakıldığında, ekstraksiyon için uygulanan önceki iki metoda göre değerlerin ortalama olarak arttığı gözlemlenmiştir. Ancak, uygulanan modifiye SDS-LiCl yöntemi sonucunda elde edilen RNA örneklerinin saflık değerleri yeterli olsa da, nükleik asit miktarlarının düşük olması sebebiyle farklı bir yöntem için literatür taraması yapılmıştır.



Şekil 4.1. Modifiye RNA Extracol yöntemi kullanılarak örneklerden ekstrakte edilen RNA'ların Bioanalyzer elektroferogram görüntüleri. X eksenini (Nükleotidler) ve Y eksenini FU (Floresans Birimleri), RIN: RNA Bütünlük Numarası.

Çizelge 4.10. Modifiye SDS-LiCl ekstraksiyon yöntemi uygulanarak elde edilen RNA'nın kalite kontrol değerlendirme sonuçları.

Örnek	Nükleik Asit Miktarı (ng/µL)	Hacim (µL)	Toplam Miktar (µg)	RNA Saflığı (A260/280)	RIN
Mısır Tohumu	131.00	40.00	5.24	2.07	3.80
MF1 (%<0.1 GM MIR604)	22.00	34.00	0.75	2.18	1.80
MF2 (%75 GM MIR604)	32.00	33.00	1.06	2.12	3.60
MF2T* (%75 GM MIR604)	64.00	35.00	2.24	2.11	4.30

*: Mikrodalga işlemi (600 W, 2 dk)

Modifiye CTAB Ekstraksiyon Metodu (Metot D):

Modifiye CTAB ekstraksiyon yöntemiyle ekstrakte edilen RNA örneklerinin miktar ve kalitesini belirlemek amacıyla Nanodrop'ta absorbans ölçümü yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.11'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. Modifiye CTAB ekstraksiyon yöntemi kullanılarak örneklerden ekstrakte edilen RNA için Nanodrop ölçümleri sonucunda elde edilen RNA verim, varyasyon katsayısı ve saflık (A260/280) değerleri.

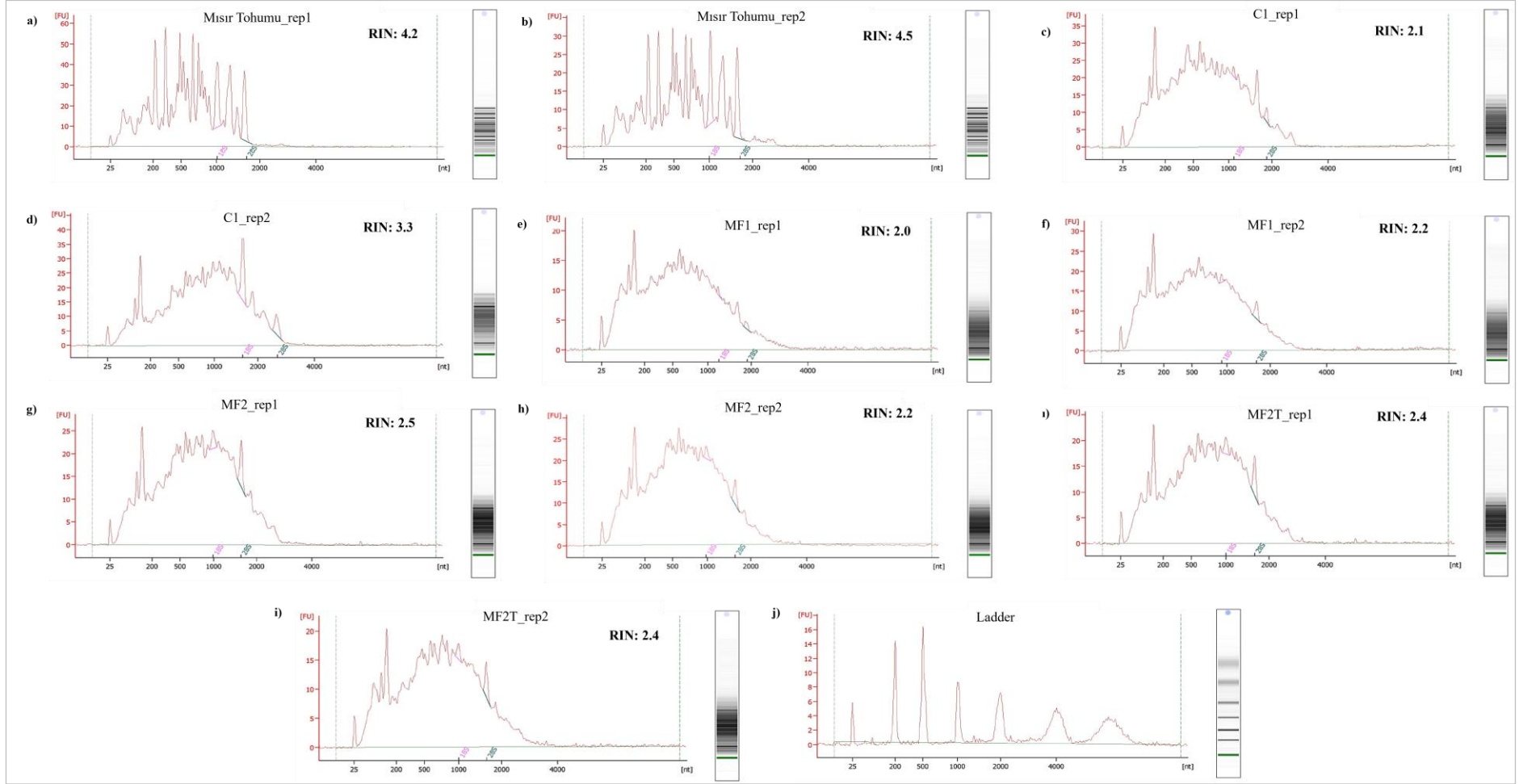
Örnek	RNA Verimi (µg/g un)**	Varyasyon Katsayısı (%)	RNA Saflığı (A260/280)**
Mısır Tohumu	163.47 ± 46.11	28.20	2.08 ± 0.00
C1 (%0 GM)	171.12 ± 3.74	2.19	2.14 ± 0.00

MF1			
(%<0.1 GM MIR604)	128.42 ± 2.98	2.32	2.13 ± 0.01
MF2			
(%75 GM MIR604)	182.19 ± 8.17	4.48	2.14 ± 0.00
MF2T*			
(%75 GM MIR604)	149.96 ± 2.18	1.45	2.10 ± 0.02

*: Mikrodalga işlemi (600 W, 2 dk)

** : Verilen değerler, iki biyolojik tekrar örneklerinin ortalama ± standart sapma değerleridir.

Çizelge 4.11'deki sonuçlar incelendiğinde, RNA saflık değerlerinin 2.0-2.2 arasında olduğu görülmektedir. RNA verimi ve varyasyon katsayısı değerleri de uygun bulunmuştur. Örneklerden elde edilen RNA örneklerinin RIN değerleri ise 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, ABD) sistemiyle belirlenmiş ve analizle ilişkili elektroferogramlar ile jel benzeri görüntüler Şekil 4.2'de sunulmuştur.



Şekil 4.2. Modifiye CTAB ekstraksiyon yöntemi kullanılarak örneklerden ekstrakte edilen RNA'ların Bioanalyzer elektroferogram görüntüleri. X eksenini nt (Nükleotidler) ve Y eksenini FU (Floresans Birimleri), RIN: RNA Bütünlük Numarası.

4.2.2. DNaz Uygulaması Sonuçları

Uygulanan her iki RNA ekstraksiyon yöntemi için (hem modifiye RNA Extracol yöntemi hem de modifiye CTAB ekstraksiyon yöntemi) sıvı nitrojenle muamele edilen ve -80 °C'de depolanan GM olmayan ticari mısır unu (C1) örneklerine yönelik 4 ayrı konsantrasyon değeri noktası seçilerek, optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca yöntemlerin optimizasyonları sırasında iki farklı DNaz enzimi, (A) DNaz ve (B) DNaz uygulanmıştır. Aşağıda sırasıyla verilen çizelgelerde (Çizelge 4.12-4.17) optimizasyon çalışmalarıyla elde edilen Nanodrop ve Bioanalyzer sonuçları özetlenmiştir.

Çizelge 4.12. Modifiye RNA Extracol yöntemi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan C1 örneklerinden ekstrakte edilen RNA için Nanodrop sonucunda elde edilen RNA verim değerlerinin karşılaştırılması.

Örnek No.	C1 Başlangıç Miktarı (g)	C1 Konsantrasyonu (g/mL)	RNA Verimi ($\mu\text{g/g un}$)*
1	0.10	0.083	239.3 \pm 43.00
2			
3	0.20	0.167	157.4 \pm 5.10
4			
5	0.35	0.292	131.8 \pm 9.60
6			
7	0.50	0.417	125.1 \pm 0.90
8			

*: Verilen değerler, iki biyolojik tekrar örneklerinin ortalama \pm standart sapma değerleridir.

Çizelge 4.12 incelendiğinde, ticari mısır unu konsantrasyonu 0.083 g/mL olan örneklerin RNA verimi diğer konsantrasyonda hazırlanan örneklere göre daha yüksek çıkmıştır.

Çizelge 4.13. Modifiye RNA Extracol yöntemi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan C1 örneklerinden ekstrakte edilen RNA'nın (A) DNaz uygulaması sonrasında elde edilen RNA kalite ölçümleri.

Örnek No.	Nükleik Asit Konsantrasyonu (ng/µL)	Safılık (A260/A280)	Nükleik Asit Konsantrasyonu (ng/µL)*	Safılık (A260/A280)*	RIN Değeri*
1	564.60	1.89	599.50	1.81	2.80
3	649.80	1.81	392.90	1.92	2.50
5	855.20	2.04	502.70	2.04	1.90
7	1242.00	2.13	613.70	2.04	2.10

*: (A) DNaz uygulaması sonrasında elde edilen RNA kalite değerleri

Çizelge 4.14. Modifiye RNA Extracol yöntemi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan C1 örneklerinden ekstrakte edilen RNA'nın (B) DNaz uygulaması sonrasında elde edilen RNA kalite ölçümleri.

Örnek No.	Nükleik Asit Konsantrasyonu (ng/µL)	Safılık (A260/A280)	Nükleik Asit Konsantrasyonu (ng/µL)*	Safılık (A260/A280)*	RIN Değeri*
2	392.50	1.98	449.50	2.09	4.30
4	609.00	1.91	340.40	2.13	2.90
6	989.70	2.11	562.00	2.12	N/A
8	1260.10	2.11	780.80	2.16	2.70

*: (B) DNaz uygulaması sonrasında elde edilen RNA kalite değerleri

Çizelge 4.13 ve 4.14 ayrı ayrı incelendiğinde sırasıyla (A) DNaz ve (B) DNaz enzim uygulamaları, RNA saflık değerlerinde olumsuz bir etki yaratmamıştır. Bunun yanı sıra, enzimlerin RNA'nın bütünlüğünü etkili bir şekilde iyileştiremediği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.15. Modifiye CTAB ekstraksiyon yöntemi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan C1 örneklerinden ekstrakte edilen RNA için Nanodrop sonucunda elde edilen RNA verim değerlerinin karşılaştırılması.

Örnek No.	C1 Başlangıç Miktarı (g)	C1 Konsantrasyonu (g/mL)	RNA Verimi ($\mu\text{g/g un}$)*
1	0.10	0.083	137.2 \pm 29
2			
3	0.25	0.208	113.1 \pm 3.9
4			
5	0.40	0.333	54.2 \pm 2.60
6			
7	0.50	0.417	34.8 \pm 1.90
8			

*: Verilen değerler, iki biyolojik tekrar örneklerinin ortalama \pm standart sapma değerleridir.

Çizelge 4.15 incelendiğinde, ticari mısır unu konsantrasyonu 0.083 g/mL olan örneklerin RNA verimi diğer konsantrasyonda hazırlanan örneklere göre daha yüksek çıkmıştır.

Çizelge 4.16. Modifiye CTAB ekstraksiyon yöntemi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan C1 örneklerinden ekstrakte edilen RNA'nın (A) DNaz uygulaması sonrasında elde edilen RNA kalite ölçümleri.

Örnek No.	Nükleik Asit Konsantrasyonu (ng/ μL)	Safılık (A260/A280)	Nükleik Asit Konsantrasyonu (ng/ μL)*	Safılık (A260/A280)*	RIN Değeri*
1	332.20	2.06	238.80	2.17	2.60
3	546.20	2.07	420.90	2.07	2.10
5	412.30	2.09	297.00	2.12	2.00

7 329.00 2.10 229.80 2.15 3.40

*: (A) DNaz uygulaması sonrasında elde edilen RNA kalite değerleri.

Çizelge 4.17. Modifiye CTAB ekstraksiyon yöntemi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan C1 örneklerinden ekstrakte edilen RNA'nın (B) DNaz uygulaması sonrasında elde edilen RNA kalite ölçümleri.

Örnek No.	Nükleik Asit Konsantrasyonu (ng/μl)	Safılık (A260/A280)	Nükleik Asit Konsantrasyonu (ng/μl)*	Safılık (A260/A280)*	RIN Değeri*
2	216.40	2.13	187.70	2.16	N/A
4	585.10	2.04	544.40	2.10	3.80
6	454.20	2.09	407.20	2.15	2.90
8	367.80	2.10	319.50	2.15	N/A

*: (B) DNaz uygulaması sonrasında elde edilen RNA kalite değerleri.

Çizelge 4.16 ve 4.17 ayrı ayrı incelendiğinde sırasıyla (A) DNaz ve (B) DNaz enzim uygulamaları, RNA safılık değerlerinde olumsuz bir etki yaratmamıştır. Bunun yanı sıra, enzimlerin yine RNA'nın bütünlüğünü etkili bir şekilde iyileştiremediği gözlemlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında, mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan bütün mısır unu örneklerinden ayrı ayrı ekstrakte edilen RNA'lar için RNA sekanslama (RNA-Seq) analizinin yapılması hedeflenmiştir. Ancak, mısır unu örneklerine uygulanan çeşitli RNA ekstraksiyon yöntemlerinin modifikasyonları ve optimizasyon çalışmaları sonrasında, RIN değerlerinin RNA-Seq analizleri için yeterli bir şekilde arttırılmadığı gözlemlenmiştir. RNA ekstraksiyonu için uygulanan metotlar arasında RIN açısından önemli bir fark olmadığı sonucuna varılmış, mısır unu gibi işlenmiş gıda ürünlerinde yüksek RIN değerleri elde edilememiştir. Transkriptomik çalışmalar kapsamında, tezin bundan sonraki aşamalarında elde edilen RIN değerlerini tolere edebilen yüksek hassasiyete sahip qPCR sisteminin kullanılması sonucuna varılmıştır. Çizelge 4.18'de farklı mısır unu örneklerine uygulanan RNA ekstraksiyon yöntemleri ayrıntılı olarak karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.18. RNA ekstraksiyon metotlarının karşılaştırılması.

Parametreler	RNA Extracol Metodu (Metot A)	Modifiye RNA Extracol Metodu (Metot B)	Modifiye SDS-LiCl Metodu (Metot C)	Modifiye CTAB Ekstraksiyon Metodu (Metot D)
1. Test edilen mısır materyalleri	C1, MF1, MF1T, MF2, MF2T, MF3, MF3T, MF4 ve MF4T	Mısır tohumu, C1, MF1 ve MF2	Mısır tohumu, MF1, MF2 ve MF2T	Mısır tohumu, C1 MF1, MF2 ve MF2T
2. Başlangıç materyal miktarı (g)	0.03	0.10	0.10	0.25
3. Başlangıç materyal konsantrasyonu (g/mL)	0.03	0.17	0.15	0.21
4. Ekstraksiyon tamponu	-	SDS	SDS	CTAB
5. Ekstraksiyon tamponunda yer alan kimyasalların sayısı	-	5	6	6
6. Ticari kit reaktiflerinin gerekliliği	RNA Extracol	RNA Extracol	-	-
7. Faz ayrımı	Tek Aşamalı Kloroform	İki Aşamalı Kloroform	F:K:İ (25:24:1) + Kloroform	İki aşamalı K:İ (24:1)
8. Soğutmalı santrifüj uygulaması (4 °C)	Evet	Evet	Evet	Evet
9. RNA çöktürme kimyasalı	İzopropanol	İzopropanol	LiCl + Sodyum Asetat	LiCl
10. Yıkama çözeltisi	%75 etanol	%75 etanol	%80 etanol	%70 etanol

11. RNA peleti çözme	60 µL RNaz içermeyen su	50 µL %0.1 (h/h) DEPC-su	50 µL %0.1 (h/h) DEPC-su	50 µL steril UP su
12. Ekstraksiyon süresi (saat) (tampon hazırlama süresi hariç)	4	6.5	22 (~ 15 saat overnight inkübasyon)	20 (~ 15 saat overnight inkübasyon)
13. -80°C depolama gerekliliği	Hayır (-20 °C)	Hayır (-20 °C)	Evet	Evet

Hem uygulama kolaylığı ve kısa ekstraksiyon süresine sahip olması hem de yöntem sonunda elde edilen RNA kalite sonuçlarının cDNA ve qPCR analizlerini gerçekleştirmek için uygun olması nedeniyle ileriki analizler için RNA ekstraksiyon yöntemi olarak RNA Extracol (Metot A) yöntemi seçilmiştir.

4.2.3. Seçilen RNA Ekstraksiyon Yönteminin Doğrulanması

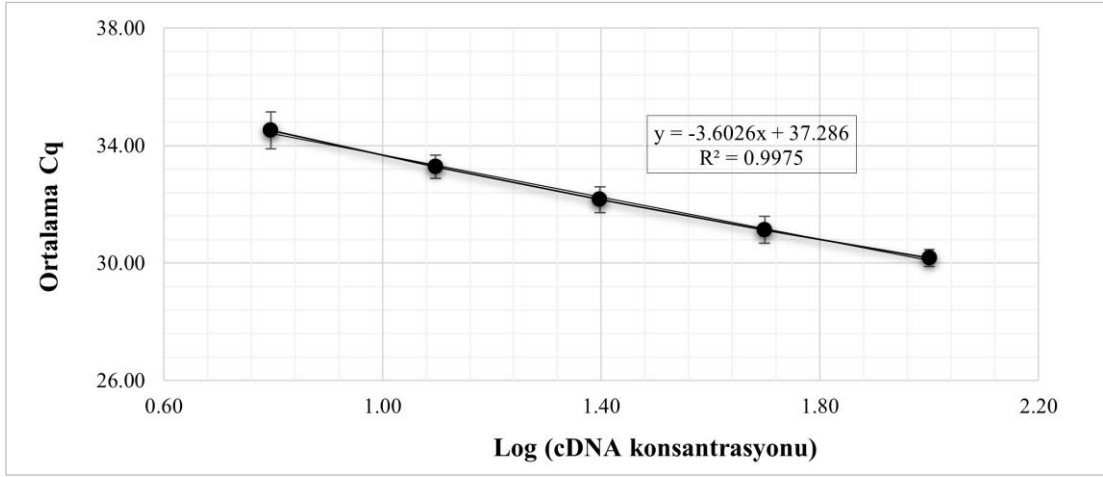
Yüksek kalitede RNA elde etmek, genellikle RT-qPCR dahil olmak üzere çeşitli moleküler yöntemlerin gerçekleştirilmesinde ilk ve önemli aşamadır. RNA ekstraksiyonu moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılan bir teknik olmasına rağmen, ekstraksiyon sırasında RNA'nın degradasyonuna neden olabilen oldukça stabil RNaz enzimlerinin varlığı nedeniyle zor olabilir [240]. Organik çözücüler ve diğer ilgili maddeler, RNazları etkisiz hale getirmek ve sağlam RNA'nın korunmasını sağlamak için tipik olarak RNA ekstraksiyon yöntemlerinde kullanılır. Bu amaçla fenol ve kloroform kombinasyonu, özellikle sınırlı miktarda hücre veya dokuyla uğraşıldığında RNA ekstraksiyonu için yaygın olarak tercih edilir [241]. Fenol bazlı bir reaktif olan RNA Extracol, RNaz enzimlerini etkili bir şekilde inhibe etme konusunda dikkate değer bir yetenek sergilemektedir. Bu özellik, lizis işlemi sırasında RNA'nın bütünlüğünü koruyarak yüksek kaliteli materyalin ekstraksiyonunu sağlamaktadır [206]. RNA Extracol kullanılarak mikrodalga uygulanmayan ve GM olmayan ticari mısır örneğinden (C1) elde edilen RNA ekstraktlarının miktar ve kalite değerleri Çizelge 4.19'da verilmiştir. Kaliteli RNA'nın A260/280 absorbans değerinin 1.8-2.1 aralığında olması önerilir; bu aralıktaki RNA'lar PCR ve qPCR dahil olmak üzere akış aşağı uygulamalar için uygundur [242]. Varyasyon katsayısının 10'un altında olması iyi olarak kabul edilirken, 30'un üzerinde

olması kabul edilmemektedir [225]. Genel ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısını içeren verim değerleri sırasıyla 283.94 µg, 70.10 µg ve %24.69 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.19. İki farklı günde beş tekrarlı çalışılarak C1 örneğinden ekstrakte edilen RNA'ların miktar ve kalite değerleri.

Örnek No	RNA Miktarı (ng/µL)	RNA Kalitesi (A260/280)
1	291.50	2.07
2	312.00	2.18
3	310.00	1.94
4	378.90	2.14
5	182.40	2.12
1	300.40	1.77
2	227.70	2.06
3	369.60	2.01
4	294.70	1.97
5	172.20	1.93

Çizelge 4.19'daki RNA miktar ve kalite değerleri ile hesaplanan varyasyon katsayısı değerleri qPCR analizleri için uygun bulunmuştur. Bir sonraki adımda, konsantrasyonu 300.40 ng/µL ve saflığı 1.77 olan bir RNA örneği seçilmiştir. Seçilen bu RNA ekstraktına cDNA protokolü uygulanmış ve cDNA miktar ve kalite değerleri sırasıyla 1151.10 ng/µL ve 1.71 olarak bulunmuştur. Bu cDNA örneği ile 100 ng/µL konsantrasyon değerinden başlayarak 5 noktalı dilüsyon serisi (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16) hazırlanmıştır. İnhibisyon kontrolü için, qPCR sisteminde ilgili *ZmADHI* primerleri ile amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Her seyreltme faktörünün ölçülen Cq değerleri EK 3'te verilmiştir. İnhibisyon eğrisi (Şekil 4.3), *ZmADHI* gen amplifikasyonu ile elde edilen 5 seyreltme Cq değeri kullanılarak çizilmiştir.



Şekil 4.3. *ZmADH1* amplifikasyonundan sonra oluşturulan inhibisyon eğrisi.

R^2 değeri ≥ 0.98 ve eğrinin eğimi ise -3.1 ile -3.6 arasında olmalıdır, bu da %110 ile %90 amplifikasyon verimliliğine karşılık gelir [205]. Elde edilen doğrusallık grafiğinin (Şekil 4.3) eğimi -3.6026, R^2 değeri 0.9975 olarak bulunmuştur. Hesaplanan amplifikasyon verimi ise %89.486'dır. Bu veriler, Avrupa GMO Laboratuvarları Ağı (ENGL)'nın [205] minimum performans gereksinimleri tanımına göre ölçüm güvenilirliğini doğrulamaktadır. Bu sonuçlara dayanarak, RNA ekstraksiyonu ve cDNA sentezi yöntemlerinin, ileri RT-qPCR analizlerinin yapılmasını destekleyen yüksek verim ve saflıkta nükleik asitler sağladığı sonucuna varılmıştır. Benzer şekilde, son çalışmalar RNA Extracol reaktifi kullanarak mısır tohumları, koleoptiller ve köklerin yanı sıra hasat edilmiş yerel buğday yapraklarından da RNA ekstrakte edilebileceğini göstermiştir. Bu çalışmalar, ekstrakte edilen RNA'nın sonraki RT-qPCR analizleri için uygun kalitede olduğunu bildirmiştir [243, 244].

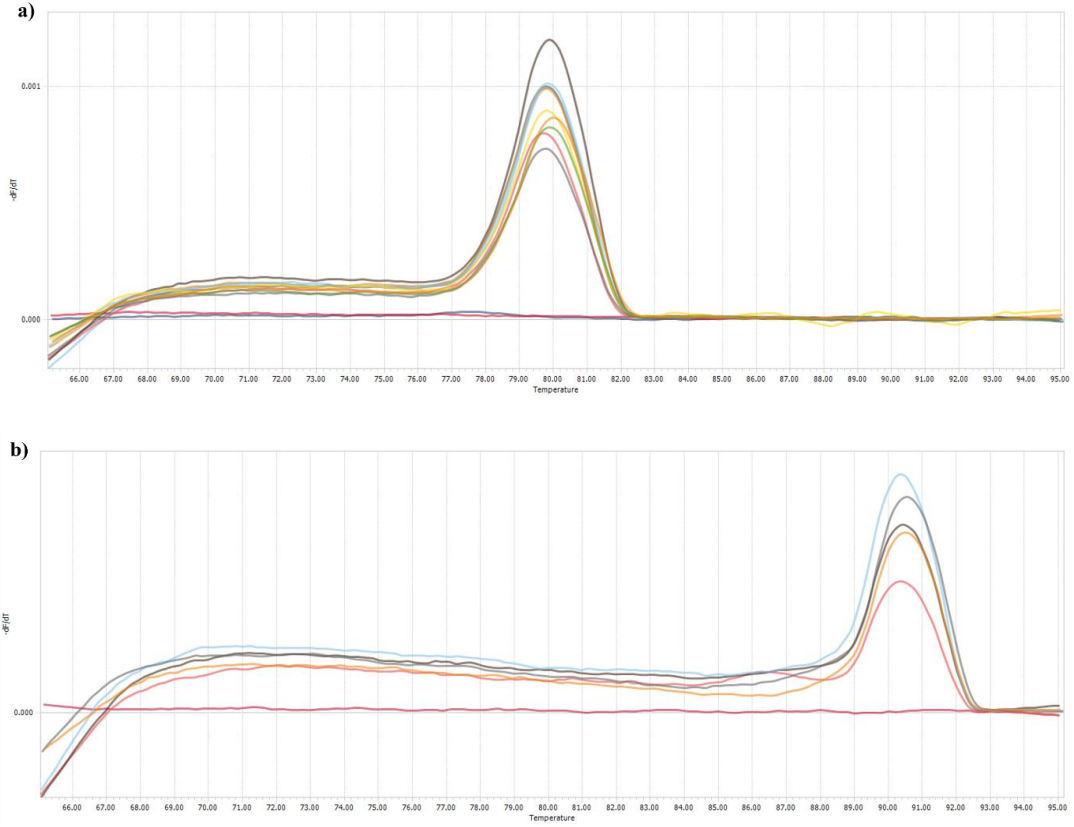
4.2.4. İki Mısır Geninin Tespiti ve Miktarının Belirlenmesi için RT-qPCR Analizlerinin Doğrulanması

Mısır örneklerinde iki genin (*ZmAGO1a* ve *ZmRLK9*) tespiti ve miktarının belirlenmesi için EvaGreen bazlı RT-qPCR analizleri geliştirilmiştir. C1 örneğinin RNA ekstraktından sentezlenen cDNA, reaksiyon karışımlarındaki son konsantrasyon değerleri sırasıyla 100 ng/ μ L, 75 ng/ μ L, 50 ng/ μ L, 25 ng/ μ L ve 12.5 ng/ μ L olacak şekilde 5 farklı noktaya seyreltilmiştir. Hazırlanan şablonlar daha sonra ilgili primerlerle (Çizelge 3.6) çoğaltılmıştır. RT-qPCR analizlerinden sonra iki farklı gen bölgesi için standart eğriler oluşturulmuştur (EK 4). *ZmAGO1a* ve *ZmRLK9* için standart eğri formülleri ve bunların R^2 değerleri (regresyonun doğrusallığını ifade eder) Çizelge 4.20'de verilmiştir.

Çizelge 4.20. RT-qPCR testlerinin doğrusallığı, amplifikasyon verimliliği ve özgüllüğü.

Hedef Gen	Standart Eğri Formülü	R ²	Verim (%)	Erime Sıcaklığı (°C)
<i>ZmAGO1a</i>	$y = -3.4989x + 36.534$	0.979	93.11	80.00
<i>ZmRLK9</i>	$y = -3.2351x + 40.630$	0.978	103.76	90.50

Belirli bir seyreltilmiş cDNA örneği serisinde, belirleme katsayısı (R²), deneysel olarak belirlenen C_q değerleri ile seyreltme serisi arasındaki korelasyonun derecesini gösterir. Yüksek kaliteli analizler ve doğru sonuçlar sağlamak için R² değeri ≥ 0.98 olmalıdır [245]. Bu çalışmada standart eğrilerden elde edilen R² değerleri bu gerekli değeri karşılamıştır. Elde edilen doğrusallık grafiklerinin eğimleri sırasıyla *ZmAGO1a* için -3.4989 ve *ZmRLK9* için -3.2351 olarak bulunmuştur. Bu hedef genler için hesaplanan amplifikasyon verim değerleri ise %93.11 ve %103.76'dır (Çizelge 4.20). Elde edilen veriler minimum performans kriterlerine [205] göre uygun aralıktadır. Ek olarak MIQE yönergeleri, sağlam ve hassas qPCR analizlerinin genellikle yüksek PCR verimliliği ile ilişkili olduğunu belirtir. Kalibrasyon eğrileri yoluyla PCR amplifikasyon veriminin belirlenmesi, ortalama PCR verimi, analitik hassasiyet ve testin sağlamlığının basit, hızlı ve tekrarlanabilir bir göstergesini sağlamaktadır [246]. Primerlerin kullanıldığı amplifikasyon işleminin özgüllüğü, 40 döngüden sonra erime eğrisi analiziyle doğrulanmıştır. Sonuçlar, her bir ileri ve geri primer çiftinin, farklı bir erime sıcaklığına sahip tek bir ampikon ürettiğini (Çizelge 4.20, Şekil 4.4) ve reaksiyonlar sırasında hiçbir primer dimer veya istenmeyen yan ürünün oluşmadığını göstermiştir.



Şekil 4.4. Erime eğrisi analizi. a) *ZmAGO1a* geninden, b) *ZmRLK9* geninden elde edilen amplikonlar. Gözlemlenen tek tepe noktaları tipik olarak saf, tek amplikonları temsil etmektedir. Spesifik sinyallerin erime sıcaklıkları sırasıyla 80 °C ve 90.5 °C'dir.

Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO), ISO 20395:2019 çerçevesinde [247], qPCR/RT-qPCR gibi moleküler tekniklerle ilgili deney tasarımı, yöntem geliştirme, analiz doğrulama ve kabul kriterlerine ilişkin öneriler sunan çok sayıda biyoanalitik kılavuz belge bulunmaktadır [248-252]. Bu çalışmada RT-qPCR testlerine yönelik doğrulama parametreleri, kılavuz dokümanda [217] belirtilen formüller ("Metot" bölümünde verilen Denklemler 5-8) kullanılarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.21'de gösterildiği gibi hesaplanan tekrar üretilebilirlik değerleri, laboratuvarındaki RT-qPCR testlerinin yüksek kesinliğini göstermektedir. Her iki test için bağıl tekrar üretilebilirlik standart sapması (RSD_R), ENGL kabul kriterine [205] göre uygun bulunmuştur. Aynı şekilde Yılmaz ve arkadaşları [253], buğday bazlı kompozit ekmeklerdeki taşıyıcı tespit etmek ve ölçmek için RSD_R değerlerini hesaplamış ve bu değerlerin genel kabul kriterlerini karşıladığını bildirmiştir.

Çizelge 4.21. RT-qPCR analizleri için doğrulama parametreleri.

Hedef Gen	S _R	RSD _R (%)	LOD (ng/μL)*	LOQ (ng/μL)*
<i>ZmAGO1a</i>	3.56	8.78	10.80	24.31
<i>ZmRLK9</i>	17.39	35.83	25.22	56.74

*: Tüm değerler cDNA konsantrasyonu (ng/μL) cinsinden ifade edilmiştir.

LOD ve LOQ değerleri deneysel prosedürlerin hassasiyet eşiklerine ilişkin önemli bilgiler sağlar [254, 255]. Çalışmamızda bu değerler mutlak standart belirsizliğin (u_0) katları olarak hesaplanmıştır. U_0 değerlerini belirlemek için ortalama cDNA konsantrasyonunun (ng/μL) S_R 'ye karşı grafikleri oluşturulmuştur (EK 5). *ZmAGO1a* ile ilgili doğru denkleminin kesişim değeri negatif bulunmuştur. Kılavuza göre [217], eğer bu değer negatifse, en düşük konsantrasyonla ilişkili S_R , u_0 'nun tahmini olarak kullanılabilir ($S_R = 2.70$). *ZmRLK9* durumunda ise doğru denklemdeki kesişim değeri pozitif (6.30) ve bu değer u_0 'yu tahmin etmek için kullanılmıştır. LOD değerlerinin *ZmAGO1a* için 10.80 ng/μL ve *ZmRLK9* için 25.22 ng/μL olduğu gözlemlenmiştir; bu değerler testlerin hedeflenen genleri güvenilir bir şekilde tespit ettiği minimum konsantrasyonları göstermektedir. Ek olarak LOQ değerleri, *ZmAGO1a* için 24.31 ng/μL ve *ZmRLK9* için 56.74 ng/μL olarak belirlenmiştir; bu değerler ise, hedeflenen genlerin belirli koşullar altında doğru bir şekilde ölçülebileceği minimum konsantrasyonları temsil etmektedir.

4.2.5. İki Mısır Geninin Mutlak Gen Ekspresyon Profili

RT-qPCR, çeşitli organizmalarda ve dokularda, ayrıca farklı koşullar altında gen ekspresyonunun incelenmesi için yaygın bir kullanım alanı kazanmıştır. Bu yöntem, nükleik asitlerin hassas ölçümüne ve analizine olanak tanıyarak duyarlılık, özgüllük, yüksek verim yetenekleri ve tutarlı sonuçlar sunmaktadır [246, 256, 257]. RNA'nın ekstraksiyonu ve analizi, mRNA seviyelerinin mevcut durumu hakkında değerli bilgiler sunar ve RNA hazırlama süreci, anlamlı bir RT-qPCR deneyi sağlamak için önemlidir. DNA kontaminasyonundan tamamen arınmış, daha yüksek kalitede RNA kullanılması çok önemlidir [258]. Çalışmamızda kullanılan RNA Extracol yöntemi, bileşenlerin ayrılmasına yardımcı olan fenol-kloroform etkileşimini içermektedir. Çözeltinin düşük pH'sı, DNA'nın fosfat grupları üzerindeki yükü nötralize ederek bu ayırmada rol oynamaktadır [259]. Bu, DNA moleküllerinin çözeltinin organik fazında tutulmasına,

RNA'nın ise sulu fazda kalmasına yardımcı olur. Yöntem, RNA ve DNA'nın etkili bir şekilde ayrılmasını mümkün kılmıştır.

A260/A280 oranınının 2.0'a yakın olması genellikle yüksek kaliteli RNA'nın göstergesi olarak kabul edilir. Ayrıca laboratuvarlar, optimal RT-qPCR deneyleri için A260/280 oranı 1.5 olan örnekleri başarıyla kullanmıştır [260]. Mikrodalga uygulanmayan ve uygulanan mısır örneklerinden ekstrakte edilen RNA'ların miktar ve kalite (A260/280) değerleri Çizelge 4.22'de verilmiştir. RNA kalite verilerininin ortalama değerleri yaklaşık 1.7-1.8 aralığında elde edilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.23'te sunulan veriler, ters transkripsiyonla üretilen cDNA'ların hem miktar hem de kalite açısından yeterli seviyelerde olduğunu doğrulamaktadır. Deneysel üretkenlikteki varyasyon düzeyini ölçmek için varyasyon katsayısı metriği kullanılmıştır. %10'un altındaki bir değer mükemmel olarak kabul edilirken, sırasıyla %10-20, %20-30 ve %30'un üzerindeki değerler iyi, kabul edilebilir ve kabul edilemez olarak nitelendirilmektedir [261]. RNA ve cDNA için varyasyon katsayısı değerleri %30'un altında bulunmuştur. Bulgular, hem mikrodalga uygulanmayan hem de mikrodalgaya tabi tutulan tüm mısır örneklerinin, RT-qPCR analizleri için yeterli miktar ve kalitede RNA ve cDNA sağladığını göstermiştir.

Çizelge 4.22. Mısır örnekleri için RNA miktar ve kalite verilerinin değerlendirilmesi.

Örnek Adı	Örnek Kodu	RNA Miktarı (ng/µL)	Ortalama Miktar Değeri (ng/µL)**	Varyasyon Katsayısı (%)	RNA Kalitesi (A260/280)	Ortalama Kalite Değeri**
Mikrodalga uygulanmayan ticari mısır unu	C1	116.60	114.85 ± 2.47	2.15	1.72	1.74 ± 0.02
	(%0 GM)	113.10			1.75	
Mikrodalga uygulanmayan mısır unu1	MF1	151.60	129.80 ± 30.83	23.75	1.79	1.78 ± 0.02
	(%<0.1 GM MIR604)	108.00			1.76	
Mikrodalga uygulanan mısır unu1	MF1T*	119.90	127.70 ± 11.03	8.64	1.78	1.81 ± 0.04
	(%<0.1 GM MIR604)	135.50			1.83	
Mikrodalga uygulanmayan mısır unu2	MF2	94.50	91.20 ± 4.67	5.12	1.79	1.77 ± 0.04
	(%75 GM MIR604)	87.90			1.74	
Mikrodalga uygulanan mısır unu2	MF2T*	86.30	101.35 ± 21.28	21.00	1.71	1.73 ± 0.02
	(%75 GM MIR604)	116.40			1.74	
Mikrodalga uygulanmayan mısır unu3	MF3	235.30	214.70 ± 29.13	13.57	1.69	1.69 ± 0.01
	(%<0.02 GM MON810)	194.10			1.68	
Mikrodalga uygulanan mısır unu3	MF3T*	257.20	255.75 ± 2.05	0.80	1.71	1.71 ± 0.00
	(%<0.02 GM MON810)	254.30			1.71	
Mikrodalga uygulanmayan mısır unu4	MF4	196.90	164.45 ± 45.89	27.91	1.70	1.70 ± 0.00
	(%5 GM MON810)	132.00			1.70	
Mikrodalga uygulanan mısır unu4	MF4T*	137.40	161.25 ± 33.73	20.92	1.69	1.69 ± 0.00
	(%5 GM MON810)	185.10			1.69	

*: Mikrodalga işlemi (600 W, 2 dk)

** : Değerler n=2 ile ortalama ± standart sapmayı temsil eder.

Çizelge 4.23. Mısır RNA örneklerinden sentezlenen cDNA'ların nanospektrofotometrik analizleri.

Örnek Adı	Örnek Kodu	cDNA Miktarı (ng/µL)	Ortalama Miktar Değeri (ng/µL)**	Varyasyon Katsayısı (%)	cDNA Kalitesi (A260/280)	Ortalama Kalite Değeri**
Mikrodalga uygulanmayan ticari mısır unu	C1	1272.40	1236.50 ± 50.77	4.11	1.78	1.79 ± 0.01
	(%0 GM)	1200.60			1.79	
Mikrodalga uygulanmayan mısır unu1	MF1	1224.40	925.15 ± 254.77	27.54	1.74	1.73 ± 0.02
	(%<0.1 GM MIR604)	834.70			1.71	
Mikrodalga uygulanan mısır unu1	MF1T*	873.00	807.65 ± 183.21	22.68	1.72	1.71 ± 0.02
	(%<0.1 GM MIR604)	957.40			1.69	
Mikrodalga uygulanmayan mısır unu2	MF2	937.20	915.20 ± 59.68	6.52	1.72	1.72 ± 0.01
	(%75 GM MIR604)	678.10			1.71	
Mikrodalga uygulanan mısır unu2	MF2T*	745.00	1029.55 ± 275.56	26.77	1.73	1.73 ± 0.01
	(%75 GM MIR604)	1105.30			1.72	
Mikrodalga uygulanmayan mısır unu3	MF3	775.30	762.70 ± 17.82	2.34	1.64	1.65 ± 0.01
	(%<0.02 GM MON810)	750.10			1.65	
Mikrodalga uygulanan mısır unu3	MF3T*	849.80	780.70 ± 97.72	12.52	1.65	1.65 ± 0.01
	(%<0.02 GM MON810)	711.60			1.64	
Mikrodalga uygulanmayan mısır unu4	MF4	777.90	800.65 ± 32.17	4.02	1.66	1.68 ± 0.02
	(%5 GM MON810)	823.40			1.69	
Mikrodalga uygulanan mısır unu4	MF4T*	732.70	749.40 ± 23.62	3.15	1.65	1.66 ± 0.01
	(%5 GM MON810)	766.10			1.67	

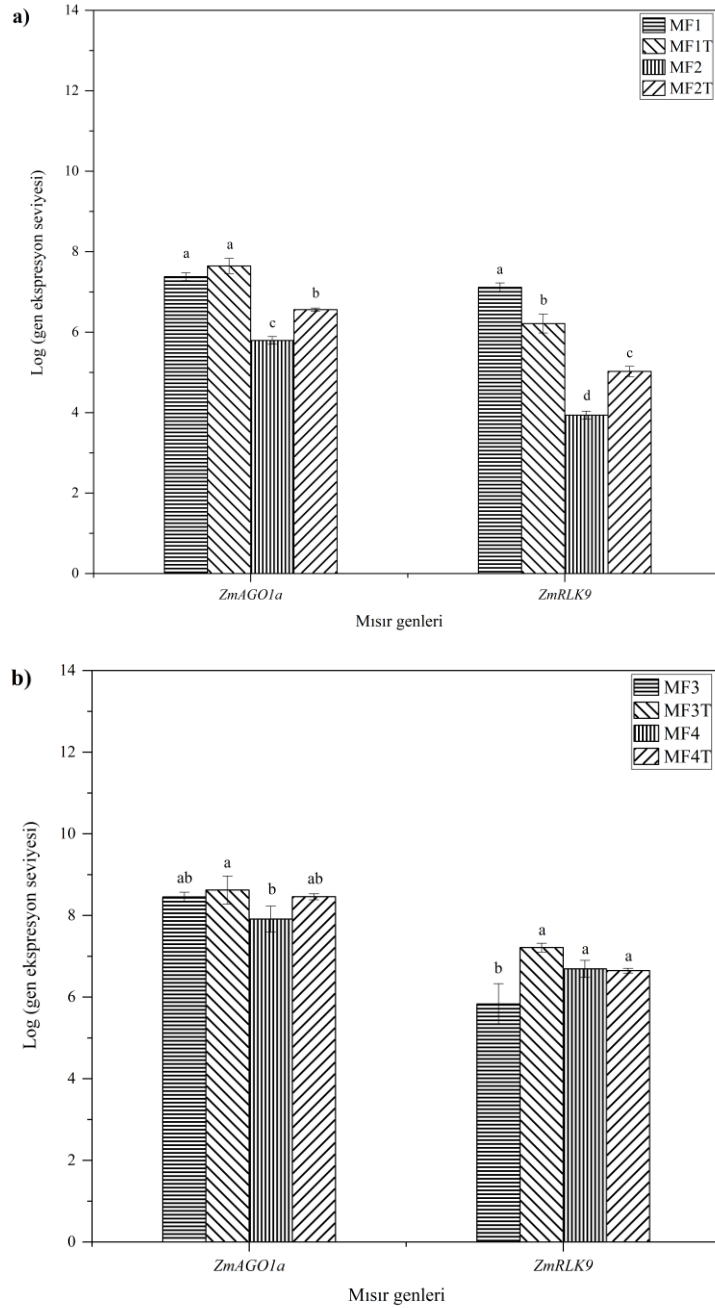
*: Mikrodalga işlemi (600 W, 2 dk)

** : Değerler n=2 ile ortalama ± standart sapmayı temsil eder.

Standart eğriler elde edildikten sonra, *ZmAGO1a* ve *ZmRLK9* gen bölgeleri için hesaplanan LOD ve LOQ değerlerinden (Çizelge 4.21) daha yüksek olan 75 ng/μL'lik bir cDNA konsantrasyon noktası seçilmiştir. Daha sonra, tüm mikrodalga uygulanmayan ve uygulanan mısır cDNA şablonları, reaksiyon karışımında 75 ng/μL son konsantrasyon değerine sahip olacak şekilde hazırlanmış ve karşılık gelen iki primer seti kullanılarak amplifiye edilmiştir. Her örnek üç tekrarlı hazırlanmıştır. Başarılı bir RT-qPCR deneyinin gerçekleştirilmesi için iyi tasarlanmış bir örnekleme protokolü çok önemlidir [262]. Önceki araştırmalar, optimal koşullar altında tüm reaksiyonların tek bir plaka üzerinde yürütülmesinin tercih edildiğini ileri sürmektedir [263-264]. Çalışmamızda *ZmAGO1a* ve *ZmRLK9* mısır genlerine yönelik programlar tek bir plaka üzerinde yürütülerek bu yaklaşım izlenmiştir. Ek olarak RT-qPCR ölçümleri için uygun plakaların seçimi bulguların güvenilirliğini büyük ölçüde etkilemektedir [35]. Önerdikleri gibi, zayıf eksprese edilen genlerin tespitini geliştirmek ve sinyal yoğunluğunu arttırmak için çalışmamızda şeffaf plakalar yerine beyaz plakalar kullanılmıştır. RT-qPCR analizleri sırasında mikrodalga uygulanmayan ve uygulanan mısır cDNA örneklerinde, DNA bağlayıcı bir boya olan EvaGreen kullanılmıştır. EvaGreen kimyasını kullanarak RT-qPCR tekniklerimiz iyi amplifikasyon seviyeleri vermiştir (EK 6) ve bu boya, mutlak kantitatif gerçek zamanlı PCR için önceden mevcut protokollere sahip diğer bitki dokusu materyallerine rahatlıkla uyarlanabilir. Bu boya, hedefe özel floresan problara olan gereksinimi ortadan kaldırmış ve ilgilenilen birden fazla gen için aynı PCR ana karışımını kullanma avantajını sunmuştur. Ayrıca, onu qPCR'de SYBR Green I'in yerine tercih edilen bir alternatif haline getiren çok sayıda özelliğe sahiptir. EvaGreen dikkat çekici bir şekilde minimum PCR inhibisyonu, boya olarak olağanüstü stabilite ve yaygın olarak kullanılan tüm gerçek zamanlı PCR döngüleyicilerle uyumluluk sergilemektedir [216].

RT-qPCR deneyleri yapıldıktan sonra, mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örneklerinde bulunan *ZmAGO1a* ve *ZmRLK9* genleri için mutlak gen ekspresyon analizleri (Denklem 9) gerçekleştirilmiştir. Örneklerle ait hesaplanan RNA seviyeleri EK 7'de sunulmuştur. Şekil 4.5a'daki log₂ ile dönüştürülmüş sonuçlar, *ZmAGO1a* geninin en düşük ekspresyon seviyesinin mikrodalga uygulanmayan MF2 örneğinde olduğunu göstermiştir. Mikrodalga uygulanmayan MF1 örneğinin ekspresyon seviyesi ile mikrodalga uygulanan formu (MF1T) arasında %95 güven düzeyinde anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. MF2 örneğindeki *ZmAGO1a* geninin ekspresyon seviyesi,

mikrodalga işleminden sonra bir log2 kat (1.13) kadar hafifçe artmıştır. *ZmRLK9* gen ekspresyonu için, en düşük ekspresyon seviyesi mikrodalga uygulanmayan MF2 örneğinde gözlemlenmiştir. Mikrodalga uygulanan örneğin (MF1T) ekspresyon seviyesinde, mikrodalga uygulanmayan MF1'e kıyasla hafif bir azalma (~0.87 kat) meydana gelmiştir. MF2 örneğindeki *ZmRLK9* geninin ekspresyon seviyesi, mikrodalga işleminden sonra yaklaşık bir nokta üç (1.28) log2 kat kadar hafifçe artmıştır.



Şekil 4.5. Mikrodalga uygulanmayan ve uygulanan örneklerde iki mısır geninin mutlak gen ekspresyon profilleri. a) MF1, MF1T, MF2 ve MF2T ve b) MF3, MF3T,

MF4 ve MF4T örneklerinin sütun grafikleri. Grafiklerin x eksenini mısır genlerini, y eksenini ise log₂ ile dönüştürülmüş gen ekspresyon değerlerini temsil etmektedir. Sütunlardaki çubuklar n=3 ile ortalama ± standart sapmayı ve farklı küçük harfler ise ortalama değerler arasındaki anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p < 0.05$).

Şekil 4.5b'de de gösterildiği gibi, *ZmAGO1a* geninin ekspresyon seviyesi mikrodalga uygulanmayan MF4 örneğinde en düşük bulunmuştur. Mikrodalga uygulanmayan MF3 örneği ile bunun mikrodalga uygulanan formu (MF3T) arasında, aynı zamanda MF4 ve MF4T örnekleri arasında da *ZmAGO1a* gen ekspresyon seviyeleri için istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. *ZmRLK9* gen ekspresyonu için, en düşük ekspresyon seviyesi mikrodalga uygulanmayan MF3 örneğinde bulunmuştur ve bu genin MF3 örneğindeki ekspresyon seviyesi, mikrodalga işleminden sonra yaklaşık bir nokta iki (1.24) log₂ kat kadar hafifçe artmıştır. MF4 örneği ile bunun mikrodalga uygulanan formu (MF4T) arasında ekspresyon seviyeleri için anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Bu tez çalışmasında, EvaGreen bazlı RT-qPCR analizleri gerçekleştirilerek hem mikrodalga uygulanmayan hem de mikrodalga uygulanan mısır örneklerinde hedeflenen iki farklı genin (*ZmAGO1a* ve *ZmRLK9*) mutlak gen ekspresyon seviyeleri başarıyla belirlenmiştir. qPCR'da mısır referans geni kullanılarak gerçekleştirilen inhibisyon kontrol testi, bu çalışmada kullanılan RNA ekstraksiyonu ve cDNA sentezi prosedürlerinin güvenilir ve doğru ölçümler sağladığını göstermiştir. *ZmAGO1a* ve *ZmRLK9* için oluşturulan standart eğrilere yönelik belirleme katsayılarının (R^2) ≥ 0.98 olduğu gözlemlenmiştir; bu, cDNA örneklerinin konsantrasyon değerleri ile ölçülen C_q değerleri arasındaki korelasyonun uygun olduğunu doğrulamıştır. Hesaplanan amplifikasyon verimleri uygun aralıkta çıkmış ve erime eğrisi analizi ise spesifik amplikonlar vermiştir.

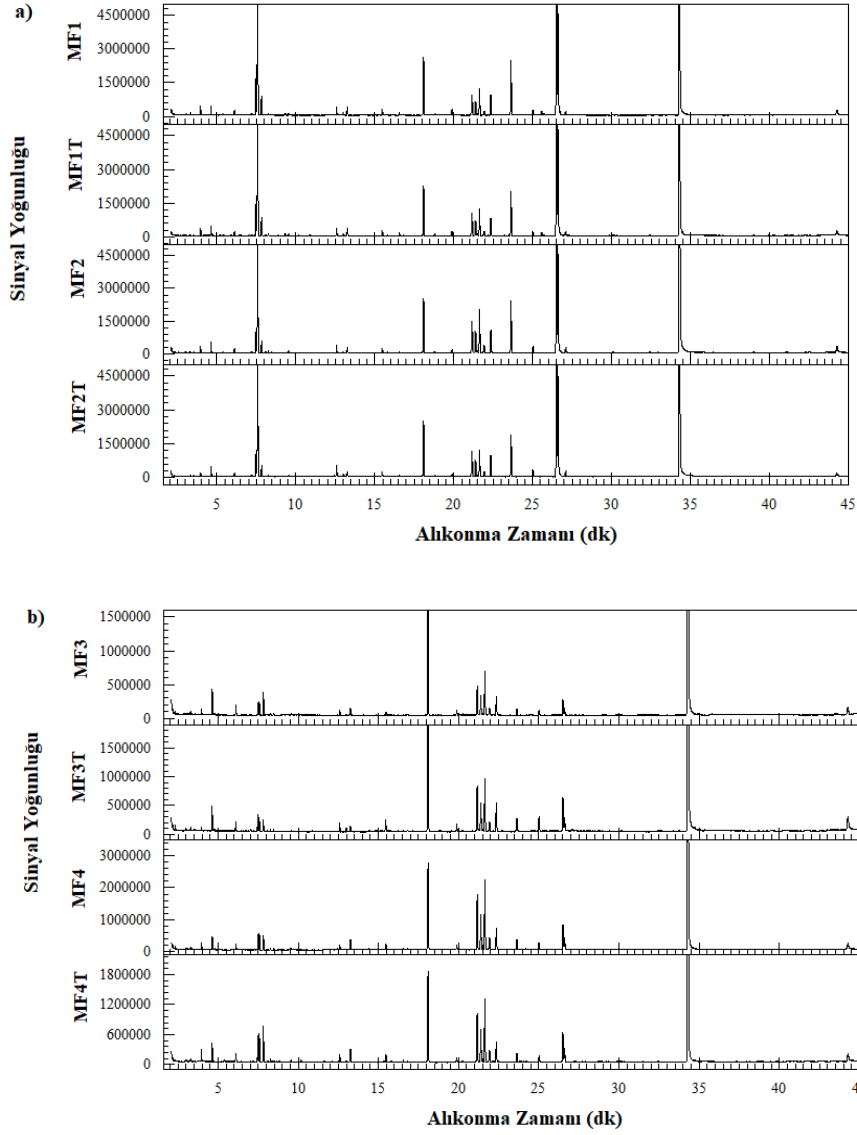
Tekrarlar arasındaki standart sapmalardaki minimum değişkenlik ve belirlenen tespit ve ölçüm limitleri, yöntemlerin tutarlı bir şekilde güvenilir sonuçlar üretme yeteneğini ve uygulanan deney koşulları altında analitleri hassasiyetle tespit etme ve ölçme kapasitelerini vurgulamıştır. Bulgular, geliştirilen ve doğrulanan RT-qPCR analizlerinin,

mikrodalga uygulanan mısır örneklerinde iki farklı genin (*ZmAGO1a* ve *ZmRLK9*) hem tespit edilmesi hem de mutlak niceliğinin belirlenmesi için uygun olduğunu göstermiştir.

4.3. Metabolomik Analiz Sonuçları

4.3.1. GC-MS Analizi ile Tanımlanan Birincil Metabolitler

GC-MS analizi ile hem mikrodalga uygulanmayan hem de mikrodalga uygulanan mısır unu örneklerinde toplam 35 birincil metabolitin varlığı tespit edilmiştir (EK 8). Metabolitlerin toplam iyon akımı (TIC) kromatogram görüntüleri MF1, MF1T, MF2, MF2T örnekleri için Şekil 4.6a'da ve ayrıca MF3, MF3T, MF4, MF4T örnekleri için ise Şekil 4.6b'de sunulmuştur.



Şekil 4.6. Mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örnekleri için 2.00 - 45.00 dk arasında elde edilen birincil metabolitlerin GC-MS toplam iyon akımı (TIC) kromatogram görüntüleri. a) MF1, MF1T, MF2 ve MF2T örneklerine ait kromatogramlar; b) MF3, MF3T, MF4 ve MF4T örneklerine ait kromatogramlar.

Kromatogramlar, 2 ile 45 dakikalık GC-MS analizi süresince birincil metabolitlere ait pikleri göstermektedir. Her bir türevlendirilmiş örnek ekstraktı için kromatogramlardaki pik sayıları aynı bulunmuş, ekstra bir pik gözlemlenmemiştir. Birincil metabolitler esas olarak trimetilsilil (TMS) türevleri formunda elde edilmiş ve altı gruba ayrılmıştır: yağ asitleri (4), amino asitler (11), şekerler (9), alkoller (3), organik asitler (5) ve bir başka

grup olarak isimlendirilen “diğerleri” (3). Mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örnekleri için belirlenen altı farklı gruptaki birincil metabolit miktarlarına ait veriler, MF1, MF1T, MF2, MF2T örnekleri için Çizelge 4.24'te, ayrıca MF3, MF3T, MF4, MF4T örnekleri için ise Çizelge 4.25'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.24 ve Çizelge 4.25' te ayrı ayrı gösterildiği gibi örneklerdeki ana yağ asidi bileşikleri, doymamış yağ asidi (UFA) bileşikleri olarak linoleik (9,12-Oktadekadienoik asit) ve oleik (9-Oktadesenoik asit) asitlerdir. Bu iki yağ asidine ait örnek kütle spektrum görüntüleri sırasıyla Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verilmiştir. Ayrıca tüm örneklerde doymuş yağ asidi (SFA) olarak palmitik ve stearik asitler tespit edilmiştir. Benzer şekilde, öğütülen mısır tohumlarındaki ana yağ asidi bileşiklerinin linoleik, oleik ve palmitik asitler olduğu gözlemlenmiştir [265-267]. Tukey testine göre ($p < 0.05$), hem MF1 ve MF2 hem de MF3 ve MF4 örneklerinde mikrodalga uygulamasından sonra yağ asitleri için önemli bir fark elde edilmemiştir. Ancak, MF3 örneğinde stearik asit miktarında hafif bir artış gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.24. Mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örneklerinden elde edilen birincil metabolitlerin metabolit miktarları (mg/kg) (Normalleştirilmiş veriler EK 9-A'da gösterilmiştir).

#	Birincil Metabolit Adı	RT (dk)	Metabolit Miktarı (mg/kg)*			
			MF1 (% < 0.1 GM MIR604)	MF1T** (% < 0.1 GM MIR604)	MF2 (% 75 GM MIR604)	MF2T** (% 75 GM MIR604)
Yağ asitleri ve türevleri						
1	Palmitic Acid, TMS derivative	23.630	0.854 ± 0.058 ^a	0.670 ± 0.274 ^a	1.039 ± 0.138 ^a	0.842 ± 0.062 ^a
2	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, TMS derivative	26.503	3.236 ± 0.101 ^a	2.557 ± 1.560 ^a	3.919 ± 0.500 ^a	3.664 ± 0.018 ^a
3	9-Octadecenoic acid, (E)-, TMS derivative	26.610	1.795 ± 0.058 ^a	1.378 ± 0.784 ^a	2.081 ± 0.182 ^a	1.961 ± 0.019 ^a
4	Stearic acid, TMS derivative	27.084	0.086 ± 0.001 ^{ab}	0.066 ± 0.033 ^b	0.118 ± 0.015 ^{ab}	0.191 ± 0.076 ^a
Toplam			5.971	4.671	7.157	6.658
Amino asitler ve türevleri						
5	L-Alanine, 2TMS derivative	3.971	0.122 ± 0.033 ^a	0.131 ± 0.037 ^a	0.090 ± 0.013 ^{ab}	0.053 ± 0.007 ^b
6	L-Norleucine, 2TMS derivative	7.379	0.011 ± 0.004 ^a	0.011 ± 0.001 ^a	0.006 ± 0.002 ^{ab}	0.004 ± 0.000 ^b
7	L-Proline, 2TMS derivative	7.827	0.284 ± 0.034 ^a	0.347 ± 0.071 ^a	0.154 ± 0.010 ^b	0.144 ± 0.012 ^b
8	Glycine, 3TMS derivative	8.081	0.016 ± 0.003 ^a	0.017 ± 0.004 ^a	0.027 ± 0.012 ^a	0.012 ± 0.001 ^a
9	L-Serine, 3TMS derivative	9.551	0.036 ± 0.006 ^{ab}	0.042 ± 0.008 ^a	0.036 ± 0.012 ^{ab}	0.018 ± 0.001 ^b
10	L-Threonine, 3TMS derivative	10.185	0.016 ± 0.003 ^a	0.020 ± 0.007 ^a	0.012 ± 0.003 ^a	0.010 ± 0.000 ^a
11	β-Alanine, 3TMS derivative	10.894	0.013 ± 0.000 ^{ab}	0.016 ± 0.006 ^a	0.008 ± 0.001 ^b	0.007 ± 0.000 ^b
12	L-5-Oxoproline, 2TMS	13.006	0.049 ± 0.002 ^a	0.048 ± 0.001 ^a	0.026 ± 0.002 ^b	0.059 ± 0.011 ^a
13	L-Aspartic acid, 3TMS derivative	13.259	0.175 ± 0.005 ^a	0.194 ± 0.016 ^a	0.105 ± 0.007 ^b	0.124 ± 0.008 ^b

14	L-Glutamic acid, 3TMS derivative	15.478	0.094 ± 0.006 ^a	0.098 ± 0.000 ^a	0.090 ± 0.017 ^a	0.089 ± 0.004 ^a
15	Asparagine, 3TMS derivative	16.560	0.051 ± 0.009 ^a	0.043 ± 0.014 ^a	0.033 ± 0.001 ^a	0.027 ± 0.011 ^a
Toplam			0.867	0.967	0.587	0.547
Şekerler ve türevleri						
16	D-Fructose, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, O-methyloxime	21.164	0.401 ± 0.015 ^b	0.387 ± 0.095 ^b	0.623 ± 0.027 ^a	0.516 ± 0.044 ^{ab}
17	L-(-)-Sorbose, pentakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (syn)	21.384	0.266 ± 0.006 ^b	0.242 ± 0.070 ^b	0.420 ± 0.009 ^a	0.330 ± 0.011 ^{ab}
18	D-Galactose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, o-methyloxime, (1E)-	21.498	0.031 ± 0.002 ^b	0.023 ± 0.013 ^b	0.050 ± 0.003 ^a	0.027 ± 0.003 ^b
19	D-(+)-Talose, pentakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (syn)	21.638	0.469 ± 0.007 ^b	0.414 ± 0.123 ^b	0.850 ± 0.033 ^a	0.529 ± 0.034 ^b
20	D-Glucose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, o-methyloxime, (1E)-	21.926	0.082 ± 0.001 ^b	0.074 ± 0.019 ^b	0.172 ± 0.027 ^a	0.105 ± 0.003 ^b
21	D-Glucitol, 6TMS derivative	22.347	0.407 ± 0.019 ^{ab}	0.327 ± 0.052 ^b	0.479 ± 0.041 ^a	0.426 ± 0.012 ^a
22	D-Gluconic acid, 6TMS	23.549	0.015 ± 0.006 ^b	0.010 ± 0.000 ^b	0.039 ± 0.005 ^a	0.029 ± 0.006 ^a
23	Myo-Inositol, 6TMS	25.019	0.082 ± 0.005 ^b	0.069 ± 0.023 ^b	0.155 ± 0.018 ^a	0.139 ± 0.005 ^a
24	Sucrose, 8TMS derivative	34.294	4.837 ± 0.000 ^b	5.742 ± 0.00 ^{ab}	7.348 ± 1.615 ^a	6.811 ± 0.045 ^{ab}
Toplam			6.590	7.288	10.136	8.912
Alkoller ve türevleri						
25	Ethanol, 2-(methylamino)-, N-trifluoroacetyl, O-(tert-butyl dimethylsilyl)	6.109	0.075 ± 0.008 ^a	0.074 ± 0.008 ^a	0.071 ± 0.008 ^a	0.064 ± 0.009 ^a

26	Ethanolamine, 3TMS derivative	7.199	0.025 ± 0.003 ^{ab}	0.032 ± 0.010 ^a	0.013 ± 0.001 ^{bc}	0.009 ± 0.001 ^c
27	Glycerol, 3TMS derivative	7.573	4.667 ± 0.646 ^{ab}	5.713 ± 1.301 ^a	3.049 ± 0.145 ^b	3.624 ± 0.014 ^b
Toplam			4.767	5.819	3.133	3.697
Organik asitler ve türevleri						
28	Lactic Acid, 2TMS derivative	3.330	0.028 ± 0.002 ^a	0.025 ± 0.009 ^a	0.021 ± 0.003 ^a	0.019 ± 0.002 ^a
29	Glycolic acid, 2TMS derivative	4.639	0.131 ± 0.027 ^a	0.163 ± 0.042 ^a	0.116 ± 0.012 ^a	0.121 ± 0.007 ^a
30	Butanedioic acid, 2TMS derivative	8.268	0.033 ± 0.007 ^a	0.033 ± 0.007 ^a	0.025 ± 0.004 ^a	0.034 ± 0.006 ^a
31	Malic acid, 3TMS derivative	12.591	0.120 ± 0.000 ^b	0.130 ± 0.009 ^b	0.116 ± 0.000 ^b	0.176 ± 0.017 ^a
32	Citric acid, 4TMS derivative	19.888	0.084 ± 0.010 ^a	0.073 ± 0.027 ^a	0.066 ± 0.006 ^a	0.046 ± 0.002 ^a
Toplam			0.396	0.424	0.344	0.396
Diğerleri						
33	Silanamine, N,N'-methanetetrailbis[1,1,1-trimethyl-	2.167	0.035 ± 0.004 ^a	0.029 ± 0.004 ^a	0.033 ± 0.001 ^a	0.019 ± 0.000 ^b
34	Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	7.486	0.501 ± 0.035 ^a	0.618 ± 0.088 ^a	0.288 ± 0.012 ^b	0.350 ± 0.012 ^b
35	Phosphoric acid, bis(trimethylsilyl) 2,3- bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester	18.805	0.022 ± 0.006 ^a	0.020 ± 0.010 ^a	0.065 ± 0.036 ^a	0.045 ± 0.022 ^a
Toplam			0.558	0.667	0.386	0.414

RT: Her bir metabolitin alıkonma zamanı

*: Tüm değerler, analiz edilen örneklerin kg'ı başına mg dahili standart (adonitol) eşdeğerleri cinsinden ifade edilmiştir. Bir satır içinde farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=3) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, $p < 0.05$.

** : Mikrodalga işlemi (600 W, 2 dk)

Çizelge 4.25. Mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örneklerinden elde edilen birincil metabolitlerin metabolit miktarları (mg/kg) (Normalleştirilmiş veriler EK 9-B’de gösterilmiştir).

#	Birincil Metabolit Adı	RT (dk)	Metabolit Miktarı (mg/kg)*			
			MF3 (%<0.02 GM MON810)	MF3T** (%<0.02 GM MON810)	MF4 (%5 GM MON810)	MF4T** (%5 GM MON810)
Yağ asitleri ve türevleri						
1	Palmitic Acid, TMS derivative	23.630	0.071 ± 0.022 ^a	0.083 ± 0.006 ^a	0.117 ± 0.013 ^a	0.113 ± 0.025 ^a
2	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, TMS derivative	26.503	0.222 ± 0.078 ^a	0.279 ± 0.061 ^a	0.380 ± 0.091 ^a	0.338 ± 0.014 ^a
3	9-Octadecenoic acid, (E)-, TMS derivative	26.610	0.098 ± 0.023 ^b	0.136 ± 0.045 ^{ab}	0.182 ± 0.034 ^a	0.162 ± 0.007 ^{ab}
4	Stearic acid, TMS derivative	27.084	0.007 ± 0.002 ^b	0.023 ± 0.004 ^a	0.012 ± 0.004 ^{ab}	0.014 ± 0.006 ^{ab}
Toplam			0.398	0.521	0.691	0.627
Amino asitler ve türevleri						
5	L-Alanine, 2TMS derivative	3.971	0.032 ± 0.006 ^{bc}	0.018 ± 0.001 ^c	0.048 ± 0.002 ^{ab}	0.063 ± 0.015 ^a
6	L-Norleucine, 2TMS derivative	7.379	0.001 ± 0.000 ^b	0.001 ± 0.000 ^b	0.004 ± 0.002 ^a	0.005 ± 0.000 ^a
7	L-Proline, 2TMS derivative	7.827	0.130 ± 0.018 ^b	0.066 ± 0.010 ^b	0.150 ± 0.024 ^{ab}	0.218 ± 0.058 ^a
8	Glycine, 3TMS derivative	8.081	0.010 ± 0.002 ^b	0.007 ± 0.001 ^c	0.012 ± 0.001 ^{ab}	0.014 ± 0.000 ^a
9	L-Serine, 3TMS derivative	9.551	0.015 ± 0.001 ^a	0.008 ± 0.002 ^b	0.016 ± 0.002 ^a	0.019 ± 0.002 ^a
10	L-Threonine, 3TMS derivative	10.185	0.001 ± 0.000 ^b	0.003 ± 0.001 ^b	0.006 ± 0.001 ^b	0.017 ± 0.005 ^a
11	β-Alanine, 3TMS derivative	10.894	0.001 ± 0.000 ^c	0.004 ± 0.001 ^b	0.003 ± 0.001 ^b	0.006 ± 0.000 ^a
12	L-5-Oxoproline, 2TMS	13.006	0.011 ± 0.006 ^b	0.030 ± 0.000 ^a	0.012 ± 0.001 ^b	0.009 ± 0.001 ^b
13	L-Aspartic acid, 3TMS derivative	13.259	0.075 ± 0.002 ^c	0.043 ± 0.003 ^d	0.129 ± 0.001 ^b	0.161 ± 0.000 ^a

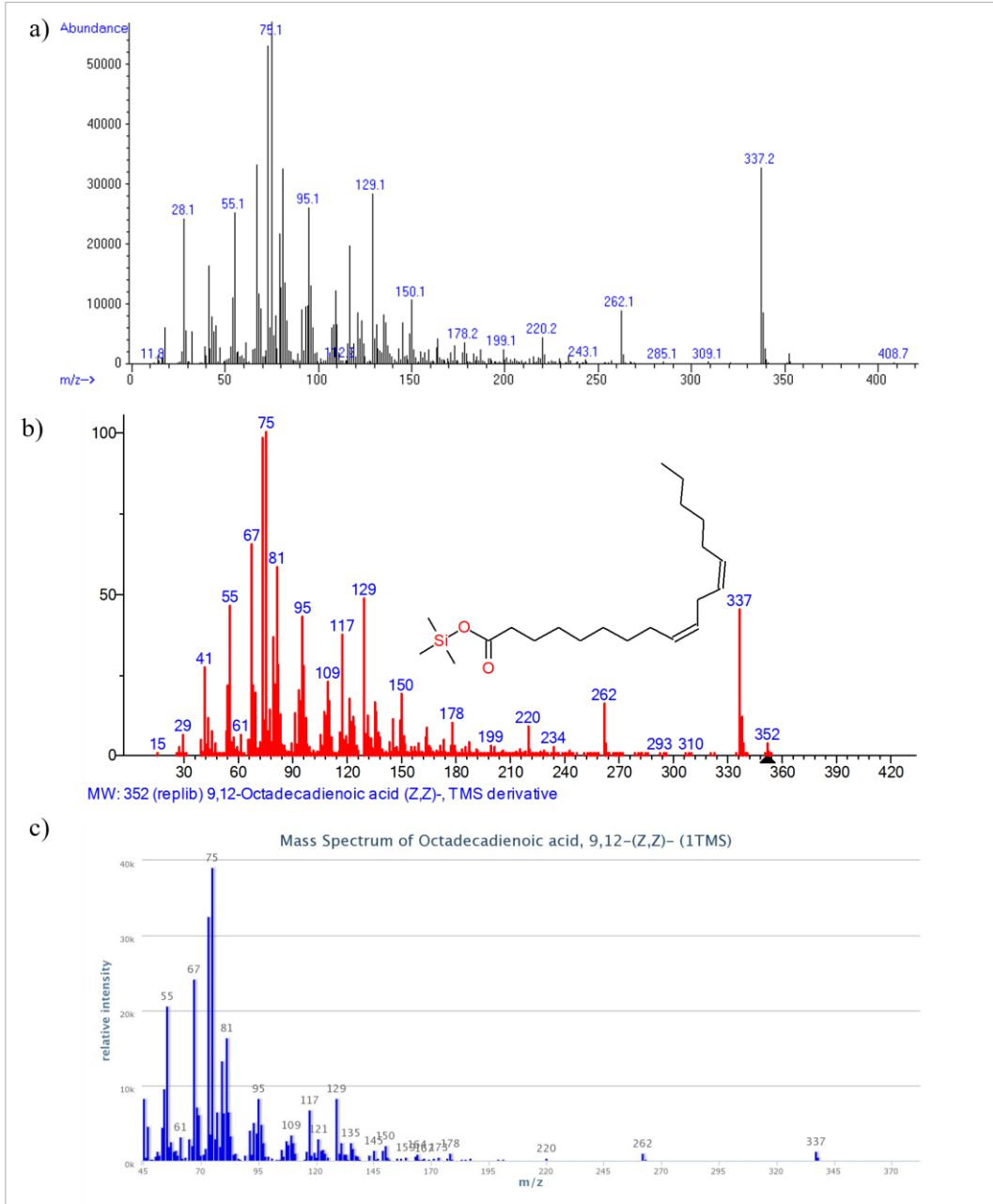
14	L-Glutamic acid, 3TMS derivative	15.478	0.034 ± 0.012 ^b	0.074 ± 0.000 ^a	0.058 ± 0.006 ^a	0.070 ± 0.000 ^a
15	Asparagine, 3TMS derivative	16.560	0.012 ± 0.003 ^b	0.002 ± 0.000 ^c	0.022 ± 0.004 ^a	0.024 ± 0.004 ^a
Toplam			0.322	0.256	0.460	0.606
Şekerler ve türevleri						
16	D-Fructose, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, O-methyloxime	21.164	0.322 ± 0.064 ^b	0.347 ± 0.000 ^b	0.673 ± 0.045 ^a	0.704 ± 0.151 ^a
17	L-(-)-Sorbose, pentakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (syn)	21.384	0.213 ± 0.038 ^b	0.226 ± 0.011 ^b	0.430 ± 0.021 ^a	0.460 ± 0.090 ^a
18	D-Galactose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, o-methyloxime, (1E)-	21.498	0.025 ± 0.003 ^b	0.018 ± 0.000 ^b	0.055 ± 0.013 ^a	0.049 ± 0.005 ^a
19	D-(+)-Talose, pentakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (syn)	21.638	0.480 ± 0.084 ^b	0.395 ± 0.032 ^b	0.891 ± 0.051 ^a	0.921 ± 0.180 ^a
20	D-Glucose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, o-methyloxime, (1E)-	21.926	0.087 ± 0.016 ^b	0.092 ± 0.014 ^b	0.154 ± 0.008 ^a	0.167 ± 0.024 ^a
21	D-Glucitol, 6TMS derivative	22.347	0.221 ± 0.041 ^a	0.229 ± 0.022 ^a	0.286 ± 0.023 ^a	0.283 ± 0.027 ^a
22	D-Gluconic acid, 6TMS	23.549	0.005 ± 0.000 ^{ab}	0.010 ± 0.003 ^a	0.007 ± 0.003 ^{ab}	0.003 ± 0.001 ^b
23	Myo-Inositol, 6TMS	25.019	0.070 ± 0.021 ^b	0.292 ± 0.008 ^a	0.103 ± 0.018 ^b	0.098 ± 0.011 ^b
24	Sucrose, 8TMS derivative	34.294	4.499 ± 0.308 ^a	4.025 ± 0.413 ^a	6.063 ± 1.541 ^a	4.373 ± 0.163 ^a
Toplam			5.922	5.634	8.662	7.058
Alkoller ve türevleri						
25	Ethanol, 2-(methylamino)-, N-trifluoroacetyl, O-(tert-butyl)dimethylsilyl)	6.109	0.054 ± 0.008 ^a	0.043 ± 0.000 ^a	0.052 ± 0.000 ^a	0.063 ± 0.015 ^a

26	Ethanolamine, 3TMS derivative	7.199	0.007 ± 0.003 ^a	0.003 ± 0.000 ^b	0.006 ± 0.001 ^{ab}	0.009 ± 0.001 ^a
27	Glycerol, 3TMS derivative	7.573	0.086 ± 0.002 ^c	0.072 ± 0.007 ^c	0.154 ± 0.008 ^b	0.218 ± 0.029 ^a
Toplam			0.147	0.118	0.212	0.290
Organik asitler ve türevleri						
28	Lactic Acid, 2TMS derivative	3.330	0.012 ± 0.002 ^{ab}	0.012 ± 0.001 ^{ab}	0.011 ± 0.000 ^b	0.016 ± 0.002 ^a
29	Glycolic acid, 2TMS derivative	4.639	0.129 ± 0.018 ^a	0.123 ± 0.017 ^{ab}	0.093 ± 0.003 ^b	0.117 ± 0.012 ^{ab}
30	Butanedioic acid, 2TMS derivative	8.268	0.010 ± 0.000 ^b	0.011 ± 0.001 ^b	0.014 ± 0.002 ^b	0.022 ± 0.002 ^a
31	Malic acid, 3TMS derivative	12.591	0.047 ± 0.002 ^b	0.060 ± 0.011 ^{ab}	0.050 ± 0.001 ^{ab}	0.064 ± 0.006 ^a
32	Citric acid, 4TMS derivative	19.888	0.084 ± 0.021 ^a	0.069 ± 0.022 ^a	0.060 ± 0.010 ^a	0.057 ± 0.012 ^a
Toplam			0.282	0.275	0.228	0.276
Diğerleri						
33	Silanamine, N,N'-methanetetraylbis[1,1,1-trimethyl-	2.167	0.026 ± 0.005 ^a	0.027 ± 0.004 ^a	0.025 ± 0.003 ^a	0.026 ± 0.000 ^a
34	Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	7.486	0.083 ± 0.001 ^c	0.096 ± 0.014 ^{bc}	0.144 ± 0.015 ^{ab}	0.182 ± 0.034 ^a
35	Phosphoric acid, bis(trimethylsilyl) 2,3- bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester	18.805	0.011 ± 0.005 ^b	0.033 ± 0.014 ^a	0.012 ± 0.004 ^b	0.010 ± 0.000 ^b
Toplam			0.120	0.156	0.181	0.218

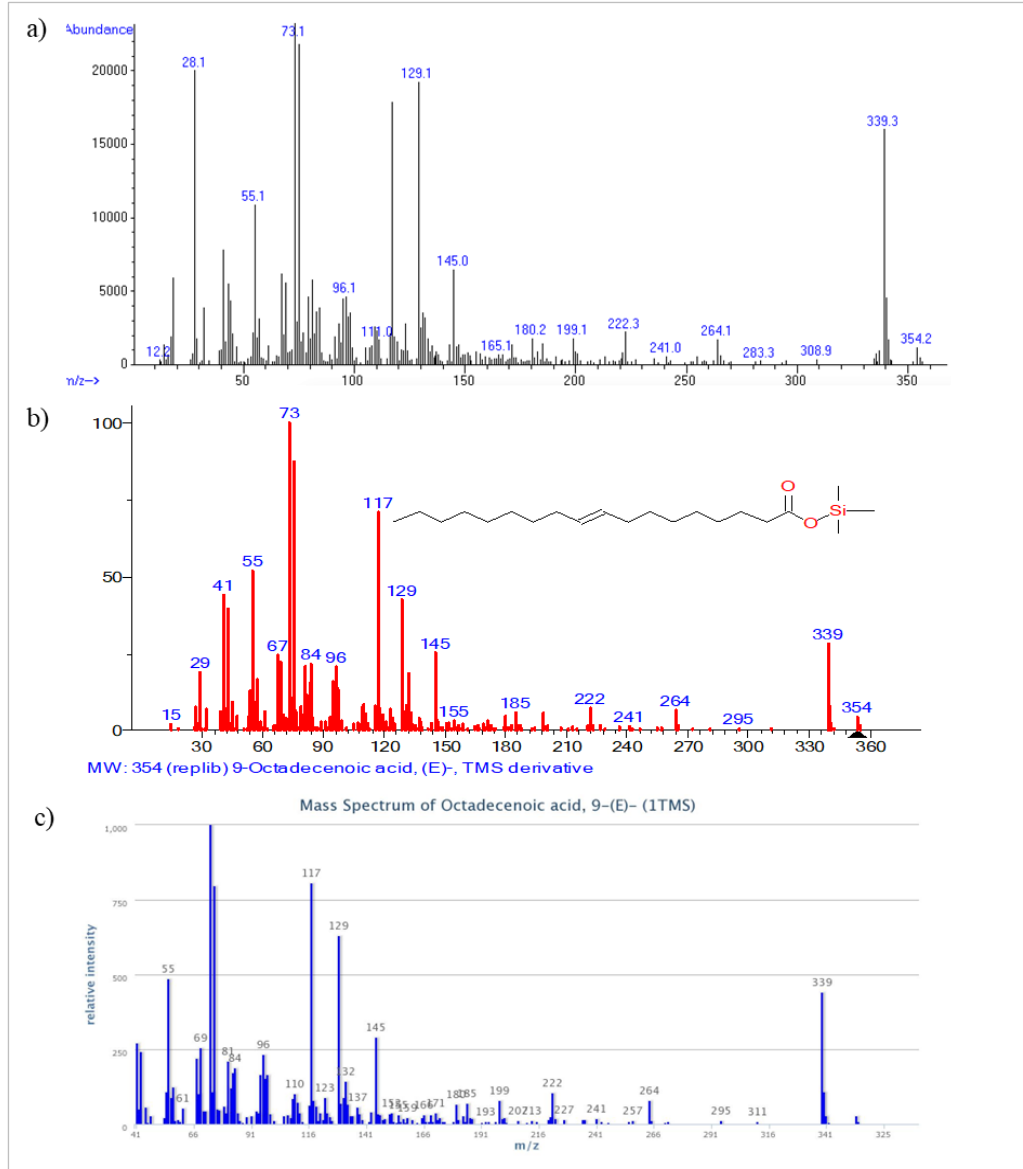
RT: Her bir metabolitin alıkonma zamanı

*: Tüm değerler, analiz edilen örneklerin kg'ı başına mg dahili standart (adonitol) eşdeğerleri cinsinden ifade edilmiştir. Bir satır içinde farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=3) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, $p < 0.05$.

** : Mikrodalga işlemi (600 W, 2 dk)



Şekil 4.7. Linoleik asidin (9,12-Oktadekadienoik asit) kütle spektrumu. a) Analiz edilen örneklere ait Enhanced Data Analysis programından alınan örnek spektrum, b) NIST kütüphanesinde mevcut olan spektrum, c) Golm Metabolome veri tabanında bulunan spektrum.



Şekil 4.8. Oleik asidin (9-Oktadesenoik asit) kütle spektrumu. a) Analiz edilen örneklere ait Enhanced Data Analysis programından alınan örnek spektrum, b) NIST kütüphanesinde mevcut olan spektrum, c) Golm Metabolome veri tabanında bulunan spektrum.

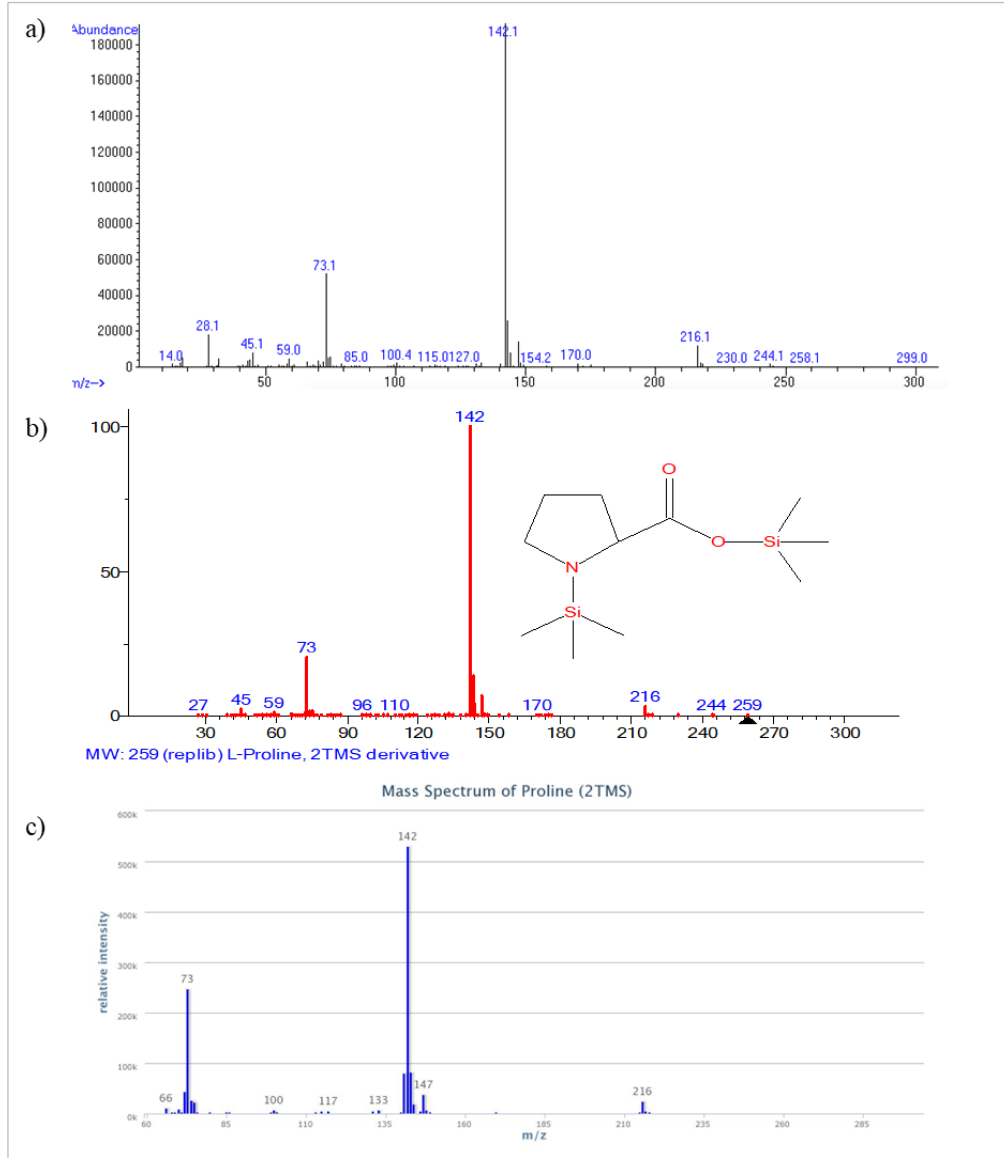
Çizelge 4.24'te gösterildiği gibi, MF2 örneğindeki 5-oksoprolin hariç, mikrodalga işleminden sonra MF1 ve MF2 örnekleri için amino asit türevi bileşenlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmemiştir ($p < 0.05$). Deng ve arkadaşları [268], mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan karabuğday taneleri arasında treonin, serin, glutamik asit ve alanin için istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlemlediklerini ($p < 0.05$) bildirmişlerdir. Çizelge 4.25 incelendiğinde, MF4 örneğindeki treonin, β -alanin ve aspartik asit hariç, benzer bir istatistiksel sonucun

gözlendiği fark edilmiştir ($p < 0.05$). MF3 örneğinde ise mikrodalga uygulamasından sonra sırasıyla glisin, serin, aspartik asit ve asparajinde hafif bir azalış gözlemlenirken, β -alanin, 5-oksoprolin ve glutamik asit miktarlarında hafif bir artış gözlemlenmiştir. Geri kalan aminoasit bileşiklerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmemiştir. Çalışmamızda tüm örneklerde majör amino asit prolin (Şekil 4.9) olup bunu, tespit edilen diğer amino asitler arasında aspartik asit, alanin ve glutamik asit takip etmiştir. Tüm örneklerin amino asit bileşiminin, FAO'nun [269] mısır için alanin, prolin, glisin, serin, treonin, aspartik asit ve glutamik asitleri içeren önerilen bileşimle tutarlı olduğu gözlemlenmiştir.

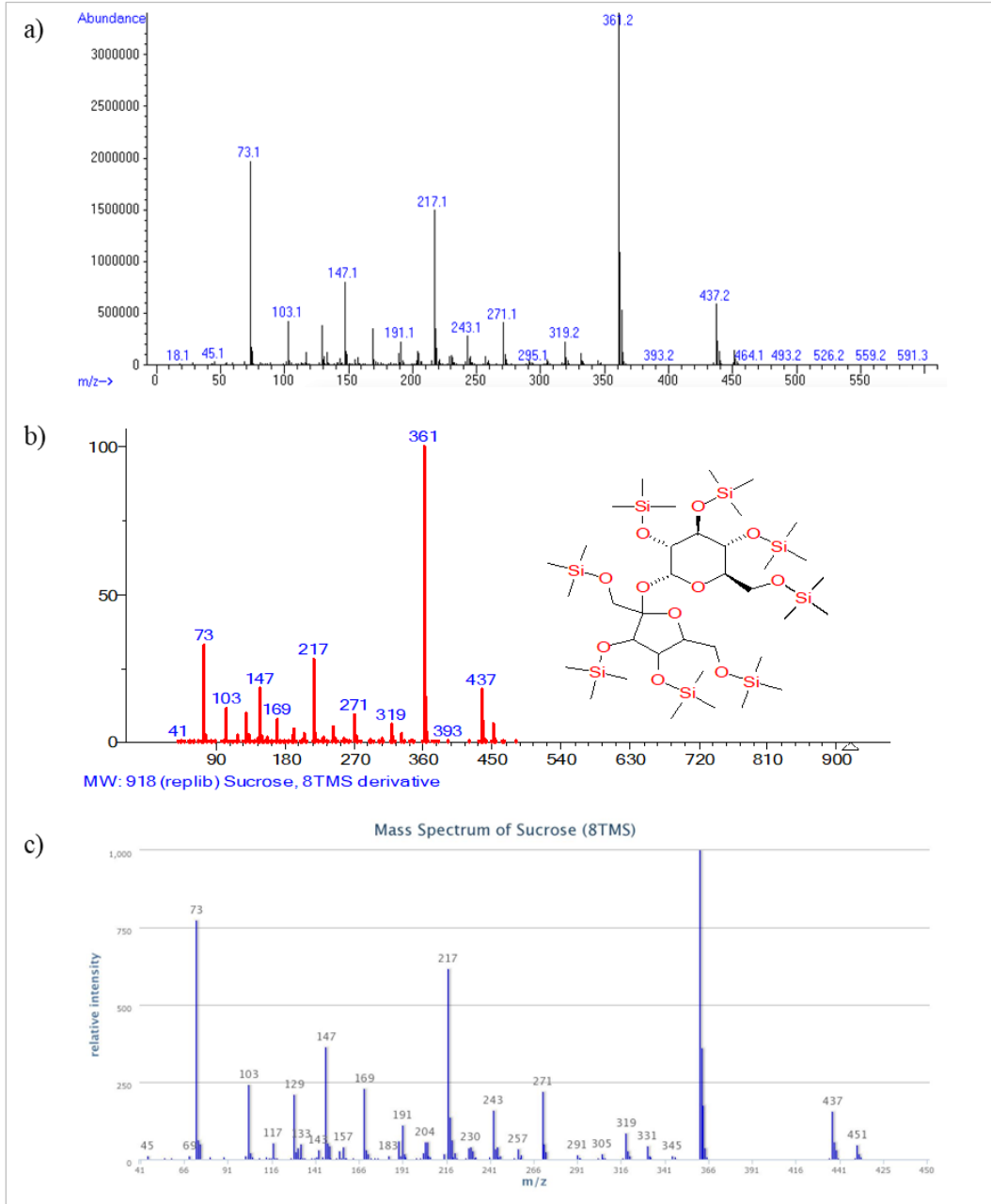
Bu çalışmada tanımlanan metabolitler (Çizelge 4.24 ve Çizelge 4.25), mısır tanesindeki şekerler ve türevleri, alkoller ve organik asitlerin kompozisyonunda bulunanlara benzerdi [270-272]. Tüm örneklerdeki ana sakkarit, beklendiği gibi indirgen olmayan şeker sakkarozdu (Şekil 4.10) ve mikrodalga uygulanan örneklere kıyasla hem MF1 ve MF2 hem de MF3 ve MF4 örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmamıştır ($p < 0.05$). İndirgen şekerler olarak tanımlanan galaktoz, taloz ve glukoz dahil tüm aldoheksozların trimetilsilil O-metil oksim türevleri formunda olduğu bulunmuştur. İstatistiksel olarak, hem MF1 ve MF2 hem de MF3 ve MF4 örnekleri için ketoheksozlarda (fruktoz ve sorboz), şeker alkollerinde (glusitol ve miyo-inositol) ve ayrıca şeker asitlerinde (glukonik asit) mikrodalga uygulanmış muadillerine kıyasla anlamlı bir fark saptanmamıştır. Sadece MF3 örneğinde tanımlanan miyo-inositol miktarında mikrodalga uygulamasından sonra hafif bir artış gözlemlenmiştir. Miyo-inositol, diğer şeker alkolleri gibi organik bir osmolit olarak işlev görmektedir ve bitki abiyotik stres toleransında yer alan birçok metabolitin öncüsü olarak görev almaktadır [271]. Bununla birlikte, insan sağlığı ve özellikle insan beyin hücrelerinde çok sayıda biyolojik sürece katıldığı bilinen [273, 274] miyo-inositolün, mısır ıslahı için de oldukça umut verici bir metabolik belirteç olduğu bildirilmiştir [271].

Gliserol (Şekil 4.11) tüm örneklerde ana alkol bileşiği olarak tespit edilmiştir. Alkoller ve türevleri mikrodalga işleminden önce ve sonra önemli bir fark göstermemiştir. Ancak, MF3'te etanolamin bileşiğinde hafif bir azalış ile MF4'te gliserol miktarında hafif bir artış gözlemlenmiştir. Ayrıca glükolik (Şekil 4.12), malik (Şekil 4.13), sitrik, bütandioik ve laktik asitler de organik asit olarak tanımlanmıştır. Mikrodalga işleminin ardından hem

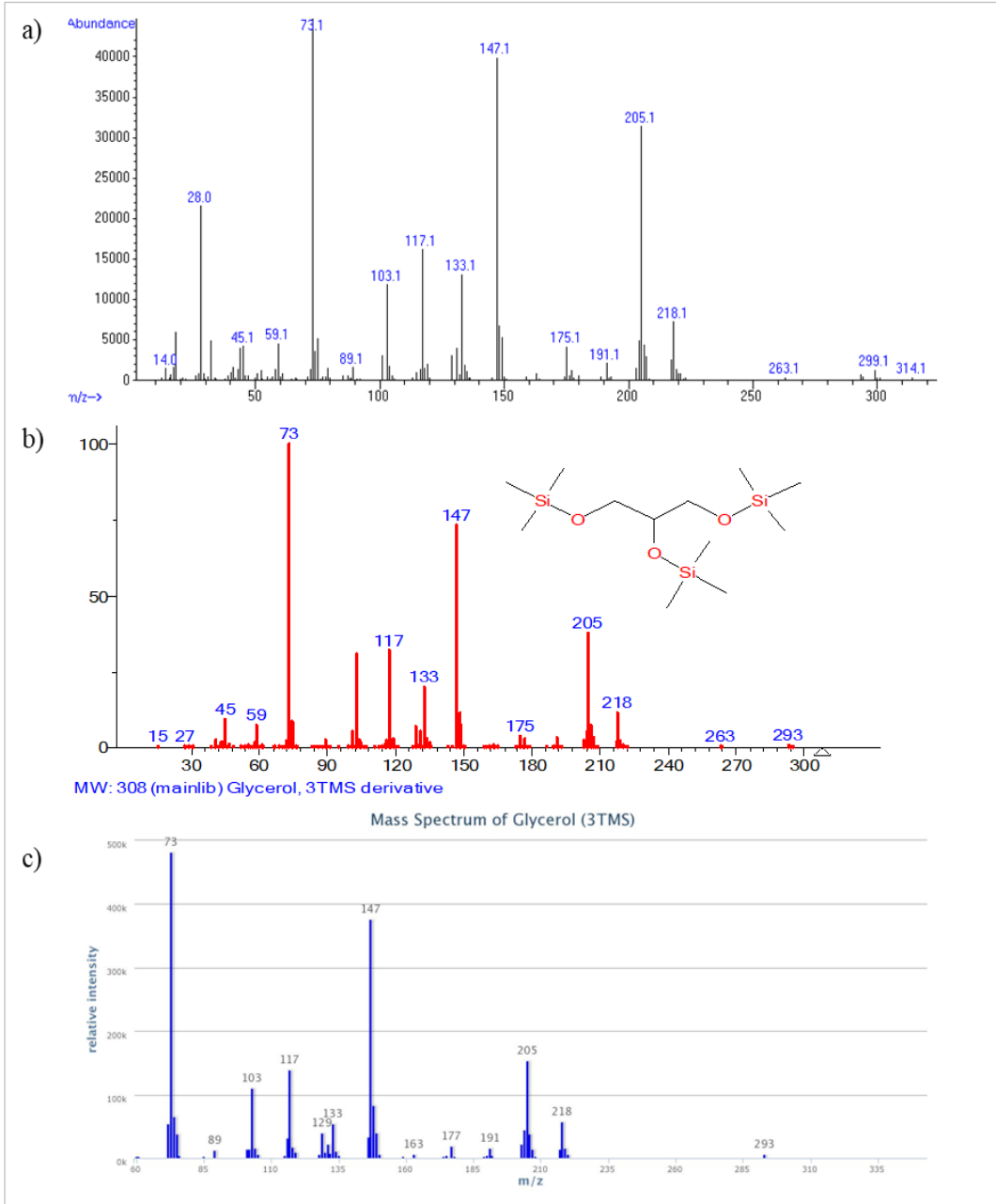
MF1 hem de MF3 örneklerinin organik asit miktarlarında gözle görülür bir değişiklik olmamış, Tukey'in çoklu karşılaştırma testiyle doğrulandığı üzere, malik asit dışında MF2'de ve laktik ile bütandioik asit dışında MF4'te de benzer bir istatistiksel sonuç gözlemlenmiştir ($p < 0.05$).



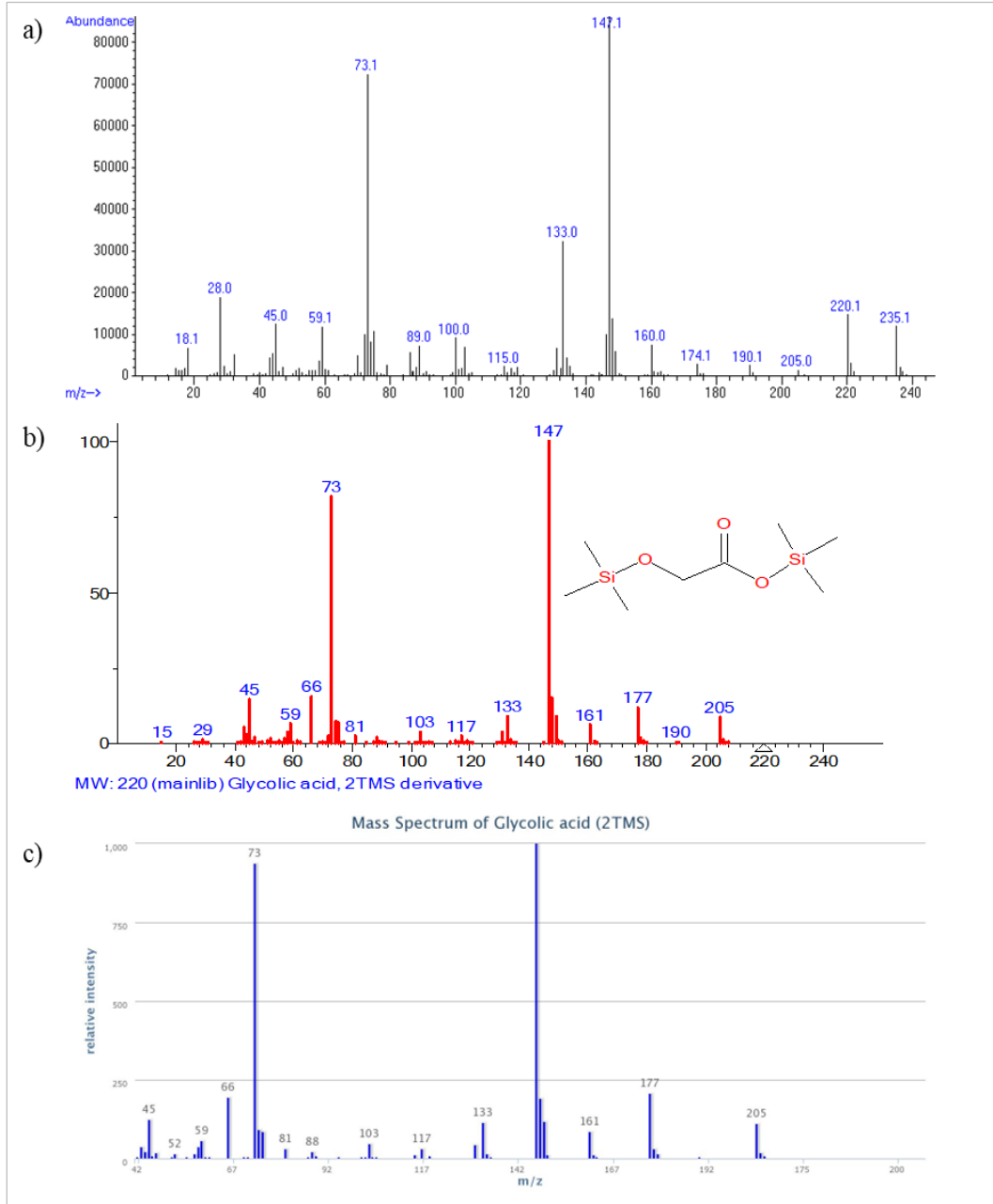
Şekil 4.9. Prolinin kütle spektrumu. a) Analiz edilen örneklere ait Enhanced Data Analysis programından alınan örnek spektrum, b) NIST kütüphanesinde mevcut olan spektrum, c) Golm Metabolome veri tabanında bulunan spektrum.



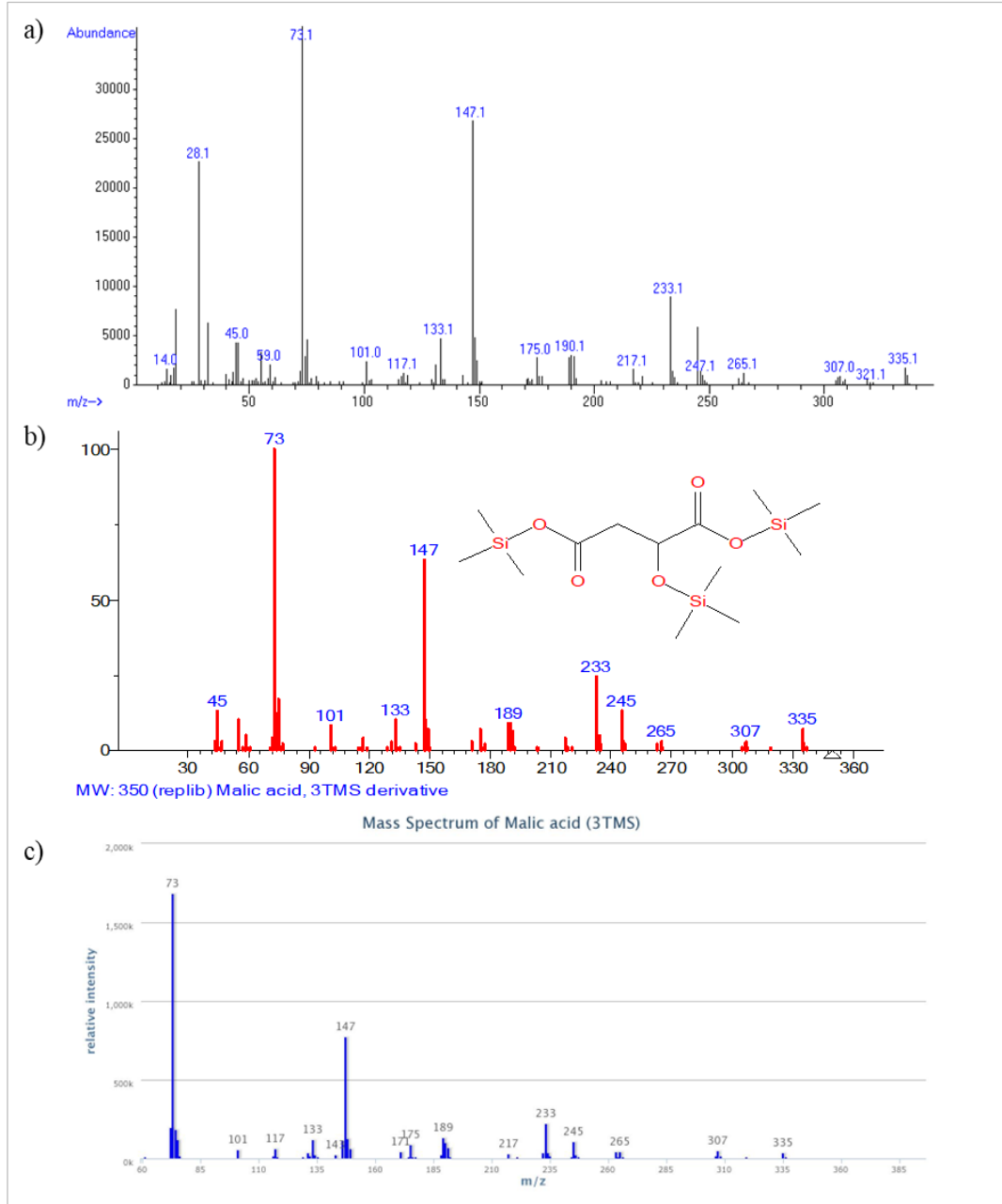
Şekil 4.10. Sakkarozun (sükroz) kütle spektrumu. a) Analiz edilen örneklere ait Enhanced Data Analysis programından alınan örnek spektrum, b) NIST kütüphanesinde mevcut olan spektrum, c) Golm Metabolome veri tabanında bulunan spektrum.



Şekil 4.11. Gliserolün kütle spektrumu. a) Analiz edilen örneklere ait Enhanced Data Analysis programından alınan örnek spektrum, b) NIST kütüphanesinde mevcut olan spektrum, c) Golm Metabolome veri tabanında bulunan spektrum.



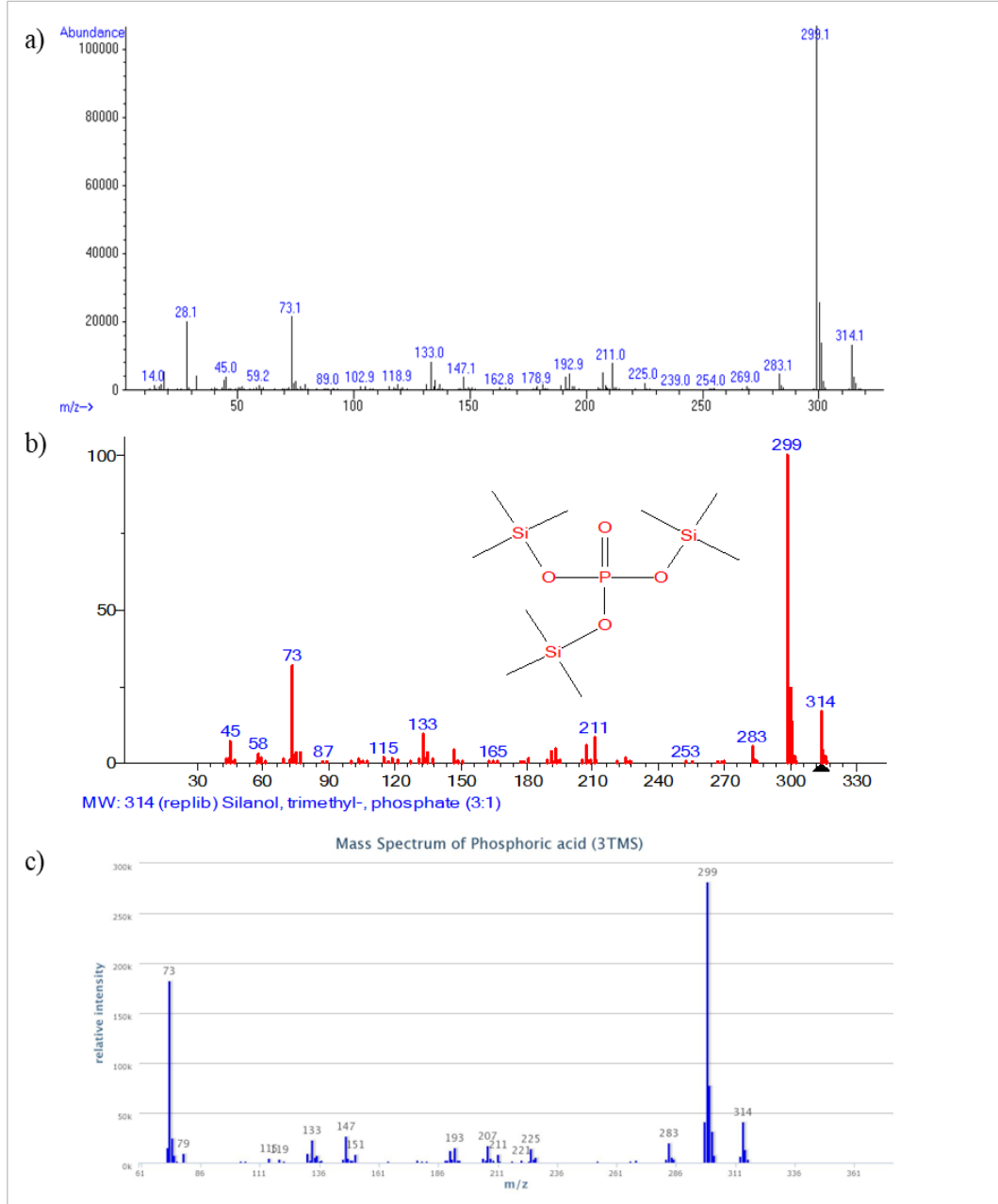
Şekil 4.12. Glikolik asitin kütle spektrumu. a) Analiz edilen örneklere ait Enhanced Data Analysis programından alınan örnek spektrum, b) NIST kütüphanesinde mevcut olan spektrum, c) Golm Metabolome veri tabanında bulunan spektrum.



Şekil 4.13. Malik asitin kütle spektrumu. a) Analiz edilen örneklere ait Enhanced Data Analysis programından alınan örnek spektrum, b) NIST kütüphanesinde mevcut olan spektrum, c) Golm Metabolome veri tabanında bulunan spektrum.

Çalışmamızda üç bileşik (silanol, trimetil-, fosfat (3:1) (Şekil 4.14) ; silanamin, N, N'-methanetetraylbis[1,1,1-trimetil- ve fosforik asit, bis(trimetilsilil) 2,3-bis[(trimetilsilil)oksi]propil ester) örnek ekstraktlarının tamamında “diğerleri” grubu olarak sınıflandırılan bileşikler olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.24 ve Çizelge 4.25). Bu

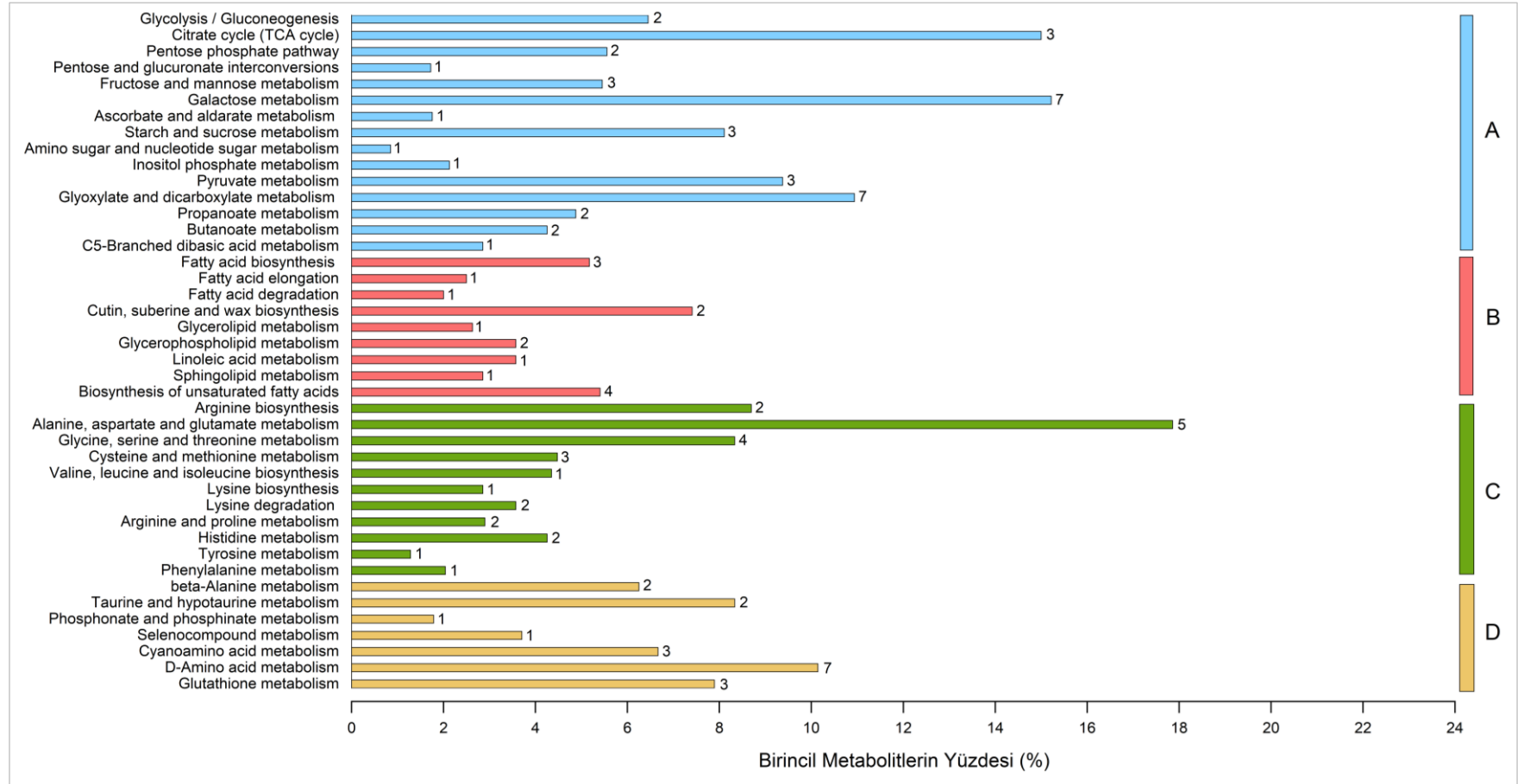
bileşiklerin önceki çalışmalardan elde edilen GC-MS bulguları ile tutarlı olduğu gözlemlenmiştir [275, 276]. MF2'deki silanamin ve MF3'teki fosforik asit bileşikleri dışında, mikrodalga işlemine tabi tutulduktan sonra tüm örneklerde bulunan “diğerleri” grubu için istatistiksel olarak kayda değer bir değişiklik olmamıştır ($p < 0.05$).



Şekil 4.14. Silanol, trimetil-, fosfat (3:1)in (fosforik asit (3TMS)) kütle spektrumu. a) Analiz edilen örneklere ait Enhanced Data Analysis programından alınan örnek spektrum, b) NIST kütüphanesinde mevcut olan spektrum, c) Golm Metabolome veri tabanında bulunan spektrum.

GC-MS analizi ile belirlenen birincil metabolitlerin çeşitli metabolik yollardaki biyolojik işlevlerini daha iyi anlamak için sırasıyla KEGG bileşik ve KEGG yolağı veri tabanları kullanılmıştır. KEGG yolağı veri tabanı, metabolizmaya ilişkin deneysel bilgiyi temsil eden, metabolik yollar, düzenleyici yollar ve moleküler kompleksler dahil olmak üzere moleküler etkileşim ağlarını içeren bir harita koleksiyonudur [277, 278]. KEGG bileşik veri tabanında taranan 35 metabolitin 29'uyla ilgili metabolik yollar KEGG yolağı veri tabanıyla bulunmuş ve EK 10-A'da gösterilmiştir. Metabolik yollara en fazla katkı sağlayan birincil metabolitler sırasıyla, yağ asitlerinden palmitik asit, amino asitlerden aspartik asit, şeker ve türevlerinden glikoz ve miyo-inositol, alkollerden gliserol, organik asitlerden bütandioik asit ve diğerleri sınıfına ait fosforik asittir. EK 10-B'de ise KEGG yolağı veri tabanında *Zea mays* (mısır) için bulunan ve çalışmada tanımlanan birincil metabolitlerle ilişkili toplam 68 metabolik yolağ listelenmiştir.

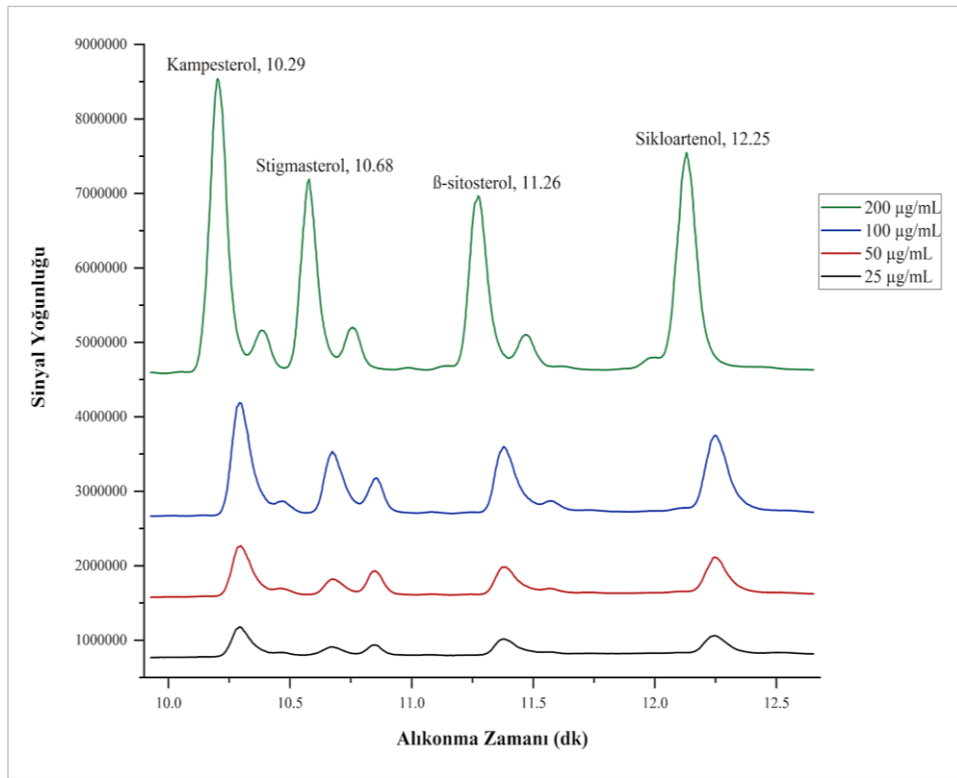
KEGG yolağ analizi, birincil metabolitlerin biyolojik fonksiyonlarının derinlemesine tanınmasına olanak sağlamıştır. Birincil metabolitlerin, esas olarak “zma01100, metabolik yollar”, “zma01110, ikincil metabolitlerin biyosentezi”, “zma01200, karbon metabolizması”, “zma01210, 2-Oksokarboksilik asit metabolizması”, “zma01212, yağ asidi metabolizması”, “zma01230, amino asitlerin biyosentezi”, “zma01240, kofaktörlerin biyosentezi” ve “zma01250, nükleotid şekerlerin biyosentezi” yollarında rol oynadığı belirlenmiştir. Bu yolların dışında, birincil metabolitler sırasıyla karbonhidrat metabolizması, amino asit metabolizması, lipid metabolizması ve diğer amino asitlerin metabolizmasıyla ilişkili biyolojik yollara katılmıştır (Şekil 4.15). Metabolitlerin ilgili yollara katkı sağlayan ve veri tabanında yer alan bileşiklerin arasında bulunma yüzdeleri hesaplanmış ve bu doğrultuda ilk 3 metabolik yolağ; “zma00250, alanin, aspartat ve glutamat metabolizması” (5 metabolit, %17.86), “zma00052, galaktoz metabolizması” (7 metabolit, %15.22) ve “zma00020, sitrat döngüsü, TCA döngüsü” (3 metabolit, %15.00) olarak sıralanmıştır.



Şekil 4.15. Mısır unlarında tespit edilen birincil metabolitlerin KEGG yolak analizi. Dikey eksen fonksiyonel sınıflandırma, yatay eksen birincil metabolitlerin yollarda bulunma yüzdelerini gösterir. Farklı renkler, mevcut analizde belirlenen biyolojik yolların dahil olduğu metabolizma sınıfını temsil eder: (A) Karbonhidrat metabolizması, (B) Lipid metabolizması, (C) Amino asit metabolizması, (D) Diğer amino asitlerin metabolizması.

4.3.2. GC-FID Analizi ile Tanımlanan Fitosteroller

Türevlendirilmiş mikrodalga uygulanan ve uygulanmayan mısır unu ekstraktlarında bulunan fitosterolleri tanımlamak için öncelikle 25, 50, 100 ve 200 µg/mL derişimlere sahip kampesterol, stigmasterol, β-sitosterol ve sikloartenol dış standartları hazırlanmış ve standartlar cihazda tanımlanan koşullarda okutulmuştur. Farklı konsantrasyonlara sahip dış standartlara ait kromatogram görüntüleri Şekil 4.16’da gösterilmiştir. Belirlenen pikler sırasıyla şu şekildedir: Kampesterol (RT (dk): 10.29), stigmasterol (RT (dk): 10.68), β-sitosterol (RT (dk): 11.26) ve sikloartenol (RT (dk): 12.25).



Şekil 4.16. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan fitosterol standartlarının GC-FID kromatogram görüntüleri.

Kalibrasyon eğrisi grafikleri (EK 11), standartların konsantrasyonlarına (µg/mL) karşı ortalama pik alanları çizilerek elde edilmiştir. Fitosterollerin kalibrasyon verileri Çizelge 4.26’da gösterilmiş ve tüm fitosterol bileşikleri için 25-200 µg/g aralığında iyi bir doğrusallık ($R^2 \geq 0.98$) sağlanmıştır. Bu, pik alanı ile fitosterol konsantrasyonu arasında orantılı bir ilişki olduğunu gösterir. Belirlenen LOD, 25.73 ile 39.01 µg/g arasında değişmekte olup, bu değerler sırasıyla β-sitosterol ve stigmasterol bileşiklerine aittir.

Çizelge 4.26. GC-FID ile analiz edilen fitosterol standartlarının doğrusallık ve duyarlılık verileri.

Standartlar	Doğrusal Denklem	R ²	LOD (µg/g)*
Kampesterol	y = 110757x-1E+06	0.989	31.70
Stigmasterol	y = 73542x-2E+06	0.985	39.01
β-sitosterol	y = 71440x-900720	0.993	25.73
Sikloartenol	y = 99027x-2E+06	0.985	38.27

*: LOD: Tespit limiti.

Fitosteroller tüm bitkilerde bulunan ikincil metabolitler olup, β-sitosterol, kampesterol ve stigmasterol, tanımlanmış 250'den fazla çeşit fitosterol bileşiği arasında doğada en bol bulunan bitki sterolleri olarak bilinir [279, 280]. Bu çalışmada, stigmasterol, mikrodalga uygulanmayan MF1 ve MF2 mısır örnekleri ile mikrodalga uygulanan muadillerinde baskın fitosterol olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.27). En yüksek stigmasterol miktarı sırasıyla, mikrodalga uygulanan ve GM olmayan mısır unu1 (MF1T) örneğinde (53.30 µg/g), ardından mikrodalga uygulanmayan ve GM olmayan mısır unu1 (MF1) örneğinde (52.89 µg/g) elde edilmiştir. Çalışmada, stigmasterolden sonra örneklerde en fazla bulunan ikinci bileşik ise β-sitosterol olmuştur. Harrabi ve arkadaşları [281], sitosterol ve stigmasterolün mısır tanelerinde bulunan başlıca serbest fitosteroller olduğunu belirtmiştir. Analiz edilen örneklerde bu iki ana fitosterol bileşiğinin miktarları, kalibrasyon eğrilerine bağlı olarak hesaplanan LOD değerinden yüksek çıkmıştır. Bu da kantifikasyon yönteminin bu iki bileşiği tanımlamak için yeterli hassasiyette olduğunu gösterir. Çalışmada, mısır unu örneklerinde tanımlanan sikloartenol miktarları ise β-sitosterol miktarlarına yakın değerlerde çıkmıştır (Çizelge 4.27). Sikloartenolün mısır tanesi fraksiyonları olan endosperm ve perikarp kısımlarında yüksek yüzdelerde olduğu bildirilmiştir [281]. Kampesterol ise Çizelge 4.27'de gösterildiği gibi tüm mısır unu örneklerinde en düşük miktarda tespit edilmiştir. 2014'te yapılan bir çalışmada, kuru öğütme sonrasında elde edilen mısır unu-3 örneğinde kampesterol miktarının en düşük olduğu bildirilmiştir [282].

Çizelge 4.27. Mısır unlarının (MF1 ve MF2) mikrodalga uygulaması sonrasında elde edilen fitosterol içerikleri.

Mısır Unları	Fitosterol Miktarları ($\mu\text{g/g}$)**				Toplam Fitosterol
	Kampesterol	Stigmasterol	β -sitosterol	Sikloartenol	
MF1 (%<0.1 GM MIR604)	10.79 \pm 0.74 ^a	52.89 \pm 9.75 ^a	33.16 \pm 6.82 ^a	30.83 \pm 3.60 ^a	127.66 \pm 20.91
MF1T* (%<0.1 GM MIR604)	11.21 \pm 0.40 ^a	53.30 \pm 9.48 ^a	34.73 \pm 7.38 ^a	30.66 \pm 3.73 ^a	129.90 \pm 21.00
MF2 (%75 GM MIR604)	10.75 \pm 0.01 ^a	51.85 \pm 0.75 ^a	46.36 \pm 0.95 ^a	33.87 \pm 0.45 ^a	142.84 \pm 2.16
MF2T* (%75 GM MIR604)	10.85 \pm 0.04 ^a	48.59 \pm 1.53 ^a	41.96 \pm 1.90 ^a	32.52 \pm 0.80 ^a	133.92 \pm 4.27

*: Mikrodalga işlemi (600 W, 2 dk)

** :Tüm analizler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir, değerler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur. Bir sütündeki aynı küçük harfler, mısır unu örneklerinin ortalama fitosterol miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını gösterir ($p < 0.05$).

Çizelge 4.28’de, kalibrasyon eğri denklemlerine göre elde edilen fitosterol miktar değerleri incelendiğinde, MF3 ve mikrodalga uygulanan MF3T ile MF4 ve mikrodalga uygulanan MF4T örneklerinde tespit edilen iki ana fitosterolün β -sitosterol ve stigmasterol olduğu gözlemlenmiştir. MF4 ve MF4T mısır unu örneklerinde diğer fitosterol bileşiklerine kıyasla en yüksek miktarda β -sitosterol tespit edilmiştir. Bu bulgular, Hossain ve Jayadeep (2020) tarafından analiz edilen ham mısır unu örneklerindeki fitosterol içeriğiyle tutarlıdır [283]. Mısır yağında baskın olan 4,4-dimetilsterollerin (triterpen alkoller), sikloartenol (% 43) ve 24-metilensikloartenol (% 40) olduğu bildirilmiştir [284]. Bu çalışmada, sikloartenol miktarı mısır unlarında ana fitosterollerden biri olarak tespit edilen β -sitosterol miktarına yakın olarak gözlemlenmiştir. Kampesterol ise Çizelge 4.28’de gösterildiği gibi tüm mısır unu örneklerinde en düşük miktarda tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, öğütülen mısır

koçanlarında β -sitosterol ve stigmasterole göre düşük miktarda bulunan fitosterolün kampesterol olduğunu bildiren literatürle uyumludur [285].

Çizelge 4.28. Mısır unlarının (MF3 ve MF4) mikrodalga uygulaması sonrasında elde edilen fitosterol içerikleri.

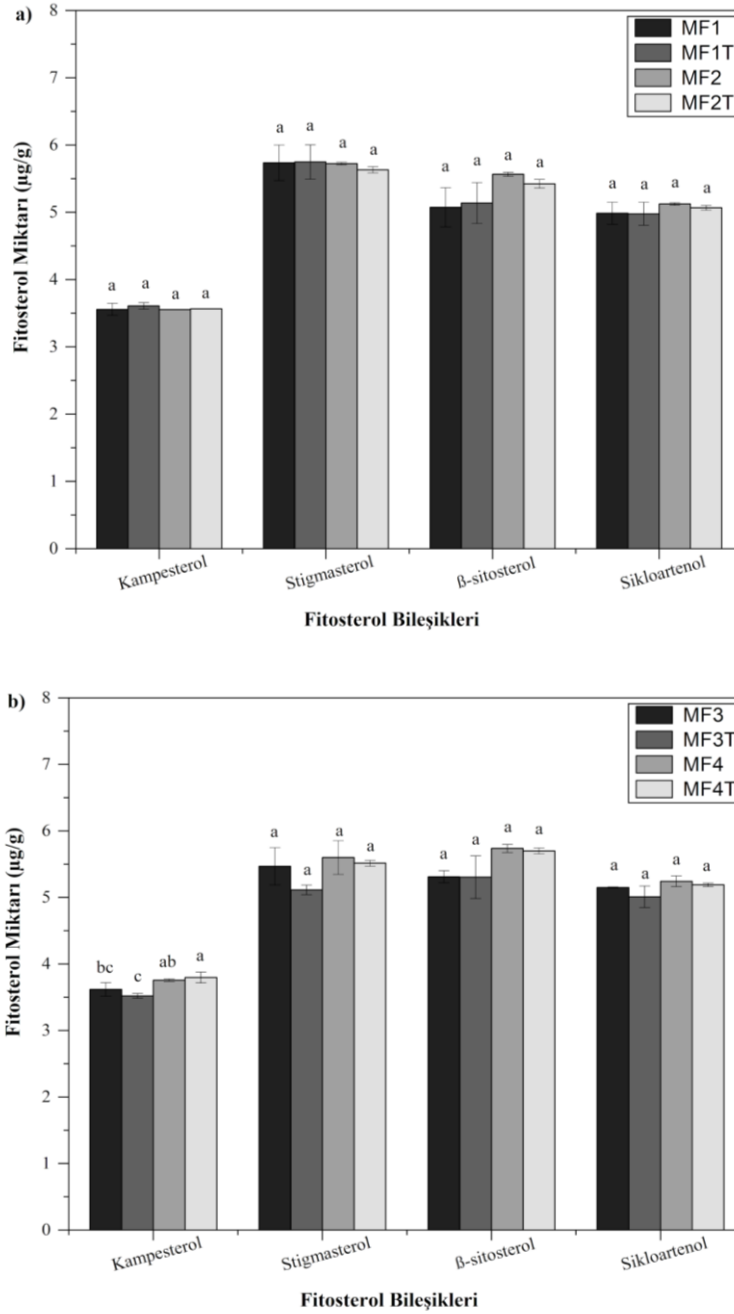
Fitosterol Miktarları ($\mu\text{g/g}$)**					
Mısır Unları	Kampesterol	Stigmasterol	β -sitosterol	Sikloartenol	Toplam Fitosterol
MF3					
(%<0.02 GM MON810)	11.29 \pm 0.87 ^{bc}	43.81 \pm 8.60 ^a	38.74 \pm 2.51 ^b	34.51 \pm 0.18 ^a	128.36 \pm 12.16
MF3T*					
(%<0.02 GM MON810)	10.48 \pm 0.28 ^c	33.62 \pm 1.74 ^a	39.18 \pm 8.74 ^b	31.36 \pm 3.61 ^a	114.63 \pm 14.38
MF4					
(%5 GM MON810)	12.51 \pm 0.18 ^{ab}	47.98 \pm 8.52 ^a	52.35 \pm 2.21 ^a	36.91 \pm 2.13 ^a	149.75 \pm 13.04
MF4T*					
(%5 GM MON810)	12.91 \pm 0.78 ^a	44.74 \pm 1.37 ^a	51.00 \pm 1.60 ^a	35.49 \pm 0.66 ^a	144.14 \pm 4.42

*: Mikrodalga işlemi (600 W, 2 dk)

** : Tüm analizler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir, değerler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur. Bir sütundaki aynı küçük harfler, mısır unu örneklerinin ortalama fitosterol miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını gösterir ($p < 0.05$).

Ayrıca, Çizelge 4.27 ve Çizelge 4.28'deki verilere göre, mikrodalga uygulamasının bütün mısır unu örneklerinde tanımlanan 4 ayrı fitosterol bileşiği için istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar yaratmadığı ortaya konmuştur, $p < 0.05$. Her bir mısır unu örneğinden elde edilen kantitatif verilere log2 normalizasyonu uygulanmıştır. Şekil 4.17'de normalize değerler incelendiğinde, örneklerde bulunan her bir fitosterol için değerlerin birbirine yakın çıktığı gözlemlenmiştir. Sırasıyla Çizelge 4.27 ve Çizelge 4.28'de verilen istatistiksel sonuçlarla uyumlu olarak, mikrodalga uygulamasının mısır unlarında

tanımlanan fitosterol bileşikleri üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır ($p<0.05$).



Şekil 4.17. Mikroalgla uygulanmayan ve mikroalgla uygulanan mısır unu örneklerinde tanımlanan fitosterollerin miktarlarının karşılaştırılması. a) MF1, MF1T, MF2 ve MF2T örneklerinin sütun grafikleri; b) MF3, MF3T, MF4 ve MF4T örneklerinin sütun grafikleri. Sütunların x eksenini fitosterol bileşiklerini ve y eksenini log₂ ile dönüştürülmüş fitosterol miktarlarını (µg/g) temsil eder. Sütunlardaki çubuklar, n=3 ile ortalama ± standart hatayı (SE) gösterir, aynı

küçük harfler, ortalama değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını gösterir ($p < 0.05$).

Bu çalışma, hem mikrodalga uygulanmayan hem de mikrodalga uygulanan belirli GM içeriği olan mısır unu örneklerinin birincil metabolitlerinin tespitini ve karakterizasyonunu gerçekleştirmek için GC-MS'e dayalı hedefe yönelik olmayan (non-targeted), fitosterol bileşimlerini belirlemek için ise GC-FID analizlerine dayalı hedefe yönelik (targeted) metabolik profil analizlerini içermektedir. Bu araştırmada mısır unu, kimyasal kompozisyon açısından kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada tanımlanan metabolitler, mısırla ilgili önceki çalışmalarla tutarlıdır. GC-MS analizi sonucuna göre, amino asitler, tüm örneklerde birincil metabolitlerin baskın grubu olarak belirlenmiş ve tüm örneklerdeki ana amino asit prolin olup bunu, sırasıyla aspartik asit, alanin ve glutamik asit takip etmiştir. Tüm örneklerde linoleik ve oleik asitler ana yağ asidi bileşikleri olarak belirlenmiştir. Örneklerdeki ana sakkarit, beklendiği gibi indirgen olmayan şeker sakkarozdu ve mikrodalga uygulanan örneklere kıyasla hem MF1 ve MF2 hem de MF3 ve MF4 örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmamıştır ($p < 0.05$). İstatistiksel olarak, hem MF1 ve MF2 hem de MF3 ve MF4 örnekleri için ketoheksozlarda (fruktoz ve sorboz), şeker alkollerinde (glusitol ve miyo-inositol) ve ayrıca şeker asitlerinde (glukonik asit) mikrodalga uygulanmış muadillerine kıyasla anlamlı bir fark saptanmamıştır. Tüm örneklerde belirlenen ana alkol bileşiği gliserol, baskın organik asitler ise glikolik ve malik asitler olmuştur.

Çalışmada tespit edilen birincil metabolitlerin metabolik yollardaki biyolojik işlevlerini daha iyi anlamak için gerçekleştirilen KEGG yolak analizleri sonucunda, metabolik yollara en fazla katkı sağlayan birincil metabolitlerin sırasıyla, yağ asitlerinden palmitik asit, amino asitlerden aspartik asit, şeker ve türevlerinden glikoz ve miyo-inositol, alkollerden gliserol ve organik asitlerden ise bütandioik asit olduğu belirlenmiştir. Çalışmada tanımlanan birincil metabolitlerle ilişkili toplam 68 metabolik yolak listelenmiş ve birincil metabolitlerin, "zma01100, metabolik yolaklar" ve "zma01110, ikincil metabolitlerin biyosentezi" yolakları başta olmak üzere sırasıyla, karbonhidrat metabolizması, amino asit metabolizması, lipid metabolizması ve diğer amino asitlerin metabolizmasıyla ilişkili biyolojik yollara katıldığı belirlenmiştir.

Mısır, buğday, pirinç ve yulaf gibi yaygın tahıllar arasında içerdiği karotenoidler, fenolik asitler ve fitosteroller gibi çeşitli ana ikincil metabolitler sayesinde en yüksek antioksidan aktiviteye sahip bir besindir. Mısırın içerdiği sitosterol ve stigmasterol gibi yaygın fitosteroller, bu tahılın öne çıkan fitokimyasal bileşenleridir [286]. Çalışmada, GC-FID analizi sonucuna göre, stigmasterol ve β -sitosterol, mikrodalga uygulanmayan mısır unu örnekleri ile mikrodalga uygulanan formlarında baskın fitosteroller olarak tespit edilmiştir. Mikrodalga uygulamasının bütün mısır unu örneklerinde tanımlanan fitosterol bileşikleri için istatistiksel olarak anlamlı farklılık yaratmadığı ortaya konmuştur, $p < 0.05$.

4.4. Lipidomik Analiz Sonuçları

4.4.1. GC-FID Analizi ile Tanımlanan Yağ Asitleri

Son yıllarda, gıdalarda ve gıda bileşenlerinde yağ asitlerinin içeriğinin ve bileşiminin belirlenmesine ilgi artmış, bu da GC-FID veya GC-MS kullanılarak yağ asitlerinin miktarının belirlenmesine yönelik analitik yöntemlerin geliştirilmesine ve doğrulanmasına yol açmıştır [287]. Bu çalışmada, GC-MS ile sadece dört yağ asidi tespit edildiğinden, tüm örneklerde kalan tanımlanamayan yağ asitleri, GC-FID kullanılarak standartlarla özelliklerinin karşılaştırılmasıyla doğrulanmıştır. Tanımlanan yağ asitlerine ait GC-FID kromatogram görüntüleri EK 12-A ve EK 12-B'de sunulmuştur. Yağ asitlerinin hesaplanan miktarları (%) ise sırasıyla Çizelge 4.29 ve Çizelge 4.30'da verilmiştir. Mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan bütün mısır unu örneklerinde toplam 10 yağ asidi tanımlanmış olup, en yüksek miktarda linoleik ve oleik asitleri tespit edilmiştir. Jahaniaval ve arkadaşları (2000) mısır tanelerinde bulunan iki ana yağ asidinin linoleik asit (%56.5) ve oleik asit (%27.8) olduğunu göstermiştir [288]. Çalışmamızda eser miktarda stearik, linolenik, araşidik ve eikosenoik asitleri tespit edilmiştir.

Çizelge 4.29 incelendiğinde, mikrodalga uygulanan muadili (MF1T) ile karşılaştırıldığında MF1'in tüm yağ asidi içeriklerinde istatistiksel olarak anlamlı farklar gözlenmemiştir, $p < 0.05$. Benzer şekilde, iki yağ asidi dışında, mikrodalga işleminden sonra MF2 örneklerinin yağ asidi bileşiminde de anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ($p < 0.05$). Çoklu karşılaştırma testlerine göre mikrodalga işleminden sonra stearik asit ve araşidik asit miktarları bir miktar azalmıştır ($p < 0.05$).

Çizelge 4.30 incelendiğinde ise, mikrodalga uygulamasından sonra MF3 örneğinde kaproik, kaprik, miristik, palmitik ve stearik asit miktarlarında hafif bir artış gözlemlenirken, oleik ve linoleik asit miktarlarında hafif bir azalış gözlemlenmiştir. Geri kalan yağ asidi miktarlarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ($p<0.05$). Mikrodalga uygulamasından sonra MF4'ün genel olarak yağ asidi bileşimi miktarlarında hafif bir azalış gözlemlenmiş olup, eikosenoik asit miktarında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p<0.05$).

Çizelge 4.29. Mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örneklerinin yağ asidi içerikleri (%) (Normalleştirilmiş veriler EK 13-A'da gösterilmiştir).

RT (dk)	Yağ Asitleri*	MF1 (% < 0.1 GM MIR604)	MF1T** (% < 0.1 GM MIR604)	MF2 (% 75 GM MIR604)	MF2T** (% 75 GM MIR604)
4.583	C6:0	7.351 ± 1.145 ^b	6.442 ± 0.420 ^b	13.933 ± 2.918 ^a	14.647 ± 0.449 ^a
7.917	C10:0	5.856 ± 1.260 ^b	5.682 ± 0.155 ^b	15.253 ± 0.482 ^a	14.398 ± 0.565 ^a
12.252	C14:0	3.288 ± 0.512 ^b	3.457 ± 0.121 ^b	9.887 ± 0.312 ^a	9.076 ± 0.747 ^a
17.273	C16:0	8.004 ± 0.077 ^a	8.032 ± 0.041 ^a	6.362 ± 0.302 ^b	6.701 ± 0.289 ^b
21.657	C18:0	1.368 ± 0.119 ^c	1.228 ± 0.023 ^c	3.242 ± 0.166 ^a	2.444 ± 0.328 ^b
22.176	C18:1	24.219 ± 1.022 ^a	24.567 ± 0.347 ^a	15.054 ± 0.888 ^b	15.798 ± 0.588 ^b
23.100	C18:2	47.680 ± 2.635 ^a	48.851 ± 0.364 ^a	32.748 ± 2.120 ^b	34.209 ± 0.952 ^b
24.714	C18:3	1.746 ± 0.554 ^b	1.289 ± 0.078 ^b	2.449 ± 0.078 ^a	1.899 ± 0.139 ^{ab}
25.567	C20:0	0.169 ± 0.034 ^b	0.178 ± 0.034 ^b	0.454 ± 0.081 ^a	0.245 ± 0.033 ^b
25.750	C20:1	0.319 ± 0.026 ^b	0.273 ± 0.013 ^b	0.621 ± 0.105 ^a	0.584 ± 0.139 ^a
	UFA/SFA oranı	2.841	2.997	1.035	1.105

RT: Her bir yağ asidinin alıkonma zamanı

*: C6:0 - kaproik asit; C10:0 - kaprik asit; C14:0 - miristik asit; C16:0 - palmitik asit; C18:0 - stearik asit; C18:1-oleik asit; C18:2 - linoleik asit; C18:3 - linolenik asit; C20:0 - araşidik asit; C20:1 - eikosenoik asit; UFA: Doymamış yağ asidi; SFA: Doymuş yağ asidi

** : Mikrodalga işlemleri (600 W, 2 dk)

Bir satır içinde farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=4) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, $p < 0.05$.

Çizelge 4.30. Mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örneklerinin yağ asidi içerikleri (%) (Normalleştirilmiş veriler EK 13-B'de gösterilmiştir).

RT (dk)	Yağ Asitleri*	MF3 (% < 0.02 GM MON810)	MF3T** (% < 0.02 GM MON810)	MF4 (% 5 GM MON810)	MF4T** (% 5 GM MON810)
4.660	C6:0	0.844 ± 0.005 ^c	1.179 ± 0.010 ^b	1.839 ± 0.005 ^a	0.703 ± 0.023 ^d
8.043	C10:0	0.981 ± 0.007 ^c	1.288 ± 0.015 ^b	2.168 ± 0.009 ^a	0.440 ± 0.035 ^d
12.420	C14:0	0.797 ± 0.007 ^c	0.890 ± 0.010 ^b	1.894 ± 0.015 ^a	0.164 ± 0.008 ^d
17.487	C16:0	9.872 ± 0.013 ^c	9.950 ± 0.011 ^b	9.648 ± 0.023 ^d	10.553 ± 0.028 ^a
21.895	C18:0	1.852 ± 0.006 ^d	2.196 ± 0.003 ^b	4.722 ± 0.012 ^a	2.083 ± 0.009 ^c
22.425	C18:1	27.561 ± 0.020 ^b	27.281 ± 0.029 ^c	25.844 ± 0.015 ^d	28.046 ± 0.040 ^a
23.383	C18:2	56.255 ± 0.034 ^a	55.427 ± 0.027 ^c	52.141 ± 0.016 ^d	56.115 ± 0.121 ^b
24.959	C18:3	1.236 ± 0.023 ^a	1.195 ± 0.015 ^a	1.087 ± 0.037 ^b	1.272 ± 0.068 ^a
25.998	C20:0	0.362 ± 0.006 ^c	0.358 ± 0.003 ^c	0.437 ± 0.011 ^a	0.383 ± 0.012 ^b
26.427	C20:1	0.240 ± 0.007 ^a	0.237 ± 0.003 ^a	0.222 ± 0.005 ^a	0.241 ± 0.030 ^a
	UFA/SFA oranı	5.799	5.305	3.829	5.981

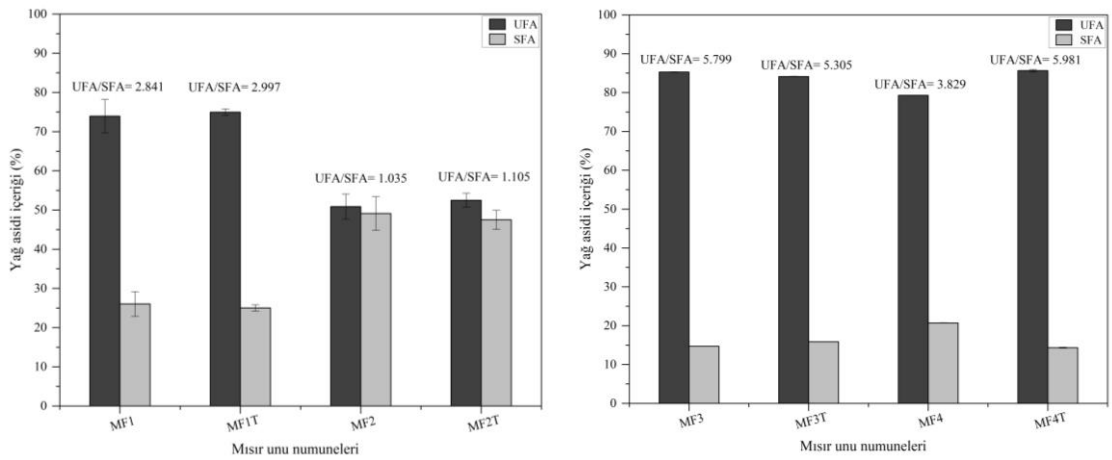
RT: Her bir yağ asidinin alıkonma zamanı

*: C6:0 - kaproik asit; C10:0 - kaprik asit; C14:0 - miristik asit; C16:0 - palmitik asit; C18:0 - stearik asit; C18:1-oleik asit; C18:2 - linoleik asit; C18:3 - linolenik asit; C20:0 - araşidik asit; C20:1 - eikosenoik asit; UFA: Doymamış yağ asidi; SFA: Doymuş yağ asidi

** : Mikrodalga işlemleri (600 W, 2 dk)

Bir satır içinde farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=4) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, $p < 0.05$.

Beslenme kalite indeksinin (NQI), yağ asidi bileşiminin çeşitli endeksleri ile belirlendiği bildirilmiştir. Bu ölçümler EPA+DHA endekslerini, PUFA/SFA oranını, ω -3/ ω -6 PUFA oranlarını ve UFA/SFA oranlarını da içermektedir [289, 290]. Çalışmada, analiz edilen mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örneklerindeki yağ asidi bileşimlerinin beslenme kalitesini belirtmek için UFA/SFA oranı hesaplanmıştır. İncelenen tüm örneklerde UFA'ların baskın olması nedeniyle UFA/SFA oranları 1'den yüksek hesaplanmıştır (Şekil 4.18). Literatüre göre, test edilen üzüm çekirdeği unları ve mısır polen örnekleri için UFA/SFA oranı değerleri 1.6'dan yüksek çıkmıştır [291-293]. MF2 ve MF2T örnekleri dışında diğer kalan örnekler (MF1, MF1T, MF3, MF3T ve MF4, MF4T) için hesaplanan UFA/SFA oranı bu değerden yüksek olduğu için, bu örneklerin iyi bir beslenme kalitesi sergiledikleri ve yağ asidi bileşimleri göz önüne alındığında UFA kaynağı olarak kullanılma potansiyeline sahip oldukları söylenebilir (Çizelge 4.29 ve Çizelge 4.30). Benzer şekilde araştırmalar, buğday, arpa, darı ve kinoa gibi tahılların [290] yanı sıra karabuğday, mısır ve kavuzlu buğdayın [133] mükemmel UFA kaynakları olduğunu göstermiştir; çünkü içerdikleri UFA/SFA değerleri 1.6'dan yüksek çıkmıştır.



Şekil 4.18. Mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örneklerinde doymamış (UFA) ve doymuş yağ asitlerinin (SFA) yağ asidi oranları (%).

Yağ asitleri, birçok metabolik süreçte önemli rol oynayan güçlü sinyal molekülleri olarak giderek daha fazla tanınmaktadır. Bu nedenle, yağ asitlerinin kantitatif olarak belirlenmesi ve yağ asidi profillerinin araştırılması, lipid analizinde temel bir konu haline gelmiştir [294]. Yağ asitlerinin gaz kromatografisi (GC) ile analizi, polariteleri ve yetersiz uçuculukları nedeniyle oldukça karmaşıktır. GC analizi için önce, polar karbonil

gruplarını daha uçucu ve polar olmayan türevlere dönüştürmek gereklidir. Bu dönüşüm sürecinde, yağ asitleri genellikle yağ asidi metil esterlerine (FAME'ler) dönüştürülmektedir. Bu türevleme işlemi, GC ile analizin daha etkili ve hassas olmasını sağlamaktadır. FID, GC dedektörü olarak kullanıldığında, özellikle FAME'lerin güvenilir bir şekilde belirlenmesi konusunda tercih edilmektedir. Bu dedektörün stabilitesi ve yüksek hassasiyeti, yağ asitlerinin analizinde güvenilir sonuçlar elde etmek için önemli bir avantaj sağlamaktadır [295, 296].

Yağ asitlerinin gıda kalitesi üzerindeki önemli etkileri, bu bileşenlerin ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmesini gerektirmektedir. Bu çalışmada, mikrodalga uygulanmayan ve uygulanan mısır unu örneklerindeki yağ asidi kompozisyonlarını hassas bir şekilde belirlemek amacıyla güçlü bir analitik teknik olan GC-FID sistemi kullanılmıştır. Örneklerde doymamış yağ asidi (UFA) bileşikleri olarak linoleik ve oleik asitler ana yağ asidi bileşikleri olarak tespit edilmiştir. Ayrıca tüm örneklerde doymuş yağ asidi (SFA) olarak palmitik ve stearik asitler elde edilmiştir. Tukey testine göre ($p < 0.05$), hem MF1 ve MF2 hem de MF3 ve MF4 örneklerinde mikrodalga uygulamasından sonra yağ asitleri için önemli bir fark gözlemlenmemiştir. Ek olarak, UFA/SFA oranı, örneklerin yağ asidi bileşiminin beslenme kalitesini göstermek için hesaplanmıştır. MF2 ve MF2T örnekleri dışındaki diğer örneklerin (MF1, MF1T, MF3, MF3T ve MF4, MF4T), iyi bir beslenme kalitesi sergiledikleri ve yağ asidi bileşimleri göz önüne alındığında UFA kaynağı olarak kullanılabilir potansiyele sahip oldukları belirlenmiştir.

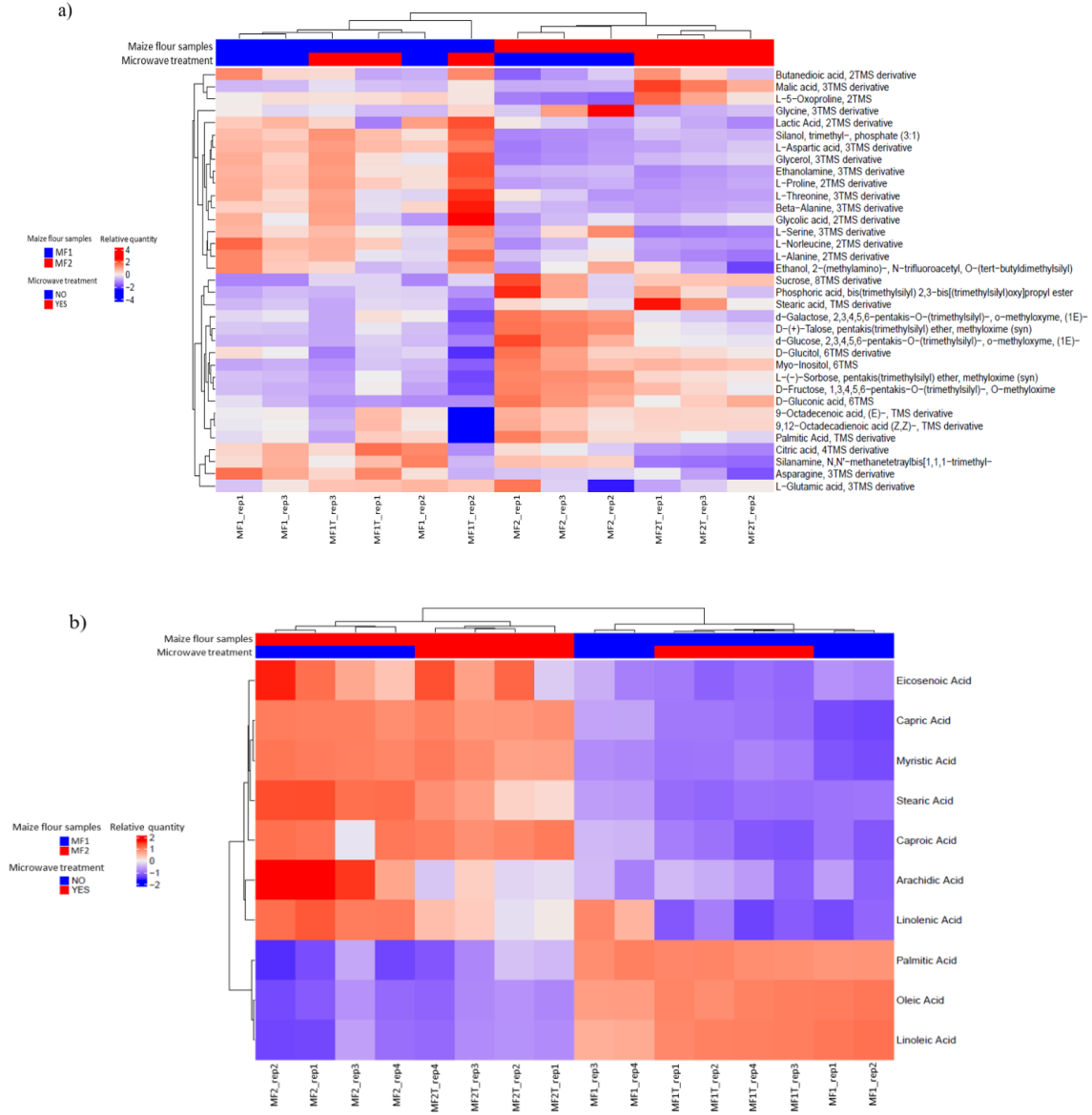
4.5. HCA ve PCA Analizleri

Hiyerarşik Kümeleme Analizi (HCA) ve Temel Bileşen Analizi (PCA), veriler ve gruplandırma arasındaki ilişkinin belirsiz olduğu durumlarda örnekler arasındaki benzerlikleri keşfetmek için kullanılmaktadır [107]. Bu tez çalışmasında, hem GC-MS ile elde edilen birincil metabolit profillerine hem de GC-FID ile elde edilen yağ asidi bileşimlerine ait normalize veri setlerini değerlendirmek amacıyla MF1 (mikrodalga uygulanmayan %<0.1 GM MIR604), MF1T (mikrodalga uygulanan %<0.1 GM MIR604) ve MF2 (mikrodalga uygulanmayan %75 GM MIR604), MF2T (mikrodalga uygulanan %75 GM MIR604) örnekleri üzerinde HCA ve PCA analizleri gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada, HCA'ya dayalı olarak oluşturulan ısı haritaları, hem mısır unu örneklerinin ölçüm tekrarlarının davranışını hem de mikrodalga uygulamasının örneklerin birincil metabolit profilini ve yağ asidi bileşimini nasıl etkilediğini göstermektedir. Şekil 4.19-a'da verilen ısı haritasında, MF1 ve MF2 örnekleri iki ayrı alt küme halinde gruplanmıştır. MF1 ve mikrodalga uygulanmış örneği (MF1T), önceden sunulan Tukey testi sonuçlarıyla tutarlı olarak tanımlanan birincil metabolit gruplarında önemli bir fark göstermemiştir. HCA, tüm örnek tekrarlarının birbirine oldukça yakın elde edildiğini ortaya çıkarmıştır. MF1T_rep2 örneğinin ise, grubundaki diğer tekrarları gibi davranmadığı gözlemlenmiştir.

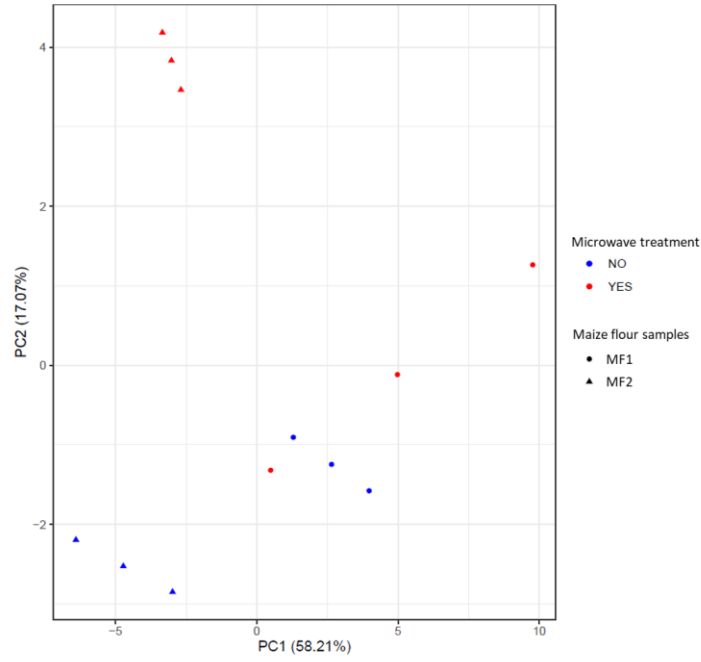
Şekil 4.19-b'de yer alan normalize yağ asidi miktarlarına ilişkin ısı haritası, MF1 ve MF2 örneklerinin iki farklı alt kümede gruplandığını ve tekrarların beklenen birlikte kümelenmeyi gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Tukey testinin sonuçlarıyla uyumlu olarak, hem MF1 ve mikrodalga uygulanmış formu (MF1T) arasında hem de MF2 ve mikrodalga uygulanmış formu (MF2T) arasında yağ asidi miktarları açısından önemli bir fark gözlemlenmemiştir.

Çalışma kapsamında PCA ise, mikrodalga uygulamasının örneklerin kimyasal profilleri üzerindeki etkisini daha iyi anlamak ve elde edilen bileşiklerin log₂ ile dönüştürülmüş miktarlarına dayalı olarak örnek gruplarını sınıflandırmak için kullanılmıştır. Şekil 4.20-a'da, MF1 ve MF2 gruplarına ait birincil metabolitlerin PCA'sı, ilk iki ana bileşenin gözlemlenen verilerin toplam varyasyonunun %75.28'ini oluşturduğunu göstermiştir. Birinci ana bileşen, MF1 ve MF1T örneklerini, MF2 ve MF2T örneklerinden ayırmıştır. MF1 ve MF1T örneklerinin ise ayrı kümeler oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, MF2 ve MF2T örnekleri, ısı haritasında gözlenen durumu yansıtan en üstteki temel bileşenler (PC1 ve PC2) tarafından ayrılabilir. PCA, tüm örnek tekrarlarının birbirine oldukça yakın elde edildiğini göstermiştir.

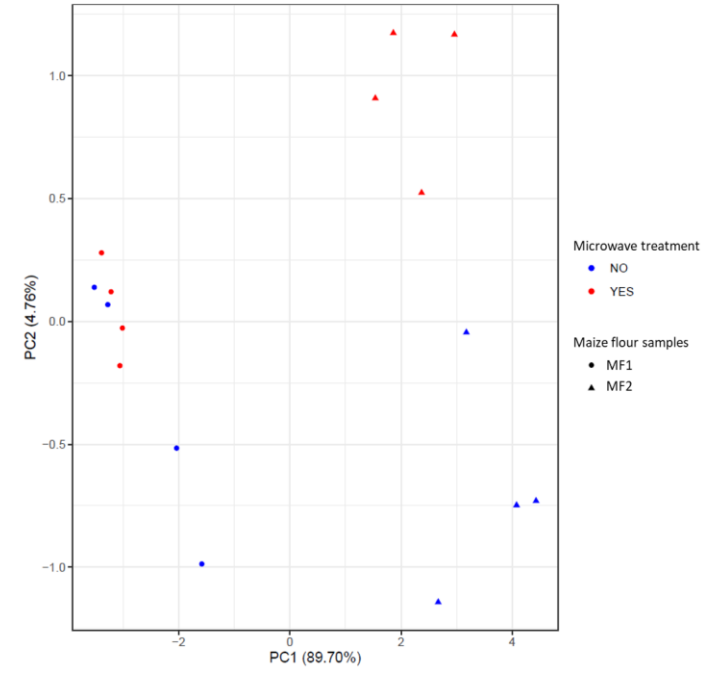


Şekil 4.19. Mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örneklerindeki bileşiklerin normalize edilmiş miktarlarına dayanan hiyerarşik kümelemenin ısı haritası: (a) GC-MS ile elde edilen birincil metabolitlerin HCA'sı; (b) GC-FID ile elde edilen yağ asitlerin HCA'sı.

a)



b)



Şekil 4.20. Mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örneklerindeki bileşiklerin normalize edilmiş miktarlarına dayanan PCA görüntüleri: (a) GC-MS ile elde edilen birincil metabolitlerin PCA'sı; (b) GC-FID ile elde edilen yağ asitlerin PCA'sı. Mavi Nokta: MF1, Kırmızı Nokta: MF1T; Mavi Üçgen: MF2 ve Kırmızı Üçgen: MF2T örneklerinin verileri.

Yağ asidi profillerinin PCA grafiğinde (Şekil 4.20-b), birinci bileşen PC1, varyansın %89.70'ini oluşturmuş, MF1 ve MF1T örneklerini MF2 ve MF2T örneklerinden ayırmıştır. MF1 örneklerinin ve bunların mikrodalga uygulanan formlarının (MF1T) birbirinden ayırt edilemez olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, örnek gruplarının tekrar ölçümleri genellikle birbirine yakın bir şekilde kümelenmiştir.

Sıvı kromatografisi (LC) veya gaz kromatografisi (GC) tabanlı platformlar, çok sayıda bileşeni aynı anda analiz etmede oldukça verimlidir. Bu yöntemlerle elde edilen bilgileri anlamak ve incelenen farklı örneklem grupları arasında ayırım yapmak için çok değişkenli analizin matematiksel araçları büyük bir öneme sahiptir [297]. HCA ve PCA'nın gıda bilimindeki kromatografik çalışmalarda kullanımı, özellikle geniş veri setlerinin analiz edilmesi ve yorumlanması için son yıllarda artmıştır [107]. Bu iki çok değişkenli analiz tekniği, un verilerinin analizinde değerli araçlar olabilir ve hemen fark edilmeyen kalıpları ve ilişkileri tanımlamaya yardımcı olabilir [298].

Çalışmada uygulanan HCA ve PCA çok değişkenli analiz yöntemleri, MF1, MF1T, MF2 ve MF2T örneklerine ait veri setlerinin iyi bir tekrarlanabilirlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu çalışma, HCA/PCA yöntemlerinin, GC analizleriyle tanımlanan kimyasal bileşiklerin normalize edilmiş verilerine göre mikrodalga uygulanmayan ve uygulanan mısır unu örnekleri için yeterli araçlar sunduğunu göstermiştir.

5. YORUM

Gıda biliminde omik teknolojilerin kullanımı, paydaşların refahını, sağlığını ve güvenini arttırmak için gelişmiş analiz teknolojileriyle entegre edilmiş gıda ve beslenmenin özel alanı olan “Foodomics (Gıda omik)” bilim alanını ortaya çıkarmıştır. Disiplin, gıda kalitesi, özgünlük, izlenebilirlik, sürdürülebilirlik, yasal konular, güvenlik, bütünlük konularında ilgili tarafların ihtiyaçlarını geniş bir perspektifle ele alınmasını öngörmektedir. Bu çalışmada, gıda matrisi karakterizasyonunda kullanılan omik teknikleri ile mikrodalga uygulanmayan ve uygulanan birbirinden farklı GM çeşitleri MIR604 ve MON810 mısırdan elde edilen unların omik yaklaşım ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Buna göre;

- 1) Genomik analizler kapsamında kullanılan kalitatif PCR yöntemiyle, hem mikrodalga uygulanmayan hem de mikrodalga uygulanan GM MIR604 içeren mısır unu örneklerinde T-NOS genetik elementinin ve GM MON810 içeren örneklerde ise P-35S elementinin tespit edilebildiği görülmüştür. GM içermeyen tüm örneklerde P-35S, P-FMV ve T-NOS genetik elementlerinin bulunmadığı ortaya konmuştur. Ayrıca, analiz edilen tüm örneklerde bitkiye özgü ACT elementinin varlığı da gösterilmiştir. Tüm örnekler için gerçekleştirilen DNA ekstraksiyonunun yüksek konsantrasyon ve saflıkla etkili olması, kalitatif PCR tarama testlerinin kullanılabilirliğini desteklemiştir. Bu çalışmada gerçekleştirilen kalitatif GMO tarama testleri güvenilir sonuçlar vermiştir.

Mikrodalga veya diğer gıda prosesleri uygulanan GM mısır unu örneklerinde düşük seviyeli tespit hassasiyeti ile genetik modifikasyonu izlemek ve tespit etmek için GMO tanımlama analizi ve kantitatif yöntemler gibi ileri analizlerin gerçekleştirilmesine yönelik çalışmalar önerilebilir.

- 2) Transkriptomik çalışmalara dayanan gen ekspresyonu analizleri, belirli koşullar altında belirli bitki dokusundaki transkripsiyon aktivitesine bakış sundukları için çok önemlidir. Tez kapsamında kullanılan mısır unu örneklerinden ekstrakte edilen RNA örnekleri için RNA-sekanslama (RNA-Seq) analizinin yapılması hedeflenmiştir. Ancak, optimizasyon çalışmaları sonrasında, RNA bütünlük numarası (RIN) değerlerinin yeni nesil sekanslama (NGS) analizleri için yeterli

olmadığı saptanmıştır. Mısır unu gibi işlenmiş gıda matrislerinin karakterizasyonu için genellikle yüksek RIN değerleri elde edilemediği bilinmektedir. Çalışmada kullanılan deney materyallerinin canlı hücre içermemesi ve yasal kısıtlamalara bağlı olarak laboratuvar düzeyinde dahi olsa ekim/dikim ve hasat yapılamaması transkriptomik çalışmalar için hedeflenen RNA sekanslama analizlerinin gerçekleştirilememesine zemin hazırlamıştır. Bu nedenle, ülkemizde GM gıda bitkileri ve ürünlerine yönelik saha denemeleri gibi bilimsel çalışmaların yürütülmesi için yapısal değişimin gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu tez çalışmasında, RNA-Seq analizi yerine elde edilen RIN değerlerini tolere edebilen yüksek hassasiyete sahip qPCR sistemi kullanılmıştır. Bu çalışma, mikrodalga uygulanan mısır ununda RNA'nın ekstraksiyonu, cDNA'nın sentezlenmesi ve gen ekspresyonunun tanımlanması hakkında ayrıntılı bilgi sağlamaktadır. Bu çalışmada güçlü potansiyele sahip RT-qPCR sistemi kullanılarak, mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örneklerinde Argonot (*ZmAGO1a*) ve Reseptör benzeri protein kinaz (*ZmRLK9*) enzim genlerinin tanımlanabilir ve ölçülebilir olduğu gösterilmiştir.

Sonuçlar, farklı gıda işleme tekniklerine tabi tutulan mısır çeşitlerinde bu genlerin tanımlanması ve ölçülmesiyle ilgili yöntemleri geliştirmeyi amaçlayan gelecekteki araştırmalar için bir temel görevi görmektedir.

- 3) Mikrodalga işleminin çeşitli gıda ürünlerinin özellikleri üzerindeki etkileri kapsamlı bir şekilde incelenirken, metabolit profili üzerindeki etkisi şimdiye kadar nispeten daha az ilgi görmüştür. Mikrodalga uygulamasının mısır ununun birincil ve ikincil metabolit profili üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılması, gıda endüstrisindeki mikrodalga uygulamalarının arttırılması açısından da değerli olacaktır. Bu tez çalışması, mikrodalga işleminin mısır unlarının metabolit profilleri üzerindeki etkilerinin GC teknikleri kullanılarak yorumlanmasına ve mısır ununun mikrodalga ile işlenmesine ilişkin araştırmalardaki boşluğun kimyasal bileşim açısından doldurulmasına katkı sağlayacaktır. Bulgular ayrıca, mikrodalga uygulamasından sonra mısır unu bileşenlerinin izlenmesi ve kontrol edilmesi için bir temel oluşturulmasına da katkıda bulunmaktadır.

Gıda işleme yöntemleri uygulanan tahıl unları üzerinde az sayıda metabolit profilleme çalışması yapılmış olsa da, çalışmadaki bulgular, mısır unu ve diğer tahıl unlarına mikrodalga uygulanmasıyla ilgili gelecekteki araştırmalar için biyokimyasal parmak izine ait temel bilgiler sağlamaktadır. Çalışmada karakterizasyon amacıyla kullanılan yöntemler ve metabolik profil araçları, birincil ve ikincil metabolitlerin anlaşılmasına ve bunların gıda ve sağlık üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesine, gıda besin değerlerinin incelenmesine ve gıda gerçekliğinin (otantisite ya da otantiklik) ortaya konmasına ilişkin gelecekteki çalışmalar için de önem arz etmektedir.

- 4) Yağ asitlerinin gıda ürünlerinde hassas bir şekilde tespit edilmesi ve kantitatif olarak belirlenmesi, lipid analizlerinin temelini oluşturan bir süreçtir. Ayrıca, yağ asidi profillerinin detaylı bir şekilde incelenmesi, bu analizlerin önemini arttırmaktadır. Bu çalışmada, güçlü bir platform olan GC-FID, mikrodalga uygulanmayan ve mikrodalga uygulanan mısır unu örneklerindeki yağ asitlerinin analizi ve örneklere özgü yağ asidi profilinin ortaya konması için başarıyla kullanılmıştır. Mısır unu örneklerinde FAME türevlendirmesi yapılan yağ asitlerinin polar bir kolonun kullanılmasıyla birbirinden ayrılması sağlanarak, hem doymamış yağ asitlerinin (UFA) hem de doymuş yağ asitlerinin (SFA) hassasiyetle tespit edilebilmesi de mümkün olmuştur. Beslenme kalite indeksinin bir parametresi olan UFA/SFA oranları belirlenerek hem mikrodalga uygulanmayan hem de mikrodalga uygulanan örneklerin yağ asidi bileşimlerine bağlı olarak potansiyel UFA kaynağı olabileceği gözlemlenmiştir.

Omik teknolojileri, geleneksel yöntemlere göre daha geniş bir perspektif sunarak, çeşitli genlerin, proteinlerin ve metabolitlerin detaylı analizini sağlamaktadır. Bu teknolojiler aynı zamanda gıda güvenliği araştırmalarında da etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), GM gıda bitkilerinin ve ürünlerinin risk değerlendirmesinde karşılaştırmalı kompozisyonel analizlerin kapsamını genişletebilecek omik araçları gibi profil oluşturma teknolojilerinin geliştirilmesini ve kullanılmasını önermiştir. Gerçekleştirilen bu tez çalışması, gıda prosesi uygulanan ve uygulanmayan GM gıda ürünlerinin analizi için farklı omik alanlarını birleştirmeye yönelik sistematik bir karakterizasyon yaklaşımı sunmaktadır. Bu yaklaşım, hem alternatif gıda işleme

teknikleri hem de genetik mühendisliği uygulanarak üretilen yeni gıdaların kompozisyonel açıdan risk değerlendirmesi için omik teknolojilerin kullanılabilirliğini öngörmektedir.

Çalışma, mikrodalga uygulaması etkisine bağlı GM mısır ununun hem moleküler ve kimyasal kompozisyonlarında meydana gelebilecek potansiyel değişimlerin gözlemlenmesi hem de kompozisyon analizlerinin gerçekleştirilmesi için omik teknolojilerin kullanılabilmesi konusunda rehberlik sağlamasının yanı sıra, elde edilen analiz sonuçları doğrultusunda, Türkiye’de de gıda kompozisyonu açısından risk değerlendirme amaçlı süreçlerde göz önünde bulundurulması gereken ve omik araçların kullanımına olanak tanıyabilecek sonuçları ortaya koymuştur. Bu yaklaşım, GM gıda ürünlerine uygulanan gıda prosesleri sonrasında, DNA’ya dayalı genomik analizler aracılığıyla GM ürünlerdeki genetik elementlerin tespit edilebileceğini, RT-qPCR ile gerçekleştirilecek transkriptomik analizler sayesinde uygulamaya bağlı gen ekspresyon profillerinin belirlenebileceğini, ayrıca metabolomik ve lipidomik analizler ile kompozisyonel karakterizasyonun yapılabileceğini ve elde edilen sonuçların multiomik veri analizi sonrasında gıda kompozisyonu açısından risk değerlendirmesinde de kullanılabilmesini desteklemektedir. GM gıda ürünlerinin kompozisyon analizine yönelik risk değerlendirme süreçlerinde kullanılacak ve uygulamaları destekleyecek olan öngörüye ait yaklaşım Şekil 4.21’de sunulmuştur.



Şekil 4.21. Gıda kompozisyonu açısından risk değerlendirme yaklaşımı

Bu yaklaşım, kompozisyon analizi açısından risk değerlendirmesi için amaç ve iş süreçlerinin bazılarını kapsamaktadır. Uygulama, veri elde etme ve değerlendirme süreçlerini gerçekleştirecek insan kaynağının belirlenmesi, bu çalışmaların yapılabilmesi için yüksek teknoloji içeren altyapının sağlanması ve sürdürülebilirliğin devam etmesi açısından finansal konuların tanımlanması gerekmektedir. Bununla birlikte, Şekil 4.21'de sunulan bakış açısına göre, GM ve GM olmayan yeni gıdalara ilgili proseslerin uygulanmasını takiben izlenecek risk değerlendirme süreçleri için öncelikle var olan yasal düzenlemelerin dikkate alınması gerekliliği, çalışmaların yürütülmesi açısından önemle vurgulanmalıdır. İlgili yasal düzenlemeler, bilimsel risk değerlendirme yapılabilmesi açısından, yüksek teknolojiye bağlı çıktılarının eldesine ve değerlendirmesine izin verecek ilkeleri, revizyonları ve değişimi içermelidir.

Çalışmanın önerdiği yaklaşım çerçevesinde, omik teknolojilerin risk değerlendirme planlama sürecindeki kullanımı ve karar verme aşamasına olan etkisi ayrıca araştırılmalıdır. Son olarak, gelecekte gıda bitkilerinin işlenmesine ve elde edilen son ürünlerin karakterizasyonuna dayanan daha fazla ve derin çalışmaların mevcut olacağı umulmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- [1] A. Valdés, G. Álvarez-Rivera, B. Socas-Rodríguez, M. Herrero, E. Ibanez, A. Cifuentes, Foodomics: Analytical opportunities and challenges, *Analytical Chemistry*, 94 (2021) 366-381.
- [2] A. Valdés, A. Cifuentes, C. León, Foodomics evaluation of bioactive compounds in foods, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 96 (2017) 2-13.
- [3] G.V. Barbosa-Cánovas, D. Bermúdez-Aguirre, B.G. Franco, K. Candoğan, G.Y. Shin, Novel food processing technologies and regulatory hurdles. Ensuring Global Food Safety, A. Martinović, S. Oh, H. Lelieveld (Eds), Academic Press, 221-228, **2022**.
- [4] S. Chandrasekaran, S. Ramanathan, T. Basak, Microwave food processing-A review, *Food Research International*, 52 (2013) 243-261.
- [5] A. Cifuentes, Food analysis and foodomics, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 7109.
- [6] S. Li, Y. Tian, P. Jiang, Y. Lin, X. Liu, H. Yang, Recent advances in the application of metabolomics for food safety control and food quality analyses, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61 (2021) 1448-1469.
- [7] G. Theodoridis, A. Pechlivanis, N.S. Thomaidis, A. Spyros, C.A. Georgiou, T. Albanis, ..., FoodOmicsGR_RI Consortium, FoodOmicsGR_RI: A consortium for comprehensive molecular characterisation of food products, *Metabolites*, 11 (2021) 74.
- [8] P. Balkir, K. Kemahlioglu, U. Yucel, Foodomics: A new approach in food quality and safety, *Trends in Food Science & Technology*, 108 (2021) 49-57.
- [9] Y. Yang, M.A. Saand, L. Huang, W.B. Abdelaal, J. Zhang, Y. Wu,, F. Wang, Applications of multi-omics technologies for crop improvement, *Frontiers in Plant Science*, 12 (2021) 563953.
- [10] D. Yadav, A. Tanveer, N. Malviya, S. Yadav, Overview and principles of bioengineering: the drivers of omics technologies. Omics Technologies and Bio-engineering, D. Barh, V. Azevedo (Eds), Academic Press, 3-23, **2018**.

- [11] Metabolomics: An introduction, EMBL-EBI Training, <https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/metabolomics-introduction/> (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [12] J.V. Swinnen, J. Dehairs, A beginner's guide to lipidomics, *The Biochemist*, 44 (2022) 20-24.
- [13] L. Casas, F. Saborido-Rey, A review of genomics methods and bioinformatics tools for the analysis of close-kin mark-recapture, *Frontiers in Marine Science*, 10 (2023) 1113870.
- [14] Biocompare-The Buyer's Guide For Life Scientists, *Genomics Tools*, <https://www.biocompare.com/Lab-Equipment/7184-Genomics-Tools/> (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [15] D. Caetano-Anollés, Polymerase chain reaction. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, S. Maloy, K. Hughes (Eds), Academic Press, 392-395, **2013**.
- [16] L. Garibyan, N. Avashia, Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR), *The Journal of investigative dermatology*, 133 (2013) e6.
- [17] B.C. Delidow, J.P. Lynch, J.J. Peluso, B.A. White, Polymerase chain reaction: basic protocols, *PCR protocols: current methods and applications*, (1993) 1-29.
- [18] J.M. Wages Jr, Polymerase chain reaction, *Encyclopedia of analytical science*, (2005) 243.
- [19] J.Y.H. Tang, Detection of microbiological hazards. *Food Safety Management*, V. Andersen, H. Lelieveld, Y. Motarjemi (Eds), Academic Press, 835-850, **2023**.
- [20] E. Tutar, E. Köksalan, İ. Akyol, Gıdalarda bulunan mikrobiyal patojenlerin karakterizasyonunda Real Time PCR teknolojisi, *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*, 18 (2015) 26-39.
- [21] M.A. Valasek, J.J. Repa, The power of real-time PCR, *Advances in physiology education*, 29 (2005) 151-159.
- [22] M. Hernández, T. Esteve, M. Pla, Real-time polymerase chain reaction based assays for quantitative detection of barley, rice, sunflower, and wheat, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005) 7003-7009.

- [23] C. Peng, P. Wang, X. Xu, X. Wang, W. Wei, X. Chen, J. Xu, Development of a qualitative real-time PCR method to detect 19 targets for identification of genetically modified organisms, SpringerPlus, 5 (2016) 1–6.
- [24] F.L. Zhang, B. Niu, L.J. Chang, Q. Yin, P. Luo, D. Wang, ... Q. Deng, A new construct specific real-time PCR method for screening GMO ingredients with *gat-tpinII* cassette in foods, feeds and seeds, Food Control, 86 (2018) 266-274.
- [25] S.S. Al Mazrooei, D.R. Alreshidi, PCR-screening of genetically modified organisms in food and feed products sold in Kuwait's market, Kuwait Journal of Science, (2023) 100074.
- [26] N. Marmiroli, E. Maestri, M. Gulli, A. Malcevschi, C. Peano, R. Bordoni, G. De Bellis, Methods for detection of GMOs in food and feed, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 392 (2008) 369-384.
- [27] M.J. Holden, M. Levine, T. Scholdberg, R.J. Haynes, G.R. Jenkins, The use of 35S and *Tnos* expression elements in the measurement of genetically engineered plant materials, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 396 (2010) 2175-2187.
- [28] Y. Wang, C. Peng, L. Ding, Z. Su, X. Chen, X. Wang, M. Sun, J. Xu, An accurate, rapid and cost-effective method for T-nos detection based on CRISPR/Cas12a, Foods, 12 (2023) 615.
- [29] M. Querci, M. Van den Bulcke, J. Žel, G. Van den Eede, H. Broll, New approaches in GMO detection, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 396 (2010) 1991-2002.
- [30] H.A. Oraby, A.A. Hassan, A.A. Abou Mossallam, Screening food products for the presence of CaMV 35S promoter and NOS 3' terminator, Journal of the Science of Food and Agriculture, 85 (2005) 1974-1980.
- [31] P. Safaei, S. Rezaie, M. Alimohammadi, S. Agha Kuchak Afshari, M. Mehdizadeh, E. Molaee Aghaee, Qualitative PCR-based detection of genetically modified soy and maize products in Iran, International Journal of Food Properties, 23 (2020) 459-469.
- [32] J. Leão-Buchir, O.C.N. Pedro, A.M. Milisse, A.M. Mabuie, L. De-Araujo, L. das Neves, D. Correia, Detection of genetically modified organisms in food products

- commercialized in Mozambique, *African Journal of Food Science*, 16 (2022) 22-29.
- [33] D. Moor, M. Liniger, L. Grohmann, R. Felleisen, Real-time PCR method for the detection of figwort mosaic virus (FMV) to complement the FMV 34S promoter-specific PCR assay used for screening of genetically modified plants, *European Food Research and Technology*, 235 (2012) 835-842.
- [34] N. Raghavachari, N. Garcia-Reyero, Overview of gene expression analysis: transcriptomics, *Gene Expression Analysis: Methods and Protocols*, (2018) 1-6.
- [35] M. Moebes, H. Kuhlmann, D. Demidov, I. Lermontova, Optimization of quantitative reverse transcription PCR method for analysis of weakly expressed genes in crops based on rapeseed, *Frontiers in Plant Science*, 13 (2022) 954976.
- [36] M.W. Pfaffl, Relative quantification. Real-time PCR, M. Dorak (Eds), Taylor & Francis, London, 89-108, 2006.
- [37] Y. Lin, C. Zhang, H. Lan, S. Gao, H. Liu, J. Liu, ..., S. Zhang, Validation of potential reference genes for qPCR in maize across abiotic stresses, hormone treatments, and tissue types, *PloS one*, 9 (2014) e95445.
- [38] S. Dhanasekaran, T.M. Doherty, J. Kenneth, TB Trials Study Group, Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification, *Journal of Immunological Methods*, 354 (2010) 34-39.
- [39] S.A. Bustin, Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems, *Journal of Molecular Endocrinology*, 29 (2002) 23-39.
- [40] M.W. Pfaffl, G.W. Horgan, L. Dempfle, Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, *Nucleic Acids Research*, 30 (2002) e36.
- [41] R. Harshitha, D.R. Arunraj, Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification, *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 49 (2021) 800-812.
- [42] L. Zhai, F. Teng, K. Zheng, J. Xiao, W. Deng, W. Sun, Expression analysis of Argonaute genes in maize (*Zea mays* L.) in response to abiotic stress, *Hereditas*, 156 (2019) 1-10.

- [43] D. Xu, H. Yang, C. Zou, W. Li, Y. Xu, C. Xie, Identification and functional characterization of the *AGO1* ortholog in maize, *Journal of Integrative Plant Biology*, 58 (2016) 749-758.
- [44] H. Zhang, R. Xia, B.C. Meyers, V. Walbot, Evolution, functions, and mysteries of plant ARGONAUTE proteins, *Current Opinion in Plant Biology*, 27 (2015) 84-90.
- [45] Y. Cui, X. Lu, X. Gou, Receptor-like protein kinases in plant reproduction: Current understanding and future perspectives, *Plant Communications*, (2022).
- [46] J.C. Walker, R. Zhang, Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the S-locus glycoproteins of *Brassica*, *Nature*, 345 (1990) 743-746.
- [47] K. Wei, Y. Wang, D. Xie, Identification and expression profile analysis of the protein kinase gene superfamily in maize development, *Molecular Breeding*, 33 (2014) 155-172.
- [48] K. Wei, Y. Wang, X. Zhong, S. Pan, Protein kinase structure, expression and regulation in maize drought signaling, *Molecular Breeding*, 34 (2014) 583-602.
- [49] Y. Qian, Y. Cheng, X. Cheng, H. Jiang, S. Zhu, B. Cheng, Identification and characterization of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families in maize, *Plant Cell Reports*, 30 (2011) 1347-1363.
- [50] C. He, J. Wang, R. Dong, H. Guan, T. Liu, C. Liu, Q. Liu, L. Wang, Overexpression of an antisense RNA of maize receptor-like kinase gene *ZmRLK7* enlarges the organ and seed size of transgenic *Arabidopsis* plants, *Frontiers in Plant Science*, 11 (2020) 579120.
- [51] G. Yang, H. Zou, Y. Wu, H. Liu, Y. Yuan, Identification and characterisation of candidate genes involved in chilling responses in maize (*Zea mays* L.), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 106 (2011) 127-141.
- [52] M. Corujo, M. Pla, J. van Dijk, M. Voorhuijzen, M. Staats, M. Slot, ..., E. Kok, Use of omics analytical methods in the study of genetically modified maize varieties tested in 90 days feeding trials. *Food Chemistry*, 292 (2019) 359-371.
- [53] R. Kumar, A. Bohra, A.K. Pandey, M.K. Pandey, A. Kumar, Metabolomics for plant improvement: status and prospects, *Frontiers in Plant Science*, 8 (2017) 1302.

- [54] O. Fiehn, Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes, *Plant Molecular Biology*, 48 (2002) 155-171.
- [55] M.F. Turner, A.L. Heuberger, J.S. Kirkwood, C.C. Collins, E.J. Wolfrum, C.D. Broeckling, J.E. Prenni, C.E. Jahn, Non-targeted metabolomics in diverse sorghum breeding lines indicates primary and secondary metabolite profiles are associated with plant biomass accumulation and photosynthesis, *Frontiers in Plant Science*, 7 (2016) 953.
- [56] M.C. Pedrosa, L. Lima, S. Heleno, M. Caroch, I.C. Ferreira, L. Barros, Food metabolites as tools for authentication, processing, and nutritive value assessment, *Foods*, 10 (2021) 2213.
- [57] S. Sanchez, A.L. Demain, Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites, *Microbial Biotechnology*, 1 (2008) 283-319.
- [58] A. Canarini, C. Kaiser, A. Merchant, A. Richter, W. Wanek, Root exudation of primary metabolites: mechanisms and their roles in plant responses to environmental stimuli, *Frontiers in Plant Science*, 10 (2019) 157.
- [59] G.R. Dwivedi, B.S. Sisodia, Secondary metabolites: metabolomics for secondary metabolites. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, V. K. Gupta, A. Pandey (Eds), Elsevier, 333-344, 2019.
- [60] A. Aharoni, G. Galili, Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface, *Current Opinion in Biotechnology*, 22 (2011) 239-244.
- [61] L.D. Roberts, A.L. Souza, R.E. Gerszten, C.B. Clish, Targeted metabolomics, *Current Protocols in Molecular Biology*, 98 (2012) 30-2.
- [62] U. Vrhovsek, D. Masuero, M. Gasperotti, P. Franceschi, L. Caputi, R. Viola, F. Mattivi, A versatile targeted metabolomics method for the rapid quantification of multiple classes of phenolics in fruits and beverages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (2012) 8831-8840.
- [63] N. Vinayavekhin, A. Saghatelian, Untargeted metabolomics, *Current Protocols in Molecular Biology*, 90 (2010) 30-1.
- [64] X. Zhang, X. Zhu, C. Wang, H. Zhang, Z. Cai, Non-targeted and targeted metabolomics approaches to diagnosing lung cancer and predicting patient prognosis, *Oncotarget*, 7 (2016) 63437.

- [65] S. Shen, C. Zhan, C. Yang, A.R. Fernie, J. Luo, Metabolomics-centered mining of plant metabolic diversity and function: Past decade and future perspectives, *Molecular Plant*, 16 (2023) 43-63.
- [66] Z. Ai, Y. Zhang, X. Li, W. Sun, Y. Liu, Widely targeted metabolomics analysis to reveal transformation mechanism of *Cistanche deserticola* active compounds during steaming and drying processes, *Frontiers in Nutrition*, 8 (2021) 742511.
- [67] H.M. Heyman, I.A. Dubery, The potential of mass spectrometry imaging in plant metabolomics: a review, *Phytochemistry Reviews*, 15 (2016) 297-316.
- [68] M.A. Farag, A. Porzel, L.A. Wessjohann, Comparative metabolite profiling and fingerprinting of medicinal licorice roots using a multiplex approach of GC-MS, LC-MS and 1D NMR techniques, *Phytochemistry*, 76 (2012) 60-72.
- [69] L. Weston, D. Skoneczny, P. Weston, J. Weidenhamer, Metabolic profiling: an overview-new approaches for the detection and functional analysis of biologically active secondary plant products, *Journal of Allelochemical Interactions*, 2 (2015) 15-27.
- [70] A.B. Robinson, N.E. Robinson, Origins of metabolic profiling, *Metabolic Profiling: Methods and Protocols*, (2011) 1-23.
- [71] L. Lacalle-Bergeron, D. Izquierdo-Sandoval, J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, T. Portolés, Chromatography hyphenated to high resolution mass spectrometry in untargeted metabolomics for investigation of food (bio) markers, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 135 (2021) 116161.
- [72] J. Rizo, D. Guillén, A. Farrés, G. Díaz-Ruiz, S. Sánchez, C. Wachter, R. Rodríguez-Sanoja, Omics in traditional vegetable fermented foods and beverages, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60 (2020) 791-809.
- [73] J.M. Cevallos-Cevallos, J.I. Reyes-De-Corcuera, Metabolomics in food science, *Advances in Food and Nutrition Research*, 67 (2012) 1-24.
- [74] M. Utpott, E. Rodrigues, A. de Oliveira Rios, G.D. Mercali, S.H. Flôres, Metabolomics: An analytical technique for food processing evaluation, *Food Chemistry*, 366 (2022) 130685.

- [75] U. Roessner, A. Nahid, B. Chapman, A. Hunter, M. Bellgard, *Metabolomics - The combination of analytical biochemistry, biology, and informatics*. Comprehensive Biotechnology, M. Moo-Young (Eds), Elsevier, 447-459, **2011**.
- [76] R. Tyagi, P. Kumar, U. Sharma, *Metabolomics techniques: A brief update*. Epigenetics and Metabolomics, P.K. Agrawala, P. Rana (Eds), Academic Press, 1-29, **2021**.
- [77] Z. Lei, D.V. Huhman, L.W. Sumner, *Mass spectrometry strategies in metabolomics*, *Journal of Biological Chemistry*, 286 (**2011**) 25435-25442.
- [78] L.W. Sumner, P. Mendes, R.A. Dixon, *Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era*, *Phytochemistry*, 62 (**2003**) 817-836.
- [79] M. Bedair, L.W. Sumner, *Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics*, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27 (**2008**) 238-250.
- [80] M. Fraga-Corral, M. Carpena, P. Garcia-Oliveira, A.G. Pereira, M.A. Prieto, J. Simal-Gandara, *Analytical metabolomics and applications in health, environmental and food science*, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 52 (**2020**) 712-734.
- [81] N. Feizi, F.S. Hashemi-Nasab, F. Golpelichi, N. Saburouh, H. Parastar, *Recent trends in application of chemometric methods for GC-MS and GC×GC-MS-based metabolomic studies*, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 138 (**2021**) 116239.
- [82] K. Dettmer, P.A. Aronov, B.D. Hammock, *Mass spectrometry-based metabolomics*, *Mass Spectrometry Reviews*, 26 (**2007**) 51-78.
- [83] J.M. Halket, D. Waterman, A.M. Przyborowska, R.K. Patel, P.D. Fraser, P.M. Bramley, *Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS*, *Journal of Experimental Botany*, 56 (**2005**) 219-243.
- [84] S.G. Villas-Bôas, K.F. Smart, S. Sivakumaran, G.A. Lane, *Alkylation or silylation for analysis of amino and non-amino organic acids by GC-MS?*, *Metabolites*, 1 (**2011**) 3-20.
- [85] U. Jumhawan, S.P. Putri, T. Bamba, E. Fukusaki, *Application of gas chromatography/flame ionization detector-based metabolite fingerprinting for*

- authentication of Asian palm civet coffee (Kopi Luwak), *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120 (2015) 555-561.
- [86] S. Kobayashi, S.P. Putri, Y. Yamamoto, K. Donghyo, T. Bamba, E. Fukusaki, Gas chromatography-mass spectrometry based metabolic profiling for the identification of discrimination markers of *Angelicae Radix* and its application to gas chromatography-flame ionization detector system, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114 (2012) 232-236.
- [87] K. Jumtee, T. Bamba, E. Fukusaki, Fast GC-FID based metabolic fingerprinting of Japanese green tea leaf for its quality ranking prediction, *Journal of Separation Science*, 32 (2009) 2296-2304.
- [88] J. Tian, C. Shi, P. Gao, K. Yuan, D. Yang, X. Lu, G. Xu, Phenotype differentiation of three *E. coli* strains by GC-FID and GC-MS based metabolomics, *Journal of Chromatography B*, 871 (2008) 220-226.
- [89] S.A. Fancy, O. Beckonert, G. Darbon, W. Yabsley, R. Walley, D. Baker, ..., K. Rumpel, Gas chromatography/flame ionisation detection mass spectrometry for the detection of endogenous urine metabolites for metabonomic studies and its use as a complementary tool to nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20 (2006) 2271-2280.
- [90] J. Zhou, C. Ma, H. Xu, K. Yuan, X. Lu, Z. Zhu, ..., G. Xu, Metabolic profiling of transgenic rice with *cryIAc* and *scK* genes: An evaluation of unintended effects at metabolic level by using GC-FID and GC-MS, *Journal of Chromatography B*, 877 (2009) 725-732.
- [91] S. Duong, N. Strobel, S. Buddhadasa, K. Stockham, M. Auldist, B. Wales, ..., M. Cran, Rapid measurement of phytosterols in fortified food using gas chromatography with flame ionization detection, *Food Chemistry*, 211 (2016) 570-576.
- [92] G. Garcia-Llatas, A. Alegria, R. Barberá, A. Cilla, Current methodologies for phytosterol analysis in foods, *Microchemical Journal*, 168 (2021) 106377.
- [93] K. Pastor, M. Ačanski, D. Vujić, G. Bekavac, S. Milovac, S. Kravić, Rapid method for small grain and corn flour authentication using GC/EI-MS and multivariate analysis, *Food Analytical Methods*, 9 (2016) 443-450.

- [94] L. Zhang, R. Yu, Y. Yu, Analysis of metabolites and metabolic mechanism in Bt transgenic and non-transgenic maize, *Microchemical Journal*, 169 (2021) 106544.
- [95] W. Tang, J. Hazebroek, C. Zhong, T. Harp, C. Vlahakis, B. Baumhover, V. Asiago, Effect of genetics, environment, and phenotype on the metabolome of maize hybrids using GC/MS and LC/MS, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65 (2017) 5215-5225.
- [96] J. Rao, F. Cheng, C. Hu, S. Quan, H. Lin, J. Wang, G. Chen, X. Zhao, D. Alexander, L. Guo, G. Wang, J. Lai, D. Zhang, J. Shi, Metabolic map of mature maize kernels, *Metabolomics*, 10 (2014) 775-787.
- [97] L. Zhang, Y. Yu, R. Yu, Analysis of metabolites and metabolic pathways in three maize (*Zea mays* L.) varieties from the same origin using GC-MS, *Scientific Reports*, 10 (2020) 17990.
- [98] R.A. Moreau, A.M. Lampi, K.B. Hicks, Fatty acid, phytosterol, and polyamine conjugate profiles of edible oils extracted from corn germ, corn fiber, and corn kernels, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86 (2009) 1209.
- [99] R.A. Herman, A.M. Phillips, R.A. Collins, L.A. Tagliani, F.A. Claussen, C.D. Graham, ..., L.M. Prochaska, Compositional equivalency of Cry1F corn event TC6275 and conventional corn (*Zea mays* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (2004) 2726-2734.
- [100] D. Schütz, E. Achten, M. Creydt, J. Riedl, M. Fischer, Non-targeted LC-MS metabolomics approach towards an authentication of the geographical origin of grain maize (*Zea mays* L.) samples, *Foods*, 10 (2021) 2160.
- [101] H. Baniasadi, C. Vlahakis, J. Hazebroek, C. Zhong, V. Asiago, Effect of environment and genotype on commercial maize hybrids using LC/MS-based metabolomics, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (2014) 1412-1422.
- [102] L. Galvez Ranilla, The application of metabolomics for the study of cereal corn (*Zea mays* L.), *Metabolites*, 10 (2020) 300.
- [103] W. Wen, D. Li, X. Li, Y. Gao, W. Li, H. Li, ..., J. Yan, Metabolome-based genome-wide association study of maize kernel leads to novel biochemical insights, *Nature Communications*, 5 (2014) 3438.

- [104] K. Skogerson, G.G. Harrigan, T.L. Reynolds, S.C. Halls, M. Ruebelt, A. Iandolino, ..., O. Fiehn, Impact of genetics and environment on the metabolite composition of maize grain, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2010) 3600-3610.
- [105] G. Özen, Metabolomik ve Fluksomik Çalışmalar ile Kolon Kanserinde Kemoterapötiklere Karşı Direncin in vitro Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2019.
- [106] O. Köseoğlu, D. Sevim, D. Özdemir, Determination of triacylglycerol composition of Ayvalık and Memecik olive oils during storage by chemometric methods, *Sakarya University Journal of Science*, 21 (2017) 1497-1504.
- [107] D. Granato, J.S. Santos, G.B. Escher, B.L. Ferreira, R.M. Maggio, Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective, *Trends in Food Science & Technology*, 72 (2018) 83-90.
- [108] T.A. Lydic, Y.H. Goo, Lipidomics unveils the complexity of the lipidome in metabolic diseases, *Clinical and Translational Medicine*, 7 (2018) 1-13.
- [109] M.J. Conroy, R.M. Andrews, S. Andrews, L. Cockayne, E.A. Dennis, E. Fahy, ..., V.B. O'Donnell, LIPID MAPS: update to databases and tools for the lipidomics community, *Nucleic Acids Research*, 52 (2024) D1677-D1682.
- [110] G. Liebisch, E. Fahy, J. Aoki, E.A. Dennis, T. Durand, C.S. Ejsing, ..., F. Spener, Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures, *Journal of Lipid Research*, 61 (2020) 1539-1555.
- [111] E. Fahy, D. Cotter, M. Sud, S. Subramaniam, Lipid classification, structures and tools, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811 (2011) 637-647.
- [112] T.B. Romsdahl, J.C. Cocuron, M.J. Pearson, A.P. Alonso, K.D. Chapman, A lipidomics platform to analyze the fatty acid compositions of non-polar and polar lipid molecular species from plant tissues: Examples from developing seeds and seedlings of pennycress (*Thlaspi arvense*), *Frontiers in Plant Science*, 13 (2022) 1038161.

- [113] O.N. Makhutova, N.N. Sushchik, M.I. Gladyshev, Fatty acid-Markers as foodweb tracers in inland waters. Encyclopedia of Inland Waters, T. Mehner, K. Tockner (Eds), Elsevier, 713-726, **2022**.
- [114] I. Brondz, LIPIDS | Fatty Acids. Encyclopedia of Analytical Science, P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole (Eds), Elsevier, 76-88, **2005**.
- [115] J. Lunn, H.E. Theobald, The health effects of dietary unsaturated fatty acids, Nutrition Bulletin, 31 (**2006**) 178-224.
- [116] R.P. Mensink, World Health Organization, Effects of saturated fatty acids on serum lipids and lipoproteins: a systematic review and regression analysis, <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246104/9789241565349-eng.pdf> (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [117] K. Yang, X. Han, Lipidomics: techniques, applications, and outcomes related to biomedical sciences, Trends in Biochemical Sciences, 41 (**2016**) 954-969.
- [118] M. Li, L. Yang, Y. Bai, H. Liu, Analytical methods in lipidomics and their applications, Analytical Chemistry, 86 (**2014**) 161-175.
- [119] H. Chen, F. Wei, X.Y. Dong, J.Q. Xiang, S.Y. Quek, X. Wang, Lipidomics in food science, Current Opinion in Food Science, 16 (**2017**) 80-87.
- [120] J. Salimon, T.A. Omar, N. Salih, Comparison of two derivatization methods for the analysis of fatty acids and trans fatty acids in bakery products using gas chromatography, The Scientific World Journal, 2014 (**2014**).
- [121] I. Brondz, Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques, Analytica Chimica Acta, 465 (**2002**) 1-37.
- [122] W.W. Christie, Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis, Advances in Lipid Methodology, 2 (**1993**) e111.
- [123] P. Delmonte, A.R.F. Kia, Q. Hu, J.I. Rader, Review of methods for preparation and gas chromatographic separation of trans and cis reference fatty acids, Journal of AOAC International, 92 (**2009**) 1310-1326.

- [124] E.D. Dodds, M.R. McCoy, L.D. Rea, J.M. Kennish, Gas chromatographic quantification of fatty acid methyl esters: flame ionization detection vs. electron impact mass spectrometry, *Lipids*, 40 (2005) 419-428.
- [125] S. KoochiKamali, C.P. Tan, T.C. Ling, Optimization of sunflower oil transesterification process using sodium methoxide, *The Scientific World Journal*, 2012 (2012).
- [126] M. Petrović, N. Kezić, V. Bolanča, Optimization of the GC method for routine analysis of the fatty acid profile in several food samples, *Food Chemistry*, 122 (2010) 285-291.
- [127] K. Nuernberg, D. Dannenberger, K. Ender, G. Nuernberg, Comparison of different methylation methods for the analysis of conjugated linoleic acid isomers by silver ion HPLC in beef lipids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2007) 598-602.
- [128] S. Nisar, M.A. Hanif, U. Rashid, A. Hanif, M.N. Akhtar, C. Ngamcharussrivichai, Trends in widely used catalysts for fatty acid methyl esters (Fame) production: A review, *Catalysts*, 11 (2021) 1085.
- [129] H.H. Chiu, C.H. Kuo, Gas chromatography-mass spectrometry-based analytical strategies for fatty acid analysis in biological samples, *Journal of Food and Drug Analysis*, 28 (2020) 60-73.
- [130] A. Kan, Characterization of the fatty acid and mineral compositions of selected cereal cultivars from Turkey, *Records of Natural Products*, 9 (2015) 124.
- [131] C.K. Chow, *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*, 3. Baskı, CRC Press, 2007.
- [132] K. Liu, Comparison of lipid content and fatty acid composition and their distribution within seeds of 5 small grain species, *Journal of Food Science*, 76 (2011) C334-C342.
- [133] J. Golijan, D.D. Milinčić, R. Petronijević, M.B. Pešić, M.B. Barać, M. Sečanski, ..., A.Ž. Kostić, The fatty acid and triacylglycerol profiles of conventionally and organically produced grains of maize, spelt and buckwheat, *Journal of Cereal Science*, 90 (2019) 102845.

- [134] C.Ö. Egesel, F. Kahrıman, N. Ekinçi, İ. Kavdır, M.B. Büyükcan, Analysis of fatty acids in kernel, flour, and oil samples of maize by NIR spectroscopy using conventional regression methods, *Cereal Chemistry*, 93 (2016) 487-492.
- [135] K. Pastor, M. Ilić, D. Vujić, D. Jovanović, M. Ačanski, Characterization of fatty acids in cereals and oilseeds from the Republic of Serbia by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) with chemometrics, *Analytical Letters*, 53 (2020) 1177-1189.
- [136] C. Diez-Simon, R. Mumm, R.D. Hall, Mass spectrometry-based metabolomics of volatiles as a new tool for understanding aroma and flavour chemistry in processed food products, *Metabolomics*, 15 (2019) 1-20.
- [137] S. Kamiloglu, J. Van Camp, E. Capanoglu, Black carrot polyphenols: Effect of processing, storage and digestion-An overview, *Phytochemistry Reviews*, 17 (2018) 379-395.
- [138] O. Rodriguez-Gonzalez, R. Buckow, T. Koutchma, V.M. Balasubramaniam, Energy requirements for alternative food processing technologies-principles, assumptions, and evaluation of efficiency, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14 (2015) 536-554.
- [139] R.N. Pereira, A.A. Vicente, Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing, *Food Research International*, 43 (2010) 1936-1943.
- [140] F.M. Allai, Z.R.A.A. Azad, N.A. Mir, K. Gul, Recent advances in non-thermal processing technologies for enhancing shelf life and improving food safety, *Applied Food Research*, 3 (2023) 100258.
- [141] S. Perino-Issartier, J.F. Maingonnat, F. Chemat, Microwave food processing. Alternatives to Conventional Food Processing, A. Proctor (Eds), The Royal Society of Chemistry, 415-458, 2010.
- [142] H. Neetoo, H. Chen, Alternative food processing technologies, *Food processing: Principles and applications*, (2014) 137-169.
- [143] J.C. Atuonwu, S.A. Tassou, Energy issues in microwave food processing: A review of developments and the enabling potentials of solid-state power delivery, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59 (2019) 1392-1407.

- [144] K. Bhatt, D. Vaidya, M. Kaushal, A. Gupta, P. Soni, P. Arya, ..., C. Sharma, Microwaves and radiowaves: in food processing and preservation, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9 (2020) 118-131.
- [145] V. Orsat, G.S.V. Raghavan, K. Krishnaswamy, Microwave technology for food processing: An overview of current and future applications, *The Microwave Processing of Foods*, (2017) 100-116.
- [146] A. Aguilar-Reynosa, A. Romání, R.M. Rodríguez-Jasso, C.N. Aguilar, G. Garrote, H.A. Ruiz, Microwave heating processing as alternative of pretreatment in second-generation biorefinery: An overview, *Energy Conversion and Management*, 136 (2017) 50-65.
- [147] P. Guzik, P. Kulawik, M. Zając, W. Migdał, Microwave applications in the food industry: An overview of recent developments, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62 (2022) 7989-8008.
- [148] H. Jiang, Z. Liu, S. Wang, Microwave processing: Effects and impacts on food components, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58 (2018) 2476-2489.
- [149] F.G.C. Ekezie, D.W. Sun, Z. Han, J.H. Cheng, Microwave-assisted food processing technologies for enhancing product quality and process efficiency: A review of recent developments, *Trends in Food Science & Technology*, 67 (2017) 58-69.
- [150] D. Wray, H.S. Ramaswamy, Novel concepts in microwave drying of foods, *Drying Technology*, 33 (2015) 769-783.
- [151] N. Munir, A. Riaz, S.G. Mustafa, R. haq, S. Ilyas, S. Naz, Effect of Different Treatments on Nutritional, Microbiological and Rheological Properties of Flours : Effect of different treatments on properties of flours, *Progress in Nutrition*, 23 (2021) e2021113.
- [152] S. Hassan, N. Ahmad, T. Ahmad, M. Imran, C. Xu, M.K. Khan, Microwave processing impact on the phytochemicals of sorghum seeds as food ingredient, *Journal of Food Processing and Preservation*, 43 (2019) e13924.

- [153] F. Vidinamo, S. Fawzia, M.A. Karim, Investigation of the effect of drying conditions on phytochemical content and antioxidant activity in pineapple (*Ananas comosus*), Food and Bioprocess Technology, (2021) 1-10.
- [154] E. Uygun, E. Yildiz, G. Sumnu, S. Sahin, Microwave pretreatment for the improvement of physicochemical properties of carob flour and rice starch-based electrospun nanofilms, Food and Bioprocess Technology, 13 (2020) 838-850.
- [155] S. Pérez-Quirce, F. Ronda, A. Lazaridou, C.G. Biliaderis, Effect of microwave radiation pretreatment of rice flour on gluten-free breadmaking and molecular size of β -glucans in the fortified breads, Food and Bioprocess Technology, 10 (2017)1412-1421.
- [156] Á. Calín-Sánchez, A. Figiel, F. Hernández, P. Melgarejo, K. Lech, Á.A. Carbonell-Barrachina, Chemical composition, antioxidant capacity, and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) arils and rind as affected by drying method, Food and Bioprocess Technology, 6 (2013) 1644-1654.
- [157] C. Ruge, R. Changzhong, L. Zaigui, The effects of different inactivation treatments on the storage properties and sensory quality of naked oat, Food and Bioprocess Technology, 5 (2012) 1853-1859.
- [158] S. Emami, A. Perera, V. Meda, R.T. Tyler, Effect of microwave treatment on starch digestibility and physico-chemical properties of three barley types, Food and Bioprocess Technology, 5 (2012) 2266-2274.
- [159] G. Juodeikiene, D. Zadeike, I. Vidziunaite, E. Bartkiene, V. Bartkevics, I. Pugajeva, Effect of heating method on the microbial levels and acrylamide in corn grits and subsequent use as functional ingredient for bread making, Food and Bioproducts Processing, 112 (2018) 22-30.
- [160] U. Uthumporn, N.I. Nadiah, W.Y. Koh, A.H. Zaibunnisa, L. Azwan, Effect of microwave heating on corn flour and rice flour in water suspension, International Food Research Journal, 23 (2016) 2493-2503.
- [161] L. Román, M.M. Martínez, C.M. Rosell, M. Gómez, Effect of microwave treatment on physicochemical properties of maize flour, Food and Bioprocess Technology, 8 (2015) 1330-1335.

- [162] V. Velu, A. Nagender, P.P. Rao, D.G. Rao, Dry milling characteristics of microwave dried maize grains (*Zea mays* L.), *Journal of Food Engineering*, 74 (2006) 30-36.
- [163] J. Izquierdo, Biotechnology can help crop production to feed an increasing world population-positive and negative aspects need to be balanced: a perspective from FAO. *Plant Genetic Engineering: Towards the Third Millennium*, A.D. Arencibia (Eds), Elsevier, 13-26, 2000.
- [164] *Biotechnology Notes*, Importance of Plant Biotechnology to Agriculture, <https://www.biotechnologynotes.com/essays/importance-of-plant-biotechnology-to-agriculture/94> (Erişim tarihi: 14 Ocak 2024).
- [165] E.E. Hood, D.V. Requesens, K.A. Eversole, Regulatory issues of biotechnologically improved plants. *Plant Biotechnology and Agriculture*, A. Altman, P.M. Hasegawa (Eds), Academic Press, 541-550, 2012.
- [166] ISAAA Brief 55-2019: Executive Summary Biotech Crops Drive Socio-Economic Development and Sustainable Environment in the New Frontier, <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/55/executivesummary/default.asp> (Erişim tarihi: 14 Ocak 2024).
- [167] 5977 Sayılı Biyogüvenlik Kanunu, T.C. Resmi Gazete, 27533, 26 Mart 2010, <https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuatmetin/1.5.5977.pdf> (Erişim tarihi: 14 Ocak 2024).
- [168] Türkiye Biyogüvenlik Bilgi Değişim Mekanizması, 2023, <http://tbbdm.gov.tr/OnayliGDO.pdf> (Erişim tarihi: 14 Ocak 2024).
- [169] I. Erkan, K. Dastan, Real-time PCR detection of genetically modified organisms in several food products and their environmental effects in Turkey, *Fresenius Environmental Bulletin*, 26 (2017) 2588-2594.
- [170] S.R. Eckhoff, M.R. Paulsen, S.C. Yang, Maize. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, B. Caballero, L.C. Trugo, P.M. Finglas (Eds), Academic Press, London, 3647-3653, 2003.
- [171] Y. Okazaki, K. Saito, Recent advances of metabolomics in plant biotechnology, *Plant Biotechnology Reports*, 6 (2012) 1-15.

- [172] S.H. Wani, K. Samantara, A. Razzaq, G. Kakani, P. Kumar, Back to the wild: mining maize (*Zea mays* L.) disease resistance using advanced breeding tools, *Molecular Biology Reports*, 49 (2022) 5787-5803.
- [173] J. Strable, M.J. Scanlon, Maize (*Zea mays*): a model organism for basic and applied research in plant biology, *Cold Spring Harbor Protoc*, 10 (2009) pdb-emo132.
- [174] M.B. Egea, T.L. De Sousa, D.C. Dos Santos, J.G. De Oliveira Filho, R.M. Guimarães, L.Y. Yoshiara, A.C. Lemes, Application of soy, corn, and bean by-products in the gluten-free baking process: A Review, *Food and Bioprocess Technology*, (2023) 1-22.
- [175] K. Irineo Filho, A.C. Jaski, M.M. Takayanagui, C.K. De Andradre, M. Butik, S.P. Quinaia, Determination and chemometric evaluation of the mineral profile of maize flours, *Journal of Food Composition and Analysis*, 92 (2020) 103579.
- [176] OECD (Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü) BioTrack Product Database : MIR604 (SYN-IR6Ø4-5), <https://biotrackproductdatabase.oecd.org/Product.aspx?id=SYN-IR6%C3%984-5> (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [177] J. Mano, S. Furui, K. Takashima, T. Koiwa, S. Futo, Y. Minegishi, ..., K. Kitta, Development and validation of event-specific quantitative PCR method for genetically modified maize MIR604, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 53 (2012) 166-171.
- [178] Syngenta Seeds USDA Revised Petition for Non-regulated Status of mCry3A Corn Event MIR604, Petition document, 04-362-01p, https://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/04_36201p.pdf (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [179] Biosafety Clearing-House Database: Living Modified Organism Identity, MIR604, <https://bch.cbd.int/en/database/record?documentID=15105> (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [180] FAO GM Foods Platform, OECD Unique Identifier details, SYN-IR6Ø4-5, <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/gm-foods-platform/browse->

[information-by/oecd-unique-identifier/oecd-unique-identifier-
details/en/?ui=169658](http://www.oecd.org/unique-identifier/unique-identifier-details/en/?ui=169658) (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).

- [181] Yem Amaçlı Kullanılmak İstenen Genetiği Değiştirilmiş MIR604 Mısır Çeşidi ve Ürünleri İçin Bilimsel Risk Değerlendirme Raporu, http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/gmfp/docs/Report%20of%20scientific%20committee-%20maize%20MIR%20604.pdf (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [182] European Food Safety Authority (EFSA), Applications (EFSA-GMO-RX-MON810) for renewal of authorisation for the continued marketing of (1) existing food and food ingredients produced from genetically modified insect resistant maize MON810; (2) feed consisting of and/or containing maize MON810, including the use of seed for cultivation; and of (3) food and feed additives, and feed materials produced from maize MON810, all under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto, EFSA Journal, 7 (2009) 1149, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1149>.
- [183] M. Gulli, E. Salvatori, L. Fusaro, C. Pellacani, F. Manes, N. Marmioli, Comparison of drought stress response and gene expression between a GM maize variety and a near-isogenic non-GM variety, PLoS One, 10 (2015) e0117073.
- [184] Biosafety Clearing-House Database: Living Modified Organism Identity, MON810, <https://bch.cbd.int/en/database/LMO/BCH-LMO-SCBD-14750/19> (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [185] Monsanto Company, Application to Place on the Market Genetically Modified Higher Plants: Insect-Protected Maize (MON810), https://food.ec.europa.eu/system/files/2021-10/gmo_rep-stud_mon-810_report-2020_ref-004.pdf (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [186] Türkiye Biyogüvenlik Bilgi Değişim Mekanizması, Genetik modifiye (GM) NK603 x MON810 mısır çeşidi, <http://www.tbdbm.gov.tr/Arsiv/NK603%20X%20MON810.pdf> (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [187] C. Paoletti, E. Flamm, W. Yan, S. Meek, S. Renckens, M. Fellous, H. Kuiper, GMO risk assessment around the world: some examples, Trends in Food Science & Technology, 19 (2008) S70-S78.

- [188] M. Garcia-Alonso, Safety assessment of food and feed derived from GM crops: using problem formulation to ensure “fit for purpose” risk assessments, *Collection of Biosafety Reviews*, 8 (2013) 72-101.
- [189] EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO), Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants, *EFSA Journal*, 9 (2011) 2150.
- [190] A.S. Sant’Ana, B.D.G.M. Franco, Microbial risk analysis. *Encyclopedia of Food Microbiology*, C.A. Batt, M. L. Tortorello (Eds), 607-613, 2014.
- [191] R. Yılmaz, C. Bayraç, Genetik Mühendisliği Ürünü Bitki, Gıda ve Yem için Risk Değerlendirme Teknik Rehberi (2017), Ankara, TAGEM ve UNEP-GEF, 1-66, http://www.tbbdm.gov.tr/Dosyalar/risk%20deg%CC%86erlendirme_TR.pdf (Erişim tarihi: 14 Ocak 2024).
- [192] J. Rhodes, Introduction to Risk Assessment and Methodologies, Training Course on Risk Assessment of Living Modified Organisms for Western, Central and Eastern Asia, 17-21 Ekim, Antalya, Türkiye, 2022.
- [193] C. Simó, C. Ibáñez, A. Valdés, A. Cifuentes, V. García-Cañas, Metabolomics of genetically modified crops, *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (2014) 18941-18966.
- [194] L.V. Shepherd, J.W. McNicol, R. Razzo, M.A. Taylor, H.V. Davies, Assessing the potential for unintended effects in genetically modified potatoes perturbed in metabolic and developmental processes, Targeted analysis of key nutrients and anti-nutrients, *Transgenic Research*, 15 (2006) 409-425.
- [195] E. Millstone, E. Brunner, S. Mayer, Beyond ‘substantial equivalence’, *Nature*, 401 (1999) 525-526.
- [196] H. Davies, A role for “omics” technologies in food safety assessment, *Food Control*, 21 (2010) 1601-1610.
- [197] European Food Safety Authority, J. Aguilera, M. Aguilera-Gomez, F. Barrucci, P.S. Cocconcelli, H. Davies, ..., M.C. Wright, EFSA Scientific Colloquium 24– ‘omics in risk assessment: state of the art and next steps, *EFSA Supporting Publications*, 15 (2018) 1512E.

- [198] R.F. Benevenuto, C.B. Zanatta, F. Waßmann, M.F. Eckerstorfer, S.Z. Agapito-Tenfen, Integration of omics analyses into GMO risk assessment in Europe: a case study from soybean field trials, *Environmental Sciences Europe*, 35 (2023) 14.
- [199] Ulusal Bilim, Mühendislik ve Tıp Akademileri (NASEM), Committee on Genetically Engineered Crops, *Genetically Engineered Crops: Experiences and Prospects*, Washington DC, National Academies Press, <http://www.nap.edu/catalog/23395/genetically-engineered-crops-experiences-and-prospects> (Erişim tarihi: 14 Ocak 2024).
- [200] Y. Zhong, W. Liang, H. Pu, A. Blennow, X. Liu, D. Guo, Short-time microwave treatment affects the multi-scale structure and digestive properties of high-amylose maize starch, *International Journal of Biological Macromolecules*, 137 (2019) 870-877.
- [201] K.R. Vijayakumar, A. Martin, L.R. Gowda, V. Prakash, Detection of genetically modified soya and maize: Impact of heat processing, *Food Chemistry*, 117 (2009) 514-521.
- [202] Anatolia Geneworks Bosphore Plant Detection Kit v3., <https://www.anatoliageneworks.com/en/kits/food-testing/plant-species-detection-kits/> (Erişim tarihi: 14 Ocak 2024).
- [203] B.Z. Hançerlioğulları, R. Yılmaz, Screening of P-35S, P-FMV, and T-NOS genetic elements in microwave-treated genetically modified cereal flours, *Molecular Biology Reports*, 50 (2023) 4813-4822.
- [204] BIOTECON Diagnostics, The Foodproof® GMO Screening 1 LyoKit - 5'Nuclease, https://webs.uab.cat/workshopmrama/wp-content/uploads/sites/312/2011/06/foodproof_gmo_screening_kits.pdf (Erişim tarihi: 14 Ocak 2024).
- [205] European Network of GMO Laboratories (ENGL), Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing, JRC Technical Report, https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/MPR%20Report%20Application%2020_10_2015.pdf (Erişim tarihi: 14 Ocak 2024).

- [206] EURx, RNA Extracol, cat. no. E3700, <https://eurx.com.pl/docs/manuals/en/e3700.pdf> (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [207] S. Dutta, V. Muthusamy, R. Chhabra, R.U. Zunjare, F. Hossain, Two-step method for isolation of high-quality RNA from stored seeds of maize rich in starch, *3 Biotech*, 10 (2020) 1-8.
- [208] A.R. Vennapusa, I.M. Somayanda, C.J. Doherty, S.K. Jagadish, A universal method for high-quality RNA extraction from plant tissues rich in starch, proteins and fiber, *Scientific reports*, 10 (2020) 16887.
- [209] E.J. White, M. Venter, N.F. Hiten, J.T. Burger, Modified cetyltrimethylammonium bromide method improves robustness and versatility: The benchmark for plant RNA extraction, *Biotechnology Journal*, 3 (2008) 1424-1428.
- [210] Agilent RNA 6000 Nano Kit Guide, https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2938-90034_RNA6000Nano_KG.pdf (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [211] EURx, smART First Strand cDNA Synthesis kit, cat. no. E0804, <https://eurx.com.pl/docs/specs/en/e0804.pdf> (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [212] Roche Diagnostics, LightCycler® 480 Probes Master kit protocol, <https://elabdoc-prod.roche.com/eLD/web/pi/en/documents/download/c9f36eef-0088-ec11-1091-005056a71a5d> (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [213] Mısır Alkol dehidrogenaz 1, *ZmADH1*, (EC Kodu: 1.1.1.1), <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P00333/entry> (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [214] M. Mazzara, C. Savini, B. Munaro, N. Foti, G. Van Den Eede, Event-specific method for the quantification of maize line MIR604 using Real-Time PCR, validation report and validated method, maize seeds sampling and DNA extraction - v.1.01. EUR 26139, https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC84134/2013_10_18_%20final%20jrc84134.pdf (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [215] L. Zhai, W. Sun, K. Zhang, H. Jia, L. Liu, Z. Liu, F. Teng, Z. Zhang, Identification and characterization of Argonaute gene family and meiosis-enriched Argonaute

- during sporogenesis in maize, *Journal of Integrative Plant Biology*, 56 (2014) 1042-1052.
- [216] Solis BioDyne, 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (no ROX) kit protocol, <https://www.bmlabosis.com/uploads/7455e6cdc4d64be29ad2317f51aef15b.pdf> (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [217] S. Trapmann, M. Burns, H. Broll, R. Macarthur, R. Wood, J. Žel, Guidance Document on Measurement Uncertainty for GMO Testing Laboratories, JRC Scientific and Technical Reports, https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC50052/101-2009_as%20published.pdf (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [218] Illumina, Technical Note: Real-Time PCR, Absolute quantification of gene expression using SYBR Green in the Eco™ Real-Time PCR system, https://www.illumina.com/Documents/products/technotes/technote_eco_absolute_quantification_using_sybrgreen.pdf (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [219] B.Z. Hançerlioğulları, U. Toprak, R. Yılmaz, Analyses of Metabolites in Microwave-treated Maize Flours, *Food and Bioprocess Technology*, (2023) 1-11.
- [220] KEGG Compound Database, <https://www.kegg.jp/kegg/compound/> (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [221] KEGG Pathway Database, <https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html> (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [222] M.U. Akram, R. Yılmaz, A. Salantur, U. Uygun, Bioactive compounds in lipids of selected wheat genotypes, *International Journal of Food Science & Technology*, 58 (2023) 6049-6058.
- [223] M.N. Irakli, V.F. Samanidou, C.G. Biliaderis, I.N. Papadoyannis, Development and validation of an HPLC-method for determination of free and bound phenolic acids in cereals after solid-phase extraction, *Food Chemistry*, 134 (2012) 1624-1632.
- [224] A. Turkeç, H. Kazan, B. Karacanli, S.J. Lucas, DNA extraction techniques compared for accurate detection of genetically modified organisms (GMOs) in

- maize food and feed products, Journal of Food Science and Technology, 52 (2015) 5164-5171.
- [225] A. Hussein Al-Marshadi, M. Aslam, A. Abdullah, Uncertainty-based trimmed coefficient of variation with application, Journal of Mathematics, 2021 (2021) 1-6.
- [226] European Network of GMO Laboratories (ENGL), Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods, JRC Technical Report, <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/ENGL%20MV%20WG%20Report%20July%202011.pdf> (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [227] J.A. Adetumbi, I.O. Daniel, O.O. Oyelakin, S.R. Akande, D. Moronkola, Comparative assessment of quality of genomic DNA extracted from maize (*Zea mays*) seed and leaf, Agricultural Science Research Journals, 3 (2013) 67-71.
- [228] European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed (EURL GMFF), Report on the in-house validation of a DNA extraction method from ground maize seeds and validated DNA extraction method, Joint Research Centre (JRC) Validated Methods, Reference Methods, and Measurements Report, <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/EURL-VL-02-14-XP.pdf> (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [229] European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed (EURL GMFF), Report on the validation of a DNA extraction method for soybean seeds, Joint Research Centre (JRC) Validated Methods, Reference Methods, and Measurements Report, <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/CRL-VL-05-06-XP-Corrected-version-2.pdf> (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [230] Thermo Scientific, T042-Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers (260/280 and 260/230 ratios), <https://www.uvm.edu/~vgn/microarray/documents/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf> (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).

- [231] Y. Li, F. Xiao, B. Liu, H. Gao, Y. Wu, J. Li, G. Wu, Rapid screening of genetically modified ingredients in soybean and cotton processing by-product and waste using direct qPCR, *Oil Crop Science*, 5 (2020) 142-148.
- [232] Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, GDO Analiz Stratejisi Uygulama Talimatı, Ankara, 2023.
- [233] D. Zhang, J. Guo, The development and standardization of testing methods for genetically modified organisms and their derived products, *Journal of Integrative Plant Biology*, 53 (2011) 539-551.
- [234] K.H. Engel, F. Moreano, A. Ehlert, U. Busch, Quantification of DNA from genetically modified organisms in composite and processed foods, *Trends in Food Science & Technology*, 17 (2006) 490-497.
- [235] D. Dwivedi, S. Kasetty, M.S. Tijare, S. Kallianpur, N. Prabhakar, R. Ragavendra T., A. Desai, Effect of conventional and microwave tissue processing technique on DNA integrity: a comparative molecular analysis, *Ethiopian Journal of Health Sciences*, 28 (2018) 615-624.
- [236] C. Bödör, O. Schmidt, B. Csernus, H. Rajnai, B. Szende, DNA and RNA isolated from tissues processed by microwave-accelerated apparatus MFX-800-3 are suitable for subsequent PCR and Q-RT-PCR amplification, *Pathology & Oncology Research*, 13 (2007) 149-152.
- [237] G. Koetsier, E. Cantor, A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers, New England Biolabs Technical Notes, https://www.neb.com/-/media/nebus/files/application-notes/technote_mv_analysis_of_nucleic_acid_concentration_and_purity.pdf?rev=c24cea043416420d84fb6bf7b554dbbb (Erişim tarihi: 14 Ocak 2024).
- [238] Q. Sheng, K. Vickers, S. Zhao, J. Wang, D.C. Samuels, O. Koues, ..., Y. Guo, Multi-perspective quality control of Illumina RNA sequencing data analysis, *Briefings in Functional Genomics*, 16 (2017) 194-204.
- [239] ThermoFisher Scientific, Top Ten Ways to Improve Your RNA Isolation, <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/general-articles/ten-ways-to-improve-your-rna-isolation.html> (Erişim tarihi: 14 Ocak 2024).

- [240] C.M. Arraiano, J.M. Andrade, S. Domingues, I.B. Guinote, M. Malecki, R.G. Matos, ..., S.C. Viegas, The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression, *FEMS Microbiology Reviews*, 34 (2010) 883-923.
- [241] L.S. Toni, A.M. Garcia, D.A. Jeffrey, X. Jiang, B.L. Stauffer, S.D. Miyamoto, C.C. Sucharov, Optimization of phenol-chloroform RNA extraction, *MethodsX*, 5 (2018) 599-608.
- [242] Thermo Fisher Scientific, RNA Isolation-General Articles, The Basics: RNA Isolation, <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/general-articles/the-basics-rna-isolation.html> (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [243] A. Ciarkowska, P. Wojtaczka, J. Keşy, M. Ostrowski, Auxin homeostasis in maize (*Zea mays*) is regulated via 1-O-indole-3-acetyl-myoinositol synthesis at early stages of seedling development and under abiotic stress, *Planta*, 257 (2023) 23.
- [244] A.B. Uğuz, Seğilmiş Yerel Buğday ęeřitlerinin Karşılaştirmalı Transkriptomik Analizi ve ęinko Uygulamasının Bazı Enzim Genlerinin İfade Düzeyine Olan Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2022.
- [245] Bio-Rad, Reagent Comparison Guide for Real-Time PCR, https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6252.pdf (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [246] S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, ..., C.T. Wittwer, The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments, *Clinical Chemistry*, 55 (2009) 611-622.
- [247] International Organization for Standardization (ISO), ISO 20395:2019, Biotechnology Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences qPCR and dPCR, <https://www.iso.org/standard/67893.html> (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [248] P. Kralik, M. Ricchi, A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything, *Frontiers in Microbiology*, 8 (2017) 108.

- [249] R. Yılmaz, C. Bayraç, M. Yücel, Single laboratory method performance evaluation for the analysis of Roundup Ready® soy flour by qualitative and quantitative detection methods, *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 9 (2017) 303-311.
- [250] S. Broeders, I. Huber, L. Grohmann, G. Berben, I. Taverniers, M. Mazzara, ..., D. Morisset, Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods, *Trends in Food Science & Technology*, 37 (2014) 115-126.
- [251] J.M. Ruijter, M.W. Pfaffl, S. Zhao, A.N. Spiess, G. Boggy, J. Blom, ..., J. Vandesompele, Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision, and implications, *Methods*, 59 (2013) 32-46.
- [252] M. Mazzara, C. Savini, C. Delobel, H. Broll, A. Damant, C. Paoletti, G. Van den Eede, Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing, Ispra: Joint Research Centre, (2008).
- [253] R. Yılmaz, C. Bayraç, A. Başman, H. Köksel, Development of SYBR green-based real time PCR assays for detection and quantification of adulteration in wheat-based composite breads and their in-house validation, *Journal of Cereal Science*, 85 (2019) 91-97.
- [254] S. Turco, G. Bastianelli, C. Morales-Rodriguez, A. Vannini, A. Mazzaglia, Development of a TaqMan qPCR assay for the detection and quantification of *Gnomoniopsis castaneae* in chestnut tissues, *Forest Pathology*, 51 (2021) e12701.
- [255] S. Nutz, K. Döll, P. Karlovsky, Determination of the LOQ in real-time PCR by receiver operating characteristic curve analysis: application to qPCR assays for *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401 (2011) 717-726.
- [256] S. Derveaux, J. Vandesompele, J. Hellemans, How to do successful gene expression analysis using real-time PCR, *Methods*, 50 (2010) 227-230.
- [257] H.D. VanGuilder, K.E. Vrana, W.M. Freeman, Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis, *Biotechniques*, 44 (2008) 619-626.

- [258] S.A. Bustin, T. Nolan, Analysis of mRNA expression by real time PCR. Real-Time PCR: An Essential Guide, K. Edwards, J. Logan, N. Saunders (Eds), Horizon Bioscience, Norfolk, 125-184, **2004**.
- [259] M. Farrag, S. Abri, N.D. Leipzig, pH-dependent RNA isolation from cells encapsulated in chitosan-based biomaterials, International Journal of Biological Macromolecules, 146 (**2020**) 422-430.
- [260] B. Zepeda, J.C. Verdonk, RNA extraction from plant tissue with homemade acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform (AGPC), Current Protocols, 2 (**2022**) e351.
- [261] A. Muthumanickam, L.K. Thugudam, N.U.I. Hossain, J.M. Lawrence, R. Jaradat, Determining the consistency rate for overall equipment effectiveness using the coefficient of variance method. Proceedings of the International Annual Conference of the American Society for Engineering Management, American Society for Engineering Management (ASEM), 1-8, **2020**.
- [262] E. De Keyser, L. Desmet, E. Van Bockstaele, J. De Riek, How to perform RT-qPCR accurately in plant species? A case study on flower colour gene expression in an azalea (*Rhododendron simsii* hybrids) mapping population, BMC Molecular Biology, 14 (**2013**) 1-15.
- [263] S. Qi, L. Yang, X. Wen, Y. Hong, X. Song, M. Zhang, S. Dai, Reference gene selection for RT-qPCR analysis of flower development in *Chrysanthemum morifolium* and *Chrysanthemum lavandulifolium*, Frontiers in Plant Science, 7 (**2016**) 287.
- [264] I. Rieu, S.J. Powers, Real-time quantitative RT-PCR: design, calculations, and Statistics, The Plant Cell, 21 (**2009**) 1031-1033.
- [265] M. Asiedu, R. Nilsen, Ø. Lie, E. Lied, Effect of processing (sprouting and/or fermentation) on sorghum and maize. I: proximate composition, minerals and fatty acids, Food Chemistry, 46 (**1993**) 351-353.
- [266] P. Sanjeev, D.P. Chaudhary, P. Sreevastava, S. Saha, A. Rajenderan, J.C. Sekhar, G.K. Chikkappa, Comparison of fatty acid profile of specialty maize to normal maize, Journal of the American Oil Chemists' Society, 91 (**2014**) 1001-1005.

- [267] C. Yururdurmaz, H. Yildiz, Fatty acid compositions of *Zea mays* L. varieties in Turkey, *Progress In Nutrition*, 24 (2022) e2022112.
- [268] Y. Deng, O. Padilla-Zakour, Y. Zhao, S. Tao, Influences of high hydrostatic pressure, microwave heating, and boiling on chemical compositions, antinutritional factors, fatty acids, in vitro protein digestibility, and microstructure of buckwheat, *Food and Bioprocess Technology*, 8 (2015) 2235-2245.
- [269] The Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Gross chemical composition, <https://www.fao.org/3/t0395e/T0395E01.GIF> (Erişim tarihi: 14 Ocak 2024).
- [270] R.M. Röhlig, J. Eder, K.H. Engel, Metabolite profiling of maize grain: differentiation due to genetics and environment, *Metabolomics*, 5 (2009) 459-477.
- [271] T. Obata, S. Witt, J. Lisec, N. Palacios-Rojas, I. Florez-Sarasa, S. Yousfi, J.L. Araus, J.E. Cairns, A.R. Fernie, Metabolite profiles of maize leaves in drought, heat, and combined stress field trials reveal the relationship between metabolism and grain yield, *Plant Physiology*, 169 (2015) 2665-2683.
- [272] M. Chen, R.S.P. Rao, Y. Zhang, C. Zhong, J.J. Thelen, Metabolite variation in hybrid corn grain from a large-scale multisite study, *The Crop Journal*, 4 (2016) 177-187.
- [273] M.H. Vazquez-Levin, G.L. Verón, Myo-inositol in health and disease: its impact on semen parameters and male fertility, *Andrology*, 8 (2020) 277-298.
- [274] M. Haris, K. Cai, A. Singh, H. Hariharan, R. Reddy, In vivo mapping of brain myo-inositol, *Neuroimage*, 54 (2011) 2079-2085.
- [275] J.P. Matthews, S. Gemme, H.J. Huebschmann, C. Llorente, R. Jimenez, N. Sreenivasulu, Metabolomics of rice genotypes using GC-MS/MS, *ThermoScientific Application Note*, (2015) 1-9.
- [276] I. Mssillou, A. Agour, N. Hamamouch, B. Lyoussi, E. Derwich, Chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of *Marrubium vulgare* L., *The Scientific World Journal*, 2021 (2021).
- [277] Y. Liu, Y. Wang, F. Guo, L. Zhan, T. Mohr, P. Cheng, ..., Y. Q. Gu, Deep sequencing and transcriptome analyses to identify genes involved in secoiridoid

- biosynthesis in the Tibetan medicinal plant *Swertia mussotii*, *Scientific Reports*, 7 (2017) 43108.
- [278] K. Hashimoto, S. Goto, S. Kawano, K.F. Aoki-Kinoshita, N. Ueda, M. Hamajima, ..., M. Kanehisa, KEGG as a glycome informatics resource, *Glycobiology*, 16 (2006) 63R-70R.
- [279] D. Zhu, L. Nyström, Phytosterols, Whole grains and their bioactives: Composition and health, (2019) 427-466, <https://doi.org/10.1002/9781119129486.ch17>.
- [280] G. Brufau, M.A. Canela, M. Rafecas, Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties, *Nutrition Research*, 28 (2008) 217-225.
- [281] S. Harrabi, A. St-Amand, F. Sakouhi, K. Sebei, H. Kallel, P.M. Mayer, S. Boukhchina, Phytosterols and phytosterols distributions in corn kernel, *Food Chemistry*, 111 (2008) 115-120.
- [282] S. Locatelli, N. Berardo, Chemical composition and phytosterols profile of degermed maize products derived from wet and dry milling, *Maydica*, 59 (2014) 261-266.
- [283] A. Hossain, A. Jayadeep, Analysis of bioaccessibility of campesterol, stigmasterol, and β -sitosterol in maize by in vitro digestion method, *Journal of Cereal Science*, 93 (2020) 102957.
- [284] T. Wang, P.J. White, Lipids of the kernel. Corn, S.O. Serna-Saldivar (Eds), Woodhead Publishing and AACC International Press, 337-368, 2019.
- [285] H.H. Bae, J.Y. Ha, Y.S. Go, J.H. Son, B.Y. Son, J.H. Kim, ..., G. Yi, High phytosterol levels in corn cobs point to their sustainable use as a nutritional source, *Applied Biological Chemistry*, 65 (2022) 69.
- [286] K.K. Mann, Health benefits of maize phytochemicals, *International Journal of Applied Social Science*, 1 (2014) 107-114.
- [287] B. Nemzer, F. Al-Taher, Analysis of Fatty Acid Composition in Sprouted Grains, *Foods*, 12 (2023) 1853.

- [288] F. Jahaniaval, Y. Kakuda, M.F. Marcone, Fatty acid and triacylglycerol compositions of seed oils of five *Amaranthus* accessions and their comparison to other oils, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77 (2000) 847-852.
- [289] Z. Momenzadeh, A. Khodanazary, K. Ghanemi, Effect of different cooking methods on vitamins, minerals and nutritional quality indices of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*), *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11 (2017) 434-441.
- [290] M. Lamine, A. Mlikia, Nutritional quality perceptions through fatty acid profiling, health lipid indices and antioxidant potentialities, *Open Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3 (2021) 1016.
- [291] D.D. Milinčić, A.Ž. Kostić, B. Špirović-Trifunović, Ž.L. Tešić, T. Tosti, A.M. Dramićanin, ..., M.B. Pešić, Grape seed flour of different grape pomaces: Fatty acid profile, soluble sugar profile and nutritional value, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 85 (2020) 305-319.
- [292] A.Ž. Kostić, M.P. Mačukanović-Jocić, B.D.Š. Trifunović, I.Ž. Vukašinović, V.B. Pavlović, M.B. Pešić, Fatty acids of maize pollen-Quantification, nutritional and morphological evaluation, *Journal of Cereal Science*, 77 (2017) 180-185.
- [293] WHO/FAO (World Health Organization/Food and Agriculture Organization), Diet, Nutrition and Prevention of Chronic Diseases. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation, WHO Technical Report Series 916. <http://health.euroafrica.org/books/dietnutritionwho.pdf> (Erişim tarihi: **14 Ocak 2024**).
- [294] O. Quehenberger, A.M. Armando, E.A. Dennis, High sensitivity quantitative lipidomics analysis of fatty acids in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811 (2011) 648-656.
- [295] I.G. McWilliam, R.A. Dewar, Flame ionization detector for gas chromatography, *Nature*, 181 (1958) 760-760.
- [296] F. Hamano, S.M. Tokuoka, T. Hashidate-Yoshida, H. Shindou, T. Shimizu, Y. Kita, Quantification of Fatty Acids in Mammalian Tissues by Gas

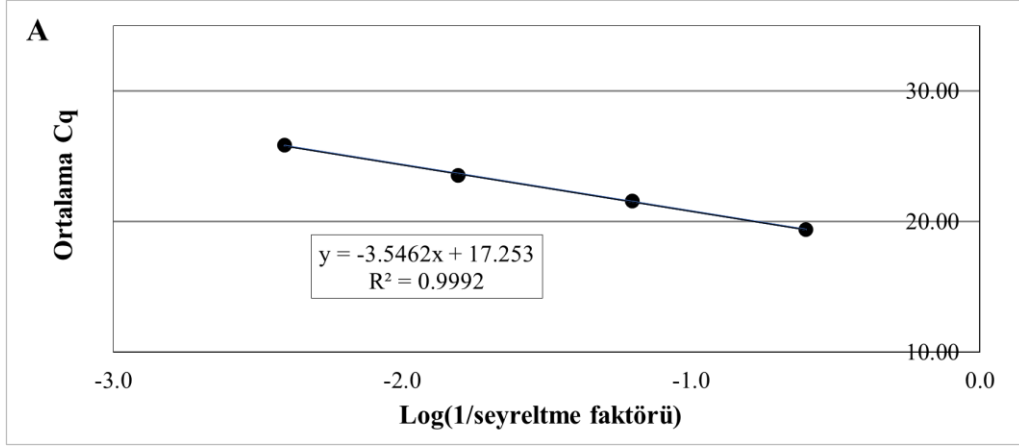
Chromatography-Hydrogen Flame Ionization Detection, *Bio-protocol*, 10 (2020) e3613.

- [297] K. Böhme, P. Calo-Mata, J. Barros-Velázquez, I. Ortea, Recent applications of omics-based technologies to main topics in food authentication, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 110 (2019) 221-232.
- [298] D.C. Lima, A.M. dos Santos, R.G. Araujo, I.S. Scarminio, R.E. Bruns, S.L. Ferreira, Principal component analysis and hierarchical cluster analysis for homogeneity evaluation during the preparation of a wheat flour laboratory reference material for inorganic analysis, *Microchemical Journal*, 95 (2010) 222-226.

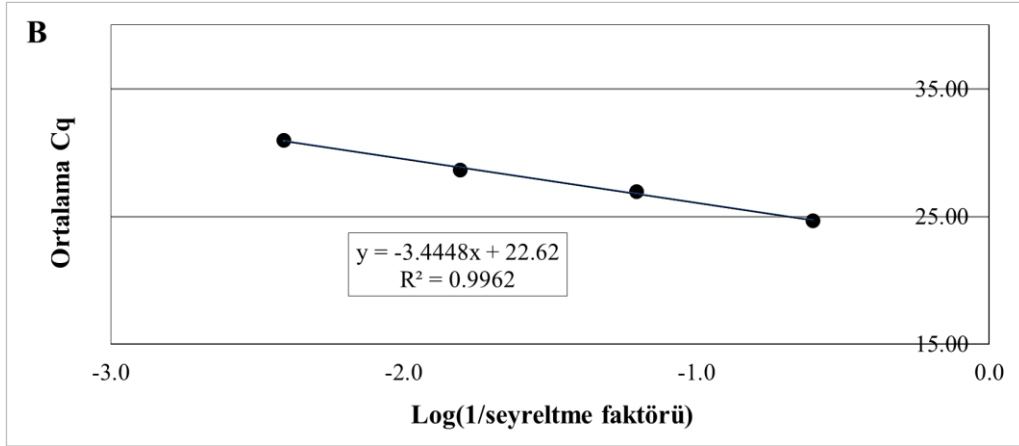
EKLER

EK 1 - Genomik Analizler Kapsamında Elde Edilen İnhibisyon Eğrileri

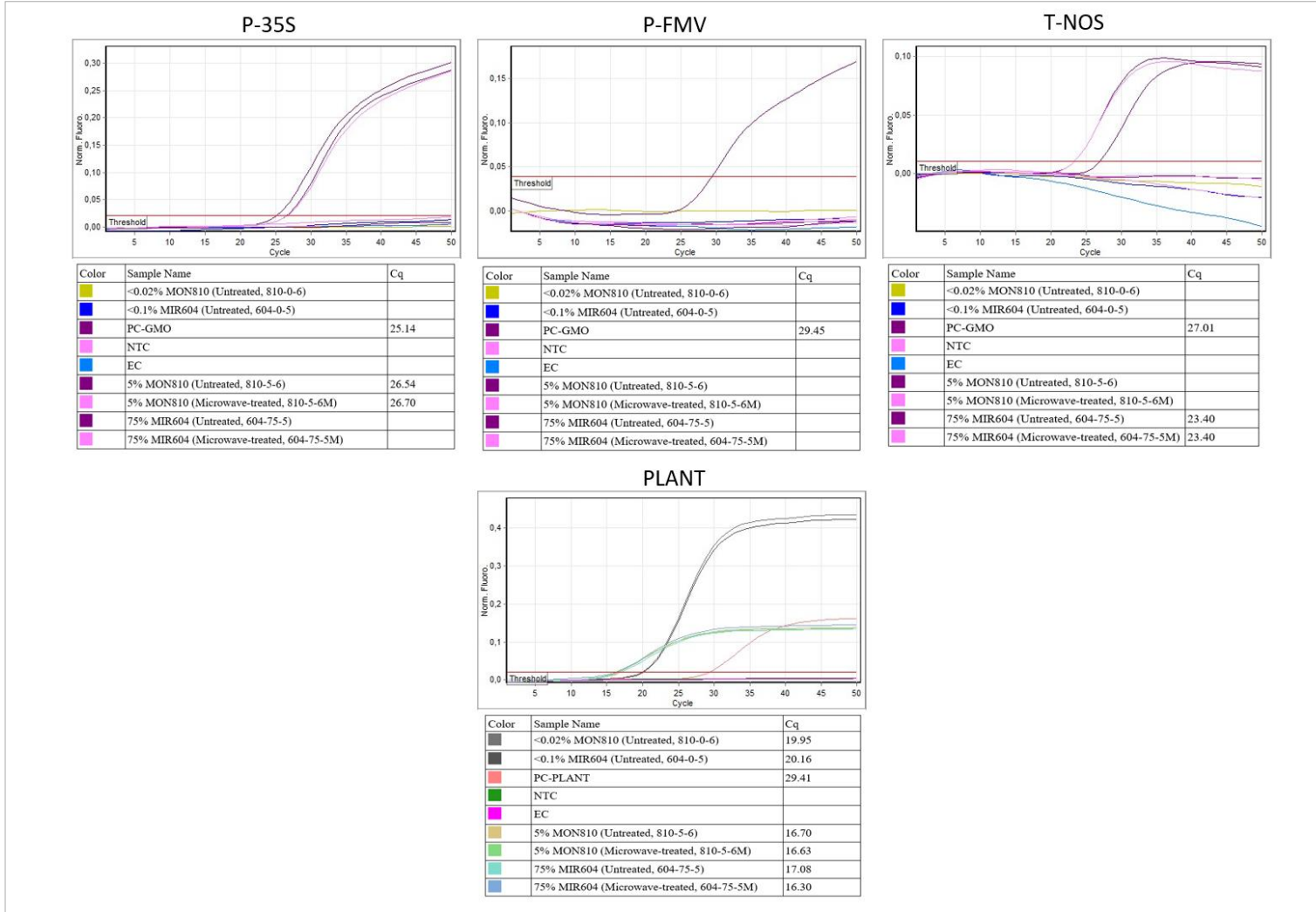
EK 1-A. MF1 (%< 0.1 GM MIR604) örneğinin inhibisyon eğrisi



EK 1-B. MF3 (%<0.02 GM MON810) örneğinin inhibisyon eğrisi



EK 2 - MIR604 ve MON810 Örnekleri için GMO Taramasına Ait Tipik Gerçek Zamanlı PCR Görüntüleri

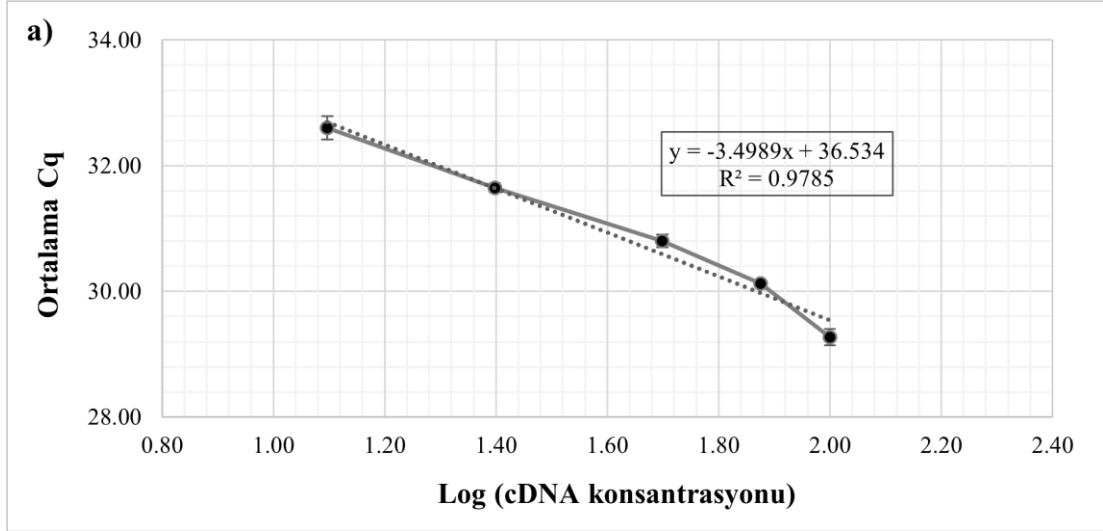


EK 3 - Mikrodalga Uygulanmayan Ticari Mısırın (C1) Seyreltilmiş cDNA Örneklerinde *ZmADHI* Amplifikasyonundan Sonra Elde Edilen Cq Değerleri

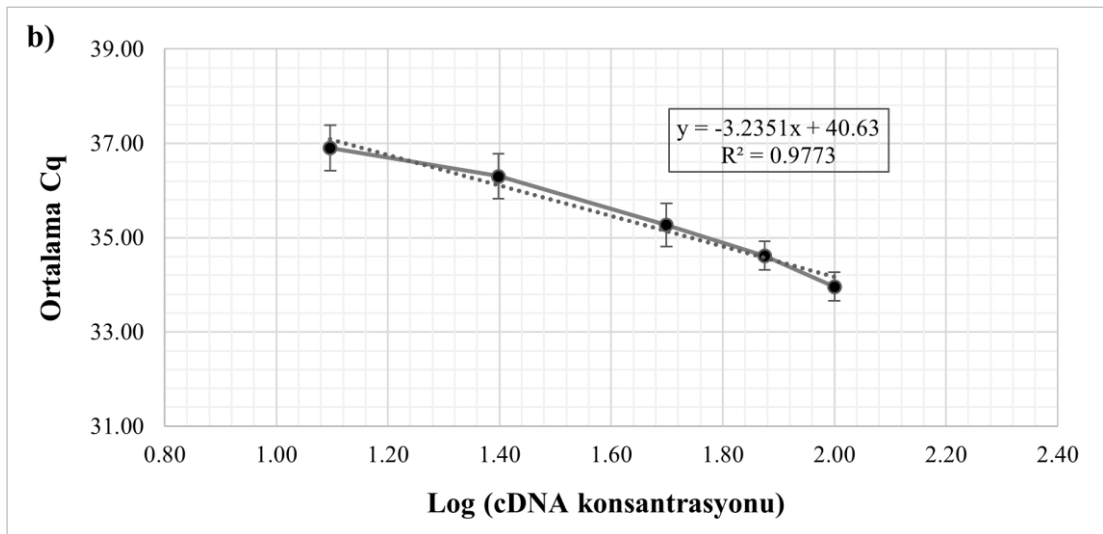
Seyreltme Faktörü	Ölçülen Cq	Ortalama Cq	Log (cDNA konsantrasyonu)
1:1 (100 ng/μL)	30.45	30.17 ± 0.28	2.00
	29.89		
1:2	31.58	31.13 ± 0.45	1.70
	30.67		
1:4	32.60	32.16 ± 0.44	1.40
	31.72		
1:8	33.68	33.28 ± 0.40	1.10
	32.88		
1:16	35.14	34.52 ± 0.63	0.80
	33.89		

EK 4 - EvaGreen Bazlı RT-qPCR Analizleri Sonrasında Oluşturulan Standart Eğriler

EK 4-A. *ZmAGO1a* amplifikasyonu sonrasında elde edilen standart eğri

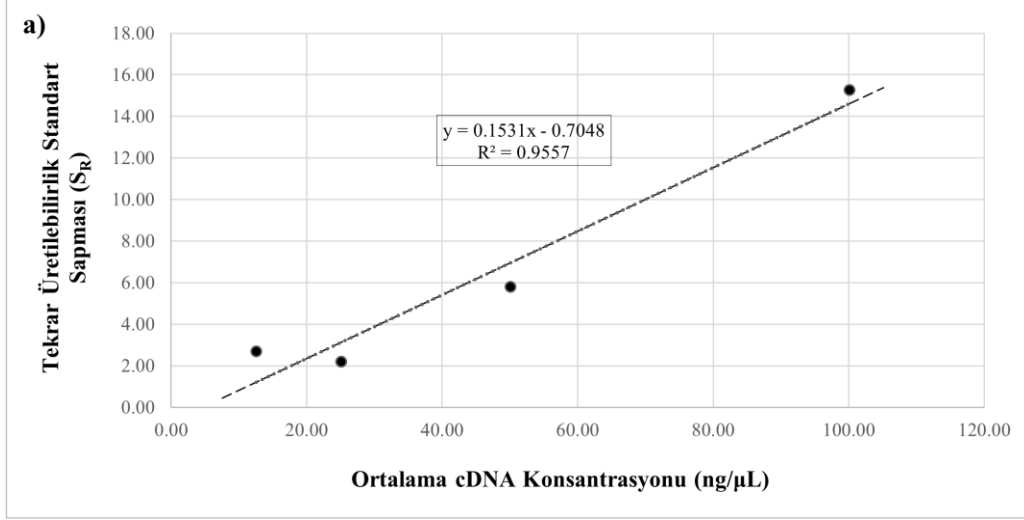


EK 4-B. *ZmRLK9* amplifikasyonu sonrasında elde edilen standart eğri

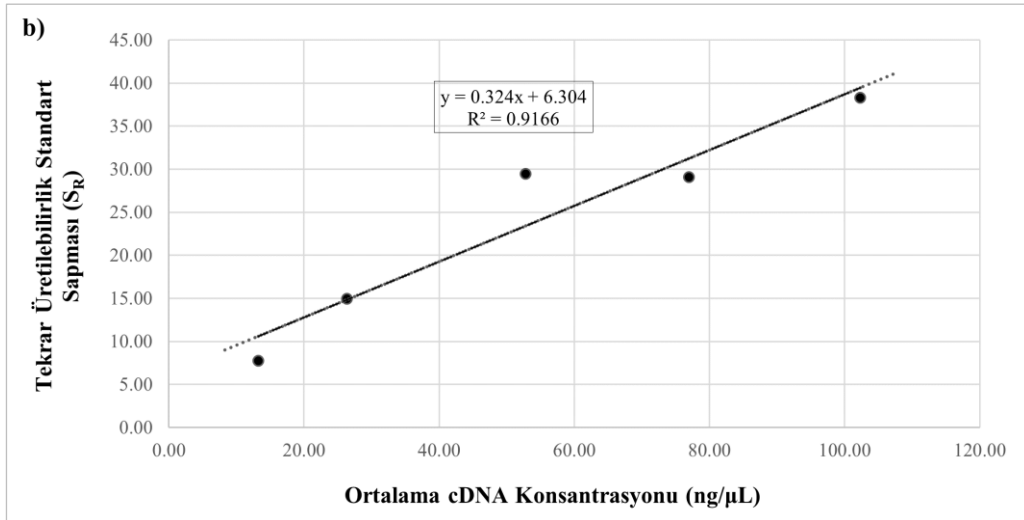


EK 5 - Mutlak Standart Belirsizlik (u_0) Değerlerini Belirlemek için Oluşturulan Doğrusal Regresyon Grafikleri

EK 5-A. *ZmAGO1a* genine ait doğrusal regresyon çizgisi



EK 5-B. *ZmRLK9* genine ait doğrusal regresyon çizgisi

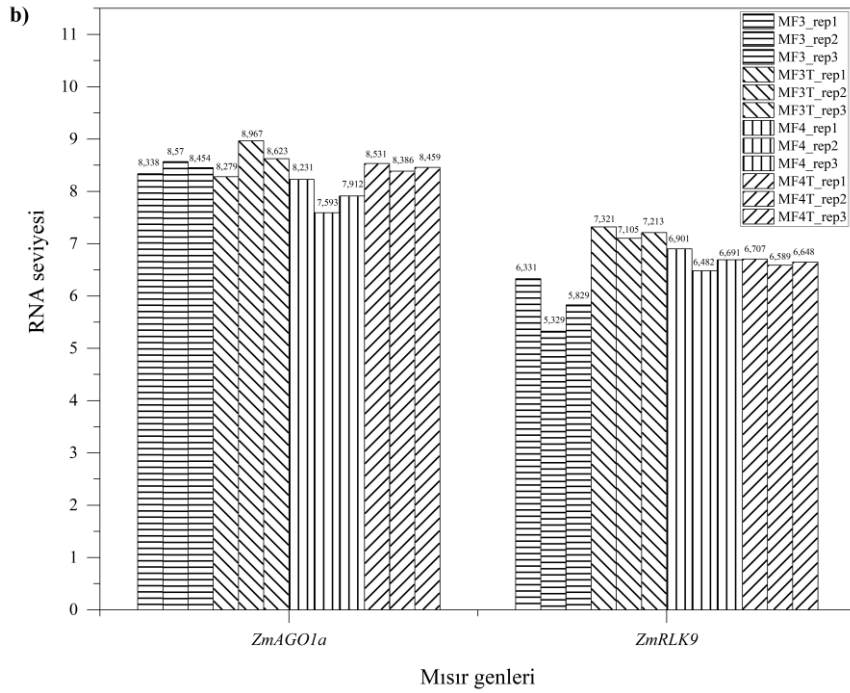
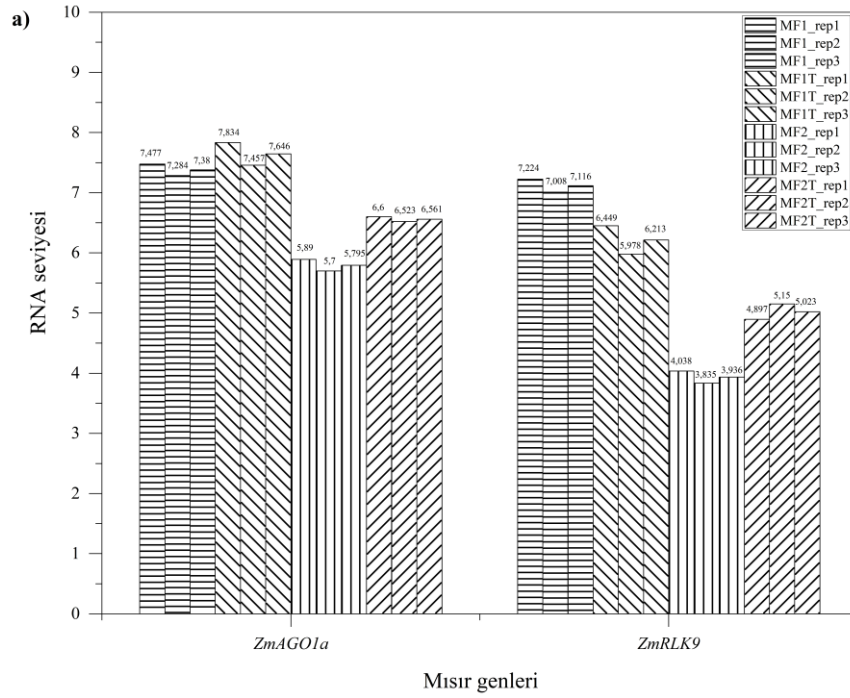


EK 6 - Mikrodalga Uygulanmayan ve Mikrodalga Uygulanan Mısır cDNA Örneklerinde İki Gen Amplifikasyonundan Sonra Elde Edilen Cq Değerleri

Örnek Adı	Örnek Kodu	Ölçülen Cq	
		<i>ZmAGO1a</i>	<i>ZmRLK9</i>
Mikrodalga Uygulanmayan Ticari Mısır Unu	C1 (%0 GM)	29.66	34.45
Mikrodalga Uygulanmayan Mısır Unu1	MF1 (%<0.1 GM MIR604)	28.67 28.87 28.77	33.60 33.82 33.71
Mikrodalga Uygulanan Mısır Unu1	MF1T* (%<0.1 GM MIR604)	28.29 28.69 28.49	34.37 34.83 34.60
Mikrodalga Uygulanmayan Mısır Unu2	MF2 (%75 GM MIR604)	30.36 30.56 30.46	36.79 37.00 36.89
Mikrodalga Uygulanan Mısır Unu2	MF2T* (%75 GM MIR604)	29.60 29.68 29.64	35.91 35.66 35.78
Mikrodalga Uygulanmayan Mısır Unu3	MF3 (%<0.02 GM MON810)	27.76 27.51 27.63	34.48 35.48 34.98
Mikrodalga Uygulanan Mısır Unu3	MF3T* (%<0.02 GM MON810)	27.82 27.09 27.46	33.51 33.72 33.61
Mikrodalga Uygulanmayan Mısır Unu4	MF4 (%5 GM MON810)	27.87 28.54 28.21	33.92 34.33 34.13
Mikrodalga Uygulanan Mısır Unu4	MF4T* (%5 GM MON810)	27.55 27.71 27.63	34.11 34.23 34.17

*: Mikrodalga işlemi (600 W, 2 dk)

EK 7 - Mikrodalga Uygulanmayan ve Mikrodalga Uygulanan Mısır cDNA Örneklerinde İki Gen Amplifikasyonundan Sonra Hesaplanan RNA Seviyeleri



a) MF1, MF1T, MF2 ve MF2T ve b) MF3, MF3T, MF4 ve MF4T örneklerine ait sütun grafikleri. Grafiklerin x eksenini mısır genlerini, y eksenini ise mutlak gen ekspresyon analizleri kapsamında log₂ ile dönüştürülmüş RNA seviyelerini temsil etmektedir.

EK 8- Mikrodalga Uygulanmayan ve Mikrodalga Uygulanan Mısır Unu Örneklerinde GC-MS ile Tespit Edilen Birincil Metabolitler

#	Alıkonma Zamanı (dk)	Birincil Metabolit Adı	Mol. Formülü	Mol. Ağırlığı (amu)
1	2.167	Silanamine, N, N'-methanetetraylbis[1,1,1-trimethyl-	C ₇ H ₁₈ N ₂ Si ₂	186.00
2	3.330	Lactic Acid, 2TMS derivative	C ₉ H ₂₂ O ₃ Si ₂	234.00
3	3.971	L-Alanine, 2TMS derivative	C ₉ H ₂₃ NO ₂ Si ₂	233.00
4	4.639	Glycolic acid, 2TMS derivative	C ₈ H ₂₀ O ₃ Si ₂	220.00
5	6.109	Ethanol, 2-(methylamino)-, N-trifluoroacetyl, O-(tert-butyl dimethylsilyl)	C ₁₁ H ₂₂ F ₃ NO ₂ Si	285.00
6	7.199	Ethanolamine, 3TMS derivative	C ₁₁ H ₃₁ NOSi ₃	277.00
7	7.379	L-Norleucine, 2TMS derivative	C ₁₂ H ₂₉ NO ₂ Si ₂	275.00
8	7.486	Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	C ₉ H ₂₇ O ₄ PSi ₃	314.00
9	7.573	Glycerol, 3TMS derivative	C ₁₂ H ₃₂ O ₃ Si ₃	308.00
10	7.827	L-Proline, 2TMS derivative	C ₁₁ H ₂₅ NO ₂ Si ₂	259.00
11	8.081	Glycine, 3TMS derivative	C ₁₁ H ₂₉ NO ₂ Si ₃	291.00
12	8.268	Butanedioic acid, 2TMS derivative	C ₁₀ H ₂₂ O ₄ Si ₂	262.00
13	9.551	L-Serine, 3TMS derivative	C ₁₂ H ₃₁ NO ₃ Si ₃	321.00
14	10.185	L-Threonine, 3TMS derivative	C ₁₃ H ₃₃ NO ₃ Si ₃	335.00
15	10.894	β-Alanine, 3TMS derivative	C ₁₂ H ₃₁ NO ₂ Si ₃	305.00
16	12.591	Malic acid, 3TMS derivative	C ₁₃ H ₃₀ O ₅ Si ₃	350.00
17	13.006	L-5-Oxoproline, 2TMS	C ₁₁ H ₂₃ NO ₃ Si ₂	273.00
18	13.259	L-Aspartic acid, 3TMS derivative	C ₁₃ H ₃₁ NO ₄ Si ₃	349.00

19	15.478	L-Glutamic acid, 3TMS derivative	C ₁₄ H ₃₃ NO ₄ Si ₃	363.00
20	16.560	Asparagine, 3TMS derivative	C ₁₃ H ₃₂ N ₂ O ₃ Si ₃	348.00
21	18.090	Adonitol, 5TMS (Ribitol) (IS)	C ₂₀ H ₅₂ O ₅ Si ₅	512.00
22	18.805	Phosphoric acid, bis(trimethylsilyl) 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester	C ₁₅ H ₄₁ O ₆ PSi ₄	460.00
23	19.888	Citric acid, 4TMS derivative	C ₁₈ H ₄₀ O ₇ Si ₄	480.00
24	21.164	D-Fructose, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, O-methyloxime	C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ Si ₅	569.00
25	21.384	L-(-)-Sorbose, pentakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (syn)	C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ Si ₅	569.00
26	21.498	D-Galactose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, o-methyloxime, (1E)-	C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ Si ₅	569.00
27	21.638	D-(+)-Talose, pentakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (syn)	C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ Si ₅	569.00
28	21.926	D-Glucose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, o-methyloxime, (1E)-	C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ Si ₅	569.00
29	22.347	D-Glucitol, 6TMS derivative	C ₂₄ H ₆₂ O ₆ Si ₆	614.00
30	23.549	D-Gluconic acid, 6TMS	C ₂₄ H ₆₀ O ₇ Si ₆	628.00
31	23.630	Palmitic Acid, TMS derivative	C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si	328.00
32	25.019	Myo-Inositol, 6TMS	C ₂₄ H ₆₀ O ₆ Si ₆	612.00
33	26.503	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, TMS derivative	C ₂₁ H ₄₀ O ₂ Si	352.00
34	26.610	9-Octadecenoic acid, (E)-, TMS derivative	C ₂₁ H ₄₂ O ₂ Si	354.00
35	27.084	Stearic acid, TMS derivative	C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si	356.00
36	34.294	Sucrose, 8TMS derivative	C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ Si ₈	918.00

EK 9 - Mikrodalga Uygulanmayan ve Mikrodalga Uygulanan Mısır Unu Örneklerinden Elde Edilen Birincil Metabolitlerinin Normalleştirilmiş Miktarları

EK 9-A. MF1, MF1T, MF2 ve MF2T örneklerinin birincil metabolit normalize değerleri

#	Birincil Metabolit Adı	RT (dk)	Metabolit Miktarı (mg/kg)*			
			MF1 (% < 0.1 GM MIR604)	MF1T** (% < 0.1 GM MIR604)	MF2 (% 75 GM MIR604)	MF2T** (% 75 GM MIR604)
Yağ asitleri ve türevleri						
1	Palmitic Acid, TMS derivative	23.630	0.890 ± 0.045 ^a	0.727 ± 0.239 ^a	1.026 ± 0.098 ^a	0.881 ± 0.048 ^a
2	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, TMS derivative	26.503	2.083 ± 0.034 ^a	1.728 ± 0.684 ^a	2.293 ± 0.147 ^a	2.222 ± 0.006 ^a
3	9-Octadecenoic acid, (E)-, TMS derivative	26.610	1.483 ± 0.030 ^a	1.195 ± 0.497 ^a	1.622 ± 0.085 ^a	1.566 ± 0.009 ^a
4	Stearic acid, TMS derivative	27.084	0.119 ± 0.013 ^{ab}	0.091 ± 0.045 ^b	0.161 ± 0.020 ^{ab}	0.251 ± 0.092 ^a
Toplam			4.575	3.741	5.102	4.920
Amino asitler ve türevleri						
5	L-Alanine, 2TMS derivative	3.971	0.165 ± 0.043 ^a	0.177 ± 0.047 ^a	0.124 ± 0.018 ^{ab}	0.075 ± 0.010 ^b
6	L-Norleucine, 2TMS derivative	7.379	0.016 ± 0.006 ^a	0.016 ± 0.002 ^a	0.008 ± 0.003 ^{ab}	0.006 ± 0.000 ^b
7	L-Proline, 2TMS derivative	7.827	0.360 ± 0.039 ^a	0.429 ± 0.076 ^a	0.207 ± 0.012 ^b	0.194 ± 0.015 ^b
8	Glycine, 3TMS derivative	8.081	0.023 ± 0.004 ^a	0.024 ± 0.005 ^a	0.038 ± 0.017 ^a	0.018 ± 0.002 ^a
9	L-Serine, 3TMS derivative	9.551	0.051 ± 0.008 ^{ab}	0.059 ± 0.011 ^a	0.051 ± 0.017 ^{ab}	0.026 ± 0.001 ^b
10	L-Threonine, 3TMS derivative	10.185	0.023 ± 0.005 ^a	0.029 ± 0.009 ^a	0.018 ± 0.004 ^a	0.014 ± 0.000 ^a
11	β-Alanine, 3TMS derivative	10.894	0.019 ± 0.000 ^{ab}	0.023 ± 0.009 ^a	0.012 ± 0.001 ^b	0.010 ± 0.000 ^b

12	L-5-Oxoproline, 2TMS	13.006	0.068 ± 0.003 ^a	0.068 ± 0.001 ^a	0.037 ± 0.003 ^b	0.083 ± 0.015 ^a
13	L-Aspartic acid, 3TMS derivative	13.259	0.233 ± 0.006 ^a	0.256 ± 0.019 ^a	0.145 ± 0.009 ^b	0.168 ± 0.011 ^b
14	L-Glutamic acid, 3TMS derivative	15.478	0.130 ± 0.007 ^a	0.135 ± 0.000 ^a	0.124 ± 0.023 ^a	0.124 ± 0.005 ^a
15	Asparagine, 3TMS derivative	16.560	0.071 ± 0.013 ^a	0.061 ± 0.019 ^a	0.047 ± 0.001 ^a	0.038 ± 0.016 ^a
Toplam			1.159	1.277	0.811	0.756
Şekerler ve türevleri						
16	D-Fructose, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, O-methyloxime	21.164	0.487 ± 0.016 ^b	0.470 ± 0.099 ^b	0.698 ± 0.024 ^a	0.599 ± 0.041 ^{ab}
17	L-(-)-Sorbose, pentakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (syn)	21.384	0.340 ± 0.007 ^b	0.311 ± 0.082 ^b	0.506 ± 0.009 ^a	0.412 ± 0.012 ^{ab}
18	D-Galactose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, o-methyloxime, (1E)-	21.498	0.045 ± 0.003 ^b	0.032 ± 0.018 ^b	0.070 ± 0.004 ^a	0.039 ± 0.005 ^b
19	D-(+)-Talose, pentakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (syn)	21.638	0.554 ± 0.007 ^b	0.497 ± 0.125 ^b	0.888 ± 0.025 ^a	0.612 ± 0.032 ^b
20	D-Glucose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, o-methyloxime, (1E)-	21.926	0.114 ± 0.002 ^b	0.103 ± 0.025 ^b	0.229 ± 0.033 ^a	0.144 ± 0.004 ^b
21	D-Glucitol, 6TMS derivative	22.347	0.493 ± 0.020 ^{ab}	0.407 ± 0.057 ^b	0.565 ± 0.040 ^a	0.512 ± 0.012 ^a
22	D-Gluconic acid, 6TMS	23.549	0.022 ± 0.008 ^b	0.015 ± 0.001 ^b	0.055 ± 0.007 ^a	0.041 ± 0.008 ^a
23	Myo-Inositol, 6TMS	25.019	0.114 ± 0.006 ^b	0.096 ± 0.031 ^b	0.208 ± 0.022 ^a	0.188 ± 0.006 ^a
24	Sucrose, 8TMS derivative	34.294	2.545 ± 0.000 ^b	2.753 ± 0.00 ^{ab}	3.043 ± 0.283 ^a	2.966 ± 0.008 ^a
Toplam			4.714	4.684	6.262	5.513
Alkoller ve türevleri						

25	Ethanol, 2-(methylamino)-, N-trifluoroacetyl, O-(tert-butyl dimethylsilyl)	6.109	0.105 ± 0.010 ^a	0.103 ± 0.011 ^a	0.099 ± 0.011 ^a	0.090 ± 0.012 ^a
26	Ethanolamine, 3TMS derivative	7.199	0.036 ± 0.004 ^{ab}	0.045 ± 0.014 ^a	0.018 ± 0.001 ^{bc}	0.013 ± 0.002 ^c
27	Glycerol, 3TMS derivative	7.573	2.496 ± 0.165 ^{ab}	2.729 ± 0.284 ^a	2.017 ± 0.052 ^c	2.209 ± 0.045 ^{bc}
Toplam			2.637	2.877	2.134	2.312
Organik asitler ve türevleri						
28	Lactic Acid, 2TMS derivative	3.330	0.040 ± 0.002 ^a	0.036 ± 0.013 ^a	0.030 ± 0.004 ^a	0.027 ± 0.003 ^a
29	Glycolic acid, 2TMS derivative	4.639	0.178 ± 0.034 ^a	0.218 ± 0.052 ^a	0.159 ± 0.016 ^a	0.165 ± 0.010 ^a
30	Butanedioic acid, 2TMS derivative	8.268	0.047 ± 0.009 ^a	0.048 ± 0.010 ^a	0.035 ± 0.005 ^a	0.048 ± 0.008 ^a
31	Malic acid, 3TMS derivative	12.591	0.163 ± 0.000 ^b	0.177 ± 0.011 ^b	0.159 ± 0.000 ^b	0.234 ± 0.021 ^a
32	Citric acid, 4TMS derivative	19.888	0.117 ± 0.013 ^a	0.101 ± 0.036 ^{ab}	0.092 ± 0.009 ^{ab}	0.064 ± 0.003 ^b
Toplam			0.545	0.580	0.476	0.538
Diğerleri						
33	Silanamine, N,N'-methanetetraylbis[1,1,1-trimethyl-	2.167	0.050 ± 0.006 ^a	0.042 ± 0.006 ^a	0.046 ± 0.001 ^a	0.028 ± 0.000 ^b
34	Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	7.486	0.586 ± 0.034 ^a	0.693 ± 0.079 ^a	0.366 ± 0.013 ^b	0.433 ± 0.013 ^b
35	Phosphoric acid, bis(trimethylsilyl) 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester	18.805	0.032 ± 0.009 ^a	0.028 ± 0.014 ^a	0.090 ± 0.048 ^a	0.063 ± 0.030 ^a
Toplam			0.668	0.763	0.501	0.524

RT: Her bir metabolitin alıkonma zamanı

*: Tüm değerler, analiz edilen örneklerin kg'ı başına mg dahili standart (adonitol) eşdeğerleri cinsinden ifade edilmiştir. Bir satır içinde farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=3) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, $p < 0.05$.

** : Mikrodalga işlemi (600 W, 2 dk)

EK 9-B. MF3, MF3T, MF4 ve MF4T örneklerinin birincil metabolit normalize değerleri

#	Birincil Metabolit Adı	RT (dk)	Metabolit Miktarı (mg/kg)*			
			MF3 (%<0.02 GM MON810)	MF3T** (%<0.02 GM MON810)	MF4 (%5 GM MON810)	MF4T** (%5 GM MON810)
Yağ asitleri ve türevleri						
1	Palmitic Acid, TMS derivative	23.630	0.099 ± 0.029 ^a	0.115 ± 0.008 ^a	0.159 ± 0.017 ^a	0.155 ± 0.033 ^a
2	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, TMS derivative	26.503	0.287 ± 0.093 ^a	0.354 ± 0.069 ^a	0.462 ± 0.096 ^a	0.420 ± 0.015 ^a
3	9-Octadecenoic acid, (E)-, TMS derivative	26.610	0.134 ± 0.030 ^b	0.183 ± 0.058 ^{ab}	0.241 ± 0.041 ^a	0.217 ± 0.009 ^{ab}
4	Stearic acid, TMS derivative	27.084	0.010 ± 0.003 ^b	0.033 ± 0.006 ^a	0.018 ± 0.006 ^{ab}	0.020 ± 0.008 ^{ab}
Toplam			0.530	0.685	0.880	0.812
Amino asitler ve türevleri						
5	L-Alanine, 2TMS derivative	3.971	0.045 ± 0.008 ^{bc}	0.026 ± 0.002 ^c	0.067 ± 0.003 ^{ab}	0.088 ± 0.020 ^a
6	L-Norleucine, 2TMS derivative	7.379	0.001 ± 0.000 ^b	0.002 ± 0.000 ^b	0.006 ± 0.002 ^a	0.006 ± 0.000 ^a
7	L-Proline, 2TMS derivative	7.827	0.177 ± 0.022 ^{bc}	0.093 ± 0.014 ^c	0.200 ± 0.030 ^{ab}	0.284 ± 0.068 ^a
8	Glycine, 3TMS derivative	8.081	0.014 ± 0.002 ^b	0.010 ± 0.001 ^c	0.017 ± 0.002 ^{ab}	0.020 ± 0.000 ^a
9	L-Serine, 3TMS derivative	9.551	0.022 ± 0.001 ^a	0.012 ± 0.003 ^b	0.023 ± 0.002 ^a	0.027 ± 0.003 ^a
10	L-Threonine, 3TMS derivative	10.185	0.002 ± 0.000 ^b	0.004 ± 0.001 ^b	0.009 ± 0.002 ^b	0.025 ± 0.006 ^a
11	β-Alanine, 3TMS derivative	10.894	0.001 ± 0.000 ^c	0.005 ± 0.001 ^b	0.005 ± 0.001 ^b	0.009 ± 0.000 ^a
12	L-5-Oxoproline, 2TMS	13.006	0.016 ± 0.008 ^b	0.042 ± 0.000 ^a	0.018 ± 0.001 ^b	0.014 ± 0.001 ^b
13	L-Aspartic acid, 3TMS derivative	13.259	0.104 ± 0.003 ^c	0.061 ± 0.004 ^d	0.175 ± 0.001 ^b	0.215 ± 0.000 ^a
14	L-Glutamic acid, 3TMS derivative	15.478	0.049 ± 0.016 ^b	0.103 ± 0.000 ^a	0.081 ± 0.008 ^a	0.097 ± 0.000 ^a

15	Asparagine, 3TMS derivative	16.560	0.017 ± 0.004^b	0.003 ± 0.000^c	0.032 ± 0.006^a	0.035 ± 0.005^a
Toplam			0.448	0.361	0.633	0.820
Şekerler ve türevleri						
16	D-Fructose, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, O-methyloxime	21.164	0.401 ± 0.070^b	0.430 ± 0.000^b	0.742 ± 0.039^a	0.765 ± 0.128^a
17	L-(-)-Sorbose, pentakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (syn)	21.384	0.278 ± 0.045^b	0.294 ± 0.013^b	0.516 ± 0.021^a	0.544 ± 0.089^a
18	D-Galactose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, o-methyloxyme, (1E)-	21.498	0.035 ± 0.004^b	0.026 ± 0.000^b	0.077 ± 0.017^a	0.070 ± 0.007^a
19	D-(+)-Talose, pentakis(trimethylsilyl) ether, methyloxime (syn)	21.638	0.564 ± 0.082^b	0.480 ± 0.033^b	0.919 ± 0.039^a	0.938 ± 0.136^a
20	D-Glucose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, o-methyloxyme, (1E)-	21.926	0.120 ± 0.022^b	0.126 ± 0.019^b	0.206 ± 0.010^a	0.223 ± 0.029^a
21	D-Glucitol, 6TMS derivative	22.347	0.288 ± 0.049^a	0.297 ± 0.026^a	0.363 ± 0.026^a	0.359 ± 0.031^a
22	D-Gluconic acid, 6TMS	23.549	0.008 ± 0.000^{ab}	0.015 ± 0.004^a	0.010 ± 0.004^{ab}	0.005 ± 0.002^b
23	Myo-Inositol, 6TMS	25.019	0.098 ± 0.028^b	0.370 ± 0.009^a	0.142 ± 0.023^b	0.135 ± 0.014^b
24	Sucrose, 8TMS derivative	34.294	2.458 ± 0.081^{ab}	2.326 ± 0.119^b	2.797 ± 0.320^a	2.425 ± 0.044^{ab}
Toplam			4.250	4.364	5.772	5.464
Alkoller ve türevleri						
25	Ethanol, 2-(methylamino)-, N-trifluoroacetyl, O-(tert-butyl)dimethylsilyl)	6.109	0.076 ± 0.011^a	0.061 ± 0.000^a	0.073 ± 0.000^a	0.088 ± 0.020^a
26	Ethanolamine, 3TMS derivative	7.199	0.011 ± 0.004^a	0.004 ± 0.000^b	0.009 ± 0.001^{ab}	0.013 ± 0.002^a

27	Glycerol, 3TMS derivative	7.573	0.119 ± 0.002 ^c	0.100 ± 0.009 ^c	0.206 ± 0.010 ^b	0.285 ± 0.034 ^a
Toplam			0.206	0.165	0.288	0.386
Organik asitler ve türevleri						
28	Lactic Acid, 2TMS derivative	3.330	0.017 ± 0.003 ^{ab}	0.017 ± 0.002 ^{ab}	0.015 ± 0.001 ^b	0.023 ± 0.004 ^a
29	Glycolic acid, 2TMS derivative	4.639	0.174 ± 0.023 ^a	0.167 ± 0.022 ^{ab}	0.128 ± 0.004 ^b	0.160 ± 0.015 ^{ab}
30	Butanedioic acid, 2TMS derivative	8.268	0.014 ± 0.000 ^b	0.015 ± 0.001 ^b	0.019 ± 0.003 ^b	0.031 ± 0.003 ^a
31	Malic acid, 3TMS derivative	12.591	0.066 ± 0.002 ^b	0.085 ± 0.015 ^{ab}	0.070 ± 0.001 ^{ab}	0.090 ± 0.008 ^a
32	Citric acid, 4TMS derivative	19.888	0.116 ± 0.027 ^a	0.095 ± 0.030 ^a	0.083 ± 0.013 ^a	0.081 ± 0.016 ^a
Toplam			0.387	0.379	0.315	0.385
Diğerleri						
33	Silanamine, N,N'-methanetetrailbis[1,1,1-trimethyl-	2.167	0.037 ± 0.006 ^a	0.039 ± 0.005 ^a	0.036 ± 0.005 ^a	0.036 ± 0.000 ^a
34	Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	7.486	0.115 ± 0.001 ^c	0.132 ± 0.018 ^{bc}	0.195 ± 0.019 ^{ab}	0.241 ± 0.041 ^a
35	Phosphoric acid, bis(trimethylsilyl) 2,3- bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester	18.805	0.016 ± 0.007 ^b	0.047 ± 0.020 ^a	0.017 ± 0.005 ^b	0.014 ± 0.000 ^b
Toplam			0.168	0.218	0.248	0.291

RT: Her bir metabolitin alıkonma zamanı

*: Tüm değerler, analiz edilen örneklerin kg'ı başına mg dahili standart (adonitol) eşdeğerleri cinsinden ifade edilmiştir. Bir satır içinde farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=3) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, $p < 0.05$.

** : Mikroalga işlemleri (600 W, 2 dk)

EK 10 - Birincil Metabolitlerin KEGG Veri Tabanı ile Analizi

EK 10-A. Birincil Metabolitlerin KEGG Giriş Numaraları ve Katıldıkları Metabolik Yolaklar

#	Birincil Metabolit Adı	KEGG Bileşik Veri Tabanı ID	KEGG Yolağı Veri Tabanı ID
Yağ asitleri ve türevleri			
1	Palmitic Acid	C00249	zma00061, zma00062, zma00071, zma00073, zma01040, zma01100, zma01212
2	9,12-Octadecadienoic acid	C01595	zma00591, zma01040, zma01100
3	9-Octadecenoic acid	C00712	zma00061, zma00073, zma01040
4	Stearic acid	C01530	zma00061, zma01040, zma01100
Amino asitler ve türevleri			
5	L-Alanine	C00041	zma00250, zma00270, zma00430, zma00450, zma00470, zma00710, zma00970, zma01100, zma01110, zma01200, zma01210, zma01230, zma02010, zma04122
6	L-Norleucine	C01933	-
7	L-Proline	C00148	zma00330, zma00470, zma00970, zma01100, zma01110, zma01230, zma02010
8	Glycine	C00037	zma00230, zma00260, zma00310, zma00440, zma00460, zma00470, zma00480, zma00630, zma00730, zma00785, zma00860, zma00970, zma01100, zma01110, zma01200, zma01230, zma01240, zma02010
9	L-Serine	C00065	zma00260, zma00261, zma00270, zma00460, zma00470, zma00564, zma00600, zma00630, zma00920, zma00970, zma01100, zma01110, zma01200, zma01230, zma01240, zma02010

10	L-Threonine	C00188	zma00260, zma00261, zma00290, zma00470, zma00860, zma00970, zma01100, zma01110, zma01230, zma02010
11	β -Alanine	C00099	zma00240, zma00410, zma00640, zma00770, zma01100, zma01110, zma01240
12	L-5-Oxoproline	C01879	zma00480, zma01100
13	L-Aspartic acid	C00049	zma00220, zma00250, zma00260, zma00261, zma00270, zma00300, zma00340, zma00410, zma00460, zma00470, zma00710, zma00760, zma00770, zma00970, zma00999, zma01100, zma01110, zma01200, zma01210, zma01230, zma01240, zma02010
14	L-Glutamic acid	C00025	zma00220, zma00250, zma00330, zma00340, zma00430, zma00470, zma00480, zma00630, zma00650, zma00660, zma00860, zma00910, zma00970, zma01100, zma01110, zma01200, zma01210, zma01230, zma01240, zma02010
15	Asparagine	C16438	-
Şekerler ve türevleri			
16	D-Fructose	C00095	zma00051, zma00052, zma00500, zma01100, zma01110, zma02010
17	L-Sorbose	C00247	zma00051, zma01100
18	D-Galactose	C00124	zma00052, zma01100
19	D-Talose	C06467	-
20	D-Glucose	C00031	zma00010, zma00030, zma00052, zma00500, zma00520, zma01100, zma01110, zma02010
21	D-Glucitol	C00794	zma00051, zma00052, zma01100, zma02010
22	D-Gluconic acid	C00257	zma00030, zma01100, zma01110, zma01200
23	Myo-Inositol	C00137	zma00052, zma00053, zma00562, zma01100, zma01110, zma01250, zma02010, zma04070

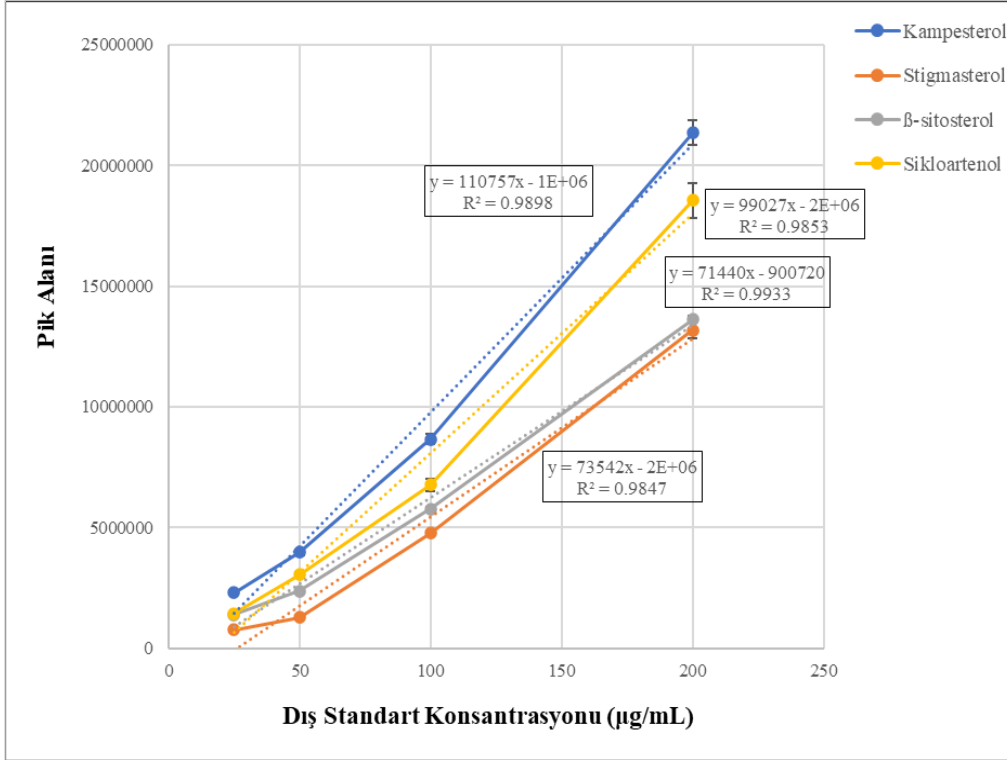
24	Sucrose	C00089	zma00052, zma00500, zma01100, zma01110, zma02010
Alkoller ve türevleri			
25	Ethanol	C00469	zma00010, zma00620, zma01100, zma01110
26	Ethanolamine	C00189	zma00564, zma01100
27	Glycerol	C00116	zma00040, zma00052, zma00561, zma01100, zma02010
Organik asitler ve türevleri			
28	Lactic Acid	C01432	-
29	Glycolic acid	C00160	zma00630, zma01100, zma01110, zma01200
30	Butanedioic acid	C00042	zma00020, zma00190, zma00250, zma00310, zma00350, zma00360, zma00620, zma00630, zma00640, zma00650, zma00760, zma00920, zma01100, zma01110, zma01200
31	Malic acid	C00149	zma00020, zma00620, zma00630, zma00710, zma01100, zma01110, zma01200
32	Citric acid	C00158	zma00020, zma00250, zma00630, zma01100, zma01110, zma01200, zma01210, zma01230, zma01240
Diğerleri			
33	Silanamine	-	-
34	Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	-	-
35	Phosphoric acid	C00009	zma00190, zma00195, zma02010

EK 10-B. Birincil Metabolitleri İçeren Metabolik Yolakların Listesi

#	KEGG Yolağı Veri Tabanı ID	Metabolik Yolak Adı
1	zma00010	Glycolysis / Gluconeogenesis - <i>Zea mays</i> (maize)
2	zma00020	Citrate cycle (TCA cycle) - <i>Zea mays</i> (maize)
3	zma00030	Pentose phosphate pathway - <i>Zea mays</i> (maize)
4	zma00040	Pentose and glucuronate interconversions - <i>Zea mays</i> (maize)
5	zma00051	Fructose and mannose metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
6	zma00052	Galactose metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
7	zma00053	Ascorbate and aldarate metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
8	zma00061	Fatty acid biosynthesis - <i>Zea mays</i> (maize)
9	zma00062	Fatty acid elongation - <i>Zea mays</i> (maize)
10	zma00071	Fatty acid degradation - <i>Zea mays</i> (maize)
11	zma00073	Cutin, suberine and wax biosynthesis - <i>Zea mays</i> (maize)
12	zma00190	Oxidative phosphorylation - <i>Zea mays</i> (maize)
13	zma00195	Photosynthesis - <i>Zea mays</i> (maize)
14	zma00220	Arginine biosynthesis - <i>Zea mays</i> (maize)
15	zma00230	Purine metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
16	zma00240	Pyrimidine metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
17	zma00250	Alanine, aspartate and glutamate metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
18	zma00260	Glycine, serine and threonine metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
19	zma00261	Monobactam biosynthesis - <i>Zea mays</i> (maize)
20	zma00270	Cysteine and methionine metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
21	zma00290	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis - <i>Zea mays</i> (maize)
22	zma00300	Lysine biosynthesis - <i>Zea mays</i> (maize)
23	zma00310	Lysine degradation - <i>Zea mays</i> (maize)
24	zma00330	Arginine and proline metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
25	zma00340	Histidine metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
26	zma00350	Tyrosine metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
27	zma00360	Phenylalanine metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
28	zma00410	beta-Alanine metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
29	zma00430	Taurine and hypotaurine metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
30	zma00440	Phosphonate and phosphinate metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
31	zma00450	Selenocompound metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
32	zma00460	Cyanoamino acid metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
33	zma00470	D-Amino acid metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
34	zma00480	Glutathione metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
35	zma00500	Starch and sucrose metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
36	zma00520	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
37	zma00561	Glycerolipid metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
38	zma00562	Inositol phosphate metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
39	zma00564	Glycerophospholipid metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
40	zma00591	Linoleic acid metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
41	zma00600	Sphingolipid metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
42	zma00620	Pyruvate metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)

43	zma00630	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
44	zma00640	Propanoate metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
45	zma00650	Butanoate metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
46	zma00660	C5-Branched dibasic acid metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
47	zma00710	Carbon fixation in photosynthetic organisms - <i>Zea mays</i> (maize)
48	zma00730	Thiamine metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
49	zma00760	Nicotinate and nicotinamide metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
50	zma00770	Pantothenate and CoA biosynthesis - <i>Zea mays</i> (maize)
51	zma00785	Lipoic acid metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
52	zma00860	Porphyrin metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
53	zma00910	Nitrogen metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
54	zma00920	Sulfur metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
55	zma00970	Aminoacyl-tRNA biosynthesis - <i>Zea mays</i> (maize)
56	zma00999	Biosynthesis of various plant secondary metabolites - <i>Zea mays</i> (maize); Including: Crocin biosynthesis
57	zma01040	Biosynthesis of unsaturated fatty acids - <i>Zea mays</i> (maize)
58	zma01100	Metabolic pathways - <i>Zea mays</i> (maize)
59	zma01110	Biosynthesis of secondary metabolites - <i>Zea mays</i> (maize)
60	zma01200	Carbon metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
61	zma01210	2-Oxocarboxylic acid metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
62	zma01212	Fatty acid metabolism - <i>Zea mays</i> (maize)
63	zma01230	Biosynthesis of amino acids - <i>Zea mays</i> (maize)
64	zma01240	Biosynthesis of cofactors - <i>Zea mays</i> (maize)
65	zma01250	Biosynthesis of nucleotide sugars - <i>Zea mays</i> (maize)
66	zma02010	ABC transporters - <i>Zea mays</i> (maize)
67	zma04070	Phosphatidylinositol signaling system - <i>Zea mays</i> (maize)
68	zma04122	Sulfur relay system - <i>Zea mays</i> (maize)

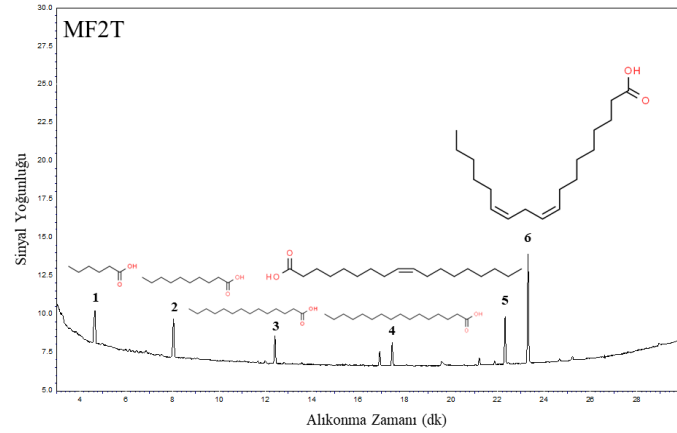
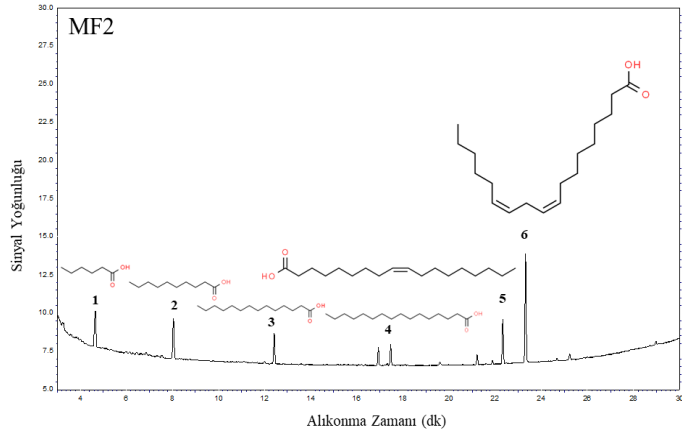
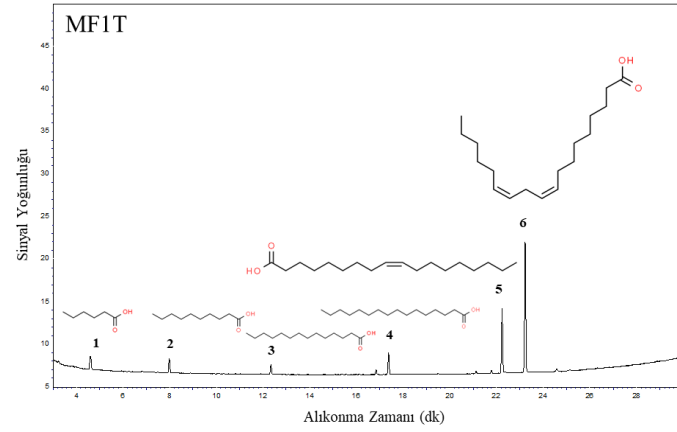
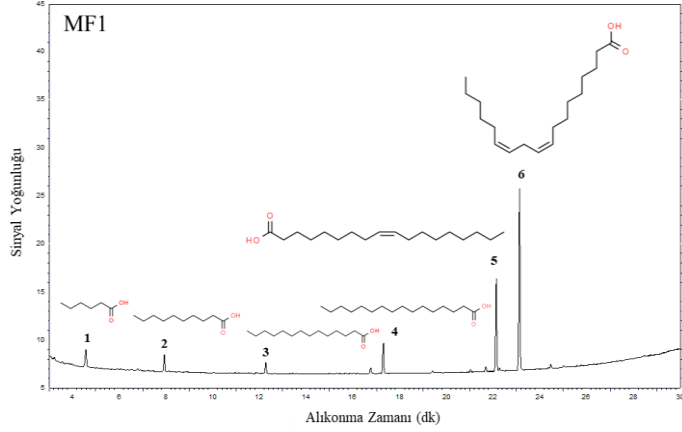
EK 11 - Fitosterollerin Tanımlanmasında Kullanılan Standartlara Ait Kalibrasyon Eğrisi Grafikleri



Grafiklerde gösterilen çubuklar, n=2 ile ortalama ± standart hatayı (SE) ifade etmektedir

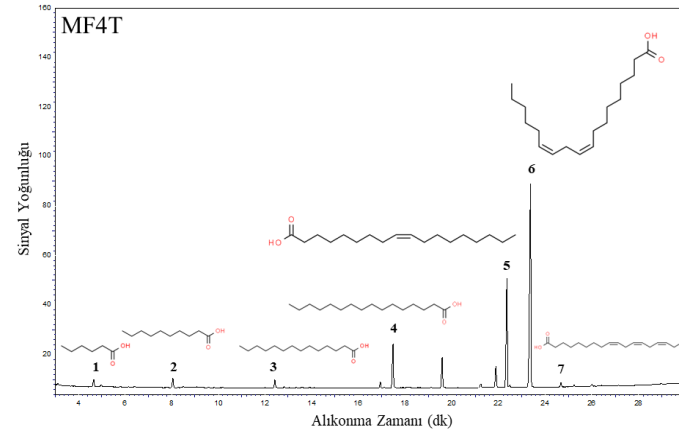
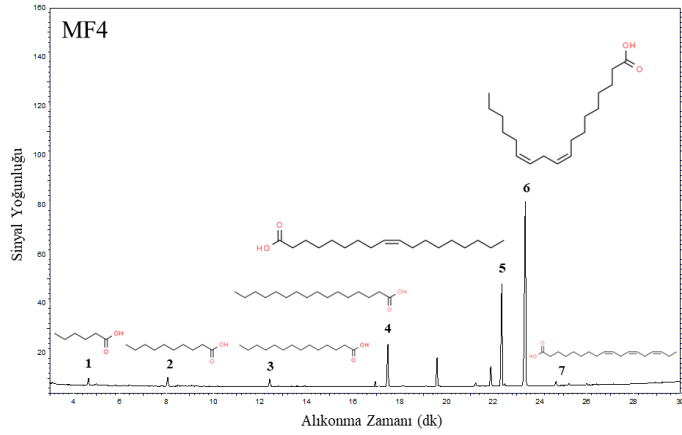
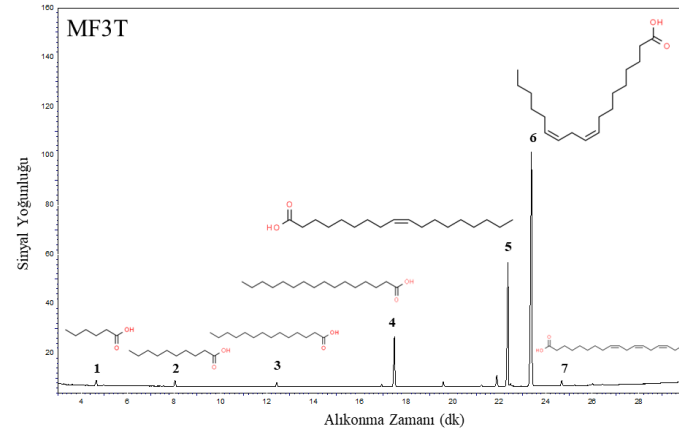
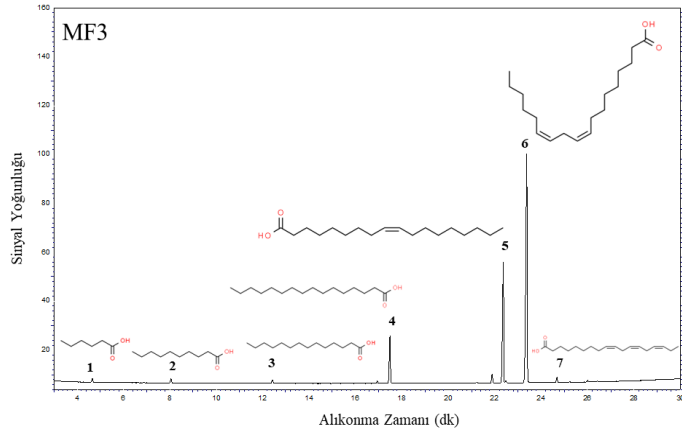
EK 12 - Mikrodalga Uygulanmayan ve Mikrodalga Uygulanan Mısır Unu Örneklerinin Yağ Asidi Profillerine Ait GC-FID Kromatogram Görüntüleri

EK 12-A. MF1, MF1T, MF2 ve MF2T örneklerine ait model kromatogramlar (Minör pikler şekillerde gösterilmemiştir)



Pik No.	Alikonma Zamanı (dk)	Yağ Asidi
1	4.583	Kaproik Asit, C6:0
2	7.917	Kaprik Asit, C10:0
3	12.252	Miristik Asit, C14:0
4	17.273	Palmitik Asit, C16:0
5	22.176	Oleik Asit, C18:1
6	23.100	Linoleik Asit, C18:2

EK 12-B. MF3, MF3T, MF4 ve MF4T örneklerine ait model kromatogramlar (Minör pikler şekillerde gösterilmemiştir)



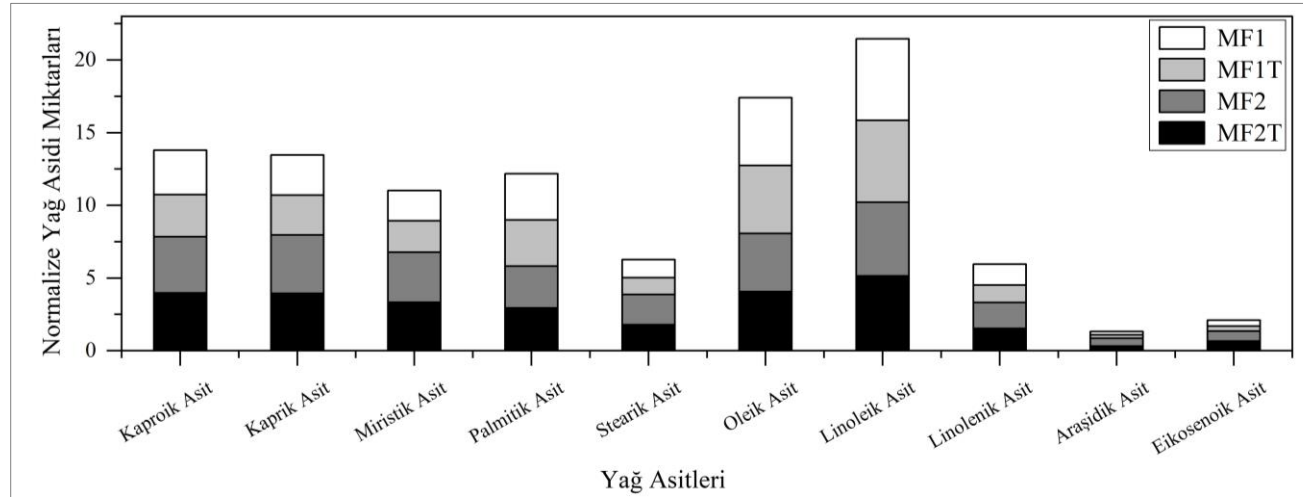
Pik No.	Alikonma Zamanı (dk)	Yağ Asidi
1	4.660	Kaproik Asit, C6:0
2	8.043	Kaprik Asit, C10:0
3	12.420	Miristik Asit, C14:0
4	17.487	Palmitik Asit, C16:0
5	22.425	Oleik Asit, C18:1
6	23.383	Linoleik Asit, C18:2
7	24.959	Linolenik Asit, C18:3

EK 13 - Mikrodalga Uygulanmayan ve Mikrodalga Uygulanan Mısır Unu Örneklerinden Elde Edilen Yağ Asitlerinin Normalleştirilmiş Miktarları

EK 13-A. MF1, MF1T, MF2 ve MF2T örneklerine ait yağ asidi normalize değerleri

Alıkönme Zamanı (dk)	Yağ Asitleri	MF1*	MF1T*	MF2*	MF2T*
4.583	Kaproik Asit	3.052 ± 0.200 ^b	2.894 ± 0.081 ^b	3.876 ± 0.317 ^a	3.967 ± 0.042 ^a
7.917	Kaprik Asit	2.759 ± 0.268 ^b	2.740 ± 0.034 ^b	4.022 ± 0.044 ^a	3.944 ± 0.052 ^a
12.252	Miristik Asit	2.093 ± 0.173 ^b	2.156 ± 0.039 ^b	3.444 ± 0.041 ^a	3.330 ± 0.106 ^a
17.273	Palmitik Asit	3.171 ± 0.012 ^a	3.175 ± 0.007 ^a	2.879 ± 0.058 ^b	2.944 ± 0.046 ^b
21.657	Stearik Asit	1.242 ± 0.073 ^c	1.156 ± 0.015 ^c	2.084 ± 0.056 ^a	1.779 ± 0.138 ^b
22.176	Oleik Asit	4.656 ± 0.058 ^a	4.676 ± 0.020 ^a	4.003 ± 0.079 ^b	4.070 ± 0.051 ^b
23.100	Linoleik Asit	5.604 ± 0.078 ^a	5.640 ± 0.011 ^a	5.075 ± 0.089 ^b	5.138 ± 0.039 ^b
24.714	Linolenik Asit	1.435 ± 0.293 ^{bc}	1.194 ± 0.049 ^c	1.786 ± 0.032 ^a	1.534 ± 0.069 ^{ab}
25.567	Araşidik Asit	0.225 ± 0.042 ^b	0.236 ± 0.043 ^b	0.538 ± 0.082 ^a	0.316 ± 0.037 ^b
25.750	Eikosenoik Asit	0.399 ± 0.028 ^b	0.348 ± 0.015 ^b	0.694 ± 0.093 ^a	0.659 ± 0.130 ^a

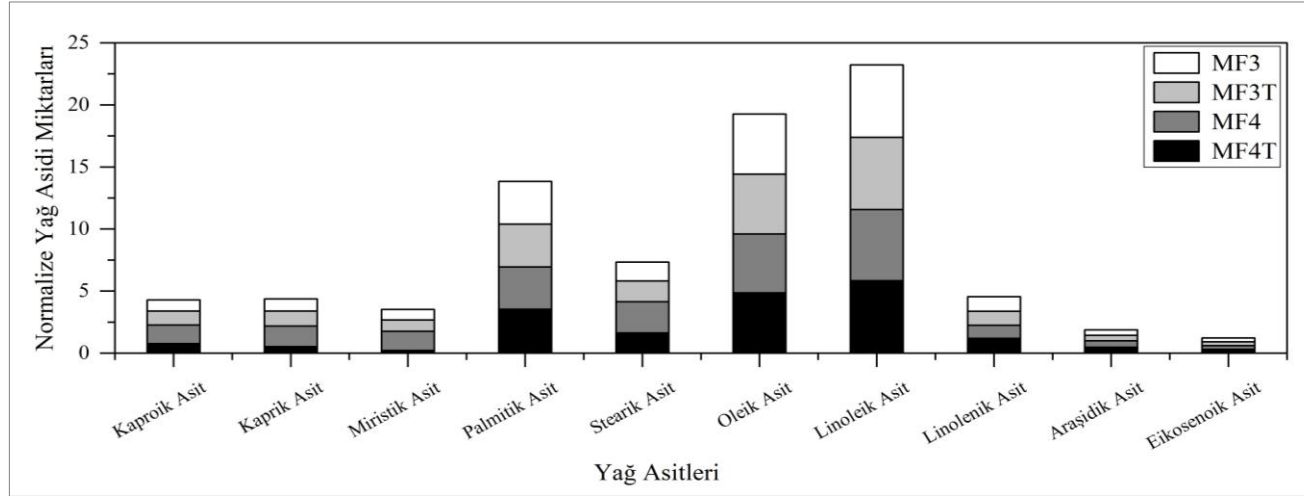
*: Bir satır içinde farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=4) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, $p < 0.05$.



EK 13-B. MF3, MF3T, MF4 ve MF4T örneklerine ait yağ asidi normalize değerleri

Alıkonma Zamanı (dk)	Yağ Asitleri	MF3*	MF3T*	MF4*	MF4T*
4.660	Kaproik Asit	0.883 ± 0.004 ^c	1.123 ± 0.007 ^b	1.505 ± 0.003 ^a	0.768 ± 0.020 ^d
8.043	Kaprik Asit	0.986 ± 0.005 ^c	1.194 ± 0.009 ^b	1.663 ± 0.004 ^a	0.525 ± 0.035 ^d
12.420	Miristik Asit	0.846 ± 0.006 ^c	0.918 ± 0.007 ^b	1.533 ± 0.008 ^a	0.220 ± 0.010 ^d
17.487	Palmitik Asit	3.443 ± 0.002 ^c	3.453 ± 0.001 ^b	3.413 ± 0.003 ^d	3.530 ± 0.004 ^a
21.895	Stearik Asit	1.512 ± 0.003 ^d	1.676 ± 0.002 ^b	2.517 ± 0.003 ^a	1.625 ± 0.004 ^c
22.425	Oleik Asit	4.836 ± 0.001 ^b	4.822 ± 0.002 ^c	4.747 ± 0.000 ^d	4.860 ± 0.002 ^a
23.383	Linoleik Asit	5.840 ± 0.001 ^a	5.819 ± 0.001 ^c	5.732 ± 0.000 ^d	5.836 ± 0.003 ^b
24.959	Linolenik Asit	1.161 ± 0.015 ^a	1.134 ± 0.009 ^a	1.061 ± 0.025 ^b	1.184 ± 0.044 ^a
25.998	Araşidik Asit	0.445 ± 0.006 ^c	0.441 ± 0.003 ^c	0.523 ± 0.011 ^a	0.467 ± 0.012 ^b
26.427	Eikosenoik Asit	0.311 ± 0.008 ^a	0.307 ± 0.004 ^a	0.289 ± 0.006 ^a	0.312 ± 0.035 ^a

*: Bir satır içinde farklı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=4) Tukey testine göre anlamlı derecede farklıdır, $p < 0.05$.



EK 14 - Tezden Türetilmiş Yayınlar

1. **Hançerlioğulları, B. Z.**, Toprak, U., & Yılmaz, R. (2023). Analyses of Metabolites in Microwave-treated Maize Flours. *Food and Bioprocess Technology*, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03164-4>

2. **Hançerlioğulları, B. Z.**, & Yılmaz, R. (2023). Screening of P-35S, P-FMV, and T-NOS genetic elements in microwave-treated genetically modified cereal flours. *Molecular Biology Reports*, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08408-2>

EK 15 - Tezden Türetilmiş Bildiriler

1. **Hançerlioğulları, B.Z.**, Toprak, U. & Yılmaz, R. Mısır Ununda Bulunan Birincil ve İkincil Metabolitlerin Kantitatif Değerlendirmesi, *13. Gıda Mühendisliği Kongresi*, 2-4 Kasım 2023, Ankara, **Sözlü Bildiri**.
2. **Hançerlioğulları, B.Z.**, Toprak, U. & Yılmaz, R. Genetik Modifiye MON810 Mısır Ununun Birincil Metabolit Profilinin Belirlenmesi, *22. Uluslararası Katılımlı Biyoteknoloji Kongresi*, 20-22 Ekim 2023, Ankara, **Sözlü Bildiri**.
3. **Hançerlioğulları, B.Z.**, Toprak, U. & Yılmaz, R. The Effect of Microwave Treatment on Gene Expression Level of Argonaute (AGO1a) and Phosphoglycerate Kinase (Pgc3) Genes in Maize (*Zea mays* L.) Flours, *1st International Congress on Biotech Studies (ICBIOS)*, 09-11 Kasım 2022, Çevrimiçi, **Sözlü Bildiri**.
4. **Hançerlioğulları, B.Z.**, Toprak, U. & Yılmaz, R. Phenol-Based Method for Isolation of High Quality RNA from MON810 and MIR604 Maize Events, *2nd International/12th National Food Engineering Congress*, 25-27 Kasım 2021, Çevrimiçi, **Poster Bildirisi**.