

Cilt / Volume: 11, Sayı / Issue: 2

Haziran / June, 2021

ISSN 2146-0574

E-ISSN 2536-4618

**FBED / JIST**

Uluslararası Hakemli Dergi / International Peer Reviewed Journal

**İĞDIR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ DERGİSİ**

**JOURNAL OF THE INSTITUTE  
OF SCIENCE AND  
TECHNOLOGY**



# FBED / JIST

**IĞDIR ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ**  
**ENSTİTÜSÜ DERGİSİ**

***Journal of the Institute***  
***of Science and Technology***

<http://dergipark.gov.tr/jist>



**Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**  
**Kısaltılmış Başlık: Iğdır Üniv. Fen Bil. Enst. Der.**

**Journal of the Institute of Science and Technology**  
**Abbreviated Title: J. Inst. Sci. and Tech.**

**Uluslararası Hakemli Dergi / International Peer Reviewed Journal**

**Basılı ISSN: 2146-0574**

**Elektronik ISSN: 2536-4618**

**Veri Tabanı / Indexed by**

TR Dizin, EBSCO, ROAD, Open Access Library (oalib), COSMOS IF, Sobiad, Google Scholar, Türkiye Atıf Dizini, International Institute of Organized Researches, Sindex, CrossRef, Eurasian Scientific Journal Index, CiteFactor, International Scientific Indexing, CAB Abstract

**Sahibi / Owner**

Prof. Dr. Mehmet Hakkı ALMA  
Rektör / Rector

**Sorumlu Müdür / Director**

Prof. Dr. Murat Ali KARAVELİOĞLU / Prof. Dr. Murat Ali KARAVELİOĞLU  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü / Graduate Education Institute Director

**Baş Editör / Editor in Chief**

Doç. Dr. Süleyman TEMEL / Assoc. Prof. Dr. Süleyman TEMEL

**Yardımcı Editörler / Associate Editors**

Prof. Dr. Bilal KESKİN / Prof. Dr. Bilal KESKİN  
Doç. Dr. Adem KOÇYİĞİT / Assoc. Prof. Dr. Adem KOÇYİĞİT  
Doç. Dr. Ersin GÜLSOY / Assoc. Prof. Dr. Ersin GÜLSOY  
Dr. Öğr. Üyesi Ümit YILDIKO / Assist. Prof. Dr. Ümit YILDIKO

**Danışma Kurulu/ Advisory Board**

Prof.Dr. Kağan KÖKTEN / *Field Crop*, Bingol University, Agricultural, Bingol, Turkey  
Prof.Dr. Abdulmecit TÜRÜT/ *Physics*, İstanbul Medeniyet University, İstanbul, Turkey  
Prof.Dr. Muhammad SARWAR, *Animal Science*, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan  
Prof.Dr. Vaqif ABBASOV, *Chemistry*, Neft Kimya Prosesleri Institutu, Azerbaijan  
Prof.Dr. Şükrü BEYDEMİR, *Biochemistry*, Anadolu University, Eskisehir, Turkey  
Prof.Dr. Salih DOĞAN, *Zoology*, Erzincan Binali Yıldırım University, Erzincan, Turkey  
Doç.Dr. Özkan AKSAKAL, *Botanical*, Ataturk University, Erzurum, Turkey  
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet POLAT, *Horticulture*, Isparta University, Isparta, Turkey  
Dr.Snezana ANDJELKOVIC, *Forage Crops*, Institute Za Krmno Bilje, Krusevac, Republic of Serbia

**Tasarım / Design**

Prof. Dr. Bilal KESKİN  
Dr. Öğr. Üyesi Barış EREN  
Arş. Gör. Hasan Kaan KÜÇÜKERDEM

**Web link:** <https://dergipark.org.tr/tr/pub/jist>

**Mail address:** fbed@igdir.edu.tr

ULUSAL EDİTÖRLER KURULU  
NATIONAL EDITORIAL BOARD

|   |   |
|---|---|
| Doç. Dr. Beyhan KİBAR, Horticulture<br>Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Bolu, Türkiye                                   | Dr. Öğr. Üyesi Ümit YILDIKO, Chemistry<br>Kafkas Üniversitesi, Kars, Türkiye                                    |
| Prof. Dr. Ferhat MURATOĞLU, Horticulture<br>Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Bolu, Türkiye                              | Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Harbi ÇALIMLI, Chemistry<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye                            |
| Doç. Dr. Ersin GÜLSOY, Horticulture<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye   | Dr. Öğr. Üyesi Uğur GÜLLER, Chemistry<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye                                     |
| Dr. Öğr. Üyesi Gültekin IŞIK, Computer Engineering<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye                                | Doç. Dr. Mahir UZUN, Mechanical Engineering<br>İnönü Üniversitesi, Malatya, Türkiye                             |
| Prof. Dr. Ahmet ULUDAĞ, Plant Protection<br>Düzce Üniversitesi, Düzce, Türkiye  | Dr. Öğr. Üyesi Mustafa HAMAMCI, Mechanical Engineering<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye                    |
| Doç. Dr. Celalettin GÖZÜAÇIK, Plant Protection<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye                                    | Dr. Öğr. Üyesi Arslan KAPTAN, Mechanical Engineering<br>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas, Türkiye           |
| Dr. Öğr. Üyesi Tuba GENÇ KESİMCİ, Plant Protection<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye                                | Dr. Öğr. Üyesi. Muhammet Raci AYDIN, Mechanical Engineering<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye               |
| Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜRBÜZ, Plant Protection<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye                                   | Prof. Dr. İsa YILDIRIM, Mathematics<br>Atatürk Üniversitesi, Erzurum, Türkiye                                   |
| Prof. Dr. Ümit İNCEKARA, Biology<br>Atatürk Üniversitesi, Erzurum, Türkiye  | Prof. Dr. Serpil HALICI, Mathematics<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye                                      |
| Dr. Öğr. Üyesi Emel DİRİZ YILDIRIM, Biology<br>Kahramanmaraş Sütçü İmam Üni. K. Maraş, Türkiye                          | Dr. Öğr. Üyesi Lokman BİLEN, Mathematics<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye                                  |
| Dr. Öğr. Üyesi Ahmet POLAT, Biology<br>Atatürk Üniversitesi, Erzurum, Türkiye   | Doç. Dr. Aynur ŞAHİN, Mathematics<br>Sakarya Üniversitesi, Sakarya, Türkiye                                     |
| Doç. Dr. Hakan KİBAR, Biosystem Engineering<br>Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Bolu, Türkiye                      | Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL, Molecular Biology and Genetic<br>Atatürk Üniversitesi, Erzurum, Türkiye               |
| Doç. Dr. Sefa ALTİKAT, Biosystem Engineering<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye                                      | Dr. Öğr. Üyesi Kaan HÜRKAN, Molecular Biology and Genetic<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye                 |
| Dr. Öğr. Üyesi Züleyha BİNGÜL, Environmental Engineering<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye                          | Dr. Öğr. Üyesi Can Ali AĞCA, Molecular Biology and Genetic<br>Bingöl Üniversitesi, Bingöl, Türkiye              |
| Dr. Öğr. Üyesi Sinan KUL, Environmental Engineering<br>Bayburt Üniversitesi, Bayburt, Türkiye                           | Prof. Dr. Mehmet Hakkı ALMA, Forestry Engineering<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye                         |
| Doç. Dr. Adem KOÇYİĞİT, Electrical Electronic Eng.<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye                                | Prof. Dr. Murat ZENGİN, Landscape Architecture<br>Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye                      |
| Dr. Öğr. Üyesi Kenan ÇİÇEK, Electrical Electronic Eng.<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye                            | Dr. Öğr. Üyesi Meryem Bihter BİNGÜL BULUT, Landscape Architecture<br>Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, Türkiye |
| Dr. Öğr. Üyesi Agah Oktay ERTAY, Electrical Electronic Eng.<br>Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Erzincan, Türkiye | Doç. Dr. İlknur MERİÇ TURGUT, Fisheries<br>Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye                                 |
| Dr. Öğr. Üyesi Seda TÜRK, Industrial Engineering<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye                                  | Doç. Dr. Yakup Erdal ERTÜRK, Agricultural Economy<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye                         |
| Dr. Öğr. Üyesi Hamid YILMAZ, Industrial Engineering<br>Bayburt Üniversitesi, Bayburt, Türkiye                           | Dr. Öğr. Üyesi Tuba Pekkirbizli ZEMESTANİ, Agricultural Eco.<br>Bozok Üniversitesi, Yozgat, Türkiye             |
| Doç. Dr. Ferdi AKMAN, Physics<br>Bingöl Üniversitesi, Bingöl, Türkiye   | Prof. Dr. Burhan KARA, Field Crops<br>Isparta Üniversitesi, Isparta, Türkiye                                    |
| Doç. Dr. İkrım ORAK, Physics<br>Bingöl Üniversitesi, Bingöl, Türkiye  | Prof. Dr. Bilal KESKİN, Field Crops<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye                                       |
| Doç. Dr. Abdulkemir KARABULUT, Physics<br>Erzurum Teknik Üniversitesi, Erzurum, Türkiye                                 | Doç. Dr. Süleyman TEMEL, Field Crops<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye                                      |
| Prof. Dr. Ahmet ERDOĞAN, Food Engineering<br>Atatürk Üniversitesi, Erzurum, Türkiye                                     | Doç. Dr. Tamer ERYİĞİT, Field Crops<br>Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van, Türkiye                               |
| Prof. Dr. İhsan Güngör ŞAT, Food Engineering<br>Atatürk Üniversitesi, Erzurum, Türkiye                                  | Doç. Dr. Adem GÜNEŞ, Soil Science and Plant Nutrition<br>Erciyes Üniversitesi, Kayseri, Türkiye                 |
| Dr. Öğr. Üye. Mubin KOYUNCU, Food Engineering<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye                                     | Dr. Öğr. Üyesi Serdar SARI, Soil Science and Plant Nutrition<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye              |
| Prof. Dr. İlker KAZAZ, Civil Engineering<br>Erzurum Teknik Üniversitesi, Erzurum, Türkiye                               | Doç. Dr. İsa YILMAZ, Animal Science<br>Muş Alparslan Üniversitesi, Muş, Türkiye                                 |
| Doç. Dr. Muhammed Yasin ÇODUR, Civil Engineering<br>Erzurum Teknik Üniversitesi, Erzurum, Türkiye                       | Dr. Öğr. Üyesi Ali İhsan ATALAY, Animal Science<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye                           |
| Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Alperen ÖZDEMİR, Civil Engineering<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye                        |   |
| Dr. Öğr. Üyesi Fikret TÜRKAN, Chemistry<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye   |   |
| Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Şilan TURHAN IRAK, Chemistry<br>İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye                                |   |

**ULUSLARARASI EDİTÖRLER KURULU**  
**INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD**

Prof. Dr. Muhammad HANIF, Mathematic  
Lahore Üniversitesi, Lahore, Pakistan

Prof. Dr. Muhammad SARWAR KHAN, Agri. Biotechnology  
University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan

Prof. Dr. Tan YANWEN, Economics  
South China Agricultural University, Guangzhou, China

Prof. Dr. Abdul WAHID, Department of Botany  
University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan

Prof. Dr. Zafar IQBAL, Veterinary Science  
University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan

Prof. Dr. Khalid JAVED, Dep. of Livestock Prod.  
University of Vet. & Animal Sciences, Lahore, Pakistan

Prof. Dr. Guang Jie ZHAO, Forestry,  
Beijing Forestry University, China

Prof. Dr. Vaqif ABBASOV, Chemistry,  
Neft Kimya Prosesleri Institutu, Azərbaycan

Prof. Dr. Emanuele BOSELLI, Food Science and Technology  
Free University of Bozen, Bolzano, Italy

Prof. Dr. Lenka KOURIMSKA, Food and Nutrition,  
Czech Uni. of Life Sciences Prague, Suchdol, Czech Republic

Assist. Prof. Dr. Christina BENEKI, Dep. of Bus. Admin.  
Tech. Educ. Inst. of Ionian Islands, Cephalonia, Greece

Dr. Abdul WAHEED, Animal Science  
Bahauddin Zakariya University, Multan, Pakistan

Dr. Snezana ANDJELKOVIC, Forage Crops  
Institute for Forage Crops(IFC), Krusevac, Republic of Serbia

Dr. Ferhat ABBAS, Vet- Animal Science, CASVAB  
University of Balochistan, Balochistan, Pakistan

Dr. Naveen KUMAR, Horticulture  
University of Florida, Florida, USA

**DİL EDİTÖRLERİ**  
**LANGUAGE CONSULTANTS**

Dr. Öğr. Üyesi Didem ERDEL,  
İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye

Uzm. Handan YILDIZ,  
Milli Eğitim Müdürlüğü, İğdır, Türkiye

Öğr. Gör. Talha YILDIZ,  
İğdır Üniversitesi, İğdır, Türkiye

**BU SAYININ HAKEM LİSTESİ**  
**REFEREE LIST IN THIS ISSUE**

Prof. Dr. Adem TATAROĞLU, Physics

Prof. Dr. Ali Bekir YILDIZ, Electrical Engineering

Prof. Dr. Ali KAYGISIZ, Animal Science

Prof. Dr. Atilla DURMUŞ, Biology

Prof. Dr. Çağrı ÇIRAK, Physics

Prof. Dr. Emel USLU, Molecular Biology and Genetics

Prof. Dr. Ercan BURSAL, Chemistry

Prof. Dr. Ercan CEYHAN, Field Crops

Prof. Dr. Ercüment Osman SARIHAN, Field Crops

Prof. Dr. Erdoğan ÖZTÜRK, Field Crops

Prof. Dr. Feyzi UĞUR, Animal Science

Prof. Dr. Hakan GEREN, Field Crops

Prof. Dr. Halil İbrahim OĞUZ, Biosystem Engineering

Prof. Dr. Handan UYSAL, Molecular Bio. and Gen.

Prof. Dr. Hasan BULUT, Mathematics

Prof. Dr. Hatice ÖĞÜTCÜ, Field Crops

Prof. Dr. İlknur AYAN, Field Crops

Prof. Dr. İlknur KORKUTAL, Horticulture

Prof. Dr. Kadir DEMİR, Physics

Prof. Dr. Kağan KÖKTEN, Field Crops

Prof. Dr. Köksal YAĞDI, Field Crops

Prof. Dr. Mehmet Burhan KARAKOÇ, Civil Engineering

Prof. Dr. Mehmet Erhan GÖRE, Fitopatoloji

Prof. Dr. Mehmet Halil SOLAK, Biology

Prof. Dr. Mehmet Salih Ağırtaş, Chemistry

Prof. Dr. Mustafa Kemal ÖZTÜRK, Physics

Prof. Dr. Mustafa TAN, Field Crops

Prof. Dr. Özlem BARIŞ, Biology

Prof. Dr. Refik KAYALI, Physics

Prof. Dr. Seydi DOĞAN, Electrical-Electronic Engineering

Prof. Dr. Şakir AYDOĞAN, Physics

Prof. Dr. Şebnem KUŞVURAN, Horticulture

Prof. Dr. Şemsettin ALTINDAL, Physics

Prof. Dr. Şevket GÜR, Mathematics

Prof. Dr. Şeyda ZORER ÇELEBİ, Field Crops

Prof. Dr. Taşkın POLAT, Field Crops

Prof. Dr. Zeki ACAR, Field Crops

Prof. Dr. Ramazan ERENLER, Chemistry

Doç. Dr. Abdullah ALTUNIŞIK, Biology

Doç. Dr. Ahmet KINAY, Field Crops

Doç. Dr. Ahmet TURŞUCU, Physics

Doç. Dr. Ali DANANDEH MEHR, Civil Engineering

Doç. Dr. Aslı YORULMAZ, Food Engineering

Doç. Dr. Baki ÖZTÜRK, Civil Engineering

Doç. Dr. Bünyamin ALIM, Electricity and Energy

Doç. Dr. Çağrı Özgür ÖZKAN, Animal Science

Doç. Dr. Durmuş Ali ALDEMİR, Physics

Doç. Dr. Ebru AKKEMİK, Food Engineering

Doç. Dr. Efkân ÇATIKER, Chemistry

Doç. Dr. Ezgi TOPÇU, Chemistry

Doç. Dr. Fethi Ahmet ÖZDEMİR, Molecular Bio. and Gen.

Doç. Dr. Fuat KARTAL, Mechanical Engineering

Doç. Dr. Gülçin YILDIZ, Food Engineering

Doç. Dr. Gülşah Saydan KANBEROĞLU, Chemistry

Doç. Dr. Güven TURGUT, Physics

Doç. Dr. Hacer LEVENT, Food Engineering

Doç. Dr. Hakan ÖZBAŞARAN, Civil Engineering

Doç. Dr. Hakan TAHTACI, Chemistry

- Doç. Dr. Halef DİZLEK, Food Engineering  
Doç. Dr. Harika Atmaca İLHAN, Biology  
Doç. Dr. Haydar KILIÇ, Food Processing  
Doç. Dr. Hülya ÖZTÜRK DOĞAN, Chemistry  
Doç. Dr. Hüseyin GÜNGÖR, Field Crops  
Doç. Dr. Hüseyin ŞAHİN, Chemistry  
Doç. Dr. İbrahim DOLAK, Chemistry  
Doç. Dr. İlknur POLAT, Horticulture  
Doç. Dr. Koray KARABULUT, Machine Engineering  
Doç. Dr. Makbule Nisa MENCET YELBOĞA, Agri. Eco.  
Doç. Dr. Mahpeyker ÖZTÜRK, Mathematic  
Doç. Dr. Mehmet Hadi AYDIN, Fitopatoloji  
Doç. Dr. Mustafa SÜRMEK, Field Crops  
Doç. Dr. Mustafa TÜRKMEN, Electronics Engineering  
Doç. Dr. Nevzat ESİM, Molecular Biology and Genetics  
Doç. Dr. Nurcihan HACIOĞLU, Biology  
Doç. Dr. Nurullah KIRATLI, Industrial Design Eng.  
Doç. Dr. Rahim ADA, Field Crops  
Doç. Dr. Rıza POLAT, Civil Engineering  
Doç. Dr. Salih PAŞA, Chemistry  
Doç. Dr. Sepanta NAİMİ, Civil Engineering  
Doç. Dr. Serdar MERCAN, Mechatronic Engineering  
Doç. Dr. Serkan GÜL, Biology  
Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ, Biotechnology  
Doç. Dr. Sultan ARSLAN TONTUL, Food Engineering  
Doç. Dr. Turgay KABAY, Horticulture  
Doç. Dr. Ufuk ATMACA, Food Processing  
Doç. Dr. Volkan OKATAN, Horticulture  
Doç. Dr. Yunus BABACAN, Electrical Electronics Eng.  
Doç. Dr. Zehra Nur ÖZER, Physics  
Doç. Dr. Zübeyir HUYUT, Biochemistry  
Dr. Öğr. Üyesi. Neslihan DEMİR, Biology  
Dr. Öğr. Üyesi Abdussamet SUBAŞI, Machine Eng.  
Dr. Öğr. Üyesi Bakiye KILIÇ TOPUZ, Agricultural Eco.  
Dr. Öğr. Üyesi Bayram KÖSE, Electrical-Electronic Eng.  
Dr. Öğr. Üyesi Bengi Hakgüder TAZE, Food Engineering  
Dr. Öğr. Üyesi Berna KOÇAK, Chemistry  
Dr. Öğr. Üyesi Betül GÜRER, Agricultural Economy  
Dr. Öğr. Üyesi Bünyamin ÖZGERİŞ, Chemistry  
Dr. Öğr. Üyesi Canan GÜLMEZ, Chemistry  
Dr. Öğr. Üyesi Çetin BAYRAK, Chemistry  
Dr. Öğr. Üyesi Dilan ALP, Physics  
Dr. Öğr. Üyesi Doğan İLHAN, Molecular Bio. and Gen.  
Dr. Öğr. Üyesi Emrah KAYA, Animal Science  
Dr. Öğr. Üyesi Erman ERDOĞAN, Physics  
Dr. Öğr. Üyesi Eyüp BAŞARAN, Chemistry  
Dr. Öğr. Üyesi Fatma AKDEMİR, Physics  
Dr. Öğr. Üyesi Hakan AVCI, Mathematics  
Dr. Öğr. Üyesi Hakan DİLMAÇ, Civil Engineering  
Dr. Öğr. Üyesi Halil ŞENOL, Chemistry  
Dr. Öğr. Üyesi Hamdullah SEÇKİN, Mol. Bio. and Gen.  
Dr. Öğr. Üyesi Hamza BOZKIR, Food Engineering  
Dr. Öğr. Üyesi Hülya DOĞAN, Field Crops  
Dr. Öğr. Üyesi Kamil ORMAN, Computer Engineering  
Dr. Öğr. Üyesi Medine ÇOPUR DOĞRUSÖZ, Field Crops  
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet BAKIRCI, Electronics and Auto.  
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KÖTEN, Food Engineering  
Dr. Öğr. Üyesi Melek ZOR, Food Engineering  
Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Fatih KULUÖZTÜRK, Physics  
Dr. Öğr. Üyesi Muhammed KARAMAN, Mol. Bio. and G.  
Dr. Öğr. Üyesi Murat BEYTUR, Chemistry  
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Kenan GEÇER, Horticulture  
Dr. Öğr. Üyesi Namık KILINÇ, Chemistry  
Dr. Öğr. Üyesi Neva KARATAŞ, Food Engineering  
Dr. Öğr. Üyesi Nizamettin ERBAŞ, Agricultural Economy  
Dr. Öğr. Üyesi Nurdoğan TOPAL, Field Crops  
Dr. Öğr. Üyesi Oğuzhan ÇAKIR, Electrical Electro. Eng.  
Dr. Öğr. Üyesi Parham TASLIMI, Biotechnology  
Dr. Öğr. Üyesi Saliha ÜNVER, Forest Engineering  
Dr. Öğr. Üyesi Serdal SABANCI, Food Engineering  
Dr. Öğr. Üyesi Serkan DEMİREL, Electricity and Energy  
Dr. Öğr. Üyesi Serkan ŞENOCAK, Civil Engineering  
Dr. Öğr. Üyesi Sinan BAYRAM, Biotechnology  
Dr. Öğr. Üyesi Sinan KUL, Environmental Engineering  
Dr. Öğr. Üyesi Şahset İRDEMEZ, Environmental Eng.  
Dr. Öğr. Üyesi Talat ÖZDEN, Electrical Engineering  
Dr. Öğr. Üyesi Ufuk ATMACA, Chemistry  
Dr. Öğr. Üyesi Ümit YILDIKO, Chemistry  
Dr. Öğr. Üyesi Yasemin Gündoğdu, Physics  
Dr. Öğr. Üyesi Yunus DEMİR, Industrial Engineering  
Dr. Öğr. Üyesi Zakir ÇALDIRAN, Physics  
Dr. Öğr. Üyesi Zekiye KOCAKAYA, Biyoloji  
Öğr. Gör. Dr. Menekşe BULUT, Food Engineering  
Öğr. Gör. Dr. Olcay CEYLAN, Biology  
Öğr. Gör. Dr. Sevtap TIRINK, Environmental Sciences  
Arş. Gör. Dr. Çağrı ALTINTAŞI, Electrical Electro. Eng.  
Arş. Gör. Dr. Elif Feyza TOPDAŞ, Food Engineering  
Arş. Gör. Dr. Emre EVİN, Biology  
Arş. Gör. Dr. Gökhan DERVİŞOĞLU, Mol. Bio. and Gen.  
Arş. Gör. Dr. Yusuf ÇAKIR, Food Engineering

İğdir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi (FBED)  
YAYIN İLKELERİ

1. FBED, Uluslararası hakemli bir dergi olup yılda dört kez yayınlanır. Dergimiz herhangi bir ücret talep etmemektedir. Makalelerin tümüne açık erişimle ulaşılabilir ve tam metin olarak indirilebilir.
2. Dergiye gönderilebilecek makale konuları Bahçe bitkileri, Bilgisayar mühendisliği, Bitki koruma, Biyoloji, Biyosistem mühendisliği, Çevre mühendisliği, Elektrik elektronik mühendisliği, Endüstri mühendisliği, Fizik, Gıda mühendisliği, İnşaat mühendisliği, Kimya, Makina mühendisliği, Matematik, Moleküler biyoloji ve genetik, Orman mühendisliği, Peyzaj mimarlığı, Su ürünleri, Tarım ekonomisi, Tarla bitkileri, Toprak bilimi ve bitki besleme ve Zootekni'dir. Dergide orijinal araştırma makalesi, derleme, teknik not yayımlanabilir.
3. Tüm yazılar iki profesyonel hakem tarafından değerlendirilir, Editör ve Yayın Kurulu tarafından incelenir.
4. FBED Türkçe ve İngilizce dillerinde yazılmış orijinal araştırma makalesi, teknik not ve derleme (toplam yayınların %20) yayınlamaktadır.
5. Yayınlanması istenilen eserlerin herhangi bir yerde yayınlanmamış veya yayınlanmak üzere herhangi bir dergiye gönderilmemiş olması zorunludur.
6. Dergiye yayınlanmak üzere gönderilen eserlerle birlikte Telif Hakkı Devir Sözleşmesi de tüm yazarlarca (farklı adreslerde bulunan yazarlar forma ait tüm bilgileri doldurarak ayrıca imzalamak suretiyle gönderebilirler) imzalanarak gönderilmelidir.
7. Eserlerin tüm sorumluluğu yazarlarına aittir.
8. Aynı sayıda ilk isim olarak bir yazarın en çok iki makalesi basılır.
9. Eserler bilim etiği ilkelerine uygun olarak hazırlanmalı, gerekliyse Etik Kurul Raporu'nun bir kopyası eklenmelidir.
10. Herhangi bir sorunuz için lütfen [fbed@igdir.edu.tr](mailto:fbed@igdir.edu.tr) adresine başvurun.

Journal of the Institute of Science and Technology (JIST)  
PUBLISHING POLICIES

1. JIST is International Peer Reviewed Journal and published four times a year. Our journal does not charge any fees. All of the articles are accessible by open access and can be downloaded in full text.
2. The articles that can be sent to the journal are Horticulture, Computer engineering, Plant protection, Biology, Biosystem engineering, Environment engineering, Electrical-electronic engineering, Industrial engineering, Physics, Food engineering, Civil engineering, Chemistry, Mechanical engineering, Mathematics, Molecular biology and genetic, Forestry engineering, Landscape architecture, Fisheries, Agricultural economy, Field crops, soil science and plant nutrition and animal science.
3. All the manuscripts submitted to our journal are peer reviewed by two professional referees, Editor in Chief, and Editorial Board.
4. JIST intends to publish original research papers, technical notes, and reviews (20% of total papers) written in Turkish and English languages.
5. Manuscripts and communications are accepted on the understanding that these have not been published nor are being considered for publication elsewhere.
6. All the authors should submit their manuscript with transfer form of copyright for potential publication. The transfer form of Copyright should be signed by all authors.
7. All the authors will be responsible contextually for contents of their manuscripts.
8. Only two manuscripts of each author as first author can be published in same issue of JIST.
9. Manuscripts should be prepared in accordance with scientific ethic rules. When required, ethical committee reports with the related documents should be submitted to JIST.
10. Please contact for any question to [fbed@igdir.edu.tr](mailto:fbed@igdir.edu.tr)

## İÇİNDEKİLER / CONTENTS

### Bahçe Bitkileri / Horticulture

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Relationships of Fruit Characteristics of Rosehips (*Rosa canina* L.) Grown in Bolu City Center  
Emrah GÜLER, Tuba BAK, Turan KARADENİZ, Ferhad MURADOĞLU

831

#### Araştırma Makalesi / Research Article

The Effect of Storage Temperature on the Composition of Fatty Acids in Crimson Sweet (*Citrullus lanatus* var. *lanatus*)  
Watermelon Cultivar Seeds  
Mozhgan ZARIFIKHOSROSHAHI, Zeynep ERGUN

839

#### Derleme Makalesi / Review Article

The Use of Biostimulants in Sustainable Viticulture  
Yagmur YILMAZ, Ruhan İlknur GAZIOĞLU SENSOY

846

### Bitki Koruma / Plant Protection

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Uçucu Yağ ve Arbusküler Mikorhizal Fungus'un Domates Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğü (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* Jarvis & Shoemaker) Hastalığına Etkileri  
The Effects of Essential Oils and Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Decay Disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* Jarvis & Shoemaker) of Root and Root Collar of Tomato  
Seda BİLİCİ<sup>1</sup> Semra DEMİR Gökhan BOYNO

857

### Biyoloji / Biology

#### Araştırma Makalesi / Research Article

*Agaricus campestris* Metanol Ekstraktının Yağ Asidi Kompozisyonu ve Terapötik Potansiyelinin Araştırılması  
Investigation of Fatty Acid Composition and Therapeutic Potential of Methanol Extract of *Agaricus campestris*  
Mehmet Kadir ERDOĞAN, Can Ali AĞCA, İbrahim Halil GEÇİBESLER

869

#### Derleme Makalesi / Review Article

İnsanların Siyanotoksinler ile Teması ve Sağlığa Etkileri  
Contact of People With Cyanotoxins and Effects on Health  
Yasemin VARLI

880

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Inactivation of Some Pathogens Inoculated to Noodle by *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry Essential Oil  
Elif Ayşe ERDOĞAN ELİUZ, Yusuf SİCAK

888

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Effect of locally isolated phosphate-solubilizing *Pseudomonas aeruginosa* IBP26 on the growth parameters of chickpea seedling  
Lokal olarak izole edilen fosfat çözücü *Pseudomonas aeruginosa* IBP26'nın nohut fidelerinin büyüme parametreleri üzerine etkisi  
Muhammed Emin ÇÖĞENDER, Nazlı Pınar ARSLAN, Mehmet Nuri AYDOĞAN

896

#### Araştırma Makalesi / Research Article

The Study on the Relationships Between the Age Structure and Body Size of the Bridled Skink, *Heremites vittatus*, (Oliver, 1804)  
from Different Altitudes in Turkey  
Elif YILDIRIM, Yusuf KUMLUTAŞ, Kamil CANDAN, Çetin ILGAZ

906

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Giresun Tombul Fındık (*Corylus avellana* L.) Yağının Serviks, Meme ve Kolon Kanseri Hücrelerinde Sitotoksik ve Antiangiyojenik Aktivitesi  
Antiangiogenic and Cytotoxic Activity of Giresun Tombul Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Oil on Cervix, Breast, and Colon Cancer Cells  
Adem GÜNER, Özlem GÜNER, Nefise Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

916

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Promoting effects of melatonin supplements on the embryogenic callus maintainance in *alfalfa* (*Medicago sativa* L.)  
İsmail BEZİRGANOĞLU

927

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Investigation of ACC-Deaminase and Indole Acetic Acid Producing Bacteria from Rhizospheric Soils in Ağrı Province  
Burak ALAYLAR, Mehmet KARADAYI

933

#### Derleme Makalesi / Review Article

*Salvia officinalis* (Tıbbi Adaçayı) Bitkisinin Bazı Abiyotik Stres Faktörlerine Yanıtları  
Responses of *Salvia officinalis* (Common Sage) to Some Abiotic Stress Factors  
Sinem ELMAS

943



**Çevre Mühendisliği / Environmental Engineering**

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Taguchi Deneysel Tasarım Yöntemi Kullanılarak Bromfenol Mavisi Biyosorpsiyonunun Modellenmesi ve Denge İzotermi  
Modeling of Bromphenol Blue Biosorption Using Taguchi Experimental Design Method and Equilibrium Isotherms  
Dilek GÜMÜŞ, Fatih GÜMÜŞ

960

**Araştırma Makalesi / Research Article**

GIS and Multicriteria Decision Analysis for Landfill Site Selection in Edirne Province, Turkey  
Azem KURU, Ezgi TOK, Merve GUROGLU AGDAS, Hacer Handan DEMİR, Hüseyin Kurtulus OZCAN, Goksel DEMİR

969

**Elektrik Elektronik Mühendisliği / Electrical Electronic Engineering**

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Kısmi Gölgeleme Etkilerini Modelleyebilen Bir PV Emülatör Tasarımı  
A PV Emulator Design That Can Model Partial Shading Effects  
Said Mahmut ÇINAR, Burak ARSEVEN

982

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Bir Rüzgâr Enerji Santralının Güç Kapasitesine Bağlı Olarak Üretebileceği Elektrik Enerjisi Potansiyelinin Belirlenmesi – Artvin İli Örneği  
Determination of the Electrical Energy Production Potential of a Wind Power Plant Depending on the Power Capacity: a Case Study for Province of Artvin  
Durukan ERDOĞAN, Kenan YİĞİT, Bora ACARKAN

998

**Araştırma Makalesi / Research Article**

PI+Feed Forward Controller Tuning Based on Genetic Algorithm for Liquid Level Control of Coupled-Tank System  
İkili Tank Sisteminin Sıvı Seviye Kontrolü için Genetik Algoritma Tabanlı PI+İleri Besleme Kontrolcü  
Mehmet YILMAZ, Kaan CAN, Abdullah BAŞÇI

1014

**Endüstri Mühendisliği / Industrial Engineering**

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Bir Hafif Raylı Ulaşım Sisteminde Makinist Çizelgeleme Problemi  
Machinist Scheduling Problem in a Light Rail Transportation System  
Zeynep CEYLAN, Merve ARSLAN, Tuba ARSLAN

1027

**Fizik / Physics**

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Determination of Radon Concentrations in Surface Water Samples of Aygır Lake in Bitlis (Turkey)  
Bitlis Aygır Gölü (Türkiye) Yüzey Su Örneklerinde Radon Konsantrasyonunun Belirlenmesi  
Halime KAYAKÖKÜ

1040

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Electrical Characterization of CdO Based Au/p-Si Rectifier  
Mehmet YILMAZ

1050

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Voltage Dependent Barrier Height, Ideality Factor and Surface States in Au/(NiS-PVP)/n-Si (MPS) type Schottky Barrier Diodes  
Mahmut BUCURGAT

1058

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Raman Excitation of Hydrogen Molecules to  $v = 1$  State  
İlhan CANDAN

1068

**Araştırma Makalesi / Research Article**

HnRNPA2'in LC(286-291) Domain Fibrili ve Onun D290V Mutasyonu Hakkında Teorik Bir Çalışma  
A Theoretical Study about LC(286-291) Domain of hnRNPA2 and its D290V Mutation  
Hakan ALICI

1080

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Bridgman Tekniği ile Büyütülen Saf ve Bor Katkılı InSe Tek Kristallerinin Morfolojik ve Optik Özelliklerinin Araştırılması  
Investigation of Morphological and Optical Properties of Undoped and Boron Doped InSe Single Crystals Grown by Bridgman Technique  
Hüseyin ERTAP, Mevlüt KARABULUT

1090

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Comparison of Structural and Electro-optical Properties of Thin Films Fabricated for Different Deposition Times Using TiO<sub>2</sub> Precursor Solutions with and without HCl by Ultrasonic Spray Pyrolysis  
Ahmet Buğrahan BAYRAM, Murat KOÇ, Salih AKYÜREKLİ, Murat KALELİ

1102

**Fizik / Physics**

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörlerinin Foton Etkileşim Parametrelerinin İncelenmesi  
Investigation of Photon Interaction Parameters of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors  
Mehmet Fatih TURHAN

1114

**Gıda Mühendisliği / Food Engineering**

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Antioxidant Potential of Some Fruit Extracts Prepared with Different Solvents  
Farklı Çözücülerle Hazırlanan Bazı Meyve Ekstraktlarının Antioksidan Potansiyeli  
Deniz GÜNAL KÖROĞLU, Gezzemhan SÜYÜNÇ, Rabia YILDIRIM, Semra TURAN

1127

**Derleme Makalesi / Review Article**

Kara Mürverin (*Sambucus nigra* L.) Besinsel İçeriği ve Fonksiyonel Özellikleri  
Nutrient Composition and Functional Properties of Black Elderberry (*Sambucus nigra* L.)  
Betül ALIÇ, Nezahat OLCAY, Mustafa Kürşat DEMİR

1140

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Gezo Pekmezinin Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi  
Determination of Rheological Properties of Gezo Pekmezi (Molasses)  
Mutlu ÇEVİK

1154

**Derleme Makalesi / Review Article**

Gıdaların Kurutulmasında Ultrason Ön İşleminin Kullanımı  
Utilization of Ultrasound Pretreatment on Drying of Foods  
Alev Yüksel AYDAR, Tuncay YILMAZ, Ceren Evrim MATARACI, Tuba Büşra SAĞLAM

1165

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Some Important Fruit Characteristics of Apricot (cv. Aprikoz) Accessions Grown in Kagizman District in Turkey  
Neva KARATAŞ

1176

**Araştırma Makalesi / Research Article**

The Effects of Germinated Seeds on Nutritional and Technological Properties of Bread  
Çimlenmiş Tohumların Ekmeğin Beslenme ve Teknolojik Özellikleri Üzerine Etkileri  
Hatice TOK, Nilgün ERTAŞ

1183

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Mineral Composition of Various Extracts and Essential Oil of Pickled *Ferula orientalis* L.  
Elif Feyza TOPDAS, Memnune SENGUL

1194

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Mikroenkapsüle Çam Propolisinin Top Kek Üretiminde Kullanılması  
Usage of Microencapsulated Pine Propolis in Cupcake Production  
Sultan ACUN, Hülya GÜL

1205

**İnşaat Mühendisliği / Civil Engineering**

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Betonarme Soğutma Kulesi Tipi Yapıların Rüzgâr ve Sıcaklık Yükleri Etkisi Altındaki Davranışı  
Behavior of Reinforced Concrete Cooling Tower Type Structures Under Wind and Thermal Loads  
Kılıç Yasin ARSLAN, İlyas Devran ÇELİK, Yusuf ÖZTÜRK, Mehmet Erkan EFE

1218

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Güçlendirme Ankrajlarının Kesme Performansının Mevcut Yığma Duvarlar Üzerinde Belirlenmesi  
Determining The Shear Performance of Strengthening Anchorage on an Existing Clay Block Masonry Wall  
Fatih ÇELİK, Orhan DOĞAN

1230

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Taşkın Frekansı Analizinde Klasik Yöntemler ve Alternatif Bir Parametre Tahmin Yönteminin Karşılaştırılması  
Comparison of Classical Methods and an Alternative Parameter Estimation Method in Flood Frequency Analysis  
Muhammet YILMAZ, Fatih TOSUNOĞLU, Mehmed Cüneyd DEMİREL

1243

**Araştırma Makalesi / Research Article**

The Effect of Alkaline Activator Components on the Properties of Fly Ash Added Pumice Based Geopolymer  
Cemal KARAASLAN, Engin YENER

1255

**Kimya / Chemistry, Kimya Mühendisliği / Chemical Engineering**

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Investigation of Changes Against Time in the Artificial Gastric Liquid Medium of Pesticide Active Substances  
Ayhan ELMASTAŞ, Adil UMAZ, Fırat AYDIN

1270

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Kanser Biyobelirteci Alfa-Fetoprotein'in Elektrokimyasal Tayini İçin Tek Kullanımlık Etiketsiz Yeni AFP İmmünoensörünün Geliştirilmesi  
Development of a New Disposable Label-free AFP Immunosensor for Electrochemical Detection of Cancer Biomarker Alpha-Fetoprotein  
Kadir ERDEM, Melike BİLGİ KAMAÇ

1279

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Synthesis and Enantiomeric Recognition Studies of Novel C<sub>2</sub>-Symmetrical Chiral Tetra-Amide Compounds  
Murat SUNKUR, Züleyha TİĞİZ, Deniz BARIŞ CEBE, Tarık ARAL

1293

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Aksiyal Disüstitüe Silisyum Ftalosiyanınların Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi  
Determination of Biological Activities of Axially Disubstituted Silicon Phthalocyanines  
Ayça Aktaş KARAÇELİK, Derya EFE, Volkan ÇAKIR, Zekeriya BIYIKLIOĞLU

1302

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Citrus Limon L. Peel Powder Incorporated Polyvinyl Alcohol/Corn Starch Antioxidant Active Films  
Pınar TERZİOĞLU, Yusuf SICAK

1311

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Saccharification of Hazelnut and Rhododendron Biomasses Using  $\beta$ -xylanase from *Thermotoga naphthophila*  
Özgenur DİNÇER, Hasan Ufuk CELEBIOĞLU, Atia HAMID, Muhammad Nauman AFTAB, Ahmet KARADAĞ

1321

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Syntheses And Characterizations Of Poly( $\epsilon$ -Caprolactone-b-Ethylene Glycol Methyl Ether) Block Copolymers Via Ring-Opening Polymerization And "Click" Chemistry  
Ergül MEYVACI, Temel ÖZTÜRK, Bedrettin SAVAŞ

1329

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Bis(Sülfonamid) İhtiva Eden Kalkon Türevlerinin Etkin Bir Şekilde Sentezi ve Karakterizasyonu  
Effective Synthesis and Characterization of Bis(Sulfonamide) Containing Chalcone  
Elif AKIN KAZANCIOĞLU

1341

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni Köpük Nanokompozitlerinin Doğrudan Metanol Yakıt Hücresinde Elektrot Malzemesi Olarak Kullanımı  
Use of Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni Foam Nanocomposites as Electrode Material in Direct Methanol Fuel Cell  
Bingül KURT URHAN

1354

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Maxilon Blue 5G Removal by Bimetallic Pt/Co Loaded on GO Material under Ultrasonic Conditions from Aquatic Medium  
Mehmet Harbi ÇALIMLI

1362

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Potansiyel Biyolojik Aktif Bazı Asimetrik Feniletıl Üre Türevlerinin Sentezi  
Synthesis of Potentially Biologically Active Some Asymmetric Phenylethyl Urea Derivatives  
Yusuf AKBABA

1374

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Effects of 4-Ethyl Resorcinol and 5-Methylresorcinol on Human Carbonic Anhydrase-I and Molecular Docking Study  
Pınar GÜLLER

1385

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Grafen Katkılı Nişasta Filmlerinin Dielektrik Özelliklerinin Geniş Frekans Aralığında İncelenmesi  
Investigation of Dielectric Properties of Graphene Filled Starch Films in Wide Frequency Range  
Gülben TORĞUT, Nedim GÜRLER

1393

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Deneyel Florozis Oluşturulmuş Ratlarda Kitosan ve Kitosan Oligosakaridin Serum ve Doku Siyalik Asit Düzeyleri Üzerindeki Etkileri  
Effects of Chitosan and Chitosan Oligosaccharide on Serum and Tissue Sialic Acid Levels in Experimental Fluorosis  
Uğur ÖZDEK, Yeter DEĞER

1402

### Kimya / Chemistry, Kimya Mühendisliği / Chemical Engineering

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Potansiyel Biyolojik Aktif Bazı Yeni Benzenesülfonamid Yapısı Taşıyan Pirazol Türevlerinin Sentezleri  
Syntheses of Potential Bioactive Some New Pyrazole Derivatives Having Benzenesulfonamide Moiety  
Cetin BAYRAK

1408

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Design, Synthesis and Antimicrobial Activities of New Carbon Nanotubes Derivatives  
Aybek YİĞİT, Mehmet Hakkı ALMA, Yüksel AKINAY, Nurettin MENGES

1420

### Makina Mühendisliği / Mechanical Engineering

#### Araştırma Makalesi / Research Article

HSS S960QL Çeliğinin MAG Kaynağında Kaynak Akımı ve Gaz Kompozisyonundaki CO<sub>2</sub> Oranının Birleştirme Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi

Investigation on Effects of Weld Current and CO<sub>2</sub> Content in Gas Composition in GMAW on Joint Properties of HSS S960QL Steel

Zafer BARLAS, Esen ORMANLI, Uğur ÖZSARAC, Ayhan ORHAN, Uğur ÇALIGÜLÜ

1430

#### Araştırma Makalesi / Research Article

FDM Üç Boyutlu Yazıcı Teknolojisinde Farklı İçyapı Geometri İle Üretilmiş Numunelerin Çekme Dayanımlarının Karşılaştırılması

Comparison of Mechanical Properties of 3D-Printed Specimens Manufactured Via FDM with Various Inner Geometries

Selim BACAK, Hatice VAROL ÖZKAVAK, Mehmet Mahir SOFU

1444

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Farklı İmalat Yöntemleri İle Elde Edilen Mikrokanalların Metrolojik Karakterizasyonu  
Metrological Characterization of Microchannels Obtained by Different Fabrication Methods

İbrahim ATEŞ, Eyüphan MANAY, Bayram ŞAHİN

1455

### Matematik / Mathematics

#### Araştırma Makalesi / Research Article

$A_{\{p_1, q_1\}^{\{p_2, q_2\}}(G, w)$  Uzayı ve Bazı Topolojik Özellikleri Üzerine  
Nilay DEĞİRMEN, İbrahim DEĞİRMEN

1468

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Soliton Solutions of Generalized Third-Order Nonlinear Schrödinger Equation by Using GKM

Seyma TULUCE DEMIRAY, Ugur BAYRAKCI

1481

### Moleküler Biyoloji ve Genetik / Molecular Biology and Genetic

#### Araştırma Makalesi / Research Article

DNA Barcoding And Species Delimitation Of *Pyrausta* (Lepidoptera: Crambidae, Pyraustinae) With Some Populations In Turkey  
Sibel KIZILDAG

1489

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Türkiye'de Yayılış Gösteren *Arctosa maculata* (Hahn, 1822) (Araneae: Lycosidae) Türünün Karyolojik Özelliklerinin Araştırılması

Demonstrating Distribution in Turkey *Arctosa maculata* (Hahn, 1822) (Araneae: Lycosidae) Type of Investigation of Karyological Features

Fahrettin Anıl SIRLIBAŞ, Zübeyde KUMBIÇAK, Ümit KUMBIÇAK

1497

#### Araştırma Makalesi / Research Article

The Evaluations and Comparisons of Nuclear and Chloroplast DNA Regions Based on Species Identification and Phylogenetic Relationships of *Crocus L.* Taxa

Aykut YILMAZ

1504

### Orman Mühendisliği / Forestry Engineering

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Orman Yangın Şiddetinin Google Earth Engine ve Coğrafi Bilgi Sistemleri Kullanarak Analizi: Hatay-Belen Örneği

Analysis of Forest Fire Severity Using The Google Earth Engine and Geographical Information Systems: Hatay-Belen Case Study

Osman Salih YILMAZ, Mehmet Serdar ORUÇ, Ali Murat ATEŞ, Fatih GÜLGEN

1519

**Tarım Ekonomisi / Agricultural Economy**

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Yem Fabrikalarında Kapasite Kullanımının Üretim ve Ekonomik Performans Açısından Değerlendirilmesi: Samsun İli Örneği, Türkiye

Evaluation of Capacity Utilization in Terms of Production and Economic Performance in Feed Factories: The Case of Samsun Province, Turkey

Uğur BAŞER, Mehmet BOZOĞLU

1533

**Araştırma Makalesi / Research Article**

COVID-19 Pandemisinin Semt Pazarcıları Üzerindeki Sosyoekonomik Etkisi: Kocaeli İli Örneği

Socioeconomic Impact of COVID-19 Pandemic on the Sellers in Street Markets: A Case Study of Kocaeli Province

Bahar AYDIN CAN

1540

**Tarla Bitkileri / Field Crops**

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Tam Sulama ve Su Stresi Koşullarında Sorgum x Sudan Otu Melezi Çeşitlerinin Gelişme Dönemleri İçin Gerekli Büyüme Gün Derece Değerlerinin Belirlenmesi

Determination of Growing Degree Days Values Required for Growth Periods of Sorghum x Sudan Grass Hybrid Varieties under Full Irrigation and Water Stress Conditions

Erdal GÖNÜLAL, Süleyman SOYLU

1550

**Araştırma Makalesi / Research Article**

The Effect of Humic Acid Applications on Growth and Quality Properties of Potato (*Solanum tuberosum* L.)

Hümk Asit Uygulamalarının Patates (*Solanum tuberosum* L.) Bitkisinin Gelişimi ve Kalite Özellikleri Üzerine Etkileri

Nursel ÇÖL KESKİN, Fikret AKINERDEM

1559

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Iğdır Ekolojik Şartlarında Bazı Yonca (*Medicago sativa* L.) Çeşitlerinin Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi

Determination of Quality Characteristics of Some Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Varieties in Iğdır Ecological Conditions

Bilal KESKİN, Süleyman TEMEL, Barış EREN

1568

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Orta ve Batı Karadeniz Bölgesinden Toplanan Yerel Yulaf Genotiplerinin Bazı Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Evaluation of Some Characteristics of Local Oat Genotypes Collected from the Central and Western Black Sea Region

Zeki MUT, Özge Doğanay ERBAŞ KÖSE, Hasan AKAY, İsmail SEZER

1582

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Yapraklı ve Yarı Yapraklı Yem Bezelyesi Çeşitleri ile Tek Yıllık Çim Karışımlarının Silaj Kalitesinin Belirlenmesi

Determination the Silage Quality of Leafy and Semi-Leafy Forage Pea and Annual Ryegrass Mixtures

Gülcan KAYMAK, Erdem GÜLÜMSER, Mehmet CAN, Zeki ACAR, İlknur AYAN

1595

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Different Plant Growth Regulators on Improvement of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Micropropagation

Ahmet Metin KUMLAY, Canan KAYA, Bünyamin YILDIRIM

1603

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Effects of Different Growing Medium, Substrate and Irrigation Method Applications on Soilless Roll Sod

Farklı Yetiştirme Ortamı, Altlık ve Sulama Yöntemi Uygulamalarının Topraksız Rulo Çim Üzerine Etkileri

Muhammet KARAŞAHİN

1616

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Hay Production of Smooth Bromegrass (*Bromus inermis* Leyss.) as Influenced by Various Management Practices in Highlands

Mustafa TAN, İrfan CORUH

1625

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Solucan Gübresinin *Satureja hortensis* L.'nin Herba Verimi ve Uçucu Yağ Oranına Etkisi

Effect of Vermicompost on Herb Yield and Essential Oil Content of *Satureja hortensis*

Nimet KARA

1635

**Zootekni / Animal Science**

**Derleme Makalesi / Review Article**

Ruminantlarda Karayolu Nakliyesinde Oluşan Stresin Nedenleri, Belirteçleri ve Sonuçları

Causes, Indicators and Consequences of Stress Caused by Road Transport in Ruminants

Kerim Emre YANAR, Mustafa Sinan AKTAŞ

1643

**Araştırma Makalesi / Research Article**

*In Vitro* Gaz Üretim Tekniği Kullanılarak Yer bademi (*Cyperus esculentus*) Çeşitlerinin Besin Değerinin Saptanması

Determination of Nutritional Values of Different Tiger nut (*Cyperus esculentus*) Types by Using *In Vitro* Gas Production Technique

Tugay AYAŞAN, Ekin SUCU, İsmail ÜLGER, Hakan İNCİ, Hatice HIZLI, Sevda İNAN

1653

**Atf için:** Güler E, Bak T, Karadeniz T, Muradoğlu F, 2021. Bolu İli Şehir Merkezinde Yetiştirilen Kuşburnuların (*Rosa canina* L.) Meyve Özellikleri Arasındaki İlişkiler. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 831-838.

**To cite:** Güler E, Bak T, Karadeniz T, Muradoğlu F, 2021. Relationships of Fruit Characteristics of Rosehips (*Rosa canina* L.) Grown in Bolu City Center. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 831-838.

## Relationships of Fruit Characteristics of Rosehips (*Rosa canina* L.) Grown in Bolu City Center

Emrah GÜLER<sup>1\*</sup>, Tuba BAK<sup>2</sup>, Turan KARADENİZ<sup>1</sup>, Ferhad MURADOĞLU<sup>1</sup>

**ABSTRACT:** Rosehip (*Rosa* spp.) is one of the most used non-wood forest products. It is an essential source of antioxidants and vitamin C besides having a wide range of uses in folk medicine and the marmalade industry. Therefore, for many years, researchers have made efforts to find the superior genotypes of this fruit. In previous studies, classical breeding methods were used in the evaluation of the data and more modernist approaches were given little attention. In this study, fruit characteristics and their relationships of rosehip genotypes growing in Bolu city center were determined by using more modernist analysis methods (Clustering, PCA) and correlation analysis. As a result of the study, while fruit weight was positively correlated with fruit size, it had a negative correlation with the fruit flesh ratio. In cluster analysis, genotypes were collected in two different groups, and PCA analysis supported this result. Results of the study proved that multivariate analysis has come to the fore as a highly effective method for evaluating genetic resources. Furthermore, the G-5 genotype stood out with its fruit weight and size.

**Keywords:** Rosehip, *Rosa canina* L., PCA, correlation, multivariety analysis

### Bolu İli Şehir Merkezinde Yetiştirilen Kuşburnuların (*Rosa canina* L.) Meyve Özellikleri Arasındaki İlişkiler

**ÖZET:** Kuşburnu (*Rosa* spp.) en çok kullanılan odun dışı orman ürünlerinden biridir. Meyvesi, halk hekimliğinde ve marmelat endüstrisinde geniş bir kullanım alanına sahip olmasının yanı sıra önemli bir antioksidan ve C vitamini kaynağıdır. Bu nedenle, araştırmacılar uzun yıllar bu meyvenin üstün genotiplerini bulmak için çaba harcadılar. Bu çalışmalarda verilerin değerlendirilmesinde klasik yetiştirme yöntemleri kullanılmış ve daha modernist yaklaşımlara çok az önem verilmiştir. Bu çalışmada Bolu il merkezinde yetişen kuşburnu genotiplerinin meyve özellikleri ve ilişkileri daha modernist analiz yöntemleri (Kümeleme, PCA) ve korelasyon analizi kullanılarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda meyve ağırlığının meyve büyüklüğü ile pozitif yönde ilişkili olduğu tespit edilirken, meyve eti oranı ile negatif korelasyona sahip olduğu görülmüştür. Küme analizinde genotipler iki farklı grupta toplanmış ve PCA analizi bu sonucu desteklemiştir. Çalışma sonucunda meyve ağırlığı ve büyüklüğü ile G-5 genotipinin öne çıktığı görülmüştür. Ayrıca kümeleme ve PCA gibi analizlerin seleksiyon ıslahı çalışmalarında verilerin değerlendirilmesinde başarılı bir şekilde kullanılabileceği değerlendirilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Kuşburnu, *Rosa canina* L., PCA, korelasyon, Bolu

<sup>1</sup> Emrah GÜLER ([Orcid ID: 0000-0003-3327-1651](https://orcid.org/0000-0003-3327-1651)), Turan KARADENİZ ([Orcid ID: 0000-0003-0387-7599](https://orcid.org/0000-0003-0387-7599)), Ferhad MURADOĞLU ([Orcid ID: 0000-0001-6595-7100](https://orcid.org/0000-0001-6595-7100)), Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü

<sup>2</sup> Tuba BAK ([Orcid ID: 0000-0002-4448-9704](https://orcid.org/0000-0002-4448-9704)), Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mudurnu Süreyya Astarıcı Meslek Yüksek Okulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Emrah GÜLER, e-mail: emrahguler6@gmail.com

## INTRODUCTION

Rosehip (*Rosa* spp.) belongs to the genus *Rosa* of the Rosaceae family of the order Rosales. Turkey has approximately 25% of rosehips that grow in the world (Kutbay and Kılınç, 1996; Türkben, 2003; Ercişli and Güler, 2005).

Rosehip is a plant in the form of a shrub that can grow up to 0.5-4.0 m with an upright, and pending form varies according to its species. Its trunk and branches can have more or fewer thorns. Rosehips are deciduous. Thorns of plants are generally curved, very few, and straight. The glabrous leaves with 5-11 leaflets, 2–4 cm long, are in the form of an egg or ellipse. The edges of the leaves are straight or piled, serrated, light bluish-green. The flowers are light red, pink, yellow, cream or white, gathered in single or umbrella-like clusters. Its flowers have five sepal and five petal leaves. The sepals are in the shape of a round or elongated egg, and the ends are folded back later, and it is poured later according to the type or remains on the fruit. The outer part of the fruit is hairy or glabrous depending on the species, and the inner part of the fruit is more or less hairy; It contains many seeds and can generally remain on the plant in winter (İlisulu, 1992; Türkben, 2003).

Rosehip has become fruit in demand by consumers in recent years having natural antioxidants beneficial to human health (Su et al., 2005). Rosehip fruits contain minerals, carotenoids, tocopherol, bioflavonoids, fruit acids, tannin, pectin, amino acid, and essential oils (Çınar and Çolakoglu, 2005).

Rosehip grows naturally in a wide range of regions, including the Caucasus, Central, and Western Asia, Europe, Iraq, Northwest Africa, and the northern and western parts of Iraq and Iran, north Afghanistan, Kashmir, Pakistan, and the former Commonwealth of Independent States (İlisulu, 1992). Rosehip plant is highly adaptive to various climate and soil conditions. Because of this characteristic, the plant can be seen in a wide-ranged area in Turkey (Ercişli and Güler, 2005).

Genetic material diversity is an excellent resource that could contribute to future rose hip breeding programs aimed at the most desirable traits, such as high yield, fruit characteristics, bioactive compounds, and resistance to disease and pests.

Even though there are plenty of studies on fruit and plant characteristics of rosehips, most of them were on physicochemical characteristics (Sanderson and Fillmore, 2010; Yıldız and Çelik, 2011; Ekinci and Kazankaya, 2012; Ersoy and Özen, 2016) and some of them were on nutritional ingredients (Türkben et al., 2005; Ercişli, 2007; Kerasioti et al. 2019; Rovná et al., 2020). Although there are academic studies on rosehip, almost no studies examine the relationships of fruit characteristics. In this study, we determined the relationships of some base characteristics of rosehip genotypes naturally grown in the city center of Bolu.

## MATERIALS AND METHODS

### Material

The rosehip genotypes used for relationship analysis in this study were obtained from the city center of Bolu. The genotypes were ungrafted and naturally grown.

### Pomological analysis

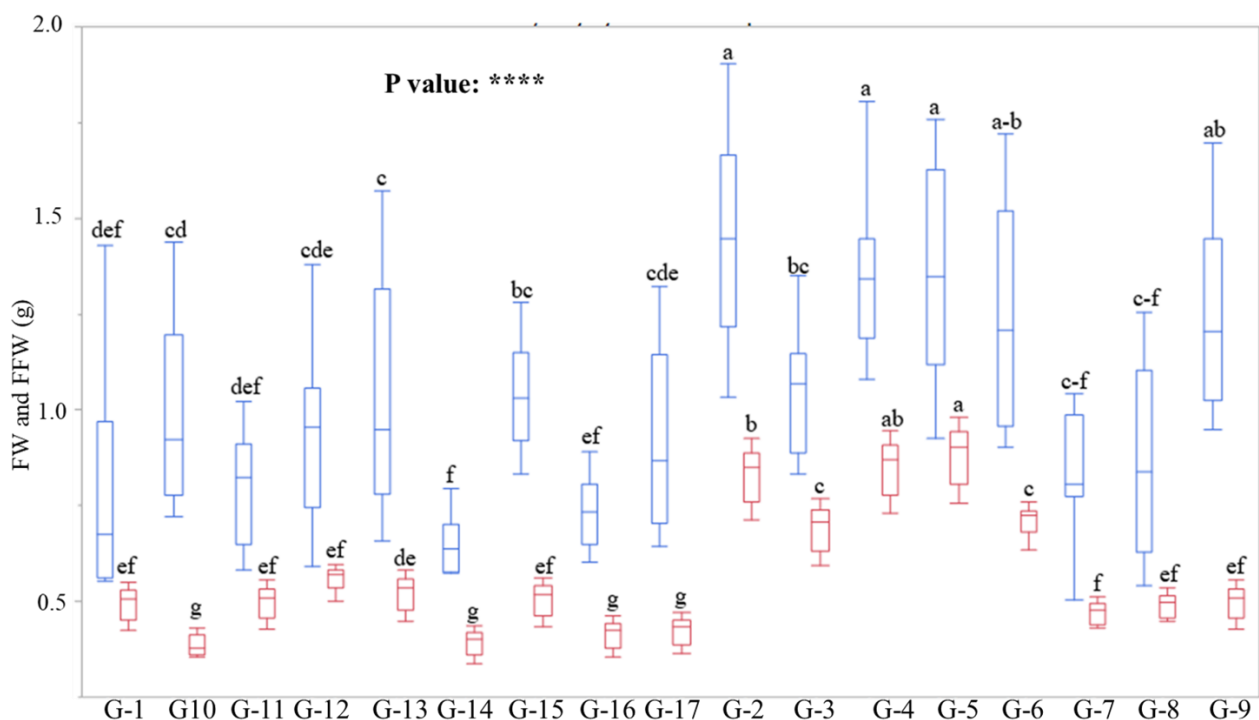
Fruit length (FL) and fruit width (FWH) were measured by a 0.001 mm sensitive digital hand caliper. Fruit weight (FW) and fruit flesh weight (FFW) were weighed by a 0.001 g sensitive scale. pH was measured with a table-type pH meter. Total soluble solids (TSS) was determined by a hand refractometer. Titratable acidity (TA) was measured with the titration method (İpek and Balta, 2020). Fruit flesh ratio (FFR) was calculated with the equation of 'FFW/FW×100' while the fruit shape index (FSI) was calculated with the equation of 'FWH/FL'.

### Statistical analysis

The ANOVA test was performed to determine the variance between genotypes in terms of fruit characteristics, and significant variants were indicated with different letters. Correlation, cluster, and principal component analysis were performed to determine relationships of features. The R Studio statistical software was used in the analysis and data visualization. The package ‘corrplot’ (Wei and Simco, 2017) was used to perform correlation analysis, and the package ‘ggplot2’ (Wickham, 2016) was used for PCA.

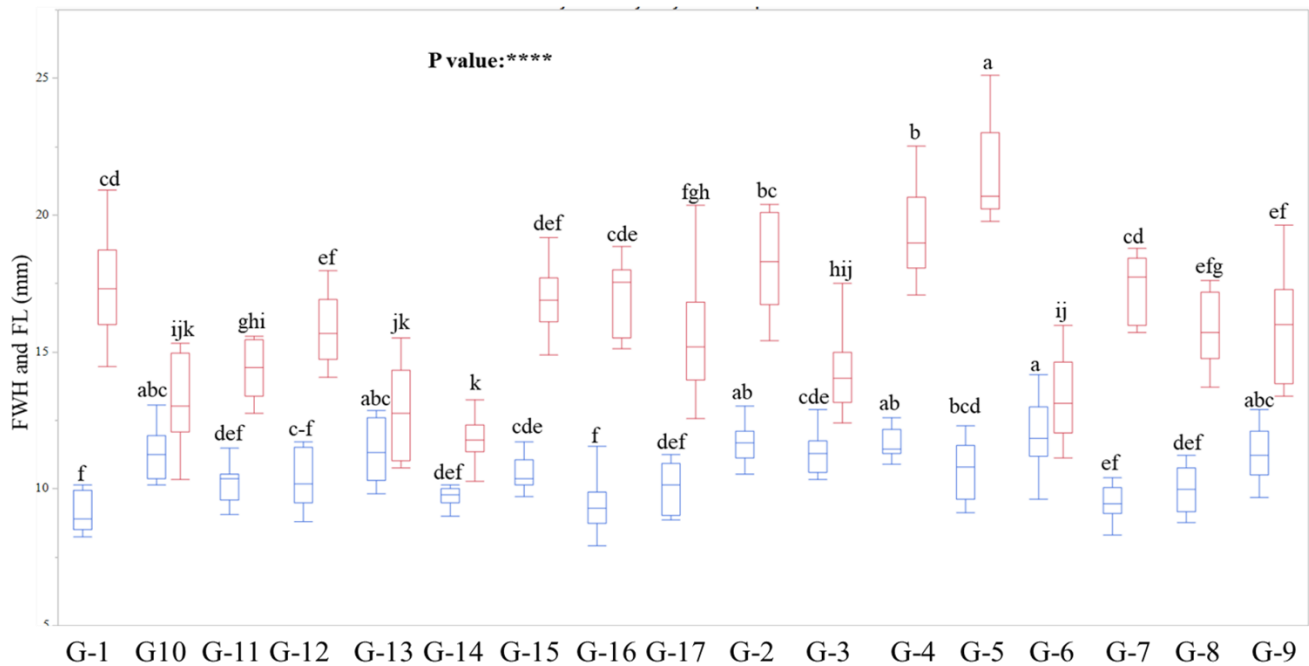
### RESULTS AND DISCUSSION

In the study, FWs of genotypes varied between 0.67 (G-14) to 1.44 g (G-2), and FFW values were between 0.49 – 0.88 g (Figure 1). FL values were determined between 11.83 - 21.54 mm in G-14 and G-5, respectively. The G-1 genotype had the least FWH (9.33 mm), while the G-6 genotype had the most superior value (11.98 mm) in terms of this feature (Figure 2). FFRs varied by 41.24% (G-10) to 67.32% (G-5), and FSI values were recorded between 1.11-2.02 (Table 1). The features fruit size (FL and FWH) and FW are desired to be as high as possible to attract the farmer's interest to grow them and suitability to mechanical and technological applications (Çelik et al., 2009). The FW and size values of the genotypes in this study were relatively low that previously reported (Yıldız and Çelik, 2011; Ekinci alp and Kazankaya; İpek and Balta, 2020) while the results fit and support most of the studies (Türkoğlu ve Muradoğlu 2003, Türkben et al., 2005; Ersoy and Selman Özer, 2016; Doğan and Kazankaya, 2006; Karakuş and Bostan, 2017). There was also a study that showed fewer values than ours (Sanderson and Fillmore, 2010). Considering all these studies, we can suggest that rosehips' fruit properties vary according to species, growing region, climatic and ecological conditions.



**Figure 1.** FW (blue boxes) and FFW (red boxes) values of genotypes. Values were given as mean  $\pm$  std. er.. Different letters indicate significant variance at the level of 0.05





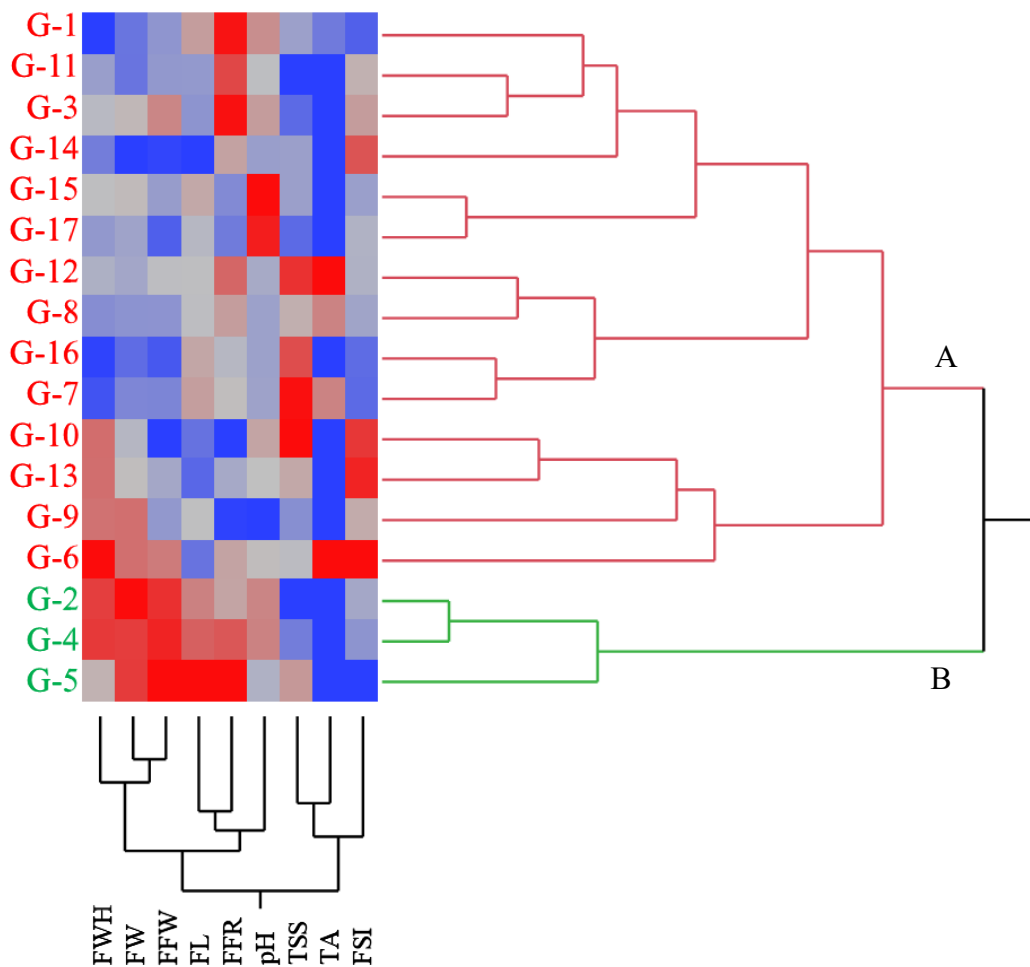
**Figure 2.** FW (blue boxes) FFW (red boxes) values of genotypes. Values were given as mean  $\pm$  std. er.. Different letters indicate significant variance at the level of 0.05

**Table 1.** The other physical and chemical properties of the genotypes

| Genotype | pH                | TSS (%)             | TA (g L) | FFR (%)              | FSI                 |
|----------|-------------------|---------------------|----------|----------------------|---------------------|
| G-1      | 3.88 <sup>s</sup> | 18.78 $\pm$ 0.49 e* | 1.95 ns  | 67.01 $\pm$ 5.48 a   | 1.87 $\pm$ 0.04 abc |
| G-2      | 3.93              | 14.04 $\pm$ 0.47 h  | 1.93     | 59.73 $\pm$ 4.34 abc | 1.57 $\pm$ 0.03 a-f |
| G-3      | 3.80              | 15.91 $\pm$ 0.53 g  | 1.91     | 67.11 $\pm$ 3.92 a   | 1.88 $\pm$ 0.64 ab  |
| G-4      | 3.95              | 16.85 $\pm$ 0.56 fg | 1.98     | 64.00 $\pm$ 3.24 ab  | 1.66 $\pm$ 0.04 a-d |
| G-5      | 3.36              | 23.40 $\pm$ 0.78 c  | 1.88     | 67.32 $\pm$ 4.39 a   | 2.02 $\pm$ 0.05 a   |
| G-6      | 3.58              | 20.50 $\pm$ 0.35 d  | 1.87     | 59.83 $\pm$ 4.13 abc | 1.11 $\pm$ 0.03 g   |
| G-7      | 3.18              | 29.67 $\pm$ 0.79 a  | 1.89     | 57.95 $\pm$ 4.35 a-d | 1.83 $\pm$ 0.05 a-d |
| G-8      | 3.16              | 22.01 $\pm$ 0.58 cd | 1.87     | 60.16 $\pm$ 5.33 abc | 1.58 $\pm$ 0.03 a-f |
| G-9      | 2.25              | 17.78 $\pm$ 0.59 ef | 1.80     | 41.58 $\pm$ 2.73 e   | 1.41 $\pm$ 0.06 d-g |
| G-10     | 3.75              | 29.80 $\pm$ 0.72 a  | 1.87     | 41.24 $\pm$ 3.16 e   | 1.16 $\pm$ 0.03 efg |
| G-11     | 3.52              | 14.04 $\pm$ 0.47 h  | 1.79     | 64.75 $\pm$ 4.51 ab  | 1.42 $\pm$ 0.05 c-g |
| G-12     | 3.27              | 28.31 $\pm$ 0.48 ab | 1.82     | 63.26 $\pm$ 4.77 ab  | 1.54 $\pm$ 0.05 b-g |
| G-13     | 3.55              | 22.46 $\pm$ 0.75 c  | 1.85     | 54.01 $\pm$ 4.57 bcd | 1.14 $\pm$ 0.03 fg  |
| G-14     | 3.13              | 18.72 $\pm$ 0.62 e  | 1.79     | 59.83 $\pm$ 3.02 abc | 1.20 $\pm$ 0.02 efg |
| G-15     | 4.49              | 18.72 $\pm$ 0.62 e  | 1.92     | 49.70 $\pm$ 3.29 cde | 1.61 $\pm$ 0.03 a-e |
| G-16     | 3.16              | 27.14 $\pm$ 0.90 b  | 1.90     | 56.21 $\pm$ 4.45 a-d | 1.83 $\pm$ 0.07 a-d |
| G-17     | 4.42              | 15.91 $\pm$ 0.53 g  | 1.80     | 47.84 $\pm$ 3.41 de  | 1.54 $\pm$ 0.05 b-g |

<sup>s</sup> statistical analysis was not performed. \*Different letters in the same column indicate significant variance in the level of 0.05. ns: not significant

The cluster analysis was performed to determine if the genotypes separate or group together in terms of fruit characteristics. As a result of the analysis, the genotypes were grouped into two main trees. Sub-cluster one (A) had fourteen of the genotypes, while sub-cluster two (B) had three of them (Figure 3). Two-way clustering showed that cluster B separate from A in terms of FWH, FW, FFW, and FL. The mean FWH of A was 10.40 mm while B had 11.35 mm. The average FW of cluster A was 0.94 g while B was 1.37 g. FFW of A was 0.50 g while B had an average of 0.85g. According to this perspective, sub-grouping has occurred in terms of priority of fruit size and weight, and sub-group B had superior values.



**Figure 3.** Two-way clustering of genotypes in terms of fruit characteristics according to Ward's method

In the study, correlation analysis was performed to determine the relationships between fruit characteristics. Correlation analysis showed that FWH had positive relationships with FW ( $r=0.82$ ), FFW ( $r=0.57$ ) and, FSI ( $r=0.51$ ). FFR was negatively related to FWH ( $r=-0.23$ ). FL had a negative correlation with FSI and a positive correlation with FFW. TSS was negatively related to FFW ( $r=-0.32$ ). None of the characteristics were statistically related to pH and TA. All correlations have been shown in Figure 4.

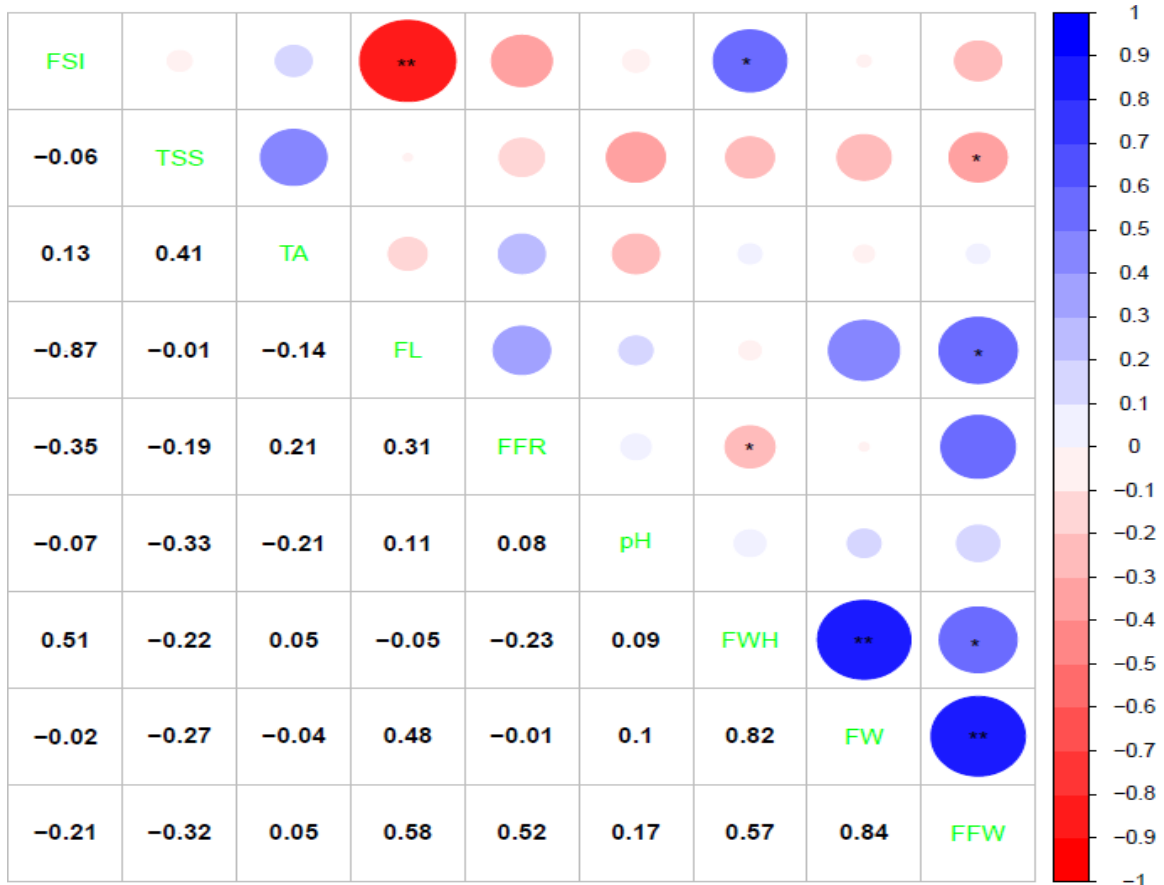


Figure 4. Pearson's correlations of fruit characteristics of rosehip. \*indicates significance at 0.05, and \*\* indicates significance at 0.01

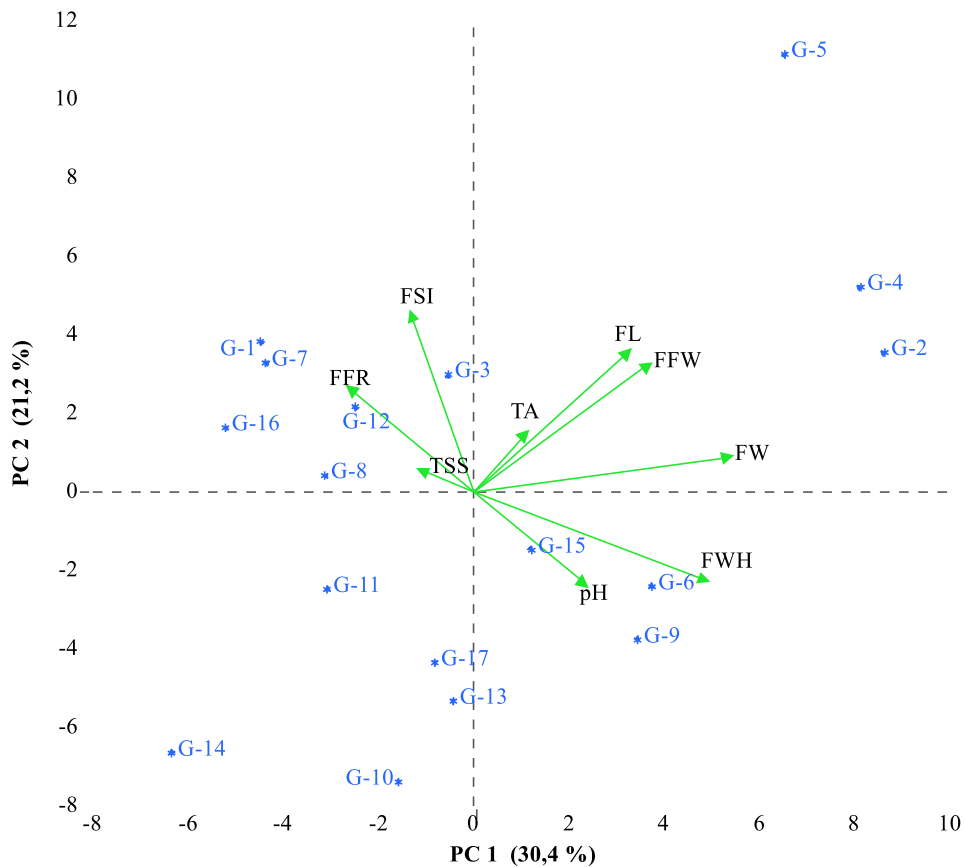


Figure 5. Distribution of the fruit characteristics and genotypes in the biplot

In the PCA analysis, PC1 described 30.4%, and PC2 explained 21.2% of the data. FW had the highest effect on PC1 (0.57), followed by FL, FWH, and FFW, and these features had almost the same amount of influence (0.42). FSI had a dominant effect on PC2, and it was negative (-0.62). FL was the second with a value of 0.44. As clearly seen in Fig. 5, genotypes 2, 4, and 5 separated into different zone supporting cluster analyses. Sanderson and Fillmore (2010) stated a total of 66% variation in PCA. The difference between various amounts of PCA's is considered to occur due to data set differentiation.

## CONCLUSION

This study was carried out on the rosehip germplasm of the city center of Bolu province. As a result of the study, it was observed that the rosehip genotypes grown in the city center were of medium size and partially competed with the genotypes reported by previous researchers. The genotypes 2, 4, and 5 came to the fore with fruit size and weight, and they were considered valuable material to be evaluated in future studies. Besides, clustering and PCA analyzes were highly useful in determining superior genotypes and clearly differentiated them. In subsequent studies, it was proven that these analyzes could also be used effectively instead of the classical weighted grading method.

## Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

## Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

## REFERENCES

- Çelik F, (2007). Vangölü Havzası Kuşburnu (*Rosa* spp.) Genetik Kaynaklarının Seleksiyonu ve Mevcut Biyolojik Çeşitliliğin Tespiti. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Doktora Tezi, Van.
- Çelik F, Kazankaya A, Ercişli S, 2009. Fruit Characteristics of Some Selected Promising Rose Hip (*Rosa* spp.) Genotypes from Van Region of Turkey. African Journal of Agricultural Research, 4 (3): 236-240.
- Çınar İ, Çolakoğlu AS, 2005. Potential Health Benefits of Rose Hip Products. Proceedings of the First International Rose Hip Conference. Acta Horticulturae, 690, 253– 257.
- Doğan A, Kazankaya A, 2006. Fruit Properties of Rose Hip Species Grown in Lake Van Basin (Eastern Anatolia Region). Asian Journal of Plant Sciences, 5 (1): 120-122.
- Ekincialp A, Kazankaya A, 2012. Hakkari Yöresi Kuşburnu Genotiplerinin (*Rosa* spp.) Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 22 (1): 7-11.
- Ercişli S, Güleryüz M 2004. Rose Hip Utilization in Turkey. In I. International Rose Hip Conference 690: 77-82.
- Ercişli S, 2007. Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa* spp.) species. Food Chemistry, 104: 1379–1384.
- Ersoy N, Özen MS, 2016. Some Physico-chemical Characteristics in Fruits of Rose Hip (*Rosa* spp.) Genotypes from Bolu Province in Western Part of Turkey. АГРОЗНАЇЕ, 17(2): 191-201.
- İpek P, Balta F, 2020. Fruit Properties of Rose Hip (*Rosa spp.*) Genotypes Selected from Akkuş, Ordu Province. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 30(2), 338-344.
- İlisulu K, 1992. İlaç ve Baharat Bitkileri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları Ders Kitabı No:360, s302.

- Karakuş S, Bostan SZ, 2017. Akıncılar (Sivas) Yöresinde Doğal Olarak Yetişen Kuşburnu Genotiplerinin (*Rosa* spp.) Seleksiyon Yoluyla Islahı. Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi, 6: 215-225.
- Kerasiotti E, Apostolou A, Kafantaris I, Chronis K, Kokka E, Dimitriadou C, Kouretas D, 2019. Polyphenolic Composition of *Rosa canina*, *Rosa sempervivens* and *Pyrocantha coccinea* Extracts and Assessment of Their Antioxidant Activity in Human Endothelial Cells. Antioxidants, 8(4): 92.
- Kutbay HG, Kılınç M, 1996. Kuşburnu (*Rosa*. L.) Türlerinin Taksonomik Özellikleri ve Türkiye'deki Yayılışları. Kuşburnu Sempozyumu, 5-6 Eylül 1996, Gümüşhane, Türkiye, s:75-83
- Rovná K, Ivanišová E, Žiarovská J, Ferus P, Terentjeva M, Kowalczewski PŁ, Kačániová M, 2020. Characterization of *Rosa canina* Fruits Collected in Urban Areas of Slovakia. Genome Size, iPBS Profiles and Antioxidant and Antimicrobial Activities. Molecules, 25 (8): 1888.
- Sanderson K, Fillmore S, 2010. Evaluation of Native Rose Selections for Rose Hip Production in Prince Edward Island. International Journal of Fruit Science, 10: 379–389.
- Su L, Yin JJ, Charles D, Zhou K, Moore J, and Yu LL, 2005. Total Phenolic Contents, Chelating Capacities, and Radical-scavenging Properties of Black Peppercorn, Nutmeg, Rosehip Cinnamon and Oregano leaf. Food Chemistry, 100 (3): 990–997.
- Türkben C, 2003. Kuşburnu, Uludağ Üniversitesi Basımevi, ISBN, 975-6958.
- Türkben C, Barut E, Çopur ÖU, Durgut E, Himelrick DG, 2005. Evaluation of Rose Hips (*Rosa* spp.) Selections. International Journal of Fruit Science, 5 (2): 113-121.
- Türkoğlu, N., Muradoğlu, F. 2003 “Tatvan Yöresinde Doğal Olarak Yetişen Kuşburnu Tiplerinin Üstün Özelliklerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma”, Türkiye IV Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi 08-12 Eylül 2003 Antalya; s:256-257.
- Wei T, Simko V, 2017. RPackage “corrplot”: Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.84).
- Wickham H, 2016. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4.

**To Cite:** Zarifikhosroshahi M, Ergun Z, 2021. The effect of storage temperature on the composition of fatty acids in Crimson Sweet (*Citrullus lanatus* var. *lanatus*) watermelon Cultivar seeds. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 839-845.

### The Effect of Storage Temperature on the Composition of Fatty Acids in Crimson Sweet (*Citrullus lanatus* var. *lanatus*) Watermelon Cultivar Seeds

Mozhgan ZARIFIKHOSROSHAHI<sup>1\*</sup>, Zeynep ERGUN<sup>2</sup>

**ABSTRACT:** Crimson Sweet is one of the favorite watermelon cultivars with high sugar content and great flavor containing small and dark seeds. Both fruit flesh and seeds have high nutrition content. In order to evaluate new sources of oil for the growing population, watermelon seed oil is used in some nations. Therefore, it was aimed to determine the fatty acid profile of differentially stored Crimson Sweet watermelon seed oil in this study. The results indicated that seeds are rich in Omega 6 fatty acid (40.62-42.34%). The amount of this essential fatty acid was higher at samples stored at 4°C. Palmitic, oleic, and stearic acids are the main fatty acids followed by linoleic acid in Crimson Sweet watermelon, respectively. Moreover, the ratio of polyunsaturated fatty acid to saturated fatty acids was determined as 1.16, 1.20, 1.27 (room temperature, 4°C, and newly harvested, respectively) which are in the desirable range for qualified oil.

**Keywords:** Crimson Sweet watermelon, fatty acids, Omega 6, temperature

<sup>1</sup> Mzhgan ZARIFIKHOSROSHAHI ([Orcid ID: 0000-0001-5491-1430](https://orcid.org/0000-0001-5491-1430)), Cukurova University, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture, Adana, Turkey

<sup>2</sup> Zeynep ERGUN ([Orcid ID: 0000-0002-9868-9488](https://orcid.org/0000-0002-9868-9488)), Adana Alparslan Turkes Science and Technology University, Faculty of Engineering, Department of Bioengineering, Adana, Turkey

\*Corresponding Author: Mzhgan ZARIFIKHOSROSHAHI, e-mail: mn\_zarifi@yahoo.com

## INTRODUCTION

Increased global nutritional demands make the use of vegetable oils necessary for utilization in both food and industrial purposes such as cosmetics and soap making (Nwosu et al., 2017). Oil extracted from some seeds, cereal grains, nuts and fruits such as watermelon and melon are known as vegetable oils. However, some vegetable oils are not produced in commercial quantities. *Citrullus lanatus* (watermelon) is a member of Cucurbitaceae, a family also referred to as cucurbits which has around 800 species and 130 genera (Najafi et al., 2010). Melons, pumpkins, squashes, and gourds are also the member of this family. Due to sweet flavor and high nutritional value, watermelon is mainly consumed as a fruit widely in some regions of the world, mainly in Africa and Asia. Besides consuming as a source of nutrition, it is also used in folk medicine for the treatment of strangury (Ziyada and Elhussien, 2008). Watermelon as a tropical plant requires a lot of sunshine and a high temperature of over 25°C for optimum growth. Drained fertile soil with a moderately acidic nature is a favorite condition for watermelon to grow up (Tabiri et al., 2016). Watermelons have important nutrition value because of rich vitamins B, C, and E and  $\beta$ -carotene sources and also contain considerably large amounts of lycopene (Choudhury et al., 2015). Watermelon bioactive content especially lycopene contributes to quenching the free radicals causing diseases such as atherosclerosis, asthma, colon cancer, diabetes, and arthritis. Moreover, watermelon contains high levels of fibers and citrulline, the precursor of arginine amino acid (Tabiri et al., 2016). The quality of watermelon varieties is extremely based on the sugar content and its sweetness. Watermelon can be used as fresh salad, dessert, snacks, and decorations. Besides consuming watermelon fruit flesh, its seeds also are highly nutritional. Watermelon seeds are rich sources of minerals (such as magnesium, potassium, phosphorus, sodium, iron, calcium, zinc, manganese, and copper), vitamins B, protein (31.9%), and fat (57.1%) (Braide et al., 2012). Some nations consume watermelon seed oil in the cooking and manufacturing of cosmetics but not on an industrial scale (Jensen et al., 2011). Watermelon seeds also contain Leucine, Isoleucine, Tryptophan, and Valine necessary amino acids (Razavi and Milani, 2006). Watermelon seed oils have been studied in different parts of the world because it has a high content of linoleic acid (Ziyada and Elhussien 2008, Taiwo et al., 2008). Despite the different potential applications and nutrition value, the watermelon seeds are often discarded while the fruit is eaten. The recovery and use of agricultural and food processing by-products lead to a decrease in waste disposal problems besides increased limited resources (Kamel et al., 1985). Recently by increasing the demand of the growing population for vegetable oil, the researchers have focused on the exploring of potential and newer plant resources for oil production at an industrial scale (Anhwange, 2004, Parry et al., 2005; Ramadan et al., 2006; Mabaleha et al., 2007; Celik and Ercisli, 2009; Nehdi, 2011). Moreover, investigation on postharvest conditions and periods on changes in wanted characteristics is an important issue in the evaluation of new seed oil sources. On the other hand, fatty acid composition is affected by temperature during seed maturation (Canvin, 1965). Whereas the production of saturated fatty acids increases in warm, dry growing conditions, cooler, moist conditions lead to the production of the polyunsaturated fatty acids (Harris et al., 1978; Yaniv et al., 1995).

In this study, it was aimed to determine the fatty acid profile of Crimson sweet watermelon oil-bearing seeds with high nutritional importance storing at different temperatures to compare with newly harvested ones. Therefore, the old seeds can be evaluated in oil production.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Material

*Citrullus lanatus* var. *lanatus* were used in this study. The seeds were provided by a commercial company (Haluk Gebzeli-Gebzeli Ziraat). The samples were treated at room temperature and +4°C (in conservation refrigerator) for 12 months and compared with newly harvested seeds. Seeds in-room temperatures were kept in special seed storage rooms with adjusted temperature (25°C), darkness, and humidity (%20).

### Oil Extraction

The oils of all samples were extracted at the same time (immediately after harvest of new samples, the conserved seeds and newly harvested ones were used). Obtained fresh oil was analyzed for fatty acids via an automatic soxhlet device (Gerhardt GmbH & Co. KG). Nine grams of dried seed and tuber samples were used for oil extraction. Hexane (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used as a solvent and extracted oil was weighted for determination of the oil percent in the samples. The oil content of seeds and tubers were expressed as g100g<sup>-1</sup> of dry samples. Esterification of fatty acids was done based on David et al., (2003) method.

### Determination of Fatty Acids

The fatty acids were analyzed by a GC (Perkin Elmer, Shelton, USA). Chromatographic separation was performed using a (30 m × 0.25 mm ID, 0.25 µm film thickness DB-Wax) column equipped with a flame ionization detector (FID). The oven temperature was 50°C for 1 min, raised to 25°C min<sup>-1</sup> to 200°C, then 3°C min<sup>-1</sup> to 230°C which was held for 18 min, while the injector and the detector temperatures were set at 280°C and 250°C, respectively. The results were expressed in GC area % as a mean value and ± standard deviation (David et al., 2003).

### Statistical Analysis

The statistics of biochemical analysis were done using JMP statistical software from SAS (Version 7). Differences among the mean values were detected by the least significant differences (LSD) test at a 5 % level. The fatty acid analysis was employed two times for each oil sample.

## RESULTS AND DISCUSSION

The fatty acid composition of seed oils of Crimson Sweet at different storage conditions is shown in Table I. The results showed that linoleic acid, palmitic acid, oleic acid, and stearic acids are the main fatty acids in Crimson Sweet watermelon, respectively. Linoleic acid, the omega-6 fatty acid, is known as an essential fatty acid because the human body cannot synthesize it.

Therefore, Crimson Sweet watermelon seed oils are extremely nutritious oils to reduce serum cholesterol and remedy cardiovascular disorders (Nicolosi et al., 2004, Manzoor et al., 2007). In terms of total oil percentage, the seeds which were stored at 4°C had a high amount of total oil (26.05%) compared to others. While the oil contents of seeds in the present study were found to be lower than those reported by Mogotlane et al., (2018) (30-41.5%) from different indigenous *C. lanatus* seeds (30-41.5%), the obtained results are confirmed by the findings of Tabiri et al., (2016) (Charleston gray 26.83%, Crimson Sweet 26.50%, and Black diamond 27.83%). On the other hand, Al-Khalifa (1996) reported that *C. lanatus* seed oils from Iran, Egypt, and China (20, 24, and 21%, respectively) were lower than Crimson Sweet watermelon studied in this study. Crimson Sweet watermelon had a high amount of total poly saturated fatty acids comprising α-Linolenic acid and Linoleic acid. While no significant differences were obtained between newly harvested watermelon seeds (42.34%) and the seeds stored at 4°C (42.19%), the seeds stored at room temperature showed lower content (40.62%) of PUFA. Thirteen



The Effect of Storage Temperature on the Composition of Fatty Acids in Crimson Sweet (*Citrullus lanatus* var. *lanatus*) Watermelon Cultivar Seeds

saturated fatty acids were detected at Crimson Sweet watermelon in this study which the main ones were palmitic acid and stearic acid. The amount of total SFA was high following the total PUFA. In contrast to total PUFA, newly harvested seeds had lower (33.27%) saturated fatty acids. The seeds stored at room temperature had high levels of palmitic acid (19.17%) and stearic acid (13.86%) (SFAs) (Fig. 2). Whereas the amount of oleic acid as monosaturated fatty acid was higher in newly harvested seeds (17.29%) (Fig. 3), there were no significant differences between seeds stored at 4°C (16.36%) (Fig. 1) and room temperature (16.35%) (Fig. 2). The amount of total saturated fatty acids in the present study are comparable with those reported (64.6-88.2%) for different species of muskmelon (Tilak et al., 2006). The differences among studies may be due to different cultivar and genotypes used along with different oil extraction methods. As the results reveal, newly harvested samples and the ones stored at 4°C had higher PUFA while the amount of PUFA has decreased and may be converted to SFA at samples that are stored at room temperature. However, the ratio of PUFA: SFA is the highest at newly harvested samples (1.27) followed by seeds stored at 4°C (1.20). Consequently, the storage conditions may influence the fatty acid composition of seed oils. Although there is no evidence of storage temperature effect on the conversion of PUFA to SFA, researchers reported that dry and warm conditions are favor for SFA to be produced while moist and cooler conditions are favor to PUFA to be produced (Harris et al., 1978; Yaniv et al., 1995).

**Table I** - The fatty acid composition of seed oils of Crimson Sweet at different storage conditions [%]

| Fatty Acids                    | Room temperature        | 4°C                      | new harvest             | LSD                |
|--------------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------|
| Oil Percent                    | 25.21                   | 26.05                    | 25.56                   | -                  |
| Myristic Acid (C14:0)          | 0.11±0.02               | 0.95±0.004               | 0.11±0.002              | N.S                |
| Palmitic acid (C16:0)          | 19.17±0.11 <sup>a</sup> | 18.86±0.11 <sup>a</sup>  | 18.31±110 <sup>b</sup>  | 0.523 <sup>*</sup> |
| Stearic acid (C18:0)           | 13.86±0.01 <sup>a</sup> | 13.50±0.10 <sup>b</sup>  | 13.09±0.10 <sup>c</sup> | 0.343 <sup>*</sup> |
| Arachidic acid (C20:0)         | 0.58±0.004 <sup>a</sup> | 0.55±0.004 <sup>b</sup>  | 0.55±0.004 <sup>b</sup> | 0.018 <sup>*</sup> |
| Caprylic acid (C8:0)           | 0.34±0.007 <sup>b</sup> | 0.38±0.014 <sup>a</sup>  | 0.35±0.012 <sup>b</sup> | 0.029 <sup>*</sup> |
| Capric acid (C10:0)            | 0.05±0.000 <sup>a</sup> | 0.04±0.001 <sup>a</sup>  | 0.03±0.001 <sup>b</sup> | 0.013 <sup>*</sup> |
| Behenic acid (C22:0)           | 0.14±0.007 <sup>a</sup> | 0.13±0.005 <sup>ab</sup> | 0.12±0.004 <sup>b</sup> | 0.018 <sup>*</sup> |
| Caproic acid (C6:0)            | 0.33±0.014 <sup>c</sup> | 0.34±0.012 <sup>a</sup>  | 0.30±0.010 <sup>b</sup> | 0.018 <sup>*</sup> |
| Tricosanoic acid (C23:0)       | 0.03±0.001 <sup>a</sup> | 0.03±0.001 <sup>a</sup>  | 0.00±0.000 <sup>b</sup> | 0.028 <sup>*</sup> |
| Lignoseriic acid (C24:0)       | 0.13±0.005              | 0.12±0.004               | 0.12±0.004              | N.S                |
| Undecanoic acid (C11:0)        | 0.07±0.002              | 0.07±0.003               | 0.06±0.002              | N.S                |
| Margaric Acid (C17:0)          | 0.22±0.008 <sup>a</sup> | 0.20±0.007 <sup>ab</sup> | 0.19±0.007 <sup>b</sup> | 0.018 <sup>*</sup> |
| Pentadecanoic acid (C15:0)     | 0.06±0.002              | 0.04±0.002               | 0.04±0.001              | N.S                |
| <b>Σ SFA</b>                   | <b>35.04</b>            | <b>35.21</b>             | <b>33.27</b>            |                    |
| Palmitoleic acid (C16:1)ω-7    | 0.06±0.002              | 0.07±0.002               | 0.06±0.002              | N.S                |
| Oleic acid (C18:1n9c)ω-9       | 16.35±0.12 <sup>b</sup> | 16.36±0.12 <sup>b</sup>  | 17.29±0.13 <sup>a</sup> | 0.815 <sup>*</sup> |
| Eicosenoic acid (C20:1n9c)ω-9  | 0.08±0.003              | 0.08±0.003               | 0.08±0.003              | N.S                |
| <b>Σ MUFA</b>                  | <b>16.49</b>            | <b>16.51</b>             | <b>17.43</b>            |                    |
| a-Linolenic acid (C18:3n3) ω-3 | 0.11±0.004 <sup>b</sup> | 0.12±0.004 <sup>a</sup>  | 0.11±0.004 <sup>b</sup> | 0                  |
| Linoleic acid (C18:2n6c) ω-6   | 40.62±0.30 <sup>b</sup> | 42.19±0.32 <sup>a</sup>  | 42.34±0.31 <sup>a</sup> | 1.046 <sup>*</sup> |
| <b>Σ PUFA</b>                  | <b>40.73</b>            | <b>42.31</b>             | <b>42.45</b>            |                    |

\*LSD. Least Significant Difference (LSD). \*N.S: No significant differences. SFA: Saturated Fatty acid; MUFA: Monounsaturated fatty acid; PUFA: Polyunsaturated Fatty acid.

The Effect of Storage Temperature on the Composition of Fatty Acids in Crimson Sweet (*Citrullus lanatus* var. *lanatus*) Watermelon Cultivar Seeds

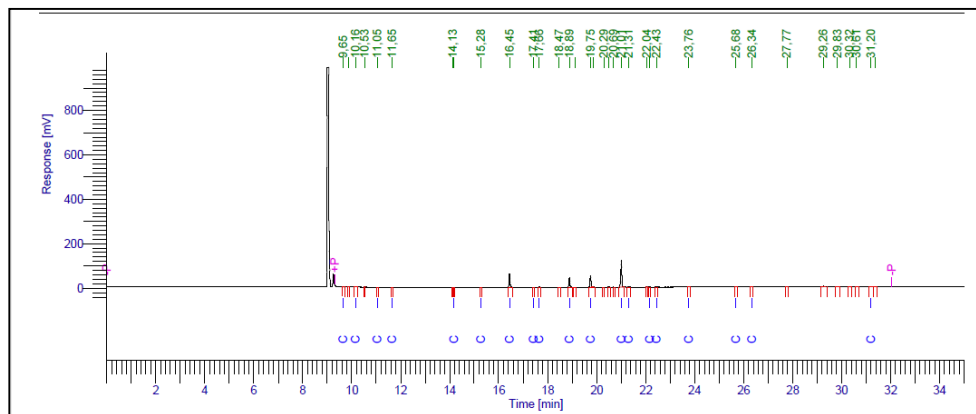


Figure 1 - The chromatogram of fatty acids of Crimson watermelon seeds at 4°C

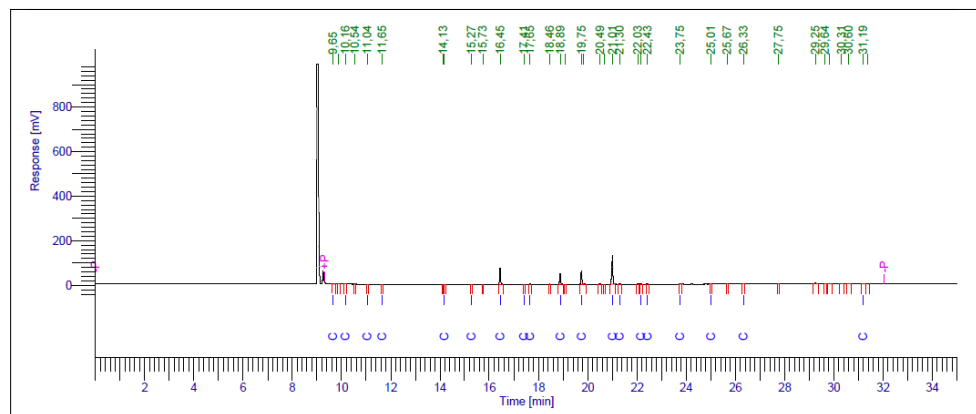


Figure 2 - The chromatogram of fatty acids of Crimson watermelon seeds at room temperature

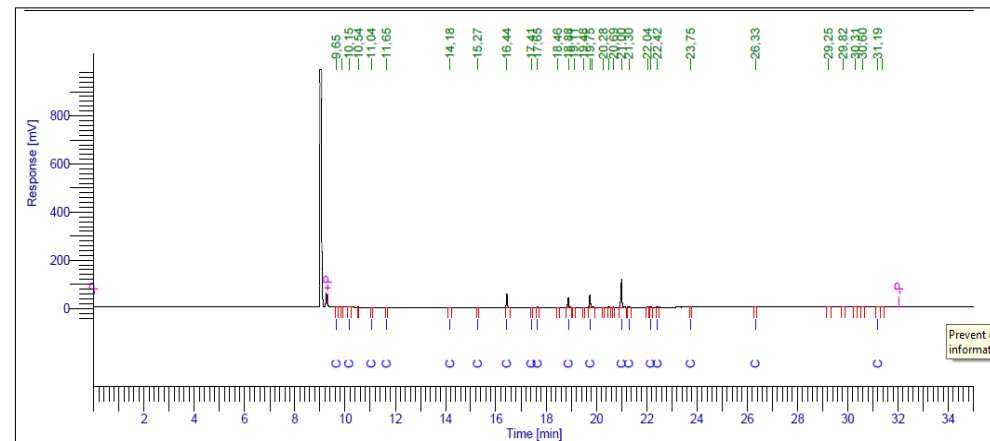


Figure 3 - The chromatogram of fatty acids of newly harvested seeds of Crimson watermelon

## CONCLUSION

The results of this study proved that the seeds of Crimson sweet watermelon are a good source of high omega 6 fatty acid. Therefore, seed oil can be evaluated as a highly notorious and healthy source in the human diet. Although the results showed that the seeds which are newly harvested and the seeds stored at cool places have a high amount of PUFA, the seeds stored at room temperature also have adequate PUFA to be evaluated at oil extraction and uses. By all, the results showed that storage temperature may affect the fatty acid composition but no matter the storage conditions, the seeds may be used for oil extraction at an industrial scale.

## Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Author's Contributions

The authors contributed equally to this manuscript. The authors contributed to the discussion of the results and all of them read and approved the final manuscript.

## REFERENCES

- Al-Khalifa AS, 1996. Physicochemical characteristics, fatty acid composition, and lipoxygenase activity of crude pumpkin and melon seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (4): 964-966.
- Anhwange BA, Ajibola VO, Oniye SJ, 2004. Chemical studies of the seeds of *Moringa oleifera* (Lam) and *Detarium microcarpum* (Guill and Sperr). *J. Biol. Sci.* 4 (6): 711-715.
- Braide W, Odiong IJ, and Oranusi S, 2012. Phytochemical and Antibacterial properties of the seed of watermelon (*Citrullus lanatus*). *Prime Journal of Microbiology Research* 2 (3): 99-104.
- Canvin DT, 1965. The effect of temperature on the oil content and fatty acid composition of the oils from several oil seed crops. *Cani. J. Botany* 43: 63-69.
- Celik F, and Ercisli S, 2009. Lipid and fatty acid composition of wild and cultivated red raspberry fruits (*Rubus idaeus* L.). *J. Med. Plants Res.* 3: 583-585.
- Choudhury BR, Haldhar SM, Maheshwari SK, Bhargava R, Sharma SK, 2015. Phytochemicals and antioxidants in watermelon (*Citrullus lanatus*) genotypes under hot arid region. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 85 (3): 414-417.
- David F, Sandra P, Wylie P, 2003. Improving the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters Using Retention Time Locked Method and Retention Time Databases," Application Note 5990-4822EN, Agilent Technologies publication 5988-5871EN.
- Harris HC, McWilliam JR, and Masson WK, 1978. Influence of temperature on oil content and composition of sunflower seed. *Aust. J. Agric. Res.* 29: 1203-1212.
- Jensen BD, Toure FM, Hamattal MA, Toure FA, and Nantoumé DA, 2011. Watermelons in the Sand of Sahara: Cultivation and use of indigenous landraces in the Tombouctou Region of Mali. *Ethnobotany Research and Applications* 9: 151-162.
- Kamel BS, Dawson H, and Kakuda Y, 1985. Characteristics and composition of melon and grape seed oils and cakes. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 62 (5): 881-883.
- Mabaleha MB, Mitei YC, Yeboah SO, 2007. A comparative study of the properties of selected melon seed oils as potential candidates for development into commercial edible vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84: 31-36.
- Manzoor MF, Anwar T, Iqbal M, Bhangar I, 2007. Physicochemical characterization of *Moringa concanensis* seed and seed oil. *Journal of American Oil Chemist Society*, 84: 413-419.
- Mogotlane EA, Mokwala PW, Mangena P, (2018). Comparative analysis of the chemical compositions of indigenous watermelon (*Citrullus lanatus*) seeds from two districts in Limpopo Province, South Africa. *African Journal of Biotechnology*, 17(32), 1001-1006.
- Najafi S, Sanadgol N, Nejad B. S, Beiragi M. A, Sanadgol, E. (2010). Phytochemical screening and antibacterial activity of *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Plants Research* 4 (22): 2321-2325.
- Nehdi IA, 2011. Characteristics and composition of *Washingtonia filifera* (Linden ex André) H. Wendl., seed and seed oil. *Food Chem.* 126: 197-202.
- Nicolosi RJ, Woolfrey B, Wilson TA, Scollin P, Handelman G, Fisher R, 2004. Decreased aortic early atherosclerosis and associated risk factors in hypercholesterolemic hamsters fed a high- or midoleic acid oil compared to a high-linoleic acid oil. *Journal of Nut. Biochem.* 15: 540-547.

- Nwosu C, Ozumba IC, Kabir AO, 2017. Effect of Process Parameters on the Physical Properties of Watermelon Seed Oil under Uniaxial Compression. *Nutri Food Sci Int J.* 4(1): 555-626.
- Parry J, Su L, Luther M, Zhou K, Yurawecz MP, Whittaker P, Yu L, 2005. Fatty acid composition and antioxidant properties of cold-pressed marionberry, boysenberry, red raspberry, and blueberry seed oils. *J. Agric. Food Chem.* 53: 566-573.
- Ramadan MF, Sharanabasappa G, Parmjyothi S, Seshagiri M, Moersel JT, 2006. Profile and levels of fatty acids and bioactive constituents in mahua butter from fruit-seeds of buttercup tree [*Madhuca longifolia* (Koenig)]. *Eur. Food Res. Technol.* 222: 710-718.
- Razavi SM, Milani E, 2006. Some physical properties of the watermelon seeds. *African Journal of Agricultural Research* 1 (3): 065-069.
- Tabiri B, Agbenorhevi JK, Wireko-Manu FD, Ompouma EI, 2016. Watermelon seeds as food: Nutrient composition, phytochemicals and antioxidant activity.
- Taiwo AA, Agbotoba MO, Oyedepo JA, Shobo OA, Oluwadare I, Olawunmi MO, 2008. Effects of drying methods on properties of water melon (*Citrullus lanatus*) seed oil. *Afr. J. Food Agr. Nutr. Dev.* 8: 1684-5374.
- Tilak RM, Tukaram A, Brij ML, Valangaman SS, 2006. A study of seeds of musk melon (*Cucumis melo* L.), A lesser known source of edible oil. *J. Sci. Food Agri.* 10: 973-978.
- Yaniv Z, Schafferman D, Zur M, 1995. The effect of temperature on oil quality and yield parameters of high-and low-erucic acid Cruciferae seeds (rape and mustard). *Industrial Crops and Products* 3 (4): 247-251.
- Ziyada AK, Elhussien SA, 2008. Physical and chemical characteristics of *Citrullus lanatus* var. *colocynthoide* seed oil. *J Phys Sci* 19: 69-75.

## The Use of Biostimulants in Sustainable Viticulture

Yagmur YILMAZ<sup>1</sup>, Ruhan İlknur GAZIOĞLU SENSOY<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT:** Viticulture has a very wide application area in the world, which is great importance economically and in terms of human diet. The grapevine is evaluated in many areas, both grapes and leaves contain valuable compounds such as vitamins, minerals, antioxidants, organic acids, fats, proteins etc.. It has become inevitable that sustainable production techniques, the use of new integrated techniques, and sufficient sensitivity to protect human and environmental health have to be applied for viticulture which is of great importance in terms of human diet. Sustainable viticulture includes human and environment friendly production systems. It is seen that biostimulants, in other words bioactivators, are used within the scope of scientific researches and in viticulture applications in sustainable viticulture in the world. Containing organic or inorganic compounds, microorganisms; biostimulants are applicable to leaves, soil or seeds; positively affect plant growth, yield, nutrition, and product quality. It has been determined by various studies that biostimulants increase the resistance of plants to biotic and abiotic stress conditions and also regulates the soil structure. Biostimulants have been classified by some researchers as humic substances, amino acids and other nitrogenous compounds, seaweed and plant extracts, chitin and chitosan-like polymers, inorganic compounds, beneficial fungi and beneficial bacteria, waste, exudates and extracts of seeds, leaves and roots. Biostimulants have an important place within the scope of sustainable viticulture in areas such as protection of natural resources, especially soil and water, combating erosion and forest fires, ensuring biological diversity, and integrated pest management. The need to increase soil and plant productivity, to create ecological balance, and most importantly to protect the health of humans and other living things, is better seen each day. This need for a sustainable life and healthy continuity of future generations leads scientists and producers to friendly applications such as biostimulants.

**Keywords:** Biostimulants. sustainable production, viticulture

<sup>1</sup> Yagmur YILMAZ<sup>1</sup> ([Orcid ID: 0000-0002-0769-9171](https://orcid.org/0000-0002-0769-9171)), Van Yuzuncu Yil University, Horticultural Sci. Institute of Natural and Applied Sci., Van, Turkey

<sup>2</sup> Ruhan İlknur GAZIOĞLU SENSOY ([Orcid ID: 0000-0002-2379-0688](https://orcid.org/0000-0002-2379-0688)), Van Yuzuncu Yil University, Horticulture Department, Van, Turkey

\*Corresponding Author: Ruhan İlknur GAZIOĞLU SENSOY, e-mail: rigazioglu@yyu.edu.tr

## INTRODUCTION

Sustainable agriculture is an agricultural structure where natural resources are protected in the long term and contains agricultural technologies do not harm the environment. In other words, sustainable agriculture is an approach that aims to balance environmental, social, ergonomic and economic dimensions in agricultural production. Sustainable agriculture aims to keep the economy alive in the short and long term, to increase the quality of life of the producers, and to develop application areas in this direction, while maintaining productivity on the one hand, and reducing the damage to the environment on the other (Turhan, 2005).

Sustainable viticulture aims to restore the disturbed natural balance as a result of faulty applications in the ecological system. It includes human and environment friendly production systems. It envisages organic and green fertilization, alternation, soil conservation, increasing plant resistance, benefiting from parasites and predators. Sustainable viticulture ensures that all these possibilities are created in a comprehensive system and is a production model that aims to increase the quality of the product rather than increase the amount in production (Anonymous, 2020a).

As in all agricultural fields, the importance and necessity of sustainability in viticulture is better understood every day. This situation has led researchers to investigate different plant activators in the field of viticulture.

Affecting plant growth, nutrition, product quality and yield positively; in order to increase the resistance of plants to abiotic stress. Biostimulants are materials that are applied to plants from the leaves, soil or seeds, which may contain organic or inorganic compounds, microorganisms, and some of them also have regulatory effects on the soil structure. Biostimulants are also called "Biological Stimulants" or "Plant Activators" (Du Jardin, 2015; Külahtaş and Çokuysal, 2016; Roupheal, 2018;).

As the trend towards healthy agricultural products has increased in recent years, it is observed that scientific researches using biostimulant products are increasing day by day and the product market is constantly expanding (Povero et al., 2016). France, Italy and Spain are the leading EU countries in commercial biostimulant production (Traon et al., 2014). Biostimulants are also recommended agronomic tools to counter abiotic stress. These products, which contain bioactive molecules, have a beneficial effect on plants and combat adverse environmental conditions by affecting primary or secondary metabolism. Plant protection products that only have a direct effect against biotic stresses should not be included in the biostimulant category. For a plant activator to be called a biostimulant, the product must also be effective against abiotic stress conditions on the plant (Bulgari et al., 2019).

### Classification of Biostimulants

It is seen that different researchers show different approaches when classifying biostimulants. Especially in recent studies, researchers have listed different activators as biostimulants.

These categories are;

1. Humic substances
2. Amino acids and other nitrogenous compounds
3. Seaweed and plant extracts
4. Chitin and chitosan-like polymers
5. Inorganic compounds
6. Useful fungi and beneficial bacteria (Du Jardin, 2015).
7. Wastes (Yakhin et al., 2017).
8. Exudates and extracts of seeds, leaves and roots (Yakhin et al., 1998; Ertani et al., 2014; Yasmeeen et al., 2014; Lucini et al., 2015; Ugolini et al., 2015).

## Humic substances

Humic substances are the natural organic substances found in soil, water, sediments of decayed animals and plants. In other words, humic substances are called macromolecular compounds formed during degradation of plants in soil or surface waters, which are natural organic materials found in the environment. Fulvic and humic acids are the most widely used bioactivators in agriculture.

1. Humin: It is a part of humic substances that cannot be soluble in water at any acid or alkaline pH.
2. Fulvic acid: It is a part of humic substances that are in water soluble form under all pH conditions.
3. Humic acids: The main content of organic substances in the soil is humus. Humic acid is the most active ingredient of humus. Humic acids are the main compounds obtained from soil (Anonymous, 2020b). They have undertaken tasks such as controlling the availability of plant nutrients, ensuring the Carbon and Oxygen exchange between the soil and the atmosphere, and ensuring the transformation of toxic chemicals into different components (Piccolo and Spiteller, 2003; Anonymous, 2020c).

The mechanism of action of humic substances; change the physical properties of the soil and increase its water holding capacity; affect the cation exchange capacity and buffering properties and nutrient availability of the soil; encourage the transformation of numerous elements into forms that plants can use; increase the permeability of plant membranes. Humic substances also stimulate the growth of various beneficial microorganism groups; encourage the root systems of plants to further development and cell division and expansion; increase enzyme (complex proteins that can accelerate the rate of chemical reactions) and hormone systems (Anonymous, 2019a).

The effects of humic acid applications on the yield, grape characteristics and nutrient uptake of Ercis grape cultivar (*V. vinifera* L.) in Van province of Turkey were examined during two growing seasons in 2003-2004 (Cangi, et al, 2006). Solid form of humic acid (55 % humic acid, 30 % fulvic acid and 8 % K<sub>2</sub>O) were applied from soil in the amount of 100, 200, 300 kg ha<sup>-1</sup> and 10, 20, 30 kg ha<sup>-1</sup> from leaves. As a result, these researchers stated that SSC, total acid, N and Fe contents of leaves of grape vines were affected by humic acid application. In cool ecology such as Van province, increase in SSC by humic acid application will be contribute to ripening of grapes before autumn frost (Cangi, et al, 2006).

In a study conducted by Morard et al. (2011) on vineyards, it was observed that the taste of grape berries improved as a result of the humic acid applications they applied. In a study, the response of two grape varieties (Feteasca Regala and Riesling) by spraying three different concentrations of humic acid onto leaves was investigated in order to demonstrate sustainable viticulture practices to farmers. As a result of the research, it was observed that there was an increase in growth, yield and fruit quality in vines (Popescu and Popescu, 2018).

In a study in which cane steels belonging to the cv. Sultani Çekirdeksiz and Narince and cv. Erciș were used, in addition to determining the tolerance to salt, the biochemical contents and some physiological parameters were investigated in order to determine the protection mechanisms of the used Humic acid doses in the plant under stress conditions.

It has been observed that humic acid applications increase the resistance of the plant to salty soil conditions. When the treated plants and control plants were compared in terms of macro-microelements, it was observed that humic acid applications generally increased mineral substance intake, although the results differ according to the elements, application doses and plant parts (Ersayar, 2017).

### Protein hydrolysates and amino acids

These biostimulants are obtained from both plant and animal industrial products. Plants can directly use amino acids and peptides to increase their development and resistance to stressors (Watson and Fowden, 1975; Ertani et al., 2009).

Protein hydrolysates function as plant growth regulators thanks to the peptides they contain (Ryan et al., 2002). Protein hydrolysates help plants to uptake more Nitrogen by promoting Carbon and Nitrogen metabolism in plants (Külahtaş and Çokuysal, 2016). Protein hydrolysates have direct effects on plants as well as indirect effects. When these products are used, microbial activity becomes more active in soils (Du Jardin, 2015).

The amino acids found in biostimulants can be included in the protein structure in plants as well as non-protein amino acids. In some studies, it has been observed that non-protein amino acids such as glutamate, histidine, proline, glycine and betaine are applied externally and these amino acids protect the plants from abiotic stress factors or stimulate the metabolic signaling mechanisms in plants (Sharma and Dietz, 2006; Forde and Lea, 2007).

Polat (2006) conducted a study to determine the effects of biostimulants on growth of grapesapling in 2006 by employing two different biostimulants (Agrozym and Almina) at four different dosages (0, 5, 10, 20 g per pot) in one year old grape sapling planted in 10 liter of pots in 2006 vegetation period. It was found that biostimulants, overall, caused positive effects of plant growth. While both biostimulants did not lead to any changes at budding dates, the shoot length and weight, chlorophyll level, root length and weight increased to a great extent. While macro plant nutrient of levels (N, P, K, Ca, Mg, and S) did not change, the micro nutrients (Mn, Fe, Zn, Mo, and B) increased greatly (Polat, 2006).

Biostimulants containing amino acids are supportive of plants' resistance to oxidative conditions and defense mechanisms against abiotic stressors. Glycine betaine and proline are osmotic regulators that stabilize amino acids, enzymes and cell membranes under high salt concentrations and temperature conditions that disrupt plant growth (Ashraf and Foolad, 2007, Dos Reis et al., 2012, Ahmad et al., 2013). In addition to being effective in salt and drought stress in plants, proline also provides resistance to plants in heavy metal stress and regulates plant growth by removing reactive oxygen species (Sharma and Dietz, 2006).

In order to increase the quality of a vineyard with good growing conditions, the eco-physiological and productive characteristics of the vine in the cv. Sangiovese were investigated. As a result of the research, it was found that the application of these biostimulants provides a balance during phenolic maturity, preserves the sugar content of fruits and increases the anthocyanin and polyphenol contents (Salvi et al., 2015).

Two protein hydrolysates from soybean (soy) and casein (casein) were tested to trigger the resistance of grapevines against downy mildew (*Plasmopara viticola*) pathogen, which has the most destructive effect on European and North American vineyards. It was determined that the infected grapevine leaf surface was reduced by 76% and 63%, respectively, with the application of soy and casein in cv. Marselan. In general, although the effect of soybeans is more pronounced than casein hydrolysate, both hydrolysates increased immunity in grapes against pathogen attack (Lachhab et al., 2014).

### Seaweed extracts

The use of seaweed as organic matter and fertilizer goes back a long way in agriculture. However, the effects of biostimulant products in agriculture have just begun to be noticed. The fact that it contains polysaccharides, alginates, carrageenan and their by-products has enabled the use of seaweed in agriculture (Külahtaş and Çokuysal, 2016). In addition to the chelating properties of these extracts that



facilitate the intake of plant nutrients, they also positively affect the soil structure and aeration, and have a regulatory effect on plant growth and development (Milton, 1964).

Seaweed extracts are also considered as biostimulants because they improve important criteria such as seed germination, seed development, plant growth, yield, flower and fruit formation, resistance to biotic and abiotic stress factors, and post-harvest shelf life (Mancuso et al., 2006; Rayorath et al., 2008; Khan et al., 2009; Craigie, 2011).

In a study which is conducted in the vineyard, it was found that the root development increased as a result of the foliar application of seaweed extracts (Mancuso et al., 2006). This situation was associated with the increase in lateral root development and the increase in total root volume and length, with phytohormones such as auxin and cytokine found in seaweed extracts (Khan et al., 2011a, 2011b). At the same time, Kuwada et al. (1999) was concluded that root growth observed in plants in soils where moss extracts were applied positively affected microorganism activity in these soils.

The cv. Carménère grown in Chile has a serious impact on plant productivity due to its tendency to reproductive disorders. Since the cv. Carménère is an important variety for the region, the effect of seaweed extract, which is a plant growth regulator, on fertilization disorder has been investigated. In the research; some parameters such as the effect on fruit cluster and cluster characteristics, number and weight of fruits, cluster weight, grain size and distribution of clusters, and the physicochemical of grape must were measured. In the study, in addition to brown algae (*Ascophyllum nodosum*), boron ethanolamine and a lot of zinc oxide were given. The results showed that there was an increase in the number and weight of fruits per cluster in cv. Carménère. Therefore, it has been concluded that it is possible to improve reproductive disorders caused by excessive sun exposure by treating it with certain micro elements such as boron and zinc in addition to seaweed extract (Gutiérrez-Gamboa et al., 2018).

### **Chitin and chitosan biopolymers**

These components are used in food, cosmetics, medical and agricultural sectors. Chitin and chitosan biopolymers are mostly obtained from marine products and mushrooms. For physiological effects of chitin and chitosan in plants, The positive effects of their ionic structure on the protection effect of DNA, plasma membrane, cell wall, cell parts and stress factors and related activation of genes have been observed in some studies (Hadwiger, 2013; Katiyar et al., 2015).

The positive effects of chitosan, such as protection from fungal pathogens, resistance to abiotic stressors and increasing the fruit quality are increasing day by day. It has been determined that chitosan applications have effects such as stomata closure due to abscisic acid in plants and the development of defense mechanism of this component against environmental stressors (Iriti et al., 2009).

### **Inorganic compounds**

Inorganic compounds obtained from organic materials can also find use within the scope of sustainable agriculture. Inorganic compounds facilitate the growth and development of plants (Anonymous, 2019b). These components generally do not contain carbon, since they are inorganic, they are not synthesized in the living body but taken from the outside ready, they have a structure that can pass directly into the cell without being digested, and they mostly play regulatory roles in living things (Anonymous, 2020d).

Downy mildew disease in grapevines is one of the most important and destructive diseases in viticulture. Copper-based fungicides are used in organic vineyards to control disease. However, since 2006, the use of copper has been limited by a EU regulation. In the study, 112 different biostimulants and other methods, including biocontrol agents, were examined. Animal originated materials, homeopathic preparations, inorganic substances, microbial extracts, natural derivatives, plant extracts,

physical methods and synthetic materials were used in the study. While not as effective as copper for controlling downy mildew in organic vineyards, *Yucca schidigera* (a tree in the form of a bush) and *Salvia officinalis* (sage) extracts and *Trichoderma harzianum* (Biocontrol agent) could be cited as promising candidates. Potassium bicarbonate (Armicarb and Salukarb), which does not contain copper, was used as an inorganic substance in the study and it was found that it effectively reduced downy mildew infection in wine grapes. Armicarb, SaluKarb, Gro-stim, Kendal and Ulmasud were used among the inorganic substances. The purpose of this study is thought to help develop an integrated management program in which a less effective product is applied with copper to reduce the total amount of copper applied (Dagostin et al., 2011).

### Inoculants

Microbial inoculants used in agriculture are divided into two groups as bio-pesticides and biological fertilizers. Bio-pesticides are a kind of pesticide, that are obtained from many natural materials in the form of animals, plants, bacteria and various minerals and are based on the use of vectors (harmful) in plant protection. They are less harmful compounds than chemical pesticides. While these directly affect the target pest and closely resembling creatures; conventional pesticides affect a wider group, including birds, insects and mammals (Yarsan and Çevik, 2007). Biological fertilizers are agricultural inputs that contain live microorganisms and can be applied to seeds, different surfaces of plants and soil. The most common biological fertilizers may include beneficial bacteria (PGPR= Plant Growth Promoting Rhizobacteria) some fungi, or mycorrhizal fungi. Especially biological fertilizers are included in the biostimulant group (Vessey, 2003).

The beneficial microorganisms PGPR's work as biostimulants by assuming tasks such as symbiotic N fixation, making plant nutrients useful, siderophore production, facilitating Fe uptake and production of volatile organic compounds (Çakmaçi, 2005).

*Trichoderma* isolate is among the important microorganisms due to their capacity to control phytopathogenic fungi. Some *Trichoderma* isolates have a significant biostimulant effect. It can be used in both solid and liquid form. *Trichoderma* spp. has a positive effects such as phyto-stimulation mechanism, increasing root, branching and nutrient intake capacity, communication with root and shoot systems, connection with the rhizosphere, and significant increase in plant growth and yield have been observed in many studies (López-Bucio et al., 2015).

In a study, different doses of *Bacillus subtilis* PGPR isolates and *Trichoderma harzianum* were applied to investigate the effects on young plant development. As a result, it has been determined that *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* have positive effects on planting success and development of 2-year-old Syrah / 110R young plants (Korkutal et al., 2017a; Korkutal et al., 2017b).

In a study conducted in the field of vegetables, it was aimed to determine the combinations with different hybrid and standard tomato varieties and some PGPR bacteria and to examine the reactions of the best combinations under salt stress. In the first stage of the study, 3 hybrids and 3 standard tomatoes varieties were used as plant material. Eight bacterial species tested in previous studies were used as bacterial inoculum sources. It has been determined that PGPR isolates provide the positive effects on seedling development parameters in tomato plants under salt stress and facilitate the intake of nutrients such as K and Ca, which are important in nutrient content, especially in salt stress (Yilmaz, 2017).

In light of the work has been completed, the promotion of the use of particular viticulture area of PGPR isolate and widespread, without the need for inorganic plant nutrition and plant protection materials, it has been found to apply the most ideal form (Gazioglu Sensoy, et al., 2019).

Mycorrhizal fungi inoculates to the roots of many plants in the ecosystem through the spores existing in the soil. This situation increases the resistance of the plant to drought and some diseases. These fungi mycelium networks, known as the web of nature, can settle in the roots of plants as well as provide connections between plants that are far apart. They share nutrients with other plants, or they can release toxic chemicals to harm plants they do not like (Anonymous, 2019c).

In another study conducted in the vineyard, mycorrhiza and humic acid were applied to increase the quality characteristics of the seedlings in the production of grafted rooted tubular vine saplings. As a result of the application; The vegetative growth such as root number, root thickness, root length, shoot length, shoot thickness of seedlings, and the grafting success level have affected varying rates according to variety / rootstock combinations. As a result of the research, it has been determined that both humic acid and mycorrhiza applications significantly increase the seedling yield (Kavak, 2006). It seems that the effect of mycorrhiza applications in sustainable viticulture studies is promising.

Korkutal et al. (2020), use two different mycorrhiza cocktails (Symbion Vesicular Arbuscular Mycorrhiza, Shubhodaya Vesicular Arbuscular Mycorrhiza) were applied to the young grapevines four different methods (Control, Planting mixture, Root, Root + Planting mixture). Researchers were used cv. Alphonse Lavelleé and cv. Razakı as a plant material. The young grapevine performance, shoot, leaf and root characteristics were examined; leaf, shoot, and root mineral compounds were analyzed. As a result, it has been demonstrated that the most beneficial application to young grapevine in both cvs and both different mycorrhizal preparations is the application to the soil mixture.

### **Organic wastes**

Food waste or industrial waste streams, composts and compost extracts, fertilizers, vermicompost, waste water and sewage treatment have been included in the biostimulant group by some researchers (Yakhin et al., 2017). Agricultural wastes are divided into three groups:

1-Wastes remaining as a result of plant production; the vegetative mass that comes out as a result of the crop production in the cultivated land, forest, fallow land, fruit and vegetable cultivated areas and cannot be qualified as a product is considered as waste. Stem, straw, buck, bark, seed, pruning residues can be included in this group.

2-Wastes remaining as a result of animal production; it is the internal organs left over as a result of animal manure and slaughter. Animal manures are used as fuel (dung) and as fertilizer. It is possible to use wastes from internal organs as compost fertilizers.

3-Wastes resulting from the processing of agricultural products; they are the wastes generated as a result of the processes (grinding, sorting, drying etc.) of agricultural products before they are directly used.

These are unused wastes such as stalk, straw, shell and seed. Knowing the effects of post-processing wastes of these products on soil properties is necessary for a useful and appropriate recycling. The pulp obtained after processing is called biochar. The wastes arising from grape products are evaluated in different areas: grape (peel, seed and grape waste) were used as growing medium, silage additive, in poultry feed, dye (for food or fabric), feed additive, in the cosmetics industry, in aromatherapy, and pruning residues are used as fuel. (Bekar, 2016).

### **Exudate and extracts of seeds, leaves, shoots and roots**

This biostimulant group is obtained from the exudates of seeds, leaves and roots. For the most part, it is extracted from high plants such as *Amaryllidaceae* (daffodils), *Brassicaceae*, *Ericaceae* (terraceae), *Fabaceae* (legumes), *Fagaceae* (chestnuts), *Moringaceae*, *Plantaginaceae*, *Poaceae*, *Rosaceae*,

*Solanacea*, *Theaceae*, *Vitaceae* (Parrado et al., 2008; Pretorius, 2013). This biostimulant group gives positive results in the growth and development of the plant, its yield and quality, and in the fight against diseases, in sustainable viticulture (Parrado et al., 2008; Pretorius, 2013; Atıcı, 2016).

In a study investigating the possibility of using grape-shoot extracts as a biostimulant in viticulture, the extract obtained from the shoots of the same vine was applied to the cv. Airén leaves. In the resulting; it was determined that it positively affected the alcohol degree, pH, total acidity, volatile acidity, color density, variable aroma potential index, phenolic compounds and yield. These results are predicted to contribute to sustainable viticulture (Sánchez-Gómez et al., 2016).

## CONCLUSION

Sustainable agriculture is an extremely important concept in terms of creating a society that meets its own needs without endangering future generations. Conservation of our natural resources, especially soil and water, combating soil erosion and forest fires, ensuring biological diversity, integrated medicine management, using organic production models and appropriate cultivation techniques, is of great importance for sustainable living.

While the regular and effective use of organic materials from different origins has a positive effect on some physical and chemical properties of the soil; at the same time, it provides significant support for a sustainable agricultural production without harming human beings and nature. Productivity-oriented conventional agricultural activities, which are carried out without considering human, animal and environmental health, destroy our soil and water resources over the years, and inorganic preparations that are used extensively sometimes cause irreversible problems. However, the return of natural products and natural wastes to nature will not cause negative reactions in the ecosystem, but will provide significant increases in productivity and quality. In addition to some applications sensitive to human and environment, we also benefit from the substances we call biostimulants; it will provide great advantages in terms of clean food, clean environment and healthy life. With the use of these substances, human and environmental health is protected, while operating costs can be minimized in terms of agricultural inputs.

The use of biostimulants has an important place in sustainable agriculture and sustainable viticulture practices. The use of humic substances, amino acids and other nitrogenous compounds, seaweed and plant extracts, chitin and chitosan-like polymers, inorganic compounds, beneficial fungi and beneficial bacteria, organic wastes, seeds, leaves and root exudates and extracts, without harming the ecology and human health and abiotic problems. It also has positive effects on the growth levels and bioactive components of plants.

If the grape, which is both a fruit with high table value and an industrial product, is grown with sustainable methods at the growing stage, the product obtained will of course be more valuable. Considering that consumer tendencies change in a positive way and the level of consciousness increases day by day; sustainable viticulture will increase the marketability of grapes grown with clean agricultural practices in the consumption of products obtained from fresh, dried or must. Especially the grape that turns into wine, which is a product with high economic value all over the world, will reach a higher market share with the use of biostimulants.

## Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

## Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

## REFERENCES

- Ahmad R, Lim CJ, Kwon SY, 2013. Glycine betaine: a versatile compound with great potential for gene pyramiding to improve crop plant performance against environmental stresses. *Plant Biotechnol Report*, 7: 49-57.
- Anonymous, 2019a. <https://www.agbiologic.com/products/biological-biostimulants-101/> erişim tarihi: 22.07.2019.
- Anonymous, 2019b. <https://www.eokultv.com/inorganik-bilesenler/9399>. erişim tarihi: 10.12.2019.
- Anonymous, 2019c. <https://www.dunya.com/surdurulebilir-dunya/doganin-interneti-mantar-haberi-347891> erişim tarihi: 10.12.2019.
- Anonymous, 2020a. <http://apelasyon.com/Yazi/380-tarimda-surdurulebilirlik> erişim tarihi: 23.05.2020.
- Anonymous, 2020b. <https://www.sorhocam.com/etiket.asp?sid=3204&humik-maddeler/> erişim tarihi: 01.05.2020.
- Anonymous, 2020c. <https://insapedia.com/humik-madde-nedir-humik-asit-nedir/> erişim tarihi: 01.05.2020
- Anonymous, 2020d. <https://webders.net/478/canlilarin-yapisinda-bulunan-inorganik-bilesikler.html> erişim tarihi: 21.05.2020.
- Ashraf M, Foolad MR, 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2): 206–216.
- Bekar T 2016. Bağcılıkta atık teknolojisi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(1): 17-24.
- Bulgari R, Franzoni G, Ferrante A, 2019. Biostimulants application in horticultural crops under abiotic stress conditions. *Agronomy*, 9(6): 306.
- Cangi, R., Tarakcioglu, C., & Yasar, H. (2006). Effect of humic acid applications on yield, Fruit Characteristics and nutrient uptake in Ercis grape (*V. vinifera* L.) cultivar. *Asian Journal of Chemistry*, 18(2), 1493.
- Craigie JS, 2011. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of Applied Phycology*, 23(3): 371–393.
- Çakmaç R, 2005. Bitki Gelişimini Teşvik Eden Rizobakterilerin Tarımda Kullanımı. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 36 (1): 97-107, 2005 ISSN 1300-9036.
- Dagostin S, Schärer, HJ, Pertot I, Tamm L, 2011. Are there alternatives to copper for controlling grapevine downy mildew in organic viticulture?. *Crop Protection*, 30(7): 776-788.
- Dos Reis, SP, Lima AM, de Souza CRB, 2012. Recent molecular advances on downstream plant responses to abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7): 8628–8647.
- Du Jardin P, 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae* 196: 3–14.
- Du Jardin P, 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae (Amst.)*, 196: 3–1.
- Ersayar L, 2017. Tuz Stresi Altındaki Bazı Üzüm Çeşitlerine Ait Çeliklerde Hümik Asit Uygulamalarının Etkisi. Yüksek lisans tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Van.
- Ertani A, Cavani L, Pizzeghello D, 2009. Biostimulant activity of two protein hydrolyzates in the growth and nitrogen metabolism of maize seedlings. *Journal of plant nutrition and soil science*, 172(2): 237–244.
- Forde BG, Lea PJ, 2007. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *Journal of Experimental Botany*, 58(9): 2339–2358.
- Gazıoğlu Sensoy Rİ, Yılmaz Y, Bas EÖ, Akkopru A, 2019. Bitki Gelişimini Teşvik Eden Bakterilerin Sürdürülebilir Bağcılıkta Kullanım Olanakları. *ISPEC III. Uluslararası Tarım Hayvancılık ve Kırsal Kalkınma Kongresi*. 798-811.
- Gutiérrez-Gamboa G, Garde-Cerdán T, Souza-Da Costa B, Moreno-Simunovic Y, 2018. Strategies for the improvement of fruit set in *Vitis vinifera* L. cv. 'Carménère' through different foliar biostimulants in two different locations. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 33(2): 177-183.
- Hadwiger LA, 2013. Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid science or hype. *Plant Science*, 208, 42–49.
- Iriti M, Picchi V, Rossoni M, Gomasca Ludwig, N, Gargano M, Faoro F, 2009. Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. *Environmental and Experimental Botany*, 66(3): 493–500.
- Katiyar Hemantaranjan A, Singh B, 2015. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review *Indian Journal of Plant Physiology*, 20: 1–9.
- Kavak O, 2006. Aşılı Köklü ve Tüplü Asma Fidanı Üretiminde Fidan Kalite Özelliklerine Mikoriza ve Hümik Asit Uygulamalarının Etkileri (Doctoral dissertation, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).

- Khan W, Hiltz D, Critchley AT, Prithviraj B, 2011a. Bioassay to detect *Ascophyllum nodosum* extract-induced cytokinin-like activity in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Applied Phycology*, 23(3): 409–414.
- Khan W, Rayirath UP, Subramanian S, 2009. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal Plant Growth Regul* 28: 386–399.
- Khan ZH, Kahn MA, Aftab T, Idrees M, Naeem M. (2011b) Influence of alginate oligosaccharides on growth, yield and alkaloid production of opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Front Agriculture China* 5: 122–127.
- Korkutal I, Bahar E, Gunes N, 2017a. Different Doses Effects of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* on cv. Syrah: I. Young Plants Performance During Growing Period in Organic Viticulture. 2nd International Balkan Agriculture Congress, Congress Book: 650-657, 16-18 May 2017, Tekirdag.
- Korkutal I, Bahar E, Gunes N. 2017b. Different doses effects of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* on cv. Syrah II. Young plants properties in organic viticulture. 2 nd Int. Balkan Agr. Cong. pp. 658-667.
- Korkutal I, Bahar E, Teksoz Ozakin T, 2020. Applying Mycorrhizas by Different Methods on Grafted Rooted Vines (*Vitis vinifera* L.) Sapling Performance and Growth Characteristics. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 33(2): 149-157.
- Kuwada K, Ishii T, Matsushita I, Matsumoto I, Kadoya K, 1999. Effect of seaweed extracts on hyphal growth of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi and their infectivity on trifoliate orange roots. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 68: 321–326.
- Külahtaş B, Çokuysal B, 2016. Biyostimulantların Sınıflandırılması ve Türkiye’deki Durumu. *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 31(3), 185-200.
- Lachhab N, Sanzani SM, Adrian M, Chiltz , Balacey S, Boselli M, Poinssot B, 2014. Soybean and casein hydrolysates induce grapevine immune responses and resistance against *Plasmopara viticola*. *Frontiers in Plant Science*, 5, 716.
- López-Bucio J, Pelagio-Flores R, Herrera-Estrella A, 2015. *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia Horticulturae*, 196, 109-123.
- Lucini L, Roupheal Y, Cardarelli M, Canaguier R, Kumar P, Colla G, 2015. The effect of a plant-derived biostimulant on metabolic profiling and crop performance of lettuce grown under saline conditions. *Scientia Horticulturae*, 182: 124-133.
- Mancuso S, Azzarello E, Mugnai S, Briand X, 2006. Marine bioactive substances (IPA extract) improve foliar ion uptake and water stress tolerance in potted *Vitis vinifera* plants. *Advances in Horticultural Science*, 20: 156-161.
- Milton RF, 1964. Liquid seaweed as a fertilizer. In *Proc Int Seaweed Symp* (Vol. 4, pp. 428-431).
- Morard P, Eyheraguibel B, Morard M, Silvestre J, 2011. Direct effects of humiclike substance on growth, water, and mineral nutrition of various species. *Journal of Plant Nutrition*, 34(1): 46–59.
- Parrado J, Bautista J, Romero EJ, García-Martínez AM, Friaiza V, Tejada M, 2008. Production of A Carob Enzymatic Extract: Potential Use As A Biofertilizer. *Bioresource Technology*, 99(7): 2312-2318.
- Piccolo A, Spiteller M, 2003. Electrospray ionization mass spectrometry of terrestrial humic substances and their size fractions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377(6): 1047–1059.
- Polat, A. (2006). So4 anacı üzerine aşılı syrah asma fidanlarının büyüme ve gelişmesi üzerine biyoyarıcılarının etkileri/The effects of biostimulans on growth and development of syrah vine saplings grafted on so4 rootstock (Doctoral dissertation).
- Popescu GC, Popescu M, 2018. Yield, berry quality and physiological response of grapevine to foliar humic acid application. *Bragantia*, 77(2): 273-282.
- Povero G, Mejia JF, Di Tommaso D, Piaggese A, Warrior PA, 2016. Systematic Approach to Discover and Characterize Natural Plant Biostimulants. *Frontiers in Plant Science*, 7: 435.
- Pretorius JC, 2013. Extracts and compounds from “*Agapanthus africanus*” and their use as biological plant protecting agents. U.S. Patent No. 8,435,571. 7 May 2013.
- Rayorath P, Jithesh MN, Farid A, Khan W, Palanisamy R, Hankins SD, Critchley AT, Prithviraj B, 2008. Rapid bioassays to evaluate the plant growth promoting activity of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. using a model plant, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Journal of Applied Phycology*, 20(4): 423-429.
- Roupheal Colla G, 2018. Synergistic Biostimulatory Action: Designing the Next Generation of Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers Plant Science*, 9: 1655.

- Ryan MH, Norton RM, Kirkegaard JA, McCormick KM, Knights SE, Angus JF, 2002. Increasing mycorrhizal colonisation does not improve growth and nutrition of wheat on Vertosols in south-eastern Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*, 53(10): 1173-1181.
- Salvi L, Cataldo E, Secco S, Mattii GB, 2015, November. Use of natural biostimulants to improve the quality of grapevine production: first results. In II World Congress on the Use of Biostimulants in Agriculture 1148 (pp. 77-84).
- Sánchez-Gómez R, Zalacain A, Pardo F, Alonso GL, Salinas MR, 2016. An innovative use of vine-shoots residues and their “feedback” effect on wine quality. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37: 18-26.
- Sharma SS, Dietz KJ, 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, 57(4): 711-726.
- Traon D, Amat L, Zotz F, du Jardin PA, 2014. Legal Framework for Plant Biostimulants and Agronomic Fertiliser Additives in the EU; Report for the European Commission; Enterprise & Industry Directorate-General: Brussels, Belgium, p. 133.
- Turhan Ş, 2005. Tarımda sürdürülebilirlik ve organik tarım. *Tarım Ekonomisi Dergisi*, 11: (1 ve 2), 13-24.
- Ugolini L, Cinti S, Righetti L, Stefan A, Matteo R, D’Avino L, Lazzeri L, 2015. Production of an enzymatic protein hydrolyzate from defatted sunflower seed meal for potential application as a plant biostimulant. *Industrial Crops and Products*, 75: 15-23.
- Vessey JK, 2003. Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biofertilizers. *Plant Soil*, 255: 571–586.
- Watson R, Fowden L, 1975. The uptake of phenylalanine and tyrosine by seedling root tips. *Phytochemistry*, 14: 1181–1186.
- Yakhin IA, Ibragimov RI, Yakhin OI, Isaev RF, Vakhitov VA, 1998. The induced effect of biopreparation stifun on the accumulation of trypsin inhibitörs in potato tubers during storage. *Russian Agricultural Sciences*, 4: 12–13.
- Yakhin OI, Lubyayov AA., Yakhin IA, Brown PH, 2017. Biostimulants in plant science: a global perspective. *Frontiers in Plant Science*, 7: 2049.
- Yarsan E, Cevik A, (2007). Vektör mücadelesinde biyopestisitler. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 64(1): 61-70.
- Yasmeen A, Nouman W, Basra, SMA, Wahid A, Rehman H, Hussain N, Afzal I, 2014. Morphological and physiological response of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to natural and synthetic cytokinin sources: a comparative study. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(12): 3147-3155.
- Yilmaz, Y, 2017. Bitki Gelişimini Teşvik Eden Kök Bakterilerinin (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) Bazı Standart ve Hibrit Domates (*Solanum Lycopersicum* L.) Çeşitlerinde Tuz Stresindeki Etkilerinin Araştırılması. Yüksek lisans tezi (basılmamış), Y.Y.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.

**Atf İçin:** Bilici S, Demir S, Boyno G, 2021. Uçucu Yağ ve Arbusküler Mikorhizal Fungus'un Domates Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğü (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* Jarvis & Shoemaker) Hastalığına Etkileri. . İğdir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 857-868.

**To Cite:** Bilici S, Demir S, Boyno G, 2021. The Effects of Essential Oils and Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Decay Disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* Jarvis & Shoemaker) of Root and Root Collar of Tomato. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 857-868.

**Uçucu Yağ ve Arbusküler Mikorhizal Fungus'un Domates Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğü (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* Jarvis & Shoemaker) Hastalığına Etkileri**

Seda BİLİCİ<sup>1</sup> Semra DEMİR<sup>1\*</sup> Gökhan BOYNO<sup>1</sup>

**ÖZET:** Bu çalışmada, bazı Arbusküler Mikorhizal Fungus (AMF) türleri (*Rhizophagus intraradices* (Ri) ve *Funneliformis mosseae* (Fm)) ile bazı uçucu yağların (kekik, nane ve adaçayı), domatesteki önemli hastalıklar arasında yer alan *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Jarvis & Shoemaker) (FORL)'nin yol açtığı kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığı üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışmanın birinci aşamasında, *in-vitro* koşullarda üç farklı uçucu yağ ile bunların beş farklı dozu (25, 50, 75, 100 ve 150 µl L<sup>-1</sup>), FORL'ye karşı denenmiştir. Çalışma sonucunda patojenin miseliyal koloni gelişiminin sadece kekikten elde edilen uçucu yağın (KUY) tüm dozlarının %50.8-80.8 oranında engellediği; en iyi dozun ise 150 µl L<sup>-1</sup> doz olduğu saptanmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında *in-vivo* koşullarında yetiştirilen domates bitkilerine, AMF türleri ile 150 µl L<sup>-1</sup> dozundaki KUY uygulanmıştır. Uygulama gruplarının bitki gelişimine önemli bir etkileri olmamakla beraber, AMF kolonizasyon yoğunluklarına ve mikorizal bağımlılık kriterlerine göre en iyi uyumun Ri ile olduğu saptanmıştır. Çalışmanın üçüncü aşamasında Ri ile KUY'un 150 µl L<sup>-1</sup> doz uygulamasının, domates bitkisinde FORL'ye olan etkileri araştırılmıştır. Tüm uygulamalar kontrol grubuna göre hastalığı %28-55 oranlarında baskılamak, Ri+KUY+FORL kombinasyonunun patojene karşı en etkili grup olduğu, uygulama gruplarının bitkinin morfolojik gelişimine önemli katkı sağlamadığı gözlenmiştir. AMF kök kolonizasyon yoğunluğu açısından en yüksek değerler Ri ve Ri+KUY+FORL uygulama gruplarında sırasıyla, %43.89 ile %37.77 oranlarında olurken, AMF spor yoğunluklarında istatistik olarak önemli fark oluşmamıştır. Mikorizal bağımlılık ise sadece Ri+KUY uygulamasında tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan Ri ile KUY uygulamalarının patojeni engellemede önemli bir potansiyele sahip olduğu, ancak bitki gelişimine önemli katkı sağlamadığı belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Domates, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (Jarvis & Shoemaker), arbusküler mikorhizal fungus, uçucu yağlar

**The Effects of Essential Oils and Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Decay Disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* Jarvis & Shoemaker) of Root and Root Collar of Tomato**

**ABSTRACT:** In this study, the effects of some Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) species (*Rhizophagus intraradices* (Ri) and *Funneliformis mosseae* (Fm)) and some essential oils (thyme, mint and sage) on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (Jarvis & Shoemaker) (FORL) of root and root collar of tomato which are two of the important diseases were investigated. In the first stage of study three different essential oils and five different doses of oils (25, 50, 75, 100, 150 µl L<sup>-1</sup>) have been tested against FORL *in-vitro* conditions. As a result of the study, it was determined that all doses of essential oils obtained from thyme (KUY) prevented the development of micellar colonies of the pathogen by 50.8-80.8%; and the best dose was 150 µl L<sup>-1</sup>. In the second stage of the study, 150 µl L<sup>-1</sup> dose of KUY was applied to tomato plants grown under *in-vivo* conditions with AMF species. Although treatment groups did not have a significant effect on plant growth, according to AMF colonization densities and mycorrhizal dependence criteria, the best effect was found with Ri. In the third stage of the study, the effects of 150 µl L<sup>-1</sup> dose of KUY and Ri application on FORL in tomato plant were investigated. Ri+KUY+FORL combination was determined to be the most effective group against the pathogen. In addition, although all treatments suppressed the pathogen at a rate of 28-55%, they did not show significant effect on the morphological development of the plant. While the AMF root colonization density Ri and Ri+KUY+FORL treatment groups had the highest values at 43.89% and 37.77% respectively, there was no significant difference in spore density in the rhizosphere. Mycorrhizal dependence was detected only in Ri+KUY treatment. As a result, it was determined that Ri and KUY treatments have an important potential in preventing the pathogen, but they do not contribute significantly to plant growth.

**Keywords:** Tomato, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (Jarvis & Shoemaker), arbuscular mycorrhizal fungi, essential oils.

<sup>1</sup> Seda BİLİCİ (Orcid ID:0000-0001-6551-211X), Semra DEMİR (Orcid ID: 0000-0002-0177-7677), Gökhan BOYNO (Orcid ID: 0000-0003-3195-0749), Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Van, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Semra DEMİR, e-mail: semrademir@yyu.edu.tr

Bu çalışma Seda BİLİCİ'nin Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.



## GİRİŞ

Dünyada en çok üretilen, tüketilen ve ticareti yapılan domates (*Solanum lycopersicum* L.), renk, lezzet ve besin içeriği gibi özellikleri açısından önemli sebze ürünlerinin başında gelmektedir (Wang ve ark., 2010). Ayrıca, gıda sanayinde dondurulmuş, konserve, salça, ketçap, turşu gibi çok çeşitli kullanım alanlarına sahip olması; bünyesinde B6, B1, A ve C vitaminlerini içermesi gibi birçok özelliği nedeniyle insan beslenmesinde önemli rol oynamaktadır (Vural ve ark., 2000).

Domatesin dünyadaki toplam üretimi, yaklaşık 182 256 458 ton olup, 12 150 000 tonluk üretimi ile de Türkiye dünya çapında dördüncü sıradadır (FAO. 2020). Üretimi oldukça fazla olan bu üründe ise, hastalıkların salgın halde görülmesi kaçınılmazdır. Bu hastalıkların başında fungal patojenlerin neden olduğu hastalıklar gelmektedir (Kırbağ ve Turan, 2006; Song ve ark., 2011). Özellikle toprak kaynaklı patojenler arasında yer alan *Fusarium* türleri, domates yetiştiriciliği yapılan tüm alanlarda ciddi verim kayıplarına sebep olmaktadır (Attitalla ve ark., 2004; Bogale ve ark., 2007).

*Fusarium* türleri içinde domateste en yaygın görüleni *Fusarium oxysporum*'dur. Bu etmenin ise domatesi hastalandıran *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Snyder & Hans) (FOL), *Fusarium solgunluğuna* ve *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (Jarvis & Shoemaker) (FORL) ise kök ve kök boğazı çürümelerine sebep olan iki patojenik spesiyal form olarak belirlenmiştir (Castano ve ark., 2013; McGovern, 2015). FORL, bitkinin iletim borularında FOL'e göre daha az kahverengileşmeye sebep olmaktadır. Aynı zamanda kök boğazının 20-30 cm üzerinde kahverengi çizgilere yol açmaktadır. FORL'nin en tipik belirtisi ise çürümüş yan köklerin dip kısımlarındaki yuvarlak şekilde kahverengi lezyonlardır. Ayrıca bu fungus, ölü ve kuruyan bitkiler üzerindeki nekrotik gövde lezyonlarında beyaz-pembe renkli sporulasyon oluşturmaktadır (Can ve ark., 2003; Can ve ark., 2004).

*F. oxysporum*'un mikro-konidi, makro-konidi ve klamidospor olmak üzere üç tip aseksüel spor yapısı bulunmaktadır. FORL'nin yayılmasında ve hayatta kalmasında mikro-konidiler ve klamidospor yapıları oldukça etkilidir. Mikro-konidiler, çok bol miktarda oluşmakta ve çoğunlukla hava, toprak ve su hareketleri ile yayılmaktadır. Bu yayılım tekrarlı enfeksiyonlara sebebiyet vermekte ve %90'a varan ürün kayıplarına neden olmaktadır (Hajlaoui ve ark., 2001; Hibar, 2002; Çolak ve Biçici, 2011). Klamidosporlar ise kalın duvarlara sahip olup, fungusun toprakta uzun yıllar canlı kalmasını sağlamaktadır (Ozbay ve ark., 2002).

*Fusarium* türlerinin neden olduğu solgunluk ve kök çürüklüğü hastalıklarına karşı mücadele, çoğunlukla dayanıklı çeşit kullanımı ile kültürel yöntemler ve kimyasal mücadele programları şeklinde uygulanmaktadır (Aydın, 2019). Ancak hastalığa neden olan etmenin saprofitik yaşama özelliği ve dayanıklı çeşitlerin sınırlı sayıda geliştirilmesi nedeniyle kültürel yöntemler yetersiz kalmaktadır (Landa ve ark., 2004; Jiménez-Díaz ve ark., 2015). Bununla beraber, FORL'ye karşı uygun dayanıklılığa sahip ticari olarak kesin kabul edilebilir çeşitler henüz geliştirilmemiştir (Çolak ve Biçici, 2011). Bu nedenlerden dolayı üreticiler kimyasal mücadeleye başvurumaktadırlar. Kullanılan bu kimyasallar ise, insan sağlığına olan tehdidinin yanı sıra; su kaynaklarına ve toprağa bulaşarak, hedef dışı organizmalara zarar vermekte, kalıntılar ve kalıcı bileşikler nedeniyle biyolojik sistemlere ve çevreye büyük problemler oluşturmaktadır (Yıldız ve ark., 2005). Buna ek olarak, toksisite ve patojenlerin direnç problemlerini de beraberinde getirmektedir (Saito ve ark., 2016). Bu çerçevede, farklı mücadele yöntemleri son zamanlarda kimyasal mücadeleye alternatif yaklaşımlar içinde önemli bir potansiyele sahip olduğu görülmektedir. Bu yöntemlerin başında ise biyolojik mücadele çalışmaları yer almaktadır.

Hastalıklarla mücadelenin ileri bir adımı olarak biyolojik mücadele düşünülebilir (Aydın, 2015; 2019). Bu bağlamda kullanılan biyolojik kontrol ajanları (BKA)'nın bitki kök bölgesine kolonize olmaları teşvik edilerek, bir savunma hattı oluşturmak suretiyle, bitkilerin hastalanması

engellenmektedir (Benítez ve ark., 2004). Özellikle de bitkileri bazı kök hastalıklarına karşı korumada, bitki gelişimini artırmada ve çeşitli stres faktörlerine karşı bitkiyi dirençli hale getirmede oldukça etkili simbiyotlar olarak kabul edilen Arbusküler Mikorhizal Funguslar (AMF) önemli bir yere sahiptir (Smith ve Smith, 2012; Demir ve ark., 2015). Bu kapsamda AMF'nin domates patojeni olan *F. oxysporum*'un mikrokonidial çimlenmesini etkilediği (Scheffknecht ve ark., 2007), aynı zamanda bu hastalığa karşı bitkinin direncini ve biyo-kütlesini de arttırdığı rapor edilmiştir (Wang ve ark., 2020).

Son zamanlarda hastalık etmenleriyle mücadelede, doğal yapıda birçok koruyucu ajanlar kullanılmaktadır. Özellikle bitkilerden elde edilen uçucu yağlar, doğal nitelikte olmaları ile beraber, insan sağlığını ve doğayı tehdit etmemeleri nedeniyle sentetik pestisitlere alternatif olarak kullanılabilir. Özellikle bitkilerden elde edilen uçucu yağlar, doğal nitelikte olmaları ile beraber, insan sağlığını ve doğayı tehdit etmemeleri nedeniyle sentetik pestisitlere alternatif olarak kullanılabilir. Özellikle bitkilerden elde edilen uçucu yağlar, doğal nitelikte olmaları ile beraber, insan sağlığını ve doğayı tehdit etmemeleri nedeniyle sentetik pestisitlere alternatif olarak kullanılabilir. Özellikle bitkilerden elde edilen uçucu yağlar, doğal nitelikte olmaları ile beraber, insan sağlığını ve doğayı tehdit etmemeleri nedeniyle sentetik pestisitlere alternatif olarak kullanılabilir.

Kök ve kök boğazı çürümesine sebep olan hastalığın, hem uçucu yağların hem de AMF ile kontrolüne yönelik araştırmaların sınırlı sayıda olduğu; bunların kombinasyonları ile yapılan araştırmalara yönelik literatüre ise rastlanmadığı görülmektedir. Bu çalışmada, domates tarımında önemli verim kayıplarına neden olan, kök ve kök boğazı çürümesine sebebiyet veren hastalık etmeni FORL'ye karşı AMF ile uçucu yağların biyolojik kontrol/doğal koruyucu ajanları olarak potansiyellerinin ve bitki gelişimlerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Çalışma Materyalleri

Test bitkisi olarak yaygın bir şekilde yetiştiriciliği yapılan ve *Fusarium* solgunluğuna duyarlı olduğu bilinen Fla. 7781 nolu domates çeşidi kullanılmıştır. AMF izolatları olarak, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Mikoloji laboratuvarı stoklarında bulunan *Rhizophagus intraradices* (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßler ve *Funneliformis mosseae* (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler izolatları kullanılmıştır. Patojen izolat olarak ise, Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü (BATEM)'den temin edilen *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL) izolatı kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan kekik, nane ve adaçayı uçucu yağları ise ticari olarak temin edilmiştir.

### Uygun AMF ile Uçucu Yağ ve Dozunun Belirlenmesi

Çalışmada uygun AMF ile uçucu yağ kombinasyonlarının ve uçucu yağın uygulama dozunun belirlenmesi için hem *in-vitro* hem de *in-vivo*'da testler yapılmıştır.

*In-vitro* testlerde, sterilize edilmiş PDA ortamları su banyosunda 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra kekik, nane ve adaçayı uçucu yağları 25, 50, 75, 100 ve 150 µl L<sup>-1</sup> konsantrasyonlarında olacak şekilde ilave edilerek steril petrilere aktarılmıştır. Daha sonra katılan bu ortamlara ise bir haftalık FORL kültüründen 5 mm çapında diskler alınıp ekimi yapılarak, 27°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 3., 4., 5. ve 6. günlerinde petrilere gelişen fungusun miseliyal koloni çapları dijital kumpas kullanılarak birbirine dik yönlerde ölçülmüştür. Denemeler üç tekerrürlü ve her tekerrürde üç tekrar olacak şekilde yürütülmüştür. Bu test sonucunda en iyi uçucu yağ ve dozu belirlenerek *in-vivo* testine geçilmiştir.

*In-vivo* testi, 24±2°C sıcaklık, % 50-60 nem, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlanan iklim odasında yürütülmüş olup, 2:1 oranında torf:perlit doldurulmuş 16x18 cm boyutunda saksılar hazırlanmıştır. Hazırlanan bu saksıların tohum yatağına her bir AMF türünden 2.5 g'lık inokulum (yaklaşık 25-40 spor g<sup>-1</sup> toprak inokulum yoğunluğu) koyularak, yüzey sterilizasyonu yapılmış

domates tohumları ekilmiştir. Domates fidelerinin ilk çıkışlarından 6 hafta sonra *in-vitro* testinde başarılı bulunan uçucu yağ, belirlenen uygun dozda topraktan uygulanmıştır. Çalışma 3 tekerrürlü yürütülmüş olup, 10 haftalık gelişim periyodunu tamamlayan bitkiler hasat edilerek, morfolojik parametrelerine, AMF kök kolonizasyonu, rizosfer bölgesinde AMF spor yoğunluğu ve mikorhizal bağımlılığa bakılmıştır.

### Bitki morfolojik parametrelerinin belirlenmesi

Hasat edilen bitkilerin sürgün yaş/kuru ağırlığı, kök yaş/kuru ağırlığı, sürgün/kök boyları ve sürgün çapı değerlendirilmiştir. Bu amaçla kök boğazından kesilen bitkilerin üst kısımları doğrudan tartılmış, kökler ise musluk suyu yardımı ile yetiştirme ortamı materyallerinden arındırıldıktan sonra tartılmıştır, bu yolla yaş ağırlıklar elde edilmiştir. Tartılan materyaller 70°C'de 48 saat kurutulmuş kuru ağırlıklar tespit edilmiştir. Sürgün ve kök boy ölçümleri bir cetvel ile, sürgün çapı ise dijital kumpas yardımıyla ölçülerek belirlenmiştir.

### AMF kök kolonizasyonu, rizosfer bölgesinde AMF spor yoğunluğu ve mikorizal bağımlılığın belirlenmesi

Bitki kökleri temizlenip, % 0.05'lik Laktofenol mavisi katılarak hazırlanan boya çözeltisi ile boyanmıştır (Phillips ve Hayman, 1970). Daha sonra AMF kök kolonizasyonunun belirlenmesi için ışık mikroskobu altında mikorizal fungus yapıları gözlenmiştir. Ayrıca kök kolonizasyonu Grid-Line Intersect yöntemi ile ölçülerek, yüzde (%) olarak hesaplanmıştır (Giovannetti ve Mosse, 1980). AMF'li bitkilerin rizosfer bölgesindeki topraklarda AMF spor yoğunlukları ise ıslak eleme yöntemi ile 1 g topraktaki sporlar sayılarak belirlenmiştir (Gerdemann ve Nicholson, 1963) Daha sonra bitkilerdeki AMF'nin etkinliğini belirlemek amacıyla mikorhizal bağımlılığa bakılmıştır. Mikorhizal bağımlılık (MB), bitkilerin 10 haftalık gelişiminden sonra kuru ağırlıkları tartılıp, 1 no'lu Eşitlik kullanılarak belirlenmiştir (Declerck ve ark., 1995).

$$MB (\%) = [(A - B) \div A] \times 100 \quad (1),$$

Eşitlikte:

A; AMF (+) bitkinin toplam kuru ağırlığı,

B; AMF (-) bitkinin toplam kuru ağırlığı ifade etmektedir.

Elde edilen veriler sonucunda en iyi uyumu gösteren AMF x uçucu yağ kombinasyonu belirlenerek daha sonraki testlerde kullanılmıştır.

### Seçilen AMF ve Uçucu Yağın FORL'ye Etkisi

*In-vitro* ve *in-vivo* testler sonucuna göre en iyi uyum gösteren AMF x uçucu yağ kombinasyonunun ve bunların tekli uygulamaları *in-vivo*'da FORL inokule edilen bitkiler üzerinde etkilerine bakılmıştır. Yukarıda bahsedildiği gibi domates tohumları AMF (+) ve AMF (-) olacak şekilde 3 tekerrür olarak ekimleri yapılmıştır. İlk fide çıkışlardan 6 hafta sonra uçucu yağ ile birlikte,  $1 \times 10^6$  konidi  $ml^{-1}$  yoğunluğunda patojen süspansiyonu 5 mL bitki<sup>-1</sup> olacak şekilde topraktan içirme yöntemi ile bitkilere uygulanmıştır. Patojen inokulasyonundan 4 hafta sonra hastalık şiddeti 0 – 5 skalası (0: belirti yok, 1: Kökte hafif renk değişikliği (toplam alanın % 10'undan daha az), 2: Koyu renkli leke ve lezyonlar kökün 1/4'üne yayılmış, 3: Enfeksiyon toplam kök alanının yarısını kaplamış, ana kökte bariz renk değişikliği, 4: Enfeksiyon kökün 3/4'ünü kaplamış, kök boğazında lezyonlar, yapraklarda solgunluk 5: Enfeksiyon kökün tümüne yayılmış, genç yapraklarda sararma ve ölüm) ile değerlendirilmiştir. Elde edilen değerler hastalık şiddeti (DI) formülü (Eşitlik 2) yardımı ile yüzde hastalık şiddetine dönüştürülmüştür.

$$DI (\%) = [\sum(SD \times BS) \div (ESD \times TB)] \times 100 \quad (2),$$

Eşitlikte;

SD; Skala değeri

BS; Aynı skala değerindeki bitki sayısı

ESD; En yüksek skala değeri,

TB; Toplam bitki sayısını ifade etmektedir.

Hastalık şiddeti yüzdeleri baz alınarak uygulama gruplarının hastalığı baskılama oranları (BO) Eşitlik 3'te gösterilen formül ile hesaplanmıştır.

$$BO (\%) = [(Dik - DI) \div Dik] \times 100 \quad (3),$$

Eşitlikte;

Dik; Kontrol grubunun hastalık şiddeti değerini temsil etmektedir.

Daha sonra bitkiler hasat edilerek yukarda da belirtildiği gibi, bitkinin morfolojik parametrelerine, AMF kök ve rizosfer bölgesinde ki kolonizasyon yoğunlukları ile mikorhizal bağımlılığa bakılmıştır.

### İstatistik Analizler

Çalışma tesadüf parselleri deneme desenine göre dizayn edilmiştir. Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SAS paket programı kullanılarak, Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ve T testi (ikili karşılaştırmalarda) uygulanmıştır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Uygun AMF ile Uçucu Yağ ve Dozunun Belirlenmesi

En uygun uçucu yağın belirlenmesine yönelik *in-vitro* testinde, uygulamaların patojen üzerindeki etkileri (Çizelge 1) istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). Bu çerçevede, kontrole göre nane ve adaçayından elde edilen uçucu yağların herhangi bir dozu, fungusun miseliyal koloni gelişimine etki etmediği belirlenirken, kekikten elde edilen uçucu yağın tüm dozları bu gelişimi azaltmıştır (Çizelge 1). Boyraz ve Koçak (2006) tarafından yapılan bir çalışmada da farklı bitkilerden elde ettiği uçucu yağların patojenlere karşı etkilerinin farklı olduğu belirtilmiştir. Uçucu yağların patojenlere olan etkilerinin farklılık göstermesinin en büyük nedeninin, yapılarında bulunan bileşiklerin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir (Romagnoli ve ark., 2005). Bu çalışmada kekik uçucu yağın en yüksek dozunun ( $150 \mu\text{l L}^{-1}$ ), %84.8 oranında patojenin koloni gelişimini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Çizelge 1). Benzer çalışmalarda da kekikten elde edilen uçucu yağın birçok patojenin gelişimini engellediği bildirilmiştir (Boyraz ve Koçak, 2006; Uçar ve ark., 2015). Bunun nedeni ise, bu uçucu yağda ana bileşen olarak öne çıkan “carvacrol” ün antibakteriyel, antifungal, antihelmintik, insektisidal, analjezik ve antioksidan etkisinin olmasıdır (Baytop, 1999). Nitekim Bozhüyük ve ark. (2015) kekik uçucu yağının *in-vitro* koşullarda bazı fungal patojenlere (*Fusarium equiseti*, *Botrytis* sp., *Phytophthora capsici*, *Nigrospora oryzae*, ve *Rhizoctonia solani*) karşı antifungal etkisinin olduğunu belirtmişlerdir.

*In-vitro* testi sonucunda, engelleme oranı en yüksek olan kekik uçucu yağı (KUY) ve bunun  $150 \mu\text{l L}^{-1}$  dozu sonraki testlerde kullanılmak üzere seçilmiştir. Seçilen KUY ve dozunun AMF türleri (*R. intraradices* ve *F. mosseae*) içinde en iyi uyumu belirlemek üzere *in-vivo* testine geçilmiştir. Bu kapsamda, uygulama gruplarının bitki gelişim parametreleri üzerinde etkileri (Çizelge 2) istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ( $P < 0.05$ ). Ancak bu uygulamaların AMF kök kolonizasyon yoğunluğu (%) ve rizosfer bölgesindeki spor yoğunluğu (spor  $\text{g}^{-1}$  toprak) üzerinde etkileri ise (Çizelge 3) önemli bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). Elde edilen veriler KUY'a göre karşılaştırıldığında bitkinin morfolojik gelişimine, AMF türlerinin (*R. intraradices* ve *F. mosseae*) KUY ile kombinasyonlarının etki etmediği belirlenmiştir. Nitekim bazı uçucu yağların AMF ile uygulandığında, AMF'nin bitkiyle simbiyosis

oluşumunu olumsuz etkilediği ve bu olumsuzluğun bitki gelişimine de yansıdığı düşünülmektedir (Stamou ve ark., 2017). Bu bağlamda Chaudhary ve ark. (2008), uçucu yağ+AMF uygulamalarının AMF kolonizasyon yoğunluğunda artış göstermesine rağmen, bitkinin sürgün biyo-kütlesinde önemli bir etkisinin olmadığı tespit etmiştir.

**Çizelge 1.** Kekik, nane ve adaçayı uçucu yağlarının farklı dozlarının *in vitro*'da FORL'nin miseliyal gelişimine etkileri

| Uygulamalar | Uygulama Dozları ( $\mu\text{l L}^{-1}$ ) | Koloni Çapı (mm)*     | Yüzde Etki (%)** |
|-------------|---|-----------------------|------------------|
| Kekik       | 0   | 1.18 <sup>ba***</sup> |                  |
|             | 25  | 0.58 <sup>c</sup>     | 50.8             |
|             | 50  | 0.58 <sup>c</sup>     | 50.8             |
|             | 75  | 0.51 <sup>dc</sup>    | 56.7             |
|             | 100                                       | 0.41 <sup>d</sup>     | 65.2             |
|             | 150                                       | 0.18 <sup>e</sup>     | 84.8             |
| Nane        | 25  | 1.22 <sup>ba</sup>    | -                |
|             | 50  | 1.26 <sup>ba</sup>    | -                |
|             | 75  | 1.33 <sup>a</sup>     | -                |
|             | 100                                       | 1.24 <sup>ba</sup>    | -                |
|             | 150                                       | 1.30 <sup>ba</sup>    | -                |
|             | 25  | 1.18 <sup>ba</sup>    | -                |
| Adaçayı     | 50  | 1.31 <sup>ba</sup>    | -                |
|             | 75  | 1.18 <sup>ba</sup>    | -                |
|             | 100                                       | 1.18 <sup>ba</sup>    | -                |
|             | 150                                       | 1.18 <sup>ba</sup>    | -                |

\*: İnkübasyondan 3., 4., 5. ve 6. günlerinde petrielerde gelişen fungusların miseliyal koloni çapları ölçülüp, ortalamaları alınarak hesaplanmıştır,

\*\* : Kontrolle göre hesaplanmış olup, -; fungusun miseliyal koloni gelişimini etkilemediğini gösterir,

\*\*\*: Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütündeki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir ( $p < 0.05$ )

**Çizelge 2.** AMF ve KUY uygulamalarının domateste bitki gelişim parametrelerine etkileri

| Uygulamalar | SB* (cm)             | KB (cm)            | SÇ (mm)           | SYA (g)            | KYA (g)            | SKA (g)           | KKA(g)            |
|-------------|----------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| KUY         | 48.80 <sup>a**</sup> | 18.62 <sup>a</sup> | 5.58 <sup>a</sup> | 28.55 <sup>a</sup> | 12.12 <sup>a</sup> | 3.20 <sup>a</sup> | 0.60 <sup>a</sup> |
| Ri+KUY      | 44.26 <sup>a</sup>   | 19.82 <sup>a</sup> | 5.73 <sup>a</sup> | 28.70 <sup>a</sup> | 12.22 <sup>a</sup> | 3.30 <sup>a</sup> | 0.63 <sup>a</sup> |
| Fm +KUY     | 46.16 <sup>a</sup>   | 17.40 <sup>a</sup> | 5.65 <sup>a</sup> | 28.22 <sup>a</sup> | 12.06 <sup>a</sup> | 3.10 <sup>a</sup> | 0.59 <sup>a</sup> |

\*: SB: Sürgün boyu, KB: Kök boyu, SÇ: Sürgün çapı, SYA: Sürgün yaş ağırlığı, KYA: Kök yaş ağırlığı, SKA: Sürgün kuru ağırlığı, KKA: Kök kuru ağırlığı,

\*\* : Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütündeki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir ( $p < 0.05$ )

Ri+KUY kombinasyonun AMF kök kolonizasyon yoğunluğunda (%42.16) ve rizosfer bölgesindeki spor yoğunluğunda (31 spor  $\text{g}^{-1}$  toprak) Fm+KUY kombinasyonuna göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (Çizelge 3). Kekik türlerinin AMF kolonizasyon yoğunluğunu arttırdığı tespit edilmekle beraber (Karagiannidis ve ark., 2012), kekikten elde edilen uçucu yağın AMF üzerindeki etkisinin tam olarak ortaya koyan bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak naneden elde edilen uçucu yağın *R. intraradices*'in kök kolonizasyon yoğunluğuna önemli bir etkisinin olmadığını rapor edilirken (Stamou ve ark., 2017), *Artemisia annua* bitkisinden elde edilen uçucu yağların ise, *G. macrocarpum* ve *G. fasciculatum*'un kök kolonizasyon yoğunluğunu arttırdığı belirlenmiştir (Chaudhary ve ark., 2008). Mikorizal bağımlılıkta ise, bitkinin biyo-kütlesine göre paralellik gösterdiği bilinmektedir (Declerck ve ark., 1995). Bu nedenle, Ri+KUY kombinasyonunun istatistiksel fark olmamakla beraber bitki biyo-kütlesini arttırdığı ve dolayısıyla düşüğe olsa mikorizal bağımlılık oluşturduğu (+ (%3.3)); Fm+KUY kombinasyonu ise bitki biyo-kütlesine etkisinin olmadığı ve dolayısıyla mikorizal bağımlılık

oluşturmadığı (- (%2.9)) tespit edilmiştir (Çizelge 3). Bu sonuçlar baz alınarak Ri+KUY kombinasyonu en iyi uyumu gösterdiği belirlenmiş olup, sonraki çalışmalarda bu kombinasyon ve bunların tekli uygulamaları kullanılmıştır.

**Çizelge 3.** AMF ve KUY uygulamalarının domateste AMF kök kolonizasyonu, rizosfer spor yoğunluğu ve mikorhizal bağımlılığa etkileri

| Uygulamalar | AKK* (%)             | RSY (spor g <sup>-1</sup> toprak) | MB (%)     |
|-------------|----------------------|-----------------------------------|------------|
| Ri+KUY      | 42.16 <sup>a**</sup> | 31 <sup>a</sup>                   | +*** (3.3) |
| Fm +KUY     | 26.50 <sup>b</sup>   | 20 <sup>b</sup>                   | - (2.9)    |

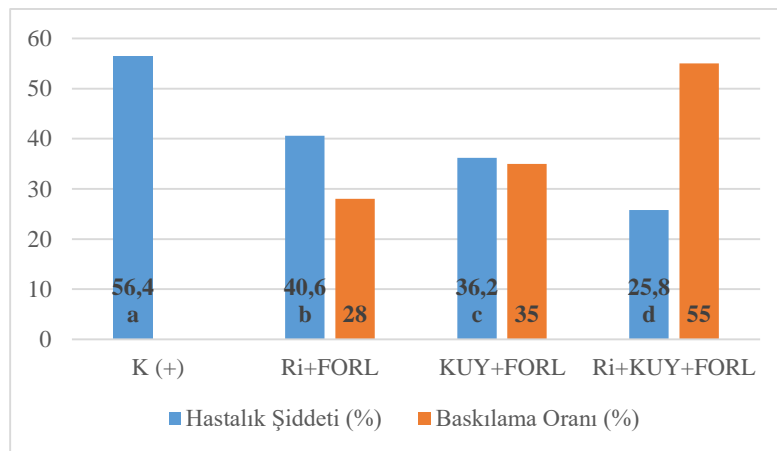
\*: AKK: AMF Kök Kolonizasyonu, RSY: Rizosfer Bölgesinde AMF Spor Yoğunluğu, MB: Mikorizal bağımlılık

\*\* : T testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark P< 0.05'e göre önemsizdir,

\*\*\*: +; Mikorizal bağımlılık var, -; Mikorizal bağımlılık yok

### R. intraradices ve KUY Uygulamalarının FORL'ye Etkisi

*In-vitro* ve *in-vivo* testler sonucunda belirlenen Ri+KUY kombinasyonu ve bunların tekli uygulamaları hastalık şiddeti üzerinde etkileri (Şekil 1) istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0.05). Pozitif kontrol (K (+)) uygulamasında hastalık şiddeti %56.40 oranında tespit edilirken, Ri+FORL ve KUY+FORL uygulamalarının ise sırasıyla %40.60 ve %36.18 oranları ile önemli derecede hastalık şiddetini düşürdüğü belirlenmiştir. Özellikle bu uygulamaların bir arada kullanılması ile yapılan kombinasyonun (Ri+KUY+FORL) hastalık şiddetini en aza indirdiği saptanmıştır (%25.84). Baskılama oranlarına bakıldığında ise tüm uygulamaların %28-55 aralığında hastalığı baskıladığı tespit edilmiştir. Patojene karşı bu etkilerin, konukçu bitkinin biyolojik kontrol ve/veya doğal koruyucu ajanlarını tanıma sürecinde bazı savunma mekanizmalarını aktif hale getirip, enzim ve hormon aktivitelerini arttırdığı ve bu süreçte aktivasyonların en yüksek seviyeye ulaştığı bilinmektedir (Morandi, 1996; Azcón-Aguilar ve Barea, 1997). Bu aktivasyonun etkisi ve mekanizmaları tam olarak ortaya konulmamakla birlikte; hızlı ve lokalize olmuş bir şekilde biyokimyasal savunma mekanizmaları neticesinde ortaya çıkan lignifikasyon, hidroksiprolin ve hipersensitif reaksiyonlarla zenginleştirilmiş hücre duvarının oluşması ile aktive edilmiş fiziksel bariyerler ve antifungal enzimlerin üretilmesi gibi, mekanizmaların etkili olduğu belirtilmektedir (Demir, 2005). Bu kapsamda Wang ve ark. (2020) AMF uygulamasının, Nguéack ve ark. (2009) ise bahçe kekiğinden elde edilen uçucu yağ uygulamasının bu mekanizmaları kullanarak bazı fungal patojenlere karşı etkili olduğunu belirtmişlerdir.



**Şekil 1.** R. intraradices ve KUY uygulamalarının domateste FORL'nin hastalık şiddetine etkileri ve hastalığa karşı baskılama oranları.

Ri+KUY kombinasyonu ve bunların tekli uygulamaları patojeni baskıladığı görülürken (Şekil 1), bitki gelişimine istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ) (Çizelge 4). Nitekim aynı bitki türünün farklı çeşitlerinin mikorhizal yaşama tepkileri birbirinden farklı olabilmektedir (Linderman ve Davis, 2004; Şensoy ve ark., 2007). Ayrıca uçucu yağların antifungal etkilerinden dolayı, AMF'nin bitkiyle tam simbiyosis oluşturamaması ve bitki gelişimini teşvik etmesi noktasında olumsuz etkilerinin olması muhtemeldir (Stamou ve ark., 2017). Bunun dışında bazı uçucu yağlarda bulunan kimyasal bileşikler bitkilerde; hücre yıkımına, fotosentez için gerekli pigmentlerin oluşumuna ve amino asit sentezine engel olabilmektedir (Arminante ve ark., 2006; Yazlık, 2014). Uçucu yağların bu özellikleri dikkate alındığında birçok kültür bitkisinin morfolojik gelişimini etkilemediği ya da olumsuz etkisinin olduğu söylenebilir (Yazlık ve Üremiş, 2017).

**Çizelge 4.** *R. intraradices* ve KUY uygulamalarının FORL ile inokule edilmiş domates bitkilerinin morfolojik gelişim parametrelerine etkisi

| Uygulamalar | SB* (cm)             | KB (cm)            | SÇ (mm)           | SYA (g)            | KYA (g)            | SKA (g)           | KKA (g)           |
|-------------|----------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| K (-)       | 46.50 <sup>a**</sup> | 13.76 <sup>a</sup> | 5.55 <sup>a</sup> | 28.10 <sup>a</sup> | 11.40 <sup>a</sup> | 3.56 <sup>a</sup> | 0.46 <sup>a</sup> |
| K (+)       | 44.56 <sup>a</sup>   | 13.53 <sup>a</sup> | 4.50 <sup>a</sup> | 27.30 <sup>a</sup> | 12.66 <sup>a</sup> | 3.53 <sup>a</sup> | 0.65 <sup>a</sup> |
| Ri          | 45.33 <sup>a</sup>   | 13.33 <sup>a</sup> | 4.80 <sup>a</sup> | 30.20 <sup>a</sup> | 13.50 <sup>a</sup> | 3.03 <sup>a</sup> | 0.64 <sup>a</sup> |
| KUY         | 46.43 <sup>a</sup>   | 12.40 <sup>a</sup> | 4.06 <sup>a</sup> | 27.10 <sup>a</sup> | 10.80 <sup>a</sup> | 3.53 <sup>a</sup> | 0.50 <sup>a</sup> |
| Ri+KUY      | 48.06 <sup>a</sup>   | 12.50 <sup>a</sup> | 3.93 <sup>a</sup> | 26.60 <sup>a</sup> | 13.20 <sup>a</sup> | 3.60 <sup>a</sup> | 0.62 <sup>a</sup> |
| Ri+FORL     | 45.80 <sup>a</sup>   | 13.60 <sup>a</sup> | 4.76 <sup>a</sup> | 27.20 <sup>a</sup> | 14.20 <sup>a</sup> | 2.96 <sup>a</sup> | 0.66 <sup>a</sup> |
| KUY+FORL    | 47.10 <sup>a</sup>   | 13.70 <sup>a</sup> | 4.46 <sup>a</sup> | 27.30 <sup>a</sup> | 13.26 <sup>a</sup> | 3.30 <sup>a</sup> | 0.55 <sup>a</sup> |
| Ri+KUY+FORL | 50.80 <sup>a</sup>   | 13.43 <sup>a</sup> | 4.83 <sup>a</sup> | 27.60 <sup>a</sup> | 11.56 <sup>a</sup> | 3.20 <sup>a</sup> | 0.63 <sup>a</sup> |

\*: SB: Sürgün boyu, KB: Kök boyu, SÇ: Sürgün çapı, SYA: Sürgün yaş ağırlığı, KYA: Kök yaş ağırlığı, SKA: Sürgün kuru ağırlığı, KKA: Kök kuru ağırlığı, \*\*: Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir ( $P<0.05$ )

**Çizelge 5.** *R. intraradices* ve KUY uygulamalarının domatiste AMF kök kolonizasyonu, rizosfer spor yoğunluğu ve mikorhizal bağımlılığa etkileri

| Uygulamalar | AKK* (%)             | RSY (spor g <sup>-1</sup> toprak) | MB (%)     |
|-------------|----------------------|-----------------------------------|------------|
| Ri          | 43.89 <sup>a**</sup> | 22 <sup>a</sup>                   | -*** (9.5) |
| Ri+KUY      | 32.65 <sup>b</sup>   | 25 <sup>a</sup>                   | + (4.7)    |
| Ri+FORL     | 11.56 <sup>c</sup>   | 23 <sup>a</sup>                   | - (15.5)   |
| Ri+KUY+FORL | 37.77 <sup>ab</sup>  | 21 <sup>a</sup>                   | - (9.13)   |

\*: AKK: AMF kök kolonizasyonu, RSY: Rizosfer bölgesinde AMF spor yoğunluğu, MB: Mikorizal bağımlılık

\*\* : Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütundaki aynı harfler arasındaki fark önemsizdir ( $P<0.05$ ),

\*\*\*: +; Mikorizal bağımlılık var, -; Mikorizal bağımlılık

AMF kök kolonizasyonu yoğunluğu açısından uygulama grupları arasında istatistiki olarak fark bulunurken, rizosfer bölgesindeki AMF spor yoğunluğunda bu farkın olmadığı tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ) (Çizelge 5). AMF kök kolonizasyon yoğunluğunda Ri uygulaması %43.89 ile en yüksek orana sahip olurken, Ri+FORL uygulamasının ise %11.56 ile en az AMF kök kolonizasyon oranına sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 5). Ri+KUY uygulamasında rizosfer bölgesindeki AMF spor yoğunluğunda istatistiksel fark olmamakla beraber en yüksek değere sahip olduğu ve sadece bu grupta mikorizal bağımlılığın olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5). Diğer uygulama grupları ise mikorizal bağımlılık oluşturamamıştır. AMF'ler rizosferde oldukça önemli simbiyont mikroorganizmalardan biri olup, lokalize oldukları bölgedeki abiyotik ve biyotik stres koşullarından etkilenmekte, söz konusu faktörler de fungusun kolonizasyonunu, spor yoğunluğunu ve bağımlılık gibi gelişim kriterlerini de olumlu veya olumsuz etkileyebilmektedir (Akköprü ve Demir, 2005). Bu nedenle KUY ve FORL'nin AMF'yi olumsuz etkileyerek kök kolonizasyonunu düşürdüğü; rizosfer bölgesinde AMF spor yoğunluğuna etki

etmediği ve bitki ile tam simbiyosis oluşturamadığı için de mikorizal bağımlık genel olarak oluşmadığı ya da düşük mikorhizal bağımlılık oluştuğu söylenebilir. Bu çerçevede yapılan araştırmalarda da, AMF kolonizasyon yoğunluğu bazı uçucu yağlar (Burni ve ark., 2013; Stamou ve ark., 2017) ve patojenler (Aslanpay ve Demir, 2015, Demir ve ark., 2015) tarafından olumsuz etkilendiği ifade edilmiştir.

## SONUÇ

Mevcut çalışmada ortaya konduğu üzere uçucu yağların çeşitli fitopatojen funguslara karşı oldukça güçlü antifungal etkileri vardır. Bununla beraber uçucu yağların stabilitelelerinin kısıtlı olması ve yüksek uçuculuk özelliği göstermesi gibi dezavantajları da mevcuttur. Ayrıca uçucu yağların çok yüksek buharlaşma özelliğinden dolayı arazi şartlarında pratikte uygulanması mümkün olmamaktadır. Ancak son zamanlarda özellikle depo ve seralarda uygulamaya yönelik çalışmaların arttığı görülmektedir. Mevcut çalışmamızda da hem *in vitro* hem *in vivo* koşullar altında en yüksek antifungal etkiyi gösteren kekik uçucu yağının, FORL'ye karşı AMF ile birlikte kullanıldığında etkin bir mücadele aracı olabileceği görülmüştür. Söz konusu bu sonuç fungusitlerin azaltılması yönünde ümit vericidir. Çalışma kapsamında yer alan FORL gibi mücadelesi oldukça güç bir toprak patojenine karşı AMF ve UY gibi farklı alternatif uygulamalar denenerek hastalığa ilgili mücadele çalışmalarına yeni bir ivmenin kazandırılabilirliği düşünülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Van YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından "FLY-2017-5881" proje ile desteklenmiştir.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamışlardır.

## KAYNAKLAR

- Akköprü A, Demir S, 2005. Biological Control of Fusarium Wilt in Tomato Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and Some Rhizobacteria. *Journal of Phytopathology* 153 (9): 544-550.
- Arminante F, De Falco E, De Feo V, De Martino L, Mancini E, Quaranta E, 2006. Allelopathic activity of essential oils from Mediterranean Labiatae. *Proceedings of the I International Symposium on the Labiatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilisation* 723, February, pp. 347-356.
- Aslanpay B, Demir S, 2015. Arbusküler Mikorhizal Fungus (AMF) ve Hüyük Asitin Biber (*Capsicum annuum* L.) Bitkisinin Gelişimi ve *Phytophthora capsici* Leonian'ın Neden Olduğu Kök Boğazı Çürüklüğü Hastalığına Etkileri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi* 25 (1): 48-57.
- Attitalla IH, Fatehi J, Levenfors J, Brishammar S, 2004. A Rapid Molecular Method for Differentiating Two Special Forms (*lycopersici* and *radicis-lycopersici*) of *Fusarium oxysporum*. *Mycological research* 108 (7): 787-94.
- Aydın MH, 2015. Bitki Fungal Hastalıklarıyla Biyolojik Savaşta Trichoderma'lar. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi* 2 (2): 135-148.
- Aydın MH. 2019. Nohut (*Cicer arietinum* L.)'ta Solgunluğa Neden Olan *Fusarium oxysporum*'un Biyolojik Mücadelesi. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi* 6 (1): 65-72.
- Azcón-Aguilar C, Barea J, 1997. Arbuscular Mycorrhizas and Biological Control of Soil-Borne Plant Pathogens—An Overview of The Mechanisms Involved. *Mycorrhiza* 6 (6): 457-64.
- Baytop T, 1999. Türkiye'de Bitkilerle Tedavi. Nobel Tıp Kitapevleri Yayını, 2. Baskı, 480s, İstanbul-Türkiye.



- Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codon AC, 2004. Biocontrol Mechanisms of *Trichoderma* Strains. *International Microbiology* 7 (4): 249-60.
- Bogale M, Wingfield BD, Wingfield MJ, Steenkamp ET, 2007. Species-Specific Primers for *Fusarium redolens* And A PCR-RFLP Technique To Distinguish Among Three Clades of *Fusarium oxysporum*. *FEMS Microbiology Letters* 271 (1): 27-32.
- Boyras N, Koçak R, 2006. Bazı Bitki Ekstraktlarının *In Vitro* Antifungal Etkileri. *Selçuk Journal of Agriculture and Food Sciences* 20 (38): 82-87.
- Bozhüyük AU, Kordali Ş, Bölük G, 2015. *Satureja hortensis* L. Uçucu Yağının Antifungal Etkisi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 46 (2): 107-112.
- Burni T, Hussain F, Sharif M, 2013. Effect of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Essential Oils of Two Pharmaceutically Important *Mentha* Species in Marginal Soils. *Pakistan J Bot* 45: 293-6.
- Can C, Elekcioglu H, Yücel S, Özasan M, 2003. Seralarda Domates *Fusarium* Solgunluğuna Neden Olan Türlerin Tanısı, Hastalık Oluşumunda Nematodlar ile İlişkileri ve Mücadele Olanaklarının Belirlenmesi. *Tubitak Sonuç Raporu*, Proje No: TARP-2371.
- Can C, Yucel S, Korolev N, Katan T, 2004. First Report of *Fusarium* Crown and Root Rot of Tomato Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* In Turkey. *Plant Pathology* 53 (6).
- Castano R, Borrero C, Trillas M, Avilés M, 2013. Selection of Biological Control Agents Against Tomato *Fusarium* Wilt and Evaluation in Greenhouse Conditions of Two Selected Agents in Three Growing Media. *Biocontrol* 58 (1): 105-116.
- Chaudhary V, Kapoor R, Bhatnagar A, 2008. Effectiveness of Two Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Concentrations of Essential Oil and Artemisinin in Three Accessions of *Artemisia annua* L. *Applied Soil Ecology* 40 (1): 174-181.
- Çolak A, Biçici M, 2011. Doğu Akdeniz Bölgesi Örtü Altı Domates Yetiştiriciliğinde *Fusarium oxysporum* Spesiyal Formlarının Simptomatolojik Ayrımı İle Solgunluk ve Kök-Kök Boğazı Çürüklüğü Hastalıklarının Çıkış, Şiddet ve Yaygınlıklarının Belirlenmesi. *Bitki Koruma Bülteni* 51 (4): 331-45.
- Declerck S, Planchette C, Strullu D, 1995. Mycorrhizal Dependency of Banana (*Musa acuminata*, AAA group) Cultivar. *Plant and Soil* 176 (1): 183-187.
- Demir S, 2005. Using of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for biocontrol of soil-borne fungal pathogens. *Biological control of plant diseases: current concepts*, 124-38.
- Demir S, Şensoy S, Ocak E, et al., 2015. Effects Of Arbuscular Mycorrhizal Fungus, Humic Acid, and Whey on Wilt Diseasecaused by *Verticillium dahliae* Kleb. in Three Solanaceous Crops. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 39 (2): 300-309.
- Erdoğan O, Çelik A, Yıldız Ş, Kökten K, 2014. Pamukta fide kök çürüklüğü etmenlerine karşı bazı bitki ekstrakt ve uçucu yağlarının antifungal etkisi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 1(3): 390-397.
- Erdoğan O, Çelik A, Zeybek A, 2016. *In Vitro* Antifungal Activity of Mint Thyme Lavender Extracts and Essential Oils on *Verticillium dahliae* Kleb. *Fresenius Environmental Bulletin*, 25 (11): 4856-4862.
- FAO, 2020. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Faostat, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. (Erişim Tarihi: 06.07.2020).
- Gerdemann L.W., Nicholson T.H., 1963. Spores of Mycorrhizal Endogene Extracted from Soil by Wet Sieving and Decanting, *Transactions of the British Mycological Society* 46: 235-244.
- Giovannetti M, Mosse B, 1980. An Evaluation of Techniques for Measuring Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Infection in Roots. *New phytologist*, 489-500.
- Hajlaoui M, Hamza N, Gargouri S, Guermech A, 2001. Apparition En Tunisie De *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, Agent De La Pourriture Des Racines Et Du Collet De La Tomate. *EPPO Bulletin* 31 (4): 505-507.
- Hibar K, 2002. La fusariose du collet et des racines de la tomate: Pathogénicité et moyens de lutte. *Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies en Protection des Plantes et Environnement. Ecole Supérieure d'Horticulture et d'Elevage de Chott Mariam*, pp. 54, Mariem-Tunisia.

- Jiménez-Díaz RM, Castillo P, Del Mar Jiménez-Gasco M, Landa BB, Navas-Cortés JA, 2015. Fusarium Wilt of Chickpeas: Biology, Ecology and Management. *Crop Protection* 73: 16-27.
- Karagiannidis N, Thomidis T, Panou-Filotheou E, Karagiannidou C, 2012. Response of Three Mint and Two Oregano Species to '*Glomus etunicatum*' Inoculation. *Australian Journal of Crop Science* 6 (1): 164.
- Kırbağ S, Turan N, 2006. Malatya'da Yetiştirilen Bazı Sebzelerde Kök ve Kökboğazı Çürüklüğüne Neden Olan Fungal Etmenler. *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi* 8 (2): 159-64.
- Kordali Ş, Çakır A, Akcin TA, Mete E, Akcin A, Aydın T, Kılıç H, 2009. Antifungal and Herbicidal Properties of Essential Oils and n-hexane Extracts of *Achillea gypsicola* Hub-Mor. and *Achillea biebersteinii* Afan (Asteraceae). *Industrial Crops and Products*, 29 (2-3): 562-570.
- Landa BB, Navas-Cortés JA, Jiménez-Díaz RM, 2004. Integrated management of Fusarium wilt of Chickpea with Sowing Date, Host Resistance, and Biological Control. *Phytopathology* 94 (9): 946-960.
- Linderman RG, Davis EA, 2004. Varied Response of Marigold (*Tagetes* spp.) Genotypes to Inoculation with Different Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Scientia Horticulturae* 99 (1): 67-78.
- McGovern R, 2015. Management of Tomato Diseases Caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection* 73: 78-92.
- Morandi D, 1996. Occurrence of Phytoalexins and Phenolic Compounds in Endomycorrhizal Interactions, and Their Potential Role In Biological Control. *Plant and Soil* 185 (2): 241-251.
- Nguefack J, Dongmo JL, Dakole C, *et al.*, 2009. Food Preservative Potential of Essential Oils and Fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* Against Mycotoxigenic Fungi. *International journal of food microbiology* 131 (2-3), 151-156.
- Ozbay N, Newman S, Brown W, 2002. Evaluation of *Trichoderma harzianum* Strains to Control Crown and Root Rot of Greenhouse Fresh Market Tomatoes. *Proceedings of the XXVI International Horticultural Congress: Managing Soil-Borne Pathogens: A Sound Rhizosphere to Improve Productivity in 635*, August, pp. 79-85.
- Phillips JM, Hayman D, 1970. Improved Procedures for Clearing Roots and Staining Parasitic and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi For Rapid Assessment of Infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161.
- Romagnoli C, Bruni R, Andreotti E, Rai M, Vicentini CB, Mares D, 2005. Chemical Characterization and Antifungal Activity of Essential Oil of Capitula from Wild Indian *Tagetes patula* L. *Protoplasma* 225 (1-2): 57-65.
- Saito S, Michailides T, Xiao C, 2016. Fungicide Resistance Profiling in *Botrytis cinerea* Populations from Blueberry in California and Washington and Their Impact on Control of Gray Mold. *Plant Disease* 100 (10): 2087-2093.
- Salamci E., Kordali S., Kotan R., Cakir A and Kaya Y., 2007. Chemical Composition, Antimicrobial and Herbicidal Effects of Essential Oils Isolated from Turkish *Tanacetum aucheranum* and *Tanacetum chiliophyllum* var. *chiliophyllum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35 (9): 569-581.
- Scheffknecht S, St-Arnaud M, Khaosaad T, Steinkellner S, Vierheilig H, 2007. An Altered Root Exudation Pattern Through Mycorrhization Affecting Microconidia Germination of the Highly Specialized Tomato Pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) Is Not Tomato Specific But Also Occurs in Fol Nonhost Plants. *Botany* 85 (3): 347-52.
- Şensoy S, Demir S, Turkmen O, Erdinc C, Savur OB, 2007. Responses of Some Different Pepper (*Capsicum annuum* L.) Genotypes to Inoculation With Two Different Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Scientia Horticulturae* 113 (1): 92-95.
- Smith SE, Smith FA, 2012. Fresh Perspectives on The Roles of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Nutrition and Growth. *Mycologia* 104 (1): 1-13.
- Song W, Ma X, Tan H, Zhou J, 2011. Abscisic Acid Enhances Resistance to *Alternaria solani* in Tomato Seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 49 (7): 693-700.

- Stamou GP, Konstadinou S, Monokrousos N, Mastrogianni A, Orfanoudakis, M, Hassiotis C, ... Papatheodorou EM, 2017. The Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Essential Oil on Soil Microbial Community and N-related Enzymes During the Fungal Early Colonization Phase. *AIMS Microbiology*, 3(4): 938-959.
- Szczerbanik M, Jobling J, Morris S, Holford P, 2007. Essential Oil Vapours Control Some Common Postharvest Fungal Pathogens. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 47 (1): 103-109.
- Tripathi A, Sharma N, Sharma V, 2008. *In vitro* Efficacy of *Hyptis suaveolens* L. (Poit.) Essential Oil on Growth and Morphogenesis of *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* (Massey) Snyder & Hansen. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(3), 503- 512.
- Uçar E, Odabaş Köse E, Özyiğit Y, Turgut K, 2015. Bazı Tıbbi ve Aromatik Bitkilerde Esansiyel Yağların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi. *SDU Journal of the Faculty of Agriculture/SDÜ Ziraat Fakültesi Dergisi* 10 (2).
- Vural H, Eşiyok D, Duman I, 2000. Kültür Sebzeleri, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, 139-144.
- Wang M, Cao J, Lin L, Sun J, Jiang W, 2010. Effect of 1-methylcyclopropene on Nutritional Quality and Antioxidant Activity of Tomato Fruit (*Solanum lycopersicon* L.) During Storage. *Journal of Food Quality* 33 (2): 150-164.
- Wang X, Ding T, Li Y, Guo Y, Li Y, Duan T, 2020. Dual Inoculation of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) with *Funnelliformis mosseae* and *Sinorhizobium medicae* Can Reduce Fusarium Wilt. *Journal of Applied Microbiology* 129 (3): 665-679.
- Yazlık A, 2014. Kanyaş (*Sorghum halepense* (L.) Pers.)'ın Marmara Bölgesindeki Yaygınlığı, Yoğunluğu, Biyolojisi ve Alternatif Mücadele Olanaklarının Belirlenmesi, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi (Basılmamış).
- Yazlık A, Üremiş İ, 2017. İstanbul Kekliği (*Origanum vulgare* L.), İngiliz Lavantası (*Lavandula angustifolia* L.) ve Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) Uçucu Yağ Bileşiklerinin Bazı Kültür Bitkilerinin Gelişimine Etkinliği. *Alatarım* 16 (1): 67-76.
- Yıldız M, Gürkan O, Turgut C, Kaya Ü, Ünal G, 2005. Tarımsal Savaşmada Kullanılan Pestisitlerin Yol Açtığı Çevre Sorunları, [http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/dd7a04804967197\\_ek.pdf](http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/dd7a04804967197_ek.pdf). (Erişim Tarihi: 02.08.2020).

**Atf İçin:** Erdoğan MK, Ağca CA, Geçibesler İH, 2021. Agaricus campestris Metanol Ekstraktının Yağ Asidi Kompozisyonu ve Terapötik Potansiyelinin Araştırılması. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 869-879.

**To Cite:** Erdogan MK, Agca CA, Gecibesler IH, 2021. Investigation of Fatty Acid Composition and Therapeutic Potential of Methanol Extract of *Agaricus campestris*. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 869-879.

### **Agaricus campestris Metanol Ekstraktının Yağ Asidi Kompozisyonu ve Terapötik Potansiyelinin Araştırılması**

Mehmet Kadir ERDOĞAN<sup>1\*</sup>, Can Ali AĞCA<sup>2</sup>, İbrahim Halil GEÇİBESLER<sup>3</sup>

**ÖZET:** Yapılan bilimsel araştırmalar mantarların çok umut verici farmakolojik potansiyele sahip olduğuna işaret etmektedir. *Agaricus campestris*, önemli biyoaktiviteye sahip yenilebilir bir mantar türüdür. Bu çalışmada, *A. campestris* metanol ekstraktının (AC) antioksidan ve antiproliferatif aktiviteleri ile yağ asidi kompozisyonunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır. AC içeriğindeki yağ asitlerinin kantitatif analizi GC-MS spektrometresi ile değerlendirilmiştir. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için ise DPPH serbest radikali giderme testi, ABTS katyon radikali giderme aktivitesi, ferrik iyonlarını indirgeme testi ve Ferröz iyonlarını şelatlama testleri kullanılmıştır. AC ekstraktının antiproliferatif etkisi ise insan kolon (HT-29), meme (MCF-7) ve beyin (U373) kanseri hücre hatlarında zaman ve doz bağımlı olarak WST-1 hücre canlılığı analizi ile belirlenmiştir. AC içeriğinde baskın bileşenler olarak doymamış yağ asidi olan linoleik asit (18:2, ω-6) %56.45 oranında ve doymuş yağ asidi olan palmitik asit (16:0) %28.74 oranında analiz edilmiştir. Antioksidan aktivite parametreleri geniş konsantrasyon aralıklarında değerlendirildiğinde, artan konsantrasyon ile lineer bir antioksidan aktivite artışı gözlemlendi. AC 24 saatlik tedavide HT-29 hücrelerinde 52.62 µg mL<sup>-1</sup> IC<sub>50</sub> değeri ile en yüksek antiproliferatif etkiyi göstermiştir. Bu bulgular, *A. campestris* hakkında daha fazla araştırma yapmak için ilginç veriler ortaya koymaktadır, ve özellikle kanser hücreleri üzerindeki güçlü antiproliferatif potansiyel mantarın daha fazla araştırılmaya değer olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Agaricus campestris*, Antioksidan, Antiproliferatif, Yağ asidi kompozisyonu

#### **Investigation of Fatty Acid Composition and Therapeutic Potential of Methanol Extract of *Agaricus campestris***

**ABSTRACT:** Recent reports indicate that mushrooms have very promising pharmacological potential. *Agaricus campestris* is an edible fungus species with bio-activity. This study aimed to screen the anti-oxidant, anti-proliferative activities, and fatty acid composition of methanol extract of *A. campestris* (AC). The quantitative analysis of fatty acids of AC was evaluated by GC-MS spectrometer. For the determination of antioxidant activity, DPPH free radical scavenging test, ABTS radical scavenging activity, Ferric ions reduction assay and Ferrous ions chelation assays were used. The antiproliferative effect of AC was determined by the time and dose dependent with WST-1 cell viability analysis in human colon (HT-29), breast (MCF-7) and brain (U373) cancer cell lines. Linoleic acid (18: 2, ω-6), which is the unsaturated fatty acid, was analyzed at 56.45% and the saturated fatty acid palmitic acid (16: 0) was analyzed at 28.74% as the major components in AC. It was observed that AC, whose antioxidant activity parameters were evaluated in wide concentration ranges, displayed a linear increase in antioxidant activity with increasing concentration. AC showed the highest antiproliferative effect in HT-29 cells with an IC<sub>50</sub> value of 52.62 µg mL<sup>-1</sup> for 24 h treatment. These results provide interesting data for further research on *A. campestris*, and its strong antiproliferative potential particularly on cancer cells, indicates that the mushroom is worth further investigation.

**Keywords:** *Agaricus campestris*, Antioxidant, Antiproliferative, Fatty acid composition

<sup>1</sup> Mehmet Kadir ERDOĞAN ([Orcid ID: 0000-0002-1579-5737](https://orcid.org/0000-0002-1579-5737)), Bingöl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bingöl, Türkiye

<sup>2</sup> Can Ali AĞCA ([Orcid ID: 0000-0002-0244-3767](https://orcid.org/0000-0002-0244-3767)), Bingöl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bingöl, Türkiye

<sup>3</sup> İbrahim Halil GEÇİBESLER ([Orcid ID: 0000-0002-4473-2671](https://orcid.org/0000-0002-4473-2671)), Bingöl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, İş Sağlığı ve Güvenliği Bölümü, Doğal Ürün Araştırma Laboratuvarı, Bingöl, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mehmet Kadir ERDOĞAN, e-mail: mkerdogan@bingol.edu.tr

## GİRİŞ

Son dönemlerde yapılan çalışmalar, bazı gıda ürünlerinin zayıf yan etki gösteren ve yüksek anti-kanser potansiyeline sahip doğal biyoaktif maddeler içerdiğini göstermiştir. Bu bağlamda, birçok tıbbi ve yenilebilir mantar türü, sahip oldukları biyoaktif bileşik kompozisyonları ve yüksek besin içerikleri bakımından ön plana çıkmaktadırlar (Lindequis, 2013). Tıbbi mantarlar, farmasötik uygulamalarda kullanılan ancak doğrudan yenilemeyen mantarlardır. Yenilebilir mantarlar; fenolik bileşikler, flavonoidler ve yağ asidi içerikleri bakımından zengin olmaları nedeniyle fonksiyonel ve sağlıklı gıda kaynağı olarak değerlendirilmekte ve sahip oldukları tıbbi özelliklerinden dolayı bilim insanlarının dikkatini çekmektedirler. Ayrıca bu mantarların ve bunlardan elde edilen farklı ekstraktların birçok hastalığın muhtemel tedavisi için geçmişten günümüze yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir. Yenilebilir mantarların biyoaktif bileşiklerinin potansiyel farmakolojik etkilerine bağlı olarak, anti-oksidan, anti-biyotik (Liu ve ark., 2013), anti-mikrobiyal (Alves ve ark., 2013), hepatoprotektif (Liu ve ark., 2017), anti-diyabetik (Dubey ve ark., 2019) ve anti-kanser etkilere sahip olduğu yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. Önemli yenilebilir mantarlar Agaricus cinsine aittirler. *A. bisporus* kültüre edilen bir mantar türü olmasına karşın, *A. campestris* doğada yabani olarak yetişen yenilebilir bir mantardır. *A. campestris* türünün düşük kalori ve şeker içeriğine sahip olduğu, ve fenolik asitler bakımından diğer Agaricus türlerine oranla en yüksek konsantrasyona sahip olduğu bildirilmiştir (Glamočlija ve ark., 2015).

Antioksidanlar, hücre biyomoleküllerinin (lipitlerin, DNA veya proteinlerin) oksidasyonunu inhibe edip, hücrelere verilen zararı en aza indirerek, serbest radikal saldırısına karşı savunmada önemli bir rol oynarlar (Liu ve ark., 2013; Harris ve DeNicola., 2020). Tıbbi değeri olan ve yenilebilir antioksidan özellik, sentetik antioksidanların aksine, toksik ve mutajenik etkiler olmaksızın, serbest radikalın nötralizasyonu sağlayabilir (Glumac ve ark., 2017; Karaman ve ark., 2019). Bununla birlikte, terapötik potansiyelleri nedeniyle mantarların antioksidan ve antitümör değerleri, mantarlardan ekstrakte edilebilen çok çeşitli bileşiklere bağlıdır.

Mantarlarda, yağ asidi kompozisyonu besinsel faktörler, oksijen ve çevresel sıcaklık gibi farklı etmenler tarafından etkilenmekle birlikte, tipik olarak ortaya çıkan başlıca yağ asitleri, membran fosfolipidleri ve depolama triasilgliseroller, palmitik ve stearik asitlerdir. Ayrıca, palmitik ve stearik asitlerin doymamış türevleri palmitoleik, oleik, linoleik ve linolenik asitler de mantarların içeriğinde yer almaktadır (Suutari, 1995). Yapılan çalışmalarla, mantarların yağ asidi kompozisyonunda bulunan, linolenik asitin (LA) meme (Chajès ve ark., 1995), mesane (Brinkman ve ark., 2011) ve kolon kanseri hücrelerinin hücre proliferasyonunu down-regüle ettiği, ayrıca LA pre-inkübasyonun sitotoksik ajanlara karşı hücre hassasiyetini arttırdığı gösterilmiştir (Chamberland ve Moon, 2015).

Yukarıda geçen bilgilerin ışığında bu çalışmada, *A. campestris* metanol ekstraktının (AC), yağ asidi kompozisyonu ve anti-oksidan aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, yenilebilir mantarların kanser önleyici maddeler barındırdığı son yıllarda doğrulandığı için, kanser tedavisinde doğal ajanlar olarak kullanılabilmesi göz önüne alındığında, AC ile tedavi edilen U373 beyin tümör hücreleri, MCF-7 meme kanseri hücreleri ve HT-29 kolon kanseri hücre hattındaki anti-proliferatif etki araştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Bitkisel Ekstraktın Hazırlanması

*A. campestris* Bingöl İli Çan (Göztepe) köyü 38°57'47.7"N 40°35'31.0"E koordinatlarında 780 m yükseklikteki çayırılık alanlardaki doğal habitatlarından toplanmıştır. Toplanan mantar örnekleri laboratuvara getirildikten sonra liyofilize edilmek için -80 C'de dondurulmuştur. Liyofilizasyon işlemi

ile kurutulan mantar örneği (300 gr) ve metanol çözücüsü (2000 mLx3) kullanılarak 20°C'de ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen ekstraktın çözücüsü evaporatör yardımı ile uzaklaştırılarak kuru ekstrakt (12.4 g) elde edilmiştir. Elde edilen kuru ekstrakt biyolojik aktivite testleri ve kimyasal analizler için +4°C de muhafaza edilmiştir.

### Yağ Asidi İçeriğinin Belirlenmesi

AC içerisindeki apolar karakterli yağ asitlerinin kantitatif analizi için GC-MS spektrometresi kullanılmıştır. Metanol ekstraktı içerisindeki lipofilik bileşenlerin analizi için ekstraktlara esterleştirme işlemi uygulandı. Esterifikasyon işlemi için metanol içerisinde 1 M'lık KOH çözeltisi hazırlandı. Deney tüpü içerisine ekstraktan 50 mg alındı ve 5 mL hekzan içerisinde çözüldü. Oluşan çözelti üzerine hazırlanan alkali çözeltiden 3 mL konularak vorteksledi. Şiddetli karıştırma işlemi sonrasında üst fazlar alınarak 0.45 µm gözenekli filtreden süzülerek viallere alındı (Gecibesler vd. 2018). AC bileşenlerinin GC-MS spektrometresi ile analizi için Agilent 5975 C MSD-7890-GC marka cihaz kullanıldı. Kolon olarak HP-5MS %5 PMS (Phenyl Methyl Silican) 30mx250µmx0,25µm ebatlarında kolon kullanıldı. Taşıyıcı gaz olarak helyum gazı kullanıldı. Numunelerin enjeksiyon hacmi 1µL; split oranı 25:1; sıcaklık 250°C; FID dedektör voltajı 1.176471kV ve analiz süresi 61 dakika olarak ayarlandı. Sıcaklık programı ise 0. dakikada başlangıç sıcaklığı 120°C'de ayarlanarak bu sıcaklıkta 4 dk sabit tutuldu. 27 dakika boyunca dakikada 3°C'lik artış ile 200°C'ye getirildi. 10 dakika boyunca 200°C'de sabit tutuldu. 5 dakika boyunca dakikada 15°C'lik sıcaklık artışı ile sıcaklık 280°C'ye getirildi. Son olarak 15 dakika boyunca bu sıcaklıkta sabit tutularak program sonlandırıldı.

### Antioksidan Aktivite Testleri

Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde; DPPH serbest radikali giderme testi, ABTS katyon radikali giderme aktivitesi (ABTS), ferrik (Fe<sup>3+</sup>) iyonlarını indirgeme testi (FRAP) ve Ferröz (Fe<sup>2+</sup>) iyonlarını şelatlama (FCAP) testi kullanılmıştır.

### Serbest Radikal Giderme Aktivitesi (DPPH Testi)

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali giderme aktivitesi için Blois tarafından kullanılan metod uygulanmıştır (Blois, 1958). Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan AC ekstraktlarından (0.5 mL) alınarak içerisinde litrede 6x10<sup>-5</sup> mol olacak şekilde hazırlanan DPPH radikali solusyonu (2.5 mL) karıştırıldı. Bu karışım güçlü bir şekilde karıştırılarak 60 dakika karanlık bölgede bekletildi ve 517 nm'de absorbans değerleri okundu. Her bir ekstrakt örneği ve antioksidan standart için ayrı ayrı metanol içeren numune körleri ve DPPH içeren kontrol grupları oluşturuldu. Her bir ekstrakt örneği ve standartlar ile tek tek çalışıldı, kontrolün absorbansı günlük olarak her ölçümde tekrar tekrar okundu ve üç paralel çalışıldı.

DPPH radikali giderme aktivitesi aşağıda verilen formül ile hesaplandı:

$$\text{DPPH radikali giderme aktivitesi (\%)} = \frac{C_A - N_A}{C_A} \times 100$$

Denklemden C<sub>A</sub> kontrolün absorbans değerini, N<sub>A</sub> ise numunenin absorbans değerini göstermektedir.

### İndirgeyici Güç Özelliğinin Ölçülmesi (FRAP)

Ferrik (Fe<sup>3+</sup>) iyonlarını indirgeme gücü kapasitesi Oyaizu metoduna göre tayin edildi (Oyaizu, 1986). Ortamdaki indirgen madde Fe<sup>3+</sup> iyonlarını Fe<sup>2+</sup> iyonlarına indirger ve FeCl<sub>3</sub> ilavesiyle oluşan Prusya mavisi rengindeki kompleksin absorbansı ölçülür. Yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme kapasitesinin göstergesidir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan AC ekstraktlarının 1 mL'sine, 2.5 mL fosfat tamponu (0.2 M, pH=6.6) ve 2.5 mL %1'lik K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> eklendi. Karışımlar 50°C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra 2.5 mL %10'luk TCA eklendi ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı.

Santrifüj sonrası süpernatantlardan 2.5 mL alınarak eşit hacimde destile su ve 0.5 mL %0.1'lik FeCl<sub>3</sub> çözeltisi ile karıştırılarak 700 nm'de absorbansları okutuldu.

### Metal Şelatlama Aktivitesinin Ölçülmesi (FCAP)

Metal şelatlama aktivitesine, Dinis ve arkadaşlarının metoduna göre demir (II) iyonlarını şelatlama özelliği üzerinden bakılmıştır (Dinis ve ark., 1994). Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesi için farklı konsantrasyonlarda hazırlanan örneklerin her birisinden 0.5 mL deney tüpü içerisine alınarak üzerine 1.6 mL deiyonize su ve 0.05 mL 2 mM FeCl<sub>2</sub> bileşiğinden eklendi. Her bir deney tüpü homojen bir biçimde karıştırıldı ve 30 saniye sonrasında 5 mM ferrozin bileşiğinden 0.1 mL eklendi. Ferrozin bileşiği iki değerlikli demir ile reaksiyona girdiğinde suda çok iyi çözünür hale gelecektir. Bu işlemi takiben 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılan reaksiyon karışımının Fe<sup>+2</sup>-Ferozin kompleksinin absorbansı 562 nm'de ölçülmüştür. Böylelikle örneklerin ferröz iyonlarını şelatlama aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Metal Şelatlama Aktivitesi (\%)} = \frac{C_A - N_A}{C_A} \times 100$$

Denklemden C<sub>A</sub> kontrolün absorbans değerini, N<sub>A</sub> ise numunenin absorbans değerini göstermektedir.

### ABTS Radikali Giderme Aktivitesi (ABTS)

ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzothiazolin-6-sülfonat)) radikali giderme aktivitesi Re ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre belirlenmiştir. ABTS radikali oluşturulması, ABTS'nin potasyum persülfat (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) oksidasyonu ile üretildi. Bu işlem için 2 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiye 2.45 mM'lık potasyum persülfat çözeltisi eklenerek ABTS radikali elde edildi. Elde edilen çözelti kullanılmadan önce 734 nm'de absorbansı 0.1 M ve pH'sı 7.4 olan fosfat tamponu ile 0.700±0.025 nm'ye ayarlandı. Farklı konsantrasyonlardaki AC stok çözeltisine (100 µL) ABTS radikali çözeltisi (2.4 mL) ilave edildikten sonra 8 dakika inkübe edildi. Tampondan oluşan köre karşı 734 nm'de absorbansları kaydedildi (Re ve ark., 1999).

### Antiproliferatif Aktivitenin Belirlenmesi

Anti-proliferatif etkiyi belirlemek amacıyla; MCF-7 insan meme, HT-29 insan kolon ve U373 insan beyin tümörü hücre hatları farklı doz ve sürelerde AC ile tedavi edilerek hücre canlılıkları belirlenmiştir.

### Hücre Hatları ve Kültür Koşulları

Bu çalışmada, American Type Culture Collection (ATCC) den temin edilmiş olan, MCF-7 insan meme kanseri, HT-29 insan kolon kanseri ve U373 insan glioblastoma multiform hücre hatları kullanılmıştır. Tüm kanser hücre hatları, aksi belirtilmedikçe, içerisinde %10 fetal sıgır serumu (FBS) (56 °C inaktive edilmiş), 3 mM of L-glutamine ve antibiyotik (100 µg mL<sup>-1</sup> streptomisin 100 IU mL<sup>-1</sup> penisilin) içeren DMEM besiyerinde 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve nemli koşullara altında kültüre edilmiştir. Hücre geç-logaritmik fazda, yoğunlukları %80-90'a ulaştığında, canlılık testlerinde kullanılmışlardır.

### Hücre Canlılık Testi

AC ekstaktının hücre canlılığı üzerine etkisi doz ve zaman bağımlı olarak değerlendirilmiştir. Kanser hücreleri, AC ekstraktının dört farklı dozuna (25, 50, 100, 250 µg mL<sup>-1</sup>) 24 ve 48 saatlik sürelerle maruz bırakılmış ve sonuçlar WST-1 (Intron Biotechnology, Gyeonggi-do, Korea) proliferasyon deney kiti kullanılarak elde edilmiştir (Erdogan ve ark., 2020a). Bu amaçla; hücreler, 96 kuyucuklu plakalara, her bir kuyucukta 1x10<sup>4</sup> hücre olacak şekilde ekimler gerçekleştirilmiştir. Ardından adherent hücrelerin plaka yüzeye tutunması için hücreler CO<sub>2</sub> inkübatöründe gece boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler, 24 ve 48 saat süre ile 25, 50, 100 ve 250 µg mL<sup>-1</sup> konsantrasyonlarda AC ile tedavi edilmiştir. Tedavi

sonrasında, aspire edilerek besiyeri ortamdan uzaklaştırılmış ve üretici firmanın geliştirdiği protokol uyarınca, 10 µL WST-1 solüsyonu taze besiyeri içerisinde çözünerek ilgili kuyucuklara eklenmiştir. 37°C'lik CO<sub>2</sub> inkübatöründe 120 dk'lık inkübasyonun ardından mikropate okuyucu (SpectraMax 384 Plus, Molecular Devices, USA) ile 450 nm'de absorban değerleri kaydedilmiştir.

### İstatistiksel Analizler

Verilerin analizi, GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirildi. Sonuçlar, ortalama ± standart hata olarak belirlenmiş ve  $P < 0.05$  olanlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

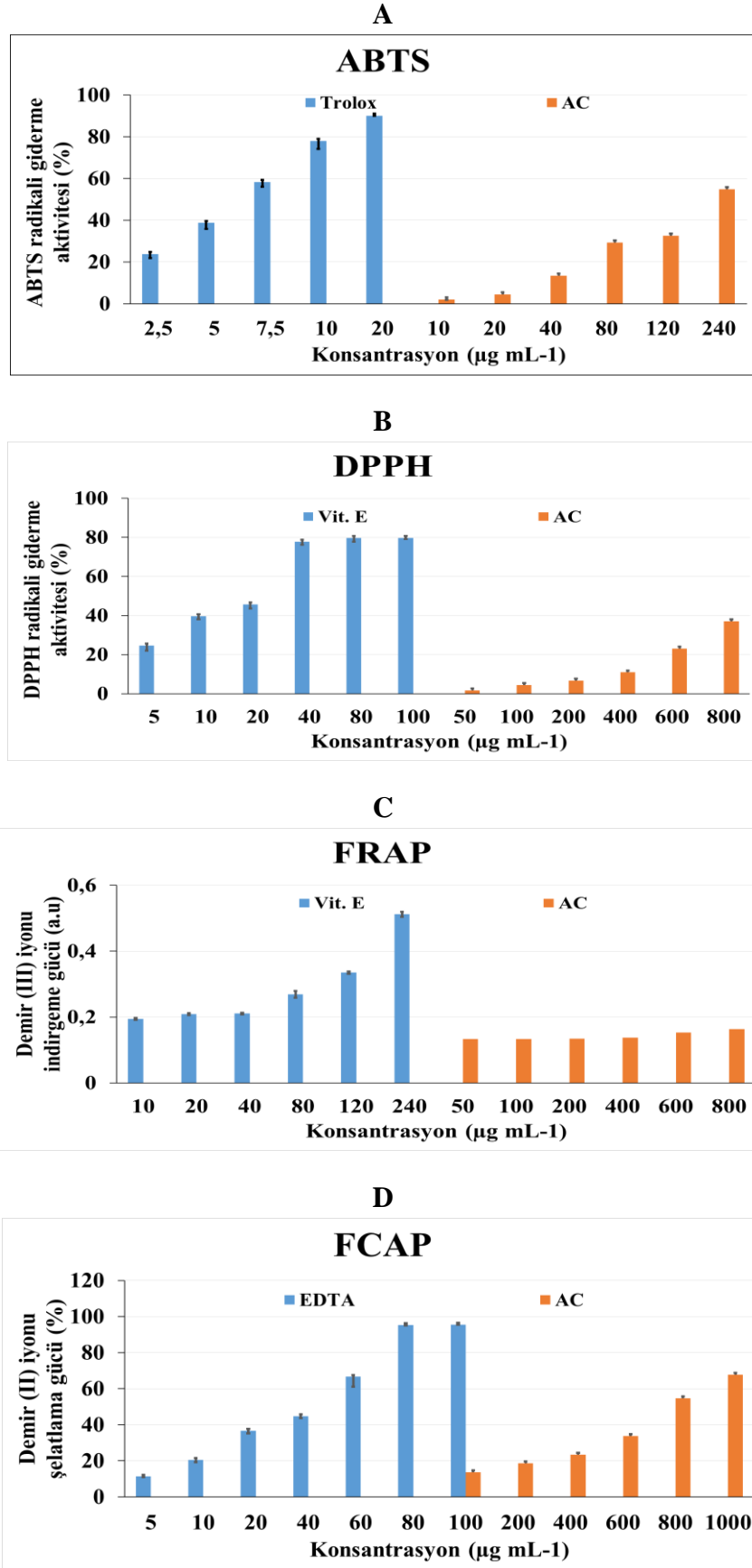
### A. campestris'in Yağ Asidi Kompozisyonu

Mantarlar, oldukça besleyici olmasının yanı sıra, onlara antioksidan özellikler dahil olmak üzere yüksek terapötik değer sağlayan çok çeşitli sekonder metabolitler içerirler (Akata ve ark., 2012; Kosanić ve ark., 2012; Kozarski ve ark., 2015). *A. campestris* türünün de aralarında bulunduğu yenilebilir mantarlar üzerine yapılan lipofilik bileşen analiz sonuçları *A. campestris* içeriğinin palmitik asit ve linoleik asit seviyesi, oleik, stearik ve araşidik asitlerden daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Yılmaz ve ark., 2006). Bu çalışmamız ile AC içeriğindeki yağ asidi kompozisyonu gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ile analiz edilerek 12 tane bileşen tespit edilmiştir. Bu bileşenlerden üç tanesi doymamış yağ asitlerinden (%57.3), dokuz tanesi doymuş yağ asitlerinden (%42.7) oluşmaktadır. Literatür verileriyle uyumlu olarak bizim bulgularımız da AC içeriğinin insan diyetinde önemli bir yere sahip olan doymamış yağ asidi bakımından zengin olduğu ortaya çıkmıştır. AC içeriğinde doymamış yağ asidi olan linoleik asit (18:2, ω-6) %56.45 oranında ve doymuş yağ asidi olan palmitik asit (16:0) %28.74 oranında baskın bileşenler olarak analiz edilmiştir (Çizelge 1). Günlük diyetinde önemli olan diğer doymamış yağ asitleri olarak α-linoleik asit (%0.80) ve 8,11-eikosadienoik asit (%0.58) minör bileşenler olarak analiz edilmiştir.

**Çizelge 1.** *A. campestris* metanol ekstraktının yağ asidi kompozisyonu

| No | Alıkonma zamanı (dk.) | Bileşik ismi                   | Bağıl Bolluk (%) |
|----|-----------------------|--------------------------------|------------------|
| 1  | 16.41                 | Miristik asit (14:0)           | 1.06             |
| 2  | 17.65                 | Pentadakanoik asit (15:0)      | 0.87             |
| 3  | 19.23                 | Palmitik asit (16:0)           | 28.74            |
| 4  | 20.92                 | Heptadekanoik asit (17:0)      | 0.96             |
| 5  | 22.39                 | Stearik asit (18:0)            | 6.71             |
| 6  | 23.52                 | Linoleik asit (18:2, ω-6)      | 56.45            |
| 7  | 24.09                 | Araşidik asit (20:0)           | 2.08             |
| 8  | 24.50                 | α-Linoleik asit (18:3, ω-3)    | 0.80             |
| 9  | 25.33                 | 8,11-Eikosadienoik asit (20:2) | 0.58             |
| 10 | 26.34                 | Behenik asit (22:0)            | 0.99             |
| 11 | 27.43                 | Trikosanoik asit (23:0)        | 0.17             |
| 12 | 28.60                 | Lignoserik asit (24:0)         | 0.59             |





**Şekil 1.** *A. campestris* metanol ekstraktının ABTS (A), DPPH (B), FRAP (C) ve FCAP (D) testleri açısından antioksidan aktiviteleri

### Antioksidan aktivite test sonuçları

Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için ABTS, DPPH, FRAP ve FCAP testlerini içeren dört farklı antioksidan aktivite test parametresi kullanılmıştır. Kullanılan testler özellikle *A. campestris* gibi gıda temelli doğal ürünlerin antioksidan aktivitelerini belirlemede oldukça yoğun kullanılan testlerdir (Erdogan ve ark., 2020a). ABTS katyon radikali giderme aktivitesini değerlendirmek için 10-240 µg mL<sup>-1</sup> aralığındaki AC konsantrasyonu ve troloks antioksidan standardı kullanılmıştır. AC artan konsantrasyonları ile ABTS katyon radikallerini ortamdaki temizlediği görülmüştür (Şekil 1.A). AC 240 µg/mL konsantrasyonda %54.90 ± 0.23 değerinde bir aktivite göstermiştir. DPPH radikali giderme aktivitesi 50-800 µg mL<sup>-1</sup> AC konsantrasyon aralığında E vitamini ile mukayese edilerek değerlendirilmiştir. DPPH testinde, Şekil 1.B'de görüleceği gibi, artan AC konsantrasyonu ile birlikte ortamdaki DPPH radikallerinin inhibe edildiği görülmüştür. AC 800 µg mL<sup>-1</sup> konsantrasyonda DPPH'ı %37.03 ± 3.17 oranında inhibe etmiştir. Demir (III) iyonlarını indirgeme potansiyelleri de 50-800 µg mL<sup>-1</sup> konsantrasyon aralığında değerlendirilmiştir. Şekil 1.C'de verildiği gibi artan konsantrasyonlarda kaydedilen artan absorban değerleri numunenin bir indirgeme potansiyelinin olduğunu göstermektedir (Gecibesler ve ark., 2017). AC ekstraktının demir (III) iyonlarını artan konsantrasyon ile bir dereceye kadar indirgeyebildiği gösterilmiştir. Bu durumun nedeni, sekonder metabolitlerin bir araya gelmesi ile moleküllerin birbirilerini baskılaması sonucunda aktivitede sınırlamalara neden olması olabilir (Olcott ve Einset, 1958; Yin ve ark., 2012). Son olarak AC şelatlama kapasitesi demir (II) iyonları üzerinden değerlendirilerek antioksidan aktivitesi ortaya konulmuştur. Demir (II) iyonlarını şelatlama kapasiteleri 100-1000 µg mL<sup>-1</sup> AC konsantrasyon aralığında EDTA şelatlama ajanı ile mukayese edilmiştir. Test sonucunda artan AC konsantrasyonu ile birlikte EDTA şelatörüne göre daha ılımlı bir şelatlama aktivitesi görülmüştür (Şekil 1.D).

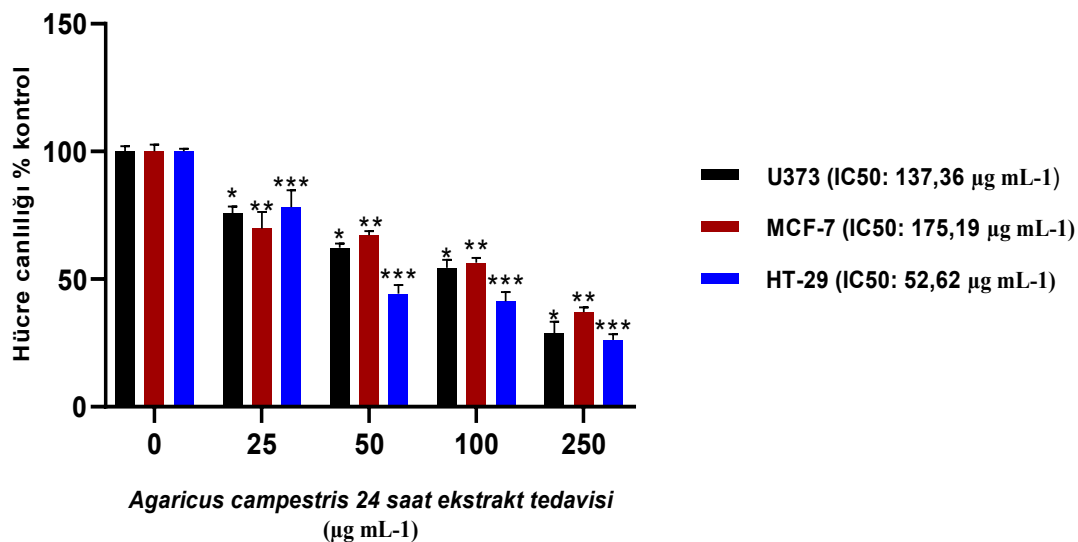
Halk arasında yaygın olarak tüketilen mantar türlerinin antioksidan aktivite ve toplam sekonder metabolit içeriği üzerine yapılan bir çalışmada, *A. campestris* türünün en yüksek fenolik içeriğe (15.63 mg GAE g<sup>-1</sup> ekstre) ve DPPH, ABTS, FRAP ve CUPRAC gibi antioksidan aktivite testlerine karşı maksimum antioksidan aktivite potansiyeline sahip olduğu rapor edilmiştir (Akata ve ark., 2019). Bizim bulgularımız da bu çalışmayla uyumlu olarak AC ekstraktının önemli antioksidan kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir.

### *A. campestris* Metanol Ekstraktının U373, MCF-7 ve HT-29 Hücre Hatları Üzerindeki Antiproliferatif Etkisi

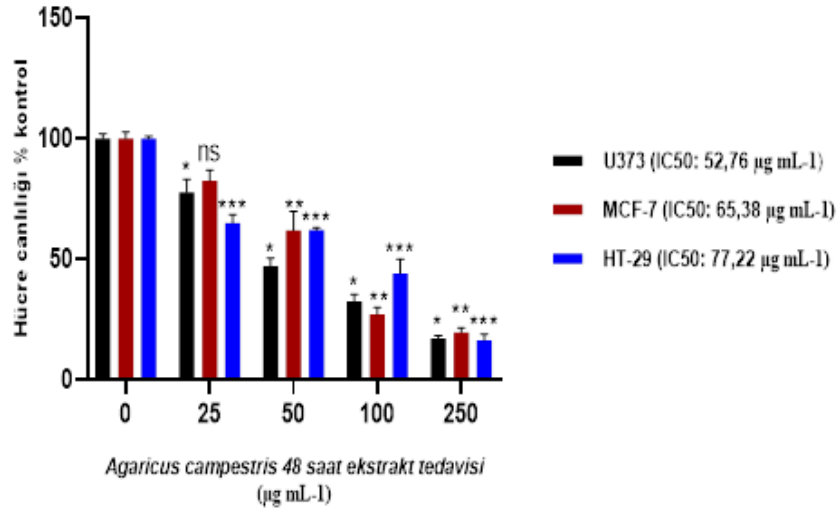
Kanser, dünya çapında ölümlerin ana nedenlerinden biridir. Geleneksel kanser tedavisinde kullanılan ajanların neden olduğu toksisite ve yan etkileri en aza indirmek için, doğal kaynaklı yeni moleküllerin keşfine karşı küresel bir eğilimin olduğu bilinmektedir (Erdoğan ve ark., 2020b). Mantarlar, büyük ve henüz geniş ölçüde kullanılmamış güçlü farmasötik bileşikler içermektedir (Liu ve ark., 2013). Yapılan güncel bir çalışmada, yabancı yenilebilir mantar olan *A. lanipes* türünün antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin yanı sıra *in vitro* koşullarda A549 akciğer kanseri hücre hattına karşı sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, *A. lanipes* metanolik özütünün, güçlü antimikrobiyal aktiviteye ve yüksek antiproliferatif etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, *A. lanipes* metanol ekstraktının pro-apoptotik Bax ve kaspaz-3 mRNA ekspresyon düzeylerinde artışla beraber Bcl-2 ekspresyonunda kayda değer düzeyde azalmaya neden olduğu ve apoptozisi indüklediği bildirmiştir (Kaygusuz ve ark., 2017). *A. blazei* türünün insan pankreatik kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, *A. blazei* sıcak su özütünün, G0/G1 hücre döngüsü tutuklaması ve kaspaz-bağımlı apoptozun indüksiyonu yoluyla kültürlenmiş pankreas kanseri hücrelerinin proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği bulunmuştur. *A. blazei* sıcak su özütü,

pankreas kanserinin tedavisi için yararlı olabilecek aktif bileşiklerin izolasyonu için potansiyel bir aday olduğu bildirilmiştir (Matsushita ve ark., 2018). Yapılan çalışmalar, *A. brasiliensis* ve *A. blazei* türlerinden elde edilen mantar ekstraktlarının oral kanser, hepatoselüler karsinom ve osteosarkom hücre tiplerine karşı çeşitli konsantrasyonlarda etkili olduğunu göstermiştir (Fan ve ark., 2011; Su ve ark., 2011). Diğer *Agaricus* cinsi mantarların antiproliferatif etkilerini ortaya koyan birçok çalışma olmasına rağmen, *A. campestris* türünün antiproliferatif etkisi hala belirsizliğini korumaktadır. Bu amaçla, *A. campestris* metanol ekstraktının doz ve zaman bağımlı olarak ( $0-250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) insan glioma, meme ve kolon kanseri hücre hatları (U373, MCF-7 ve HT-29) üzerindeki antiproliferatif etkileri incelenmiş ve bulgular Şekil 2’de gösterilmiştir. Artan AC konsantrasyonlara bağlı olarak, 24 ve 48 saatlik tedaviden sonra, WST-1 hücre proliferasyon deneyi ile hücrelerin kontrol grubuna göre canlılık yüzdesi belirlendi.  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ’lik AC tedavisinin, 24 saatlik tedavide U373 ve MCF-7 hatlarında hücre canlılığını kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalttığı, ancak U373 ve MCF-7 hücrelerinin canlılığındaki azalmanın aynı konsantrasyonda 48 saatlik tedavide daha zayıf olduğu belirlenmiştir. AC tedavisinin, U373, MCF-7 ve HT-29 hücre hatlarındaki  $IC_{50}$  değerlerini belirlemek için WST-1 hücre canlılığı sonuçları GraphPad Prism 8 programı kullanılarak analiz edildi. AC için  $IC_{50}$  değerleri 24 saatlik tedavide U373, MCF-7 ve HT-29 hücrelerinde sırasıyla 137.36, 175.19 ve  $52.62 \mu\text{g mL}^{-1}$  olarak saptanmıştır. Öte yandan aynı dozlarda 48 saatlik tedavi sonucunda  $IC_{50}$  değerleri U373, MCF-7 ve HT-29 hücrelerinde sırasıyla 52.76, 65.38 ve  $77.22 \mu\text{g mL}^{-1}$  olarak saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar, AC ile 48 saatlik tedavinin  $IC_{50}$  değerlerini 24 saatlik tedaviye kıyasla U373 ve MCF-7 hücrelerinde yarıdan daha fazla azalttığını göstermektedir. Ancak 24 saatlik tedavide en düşük  $IC_{50}$  değerine sahip olan HT-29 hücre hattında bu durumun tam aksi olarak arttığı belirlenmiştir. Sonuçlarımız, *A. campestris* metanol ekstraktının, U373, MCF-7 ve HT-29 hücre hatlarına karşı doz ve zaman bağımlı olarak antiproliferatif etki gösterdiğini açıkça ortaya koymaktadır (Şekil 2).

## A



## B



**Şekil 2.** *A. campestris* metanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının 24 (A) ve 48 (B) saatlik inkübasyon süresinde U373, MCF-7 ve HT-29 hücrelerin canlılığı üzerine etkisi (kontrol grubuna göre; \* $p < 0.05$  U373 hücre hattı için, \*\* $p < 0.05$  MCF-7 hücre hattı için, \*\*\* $p < 0.05$  HT-29 hücre hattı için, ns; fark istatistiksel olarak anlamlı değil).

## SONUÇ

Bu çalışmada, *A. campestris* türünün yağ asidi kompozisyonu, antioksidan ve antiproliferatif etkileri incelenmiştir. Toplam yağ asidi içeriğinin, insan diyetinde önemli bir yere sahip olan doymamış yağ asidi bakımından zengin olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca, *A. campestris* metanol ekstraktının önemli bir antioksidan kapasiteye sahip olduğu ve U373, MCF-7 ve HT-29 kanser hücre hatlarına karşı doz ve zaman bağımlı olarak antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. Mevcut sonuçlar, yenilebilir bir mantar olan *A. campestris* türünün yağ asitleri bakımından zengin olmasının yanı sıra, antioksidan ve antiproliferatif özellikler sergilediğini de göstermektedir.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Akata I, Ergonul B, Kalyoncu F, 2012. Chemical compositions and antioxidant activities of 16 wild edible mushroom species grown in Anatolia. *International Journal of Pharmacology*, 8(2): 134-138.
- Akata I, Zengin G, Picot CMN, Mahomoodally MF, 2019. Enzyme inhibitory and antioxidant properties of six mushroom species from the Agaricaceae family. *South African Journal of Botany*, 120: 95-99.
- Alves M, CFR Ferreira I, Dias J, Teixeira V, Martins A, Pintado M, 2013. A Review on Antifungal Activity of Mushroom (Basidiomycetes) Extracts and Isolated Compounds. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13(21): 2648-2659.
- Blois MS, 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617): 1199-1200.
- Brinkman MT, Karagas MR, Zens MS, Schned AR, Reulen RC, Zeegers MP, 2011. Intake of  $\alpha$ -linolenic acid and other fatty acids in relation to the risk of bladder cancer: results from the New Hampshire case-control study. *British journal of nutrition*, 106(7): 1070-1077.

- Chajès V, Sattler W, Stranzl A, Kostner GM, 1995. Influence of n-3 fatty acids on the growth of human breast cancer cells in vitro: Relationship to peroxides and Vitamin-E. *Breast Cancer Res Treat*, 34:199–212.
- Chamberland JP, Moon HS, 2015. Down-regulation of malignant potential by alpha linolenic acid in human and mouse colon cancer cells. *Familial Cancer*, 14(1): 25-30.
- Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM, 1994. Action of phenolic derivatives as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys*, 315(161):69-77.
- Dubey SK, Chaturvedi VK, Mishra D, Bajpey A, Tiwari A, Singh M P, 2019. Role of edible mushroom as a potent therapeutics for the diabetes and obesity. *3 Biotech*, 9(12): 450.
- Erdogan MK, Gecibesler IH, Behcet L, 2020a. Chemical constituents, antioxidant, antiproliferative and apoptotic effects of a new endemic Boraginaceae species: *Paracaryum bingoelianum*. *Results in Chemistry*, 2: 247-256.
- Erdogan MK, Agca CA, Gecibesler IH, 2020b. The antiproliferative potential of isolated emodin and aloe-emodin from *Rheum ribes* on different cancer cell lines. *Biological Diversity and Conservation*, 13(2): 159-167.
- Fan MJ, Lin YC, Shih HD, Yang JS, Liu KC, Yang ST, Chung JG, 2011. Crude extracts of *Agaricus brasiliensis* induce apoptosis in human oral cancer CAL 27 cells through a mitochondria-dependent pathway. *In vivo*, 25(3), 355-366.
- Gecibesler IH, Behcet L, Erdogan MK, Askin H, 2017. Antioxidant potencies and chemical compositions of essential oils of two endemic species grow in Turkey: *Astragalus ocephalus* subsp. *stachyophorus* and *Astragalus sericans*. *Progress in Nutrition*, 19: 60-67.
- Gecibesler IH, Demirtas I, Behcet L, 2018. Influence of Altitude on Chemical Variability of Volatile Profile for Endemic *Diplotaenia bingolensis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 54(3): 579-580.
- Glamočlija J, Stojković D, Nikolić M, Ćirić A, Reis FS, Barros L, Soković M, 2015. A comparative study on edible *Agaricus* mushrooms as functional foods. *Food & function*, 6(6): 1900-1910.
- Glumac M, Pejin B, Karaman M, Mojović M, Matavulj M, 2017. Lignicolous fungi hydrodistilled extracts may represent a promising source of natural phenolics. *Natural product research*, 31(1): 104-107.
- Harris IS, DeNicola GM, 2020. The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. *Trends Cell Biol*. 30:440-451.
- Karaman M, Tesanovic K, Gorjanovic S, Pastor FT, Simonovic M, Glumac M, Pejin B, 2019. Polarography as a technique of choice for the evaluation of total antioxidant activity: The case study of selected *Coprinus Comatus* extracts and quinic acid, their antidiabetic ingredient. *Natural Product Research*, 55:1-6.
- Kaygusuz O, Kaygusuz M, Dodurga Y, 2017. Assessment of the antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of the wild edible mushroom *Agaricus lanipes* (F.H. Møller & Jul. Schäff.) Hlaváček. *Cytotechnology* 69: 135-144.
- Kosanić M, Ranković B, Dašić M, 2012. Mushrooms as possible antioxidant and antimicrobial agents. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 11(4): 1095.
- Kozarski M, Klaus A, Jakovljevic D, Todorovic N, Vunduk J, Petrović P, Van Griensven L, 2015. Antioxidants of edible mushrooms. *Molecules*, 20(10): 19489-19525.
- Lindequist U, 2013. The merit of medicinal mushrooms from a pharmaceutical point of view. *International journal of medicinal mushrooms*, 15:517–523.
- Liu K, Wang J, Zhao L, Wang Q, 2013. Anticancer, antioxidant and antibiotic activities of mushroom *Ramaria flava*. *Food and chemical toxicology*, 58: 375-380.
- Liu Q, Zhu M, Geng X, Wang H, Ng TB, 2017. Characterization of polysaccharides with antioxidant and hepatoprotective activities from the edible mushroom *Oudemansiella radicata*. *Molecules*, 22(2): 234.
- Matsushita Y, Furutani Y, Matsuoka R, Furukawa T, 2018. Hot water extract of *Agaricus blazei* Murrill specifically inhibits growth and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *BMC Complement Altern Med.*, 18(1):319.
- Olcott HS, Einset E, 1958. An antagonistic effect with antioxidants for unsaturated fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 35(4): 159-160.

- Oyaizu M, 1986. Studies on products of browning reaction. The Japanese journal of nutrition and dietetics, 44(6): 307-315.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free radical biology and medicine, 26(9-10): 1231-1237.
- Su ZY, Tung YC, Hwang LS, Sheen LY, 2011. Blazeispirol A from Agaricus blazei fermentation product induces cell death in human hepatoma Hep 3B cells through caspase-dependent and caspase-independent pathways. Journal of agricultural and food chemistry, 59(9): 5109-5116.
- Suutari M 1995. Effect of growth temperature on lipid fatty acids of four fungi (Aspergillus niger, Neurospora crassa, Penicillium chrysogenum, and Trichoderma reesei). Archives of microbiology, 164(3): 212-216.
- Yılmaz N, Solmaz M, Türkekul İ, Elmastaş M, 2006. Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. Food Chemistry, 99(1): 168-174.
- Yin JIE, Becker EM, Andersen ML, Skibsted LH, 2012. Green tea extract as food antioxidant. Synergism and antagonism with  $\alpha$ -tocopherol in vegetable oils and their colloidal systems. Food chemistry, 135(4): 2195-2202.

**Atf İçin:** Varlı Y, 2021. İnsanların Siyanotoksinler ile Teması ve Sağlığa Etkileri. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 880-887.

**To Cite:** Varlı Y, 2021. Contact of People With Cyanotoxins and Effects on Health. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 880-887.

## İnsanların Siyanotoksinler ile Teması ve Sağlığa Etkileri

Yasemin VARLI<sup>1\*</sup>

**ÖZET:** Siyanobakteriler; gram negatif, 16S rRNA ve klorofil-a içeren, karbondioksit ve atmosferik azotu fiske edebilen, fotosentetik, organik karbon ve oksijen üretebilen tek prokaryotik organizmadır. Son yıllarda değişen iklim koşulları ve artan insan faaliyetleri, tüm dünyada zararlı siyanobakteriyel bloom oluşum sıklığını artırmaktadır. Siyanobakteriyel bloomlar, zararlı toksinler ve kötü kokulu bileşikler üreterek içme suyu ve eğlence suları için bir tehdit oluşturmaktadır. Ayrıca bloom oluşumu, hipoksiye ve ekosistemdeki besin ağının bozulmasına neden olur. Çeşitli çevresel faktörlerin siyanotoksin sentezinin düzenlenmesindeki rollerinin bilinmesi, toksik siyanobakteriyel bloomların etkin yönetimi için gereklidir. Siyanotoksinler, siyanobakterilerin çeşitli cinsleri tarafından üretilen sekonder metabolitler grubu olup algler, bitkiler, hayvanlar ve insan dâhil olmak üzere birçok ökaryotik organizma için son derece zehirlidir. Siyanotoksinler, gen kümeleri şeklinde organize olmuş bir grup gen tarafından kodlanan enzimlerle non-ribozomal olarak sentezlenirler. Siyanotoksin, gelişmenin tüm aşamalarında üretilmektedir. Bu derlemede, insanların siyanotoksinler ile teması ve sağlığa etkileri özetlenmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Siyanobakteri, siyanotoksin, insan sağlığı, toksikolojik risk

### Contact of People With Cyanotoxins and Effects on Health

**ABSTRACT:** Cyanobacteria is the only group of prokaryotic organisms containing gram negative, 16S rRNA and chlorophyll-a, capable of fixed carbon dioxide and atmospheric nitrogen, photosynthetic, producing organic carbon and oxygen. Recent years changing climatic conditions and increasing human activities in increase the frequency of harmful cyanobacterial “bloom” formation worldwide. Cyanobacterial “blooms” can produce harmful toxins and foul-smelling compounds, creating a threat to drinking and recreational waters. In addition, the formation of “bloom” causes hypoxia and food network degradation. Knowing the role of various environmental factors in the regulation of cyanotoxin synthesis is essential for the effective management of toxic cyanobacterial blooms. Cyanotoxins are a group of secondary metabolites produced by various strains of cyanobacteria and are highly toxic to many eukaryotic organisms, including algae, plants, animals and humans. Cyanotoxins are synthesized non-ribosomally by enzymes encoded by a group of genes organized in gene clusters. Toxin can be produced at all stages of development. In this review, the contact of people with cyanotoxins and their effects on health are summarized.

**Keywords:** Cyanobacteria, cyanotoxin, human health, toxicological risk

<sup>1</sup> Yasemin VARLI ([Orcid ID: 0000-0003-3944-1316](https://orcid.org/0000-0003-3944-1316)), Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Samsun, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Yasemin VARLI, e-mail: yaseminvarli@gmail.com

## GİRİŞ

Siyanobakteriler, yaklaşık 3.5 milyar yıl önce var olmuş fotosentetik prokaryotlardır. Dünyanın erken atmosferinde oksijen birikiminde önemli rol almışlardır. Böylece aerobik yaşam formlarının hayatta kalmasını uygun hale getirmiştir (Chaurasia, 2015). Siyanobakteriler; 16S rRNA ve klorofil-a içeren, karbondioksit ve atmosferik azotu fiske edebilen, fotosentetik, gram negatif, oksijen üretebilen organizmalardır. Siyanobakterilerin; tek hücreli, çok hücreli, kokoid, dallı filament, ototrofik, heterotrofik, psikrofilik, termofilik, asidofilik, alkalofilik olmak üzere çok çeşitli türleri vardır. Hem serbest hem de endosimbiont olarak bulunurlar (Thajuddin ve Subramanian, 2005). Siyanobakteriler birçok su ekosisteminde bulunurlar. Aşırı büyümeleri 'siyanobakteriyel bloom' olarak adlandırılır. Büyük siyanobakteriyel bloomlar; mortalite, ekosistem kararsızlığı ve siyanotoksinler olarak bilinen bileşiklerin üretimi gibi olumsuz çevresel etkilere yol açtıklarında "zararlı" olarak adlandırılırlar (Chorus ve Fastner, 2001).

Siyanobakterilerin pek çok cins ve türünün biyolojik olarak aktif sekonder bileşikler ürettiği bilinmektedir. Bu bileşiklerin pek çoğu, insan dâhil olmak üzere çeşitli organizmalarda son derece toksik olduğu kanıtlanmıştır (Pearson ve ark., 2010). Siyanobakterilerden izole edilen 800'den fazla sekonder metabolitin; antibakteriyel, antifungal, antiviral, antitümör, antiprotozoal, sitotoksik ve toksik etkileri yapılan araştırmalarla belirlenmiştir (Vijayakumar ve Menakha, 2015). Siyanotoksinler etkilerine göre hepatotoksinler (mikrosistin, nodularin ve cylindrospermopsin), nörotoksinler (anatoksin, saksitoksin ve  $\beta$ -Metilamino-L-alanin (BMAA)) ve dermatotoksinler (lyngbyatoksin ve aplysiatoksin) şeklinde sınıflandırılmaktadır. Siyanotoksinlerden, mikrosistin ve nodularinin etki mekanizması benzerdir. Mikrosistin ve nodularinin; karaciğer hasarı, gastrointestinal rahatsızlıklar ve ökaryotik protein fosfataz inhibisyonu gibi olumsuz etkileri görülmektedir. Anatoksin ve saksitoksin ise sinir hücrelerini etkileyerek sinir iletimini devre dışı bırakmaktadır.  $\beta$ -Metilamino-L-alanine (BMAA) maruziyetin insan motor nöron hastalığı olarak bilinen amiyotrofik lateral skleroza (ALS) neden olduğu rapor edilmektedir (Kaebernick ve Neilan, 2001).

İnsanlar ve hayvanlarda siyanobakteriyel zehirlenme vakaları ilk olarak on dokuzuncu yüzyılda rapor edilmiştir (Hunter, 1998; Koreiviené ve ark., 2014). O yıllardan beri, siyanobakterilerle temas eden insanlarda, memelilerde ve kuşlarda zehirlenme belirtilerinin yanı sıra ölüm raporları Dillenberg ve Dehnel (1960), Bartram ve Chorus (1999), Stewart ve ark. (2008) ve Giannuzzi ve ark. (2011) tarafından özetlenmiştir.

Siyanotoksinler, insanlarda hemodiyaliz yoluyla maruz kaldığında ölüme neden olabilir (Svirčev ve ark., 2009). Siyanotoksinlere maruz kaldıktan sonra hayvanlarda ve insanlarda, karın ağrısı, kusma, ishal, cilt tahrişi, halsizlik, boğaz ağrısı, soluk mukoza ve kas titremeleri gibi semptomlar gözlenmektedir (Bartram ve Chorus, 1999). Mikrosistinler (MC), sadece akut zehirlenmeye neden olma yetenekleri için değil; aynı zamanda içme suyunda düşük mikrosistin (MC) konsantrasyonlarına kronik maruz kalma yoluyla kansere neden olması ve potansiyel olarak teşvik etme yeteneklerinden dolayı dikkat çekmektedir (Lun ve ark., 2002; Maatouk ve ark., 2004). 2006 yılında Fransa'nın Lyon şehrinde, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC), mikrosistin-LR'nin insanlar için olası bir kanserojen olduğu sonucunu ortaya koyarak, grup 2B kanserojen olarak sınıflandırmıştır (Grosse ve ark., 2006). Siyanotoksinlerin, özellikle de mikrosistinlerin neden olduğu sağlık sorunları, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) önerdiği tolere edilebilir günlük alım (TDI) 0.04  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ve içme suyunda mikrosistin-LR değeri 1  $\mu\text{g}/\text{L}$  olarak belirlenmiştir (Drobac ve ark., 2013). Bu derleme, toksinlerin insanlara ulaşması için olası yollar olarak çeşitli sucul organizmalar, yenilebilir bitkiler, diyet takviyeleri ve içme suyu kaynaklarında siyanobakteriyel toksisite ve siyanotoksin birikimine odaklanmaktadır.



Siyanotoksinlere maruz kalma doğrudan veya dolaylı olarak ortaya çıkabilir. İnsanların siyanotoksinlere teması başlıca şu yollarla olmaktadır: kontamine içme suyunun yanlışlıkla vücuda alınması, soluk alma (inhalasyon) veya burun mukoza membranı ile temas, banyo, yüzme ve kano gibi eğlence aktiviteleri sırasında toksinler ile dermal temas, siyanotoksin içeren su ile sulanmış meyve ve kontamine olmuş sebzelerin tüketimi, kontamine sulara yaşayan akuatik (sucul) organizmaların tüketilmesi (balık, kabuklu deniz ürünleri v.s), siyanobakteri besin takviyelerinin oral yolla alımı (siyanotoksin düzeyleri kontrol edilemez ise), diyaliz ile spesifik intravenöz yol (damar içi yol) ile alınmasıdır. Araştırmalar ayrıca siyanotoksinlerin toksik etkilerinin besin zincirinde biyolojik olarak birikebileceğini göstermektedir (Koreiviené ve ark., 2014; Drobac ve ark., 2013; Dietrich ve ark., 2008).

### **Kontamine İçme Suyunun İçilmesi**

Kontamine içme suyunun içilmesi, siyanotoksinin vücuda alınmasının sık karşılaşılan bir yoludur. Su, siyanobakteriyel bloom sırasında su kaynağının yüzeyinden elde edilirse, hücrelerin parçalanması esnasında toksin salınımı ile suyun kontaminasyonu mümkündür. Sudan siyanotoksinlerin büyük miktarda alınımı veya uzun süreli küçük dozlarda alınımı yani kronik maruziyet sonucu insan sağlığı riskleri artmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar, içme suyundaki hepatotoksinlerin primer karaciğer kanseri (PLC) için risk faktörü olduğunu göstermektedir. Mikrosistin, primer karaciğer kanseri (PLC) gelişiminde önemli bir kimyasal ve dış faktör olabilir (Drobac ve ark., 2013; Svirčev ve ark., 2010).

### **Dermal Temas ve Nefes Alma Yolu ile Temas**

Dermal temas, siyanobakteriyel bloomun var olduğu eğlence sularında oluşur. Eğlence amaçlı sulara siyanobakteriyel toksin ile temas sonucunda şu semptomlar görülmektedir: derinin pul pul dökülmesi, astım, kuru öksürük, zatürre, kusma ve diğer gastrointestinal semptomlar, saman nezlesi, konjunktivit, kulak ve gözde tahriş, alerjik reaksiyonlar, şiddetli baş ağrısı, baş dönmesi, ağızda kabarcıktır, kas ağrısı. Hawaii, Japonya, Avustralya ve Florida'nın kıyı sularında bu belirtiler rapor edilmiştir (Stewart ve ark., 2006).

Rekreasyon sırasında, bir potansiyel temas yolu da inhalasyondur. Deniz ve tatlı su bloomlarına maruz kaldıktan sonra solunum zorluğu rapor edilmiştir. Mikrosistin-LR'nin farelere intranasal uygulaması; karaciğer hasarına ve burunda nekroza neden olmuştur (Metcalf ve ark., 2012).

### **Karasal ve Sucul Bitkiler Yolu ile Temas**

Bitkileri sulamada kullanılan suyun siyanobakteri içermesi ile veya sucul bitkiler doğrudan siyanotoksin ile temas edebilir. Böylelikle hem bitki verimi hem de kalitesi etkilenmektedir. Ayrıca mikrosistin absorpsiyonu tavsiye edilen tolere edilebilir sınırı aşarsa, toksinden etkilenen bitkiler, insan ve hayvan sağlığı için risk oluşturabilir (Drobac ve ark., 2013).

Daha önce yapılan araştırmalar siyanotoksinlerin bitkiler üzerine olumsuz etkileri olabileceğini ortaya koymaktadır. Fidelerin siyanotoksinlere maruz kalması, çeşitli karasal bitkilerin büyümesini inhibe etmektedir. Mikrosistin-LR gibi siyanobakteriyel ekstraktların; buğday (*Triticum durum*), mısır (*Zea mays*), bezelye (*Pisum sativum*) ve mercimek (*Lens esculenta*) gibi kültür bitkilerinin mineral besin alımı, verimlilik, fotosentez faaliyeti, büyüme ve gelişimini etkilediği görülmektedir (Saqrane ve ark., 2009). Sucul bitkilerin (hem su altı hem su üstü bitkileri), mikrosistin-LR'nin düşük dış konsantrasyonlarını absorbe ettiği ve toksini sürgün dokusunda biriktirdiği rapor edilmektedir. Sucul bitkiler mikrosistin-LR'ye maruz kaldığında, klorofil pigmentleri hasar gördüğünden, büyüme ve fotosentetik oksijen üretiminin de inhibe edildiği görülmüştür (Mitrovic ve ark., 2005; Chen ve ark., 2010). Peuthert ve ark. 2007 yılında yaptıkları çalışmada, on bir tarım bitkisinin fidelerinin kökleri tarafından mikrosistin-LR ve mikrosistin -LF alımı olduğunu rapor etmişlerdir. Sulama yoluyla mikrosistine maruz kalan kara bitkilerinin insan sağlığı üzerinde toksik etki gösterdiği ileri

sürülmektedir (Peuthert ve ark., 2007). Pirinç tarlalarındaki siyanobakteriler atmosferden azot fiksasyonu yaparak pirinç için önemli bir azot kaynağı sağlamaktadır. Ancak bu bitkilerin mikrosistin alım mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Drobac ve ark., 2013).

### Sucul Besin Ağı Yolu ile Temas

İnsanların tükettiği sucul hayvanlarda siyanotoksinlerin biyolojik birikimi meydana gelebilir. Mikrosistin, tatlı su karidesi (*Palemon modestus*, *Macrobrachium nipponensis*) ve kırmızı bataklık kerevitinde (*Procambarus clarkii*) tespit edilmiştir. Deniz ortamlarında ise saksitoksin inci istiridyede (*Pinctada maxima*) tespit edilmiştir (Chen ve Xie, 2005). Ayrıca silindrospermopsin, iki kabukluların hemolenfinde, iç organlarında, gonadlarında ve ayaklarında belirlenmiştir. Siyanotoksinlerin biyolojik birikimi ve insanlara ulaşması sucul besin ağı yoluyla sağlanır. Sucul besin ağının en üstünde yer alan balıklar, siyanotoksinlere en çok maruz kalırlar. Toksinin; balıkların karaciğer, kas, solungaç, bağırsak ve böbreklerinde biriktiği rapor edilmektedir. Balıklar, beslenme veya solunum yoluyla siyanotoksinlere maruz kalmaktadır (Negri ve ark., 2004; White ve ark., 2006).

Mikrosistin; karaciğerde protein fosfatazları inhibe ederek normal hücrel aktiviteyi bozmaktadır. Gelişmenin erken dönemlerinde (embriyonik) mikrosistine maruz kalma, normal embriyonik gelişmeyi bozabilir, hayatta kalma ve büyüme oranını düşürebilir ve bazı histopatolojik etkilere (genişlemiş ve opak vitellüs kesesi, küçükbaş, kavisli gövde ve kuyruk, hepatobiliyer anormallikler, hepatositlerde ultra yapısal değişiklikler, kalp atış hızı düzensizlikleri gibi) neden olabilir. Genç ve yetişkin balıklarda, mikrosistine maruziyet büyüme oranı ve osmotik regülasyonu etkileyebilir, kalp hızını ve serumdaki karaciğer enzim aktivitesini artırabilir; karaciğer, bağırsak, böbrek, kalp, dalak ya da solungaçlarda histopatolojik değişmelere neden olur; davranış değişikliği görülür. Bu anormallikler siyanotoksinin dozuna ve temas yoluna bağlı olarak değişmektedir (Malbrouck ve Kestemont, 2006). Düşük mikrosistin konsantrasyonuna maruziyet sonucu (10 µg-100 µg) sazan hepatositleri apoptoz yoluyla ölüme neden olurken, daha yüksek konsantrasyonlarda (1000 µg) ise nekroz yoluyla öldüğü görülmektedir (Götz ve ark., 2000). Histopatolojik araştırmalar, siyanobakteriyel toksinlerin balıkları öldürme yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir (Li ve ark., 2007).

Romo ve ark., 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada, *Liza* sp. (kefal) türlerinde balık dokularında toksin birikimini araştırmışlar ve karaciğer, bağırsak, solungaç ve kaslarda yüksek mikrosistin konsantrasyonlarını tespit etmişlerdir. Ayrıca farklı balık türlerinde, farklı miktarlarda mikrosistin birikimi olduğu rapor edilmektedir (Romo ve ark., 2012). Xie ve ark., 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada, mikrosistin içeriğinin karnivor balıkların kas ve karaciğerinde en yüksek olduğu ve bunu omnivor balıklar takip ederken, en düşük mikrosistin konsantrasyonunun ise herbivor balıklarda olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuç mikrosistin balıklarda besin zincirinde yukarı doğru artan bir birikim yaptığını göstermektedir (Xie ve ark., 2005).

### Siyanobakteriyel Besin Takviyeleri Yolu ile Siyanotoksinlere Temas

Siyanobakteriler, zengin protein içeriği nedeniyle besin takviyesi olarak kullanılmaktadır (örneğin *Spirulina*, *Nostoc*, *Aphanizomenon flos-aquae*). Siyanobakteri besin takviyeleri; detoksifikasyon, kilo kaybı, yüksek enerji gibi faydalı sağlık etkilerinden dolayı sanayileşmiş ülkelerde satılmaktadır. Ayrıca bu ürünlerin çoğu dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu olan çocuklarda farmakolojik tedavi amacıyla da kullanılmaktadır (Carmichael ve ark., 2000). Bu ürünler hap, kapsül ve toz haline getirilmekte ve doktor tavsiyesi olmadan tüketilmektedir. Bu ürünler doğal olduğu için güvenli olduğu kabul edilmekte ve dolayısıyla siyanobakteri besin takviyeleri yüksek dozlarda ve uzun süre kullanılmaktadır. Ancak siyanobakteri besin takviyelerinin; bulantı, kusma ve ishal gibi belirtiler dâhil olmak üzere sağlığa olumsuz etkileri olabilir. Bununla birlikte siyanobakteri besin takviye ürünlerinde

iz miktarda siyanotoksin bulunmuştur (Draisci ve ark., 2001; Ballot ve ark., 2004). *Spirulina* toksik değildir, ancak *Spirulina* tabanlı besin takviyelerinde epoksiyanotoksin-a ve dihydrohomoanatoksin-a tespit edilmiştir. Ayrıca *Spirulina* tabanlı besin takviyesi tüketiminin orta yaşlı Japonlarda karaciğer hasarına neden olduğu düşünülmektedir. *Aphanizomenon flos-aquae* türünün, anatoksin-a ve saksitoksinin yanı sıra  $\beta$ -Metilamino-l-alanin de (BMAA) ürettiği tespit edilmiştir. *Aphanizomenon flos-aquae*, genellikle doğal göllerde *Microcystis* gibi diğer siyanobakteriyel türlerle bir arada bulunur. Bu da siyanobakteri besin takviyesi tüketicilerinin, mikrosistin ve diğer toksinlere maruz kalabileceği anlamına gelmektedir (Ferreira ve ark., 2001; Iwasa ve ark., 2002; Cox ve ark., 2005).

### İntravenöz Yol ile Siyanotoksinlere Temas

1996 yılında Brezilya Caruaru'daki hemodiyaliz merkezinde meydana gelen bir vakada; rutin hemodiyaliz tedavisinden sonra hastaların çoğunluğu (131 hastadan 116'sı) görme bozukluğu, bulantı, kusma ve kas güçsüzlüğü yaşamıştır. Belirli bir süre sonra, 100 hastada akut karaciğer yetmezliği görülmüş ve Caruaru sendromu adı verilen bu vaka sebebiyle 52 hasta yaşamını yitirmiştir. Daha sonra yapılan incelemelerde mikrosistin, tüm hasta serumlarında ve karaciğer doku örneklerinde var olduğu belirlenmiştir. Mikrosistin, kliniğin su arıtma sistemindeki karbon ve reçinelerde de tespit edilmiştir. Ayrıca, siyanobakterilerin yerel su kaynaklarında önemli bir oranda mevcut olduğu ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak bu hastaların ölüm nedeninin mikrosistin (MC-YR, MC-LR, MC-AR) ile intravenöz maruziyet olduğu ifade edilmektedir (Drobac ve ark., 2013; Azevedo ve ark., 2002).

### SONUÇ

Bu derleme insanların çeşitli yollardan siyanotoksinlere maruz kalabileceğini göstermektedir. Suda yaşayan bazı hayvanlarda, yenilebilir bitkilerde ve besin takviyelerinde siyanotoksinlerin özellikle mikrosistinlerin (MC) birikmesi, mikrosistinlerin insan vücuduna girebileceği bir maruz kalma yolu olarak gıdaların önemi hakkında farkındalık oluşturmaktadır. Toksik siyanobakteriyel bloomun potansiyel etkilerini anlamak ve etkili şekilde yönetmek hayati önem taşır. Örneğin, içme suyu kontaminasyonu nadir görülen bir durumdur, ancak ortaya çıkarsa çok sayıda insanı etkileme potansiyeline sahiptir. Aksine, rekreasyona maruz kalma daha sık görülür, ancak herhangi bir olaydan etkilenen kişi sayısı çok daha düşüktür. Hemodiyaliz yoluyla (yani intravenöz maruziyet) zehirlenme nadirdir, ancak tedavide kullanılan su hacmi göz önüne alındığında, kontamine su potansiyel olarak çok sayıda kişiyi etkileyebilir ve ölümle sonuçlanabilir. Bu nedenle, sucul ortamları ve insan sağlığını korumak amacıyla ulusal ve uluslararası mevzuat ile risk yönetimi önlemlerinin oluşturulması ve uygulanması gerekmektedir.

### Çıkar Çatışması

Makaleye ait çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve makalenin yazılması aşamalarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederim.

### Yazar Katkısı

Makalenin planlanması, yürütülmesi ve yazılması makale tek yazarı olarak tarafımda yapıldığı beyan ederim.

### KAYNAKLAR

Azevedo SM, Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, Eaglesham GK, 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology*, 181:441-446.

- Ballot A, Krienitz L, Kotut K, Wiegand C, Metcalf JS, Codd GA, Pflugmacher S, 2004. Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in three alkaline Rift Valley lakes of Kenya-Lakes Bogoria, Nakuru and Elmenteita. *Journal of Plankton Research*, 26(8):925-935.
- Bartram J, Chorus I, 1999. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. CRC Press.
- Carmichael WW, Drapeau C, Anderson DM, 2000. Harvesting of *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Born. & Flah. var. *flos-aquae* (Cyanobacteria) from Klamath Lake for human dietary use. *Journal of applied phycology*, 12(6):585-595.
- Chaurasia A, 2015. Cyanobacterial biodiversity and associated ecosystem services: introduction to the special issue. *Biodiversity and Conservation*, 24(4):707-710.
- Chen J, Dai J, Zhang H, Wang C, Zhou G, Han Z, Liu Z, 2010. Bioaccumulation of microcystin and its oxidative stress in the apple (*Malus pumila*). *Ecotoxicology*, 19(4):796-803.
- Chen J, Xie P, 2005. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and-RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Toxicon*, 45(5):615-625.
- Chorus I, Fastner J, 2001. Recreational exposure to cyanotoxins. *Cyanotoxins: Occurrence, Causes. Consequences*, pp:190-199.
- Cox PA, Banack SA, Murch SJ, Rasmussen U, Tien G, Bidigare RR, Bergman B, 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(14):5074-5078.
- Dietrich DR, Fischer A, Michel C, Höger SJ, 2008. Toxin mixture in cyanobacterial blooms—a critical comparison of reality with current procedures employed in human health risk assessment. In *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*, pp. 885-912, Springer, New York, NY.
- Dillenberg HO, Dehnel MK, 1960. Toxic waterbloom in Saskatchewan, 1959. *Canadian Medical Association Journal*, 83(22):1151.
- Draisci R, Ferretti E, Palleschi L, Marchiafava C, 2001. Identification of anatoxins in blue-green algae food supplements using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants*, 18(6):525-531.
- Drobac D, Tokodi N, Simeunović J, Baltić V, Stanić D, Svirčev Z, 2013. Human exposure to cyanotoxins and their effects on health. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 64(2):305-315.
- Ferreira FM, Soler JMF, Fidalgo ML, Fernández-Vila P, 2001. PSP toxins from *Aphanizomenon flos-aquae* (cyanobacteria) collected in the Crestuma-Lever reservoir (Douro river, northern Portugal). *Toxicon*, 39(6):757-761.
- Giannuzzi L, Sedan D, Echenique R, Andrinolo D, 2011. An acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande Dam, Argentina. *Marine Drugs*, 9(11):2164-2175.
- Götz J, Probst A, Mistl C, Nitsch RM, Ehler E, 2000. Distinct role of protein phosphatase 2A subunit  $C\alpha$  in the regulation of E-cadherin and  $\beta$ -catenin during development. *Mechanisms of development*, 93(1-2):83-93.
- Grosse Y, Baan R, Straif K, Secretan B, Ghissassi FE, Coglianò V, 2006. Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *Lancet Oncology*, 7(8):628-629.
- Hunter PR, 1998. Cyanobacterial toxins and human health. In *Symposium Series-Society for Applied Bacteriology*, No. 27.

- Iwasa M, Yamamoto M, Tanaka Y, Kaito M, Adachi Y, 2002. Spirulina-associated hepatotoxicity. *The American journal of gastroenterology*, 97(12):3212.
- Kaebnick M, Neilan BA. 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS microbiology ecology*, 35(1):1-9.
- Koreivienė J, Anne O, Kasperovičienė J, Burškytė V, 2014. Cyanotoxin management and human health risk mitigation in recreational waters. *Environmental monitoring and assessment*, 186(7):4443-4459.
- Li XY, Wang J, Liang JB, Liu YD, 2007. Toxicity of microcystins in the isolated hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicology and environmental safety*, 67(3):447-451.
- Lun Z, Hai Y, Kun C, 2002. Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomedical and Environmental Sciences*, 15(2):166-171.
- Maatouk I, Bouaïcha N, Plessis MJ, Périn F, 2004. Detection by <sup>32</sup>P-postlabelling of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine in DNA as biomarker of microcystin-LR-and nodularin-induced DNA damage in vitro in primary cultured rat hepatocytes and in vivo in rat liver. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 564(1):9-20.
- Malbrouck C, Kestemont P, 2006. Effects of microcystins on fish. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25(1):72-86.
- Metcalf JS, Richer R, Cox PA, Codd GA, 2012. Cyanotoxins in desert environments may present a risk to human health. *Science of the Total Environment*, 421:118-123.
- Mitrovic SM, Allis O, Furey A, James KJ, 2005. Bioaccumulation and harmful effects of microcystin-LR in the aquatic plants *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza* and the filamentous alga *Chladophora fracta*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 61(3):345-352.
- Negri AP, Bunter O, Jones B, Llewellyn L, 2004. Effects of the bloom-forming alga *Trichodesmium erythraeum* on the pearl oyster *Pinctada maxima*. *Aquaculture*, 232(1-4):91-102.
- Pearson L, Mihali T, Moffitt M, Kellmann R, Neilan B, 2010. On the chemistry, toxicology and genetics on the Cyanobacterial toxins, Microcystin, nodularin, Saxitoxin and silindrospermopsin. *Marine Drugs*, 8(5):1650-1680.
- Peuthert A, Chakrabarti S, Pflugmacher S, 2007. Uptake of microcystins-LR and-LF (cyanobacterial toxins) in seedlings of several important agricultural plant species and the correlation with cellular damage (lipid peroxidation). *Environmental Toxicology: An International Journal*, 22(4):436-442.
- Romo S, Fernández F, Ouahid Y, Barón-Sola Á, 2012. Assessment of microcystins in lake water and fish (*Mugilidae*, *Liza* sp.) in the largest Spanish coastal lake. *Environmental monitoring and assessment*, 184(2):939-949.
- Saqrane S, Ouahid Y, El Ghazali I, Oudra B, Bouarab L, del Campo FF, 2009. Physiological changes in *Triticum durum*, *Zea mays*, *Pisum sativum* and *Lens esculenta* cultivars, caused by irrigation with water contaminated with microcystins: a laboratory experimental approach. *Toxicon*, 53(7-8):786-796.
- Stewart I, Seawright AA, Shaw GR, 2008. Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds—an overview. In *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. Springer, pp. 613-637, New York, NY.
- Stewart I, Webb PM, Schluter PJ, Shaw GR, 2006. Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria—a review of anecdotal and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment. *Environmental Health*, 5(1):6.

- Svirčev Z, Krstič S, Miladinov-Mikov M, Baltić V, Vidović M, 2009. Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia. *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 27(1):36-55.
- Svirčev Z, Baltić V, Gantar M, Juković M, Stojanović D, Baltić M, 2010. Molecular aspects of microcystin-induced hepatotoxicity and hepatocarcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 28(1):39-59.
- Thajuddin N, Subramanian G, 2005. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science*, 89(1):47-57.
- Vijayakumar S, Menakha M, 2015. Pharmaceutical applications of cyanobacteria-A review. *Journal of Acute Medicine*, 5(1):15-23.
- White SH, Duivenvoorden LJ, Fabbro LD, Eaglesham GK, 2006. Influence of intracellular toxin concentrations on cylindrospermopsin bioaccumulation in a freshwater gastropod (*Melanoides tuberculata*). *Toxicon*, 47(5):497-509.
- Xie L, Xie P, Guo L, Li L, Miyabara Y, Park HD, 2005. Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 20(3):293-300.

## Inactivation of Some Pathogens Inoculated to Noodle by *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry Essential Oil

Elif Ayşe ERDOĞAN ELİUZ<sup>1\*</sup>, Yusuf SICAK<sup>2</sup>

**ABSTRACT:** In this study, it was aimed the the efficacy of *Syzygium aromaticum* essential oil (EO) on inactivation of *Escherichia coli* (ATCC 25293), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25925) inoculated to noodle was investigated by dip incubation method. The components of *S. aromaticum* EO were analyzed by GC-MS and found the main components as eugenol, (Z)-9,17-octadecadienal (25.96%), (-)-caryophyllene (5.29%), and acetugenol. Broth Microdilution and Agar Well Diffusion Method were used for antibacterial activity of *S. aromaticum* EO. Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of *S. aromaticum* were 14.8 mg mL<sup>-1</sup> for *E. coli*, 10.98 mg mL<sup>-1</sup> for *K. pneumoniae*, 9.29 mg mL<sup>-1</sup> for *B. subtilis*, and 9.8 mg mL<sup>-1</sup> for *S. aureus*, while the inhibition zones were between 3 mm and 7.1 mm for the pathogens. In the study, 100 µL of clove oil have 100% inhibition effect on *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *S. aureus* attached to the noodle. However, *B. subtilis* was found to be quite resistant. As a result, the essential oil appears to be effective against both Gram-negative and Gram-positive bacteria.

**Keywords:** *Syzygium aromaticum*, essential oil, antimicrobial, food pathogens, noodle

<sup>1</sup> Elif Ayşe ERDOĞAN ELİUZ ([Orcid ID: 0000-0003-4317-3000](https://orcid.org/0000-0003-4317-3000)), Mersin University, Technical Sciences Vocational School, Department of Food Technology, TR-33343, Mersin, Turkey

<sup>2</sup> Yusuf SICAK ([Orcid ID: 0000-0003-2339-5837](https://orcid.org/0000-0003-2339-5837)), Muğla Sıtkı Koçman University, Vocational School of Koycegiz, Department of Herbal and Animal Production, Muğla, Turkey

\*Corresponding Author: Elif Ayşe ERDOĞAN ELİUZ, e-mail: eliferdogan81@gmail.com

## INTRODUCTION

Foodborne infections pose a significant danger to consumers. Therefore, one of the most important issues in the food industry is hygiene and sanitation. Various chemicals are used for pathogenic microorganisms carried by food, but antimicrobial agent research has gained continuity due to the development of resistance of microorganisms against them (Stermitz et al., 2000; Shan et al., 2007). The indicator microorganisms used in relation to hygiene practices are *S. aureus* and *Bacillus* strains (Pamuk et al., 2018) in the food industry and *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* found in the industrial wastewater (Guan and Holey, 2003; Cabral et al., 2010). Contamination of ready-to-eat foods with *S. aureus* is common during slicing, cooking or packaging of food and the its resistance to dry and stressful environments poses a threat to human health (Chaibenjwong and Foster, 2011; Syne et al., 2013). Another bacterial group important for food contamination is *Bacillus* species. Many species such as *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* are well known as a cause of food-associated illness (Logan, 2012). In present study, we studied four important food pathogens and they can cause serious problems in the food industry. Previously, they have been shown to be isolated from cereal products such as, noodles (Rong and Xu-Hui, 2012), flour and bulgur (Yurdakul et al. 2017, Çetinkaya 2019).

Many herbs that have medicinal uses and that we use as spices have important pharmacological components due to their aromatic properties. Year by year, interest in active ingredients obtained from plants and their antimicrobial activities have increased due to the problem of bacteria gaining resistance to antimicrobial agents (Notermans et al., 1991; Shan et al., 2007). Among medicinal plants, *S. aromaticum* (synonym: *Eugenia caryophyllata*), known as the clove tree and belongs to Myrtaceae family, is common in many countries such as East Indonesia, Sri Langka, Brazil, Jamaica, Turkey (Burt and Reinders 2003; Sohilit, 2015). Clove plant have been used commonly in fragrance and flavouring industries besides cooking as spice. Medically, it has the effect of relieve pain and promote healing because of significant biological components (Chaieb et al., 2017). Furthermore, its bioactive compounds have antimicrobial (Pundir et al., 2010), anti-inflammatory (Ozturk and Ozbek, 2005) and antioxidant (Jirovetz et al., 2006) properties.

As far as we know, paper related to the inactivation of pathogens contaminated with any food with clove oil is very few (Omidbeygi et al., 2007; Mytle et al., 2006). With this study, it was first investigated the inhibition performance of *S. aromaticum* against *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, and *S. aureus* on noodle.

## MATERIAL AND METHODS

### Preparing the *S. aromaticum* Essential Oil and GC-MS Analysis

*S. aromaticum* was collected from Köyceğiz/Muğla in 2018. Approximately, 500 grams of *S. aromaticum* seed sample was used for the essential oil extraction process. Solvent-extraction method was performed using a hydrodistillation with pure water for 2 hours. The mixture added to hexane. After liquid-liquid extraction, the aqua in organic phase was dried over anhydrous  $MgSO_4$ . The essential oil (EO) was concentrated after the solvent of organic phase was evaporated using the rotary evaporator under vacuum. Obtained essential oil was kept in desiccator. It was protected from sunlight until analysis. The components of *S. aromaticum* EO were analysed by GC-MS 7890A-(5975C inert MSD) instrument equipped with 30m X 250  $\mu m$  film X 0.25  $\mu m$ -thickness column (Agilent 19091S-433) with helium carrier gas. The EO was eluted for 64 minutes of retention time using initial temperature of 60°C for 5 min and temperature was raised to 150°C by an increase of 3°C for 2 min, by 3°C  $min^{-1}$  to 200°C, by 4°C  $min^{-1}$  to 240°C. The components of *S. aromaticum* EO were performed based on the mass spectra library (Wiley Registry 9th/NIST 2011 database, W9N11.L) (Yabalak, 2018).



### Antibacterial Screening

To the antimicrobial tests, *E. coli* (ATCC 25293), *K. pneumoniae* (ATCC 10031), *B. subtilis* (ATCC 6633), *S. aureus* (ATCC 25923) were taken from Refik Saydam Hifzıssıhha Centre (Ankara/Turkey). The inoculums of *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, and *S. aureus* were prepared in 4 mL Tryptic Soy Broth and incubated at 37°C, overnight. Then, the bacteria suspensions were adjusted to 0.5 McFarland Standard Turbidity and stored at +4°C until experiments (Sıcak and Erdogan Eliuz, 2019).

### Broth Microdilution Method and Well Diffusion Method

According to Broth Microdilution, the two-fold serial dilutions of 50 µL *S. aromaticum* EO (1.160 g mL<sup>-1</sup> in DMSO 10%) was performed into 96-well plates which was previously added 50 µL of MHB (Mueller Hinton Broth) medium along from 2nd to 10th columns. There are only MHB and microbe in 11 and 12 well as as negative control. Then, 5 µL culture of bacteria were inoculated in all wells except negative control. The plates were incubated at 37°C for 24 h and MIC (Minimum Inhibitory Concentration) was calculated as the lowest concentration where no visible turbidity was observed in each row of the 96-well plate (Patton et al., 2006; Sıcak and Erdogan, 2019).

To determine of inhibition zone of *S. aromaticum* on *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, and *B. subtilis* were used Well Diffusion Method. For this, the bacteria cultures at stationary phase were spread onto Mueller Hinton Agar plates (MHA) and 6 mm-wells were drilled into the middle of petri. The 50 µL of *S. aromaticum* EO placed in the wells and incubated at 37°C during 24 h, calculated clear zones (Sıcak and Erdogan Eliuz, 2019). As positive control, Ampicillin was used for bacteria and the experiments were repeated three times.

### Inactivation Method of Pathogens on Noodle by *S. aromaticum* EO

The inoculation of *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, and *S. aureus* to noodle was made using dip inoculation method (Singh et al., 2002). According this method, 0.02 g sample of noodle was dipped into 500 µL of inoculum (approximately 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup>) prepared before and then shaken gently using a shaker incubator at 120 rpm for 1 min at 25°C to homogeneous distribution of organisms. At the end of each treatment, noodle was drained and washed immediately with 500 µL of sterile saline (0.9%) with agitation (120 rpm) for 1 min to remove residual oil. Then, three different amounts of *S. aromaticum* EO (50 µL, 1 mL and 1.5 mL) were added to the eppendorf with noodle and shaken (120 rpm) for 1 min. Then, noodles were transferred by sterile spatula into the eppendorf which is added previously 1 mL 0.9% saline. The eppendorf was mixed during 2 min and noodle was removed. Then, serial dilution (10<sup>-6</sup>) of the liquid in the eppendorf was made with sterile 0.9% saline solution. To enumeration of surviving microorganisms, 0.1 ml sample was spread-plated on MHA. After the incubation of bacteria at 37°C and 24 h, the colonies were counted and logarithmic reduction were measured. The negative control was noodle without inoculation and the aqueous treatment.

### Statistical Analysis

Statistical analyses and significance of MICs and Inhibition zone (IZ) were measured by Tukey test in one-way analysis of variance using SPSS 25 ( $p \leq 0.05$ ). The experiments were repeated three times.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Chemical Composition of *S. aromaticum* EO

The components of *S. aromaticum* were detected by GC-MS. The results of the chemical composition of *S. aromaticum* were presented in Table 1. *S. aromaticum* EO contained predominantly

eugenol (60.34%), (Z)-9,17-octadecadienal (25.96%), (-)-caryophyllene (5.29%), and acetugenol (4.99%). The other components were eucalyptol, *p*-menthan-3-one,  $\beta$ -selinene, calamenene, (-)-caryophyllene oxide.

**Table 1.** Chemical composition of *S. aromaticum* EO

| <sup>a</sup> RI | Compound                | % <sup>b</sup> RA |
|-----------------|-------------------------|-------------------|
| 1027            | Eucalyptol              | 0.07              |
| 1152            | <i>p</i> -Menthan-3-one | 0.29              |
| 1370            | Eugenol                 | 60.34             |
| 1416            | Caryophyllene           | 5.29              |
| 1451            | $\beta$ -Selinene       | 0.60              |
| 1521            | Calamenene              | 0.18              |
| 1531            | Acetugenol              | 4.99              |
| 1581            | (-)-Caryophyllene oxide | 0.29              |
| 2476            | (Z)-9,17-Octadecadienal | 25.96             |

<sup>a</sup>Retention Index. <sup>b</sup>Relative area (peak area relative to the total peak area).

### Antimicrobial Activity of *S. aromaticum* EO

The results showed that *S. aromaticum* EO was effective against *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, and *S. aureus* by broth microdilution and well diffusion method (Table 2). Any statistically significant difference did not see between the MICs of the oil against the pathogens. The MICs of *S. aromaticum* on *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* and *S. aureus* were 14.8, 10.98, 9.29, 9.8 mg mL<sup>-1</sup>, respectively. According to well diffusion method, IZs of the oil were 3.01 mm for *E. coli*, 5.02 mm for *K. pneumoniae*, 3.80 mm for *B. subtilis* and 7.1 mm for *S. aureus*. Statistically, there was a significant difference between *E. coli* (3.01 mm) and *S. aureus* (7.1 mm) IZs (Figure 1).

Many papers in different countries have shown that the main components are eugenol,  $\beta$ -caryophyllene and caryophyllene oxide although the minor components of clove oil differs, as in our work (Bhuiyan et al., 2010; Razafimamonjison et al., 2014; Sohilit, 2015). For instance, the major compounds in EO of *Eugenia caryophyllata* was identified as eugenol (78.72%) and  $\beta$ -caryophyllene (17.49%) and the antimicrobial performances of these two components have been previously reported (Marchese et al., 2017). *Syzygium polyanthum*, contained cis-4-decanal, 1-decyl aldehyde, and capryl aldehyde, and *Syzygium polyanthum*, contained *p*-eugenol and  $\beta$ -caryophyllene, were not inhibited *E. coli*. However, *B. subtilis* and *S. aureus* were inhibited with between MIC of 31.25 and 250  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> (Hamad et al., 2017). In this study, all three bacteria were strongly inhibited with MIC of >9 mg mL<sup>-1</sup> and IZ>3 mm by *S. aromaticum* EO that contain mostly eugenol and 9,17-octadecadienal. In another study, MICs of *Eugenia caryophyllata* were reported to be 1  $\mu$ l mL<sup>-1</sup> for *S. aureus*, *K. pneumoniae* and *B. cereus*, while it was 2  $\mu$ l mL<sup>-1</sup> for *E. coli*. In the same study, IZs were between 17 mm and 30 mm for these pathogens (Mahboubi and Mahboubi, 2015). In addition, infusion, decoction and oil of clove were reported that inhibits Gram negative bacteria including *E. coli* and *K. pneumoniae* 8 mm and 23.75 mm (Saeed and Tariq, 2008). Differences in MIC and IZ levels may be caused by interactions with minor compounds other than eugenol.

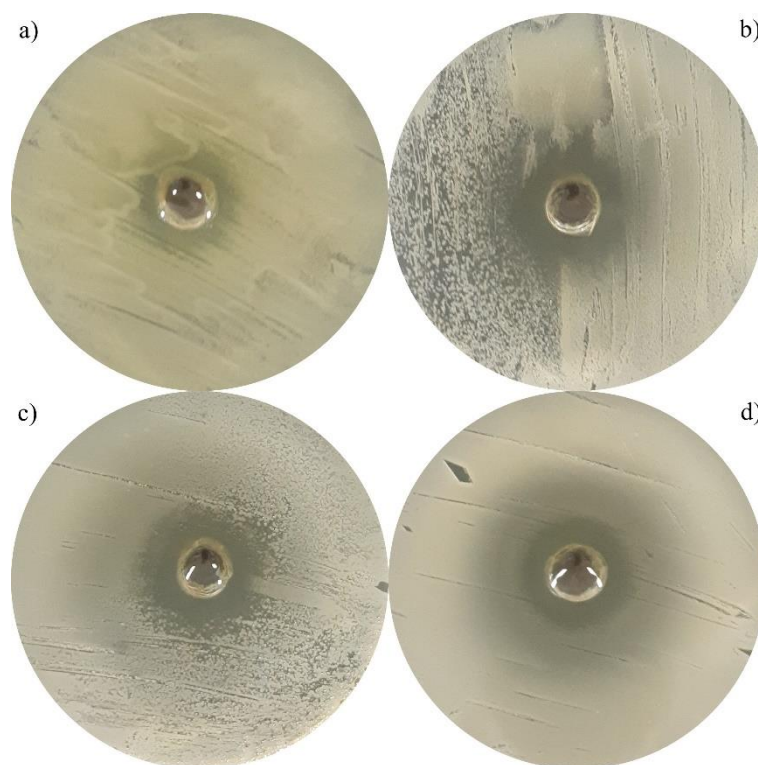
In our study, the pathogens were almost susceptible against *S. aromaticum* as in some studies, while *Eugenia caryophyllata* extract inactivated *B. cereus*, *S. aureus* and *E. coli* (Shan et al., 2007). The essential oil of clove essential oil was found to be quite effective against *B. cereus* and *E. coli*, However, *E. coli* O 157 and *K. pneumoniae* were moderately sensitive to the oil (Badhe et al., 2013). Mostafa et

al. (2018), showed that *B. cereus*, *S. aureus* and *E. coli* were susceptible with >11.9 mm IZs against *S. aromaticum*.

**Table 2:** MIC and IZ of *S. aromaticum* EO against *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* and *B. subtilis*.

|                               | EO-MIC (mg mL <sup>-1</sup> ) | A-MIC (µg mL <sup>-1</sup> ) | EO-IZ (mm)               | A-IZ (mm)   |
|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------|-------------|
| <i>E. coli</i> Gram (-)       | 14.8 <sup>a</sup> ±0.12       | 16 ±0.22                     | 3.01 <sup>a</sup> ±0.04  | 10.1±0.03   |
| <i>K. pneumoniae</i> Gram (-) | 10.98 <sup>a</sup> ±0.11      | 16 ±0.08                     | 5.02 <sup>ab</sup> ±0.03 | 12.04 ±0.04 |
| <i>B. subtilis</i> Gram (+)   | 9.29 <sup>a</sup> ±0.09       | 32 ±0.01                     | 3.80 <sup>ab</sup> ±0.02 | 4.3 ±0.01   |
| <i>S. aureus</i> Gram (+)     | 9.8 <sup>a</sup> ±0.23        | 32±0.03                      | 7.1 <sup>b</sup> ±0.02   | 7.7 ±0.02   |

The mean MICs and IZs were expressed with the standard deviation (±) and significance level (ANOVA, 25; 0.05, Tukey test). In the same column, values marked with different exponential letters differ statistically at 0.05 level. A: Ampicillin: 16 µg/mL



**Figure 1:** The images of tolerance and sensitivity levels of *E. coli* (a), *K. pneumoniae* (b), *B. subtilis* (c) and *S. aureus* (d) in exposure to *S. aromaticum*.

In this paper, the MICs of *S. aromaticum* EO (<15 mg mL<sup>-1</sup>) were found to be higher than the MICs of Sethi et al. (2013), study which methanol extract of *S. aromaticum* were researched (MIC > 75 mg mL<sup>-1</sup>) against bacteria. In this case, it can be said that its essential oil is more effective.

#### Inactivation Method of Pathogens on Noodle by *S. aromaticum* EO

Inactivation of *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, and *S. aureus* inoculated to noodle by *S. aromaticum* EO at 50 µL, 100 µL and 150 µL were investigated by dip inoculation method (Table 3). *S. aromaticum* EO at 50 µL caused between 0.4 and 8.0 log reduction all pathogens. Log reduction of *E. coli*, *K. pneumoniae* and *S. aureus* colony, at 50 µL and 100 µL of the EO, were 8.0 CFU mL<sup>-1</sup>. However, log reduction of *B. subtilis* at 50 µL, 100 µL and 150 µL of the EO were 0.4, 0.8 and 0.9 CFU mg<sup>-1</sup>.

**Table 3:** Log reduction in *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, and *S. aureus* on noodle by *S. aromaticum* EO

|                      | Log reduction (CFU mg <sup>-1</sup> )         |                        |        |
|----------------------|---|------------------------|--------|
|                      | <i>S. aromaticum</i> EO (g mL <sup>-1</sup> ) |                        |        |
|                      | 50µL  | 100µL                  | 150 µL |
| <i>E. coli</i>       | 1.7   | 8.0                    | 8.0    |
| <i>K. pneumoniae</i> | 1.5   | 8.0                    | 8.0    |
| <i>S. aureus</i>     | 8.0   | 8.0                    | 8.0    |
| <i>B. subtilis</i>   | 0.4   | 0.8                    | 0.9    |
| Control*             |   | ~1.5 x 10 <sup>8</sup> |        |

\*Starting population

With this study, it was shown that the number of *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, and *S. aureus* on noodle can be reduced by applying *S. aromaticum* EO. In the study, after 100 µL of clove oil, we can say about a 100% effect on *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *S. aureus*. However, *B. subtilis* attached to the noodle was found to be quite resistant.

## CONCLUSIONS

The oil appears to be rather effective against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. This study indicates that the essential oil of *S. aromaticum* has antibacterial effect on *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, and *S. aureus*. At the same time, to reduce the risk of these pathogens multiplying on noodle, *S. aromaticum* EO components may be an alternative.

## ACKNOWLEDGEMENT

Thank to Mersin University Advanced Technology Education Research and Application Center for GC-MS analysis.

## Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

## Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

## REFERENCES

- Badhe S, Fairoze MN, Raghunath BV, Sudharshan S, Ruban W, Chandrashekar V, 2013. Evaluation of antimicrobial efficacy of aqueous extract and essential oil of clove (*Eugenia caryophyllata* thund) in chicken meat against various food born pathogens. *Journal of Cell and Tissue Research*, 13(1): 3507-3511.
- Bhuiyan, NI, Begum J, Nandi NC, Akter F, 2010. Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (*Syzygium aromaticum*, L. Alston), *African Journal of Plant Science*, 4(11): 451-454.
- Burt SA, Reinders RD, 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 36(3): 162-167.
- Cabral JPS, 2010. Water Microbiology, Bacterial Pathogens and Water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(10): 3657-3703.
- Chaibenjawong P, Foster SJ, 2011. Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Archives of Microbiology*, 193(2): 125-135.

- Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi AB, Rouabhia M, Mahdouani K, Bakhrouf A, (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(6): 501-506.
- Guan TY, Holley RA, 2003. Pathogen Survival in Swine Manure Environments and Transmission of Human Enteric Illness-A Review. *Hog Manure Management, the Environment and Human Health*, 32: 51-71.
- Hamad A, Mahardika MGP, Yuliani I, Hartanti D, 2017. Chemical constituents and antimicrobial activities of essential oils of *Syzygium polyanthum* and *Syzygium aromaticum*. *Rasayan Journal of Chemistry*, 10(2): 564 – 569.
- Jirovetz L, Buchbauer G, Stoilova I, Stoyanova A and Schmidt E, 2006. Chemical composition and antioxidant properties of clover leaf essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 6303-6307.
- Logan NA, 2012. *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *Journal of Applied Microbiology*, 113:417-429.
- Mahboubi M, Mahboubi M, 2015. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Eugenia caryophyllata* essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18 (4): 967 - 975.
- Marchese A, Barbieri R, Coppo E, Orhan IE, Daglia M, Nabavi SF, Izadi M, Abdollahi M, Nabavi SM, Ajami M, 2017. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Journal Critical Reviews in Microbiology*, 43(6): 668-689.
- Mostafa AA, Al-Askar AA, Almaary, KS, Dawoud TM, Sholkamy EN, Bakri MM, 2018. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2): 361-366.
- Mytle N, Anderson GL, Doyle MP, Smith MA, 2006. Antimicrobial Activity of Clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters, *Food Control*, 17(2):102-107.
- Notermans S, Dormans JAMA, Mead GC, 1991. Contribution of surface attachment to the establishment of microorganisms in food processing plants: A review. *Biofouling*, 5(1-2): 21-36.
- Omidbeygi, M, Mohsen B, Zohreh H, and Hassanali N, 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste, *Food Control*, 18(12):1518-1523.
- Ozturk A, Ozbek H, 2005. The Anti-inflammatory activity of *Eugenia caryophyllata* essential oil: An animal model of antiinflammatory activity, *European Journal of General Medicine*, 2(4): 159-163.
- Pamuk Ş, Erdoğan M, Yıldırım Y, Hızlısoy H, AS, Sepin Ö, 2018. Üniversite Kampüs Kantinlerindeki Gıdaların Mikrobiyolojik Kalitesinin ve Gıda Çalışanlarının El Hijyen Durumlarının Değerlendirilmesi. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 11(4): 363-373.
- Patton T, Barrett J, Brennan J, Moran N, 2006. Use of a Spectrophotometric Bioassay for Determination of Microbial Sensitivity to Manuka Honey. *Journal of Microbiological Methods*, 64(1):84-95
- Pundir RK, Jain P, Sharma C, 2010. Antimicrobial activity of ethanolic extracts of *Syzygium aromaticum* and *Allium sativum* Against food associated bacteria and fungi, *Ethnobotanical Leaflets*, 14: 344-360.
- Razafimamonjison G, Jahiel M, Duclos Th, Ramanoelia P, Fawbush F, Danthu P, 2014. Bud, leaf and stem essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from Madagascar, Indonesia and Zanzibar. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(3): 224-233.

- Rong C, Xu-Hui T, 2012. Monitoring of food-borne pathogens in Yongzhou City in 2011. Practical Preventive Medicine, Abstract.1.
- Saeed S, Tariq P, 2008. *In vitro* antibacterial activity of clove against gram negative bacteria. Pakistan Journal of Botany, 40(5): 2157-2160.
- Sethi S, Dutta A, Lal Gupta B, Gupta S, 2013. Antimicrobial activity of spices against isolated food borne pathogens. International Journal of Pharmaceutics, 5: 260-262.
- Shan B, Cai YZ, Brooks JD, Corke H, 2007. The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. International Journal of Food Microbiology, 117: 112-119.
- Sıcak Y, Erdoğan Eliuz EA, 2019. Chemical content and biological activity spectrum of *Nigella sativa* seed oil. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi, 22: 928-934.
- Singh N, Singh RK, Bhunia AK, Stroshine, RL, 2002. Effect of inoculation and washing methods on the efficacy of different sanitizers against *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce. Journal of Food Microbiology, 19:183-193.
- Sohilait JH, 2015. Chemical Composition of the Essential Oils in *Eugenia caryophyllata*, Thunb from Amboina Island. Journal of Chemical Sciences, 3(6): 95-99.
- Stermitz FR, Tawara-Matsuda J, Lorenz P, Mueller P, Zenewicz L, Lewis K, 2000. 5-methoxyhydnocarpin-D and pheophorbide A: berberis species components that potentiate berberine growth inhibition of resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Natural Products, 63: 1146-1149.
- Syne SM, A Ramsubhag, Adesiyun AA, 2013. Microbiological hazard analysis of ready-to-eat meats processed at a food plant in Trinidad, West Indies, Infection Ecology and Epidemiology, 3(1): 1-12.
- Yabalak E, (2018) Radical scavenging activity and chemical composition of methanolic extract from *Arum dioscoridis* Sm. var. *dioscoridis* and determination of its mineral and trace elements. Journal of the Turkish Chemical Society Section A, 5: 205-218.

**Atuf İçin:** Çöğender ME, Arslan NP, Aydoğan MN, 2021. Lokal olarak izole edilen fosfat çözücü *Pseudomonas aeruginosa* IBP26' nın nohut fidelerinin büyüme parametreleri üzerine etkisi. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 896-905.

**To Cite:** Çöğender ME, Arslan NP, Aydoğan MN, 2021. Effect of locally isolated phosphate-solubilizing *Pseudomonas aeruginosa* IBP26 on the growth parameters of chickpea seedling. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 896-905.

### Effect of locally isolated phosphate-solubilizing *Pseudomonas aeruginosa* IBP26 on the growth parameters of chickpea seedling

Muhammed Emin ÇÖĞENDER<sup>1</sup>, Nazlı Pınar ARSLAN<sup>2</sup>, Mehmet Nuri AYDOĞAN<sup>1\*</sup>

**ABSTRACT:** This work was conducted to examine the effect of locally isolated phosphate-solubilizing bacteria on the growth parameters of chickpea seedling cultivated in pots containing Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (tricalcium phosphate). Among the isolated strains, the highest phosphate-solubilizing activity in the broth medium was observed for the isolate IBP26. Similarly, in the greenhouse study, the same isolate was determined to cause maximum increases in growth parameters (shoot and root length, total biomass, phosphorus, total sugar, and protein contents) of chickpea plants in the presence of Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. The isolate IBP26 was identified as *Pseudomonas aeruginosa* (GenBank accession number: MW092004). Experiments demonstrated that the application of the bacterium alone in the absence of Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> or the application of Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> alone in the absence of bacterium did not cause significant change in growth parameters of the chickpea plants, and that the desired increases in the growth parameters of these plants could be achieved by the co-application of bacterium and Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa* IBP26, phosphate solubilization, chickpea, growth parameters.

### Lokal olarak izole edilen fosfat çözücü *Pseudomonas aeruginosa* IBP26' nın nohut fidelerinin büyüme parametreleri üzerine etkisi

**ÖZET:** Bu çalışma, lokal olarak izole edilmiş fosfat çözücü bakterilerinin, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (trikalsiyum fosfat) içeren saksılarda yetiştirilen nohut fidelerinin büyüme parametreleri üzerindeki etkisini incelemek için yapılmıştır. İzole edilen suşlar arasında, sıvı kültürde en yüksek fosfat çözüdürücü aktivite IBP26 izolatu için gözlenmiştir. Benzer şekilde, sera çalışmasında da, aynı izolatu Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> varlığında nohut bitkilerinin büyüme parametrelerinde (sürgün ve kök uzunluğu, biyokütle, fosfor, toplam şeker ve protein içeriği) maksimum artışa neden olduğu belirlenmiştir. IBP26 izolatu *Pseudomonas aeruginosa* olarak teşhis edilmiştir (GenBank accession number: MW092004). Deneyler, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>' nin yokluğunda tek başına bakteri uygulamasının veya bakteri yokluğunda tek başına Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> uygulamasının nohut bitkilerinin büyüme parametrelerinde kayda değer değişime neden olmadığını, bu bitkilerinin büyüme parametrelerinde istenilen artışların bakteri ve Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>' nin birlikte uygulanması sayesinde başarılabilceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Pseudomonas aeruginosa* IBP26, fosfat çözünlülüğü, nohut, büyüme parametreleri

<sup>1</sup> Muhammed Emin ÇÖĞENDER ([Orcid ID: 0000-0003-1108-1240](https://orcid.org/0000-0003-1108-1240)), Mehmet Nuri AYDOĞAN ([Orcid ID: 0000-0001-7518-4746](https://orcid.org/0000-0001-7518-4746)), Ataturk University, Science Faculty, Department of Biology, Erzurum, Turkey

<sup>2</sup> Nazlı Pınar ARSLAN ([Orcid ID: 0000-0002-3951-4418](https://orcid.org/0000-0002-3951-4418)), Bingol University, Vocational School of Health Services, Bingol, Turkey

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mehmet Nuri AYDOĞAN, e-mail: mnaydogan@ata.uni.edu.tr

Bu çalışma Muhammed Emin ÇÖĞENDER'in Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

## INTRODUCTION

Plant-associated bacteria can be classified into beneficial, deleterious and neutral groups based on their effects on plant growth. Beneficial bacteria are also known as plant growth promoting bacteria. They colonize the rhizosphere, the root surface, or the root itself. They may induce plant growth in two different ways, indirectly or directly (Rodríguez and Fraga, 1999; Vessey, 2003; Antoun and Prévost, 2005; Beneduzi et al., 2012). In indirect growth promotion, plant growth promoting bacteria reduce or prevent the harmful effect of pathogenic microorganisms by producing antibiotics or siderophores (Beneduzi et al., 2012; Olanrewaju et al., 2017). These bacteria promote directly plant growth through mechanisms such as the synthesis of phytohormones, N<sub>2</sub> fixation, reduction of membrane potential of the roots, as well as the solubilization of inorganic phosphate and mineralization of organic phosphate (Rodríguez and Fraga, 1999; Amarasen et al., 2019).

Phosphorus is the second most important macro nutrient required by plants, after nitrogen. Therefore, application of phosphatic fertilizers is essential for higher crop yields in agricultural studies. However, phosphatic fertilizers become insoluble when applied to the soil and turn into complexes such as aluminum phosphate, calcium phosphate and iron phosphate in the soil (Walpolá and Yoon, 2012). While the calcium form of insoluble phosphatic complexes is dominant in neutral to alkaline soil conditions, iron and aluminum phosphates are more dominant under acidic conditions. It has been documented that plants take up phosphorus as soluble orthophosphate ions (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-1</sup> and HPO<sub>4</sub><sup>-2</sup>), whereas the fixed form of phosphorus cannot be efficiently taken up by the plants (Kumar and Narula, 1999; Del Campillo et al., 1999).

Phosphate solubilizing microorganisms (PSMs) hydrolyze insoluble phosphatic compounds and make phosphorus more accessible for plants. Therefore, inoculation of soils with PSMs is known to result in higher crop yields (Johri et al., 1999; Walpolá and Yoon, 2012; Kalayu, 2019; Hii et al., 2020). PSMs can solubilize phosphatic compounds by applying various mechanisms such as lowering soil pH, chelation, and mineralization. Organic acids produced by microorganisms are effective in lowering soil pH (Kalayu, 2019). Namely, PSMs produce organic acids that lower of soil pH, thereby increasing phosphorus solubilization in the soil. There are many different organic acids that can dissolve phosphate and are produced by microorganisms; however, gluconic acid and 2-ketogluconic acids appear to be the most effective ones. PSMs include fungal (mainly *Penicillium* and *Aspergillus strains*), bacterial (mainly *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Rhizobium strains*) and arbuscular mycorrhizal strains (Kalayu, 2019). Phosphate solubilizing bacteria may also enhance plant productivity by producing other secondary metabolites. The potential of phosphate-solubilizing bacteria to produce IAA and siderophore increases the potential of these bacteria to be used as bio fertilizers (Mamta et al., 2010). In the light of this knowledge, it is thought that phosphate dissolving bacteria will gain more importance in the future.

Herein, the present study was carried out to elucidate whether locally isolated phosphate solubilizing-bacteria had the potential to promote the growth of chickpea seedlings.

## MATERIALS AND METHODS

### Isolation and screening of phosphate-solubilizing bacteria

The soil samples were collected from root zone and rhizosphere of various leguminous plants (wild chickpea and lentil) at different habitats in Erzurum province and its surrounding (Turkey). Nearly 1 g of soil samples was dispersed in 10 mL sterile-saline water. The prepared suspensions were separately vortexed and serially diluted up to 10<sup>-6</sup> with sterile saline water. Then, 0.1 mL of each dilution sample was separately spread on 90-mm diameter petri dish containing 15 mL of NBRIP (National Botanical



Research Institute's phosphate growth medium) medium. This medium composed of ( $\text{g L}^{-1}$ ) 10 glucose, 5  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (tricalcium phosphate), 5  $\text{MgCl}_2$ , 0.25  $\text{MgSO}_4$ , 0.2 KCl, 0.1  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and 20 agar-agar (pH 7.0). At the end of incubation period (2-4 days) at  $30^\circ\text{C}$ , growing-bacterial colonies on the medium were sub-cultured and purified. The isolated strains were separately numbered and maintained at  $4^\circ\text{C}$ .

In the second step, the isolated strains were screened in terms of the potential to solubilize inorganic phosphorus. For this purpose, 50  $\mu\text{L}$  seed culture (approximately  $0.5\text{-}1 \times 10^9$  cfu  $\text{mL}^{-1}$ ) of each bacterial strain was separately transferred in the glass tubes containing 10 mL of sterilized NBRIP-BPB broth medium. Different from NBRIP, NBRIP-BPB contained  $0.025 \text{ g L}^{-1}$  bromphenol blue (BPB) as well as the other nutritional components but did not agar. Bacterium-free medium was used as control. The tubes were incubated at  $30^\circ\text{C}$  in a shaking incubator (New Brunswick Scientific, USA) at 180 rpm. At the end of 3 days incubation period, tubes were centrifuged at 5000 rpm for 10 min. Absorbances of obtained supernatants were assayed at 600 nm using a spectrophotometer (Mehta and Nautiyal, 2000). Soluble phosphate in culture supernatant was estimated by Vanadomolybdate method and expressed as equivalent phosphorus ( $\text{mg L}^{-1}$ ) (Jackson, 1973). Better phosphate-solubilizing isolates were selected and then used in the next steps of the study.

### **Bacterial inoculation and plant growth**

Chickpea seeds were surface sterilized with 1% sodium hypochlorite for 10 min and washed 4 times with sterilized distilled water. Afterwards, the seeds were soaked in distilled water about 24 h and were subjected to germination for 3 days. Twenty of germinated seeds were placed in each pot at 2 cm depth. Seedlings were grown for 10 d on pots containing sand. Each pot (20 cm diameter) contained 2 kg of sand. Before using, sand was washed with water and then sterilized at  $170^\circ\text{C}$  for 60 min. For inoculation, promising-strains were grown in NBRIP medium at  $30^\circ\text{C}$  for 3 days at 180 rpm. The optical density of obtained wet cells was adjusted to  $10^9$  cells/mL with saline water for each strain. One mL of suspension was inoculated on pots containing chickpea seeds.

The experimental design was consisted of four treatment as described follows — treatment 1: contained only sterilized sand and chickpea seeds (control 1); treatment 2: sterilized sand, insoluble phosphate and chickpea seeds (control 2); treatment 3: only sterilized sand, chickpea seeds and bacterium (control 3); treatment 4: sterilized sand, insoluble phosphate, chickpea seeds and bacteria. Pots were watered weekly with the nutrient solution described by Hoagland and Arnon (1950). But, this solution did not contain any phosphorus source apart from  $5 \text{ g L}^{-1} \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Growth experiments were performed in a greenhouse (uncontrolled conditions).

### **Determination of protein, reducing sugar and phosphorus contents as well as shoot and root lengths**

Freshly harvested leaf samples (0.5 g) of chickpea plants were homogenized in 0.05 M phosphate buffer (pH 6.5). Homogenates were centrifuged at 15000 rpm for 20 min at  $4^\circ\text{C}$ . Then, obtained supernatant was employed for the determination of protein amount (Bradford, 1976) and sugar contents (Miller 1959). Shoot and root lengths were measured using a centimeter scale. Phosphorus content was determined using an inductively coupled plasma optical emission spectrophotometer (Optima 2100 DV, Perkin-Elmer, Shelton, CT, USA).

### **Identification of phosphate solubilizing bacteria**

The identification of the most promising isolate was performed according to whole-cell cellular fatty acids and 16S rRNA analysis. Cellular fatty acids were analyzed by gas chromatography (GC) using the MIDI system (MIDI, Newark, DE). The analysis was performed using the Sherlock Microbial Identification system TSBA 4.0 software and library general system software version 4.1. Qualitative

and quantitative differences in the fatty acid profiles were used to compute the distance for each strain relative to the strains in the library (Sasser, 1990a,b; Sasser and Wichman, 1991).

The identification of the isolate was also performed according to 16S rRNA sequence analysis. In brief, genomic DNA was extracted and purified according to the Promega Wizard<sup>R</sup> Genomic DNA Purification Kit (A2360) protocol. The purity of the extracted DNA was spectrophotometrically evaluated by A260/A280 ratio. The gene encoding for the 16S rDNA was amplified by PCR using 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') universal bacterial primers. After the amplified fragments were cloned into *Escherichia coli* JM101 strain with the pGEM-T Easy Cloning Vector (Promega, Southampton, UK) according to the instructions of the manufacturer, the plasmid was purified using Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, A1330) kit and sequenced in Macrogen Company (Netherlands). The 16S rRNA obtained was compared with the other bacterial series in the GenBank and EzTaxon (<http://blast.ncbi.nlm.nih> and <http://www.eztaxon.org>), the similarity rate was determined and GenBank accession number was received.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Isolation and screening of phosphate-solubilizing bacteria

Previous studies have widely demonstrated that phosphate-solubilizing bacterial inoculants improve plant growth and yield (Appanna, 2007; Hameeda et al., 2008; Vikram and Hamzehzarghani, 2008; Mohammed et al., 2011; Kalayu et al., 2019). Therefore, the present preliminary experiments were performed to isolate new bacterial strains being capable of solubilizing  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , an insoluble inorganic phosphate. The isolation experiments were performed on NBRIP medium containing insoluble  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (tricalcium phosphate) as inorganic phosphate. Total 76 bacterial strains grown on this medium were picked up and purified. They were then screened on NBRIP-BPB (brom phenol) medium for the determination of better phosphate solubilizing-ones. Among 76 bacterial isolates, only five isolates were found to cause a significant decolorization in blue color of NBRIP-BPB medium, namely have high phosphate-solubilizing activity. Phosphate-solubilizing potentials of five isolates (IPB 4, IPB 8, IPB 25, IPB 26 and IPB 72) were determined as 53.75, 52.47, 46.03, 110.86 and 27.58 mg L<sup>-1</sup>, respectively.

### Effect of phosphate-solubilizing bacteria on growth parameters of chickpea

In the subsequent stages of the study, five isolates were evaluated in terms of the potential to promote the growth of chickpea in the presence of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . At the end of 10-days growth period, the plants were harvested and the average lengths of shoot and roots for each treatment group were recorded (Table 1). The experiments showed that no significant difference was observed between shoot lengths of treatment group 1 chickpea plants (plants grown on pots containing only sand) and treatment group 2 chickpea plants grown on pots containing sand and  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Similarly, no significant increase in shoot lengths of chickpea was detected, when chickpea seeds were grown on pots inoculated with bacteria (treatment group 3: sand, chickpea and bacterium). Whereas, the experiments exhibited that there was a significant increase in shoot length of the plants, which were grown in the presence of bacteria and  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (treatment group 4). Shoot lengths of chickpea plants with inoculated IPB 4, IPB 8, IPB 25, IPB 26 and IPB 72 were determined as 21.83, 19.70, 18.20, 23.41 and 14.48 cm, respectively (treatment group 4). Whereas, average shoot length of control plants (treatment group 1) was determined as 12.94 cm.

Effect of locally isolated phosphate-solubilizing *Pseudomonas aeruginosa* IBP26 on the growth parameters of chickpea seedling

With comparison to treatment group 1 plants, there were no important changes in root lengths of treatment group 2 and 3 plants (Table 1). Even, shorter root lengths were assayed for treatment group 3 plants which were inoculated with any of four isolates (IPB 4, IPB 25, IPB 26 and IPB 72) in the absence of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Conversely, longer root lengths were reached when chickpea seeds were grown in the presence of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  and test bacterium (Treatment group 4). Among treatment group 4 plants, the plants inoculated with IBP26 were found to have the maximum root length (12.06 cm). Whereas, average root length of treatment group 1 was assayed as only 7.50 cm.

**Table 1.** Effect of test bacteria on shoot and root lengths of chickpea

| Treatment groups   | Shoot length (cm)   | Root length (cm)   |
|--|---------------------|--------------------|
| TG1(sand, chickpea seeds)  | 12.94 <sup>cd</sup> | 7.50 <sup>c</sup>  |
| TG2(sand, chickpea seeds, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )         | 13.38 <sup>cd</sup> | 7.70 <sup>bc</sup> |
| TG3 (sand, chickpea seeds, IPB4)                                 | 13.42 <sup>cd</sup> | 7.02 <sup>c</sup>  |
| TG3 (sand, chickpea seeds, IPB8)                                 | 11.89 <sup>d</sup>  | 8.08 <sup>bc</sup> |
| TG3 (sand, chickpea seeds, IPB25)                                | 13.14 <sup>cd</sup> | 7.45 <sup>c</sup>  |
| TG3 (sand, chickpea seeds, IPB26)                                | 13.41 <sup>cd</sup> | 7.42 <sup>c</sup>  |
| TG3 (sand, chickpea seeds, IPB72)                                | 13.24 <sup>cd</sup> | 7.03 <sup>c</sup>  |
| TG4 (sand, chickpea seeds, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , IPB4)  | 21.83 <sup>a</sup>  | 11.31 <sup>a</sup> |
| TG4 (sand, chickpea seeds, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , IPB8)  | 19.70 <sup>b</sup>  | 9.23 <sup>b</sup>  |
| TG4 (sand, chickpea seeds, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , IPB25) | 18.20 <sup>b</sup>  | 10.83 <sup>a</sup> |
| TG4 (sand, chickpea seeds, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , IPB26) | 23.41 <sup>a</sup>  | 12.06 <sup>a</sup> |
| TG4 (sand, chickpea seeds, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , IPB72) | 14.48 <sup>c</sup>  | 8.53 <sup>bc</sup> |

All values are the mean of two replicates from three independent experiments (n = 6). Different lowercase letters in the same column indicate significant differences (P < 0.05). TG: treatment group

As for the total sugar and protein contents of chickpea plants in four different treatment groups, it was seen that treatment group 4 chickpea plants had higher protein and sugar contents (Table 2). Especially, the highest total sugar (30.9 mg g<sup>-1</sup>) and protein (14.25 mg g<sup>-1</sup>) contents were recorded for the chickpea plants inoculated with IBP-26 among the treatment group 4 plants. In parallel with shoot and root lengths, there was no significant decrease or increase in total sugar and protein contents of treatment group 2 and 3 plants compared to treatment group 1 plants.

**Table 2.** Effect of test bacteria on total sugar and protein contents of chickpea

| Treatment groups   | Total sugar (mg g <sup>-1</sup> ) | Protein content (mg g <sup>-1</sup> ) |
|--|-----------------------------------|---------------------------------------|
| TG1(sand, chickpea seeds)  | 22.0 <sup>f</sup>                 | 11.74 <sup>de</sup>                   |
| TG2(sand, chickpea seeds, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )         | 23.0 <sup>ef</sup>                | 11.55 <sup>e</sup>                    |
| TG3 (sand, chickpea seeds, IPB4)                                 | 24.2 <sup>ef</sup>                | 12.25 <sup>cde</sup>                  |
| TG3 (sand, chickpea seeds, IPB8)                                 | 25.2 <sup>de</sup>                | 11.6 <sup>e</sup>                     |
| TG3 (sand, chickpea seeds, IPB25)                                | 25.2 <sup>de</sup>                | 12.2 <sup>cde</sup>                   |
| TG3 (sand, chickpea seeds, IPB26)                                | 25.5 <sup>de</sup>                | 12.75 <sup>bcde</sup>                 |
| TG3 (sand, chickpea seeds, IPB72)                                | 22.5 <sup>de</sup>                | 11.90 <sup>cde</sup>                  |
| TG4 (sand, chickpea seeds, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , IPB4)  | 30.9 <sup>ab</sup>                | 13.89 <sup>ab</sup>                   |
| TG4 (sand, chickpea seeds, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , IPB8)  | 27.5 <sup>cd</sup>                | 12.95 <sup>bcd</sup>                  |
| TG4 (sand, chickpea seeds, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , IPB25) | 28.2 <sup>bc</sup>                | 13.0 <sup>bc</sup>                    |
| TG4 (sand, chickpea seeds, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , IPB26) | 30.9 <sup>a</sup>                 | 14.25 <sup>a</sup>                    |
| TG4 (sand, chickpea seeds, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , IPB72) | 26.9 <sup>cd</sup>                | 12.75 <sup>bcde</sup>                 |

All values are the mean of two replicates from three independent experiments (n = 6). Different lowercase letters in the same column indicate significant differences (P < 0.05). TG: treatment group

Effect of locally isolated phosphate-solubilizing *Pseudomonas aeruginosa* IBP26 on the growth parameters of chickpea seedling

The experiments demonstrated that supplementation of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  had not a significant role on P content in the absence of the test bacteria. In the other words, no significant increase occurred in P content of treatment group 2 plants compared with treatment group 1 plants (Table 3). The maximum augmentation in P uptake by plants was achieved, when the plants were grown in the presence of test bacteria and  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (treatment group 4 plants). Among the treatment group 4 plants, the maximum P content ( $2671 \text{ mg kg}^{-1}$ ) was determined in chickpea plants with inoculated with IBP-26. Similarly, higher dry matter contents were assayed for the plants, which were inoculated with the test bacteria in the presence of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Especially, the maximum dry matter content (22.2%) was detected for the plants inoculated with IBP 26 among treatment group 4 plants (Table 3).

**Table 3.** Effect of test bacteria on dry matter and phosphorus contents of chickpea

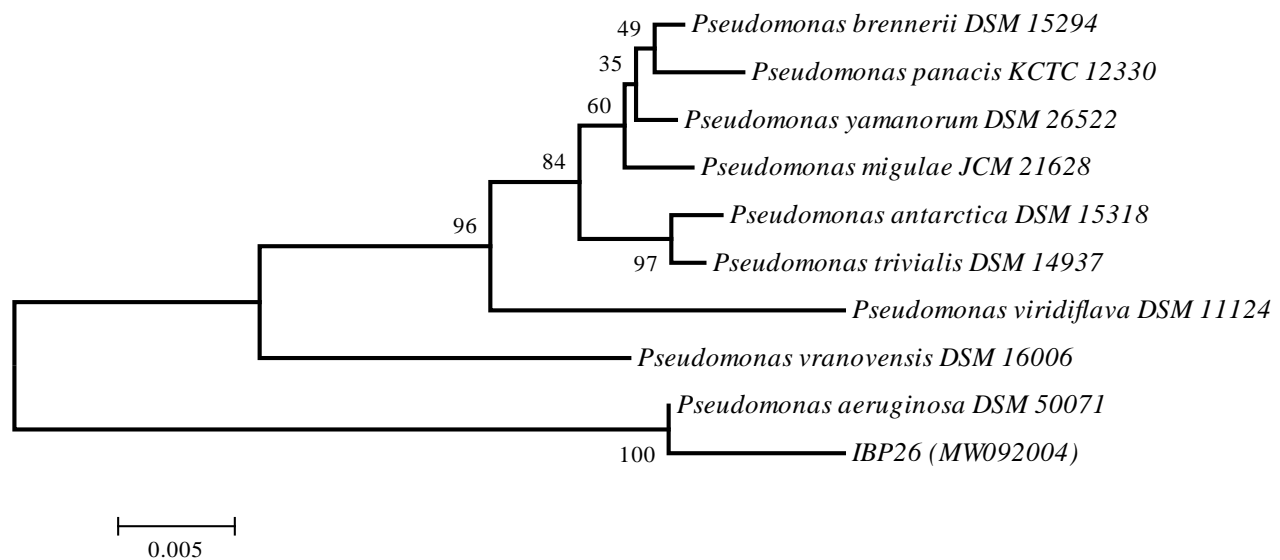
| Treatment groups   | Dry matter (%)        | Phosphorus content ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) |
|--|-----------------------|--|
| TG1(sand, chickpea seeds)  | 17.41 <sup>d</sup>    | 2114                                       |
| TG2(sand, chickpea seeds, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )         | 19.21 <sup>bcd</sup>  | 2177                                       |
| TG3 (sand, chickpea seeds, IPB4)                                 | 18.89 <sup>bcd</sup>  | 2415                                       |
| TG3 (sand, chickpea seeds, IPB8)                                 | 19.40 <sup>bcd</sup>  | 2347                                       |
| TG3 (sand, chickpea seeds, IPB25)                                | 19.56 <sup>bcd</sup>  | 2249                                       |
| TG3 (sand, chickpea seeds, IPB26)                                | 17.55 <sup>d</sup>    | 2367                                       |
| TG3 (sand, chickpea seeds, IPB72)                                | 19.21 <sup>bcd</sup>  | 2415                                       |
| TG4 (sand, chickpea seeds, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , IPB4)  | 21.46 <sup>ab</sup>   | 2623                                       |
| TG4 (sand, chickpea seeds, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , IPB8)  | 20.69 <sup>abc</sup>  | 2510                                       |
| TG4 (sand, chickpea seeds, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , IPB25) | 21.10 <sup>abc</sup>  | 2369                                       |
| TG4 (sand, chickpea seeds, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , IPB26) | 22.29 <sup>a</sup>    | 2671                                       |
| TG4 (sand, chickpea seeds, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , IPB72) | 19.76 <sup>abcd</sup> | 2227                                       |

All values are the mean of two replicates from three independent experiments ( $n = 6$ ). Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). TG: treatment group

As seen from the results presented in Table 1-3, compared to the control (treatment group 1), test bacteria (treatment group 3) alone or  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (treatment group 2) alone did not cause a significant change in plant growth parameters (shoot and root lengths, total sugar, protein and dry matter contents). The absence of any change in the treatment group 2 plants can be explained by the fact that insoluble  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  is not directly used as phosphorus source by the plants. Conversely, it was seen that the growth of chickpea plants significantly increased, when the plants were inoculated with phosphate-solubilizing test bacteria in the presence of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Namely, co-application of any test bacterium and  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  caused a significant increase in growth of chickpea seedlings (treatment group 4). Significant increases in growth parameters can mainly be attributed to greater P uptake by the plants. This is because, the present experiments revealed that the maximum P content was detected in the plants which were grown in the presence of test bacteria and  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (treatment group 4 plants). The similar increases in P uptake in the presence of phosphate solubilizing bacteria have been also reported for other plants such as *Phaseolus vulgaris*, *Lycopersicon esculentum* and *Stevia rebaudiana* in the previous studies (Peix et al., 2001; Han and Lee, 2005; Kirankumar et al., 2008; Rahi et al., 2010; Mohamed et al., 2011; Kuntuyastuti and Sutrisno, 2017).

From all the results obtained, it was clear that the maximum increases in shoot and root lengths as well as total sugar, protein, dry matter and phosphorus contents were achieved with the isolate IPB 26. This isolate was identified as *Pseudomonas aeruginosa* according to morphological and biochemical characteristics as well as FAME and 16S rRNA analyses (GenBank accession number: MW092004). This result was in good agreement with those reported by investigators, which showed that *Pseudomonas*

strains possessed high potential to promote growth of different plants (Buch et al., 2008; Ahemad and Khan, 2010; Patel et al., 2011; Prasad and Babu, 2017). Therefore, use of *P. aeruginosa* IBP26 as biofertilizers can be accepted as an efficient approach to replace chemical phosphorus fertilizers for sustainable cultivation of chickpea plants.



**Figure 1.** Neighbor joining phylogenetic tree on the basis of 16S rRNA gene sequence data of the isolate IBP26 (GenBank number: MW092004) resembled *Pseudomonas aeruginosa* at a high rate (98.5%).

It has been reported in the literature that plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) may have other potential properties such as the synthesis of phytohormones,  $N_2$  fixation and being biocontrol agent, in addition to the solubilization of inorganic phosphate and mineralization of organic phosphate (Almas et al., 2009; Hayat et al., 2012; Öztekin et al., 2015; Şahin and Dönmez, 2020). For example, several authors have informed that PGPR are capable of producing phytohormones such as indole-3-acetic acid, cytokinin and gibberellin promoting plant growth (Mehnaz et al., 2001; van Loon et al., 2007; Gupta et al., 2012; Patel and Saraf 2017). Considering this information, the fact that there is no change in the growth parameters of the treatment group 3 plants can be explained by the failure of test bacteria to produce phytohormones or to fix nitrogen. That is, the test bacteria had probably only phosphate solubilizing potential. However, we consider that co-culture of *P. aeruginosa* IBP26 and other plant growth promoting bacteria (nitrogen-fixing and/or phytohormone-producing bacteria) may be tested in future agricultural studies. This is because, the co-application of phosphate-solubilizing bacteria with nitrogen-fixing and/or phytohormone-producing other PGPR is accepted as an alternative approach in agricultural studies. Even, co-cultures provide more balanced compared with separate inoculations (Rodríguez and Fraga, 1999). For example, when phosphate-solubilizing *Agrobacterium radiobacter* was combined with nitrogen fixer *Azospirillum lipoferum*, more improvement in grain yield of barley could be achieved compared with single inoculations (Belimov et al., 1995).

## CONCLUSION

This study revealed that application of *P. aeruginosa* IBP26 in the presence of  $Ca_3PO_4$  gave rise to significant increases in the growth parameters of chickpea plants. Therefore, use of *P. aeruginosa* IBP26 as biofertilizers can be accepted as an efficient approach to replace chemical phosphorus fertilizers for sustainable cultivation of chickpea plants.

## Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Author's Contributions

The experiments as regarding the effect of the test bacterium on the plant growth parameters were performed by Muhammed Emin ÇÖĞENDER. Molecular identification of the bacterium was carried out by Nazlı Pınar ARSLAN. Mehmet Nuri AYDOĞAN was responsible for the writing of manuscript.

## REFERENCES

- Ahemad M, Khan MS, 2010. Phosphate-Solubilizing and Plant-Growth-Promoting *Pseudomonas aeruginosa* PS1 Improves Greengram Performance in Quizalafop-*p*-ethyl and Clodinafop Amended Soil. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 58:362-372.
- Almas Z, Mohammad SK, Munees A, Mohd O, Wani PA, 2009. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. In Mohammad, S. K., Almas, Z. and Javed, M. (eds.) Microbial Strategies for Crop Improvement. Springer, Verlag Berlin Heidelberg. pp. 23-49.
- Amaresan N, Jayakumar V, Kumar K, Thajuddin N, 2019. Biocontrol and plant growth-promoting ability of plant-associated bacteria from tomato (*Lycopersicon esculentum*) under field condition. Microbial Pathogenesis, 136:103713.
- Antoun H, Prévost D. 2005. Ecology of plant growthpromoting rhizobacteria. Z. A. Siddiqui (ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization 1–38.
- Appanna V, 2007. Efficacy of phosphate solubilizing bacteria isolated from vertisols on growth and yield parameters of sorghum. Research Journal of Microbiology, 2:550-559.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for t quantition of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding analitic. Biochemistry, 72:248-254.
- Belimov AA, Kojemiakov AP, Chuvarliyeva CV, 1995. Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria. Plant and Soil 173:29–37.
- Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LM, 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. Genetics and Molecular Biology, 35:1044-1051.
- Buch A, Archana G, Naresh KG, 2008. Metabolic channeling of glucose towards gluconate in phosphate-solubilizing *Pseudomonas aeruginosa* P4 under phosphorus deficiency. Research in Microbiology, 159:653-642.
- Del Campillo SE, Van der Zee S, Torrent J, 1999. Modelling long term phosphorus leaching and changes in phosphorus fertility in excessively fertilized acid sandy soils. European Journal of Soil Science, 50:391–399.
- Gupta M, Kiran S, Gulati A, Singh B, Tewari R, 2012. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. Microbiological Research, 167:358– 363.
- Hameeda B, Harini G, Rupela OP, Wani SP, Reddy G, 2008. Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. Microbiological Research, 163:234-242.
- Han HS, Lee KD, 2005. Physiological responses of soybean-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* with PGPR in saline soil conditions. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 1:216–221.
- Hayat R, Ahmed I, Sheirdil RA, 2012. An overview of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture. In *Crop production for agricultural improvement* (pp. 557-579). Springer, Dordrecht.
- Hii YS, San Chan Y, Lau SW, Michael D, 2020. Isolation and characterisation of phosphate solubilizing microorganisms from peat. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 26:101643.
- Jackson ML 1973. Soil Chemical Analysis. Prentice Hall of India Private Limited New Delhi, 38-82.

- Johri JK, Surange S, Nautiyal CS, 1999. Occurrence of salt, ph, and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils. *Current Microbiology*, 39:89–93.
- Kalayu G, 2019. Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*, 2019:1-7.
- Kirankumar R, Jagadeesh KS, Krishnaraj PU, Patil MS, 2008. Enhanced growth promotion of tomato and nutrient uptake by plant growth promoting rhizobacterial isolates in presence of tobacco mosaic virus pathogen. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 21:309–311.
- Kumar V, Narula N, 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biology and Fertility of Soils* 28 :301–305.
- Kuntyastuti H, Sutrisno S, 2017. Effect of manure, phosphate solubilizing bacteria, and chemical fertilizer application on the growth and yield of soybean. *Nusantara Bioscience*, 9:126-132.
- Mamta RP, Pathania V, Gulati A, Singh B, Bhanwra RK, Tewari R, 2010. Stimulatory effect of phosphate-solubilizing bacteria on plant growth, stevioside and rebaudioside-A contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Applied Soil Ecology* 46:222–229.
- Mehnaz S, Mirza MS, Haurat J, Bally R, Normand P, Bano A, Malik KA, 2001. Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. *Canadian Journal of Microbiology*, 47:110–117.
- Mehta S, Nautiyal CS, 2000. An efficient method for qualitative screening of phosphate- solubilizing bacteria. *Current Microbiology* 43: 51-56.
- Miller GL, 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31:426-428.
- Mohamed, HM, Ibrahim EMA, 2011. Effect of inoculation with *Bacillus polymyxa* mutants on growth, phosphorous and iron uptake by tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) in calcareous soils. *International Journal of Soil Science*, 6:176-187.
- Olanrewaju OS, Glick BR, Babalola OO, 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33:197.
- Öztekin GB, Tuzel Y, Mehmet E, 2015. Effect of nitrogen fixing bacteria use on plant growth, yield and fruit quality of tomatoes grown in greenhouse conditions. *Iğdır University Journal of the Institute of Science and Technology*, 5:21-27.
- Patel DK, Murawala P, Archana G, Kumar GN, 2011. Repression of mineral phosphate solubilizing phenotype in the presence of weak organic acids in plant growth promoting fluorescent pseudomonads. *Bioresource Technology*, 102:3055–3061.
- Patel T, Saraf M, 2017. Biosynthesis of phytohormones from novel rhizobacterial isolates and their in vitro plant growth-promoting efficacy. *Journal of Plant Interactions*, 12:480-487.
- Peix A, Mateos PF, Rodriguez-Barrueco C, Martinez-Molina E, Velazquez E, 2001. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 33:1927–1935.
- Prasad AA, Babu S, 2017. Compatibility of *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in growth promotion of groundnut (*Arachis hypogea* L.). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89:1027-1040.
- Rahi MP, Pathania V, Gulati A, Singh B, Bhanwra RK, Tewari R, 2010. Stimulatory effect of phosphate-solubilizing bacteria on plant growth, stevioside and rebaudioside-A contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Applied Soil Ecology*, 46: 222–229.
- Rodríguez H, Fraga R, 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17:319–339.
- Sasser M, 1990a. Technical Note 102. Tracking a Strain Using the Microbial Identification System. MIS, Newark, DE.
- Sasser M, 1990b. Identification of bacteria through fatty acid analysis. In: Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. (Eds.), *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest, Hungary, pp. 199–204.

- Sasser M, Wichman MD, 1991. Identification of microorganisms through use of gas chromatography and high-performance liquid chromatography. In: Balows, A., Hausler Jr., W.J., Herrman, K.L., Isenberg, H.D., Shadomy, H.J. (Eds.), Manual of Clinical Microbiology, fifth ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Şahin BU, Dönmez MF, 2020. Effects of different bacteria applications on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plant growth. Iğdır University Journal of the institute of Science and Technology, 10:1507-1517
- van Loon LC, 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. European Journal of Plant Pathology, 119:243–254.
- Vessey JK, 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil 255: 571–586.
- Vikram A, Hamzehzarghani H, 2008. Effect of phosphate solubilizing bacteria on nodulation and growth parameters of greengram (*Vigna radiata* L. Wilczek). Research Journal of Microbiology, 3: 62-72.
- Walpola BC, Yoon MH, 2012. Prospectus of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus availability in agricultural soils: A review. African Journal of Microbiology Research, 6:6600-6605.



**To Cite:** Yıldırım E, Kumlutaş Y, Candan K, Ilgaz Ç, 2021. The Study on the Relationships Between the Age Structure and Body Size of the Bridled Skink, *Heremites vittatus*, (Oliver, 1804) from Different Altitudes in Turkey. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 906-915.

**The Study on the Relationships Between the Age Structure and Body Size of the Bridled Skink, *Heremites vittatus*, (Oliver, 1804) from Different Altitudes in Turkey**

Elif YILDIRIM<sup>1\*</sup>, Yusuf KUMLUTAŞ<sup>1</sup>, Kamil CANDAN<sup>1</sup>, Çetin ILGAZ<sup>1</sup>

**ABSTRACT:** Age structure and body size of *Heremites vittatus* from three different altitudes (group I: 0-499 m, group II: 500-999 m, and group III: above 1000 m) were investigated using skeletochronology. The mean snout-vent length (SVL) of females in all groups was larger than males. The average SVL was 74.8 mm in females and 66.8 mm in males. Age ranged from three to seven years in females and two to seven years in males. No significant differences were found in mean age between sexes (Mann-Whitney U-test, p=0.324). Among three groups, there was no significant difference between the populations as regards both age and SVL. However, SVL only in groups I and II were statistically significant between sexes. Moreover, there was no significant correlation between age and SVL. The Von Bertalanffy's model indicated that females had a larger asymptotic body size than males and that there was a significant difference between the sexes in terms of growth rate.

**Keywords:** Skeletochronology, altitude, *Heremites vittatus*, Turkey

<sup>1</sup> Elif YILDIRIM ([Orcid ID: 0000-0001-9614-5754](https://orcid.org/0000-0001-9614-5754)), Yusuf KUMLUTAŞ ([Orcid ID: 0000-0003-1154-6757](https://orcid.org/0000-0003-1154-6757)), Kamil CANDAN ([Orcid ID: 0000-0002-6934-3971](https://orcid.org/0000-0002-6934-3971)), Çetin ILGAZ ([Orcid ID: 0000-0001-7862-9106](https://orcid.org/0000-0001-7862-9106)), Dokuz Eylül University, Faculty of Science, Biology Department, Turkey

\*Corresponding Author: Elif YILDIRIM, e-mail: yildirim.elif@deu.edu.tr

## INTRODUCTION

The family Scincidae is one of the largest families that has a worldwide distribution (Whiting et al., 2006). Bridled Skink, *Heremites vittatus* (Oliver, 1804) is a medium-sized species that is one of 1642 described lizards. *Heremites vittatus* has been found in Algeria, Cyprus, Egypt, Israel, Jordan, Lebanon, Libya, Syrian Arab Republic, Tunisia and Turkey. In Turkey, this species is distributed throughout southern parts in different altitudes and found in open areas of sandy or stony soil with vegetation (Baran et al., 2012).

Oliver (1804) described this species as *Scincus vittatus* for the first time. The taxonomic status of *H. vittatus* has been treated so many times. Previously this species was located in the genus *Mabuya* that was assigned to the genus *Euprepis* and then re-assigned to *Trachylepis* (Mausfeld et al., 2000; Mausfeld et al., 2002; Bauer, 2003). Finally, Karin et al. (2016) placed this species in a different genus *Heremites*.

Data on the life-history are important to address the evolution, ecology and conservation biology of reptilian species (Grimm et al., 2014). To determine the patterns of variations in age structure is a part of the life-history of species. Skeletochronology is one of the most common methods to estimate the age structure of the reptilian species because of more accurate and timesaving than other age determination methods such as mark-recapture methods. Skeletochronology estimates the age of species by counting lines of arrested growth layers during hibernation periods (Tomašević et al., 2010; Altunışık et al., 2013; Gül et al., 2014; Yakin and Tok, 2015). Many studies on lizards have been recently performed by using skeletochronology (Orlova and Smirina, 1983, *Darevskia derjugini*; Kim et al., 2010, *Eremias argus*; Kolarov et al., 2010, *Dinarolacerta mosorensis*; Arakelyan et al., 2013, *Darevskia armeniaca*, *D. uzzelli*, *D. sapphirina*, *D. unisexualis*; Gül et al., 2014, *Darevskia rudis*; Cabezas-Cartes, Boretto ve Ibarguengoytia, 2015, *Phymaturus spectabilis*; Gül et al., 2015a, *Apathya cappadocica*; Gül et al., 2015b, *Darevskia bithynica*; Üzüm et al., 2015, *Eremias suphani*; Bülbül et al., 2016a, *Darevskia parvula*; Bülbül et al., 2016b, *Darevskia clarkorum*; Altunışık et al., 2016, *Podarcis tauricus*; Kurnaz et al., 2017, *Darevskia valentini*; Eroğlu et al., 2017, *Podarcis siculus*, Üzüm et al., 2018, *Phoenicolacerta laevis*; Eroğlu et al., 2018, *Podarcis muralis*; Altunışık and Eksilmez, 2018, *Darevskia dryada*; Mermer et al., 2020, *Chalcides ocellatus*).

Data on new locality, osteology, and phylogenetic of *H. vittatus* exist in the literature (Güçlü et al., 2014; Rastergar-Pouyani et al., 2013; Kumlutaş et al., 2015). However, there is limited data about life-history such as age structure, growth pattern, or longevity of *H. vittatus* (Kalaycı et al., 2018). In the present study, age structure, body size, and growth pattern of *H. vittatus* were studied in different Turkish populations living along an altitudinal gradient from 9 to 2042 m in order to determine if the demographic life-history traits of *H. vittatus* differ concerning different altitudinal conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Site and Sampling

A total of 118 museum specimens were collected from twenty-four populations at three different altitudes (Group I: 0-499 m, group II: 500-999 m, and group III: above 1000 m) from April to November (Table 1). Moreover, the species spends at least six months in hibernation, from late October to late March. Each individual was caught by hand in the daytime. All museum specimens examined here were stored in the Fauna Flora Applied and Research Center, Dokuz Eylül University. Snout-vent lengths (SVLs) of the specimens were measured with a caliper to

the nearest 0.1 mm. Sex was determined by the examination of the secondary sexual characters (e.g. smaller head, narrower bodies, and smaller length of the cloacal aperture in males Rastegar-Pouyani and Fattahi, 2015). Sexual size dimorphism was quantified by the sexual dimorphism index as described by the formula calculated according to Lovich and Gibbons (1992):  $SDI = (\text{mean SVL of the larger sex} / \text{mean SVL of the smaller sex}) \pm 1$ . The value +1 is used if males are larger than females and -1 if the opposite is true. SDI was defined as positive if females were larger and negative if males were larger.

### Skeletochronological Analyses

For each individual, the phalanx of the longest finger of the hind limb was cut and fixed in 70% ethanol and decalcified by 5% nitric acid for 2 hours. Then, a routine histological technique was used for subsequent steps. 16 $\mu$  of diaphyseal cross-sections was prepared by using a rotary microtome and stained with Hematoxylin for 20 minutes (Fig. 1).

**Statistical Analyses.** The normality of the SVL and age distribution for each sex was tested with the Kolmogorov-Smirnov test ( $P \geq 0.05$ ). After we tested variables normality, parametric tests were applied to test significant differences for normally distributed variables. Non-parametric tests were used when variables were not normally distributed. All statistical tests were performed by IBM SPSS 23.0 for Windows.

### Growth pattern

The von Bertalanffy's model between body size and age was used for the growth pattern estimation of lizards (James, 1991; Wapstra et al., 2001; Roitberg and Smirina, 2006b; Guarino et al., 2010). The general formula of the von Bertalanffy equation used is  $L_t = L_\infty (1 - e^{-k(t-t_0)})$ , where  $L_t$  is the length at age  $t$ ,  $L_\infty$  is a parameter indicating the asymptotic maximum length,  $e$  is the base of the natural logarithm,  $k$  is a growth coefficient and  $t_0$  is the age at hatching.

**Table 1.** Population and sample size (N) of *Heremites vittatus*

| Group I    |                  |    | Group II      |                 |    | Group III     |                          |    |
|------------|------------------|----|---------------|-----------------|----|---------------|--------------------------|----|
| Population | Altitude (m)     | N  | Population    | Altitude (m)    | N  | Population    | Altitude (m)             | N  |
| Hatay      | 258/108/226/73/9 | 12 | Adiyaman      | 601             | 11 | Ankara        |                          | 1  |
| Şanlıurfa  | 370/445          | 6  | Hatay         | 632/976         | 4  | Mersin        | 1228                     | 2  |
| Antalya    | 139/28/96        | 4  | Gaziantep     | 958/732/854/519 | 12 | Gümüşhane     | 1951/2042/1668/1892      | 6  |
| Kilis      | 460              | 1  | Siirt         | 804/704         | 2  | Sivas         | 1436/1397/1559/1544/1436 | 7  |
| Şırnak     | 414/466/456      | 17 | Şanlıurfa     | 644/723/600     | 10 | Mersin        | 1297/1313/1412/1196      | 14 |
| Mersin     | 57/9             | 4  | Mersin        | 953/727         | 3  | Kahramanmaraş | 1480                     | 4  |
| Gaziantep  | 492              | 6  | Kilis         | 802/602         | 5  | Diyarbakır    | 1117                     | 8  |
|            |                  | 50 | Kahramanmaraş | 976             | 3  | Afyon         | 1226                     | 1  |
|            |                  |    |               |                 | 50 | Gaziantep     | 1114                     | 1  |

## RESULTS AND DISCUSSION

Age ranged from 3 to 7 years in females, and 2 to 7 years in males. The mean SVL of the specimens was 72.8, 71.6 and 68.5 mm from the lowest to highest elevation sites whereas the mean age was 4.32, 4.83 and 4.95, respectively. The average age and SVL of each sex of *H. vittatus* at different altitudes are given in Table 2.

**Table 2.** Mean body size and age of *Heremites vittatus* from low to high altitudes within each sex

|               | Group I (Low altitudes) |             | Group II (Medium altitudes) |             | Group III (High altitudes) |             |
|---------------|-------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|----------------------------|-------------|
|               | SVL (mm)                | Age (years) | SVL (mm)                    | Age (years) | SVL (mm)                   | Age (years) |
| <b>Female</b> | 77.7                    | 4.52        | 75                          | 4.85        | 71.8                       | 5           |
| <b>Male</b>   | 68.2                    | 4.59        | 67.4                        | 4.53        | 63.4                       | 4.61        |

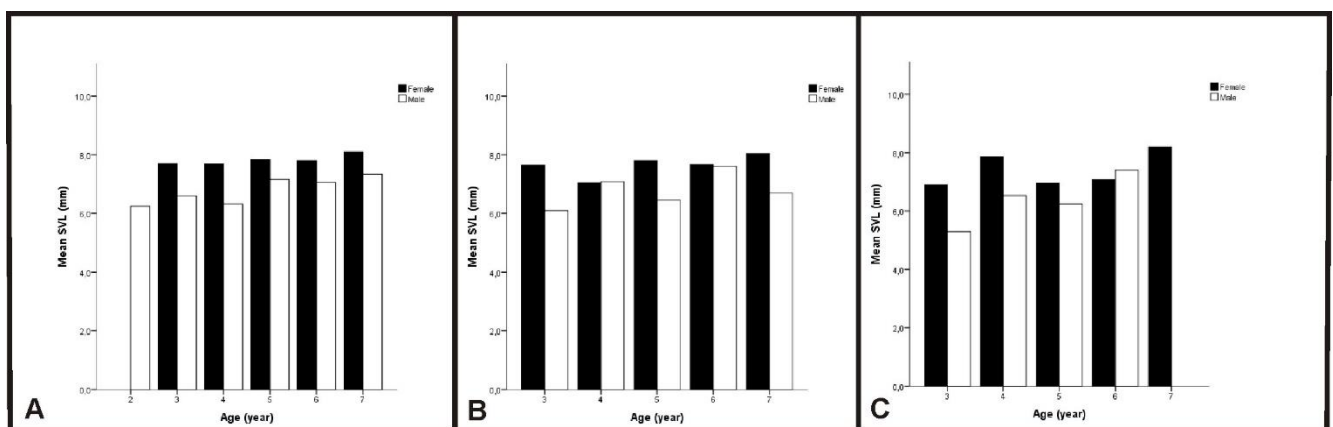
In group I, the minimum age was found to be 2 years for males and 3 for females whereas the maximum age was 7 for both males and females (Fig. 2A). The mean age of the specimens in group I was not significantly different between the sexes (Mann-Whitney U test;  $P=0.814$ ). However, a significant difference was found between sexes in terms of SVL (Independent Samples t-test:  $t=4.017$ ,  $P=0.000$ ). There was no correlation between age and SVL for both sexes (Spearman correlation:  $r=0.285$ ,  $P=079$ ).



**Figure 1.** A cross-section at the diaphysis level of phalanx of *Heremites vittatus* (5 years). eb, endosteal bone; mc, marrow cavity; rl, resorption line

In group II, the minimum age was 3 in females and 4 in males and the maximum age was found to be 6 in males and 7 in females (Fig. 2B). The mean age of the specimens did not differ significantly between sexes (Mann-Whitney U test:  $P=0.476$ ). Moreover, SVL was significantly different between sexes (Independent Sample t-test:  $t=2.898$ ,  $P=0.006$ ). There is no correlation between age and SVL for both sexes (Spearman correlation:  $r=0.160$ ,  $P=281$ ).

In group III, the minimum age was 3 in females and 4 in males while the maximum age was found to be 6 in males and 7 in females (Fig. 2C). The mean age of the specimens did not differ significantly between sexes (Mann-Whitney U test:  $P=0.220$ ). However, SVL was significantly different between sexes (Independent Sample t-test:  $F=1.717$ ,  $t=2.895$ ,  $P=0.07$ ). There was no correlation between age and SVL for females and males (Spearman correlation:  $r=0.155$ ,  $P=398$ ).

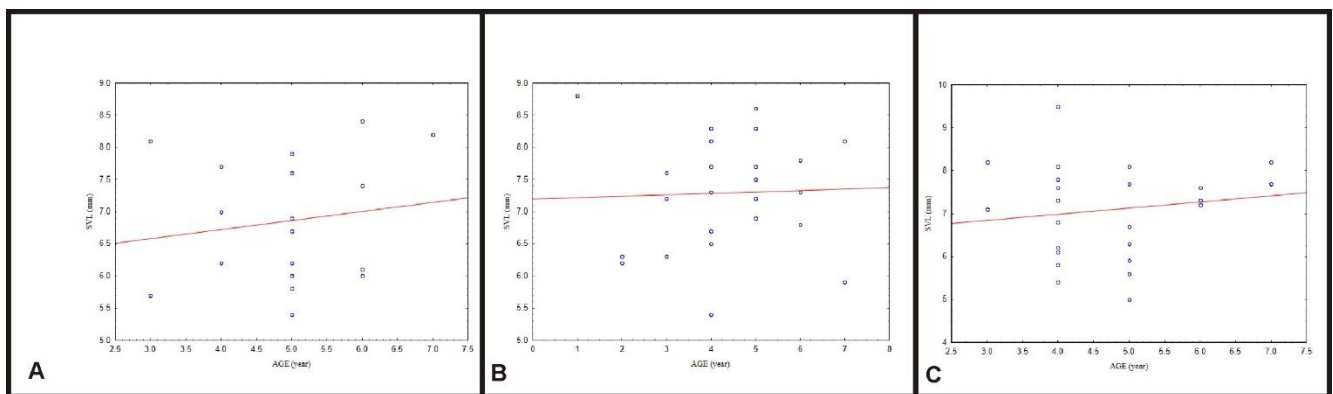


**Figure 2.** Relationships between SVL and age of *Heremites vittatus* from three groups. A. group I, B. group II and C. group III.

Females of *H. vittatus* were larger than males in terms of mean SVL. However, no significant difference was found between sexes in terms of the mean SVL (Student t-test:  $t=0.500$ ,  $P=0.667$ ). No significant difference was found both for SVL and age of individuals that inhabited three different

elevations, respectively (ANOVA:  $F=1.050$ ,  $P=0.354$ ; Kruskal-Wallis test: Chi-Square=1.215;  $P=0.545$ ).

Females were on average older than males. Therefore, the mean age of males was not significantly higher than females (Independent samples t-test:  $t=1.215$ ,  $P=0.227$ ). In addition, females were significantly larger than males (Mann-Whitney test:  $P=0.000$ ). The intersexual difference in SVL was male-biased ( $SDI = -0.10$ ) when we considered for twenty-four populations in three groups. The intersexual difference in SVL was female-biased ( $SDI=0.13$ ) in groups I and III, while this difference was male-biased ( $SDI=-0.10$ ) in group II. Moreover, SVL of group I and III had a significant difference in itself, there is no significant relation between group I and III (Independent Sample t-test:  $t=1.251$ ,  $P=0.216$ ). According to Spearman correlation, age and SVL were not correlated in females and males inhabiting three altitudes ( $r=0.093$ ,  $P=0.493$ ;  $r=0.216$ ,  $P=0.94$ ). von Bertalanffy's model showed that the estimated asymptotic SVL was not higher than the maximum SVL recorded (SVL<sub>asym</sub>, males: 69 mm; females: 76 mm). The growth coefficient was higher in females than in males ( $k$ , males: 0.769; females: 0.959). The growth curve of males was significantly different from that of females ( $t=3.827$ ,  $P=0.001$ ) (Fig. 3).



**Figure 3.** Growth curves between SVL and age in *Heremites vittatus* from three groups. **A.** group I, **B.** group II and **C.** group III

In the current study, the body size and age structure of *H. vittatus* from different populations in three elevations are compared. There are limited studies about age determination in the family Scincidae. Rohr (1997) stated that the mean age is  $4.24 \pm 0.54$  in female individuals of *Eulamprus tympanum* from low altitude and is  $7.16 \pm 0.67$  from high altitude. Dubey et al. (2013) indicated that the maximum age is 6 years in *E. leuraensis*. Smith et al. (2013) stated that the maximum age is 4 years in *Ctenotus atlas*. Kalaycı et al. (2018) investigated that the age structure of *H. vittatus* in Sivas (Turkey) population. However, it is carried out with only one population (Sivas) and female individuals. Mermer et al. (2020) indicated that the mean age was calculated as 6 years (3-10 years) for males and 5.8 years (3-10 years) for females. The maximum life span was found to be 5 years for females of *H. vittatus*. Moreover, there is a significant relation between SVL and the age of *H. vittatus*. In the present study, we also investigated Sivas population, which includes in group III. In group III, the minimum age for female individuals is 3 years whereas the maximum one is 7 years. According to our result, there was no correlation between age and SVL for females and males (group III).

Sexual differences are used for morphological characters in ectothermic animals (Endler, 1992; Blanckenhorn, 2000; Yamahira and Conover, 2002). Intersexual differences in body size are caused by the ecological, behavioral and reproduction differences between males and females. In some species available in the literature, the mean SVL in females is bigger than males (Guarino et al., 2010, *Lacerta*

*agilis*; Žagar et al., 2012, *Iberolacerta horvathi*, *Podarcis muralis*; Kanat and Tok, 2015, *Hemidactylus turcicus*; Yakın and Tok, 2015, *Anatololacerta anatolica*). Results of the previous studies showed that the body size variation in *H. vittatus* is available between sexes. Olsson and Shine (1997) stated that females with larger body size provide to increase clutch size and mass. The body size of females is correlated with fecundity whereas body size in males is related to mating success. Mating success is related to body size and behavioral features (Olsson and Madsen, 1998). In lacertids, many studies are related to male-biased in the warmer condition in terms of body size (Roitberg 2007; Gül et. al., 2014). According to our results, female-biased SSD was found in groups I and III. Females were larger than males, although male-biased SSD was found in *H. vittatus*. The highest SVL was found in group I (lowest site) for females while it was recorded in group II (middle site) for males. The finding of SVL changes in the literature (Gül et al., 2015a; Gül et al., 2015b; Bülbül et al., 2016a). In general, animals inhabited at low altitudes live shorter than those in higher elevation site. Roitberg and Smirina (2006) stated that the shorter activity period in the cooler area decreases the number of predators. The average age increases as the elevation increases (mean age in group I: 4.52; in group II: 4.71 and in group III: 4.84). The mean age is higher in group III (5 years in females and 4.61 years in males). The reason to be high mean age is caused by having the short active period of lizards in a highland population (group III). However, no significant difference in age among the three different altitudes. The underlying reason is that we did not study three populations from three different altitudes. We made a collection from different twenty-four populations.

Medium-sized species examined here is found in a wide variety of habitats. This species inhabits from sea level up to 2500 m asl. Specimens of *H. vittatus* examined here were investigated at three groups along the altitudinal gradients from 9 to 2042 m. High altitude sites address the low temperature and food ability, and short activity period (Nagy and Grabherr, 2009). In general, specimens from high-elevation sites and northern latitudes live longer than those from low-elevations sites and southern latitudes (Roitberg and Smirina, 2006b). Environmental factors are likely to reflect intraspecific body size variation of specimens along altitudinal gradients. This variation is related to the active season length (Sears, 2005). Because of the shorter activity seasons, specimens need more years to reach adult form (Karl and Fisher, 2009).

Many factors such as elevation, drought, climate, interspecific competition and predator-prey interactions make differences in age structure and other life-history traits of lizards (Roitberg and Smirina 2006a; Roitberg and Smirina 2006b; Gül et al., 2014). Özdemir et al. (2012) indicated that different environmental factors might affect population age structure. Roitberg and Smirina (2006b) reported that there is an increase in the mean age of lizard species from the colder condition. Moreover, the low mean age may also be seen in low altitude populations: 2.21 years were found in an island population of *Podarcis siculus* (Raia et al. 2010) and 4.12 years in *Eremias argus* (Kim et al. 2010). Age structure, body size and longevity of reptiles are different among the population of the same species. For example, the age of *Lacerta agilis* from the small village of Ferrere (Italy) was 4 years in males and 3 years in females while the age of individuals of the same species from the wetern coast of Sweden is 11 years for males and 12 years for females (Olsson and Shine, 1996; Guarino et al., 2010).

## CONCLUSION

Herein, we compared body size, age structure and longevity of twenty-four populations of *H. vittatus* from different altitudes. The current study shows that the mean age of populations increases with high altitudes whereas the mean SVL of populations decreases. Moreover, females are larger than

males, although male-biased SSD occurs in twenty-four populations of *H. vittatus*. Thus, it may be related to less competition and high food availability in high altitudes.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Dokuz Eylul University Scientific Research Coordination Unit. Project Number: 2017.KB.FEN.023

## Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

## Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

## REFERENCES

- Altunışık A, Gül Ç, Özdemir N, Tosunoğlu M, Ergül T, 2013. Age structure and body size of the Strauch's racerunner, *Eremias strauchi strauchi* Kessler, 1878. Turkish Journal of Zoology, 37:539 – 543.
- Altunışık A, Kalaycı TE, Uysal İ, Tosunoğlu M, Özdemir N, 2016. Age, adult survival rate and adult life expectancy of a *Podarcis tauricus* population (Reptilia: Lacertidae) from Saros Bay, Turkey. Russian Journal of Herpetology, 23(4):278-282.
- Altunışık A, Eksilmez H, 2018. Demographic life-history traits in a population of a critically endangered species, *Darevskia dryada* (Darevsky & Tuniyev, 1997). Animal Biology, 0:1-11.
- Arakelyan M, Petrosayan R, Ilgaz Ç, Kumlutaş Y, Durmus SH, Tayhan Y, Danielyan F, 2013. A skeletochronological study of parthenogenetic lizards of genus *Darevskia* from Turkey. Acta Herpetologica, 8(2):99- 104.
- Baran İ, Ilgaz Ç, Avcı A, Kumlutaş Y, Olgun K (2012) Türkiye am- fibi ve sürüngenleri. TÜBİTAK Popüler Bilim Kitapları, Ankara. [In Turkish]
- Bauer AM, 2003. On the identity of *Lacerta punctata* Linnaeus 1758, the type species of the genus Euprepis Wagler 1830, and the generic assignment of Afro- Malagasy skinks. African Journal of Herpetology, 52:1–7.
- Blanckenhorn WU, 2000. Temperature effects on egg size and their fitness consequences in the yellow dung fly *Scathophaga stercoraria*. Evolutionary Ecology, 14:627–643
- Bülbül U, Kurnaz M, Eroglu AI, Koç H, Kutrup B, 2016a. Age and growth of the red-bellied lizard, *Darevskia parvula*. Animal Biology, 66:81-95.
- Bülbül U, Kurnaz M, Eroğlu AI, Koç H, Kutrup B, 2016b. Body size and age structure of the endangered Clark's lizard (*Darevskia clarkorum*) populations from two different altitudes in Turkey. Amphibia-Reptilia, 37(4):450-456.
- Cabezas-Cartes F, Boretto JM, Ibarregüengoytia NR, 2015. Age, growth and life-history parameters of an endemic vulnerable lizard from Patagonia, Argentina. Journal of Herpetology, 25: 215-224.
- Dubey S, Sinsch U, Dehling MJ, Chevalley M, Shine R, 2013. Population demography of an endangered lizard, the Blue Mountains Water Skink, BMC Ecology, 13(1):4.
- Endler JA, 1992. Geographic variation, speciation, and clines. Princeton University Press, Princeton.
- Eroğlu AI, Bülbül U, Kurnaz M, 2017. Age structure and growth in a Turkish population of the Italian wall lizard *Podarcis siculus* (Rafinesque-Schmaltz, 1810) (Reptilia: Lacertidae). Acta Zoologica Bulgarica, 69:209-214.

- Eroğlu Aİ, Bülbül U, Kurnaz M, Odabaşı Y, 2018. Age and growth of the common Wall lizard, *Podarcis muralis* (Laurenti, 1768), Animal Biology, 0:1-13.
- Grimm A, Ramirez AMP, Moulherat S, Reynaud J, Henle K, 2014. Life-history trait database of European reptile species. Nature Conservation, 9:45 – 67.
- Guarino FM, Gia ID, Sindaco R, 2010. Age and growth of the sand lizards (*Lacerta agilis*) from a high Alpine population of north-western Italy. Acta Herpetol, 5:23-29.
- Güçlü S, Candan K, Lankiliç T, Kumlutaş Y, Durmuş SH, Poulakakis N, Ilgaz Ç, 2014. Phylogeny of *Trachylepis* sp. (Reptilia) from Turkey inferred from mtDNA sequences. Mitochondria DNA, 25(6):456-463.
- Gül S, Özdemir N, Kumlutaş Y, Ilgaz Ç, 2014. Age structure and body size in three populations of *Darevskia rudis* (Bedriaga, 1886) from different altitudes. Herpetozoa, 26:151 – 158.
- Gül S, Özdemir N, Avcı A, Kumlutaş Y, Ilgaz Ç, 2015a. Altitudinal effects on the life history of the Anatolian lizard (*Apathya cappadocica*, Werner 1902) from southeastern Anatolia, Turkey. Turkish Journal of Zoology, 39:507 – 512.
- Gül S, Özdemir N, Kumlutaş Y, Durmuş SH, Ilgaz Ç, 2015b. Age structure and body size variation in populations of *Darevskia bithynica* (Méhely, 1909) (Reptilia: Lacertidae) from different altitudes in Northwestern Turkey. Acta Zoologica Bulgarica, 67(4):487-491.
- James CD, 1991. Growth rates and ages at maturity of sympatric scincid lizards (*Ctenotus*) in central Australia. Journal of Herpetology, 25:284-295.
- Kalaycı TE, Altunışık A, Uysal İ, Tosunoğlu M, Özdemir N, 2018. Age determination of *Heremites vittatus* (Bridled Skink) (Oliver, 1804) using skeletochronology in Sivas population, Turkey. Biological Diversity and Conservation, 11(2):1-6.
- Kanat B, Tok V, 2015. Age structure of *Hemidactylus turcicus* (L., 1758) (Sauria: Gekkonidae) from southwestern Anatolis (Muğla, Turkey). Turkish Journal of Zoology, 39:373-377.
- Karin BR, Metallinou M, Weinell JL, Jackman TR, Bauer AM, 2016. Resolving the higher-order phylogenetic relationships of the circumtropical Mabuya group (Squamata: Scincidae): an out-of-Asia diversification. Molecular Phylogenetics and Evolution, 102:220–232.
- Karl I, Fischer K, 2009. Altitudinal and environmental variation in lifespan in Copper butterfly *Lycaena tityrus*. Functional Ecology, 23:1132–1138
- Kim JK, Song JY, Lee JH, Park D, 2010. Physical characteristics and age structure of Mongolian racerunner (*Eremias argus*; Larcertidae; Reptilia). Journal of Ecology Field Biology, 33: 325-331.
- Kolarov TN, Vljevic LK, Polovic LDG, Kalezic ML, 2010. The body size, age structure and growth pattern of the endemic Balkan mosor rock lizard (*Dinolacerta mosorensis kolombatovich*, 1886). Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae, 56:55-71.
- Kumlutaş Y, Candan K, Ilgaz Ç, 2015. A new locality record of *Trachylepis vittata* (Oliver, 1804) (Reptilia: Scincidae) in Nortytheastern Anatolia, Turkey. Russian Journal of Herpetology, 22(4):310-314.
- Kurnaz M, Eroğlu Aİ, Bülbül U, Koç H, Kutrup B, 2017. The life-history traits in a breeding population of *Darevskia valentini* from Turkey. Acta Herpetologica, 12(2): 167-173.
- Lovich E, Gibbons JW, 1992. A review of techniques for quantifying sexual size dimorphism. Growth Dev Aging, 56:269-281.
- Mausfeld P, Vences M, Schmitz A, Veith M, 2000. First data on the molecular phylogeography of scincid lizards of the genus *Mabuya*. Molecular Phylogenetic Evolution, 17:11–14.



- Mausfeld P, Schmitz A, Böhme W, Misof B, Vrcibradic D, Rocha CFD, 2002. Phylogenetic affinities of *Mabuya atlantica* Schmidt, 1945, endemic to the Atlantic ocean archipelago of Fernando de Noronha (Brazil): necessity of partitioning the genus *Mabuya* Fitzinger, 1826 (Scincidae: Lygosominae). *Zool. Anz.* 241:281–293.
- Nagy L, Grabherr H, 2009. *The Biology of Alpine Habitats*. Oxford: Oxford University Press.
- Mermer A, Kumaş M, Mutlu HS, Çiçek K, 2020. Age structure of a population of *Chalcides ocellatus* (Forsk., 1775) (Sauria: Scincidae) in Mediterranean Anatolia. *Zoology in the Middle East*, <http://dx.doi.org/10.1080/09397140.2020.1781362>.
- Orlova VF, Smirina EM, 1983. Age determination of *Lacerta derjugini* Nik. in natural populations. *Biologicheskie Nauki*, 9:53-57.
- Olsson M, Shine R, 1996. Does reproductive success increase with age or with size in species with indeterminate growth? A case study using sand lizards (*Lacerta agilis*). *Oecologia*, 05:175–178.
- Olsson M, Madsen T, 1998. Sexual selection and sperm competition in reptiles. In: *Sperm Competition and Sexual Selection* (T. R. Birkhead & A. P. Møller, eds), pp. 503–578. Academic Press, London.
- Özdemir N, Altunışık A, Ergül T, Gül S, Tosunoğlu M, Cadeddu G, Giacomini C, 2012. Variation in body size and age structure among three Turkish populations of the treefrog *Hyla arborea*. *Amphibia-Reptilia*, 33:25–35.
- Raia P, Guarino FM, Turano M, Polese G, Rippa D, Carotenuto F, Monti DM, Cardi M, Fulgione D, 2010. The blue lizard spandrel and the island syndrome. *BMC Evolutionary Biology*, 10:289.
- Rastegar-Pouyani, N., Fattahi, R., & Gholamifard, A. (2013). Cranial osteology of the Bridled Skink, *Trachylepis vittata* (Oliver, 1804) and its comparison with *Trachylepis aurata transcaucasica* (Chernov, 1926) (Sauria: Scincidae). *Russian Journal of Herpetology*. 20(4): 276-286.
- Rastegar-Pouyani, N, Fattahi R, 2015. Sexual dimorphism in *Trachylepis vittata* (Olivier, 1804) (Sauria: Scincidae) in the Zagros Mountains, western Iran. *Turkish Journal of Zoology*, 39:59-65
- Rohr DH, 1997. Demographic and life-history variation in two proximate populations of a viviparous skink separated by a steep altitudinal gradient. *Journal of Animal Ecology*, 66:567-578.
- Roitberg ES, Smirina EM, 2006a. Adult body length and sexual size dimorphism in *Lacerta agilis boemica* (Reptilia, Lacertidae): between-year and interlocality variation. In: Corti C, Lo Cascio P, Biaggini M, editors. *Mainland and Insular Lacertid Lizards: A Mediterranean Perspective*. Florence, Italy: Firenze University Press, pp. 175–187.
- Roitberg ES, Smirina EM, 2006b. Age, body size, and growth of *Lacerta agilis boemica* and *L. agilis strigata*: a comparative study of two closely related lizard species based on skeletochronology. *Journal of Herpetology*, 16:133–148.
- Roitberg ES, 2007. Variation in sexual size dimorphism within a widespread lizard species, Pp. 143 – 217. In: Fairbairn, D.J., Black enhorn, W.U. & Szekely, T. (Eds.): *Sex, Size, and Gender Roles: Evolutionary Studies of Sexual Size Dimorphism*. Oxford University Press, New York, USA, 280 pp.
- Sears MW, 2005. Geographic variation in the life history of the sagebrush lizard: the role of thermal constraints on activity. *Oecologia*, 143:25–36.
- Tomašević K, Ljubisavljević K, Polović L, Dukić G, Kalezić ML, 2010. The body size, age structure and growth pattern of the endemic Balkan mosor rock lizard (*Dinarolacerta mosorensis* Kolombatović, 1886). *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 56:55 – 71.

- Üzüm N, Avcı A, Kumlutas Y, Beser N, Ilgaz Ç, 2015. The first record of age structure and body size of the Suphan Racerunner, *Eremias suphani* Basoglu & Hellmich, 1968. Turkish Journal of Zoology, 39:513-518.
- Üzüm N, Ilgaz Ç, Avcı A, Candan K, Güler H, Kumlutaş Y, 2018. Comparison of the body size and age structure of Lebanon Lizard, *Phoenicolacerta laevis* (Gray, 1838) at different altitudes in Turkey. Vertebrate Zoology, 68(1):83-90.
- Wapstra E, Swan R, O'Reilly JM, 2001. Geographic variation in age and size at maturity in a small Australian viviparous skink. Copeia, 2001:646-655.
- Whiting AS, Sites JW, Pellegrino KCM, Rodrigues MT, 2006. Comparing alignment methods for inferring the history of the new world lizard genus *Mabuya* (Squamata: Scincidae). Molecular Phylogenetics and Evolution, 38:719-730.
- Yakın BY, Tok CV, 2015. Age estimation of *Anatololacerta anatolica* (Werner, 1902) in the vicinity of Çanakkale, by skeletochronology. Turkish Journal of Zoology, 39:66 – 73.
- Yamahira K, Conover DO, 2002. Intra- vs. interspecific latitudinal variation in growth: adaptation to temperature or seasonality? Ecology, 83:1252-1262
- Žagar A, Osojnik N, Carretero MA, Vrezek A, 2012. Quantifying the intersexual and interspecific morphometric variation in two resembling sympatric lacertids: *Iberolacerta horvathi* and *Podarcis muralis*. Acta Herpetologica, 7:29 – 39.

**Atf İçin:** Güner A, Güner Ö, Karabay Yavaşoğlu NU, 2021. Giresun Tombul Fındık (*Corylus avellana* L.) Yağının Serviks, Meme ve Kolon Kanser Hücrelerinde Sitotoksik ve Antianjiyojenik Aktivitesi. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 916-926.

**To Cite:** Güner A, Güner Ö, Karabay Yavaşoğlu NU, 2021. Antiangiogenic and Cytotoxic Activity of Giresun Tombul Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Oil on Cervix, Breast, and Colon Cancer Cells. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 916-926.

**Giresun Tombul Fındık (*Corylus avellana* L.) Yağının Serviks, Meme ve Kolon Kanser Hücrelerinde Sitotoksik ve Antianjiyojenik Aktivitesi**

Adem GÜNER<sup>1\*</sup>, Özlem GÜNER<sup>2</sup>, Nefise Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU<sup>3</sup>

**ÖZET:** *Corylus avellana* L. çoğunlukla Giresun'da yetişen dünyanın en kaliteli fındık türlerinden biridir. Bu çalışma, Giresun Tombul fındık yağının (0.5, 5 ve 50 mg L<sup>-1</sup>) antikanser ve antianjiyojenik aktivitelerini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Sitotoksikite insan serviks, kolon ve meme kanseri hücreleri üzerinde MTT ve laktat dehidrojenaz salım (LDH) analizleri ile belirlenmiştir. Hücrelerin oksidatif durumu, toplam oksidatif stres (TOS) ve toplam antioksidan kapasite (TAK) yöntemleriyle ortaya konulmuştur. Anti-anjiyojenik aktiviteyi değerlendirmek için civciv koryoallantoik membran (HET-CAM) deneyi kullanılmıştır. Sonuçlarımız, *C. avellana* yağının özellikle serviks kanseri hücrelerinde daha fazla olmak üzere, serviks ve kolon kanseri hücrelerinin (sırasıyla IC 50 = 6.5 ± 0.35 mg L<sup>-1</sup> ve IC 50 = 26.2 ± 3.15 mg L<sup>-1</sup>) canlılığını önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir. Bununla birlikte, fındık yağ örneği, LDH salınımında önemli bir inhibisyona yol açarak sitotoksikite ile doğrusal bir korelasyon sergilemiştir. *C. avellana* yağ örneği konsantrasyona bağlı bir şekilde serviks ve kolon hücrelerinin TAK seviyelerinde önemli bir artışa neden olurken, TOS seviyelerinde istatistiksel olarak önemli azalmaya yol açmıştır. Aynı zamanda, *C. avellana* yağ örneği yüksek konsantrasyonlarda anti-anjiyojenik etkinlik göstermiştir. Sonuçlar, Giresun fındığının umut verici bir antikanser ajan olduğunu ve bununla birlikte terapötik etkinliğini ortaya koymak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Anjiyojenesis, antikanser, antioksidan, *Corylus avellana*, oksidatif stres

**Antiangiogenic and Cytotoxic Activity of Giresun Tombul Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Oil on Cervix, Breast, and Colon Cancer Cells**

**ABSTRACT:** *Corylus avellana* L. is one of the best quality hazelnut species grown mostly in Giresun province. This present study was realised to evaluate the anticancer and antiangiogenic activities of Giresun Tombul hazelnut oil (0.5, 5 and 50 mg L<sup>-1</sup>). Cytotoxicity was determined by MTT and lactate dehydrogenase release (LDH) assays on human cervix, colon, and breast cancer cells. Oxidative status was analyzed by total oxidative stress (TOS) and total antioxidant capacity (TAC) assay. Hen's egg test chorioallantoic membrane (HET-CAM) assay was used to evaluate the anti-angiogenic activity. Our results showed that *C. avellana* oil had significant anti-proliferative activity against both cervix and colon cancer cells (6.5 ± 0.35 mg L<sup>-1</sup> and 26.26 ± 3.15 mg L<sup>-1</sup>, respectively), with more inhibiting the cervix cancers and caused significant inhibition in LDH release as a linear correlation with MTT results. *C. avellana* oil significantly increased the TAC status on the cervix and colon cells while causing a significant reduction in TOS levels in a dose-dependent manner. *C. avellana* oil had anti-angiogenic effectiveness in higher doses. The results indicated that Giresun hazelnut was a promising anticancer agent and however, further studies are needed to reveal its therapeutic effectiveness.

**Keywords:** Antiangiogenic, anticancer, antioxidant, *Corylus avellana*, oxidative stress

<sup>1</sup> Adem GÜNER ([Orcid ID: 0000-0003-3295-3538](https://orcid.org/0000-0003-3295-3538)), Sinop Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, İş Sağlığı ve Güvenliği Bölümü, Sinop, Türkiye

<sup>2</sup> Özlem GÜNER ([Orcid ID: 0000-0002-8302-9073](https://orcid.org/0000-0002-8302-9073)), Sinop Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Ebelik Bölümü, Sinop, Türkiye

<sup>3</sup> Nefise Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU ([Orcid ID: 0000-0002-7483-0184](https://orcid.org/0000-0002-7483-0184)), Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bornova, İzmir, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Adem GÜNER, e-mail: ademguner@gmail.com

## GİRİŞ

Kanser, hızlı yayılma ve vücudun diğer bölgelerine metastaz yeteneği olan anormal hücre büyümelerini içeren hastalık grubudur. Son yıllarda, dünya çapında teşhis edilen kanser vakalarının ve kanser ölümlerinin sayısında sürekli bir artış olmuştur. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2019 yılındaki küresel popülasyona yönelik kanser insidansı verilerine göre, 2018'de 18.1 milyon yeni vaka ve 9.6 milyon ölüm kaydedilmiştir (ACS, 2018). Bu duruma ek olarak, 2025 yılına kadar kanser vakalarının 20 milyonu geçeceği tahmin edilmektedir. Bu rakamlardaki artışlar sıklıkla artan ortalama yaşam süresi, teşhis ve önlemedeki eksiklikler ve özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki obezite ve sigara içme alışkanlıkları ya da yaşam tarzındaki değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Özellikle, kanser vakalarının % 40'ının sigara, aşırı kilolu olma, alkol tüketimi, düşük meyve ve sebze alımı, mesleki tehlikeler ve güneşe maruz kalma gibi sağlıksız yaşam tarzı alışkanlıklarıyla bağlantılı olduğu tahmin edilmektedir (Colditz ve ark., 2012). Bununla birlikte, kanser vakalarında diyet uygulamalarının kanser riskini azaltabilme potansiyeline sahip olduğuyla ilişkili kanıtlar giderek artmaktadır (Riboli, 2014). Meyve, sebze, balık ve zeytinyağı açısından zengin bir Akdeniz diyetinin kanser riskini % 12 azaltabileceği ve doğal içerikli diyet takviyelerinin kanserin önlenmesinde yararlı bir içerik olarak kullanılabileceği sıklıkla rapor edilmiştir (La Vecchia, 2009).

Bitkiler eski çağlardan beri canlılar için önemli bir besin kaynağı olmuştur. Teknolojik gelişmelere bağlı olarak bitkilerin yararlı etkilerinin yapısındaki aktif sekonder metabolitlerden kaynaklandığını ortaya koyan sayısız çalışma yürütülmüştür. Bu bağlamda pek çok bitkinin antioksidan, antikanser, antimikrobiyal, antiülseratif, antibakteriyel, antimutajenik ve antihistaminik gibi etkileri yoğun olarak ortaya konulmuştur (Benetou ve ark., 2008, Güner ve ark., 2019a). Aynı zamanda bitkisel doğal ürünler, medikal endüstrisinde pek çok ilacın hammadresi olarak kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanılan modern ilaçların yaklaşık % 25'i bitkilerden elde edilmiştir. Modern farmakoloji de en az 7.000 tıbbi bileşik, bitkilerden elde edilmektedir (Lui, 2004). Dünya genelinde yoğun bir kullanıma sahip olan fındık ürünleri de, yapısındaki yüksek miktarlardaki mineral, protein, diyet lifi, vitamin ve çoklu doymamış yağ asitlerinden dolayı farmasötik alanda gittikçe artan bir ivmeye sahiptir (Lui, 2003). Yapılan son çalışmalarda özellikle prostat ve kolorektal kanser hücrelerinde fındık ve fındık yan ürünlerinin antikanser etkinliği ortaya konulmuştur. Aynı zamanda, kemoterapi ilaçlarının etken maddesi olarak kullanılan taksanların fındık ürünlerinde bulunması bu bitkisel ürünleri daha kıymetli hale getirmiştir (Falasca & Casari, 2012).

Türkiye dünyanın en zengin fındık tedarikçisi konumundadır ve toplam küresel üretimin yaklaşık % 70'ine katkıda bulunmakta olup, ülkemizi İtalya, ABD ve İspanya izlemektedir (Ciarmiello ve ark., 2004). Türkiye'nin fındık ve fındık ürünlerinden toplam ihracat geliri yıllık 2 milyar ABD dolarının üstündedir. Karadeniz Bölgesi'nin iklim özellikleri, fındık için en ideal ortamı oluşturur ve farklı türde fındığa ev sahipliği yapmaktadır. Ülkemizdeki kültür fındıkları, 5-6 metre boylanabilir ve bunlar "*Corylus avellana*" ile "*Corylus maxima*" türlerinin melezleridir (Köksal ve ark., 2006; Madesis ve ark., 2013). Aynı zamanda, Türk fındığı, kalite olarak Giresun ve Levant olmak üzere ikiye ayrılır. Giresun'un kaliteli fındığı, tadı ve içerdiği yağ oranı ile yeryüzünün en nitelikli fındığı özelliğindedir. Daha az yağlı levant kalite fındık ise Samsun, Ordu, Samsun, Sakarya, Bolu, ve Zonguldak illerinde yetişmektedir (Köksal, 2002).

Başta Karadeniz bölgesi olmak üzere Türkiye genelinde fındık ve fındık ürünleri sıklıkla gıda maddesi olarak ilgi görürken, tıp ve eczacılık gibi alanlarda beklenen ilgiyi görmemiştir. Bu amaçla mevcut çalışma Giresun ilinden toplanan tombul fındığından (*C. avellana*) elde edilen yağın antikanser ve antianjiyojenik aktivitelerinin ortaya konulması amacıyla yürütülmüştür.

## MATERYAL ve METOT

Çalışmada kullanılan fındık örnekleri, 2019 yılının Ağustos ayında Tirebolu Karakaya havzasında toplanmıştır. Örneklerin kabuğu uzaklaştırıldıktan sonra, ticari olarak soğuk sıkım fındık yağı satışı gerçekleştiren firma aracılığıyla fındıkların yağı çıkarılmıştır. Elde edilen yağ örnekleri deneyin yapılışına kadar -20°C'de saklanmıştır.

### Sitotoksik aktivitenin belirlenmesi (MTT yöntemi)

Fındık yağ örneğinin sitotoksik etkinliği MCF-7 (İnsan meme adenokarsinom hücre hattı, ATCC-HTB-22), CaCo-2 (İnsan kolon kolektoral adenokarsinom hücre hattı, ATCC-HTB-37), HeLa (İnsan servikal kanser hücre hattı, ATCC-CCL-2) ve normal HEK-293 (insan embriyonik böbrek hücre hattı, ATCC-CRL-1573) hücre hatlarında belirlenmiştir.

Tüm hücre hatları,  $1 \times 10^5$  hücre/ml başlangıç hücre konsantrasyonunun da 96 kuyucuklu plakalara yetiştirilmiştir. Hücreler, 24 saat sonra farklı konsantrasyonlarda (0.5, 5 ve 50 mg L<sup>-1</sup>) örneklerle işlem uygulanmış ve pozitif kontrol için (0.2, 2 ve 20 mg L<sup>-1</sup>) doksorubisin kullanılmıştır. Çözünmüş malzemenin optik yoğunlukları (OD), 48 saat sonra UV görünür spektrofotometre ile 570 nm'de belirlenmiştir. Canlı hücrelerin yüzdesi, spektrofotometrik ölçümle belirlenmiştir. Her bir hücre hattı için uygulanan konsantrasyonda, kontrol ile karşılaştırılarak, hücre canlılığı ve maddelerin IC50 değerleri hesaplanmıştır. Hesaplama GraphPad Prism 5 programı kullanılmıştır.

% Canlılık =  $100 \times \text{Uygulanan konsantrasyondaki ortalama absorbans} / \text{Kontrol hücre absorbans}$

### Laktat dehidrogenaz (LDH) salınımı analizi

Fındık yağ örneğinin sitotoksik etki göstererek ortaya çıkardıkları LDH salınım seviyelerini belirlemek amacıyla ticari LDH sitotoksikite kiti (Cayman, ABD) kullanılmıştır. Test prosedürü, laktatın piruvat oksidasyonu aracılığı ile LDH, NAD<sup>+</sup>'ın NADH ve H<sup>+</sup>'a indirgenmesini katalizlemeye dayanmaktadır. LDH testinin denemelerde kullanılmasının temel sebebi hücrelerin nekroz sonucu hasar görüp görmediklerinin tespit edilmesidir. Ayrıca gerçekleştirilen sitotoksikite analizlerini desteklemek amacıyla LDH testi tercih edilmiştir. LDH testleri için pozitif kontrol olarak mitomisin-C kullanılmıştır.

### Toplam antioksidan kapasite (TAK) ve toplam oksidatif stres (TOS) analizi

Fındık örneğinin hücreler üzerinde TAK seviyelerini belirlemek amacıyla ticari TAK kiti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanılmıştır (Güner & İlhan, 2020). Kitin uygulamasında amaç, kullanılan örneklerin bir serbest radikal olan 2,2'-azino-bis(3- etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) bileşiğinin oluşumunu inhibe etmek suretiyle sahip oldukları antioksidan düzeylerini belirlemektir. Kit uygulaması, vitamin E analogu olan ve Troloks eşdeğeri olarak adlandırılan kararlı bir antioksidan ile kalibre edilmektedir. TAK testleri için pozitif kontrol olarak askorbik asit kullanılmıştır.

Fındık yağ örneğinin hücreler üzerinde TOS düzeylerini belirlemek amacıyla ticari TOS kiti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanılmıştır. Kit uygulamasında, örnekte mevcut olan oksidan maddeler, demir iyonu içeren kompleksleri demir iyonuna oksitlemektedir. Demir iyonları asidik ortamda kromojen

ile renkli bir yapı oluşturmaktadır. Spektrofotometrik olarak ölçülen renk yoğunluğu, örnekte bulunan oksidan moleküllerinin toplam miktarı ile ilişkilidir. Kit uygulaması hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile kalibre edilmektedir. TOS testleri için pozitif kontrol olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılmıştır.

### **Koryoallantoik membran yöntemi (HET-CAM) ile antianjiyogenik aktivitenin belirlenmesi**

Fındık yağ örneğinin antianjiyogenik etkilerini ortaya koymak amacıyla döllenmiş tavuk yumurtaları üzerinde, koryoallantoik membran modeli uygulaması gerçekleştirilmiştir. 50-60 gr ağırlığında, Leghron tavuk yumurtalarında analiz gerçekleştirilmiştir. Döllenmiş yumurtalar, 37 ± 1°C'de, % 58 ± 2 nem oranında 5 gün kuluçka makinasında inkübasyona bırakılmışlardır. 5. günde yumurtalar çıkartılmış, hava boşluğu (künt) olan yerden işaretleme yapılmış ve o bölgeden 25 mm'lik disk şeklinde yumurta kabuğu kaldırılmıştır. Membran % 9'luk NaCl ile nemlendirildikten sonra yumurtalar tekrar inkübatöre yerleştirilmiş ve 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Koryoallantoik membran, yaklaşık 2 cm çapa ulaştığında 0.3 mL fındık örnekleri direkt olarak uygulanmıştır. Pozitif ve negatif kontrol maddeleri de aynı miktarda uygulanmıştır. Kabuktaki bu açıklık laboratuvar filmi ile kapatılmıştır. Her bir test bileşiğinin her bir konsantrasyonu için 5 yumurtaya uygulama yapılmış ve tüm testler iki kez tekrarlanmıştır. Uygulama sonucunda örnekler hemoraji, vasküler lizis ve koagülasyon bakımından değerlendirildikten sonra elde edilen skorlar aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda irritasyon etkisi, stereomikroskop altında skorlama tablosunu takiben incelendi. Skorlama şu şekildedir;

$$\text{Irritasyon skoru} = [(301-h) \times 5]/300 + [(301-l) \times 7]/300 + [(301-c) \times 9]/300$$

Burada, h (hemoraji); vasküler kanamanın meydana geldiği zamandır, l (lizis); ilk vasküler parçalanmanın meydana geldiği zamandır ve c (koagülasyon); vasküler pıhtılaşmanın ilk meydana geldiği zamandır. IS'ye göre tahriş sınıflandırması: < 0.9; tahriş edici olmayan, 1-4.9; hafif tahriş, 5-8.9; orta derecede tahriş ve 9-21, şiddetli tahriş edici etki.

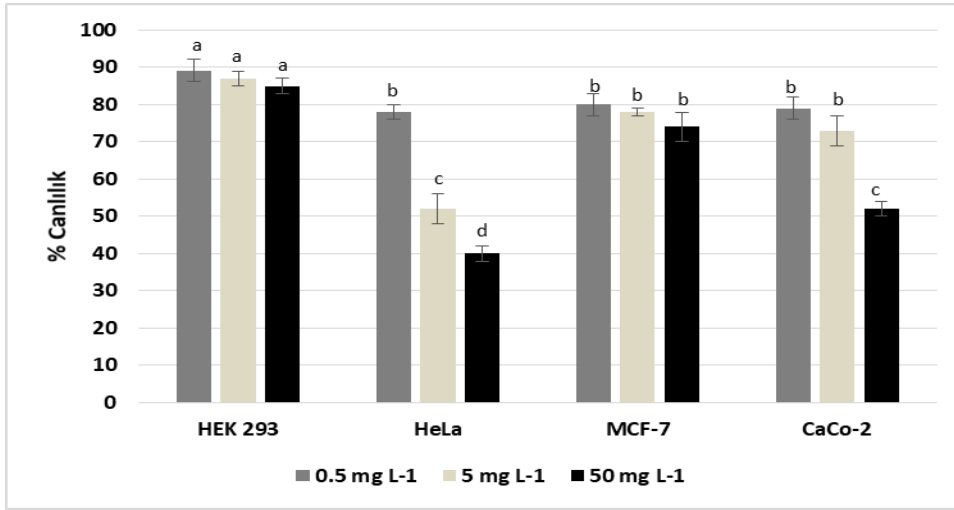
### **İstatistiksel analiz**

İstatistiksel analiz SPSS 20 (SPSS, Chicago, IL, ABD) kullanılarak yapıldı. Deneysel veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile analiz edilmiş, daha sonra uygulama ve kontrol grupları arasında herhangi bir fark olup olmadığını incelemek için Duncan testi yapılmıştır. Veriler arasındaki korelasyonları belirlemek için Pearson'ın r katsayısı kullanıldı. Sonuçlar ortalama ± SD değerleri olarak verildi ve p < 0.05 anlamlı kabul edilmiştir. Tüm deneyler üç kez tekrarlandı.

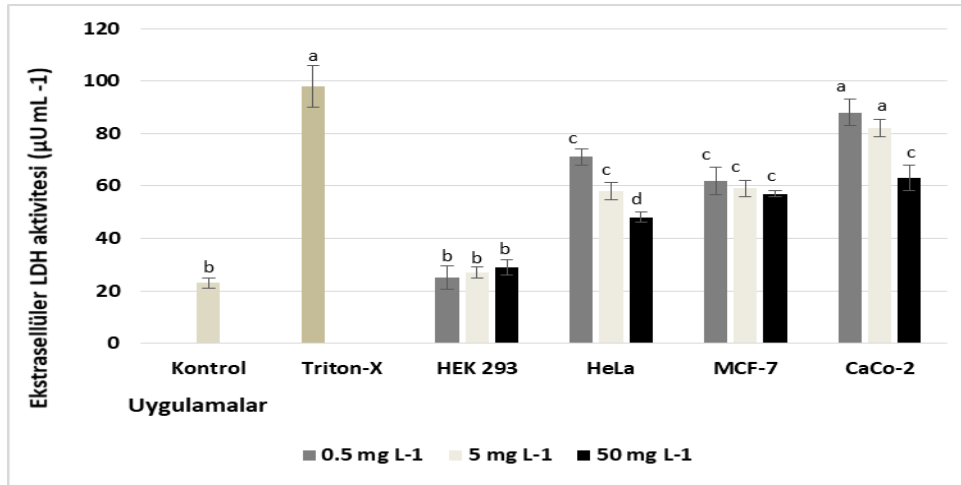
### **BULGULAR ve TARTIŞMA**

*C. avellana* Betulaceae familyasına ait olup ve dünyadaki en popüler ağaç formlarından biridir. Her fındık çeşidinin kendine has besinsel bileşimi, özgü tadı ve aroması bulunmaktadır. Giresun ilinde yetişen Tombul (yuvarlak) fındık, Türkiye'de yetiştirilen 17 ticari fındık ürün arasında birinci sınıf kaliteye sahip olup aynı zamanda dünyanın en kaliteli fındık türlerinden biri olduğu bilinmektedir (Alasalvar ve ark., 2003). Daha önceki çalışmalarda lipit, karbonhidrat, mineral ve vitamin gibi aktif bileşenlere sahip olduğu ortaya konulan Giresun Tombul fındığının, kanser hücrelerine karşı etkinliğiyle ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, *C. avellana* yağ örneklerinin kolon, meme ve serviks kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkinlik gösterdiği ortaya konulmuştur.

Kanser, yaşam ve beslenme tarzının değişmesi ile birlikte artış gösteren korkunç bir hastalık olup, başlama, çoğalma ve ilerleme gibi en az üç aşamada tanımlanan çok kademeli bir süreçtir (Green & Red, 1998). Bu safhaların ortaya çıkmasında en etkili faktörlerin, çeşitli ajanlar tarafından hücrelerde uyarılmış oksidatif stres kaynaklı olduğu bilinmektedir (Güner ve ark., 2019b). İlk aşamada, reaktif oksijen türleri (ROS), DNA'da gen mutasyonları ve yapısal değişiklikler oluşturarak DNA hasarı meydana getirebilir. Bununla birlikte, ROS, anormal gen ekspresyonuna, hücre-hücre iletişiminin bloke edilmesine ve ikinci mesajcı sistemlerin modifikasyonuna yol açarak hücrelerin çoğalmasında bir artışa veya başlatılan hücre popülasyonunun apoptozisinde bir azalmaya neden olmaktadır (Reuter ve ark., 2010; Güner ve ark., 2020). Bu kritik etkilerinden dolayı kanserin herhangi bir sürecine müdahil olarak, oksidatif stresi azaltmaya yönelik doğal bileşiklerin kullanılması hayati önem taşımaktadır. Bu çalışmamızda antioksidan etkileri bilinen tombul fındık yağının kanser hücrelerinde sitotoksik etkileri MTT test yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışmamızda *C. avellana* yağ örneğinin farklı konsantrasyonları (0.5, 5 ve 50 mg L<sup>-1</sup>) kullanılmıştır. Her üç konsantrasyonda da kanser hücre hatları (MCF-7, CaCo-2 ve HeLa) ve normal hücre hattı HEK-293 üzerindeki sitotoksik etkisi hücrelerin % 50'sinin çoğalmasını inhibe eden konsantrasyon olarak tanımlanan IC50 değeri hesaplanarak belirlenmiştir. Madde maruziyetine bağlı olarak kanser hücre hatlarında gözlemlenen hücre canlılık değerleri farklılıklar göstermiştir (Şekil 1). Test örneklerinin en etkili olduğu hücre hattı HeLa olarak tespit edilirken (6.5 ± 0.35 mg L<sup>-1</sup>), MCF-7 hücre hatlarında hesaplanabilir bir IC50 değeri hesaplanmamıştır. CaCo-2 hücre hattı incelendiğinde ise, 26.26 ± 3.15 mg L<sup>-1</sup> IC50 değeriyle inhibe edici etkiler gözlenmiştir. Benzer olarak, Esposito ve ark., (2017) A375, SK-Mel-28 ve HeLa kanser hücrelerinde *C. avellana*'nın etkinliğini inceledikleri çalışmada, fındık ekstresinin HeLa hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermişlerdir. Hücrel toksisitenin değerlendirilmesinde en önemli göstergelerden biri hasarlı/ölü hücrelerden hücrel ortama laktat dehidrojenaz (LDH) enziminin salınım seviyelerinin ölçülmesidir. Hücreler, toksik etkilere maruz kaldığında plazma membran bütünlükleri bozulur ve sitoplazmik bir enzim olan LDH hücrelerden sızarak ortama geçer (Koh ve ark., 2017; Güner, 2020). Böylece maruziyet sonrası LDH enzim aktivitesi ölçülerek hücre hasarı değerlendirilebilir. Mevcut çalışmamızda fındık uygulamalarından sonra HeLa ve CaCo-2 kanser hücrelerindeki sitotoksik etkinlik LDH salınımı testi ile aktivitesi ilk defa ortaya konulmuş ve sitotoksikite bulgularını destekleyici sonuçlar elde edilmiştir. (Şekil 2). Fındık yağ örneğiyle muamele edilen hücre hatları kontrol grubu ile kıyaslandığında, konsantrasyon artışına bağlı olarak HeLa ve CaCo-2 hücrelerinde LDH salınımı sırasıyla % 52 ve % 40 oranında inhibe olmuştur (p<0.05). MCF-7 hücrelerinde ise uygulamalar sonrası LDH salınımında istatistiki olarak anlamlı değişim bir olmamıştır. Bununla birlikte, LDH ve sitotoksikite denemeleri arasında korelatif bir ilişki tespit edilmiştir (R<sup>2</sup>=0.999). *Corylus* türlerinden izole edilen farklı peptid türlerinin insan umbilikal ven endotel hücrelerinde oksidatif stres hasarlarına karşı artan antioksidan düzeyleri ve LDH salınımının inhibisyonu aracılığıyla sitoprotektif etkiler sergilediği ortaya konulmuştur (Fang ve ark., 2018).



**Şekil 1.** *C. avellana*'nın farklı hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri. Değerler ortalama  $\pm$  SD (n = 5) olarak ifade edilmiş ve aynı sütunda bulunan ve farklı üstyazı harfleri ile gösterilen değerler (a, b, c, d) p < 0.05 düzeyinde istatistiksel olarak birbirinden anlamlı farklılıkları gösterir

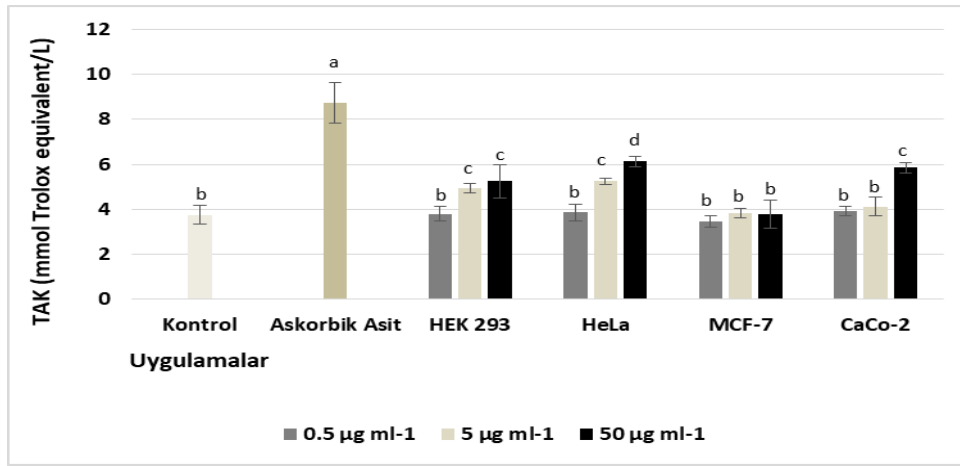


**Şekil 2.** *C. avellana*'nın farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücre hatlarında laktat dehidrojenaz (LDH) seviyeleri. Değerler ortalama  $\pm$  SD (n = 5) olarak ifade edilmiş ve aynı sütunda bulunan ve farklı üstyazı harfleri ile gösterilen (a, b, c, d) değerler p < 0.05 düzeyinde istatistiksel olarak birbirinden anlamlı farklılıkları gösterir (a: kontrol grubuna kıyasla anlamlı; b, c ve d: Triton-X grubuna kıyasla anlamlı)

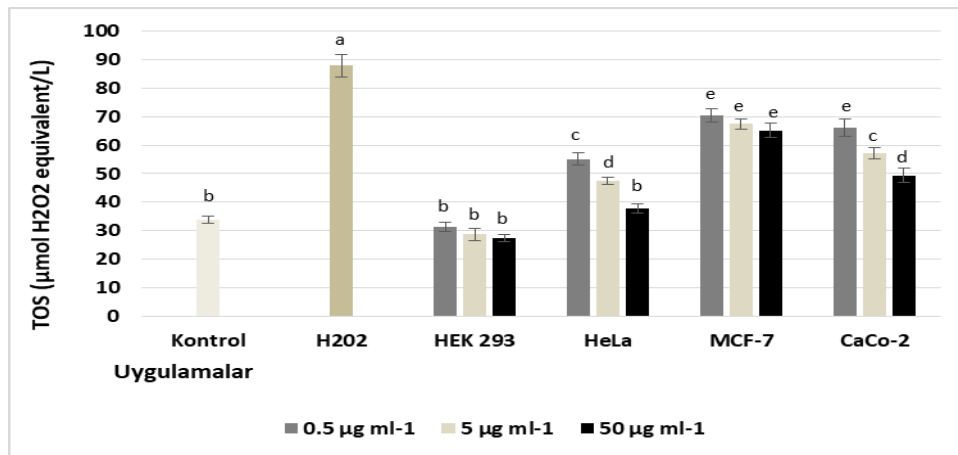
Kanser olgularının ortaya çıkmasında en etkili faktörlerden biri çeşitli eksojen veya endojen kaynaklar tarafından hücrelerde uyarılan ROS seviyelerindeki artışlardır. Bu artışların neden olduğu oksidatif stres, DNA hasarlarının yanı sıra antiapoptotik genlerin ekspresyonunda artışlara, normal hücre bölünmelerde kontrol edilemeyen bir anormal hücre çoğalmasına ve sonuçta hücre siklusunda düzensizliklere neden olmaktadır (Visconti & Grieco, 2006; Liou & Storz, 2010; Valko ve ark., 2011). Bu kritik etkilerinden dolayı, doğal ajanlarla kanserin oluşumu veya ilerleyişini önleyici stratejiler hayati önem taşımaktadır. Son zamanlarda, Fischer & Gleib (2013), fındık ve fıstık yağlarının, sızma zeytinyağına yakın ve ceviz, badem ve yer fıstığı yağlarından daha yüksek bir antioksidan kapasite sergilediğini bulmuşlardır. Başka bir çalışmada da, fındık ekstresinin yüksek antioksidan kapasite gösterdiği bildirilmiştir (Schmitzer ve ark., 2011). Fındık yağ örneği uygulamalarından sonra hücre hatlarındaki oksidan/antioksidan durumdaki değişimler Şekil 3 ve 4'de gösterilmiştir. Bu bağlamda,



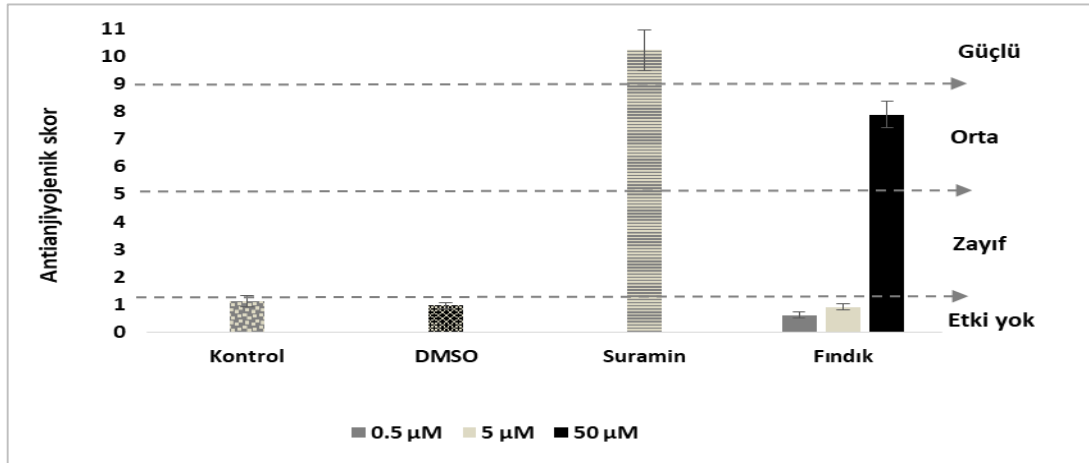
findık yağ örneği uygulamalarından sonra, konsantrasyon artışına bağlı olarak uygulamalardan sonra HeLa ve CaCo-2 hücrelerinin antioksidan durumunda sırasıyla % 60 ve % 49 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış ( $p < 0.05$ ) görülürken, oksidatif seviyelerde sırasıyla % 31 ve % 25 oranında istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) azalmalar görülmüştür. MCF-7 hücrelerinde ise findık yağ örneği uygulamaları antioksidan ve oksidan seviyeler de herhangi bir değişime yol açmamıştır. Yağ örneklerinin kanser hücrelerine karşı farklı inhibisyon etkileri, kanser hücrelerinin direnç yetenekleri ve yağ ekstraksiyonunun yapısındaki farklı metabolitlerinin farklı hücresel yollarla etkileşime girmesiyle açıklanabilir. Bununla birlikte, findık yağının var olan sitotoksik etkileri, hem serbest oksijen radikallerin üretimini baskılayarak hem de antioksidan sürece katkıda bulunarak kanser hücrelerinin canlılığını baskılamasıyla ortaya çıktığı düşünülmüştür.



**Şekil 3.** *C. avellana*'nın farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücre hatlarında total antioksidan kapasiteleri seviyeleri. Değerler ortalama  $\pm$  SD ( $n = 5$ ) olarak ifade edilmiş ve aynı sütunda bulunan ve farklı üstyazı harfleri ile gösterilen (a, b, c, ve d) değerler  $p < 0.05$  düzeyinde istatistiksel olarak birbirinden anlamlı farklılıkları gösterir (a: kontrol grubuna kıyasla anlamlı, b, c ve d: Askorbik asite kıyasla anlamlı)



**Şekil 4.** *C. avellana*'nın farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücre hatlarında total oksidan kapasite seviyeleri. Değerler ortalama  $\pm$  SD ( $n = 5$ ) olarak ifade edilmiş ve aynı sütunda bulunan ve farklı üstyazı harfleri ile gösterilen (a, b, c, d, and e) değerler  $p < 0.05$  düzeyinde istatistiksel olarak birbirinden anlamlı farklılıkları gösterir. (a: kontrol uygulama grubuna kıyasla anlamlı, b, c ve d: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubuna kıyasla anlamlı, e)



Şekil 5. *C. avellana*'nın farklı konsantrasyonlarının CAM yüzeyindeki 5 dakikalık maruziyeti takiben ortalama tahriş skoru

Anjiyojenez, yara iyileşmesi, doku büyümesi ve rejenerasyon gibi normal fizyolojilerde kan damarlarının oluşumunun gerçekleştiği karışık süreçlerdir. Anjiyojenez süreci yeni damar oluşumundan çok var olan damarlardan yan dal ve filiz oluşumlarıyla meydana gelen damarlanmalar olarak bilinmektedir (Kim & Byzova, 2014). Anjiyojenez de normal fizyolojik koşullar altında, proanjiyojenik ve antianjiyojenik faktörler arasında bir denge vardır, ancak bu denge, fizyolojik süreçleri teşvik etmek için ya da patolojik bir durumun bir parçası olarak her iki tip arabulucuya doğru kayabilir (Güner & Karabay Yavaşoğlu, 2018). Bu durumda anjiyojenez sağlıklı hücreler için vazgeçilmez bir kaynak olan damar oluşumunu ifade etse de, kanser gibi metabolizması hızlı ilerleyen durumlarda ise canlılık için hayati risk taşımaktadır (Folkman, 1995). Anjiyojenez kanser hücrelerinin başta hipoksi olmak üzere belirli uyaranlara maruz bırakılmasıyla aktive edilir ve tümör fazla büyüdüğünde vasküler endotelial büyüme faktörlerini etkileyerek yeni kaynaklara ulaşım sağlar (Eming ve ark., 2007). Bu yeni kan damarlarının gelişimi sadece tümör dokusunun besin maddeleri ile beslenmesini sağlamakla kalmaz, aynı zamanda kanser hücrelerinin metastazı için bir araç olabilmektedir (Nishida et al., 2006). Son yıllarda, kanserin antianjiyojenez sürecine müdahale sürecinde direkt olarak tümörü hedef almaktan ziyade, beslenmesini sağlayan damarlanma mekanizmasını inhibe eden çalışmalar tasarlanmıştır. Bu süreç, endotelial büyüme faktörleri inhibitörleri, endotel hücre sinyal transdüksiyon inhibitörleri, endotel hücre proliferasyonunun önleyicileri, matris metaloproteinaz inhibitörleri ve endotel kemik iliği öncü hücrelerinin inhibitörleri gibi hedef anjiyojenez inhibitörlerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilir (Denekamp, 1993; Muslim ve ark., 2012). Yürütülen birçok çalışma da, doğal kaynaklı anti-anjiyojenik ilaç uygulamalarının, yan etkileri azaltmada geleneksel kanser tedavisine kıyasla daha etkili olduğu, tümörü besleyen yeni kan damarlarının oluşumunu inhibe ettiği ve bu süreçte ilaç direnci olasılığının düşük olduğu bildirilmektedir (Ciardiello ve ark., 2000). Fındık yağ örneklerinin uygulamasına yanıt olarak ortaya çıkan lizis, kogülasyon ve hemoroji gibi antianjiyojenik etkinliği kanıtlamak amacıyla HET-CAM yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve değerlendirme sonucunda elde edilen skorlar Şekil 5'de gösterilmiştir. Pozitif kontrol olarak antianjiyojenik etkinliği kanıtlanmış süramin, negatif kontrol olarak ise NaCl kullanılmıştır. Çalışmada çözünen olarak kullanılan DMSO'nun herhangi bir etkisi tespit edilmemiştir. Pozitif kontrol (süramin), CAM ile etkileşime girerek 5 dakikalık bir süre için kanama, lizis ve pıhtılaşma ile sonlanan  $10.97 \pm 2.04$  skor ile antianjiyojenik aktivite sergilemiştir.  $50 \text{ mg L}^{-1}$ 'da

findık örneği, 5 dakikalık süre zarfında vasküler etkileri takiben  $7.92 \pm 0.9$ 'lık bir skorlama ile orta bir etki göstermiştir. Bununla birlikte, daha düşük konsantrasyon uygulamalarında herhangi değişim olmamıştır. Benzer olarak, Falasca ve ark., (2014) ellagik asit, anakardik asit, genistein, resveratrol ve inositol fosfatlar gibi biyoaktif bileşikler içeren fındığın, kanser sürecinde hücre döngüsünü etkileyerek, apoptozisin aktivasyonunun yanı sıra hücre proliferasyonu, migrasyonu ve anjiyojenezin inhibisyonu üzerinden kanser riskini azaltabileceğini ortaya koymuştur.

## SONUÇ

Sonuç olarak, fındık hem içerdiği biyoaktif bileşikler hem de lezzeti bakımından günümüze kadar önemli bir besin kaynağı haline gelmiştir. Mevcut çalışmada, Giresun fındığından elde edilen yağ örneklerinin serviks ve kolon kanser hücreleri üzerinde hem antioksidan kapasiteyi artırıp hemde ROS üretimini baskılayarak önemli bir sitotoksik etki sergilediği görülmüştür. Bu bağlamda, yüksek konsantrasyonlardaki antianjiyojenik aktivelere göz önüne alındığında, Giresun tombul fındığının kalite olarak birçok alanda tercih edilmesinin yanı sıra ileri laboratuvar teknikleriyle de desteklenerek bir antikanser ajanı olarak geliştirilme potansiyeline sahip olduğu ortaya konulmuştur.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından “FEN-BAP-A-150219-28” kodlu proje ile desteklenmiştir.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

## Yazar Katkısı

Güner A., ve Karabay Yavaşoğlu N.U. çalışmayı tasarladı. Güner A., hücre kültür çalışmalarını ve diğer enzim çalışmalarını gerçekleştirdi ve makaleyi düzenledi. Güner A., ve Güner Ö., antianjiyojenik denemeleri gerçekleştirdi ve çalışmanın sonuçlarını ve istatistiksel analizlerini gerçekleştirdi.

## KAYNAKLAR

- ACS, 2018. Cancer Facts and Figures. American Cancer Society, New York, NY, USA.
- Alasalvar C, Shahidi F, Liyana-Pathirana C, Ohshima T, 2003. Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). 1. Composition characteristics. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(13): 3790-3796.
- Benetou V, Trichopoulou A, Orfanos P, Naska A, Lagiou P, Boffetta P, Trichopoulos D, 2008. Greek EPIC cohort. Conformity to traditional Mediterranean diet and cancer incidence: the Greek EPIC cohort. British Journal of Cancer, 99(1): 191-195.
- Ciardello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Pomatico G, De Placido S, Bianco AR, Tortora G, 2000. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. Clinical Cancer Research, 6(5): 2053-63.
- Ciarmiello LF, Mazzeo MF, Minasi P, Peluso A, de Luca A, Piccirillo P, Siciliano RA, Carbone V, 2014. Analysis of Different European Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Cultivars: Authentication, Phenotypic Features, and Phenolic Profiles. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62(26): 6236-6246.
- Colditz GA, Wolin KY, Gehlert S, 2012. Applying what we know to accelerate cancer prevention. Science Translational Medicine, 4(127): 127-1244.

- Denekamp J, 1993. Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *British Journal of Radiology*, 66(783): 181-96.
- Eming SA, Brachvogel B, Odorisio T, Koch M, 2007. Regulation of angiogenesis: Wound healing as a model. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 42(3): 115-170.
- Esposito T, Sansone F, Franceschelli S, Del Gaudio P, Picerno P, Aquino RP, Mencherini T, 2017. Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Shells Extract: Phenolic Composition, Antioxidant Effect and Cytotoxic Activity on Human Cancer Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2): 392.
- Falasca M, Casari I, 2012. Cancer chemoprevention by nuts: evidence and promises. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 4: 109-120.
- Falasca, M., Casari, I. & Maffucci, T, (2014). Cancer chemoprevention with nuts. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(9): dju238.
- Fang L, Ren D, Wang Z, Liu C, Wang J, Min W, 2019. Protective role of hazelnut peptides on oxidative stress injury in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Food Biochemistry*, 43(3): e12722.
- Fischer S, Glei M, 2013. Health-Potential of Nuts. *Ernaehrungs Umschau international*, 60, 206-215.
- Folkman J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease, *Nature medicine*, 1(1): 27-31.
- Green DR, Reed JC, 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281: 1309-1312.
- Güner A, Karabay Yavaşoğlu NÜ, 2018. Evaluation of antioxidant, antimicrobial and antimutagenic activity with irritation effects of *Ceramium rubrum* (Red Algae) extract. *International Journal of Secondary Metabolite*, 5(4): 279-287.
- Güner A, Polatlı E, Akkan T, Bektaş H, Albay C, 2019a. Anticancer and antiangiogenesis activities of novel synthesized 2-substituted benzimidazoles molecules. *Turkish Journal of Chemistry*, 43(5): 1270–1289.
- Güner A, Nalbantsoy A, Sukatar A., Karabay Yavaşoğlu NU, (2019b). Apoptosis-inducing activities of *Halopteris scoparia* L. Sauvageau (Brown algae) on cancer cells and its biosafety and antioxidant properties. *Cytotechnology*, 71(3): 687-704.
- Güner A, Kızıldaş S, Nalbantsoy A, Karabay Yavaşoğlu NU, 2020. Apoptosis-inducing activity of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed oil in lung, colorectal and cervix cancer cells. *Biologia* 75: 1465-1471.
- Güner A, 2020. Toxic and irritant effects induced by zearalenone: prevention by taurine. *Toxin Reviews*, 1-10. Doi: 10.1080/15569543.2020.1777432
- Güner A, İlhan S, 2020. Cytotoxic, genotoxic, oxidative, and irritant effects of zinc pyrithione *in vitro*. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 102(10): 607-623
- Köksal AI, 2002. *Türk Fındık Çeşitleri*. A.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Ankara. ISBN 975-92886-0-5.
- Köksal AI, Artık N, Simsek A, Gunes N, 2006. Nutrient Composition of Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Varieties Cultivated in Turkey. *Food Chemistry*, 99(3): 509-515.
- Kim, Y.W. & Byzova, T.V. (2014). Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease, *Blood*, 123: 625-631.
- Koh YW, Lee SJ, Park SY, 2017. Prognostic significance of lactate dehydrogenase B according to histologic type of non-small-cell lung cancer and its association with serum lactate dehydrogenase. *Pathology-Research and Practice*, 213: 1134-1138.
- La Vecchia C, 2009. Association between Mediterranean dietary patterns and cancer risk. *Nutrition Reviews*, 67(1): 126-129.
- Lui RHJ, 2003. Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combination of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78: 517-520.
- Lui RHJ, 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 134: 3479-3485.
- Liou GY, Storz P, 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*, 44: 479-496.

- Madesis P, Ganopoulos I, Bosmali I, Tsaftaris A, Barcode H, 2013. Resolution Melting analysis for forensic uses in nuts: A case study on allergenic hazelnuts (*Corylus avellana*). Food Research International, 50, 351-360.
- Muslim N, Nassar Z, Aisha A, Shafaei A, Idris N, Majid A, Ismail Z, 2012. Antiangiogenesis and antioxidant activity of ethanol extracts of *Pithecellobium jiringa*. BMC Complementary Medicine and Therapies, 12: 210.
- Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M, 2006. Angiogenesis in cancer. Vascular Health and Risk Management, 2: 213-219.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB, 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? Free radical biology & medicine, 49(11): 1603-1616.
- Riboli E, 2014. The role of metabolic carcinogenesis in cancer causation and prevention: evidence from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Cancer Treatment and Research, 159: 3-20.
- Schmitzer V, Slatnar A, Veberic R, Stampar F, Solar A, 2011. Roasting affects phenolic composition and antioxidative activity of hazelnuts (*Corylus avellana* L.). Journal of Food Science, 76: 14-19.
- Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic MM, Mazur M, 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-biological interactions, 160(1): 1-40.
- Visconti R, Grieco D, 2009. New insights on oxidative stress in cancer. Current opinion in drug discovery & development, 12(2): 240-245.

**To Cite:** Bezirganoglu I, 2021. Promoting effects of melatonin supplements on the embryogenic callus maintainance in *alfalfa* (*Medicago sativa* L.) Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 927-932.

**Promoting effects of melatonin supplements on the embryogenic callus maintainance in *alfalfa* (*Medicago sativa* L.)**

İsmail BEZİRGANOGLU<sup>1\*</sup>

**ABSTRACT:** The goal of this study was to determine melatonin impacts on the embryogenic callus formation and callus necrosis recovering of *alfalfa* (*Medicago sativa* L). Calluses, obtained from leaf explants, were cultivated on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.0125 mg mL<sup>-1</sup> melatonin + 1 mg mL<sup>-1</sup> 2,4-D or 0.0125 mg mL<sup>-1</sup> kinetin + 1 mg mL<sup>-1</sup> melatonin. Melatonin reduced the embryogenic callus formation in both concentrations. It was detected that the weight of fresh callus in genotypes was strongly related with hormones under *in vitro* conditions and the lowest fresh callus weight was detected in presence of 0.0125 mg mL<sup>-1</sup> kinetin and 1 mg mL<sup>-1</sup> melatonin. Based on the callus necrosis recovery, the highest callus necrosis weight (0.843 g) were recorded in embryogenic calluses cultivated in 0.0125 mg mL<sup>-1</sup> melatonin + 1 mg mL<sup>-1</sup> 2,4-D melatonin-supplemented medium, compared with the calluses activated with MS alone (0.587 g). In conclusion, it was detected in this study that *in vitro* melatonin could be used in callus necrosis recovered in tissue cultures of *alfalfa*.

**Keywords:** Melatonin, *alfalfa*, Embryogenic callus, *In vitro* medium

<sup>1</sup> İsmail BEZİRGANOGLU ([Orcid ID: 0000-0003-4079-5998](https://orcid.org/0000-0003-4079-5998)), Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye

\*Corresponding Author: İsmail BEZİRGANOGLU, e-mail: ismail.bezirganoglu@erzurum.edu.tr

## INTRODUCTION

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is an indolic complex that has various functions in animals and plants. Melatonin has many significant biochemical roles in many plant species, where it seems to support an increasing plant's response to stress conditions. Many studies have been conducted and indicated a relationship between melatonin amount in cells and external environments (Hernández-Ruiz and Arnao 2008; Kim et al., 2016). The melatonin involves different physiological functions including ion absorption, nutrient transfer, gas exchange, stomatal balance, free radical scavenger and antioxidant (Erdal 2016; Murch and Saxena 2002; Reiter et al., 2002). Additionally, It also may act as a growth regulator and stimulate the formation of callus *in vitro* (Erland and Saxena 2017). It has previously been reported that alters in the basal levels of melatonin impact cell division and the formation of the mitotic spindle (Murch and Saxena 2002). The endogenous levels of melatonin influences various cytological processes including mitosis and the formation of the mitotic spindle (Murch and Saxena 2002; Turk et al., 2014). Although various impacts of melatonin in plants have been studied to date, studies about its impact on *in vitro* embryogenic callus maintaincae and plant regeneration are very limited. Moreover, to be able to increase callus formation and proliferate callus cultures in tissue cultures, suitable methods and growth regulators necessary to be developed and work efficiently. Not only is it needed to effectively induce and regeneration cultures, but also to efficiently synthesize compounds (Ullah et al., 2019). Nowadays, *in vitro* cultures have gained much importance compared to exogenous applications because of their to be a suitable and quick method to evaluate the quality and quantity of the melatonin and the other metabolites by stimulating the factors inducing their synthesis and/or accumulation. *Alfalfa* is the main forage crop for dairy producers of many agricultural regions due to its high feeding value. *Alfalfa* is cultivated for its high yield and potential for environment adaptation, wide disease tolerance, and nutritional feeding quality as well as its role on N fixation, wildlife habitat, soil conservation, and bioremediation (Pelagio-Flores et al., 2012; Hardeland et al., 2013). The medium components of tissue culture systems also play an main role in *alfalfa in vitro* culture. Leaf explants are well-known to be the best resources for efficient regeneration from callus cultures of *alfalfa*. The aims of this study was to determine the callus necrosis recover for *alfalfa* by investigating different melatonin concentrations embriyogenic callus medium.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material and callus induction

In our report, a cultivar and an ecotype (*Sazova* and *Muş*) were used as the material for the response to callus initiation. The mature seeds were sterilized with 22% NaOCl for 20 min, washed two times with autoclaved water. Coytledons or leaves were explanted to *in vitro* medium from two weeks old plants onto hormone-free MS medium (Murashige and Skoog 1962). For the melatonin treatment, cotyledons or leaves were explanted to *in vitro* medium containing MS basal medium (pH 5.7) and 0.8 % agar supplemented with 1 mg mL<sup>-1</sup> of 2,4-D in the presence of 0.0125 mg mL<sup>-1</sup> melatonin for a month. The callus were also obtained from leaf explants used for embryogenic callus initiation in the same melatonin concentration. The cotyledon and leaf explants were incubated in total darkness at 25 ± 1 °C temperature for a month. After a month, callus formation was assessed and used for embriyogenic callus studies.

### Embryogenic callus initiation and maintainance

Callus was obtained from embryogenic callus initiation, such as control and melatonin treatment in terms of two different embryogenic callus maintainance medium. In the control treatment, intact callus were placed to the embryogenic callus initiation medium containing MS basal medium (pH 5.7) and 0.8 % agar supplemented with 1 mg mL<sup>-1</sup> of 2,4-D and 0.0125 mg mL<sup>-1</sup> of kinetin without melatonin for 1 months in a growth cabinet at 28 °C, under a 16/8-h photoperiod condition. For the melatonin treatment, callus was transferred medium containing MS basal medium (pH 5.7) and 0.8 % agar supplemented with 1 mg mL<sup>-1</sup> of 2,4-D in the presence of 0.0125 mg mL<sup>-1</sup> melatonin for first medium. Callus was transferred medium containing MS basal medium (pH 5.7) and 0.8 % agar supplemented with 0.0125 mg mL<sup>-1</sup> of kinetin in the presence of 1 mg mL<sup>-1</sup> melatonin for second medium. The callus were sub-cultured for each 3 weeks in the same medium. Total duration was 3 months. The embryogenic callus weight was evaluated at the end of 3 months.

### Statistical Analysis

Each analysis was repeated three replicate. Analysis of variance was conducted using one-way ANOVA test using SPSS 13 software and means were evaluated by Duncan test at the 0.05 confidence level.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Embryogenic callus development capacity

The fresh callus weight of *Sazova* and *Muş* genotypes was shown to reduce remarkably in response to melatonin treatment. Two different levels of melatonin were detected to cause great decreases in melatonin medium and the highest fresh callus weight was observed in all genotypes exposed to control treatments (Table 1). It was observed that the weight of fresh callus in genotypes was highly related with plant growth regulation under *in vitro* conditions and the lowest fresh callus weight was detected in presence of 0.0125 mg mL<sup>-1</sup> kinetin and 1 mg mL<sup>-1</sup> melatonin (Table 1). Embryogenic callus development was influenced not only by genotype and plant growth regulation but also by genotype × plant growth regulation interaction (Table 1). Among the two genotypes tested, '*Muş*' (1.414 g) indicated the higher mean callus weight after 1 months incubation of the callus on the control media, followed by containing melatonin media but at same values both media whereas '*Sazova*' (1.375 g) indicated the highest mean callus weight than *Muş* genotype after 1 months of incubation of the callus on control media, followed by '*Sazova*' (0.378 g), after 2 months of incubation of the callus on 0.0125 mg mL<sup>-1</sup> kinetin + media. Overall, the main impact of melatonin on embryogenic callus formation was not significant; however, embryogenic callus formation was significantly affected by melatonin concentration ( $P < 0.05$ ). Besides, there was no significant interaction between melatonin and dosages (Table 1).

### Effects of melatonin supplements on callus necrosis

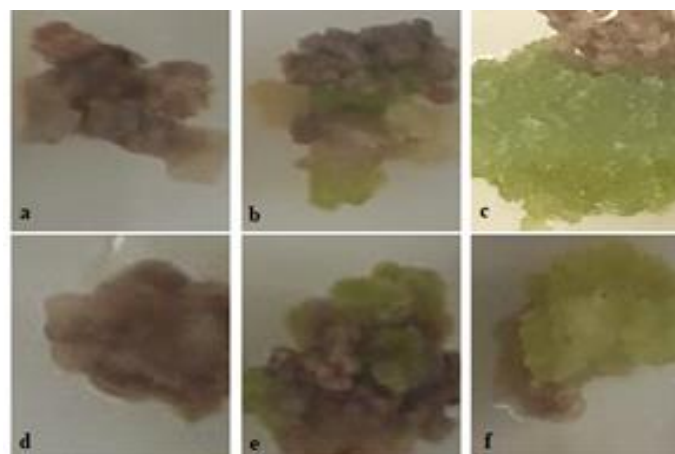
In terms of callus necrosis, two concentrations of melatonin were tested to provide the suitable concentration and times for healthy callus development. It was found that a combination of melatonin-2,4-D had the tendency to decrease for callus necrosis of *Sazova* genotypes (Table 1). The calli produced at a combination of melatonin-2,4-D were compact, healthy, and fluffy whereas control callus was detected by black color and a watery appearance (Figure 1). The callus necrosis number of embryogenic callus was affected by the hormone concentration, type and their interaction. The callus necrosis of embryogenic callus ranged from 0.843g to 0.032g based on melatonin concentration and period (Table 1; Figure 2).



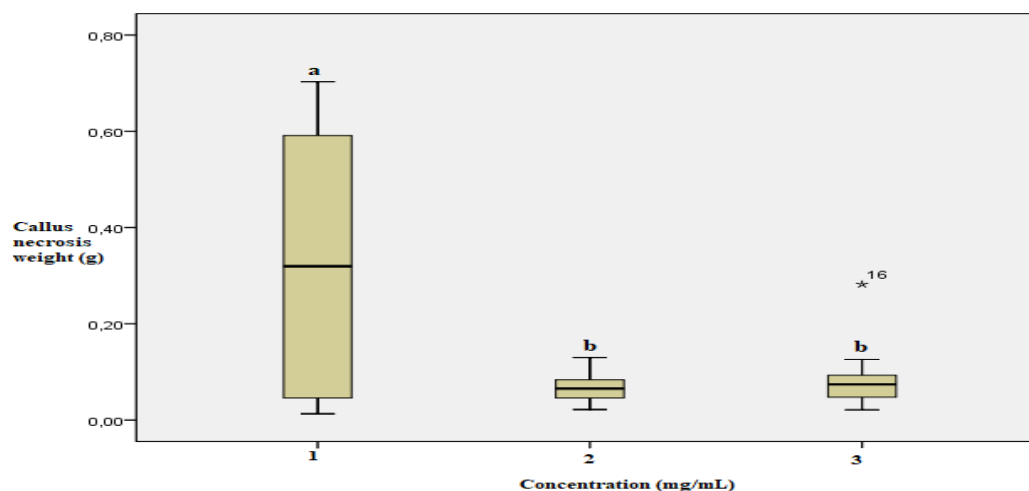
**Table 1.** Changes in embryogenic callus maintainance in *alfalfa* genotypes combination auxin-melatonin

| Genotypes<br>Months        | Embryogenic callus weight (g) | Callus necrosis weight (g) | Fresh callus weight(g)   |
|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| <b>1.month of Sazova</b>   |                               |                            |                          |
| Control                    | 1.375±0.059 <sup>a</sup>      | 0.587±0.019 <sup>a</sup>   | 0.787±0.036 <sup>a</sup> |
| Melatonin/2.4D             | 0.291±0.059 <sup>b</sup>      | 0.843±0.019 <sup>b</sup>   | 0.231±0.036 <sup>b</sup> |
| Kinetin /melatonin         | 0.202±0.059 <sup>b</sup>      | 0.091±0.019 <sup>b</sup>   | 0.110±0.036 <sup>b</sup> |
| <b>2. months of Sazova</b> |                               |                            |                          |
| Control                    | 0.320±0.075 <sup>a</sup>      | 0.063±0.042 <sup>a</sup>   | 0.239±0.031 <sup>a</sup> |
| Melatonin/2.4D             | 0.221±0.075 <sup>a</sup>      | 0.055±0.042 <sup>a</sup>   | 0.199±0.031 <sup>a</sup> |
| Kinetin /melatonin         | 0.378±0.075 <sup>a</sup>      | 0.152±0.042 <sup>a</sup>   | 0.259±0.031 <sup>a</sup> |
| <b>1.month of Muş</b>      |                               |                            |                          |
| Control                    | 1.414±0.079 <sup>a</sup>      | 0.607±0.036 <sup>a</sup>   | 0.807±0.052 <sup>a</sup> |
| Melatonin/2.4D             | 0.293±0.079 <sup>b</sup>      | 0.077±0.036 <sup>b</sup>   | 0.226±0.052 <sup>b</sup> |
| Kinetin /melatonin         | 0.293±0.079 <sup>b</sup>      | 0.063±0.036 <sup>b</sup>   | 0.230±0.052 <sup>b</sup> |
| <b>2.months of Muş</b>     |                               |                            |                          |
| Control                    | 0.258±0.036 <sup>a</sup>      | 0.041±0.012 <sup>a</sup>   | 0.807±0.024 <sup>a</sup> |
| Melatonin/2.4D             | 0.131±0.036 <sup>b</sup>      | 0.055±0.012 <sup>a</sup>   | 0.076±0.024 <sup>b</sup> |
| Kinetin /melatonin         | 0.085±0.036 <sup>b</sup>      | 0.032±0.012 <sup>a</sup>   | 0.052±0.024 <sup>b</sup> |

a,bMeans in the same column with various superscript letters differ significantly ( $P \leq 0.05$ )



**Figure 1:** a: 2. Months of Muş control, b: Muş, 0,0125 mg mL<sup>-1</sup> melatonin + 1 mg mL<sup>-1</sup> 2,4-D c: Muş, 0,0125 mg mL<sup>-1</sup> kinetin+ 1 mg mL<sup>-1</sup> melatonin d: 2. months of Sazova control e: Sazova, 0,0125 mg mL<sup>-1</sup> melatonin + 1 mg mL<sup>-1</sup> 2,4-D f: Sazova, 0,0125 mg mL<sup>-1</sup> kinetin+ 1 mg mL<sup>-1</sup> melatonin



**Figure 2:** 1. control, 2. 0,0125 mg mL<sup>-1</sup> melatonin + 1 mg mL<sup>-1</sup> 2,4-D 3. 0,0125 mg mL<sup>-1</sup> kinetin+ 1 mg mL<sup>-1</sup> melatonin.

a,bMeans in the same column with different superscript letters differ significantly ( $P \leq 0.05$ )

Despite the importance of *alfalfa* as a forage plant, the research on this plant is difficult due to allogamy, perennial and cross-fertilization as well as polyploidy (Şakiroğlu et al., 2010). Therefore the application of *in vitro* technique can be useful for genetic improving of *alfalfa*. The culture medium optimization can be affected by many traits, such as explant sources, genotype, growth conditions and medium composition (Yazıcılar et al., 2021). The combination of cytokinins and auxins promoted callus induction in a number plant species (Chaudhry et al., 2014). Melatonin has been demonstrated as playing a main functions in callus induction and somatic embryogenesis. The impacts of melatonin on *in vitro* culture have been studied by several researchers (Chaudhry et al., 2014), who proposed that melatonin activity as hormone regulators of callus formation. Ramakrishna et al., (2011, 2012) showed that melatonin has an promoted impact during the late stages of embryogenic callus growth in terms of the number of somatic embryos in *Coffea canephora*. It was found that melatonin treatment promoted responded callus necrosis rate in short-term period and embryogenic callus efficiency during long-term period in our study (Table 1). Our results are in consistent with those published by Duran et al., (2019) in the study on *Ocimum basilicum* the addition of melatonin at 100.0 µM and 200.0 µM dosages in the tissue culture medium. Their results demonstrate that melatonin reduced the frequency of callus formation compared with the control medium without melatonin. However, at 100.0 µM of melatonin in the medium, the differentiation frequency of adventitious buds from callus appeared to increase. This can be explained that callus formation is strongly related to hormone combination and concentration. According to our results, increases in necrosis recovering in melatonin-treated callus may be related to synergistic role of melatonin as direct or indirect due to was found to inhibit or promote callus necrosis and embryogenic callus formation dependent genotypes (Figure 2). Similar observations were also obtained in *Hypericum perforatum* L. (Murch et al., 2001), *Punica granatum* L. (Sarrou et al., 2014), *A. thaliana* (Koyama et al., 2013), and *Withania somnifera* (L.) Dunal (Adil et al., 2015). For example: 1 µM melatonin application in cherry considerably inhibit the promotion effects of *in vitro* culture, whereas 8.6 µM melatonin still found a enhancing effect in *P. Granatum*.

## CONCLUSION

Herein, we showed that melatonin can be used as a good auxin-cytokinin for the callus and embryogenic tissue culture. Moreover, It was detected in this study that *in vitro* melatonin could be used in callus necrosis recovered in tissue cultures of *alfalfa*. Besides it is still necessary for suitable hormone concentration requiring more detailed studies.

## Conflict of Interest

I declare that there is no conflict of interest during the planning, execution and writing of the article.

## Author's Contributions

I hereby declare that the planning, execution and writing of the article was done by me as the sole author of the article.

## REFERENCES

- Adil M, Abbasi BH, Khan T, 2015. Interactive effects of melatonin and light on growth parameters and biochemical markers in adventitious roots of *Withania somnifera* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 123: 405–412.
- Chaudhary D P, Jat S L, Kumar A, Kumar B, 2014. *Fodder quality of maize its preservation*. Springer India, 153-160.

- Erdal S, Turk H, 2016. Cysteine-induced upregulation of nitrogen metabolism-related genes and enzyme activities enhance tolerance of maize seedlings to cadmium stress. *Environ Exper Bot*, 132:92–99.
- Erland LAE, Saxena PK, Murch SJ, 2017. Melatonin in plant signalling and behaviour. *Funct Plant Biol*, <https://doi.org/10.1071/FP16384>.
- Hardeland R, 2013. Melatonin and the theories of aging a critical appraisal of melatonin's role in antiaging mechanisms. *J Pineal Res*, 55:325–356.
- Hernández-Ruiz J, Arnao MB, 2008. Melatonin stimulates the expansion of etiolated lupin cotyledons. *Plant Growth Regul*, 55:29–34.
- Kim M, Seo H, Park C, Park WJ, 2016. Examination of the auxin hypothesis of phytomelatonin action in classical auxin assay systems in maize. *J Plant Physiol*, 190:67–71.
- Koyama FC, Carvalho TLG, Alves E, da Silva HB, de Azevedo MF, Hemerly AS, Garcia CRS, 2013. The structurally related auxin and melatonin tryptophan-derivatives and their roles in *Arabidopsis thaliana* and in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Eukaryot Microbiol*, 60:646–651.
- Murashige T, and F A Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15: 473-97.
- Murch SJ, Campbell SSB, Saxena PK, 2001. The role of serotonin and melatonin in plant morphogenesis regulation of auxin-induced root organogenesis in *in vitro*-cultured explants of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 37:786–793.
- Murch SJ, Saxena PK, 2002. Mammalian neurohormones potential significance in reproductive physiology of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.)? *Naturwissenschaften*, 89:555–560.
- Pelagio-Flores R, Muñoz-Parra E, Ortiz-Castro R, López-Bucio J, 2012. Melatonin regulates *Arabidopsis* root system architecture likely acting independently of auxin signaling. *J Pineal Res*, 53:279–288.
- Ramakrishna A, Giridhar P, Jobin M, Paulose CS, Ravishankar GA, 2011. Indoleamines and calcium enhance somatic embryogenesis in *Coffea canephora* Pex Fr. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 108:267– 278.
- Ramakrishna A, Giridhar P, Sankar KU, Ravishankar GA, 2012. Endogenous profiles of indoleamines serotonin and melatonin in different tissues of *Coffea canephora* Pex Fr. As analyzed by HPLC and LC-MS-ESI. *Acta Physiol Plant*, 34:393–396.
- Reiter RJ, Tan DX, 2002. Melatonin an antioxidant in edible plants. *Ann N Y Acad Sci*, 957:341–344.
- Sakiroglu M., JJ Doyle, EC Brummer, 2010. Inferring population structure and genetic diversity of broad range of wild diploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) accessions using SSR markers. *Theor Appl Genet*, 121:403–415.
- Sarrou E, Therios I, Dimassi-Theriou K, 2014. Melatonin and other factors that promote rooting and sprouting of shoot cuttings in *Punica granatum* cv. Wonderful. *Turk J Botany*, 38:293–301.
- Turk H, Erdal S, Genisel M, Atici O, Demir Y, Yanmis D, 2014. The regulatory effect of melatonin on physiological, biochemical and molecular parameters in cold-stressed wheat seedlings. *Plant Growth Regul*, 74:139–152.
- Ullah M.A, Tungmunnithum D, Garros L, Drouet S, Hano C, Abbasi BH, 2019. Effect of Ultraviolet-C Radiation and Melatonin Stress on Biosynthesis of Antioxidant and Antidiabetic Metabolites Produced in *In Vitro* Callus Cultures of *Lepidium sativum* L. *Int. J Mol Sci*, 20:1787.
- Yazıcılar Y, Böke F, Alaylı A, Nadaroğlu H, Gedikli S, Bezirganoğlu I, 2021. *In vitro* effects of CaO nanoparticles on Triticale callus exposed to short and long-term salt stress. *Plant Cell Report*, 40:29-42.

**To Cite:** Alaylar B, Karadayı M, 2021. Investigation of ACC-Deaminase and Indole Acetic Acid Producing Bacteria from Rhizospheric Soils in Ağrı Province. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 933-942.

## Investigation of ACC-Deaminase and Indole Acetic Acid Producing Bacteria from Rhizospheric Soils in Ağrı Province

Burak ALAYLAR<sup>1\*</sup>, Mehmet KARADAYI<sup>2</sup>

**ABSTRACT:** Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) have critical role in promoting plant growth and health with various mechanisms. Production of indole acetic acid (IAA) and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase activity are well-known plant growth promoting (PGP) properties. In the current study; A total of 48 morphologically distinct bacterial colonies were chosen during the isolation of bacteria from various rhizospheric wheat, maize and sainfoin soil samples from agricultural areas in Ağrı-Turkey. The bacteria were isolated from soil samples utilizing by culture-dependent techniques. Then, the strains were visualised for PGP activities such as production acetic acid IAA and ACC deaminase activity. The 16S rRNA sequence similarity of potential PGPR rhizospheric strains demonstrated that strains belong to species *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Pseudarthrobacter*, *Arthrobacter* and *Enterobacter*. Totally, 11 of 48 isolates exhibited highly IAA producing and ACC deaminase activity. These results show that IAA producing and ACC deaminase activity of local potential PGPR strains isolated from soil rhizospheric which can appropriate for sustainable agricultural applications in Ağrı province.

**Keywords:** ACC deaminase activity, IAA production, PGPR, 16S rRNA

<sup>1</sup> Burak ALAYLAR ([Orcid ID: 0000-0001-6737-3440](https://orcid.org/0000-0001-6737-3440)), Agri Ibrahim Cecen University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Molecular Biology and Genetics, Agri, Turkey

<sup>2</sup> Mehmet KARADAYI ([Orcid ID: 0000-0002-2473-0409](https://orcid.org/0000-0002-2473-0409)), Atatürk University, Faculty of Science, Department of Biology, Erzurum, Turkey

\*Corresponding Author: Burak ALAYLAR, e-mail: balaylar@agri.edu.tr

## INTRODUCTION

Plant–microbe interactions have beneficial processes plenty of key roles in soil health, crop growth and productivity. Especially, soil microorganisms demonstrated positive effects on numerous agricultural applications. Among these soil microorganisms, plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) was initially described as; soil bacteria that located into roots of plants and they have fruitful features when inoculation onto seed and improve to plant growth by Kloepper and Schroth (1978). Therefore, researchers have been attracted attention to microorganisms based fertilizers instead of chemical fertilizers because of their high cost and detrimental impacts on sustainable agricultural applications in past decades (Adesemoye et al., 2009; Beneduzi et al., 2012; Alaylar et al., 2019; Ferreira et al., 2019; Alaylar et al., 2020a). Furthermore; they have been identified and reported PGPR bacteria including; *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* and *Serratia* (Egamberdieava, 2015; Afzal et al., 2017; Ferreira et al., 2019). Besides, various beneficial mechanisms have shown of numerous type of favorable abilities for plant growth with various mechanisms. For example; atmospheric nitrogen (N<sub>2</sub>) fixation, solubilization of phosphorus, improved to solubility of nutrients like synthesizing of siderophores, production of plant growth regulators such as cytokinins, ethylene, gibberellic acid, and indole acetic acid (IAA), and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase activity (Ahmad et al., 2008; Alaylar et al., 2020b).

According to the literature, one of the most frequently used mechanisms to explain the distinct effects of PGPR on plants is the production of phytohormones (Duca et al., 2014). Among these phytohormones; auxin is one of the important molecules that play a vital role in plants by regulating many processes in plants directly or indirectly (Bal et al., 2012; Junior et al., 2015). The most well-known and researched auxins in plants is indole-3-acetic acid (IAA) because IAA is a crucial physiologically active phytohormone for plants and secondary metabolite of L-tryptophan which have vital role in numerous biological processes as a regulator in plants like; cell expansion, division, differentiation (Lebrazi et al., 2020). Furthermore, it has been reported that plants have more uptake to soil nutrients as bacterial IAA improves both the root surface region and length. Also, most of rhizobacteria can produce IAA. Thus, PGPR strains can change root structure and promote plant development due to their ability to synthesize and secrete plant hormones like IAA, gibberellins (GAs), cytokinins and certain volatiles, hence they are termed phytostimulators (Mohite, 2013; Montana et al., 2014; Vaikuntabu et al., 2014). Especially, potential PGPR strains isolated from the rhizosphere and rhizoplane from different type of agricultural products have performed more potential of IAA production than from the non-rhizospheric soil (Bal et al., 2012).

As it is known, plants are faced to various biotic and abiotic stresses in nature such as cold, drought, flooding, heat, salinity, exposure to heavy metals and lack of nutrients, attack by phytopathogens and pests. Any of these stress conditions are demonstrated to enhancement of ethylene synthesis in plants. Because, ethylene is a precursor of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) so that the ACC deaminase enzyme hydrolyzes as a biosynthetic precursor of the hormone ethylene in plant tissues to ammonia and  $\alpha$ -ketobutyrate instead of ethylene. The main mechanisms used by PGPR strains to decrease the stress contains reducing the level of ethylene through hydrolyzing ACC by the enzyme ACC deaminase. Therefore, most of PGPR strains have ACC deaminase activity utilized for to decline hazardous effects of ethylene under stressed conditions (Abbas-Zadeh et al., 2010; Qin et al., 2014; Kadioglu et al., 2016; Misra and Chauhan 2020).

PGPR strains and their relations with plants are used commercially nowadays and it has huge potential and promise for sustainable agriculture because of their beneficial effects on plenty of agricultural products. It has been studied and examined various type of agricultural crops containing barley, canola, maize, lentils, pepper, cucumber, rice, soy, cowpea, wheat *etc.* (Adesemoye et al., 2009; Hayat et al., 2010; Sharan and Nehra, 2011).

In this study, we are focused on IAA production and ACC deaminase activity of bacterial strains which were isolated from rhizospheric soil. The main goal of the present study was identified local potential PGPR strains isolated from soil rhizosphere and quantified them *in vitro* production of IAA and ACC deaminase activity and showed to these potential PGPR strains can be used in as local specific strains in agricultural areas in Ağrı province.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

All of the chemicals utilized in the current study were purchased from Merck (Hohenbrunn, Germany), Fluka (Steinheim, Germany), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Promega (Madison, USA), Oxoid (Hampshire, England), LAB M (Lancashire, England) and Lonza (Rockland, USA).

### Collection of Soil Samples and Isolation of Rhizospheric Bacteria

Rhizospheric bacteria were isolated from soils samples in agricultural lands from Ağrı-Turkey as following procedure in the month of August 2020. Sampling was taken from 3 different sites, at depths of 0-7 cm in the region of directly surrounding the roots of the wheat, maize and sainfoin plants rhizosphere in agricultural areas. Then, soil samples were transferred under aseptic conditions to Central Research and Application Laboratory, Agri Ibrahim Cecen University. Then serially diluted soil samples ( $10^{-1}$ - $10^{-7}$ ) were spread onto Lauria Bertani (LB) agar incubated for 2 days at 28 °C. With the end of incubation period, distinct bacterial colonies were streaked on LB agar plates to obtain pure and single colonies for further studies.

### Determination of the Indol Acedic Acid Production

IAA production is one of the major pivotal natural auxins that promote plant growth. The assay was prepared according to Vaikuntapu et al., (2014) procedure. This procedure was performed as following; bacterial isolates were grown in LB broth medium containing 0.1% tryptophan and incubated for 72 hours at 28 °C. After the incubation, the isolates were centrifuged at 6000 g for 30 minutes. Then, 2 ml of the supernatant was taken and mixed with 2 drops of ortho-phosphoric acid and 4 ml of Salkowski solvent (50 ml of 35% of perchloric acid + 1 ml of 0.5 M FeCl<sub>3</sub> solution). Finally, potential IAA production bacterial isolates calorimetric measurement was carried on at 530 nm.

### Determination of the ACC Deaminase Enzyme Production

ACC deaminase enzyme activity was analysed according to the method of Penrose and Glick (2003). In this present protocol, bacterial isolates were inoculated in LB broth medium and incubated at 28 °C for 24 hours. After an overnight incubation period, 2 ml of each bacterial culture was taken and centrifuged at 8000 g for 5 minutes. Then, pellets of each sample was washed two times with Dworkin and Foster minimal salts medium. Furthermore, 2 ml of Foster minimal salts medium supplemented with ACC as only nitrogen source (DF-ACC) were transferred to bacterial cultures. The cultures were incubated at 28 °C for 24 h. Moreover, non-inoculated DF-ACC medium was used as a control group of the experiment and blank sample for the spectrophotometric measurement. Then, cultures were centrifuged at 8000 g for 5 minutes. 1 ml of each sample were taken from the cultures and centrifuged at 8000 g for 5 minutes. 100 µl of the supernatant was diluted with 1 ml of DF medium. 60 µl of each

working solution was used in the standard ninhydrin experiment (60 µl working solution +120 µl ninhydrin solution). The solution was mixed and situated in a boiling water bath for 30 minutes at 65°C. After boiling, the solution turned into a purple color. The samples were cooled at the room temperature for 20 minutes. When compared to the control, the opaque visibility in color can be evaluated as a positive result. Finally, the calorimetric measurement was performed at 570 nm.

### Molecular Identification of Potential IAA and ACC Deaminase Enzyme Production Capability of PGPR strains

Genomic DNA isolation of the selected potential IAA and ACC deaminase enzyme producer PGPR isolates was used according to method defined by Wilson in 1997. The isolates were identified through 16S rRNA gene sequencing. The partial 16S rRNA gene regions were amplified utilizing polymerase chain reaction (PCR) for molecular identification of the bacterial isolates. The primers were 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3'). The reaction mixtures (30 µl) reaction included 50 ng of extracted as a template, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM each dNTP, 1.2 µl of dimethyl sulfoxide (DMSO), 25 pmoles of forward primer and reverse primer, and 5 U Taq DNA polymerase along with reaction buffer. The amplification procedure was contained following reactions: The initial step at 95 °C for 2 min, and 36 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 53 °C, 2 min at 72 °C, followed by a final 5 min extension step at 72 °C, then brought down to 4 °C. Amplified 16S rRNA gene PCR products were analysed by QIAxcel® advanced analysis system and sequenced by Macrogen Inc. BLAST Netherlands. The nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search program of NCBI was exploited to determine the nucleotide sequence homology and relation to other bacterial sequences existing in the GenBank® (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>). Evolutionary analyses were conducted in MEGA X (Kumar et al., 2018)

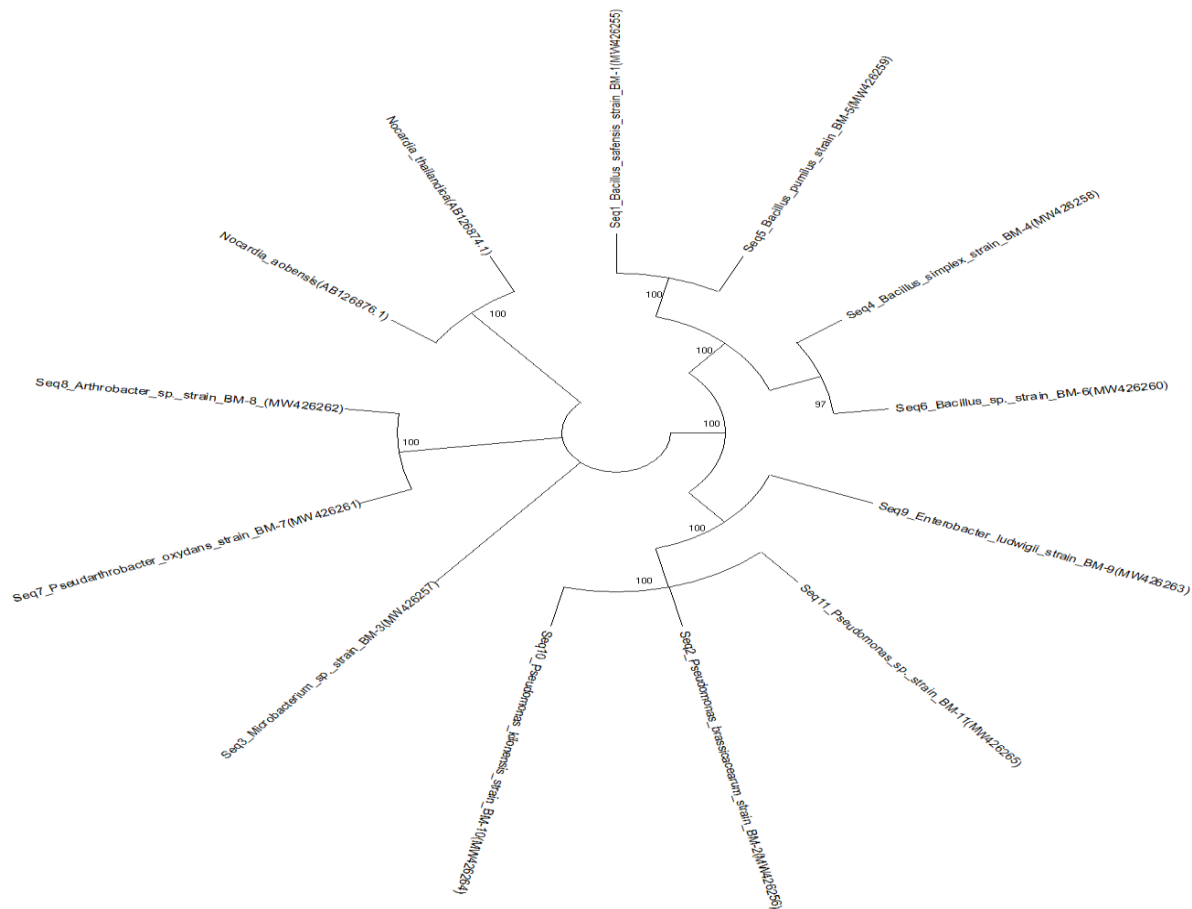
## RESULTS AND DISCUSSION

A total of 48 morphologically distinct bacterial isolates were isolated on August from agricultural areas from rhizospheric soil samples from 3 different localities in agricultural lands in Ağrı-Turkey. The rhizospheric bacteria isolated and identified utilizing by 16S rRNA gene analysis. Totally, 11 potential bacterial species were shown plant growth promoting activities not only IAA producing but also ACC deaminase activities from rhizospheric soil samples. The isolates were on 100% identical to the closest relatives assigned to GenBank. Determination of nucleotide sequence homology was established via nucleotide BLAST search program of NCBI. The 16S rRNA sequences were deposited to GenBank® with provided accession numbers from MW426255 to MW426265 respectively. Detailed information was given in Table 1.

On the basis of 16S rRNA sequences of the isolated strains and the closest relatives from GenBank the neighbour joining phylogenetic tree was constructed (Figure 1). As it's shown in Table 2; 11 isolated species belonging to 3 distinct phyla and 5 order: Proteobacteria (BM2, BM9, BM10, and BM11), Firmicutes (BM1, BM4, BM5, and BM6), Actinobacteria (BM3, BM7, and BM8).

Order I – Bacillales is one the most plenty of order and contains 4 species: *Bacillus safensis* strain BM-1, *Bacillus simplex* strain BM-4, *Bacillus pumilus* strain BM-5, and *Bacillus* sp. strain BM-6. Junior et al. were reported (2015) production of indole-3-acetic acid by *Bacillus* isolated from different soils. Cruz-Martín and coauthors were reported (2015) *B. pumilus* CCIBPC5 grow in culture media without nitrogen, and produced indole acetic acid. Furthermore, *B. pumilus* enhanced dramatically the height and stem thickness and improves dry and fresh weight of plants. On the other study, Misra and Chauhan (2020) were shown ACC deaminase-producing rhizosphere competent of *B. safensis* reduce salt stress and promote *Zea mays* L. growth by modulating ethylene metabolism. Moreover; there are numerous

studies were reported production of IAA and ACC-deaminase activity as PGP properties of as *Bacillus* sp. (Rodríguez–Romero et al., 2005; Shim et al., 2014; Gupta and Pandey, 2019).



**Figure 1.** Phylogenetic tree on the basis of 16S rRNA were created using the Neighbor-Joining method (Felsenstein, 1985; Saitou and Nei 1987; Tamura et al., 2004). Evolutionary analyses were carried on MEGA X (Kumar et al., 2018).

Order II–Pseudomonadales is second major order of the current study and it is including 3 various species; *Pseudomonas brassicacearum* strain BM-2, *Pseudomonas kilonensis* strain BM-10, and *Pseudomonas* sp. strain BM-11. According to the literature, it is also reported more studies about their PGP. Therefore, *Pseudomonas* sp. is known one of the common genus of PGPR strains which are isolated from rhizospheric soil samples. For instance; Qin et al. (2014) were found activity of ACC deaminase and IAA producing bacteria by 16S rRNA gene sequence *P. brassicacearum* subsp. *brassicacearum* from coastal halophytic medicinal plant. Moreover, *Pseudomonas* species are known not only IAA production and ACC- deaminase activity, but also other PGP properties such as; nitrogen fixation, phosphate solubilization and siderophore production and *Pseudomonas* species have been reported intensively utilized in agricultural applications according to the literature (Gu et al., 2020).

Order III– Actinomycetales contains 2 species: *Microbacterium* sp. strain BM-3 and *Arthrobacter* sp. strain BM-8. A study by Samayoa et al. (2020) were isolated and screened of PGP properties of numerous distinct type of bacterial species from soil rhizosphere and root endophyte of onion. *Microbacterium hydrocarbonoxydans* and *Microbacterium laevaniforman* have shown almost all PGPR



properties including IAA production and ACC deaminase activity and also *Microbacterium* sp. was shown IAA production according to their study.

Order IV– Micrococcales presented by single species *Pseudarthrobacter oxydans* strain BM-7. Mesa-Marín with coauthors (2019) were reported effect of PGPR on *Salicornia ramosissima* seed germination under salinity and *Pseudarthrobacter oxydans* SRT15 was showed PGP properties such as; nitrogen-fixation, phosphate solubilization and IAA production.

Order V–Enterobacterales also presented by one species *Enterobacter ludwigii* strain BM-9. Singh (2015) studied some of the PGP properties of *Enterobacter ludwigii* PGP 19 isolated from soil rhizosphere of *Pennisetum glaucum* (pearl millet). The strain *E. ludwigii* PGP 19 was able to active phosphate solubilization, IAA production, and ACC deaminase activity. According to a report by Aarab et al. (2015) *E. ludwigii* isolated rhizospheric soils of rice demonstrated IAA production.

**Table 1.** Taxonomic affiliation of the bacterial isolates and their GenBank® accession numbers

| Strain Code | Strain Name                       | Accession number | Percentage identity |
|-------------|-----------------------------------|------------------|---------------------|
| BM1         | <i>Bacillus safensis</i>          | MW426255         | 100                 |
| BM2         | <i>Pseudomonas brassicacearum</i> | MW426256         | 100                 |
| BM3         | <i>Microbacterium</i> sp.         | MW426257         | 100                 |
| BM4         | <i>Bacillus simplex</i>           | MW426258         | 100                 |
| BM5         | <i>Bacillus pumilus</i>           | MW426259         | 100                 |
| BM6         | <i>Bacillus</i> sp.               | MW426260         | 100                 |
| BM7         | <i>Pseudarthrobacter oxydans</i>  | MW426261         | 100                 |
| BM8         | <i>Arthrobacter</i> sp.           | MW426262         | 100                 |
| BM9         | <i>Enterobacter ludwigii</i>      | MW426263         | 100                 |
| BM10        | <i>Pseudomonas kilonensis</i>     | MW426264         | 100                 |
| BM11        | <i>Pseudomonas</i> sp.            | MW426265         | 100                 |

**Table 2.** Detailed information of IAA production and ACC deaminase activity of potential PGPR strains (+: slight positive, ++: moderately positive, +++: strong positive)

| Species Name                          | IAA        | ACC                  | Order            | Phylum         |
|---------------------------------------|------------|----------------------|------------------|----------------|
|                                       | Production | Deaminase Production |                  |                |
| <i>Bacillus safensis</i> BM-1         | +++        | +++                  | Bacillales       | Firmicutes     |
| <i>Pseudomonas brassicacearum</i> BM2 | +++        | +++                  | Pseudomonadales  | Proteobacteria |
| <i>Microbacterium</i> sp. BM-3        | +++        | +++                  | Actinomycetales  | Actinobacteria |
| <i>Bacillus simplex</i> BM-4          | +++        | +                    | Bacillales       | Firmicutes     |
| <i>Bacillus pumilus</i> BM-5          | +++        | +++                  | Bacillales       | Firmicutes     |
| <i>Bacillus</i> sp. BM-6              | +++        | +++                  | Bacillales       | Firmicutes     |
| <i>Pseudarthrobacter oxydans</i> BM-7 | +++        | +++                  | Micrococcales    | Actinobacteria |
| <i>Arthrobacter</i> sp. BM-8          | +++        | ++                   | Actinomycetales  | Actinobacteria |
| <i>Enterobacter ludwigii</i> BM-9     | +++        | +++                  | Enterobacterales | Proteobacteria |
| <i>Pseudomonas kilonensis</i> BM-10   | +++        | +                    | Pseudomonadales  | Proteobacteria |
| <i>Pseudomonas</i> sp. BM-11          | +++        | +                    | Pseudomonadales  | Proteobacteria |

It was also shown by previous studies; rhizospheric bacteria from soil samples have capability to fix atmospheric nitrogen, phosphate solubilization, synthesizing siderophores, ACC deaminase activity and type of phytohormones such as auxins for provide it to plants as a plant growth property (Alaylar et al., 2018; Ferchichi et al., 2019). IAA production is one of the most effective PGP mechanism (Pawlik et al., 2017). It is promoting to plant growth directly by enhancing length and root surfaces by stimulating

plant cell elongation for providing to soil nutrient from plants (Phetcharat and Duangpaeng 2012; Vinayarani and Prakash 2018). There are many reports have been shown IAA production by rhizospheric and endophytic bacteria (Ray et al., 2016; Chowdhury et al., 2017; Vinayarani and Prakash 2018; Wozniak et al., 2019). Various rhizospheric bacteria have potential to produce the auxin phytohormone IAA, these kind of rhizospheric microorganisms produce auxins in the presence of a favourable precursor like L-tryptophane (Phetcharat and Duangpaeng 2012). On the other hand, most of the plant growth promoting rhizospheric strains are well-known with ACC deaminase activity which have role in decrease to level of ethylene stress and help their host plants deal with numerous stress factors like abiotic and biotic factors.

In the line with this purpose, we observed IAA production and ACC deaminase activity as PGP by rhizospheric soil samples in agricultural areas from Ağrı-Turkey. When the compare with our results with 25 of 48 strains were demonstrated IAA production. 11 of 48 the best IAA production potential stains were chosen. On the other hand, 11 of 48 the rhizospheric bacteria were shown ACC deaminase activity.

In summary, as it mentioned it; PGPR have been revealed to beneficial effects of plant development and health. For sustainable agricultural applications, microorganism based fertilizers can be used instead of chemical fertilizers because of their eco-friendly low cost usage. Moreover, potential local PGPR strains can be more effective usage on agricultural products. Therefore, the results showed that, plant growth promoting property IAA production and ACC deaminase activity from rhizospheric bacteria with the selected from soil rhizosphere. According to our knowledge, the present study reveals for the first time to the isolation and identification of rhizospheric bacteria from soil samples in Ağrı province which have IAA production and ACC deaminase activity. It can be use in agricultural application for further.

## CONCLUSION

It can be concluded that soil rhizosphere as the huge potential source for obtaining new bacterial strains and their metabolites. In this regards; It can be understood from the present study that rhizospheric bacteria isolated from agricultural areas have crucial PGP such as IAA production and ACC deaminase activity. It is important to note that unknown rhizospheric bacteria community in soil rhizosphere in agricultural areas can be vital role in agricultural products. Rhizospheric bacteria deal with agricultural products such as wheat, barley, canola, oat, cucumber *etc.* have unique strategies that enhance growth and yield productivity of agricultural products. Taking into consideration of its economic value and vital roles of PGPR strains in plant health, enhance productivity, growth, such knowledge gap needs to be filled for active utilization of PGPR strains and detection of novel PGPR strains from local strains in agricultural areas.

## Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

## Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

## REFERENCES

Abbas-Zadeh P, Saleh-Rastin N, Asadi-Rahmani H, Khavazi K, Soltani A, Shoary-Nejati R, Miransari M 2010. Plant Growth-Promoting Activities of *Fluorescent pseudomonads*, Isolated from the Iranian soils. *Acta physiologiae plantarum*, 32, 281–288.

- Aarab S, Ollero FJ, Megias M, Laglaoui A, Bakkali M, Arakrak A, 2015. Isolation and Screening of Bacteria from Rhizospheric Soils of Rice Fields in Northwestern Morocco for Different Plant Growth Promotion (PGP) Activities: An in Vitro Study. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4, 260–269.
- Adesemoye AO, Torbert HA, Kloepper JW, 2009. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Allow Reduced Application Rates of Chemical Fertilizers. *Plant Microbe Interactions*, 58, 921–929.
- Afzal I, Iqar I, Shinwari ZK, Yasmin A, 2017. Plant Growth-Promoting Potential of Endophytic Bacteria Isolated from Roots of Wild *Dodonaea viscosa* L. *Plant Growth Regulation*, 8, 399–408.
- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS, 2008. Screening of Free-Living Rhizospheric Bacteria for Their Multiple Plant Growth Promoting Activities. *Microbiological Research*, 163, 173–181.
- Alaylar B, Güllüce M, Karadayı G, Karadayı M (2018) Isolation of PGPR Strains with Phosphate Solubilizing Activity from Erzurum and Their Molecular Evaluation by Using Newly Designed Specific Primer for *pqqB* gene. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 9, 103–106.
- Alaylar B, Gulluce M, Karadayi M, Isaoglu M, 2019. Rapid Detection of Phosphate Solubilizing Bacteria from Agricultural Areas in Erzurum. *Current Microbiology*, 76, 804–809.
- Alaylar B, Gulluce M, Karadayi M, 2020a. Detection of the *NifH* Gene in Nitrogen Fixing Bacteria from Agricultural Areas in Erzurum. *Fresenius Environmental Bulletin*, 29, 809–814.
- Alaylar B, Egamberdieva D, Gulluce M, Karadayi M, Arora NK, 2020b. Integration of Molecular Tools in Microbial Phosphate Solubilization Research in Agriculture Perspective. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36, 1–12.
- Bal HB, Das S, Dangar TK, Adhya TK, 2012. ACC Deaminase and IAA Producing Growth Promoting Bacteria from the Rhizosphere Soil of Tropical Rice Plant. *Journal of Basic Microbiology*, 53, 972–984.
- Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LMP, 2012. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Their Potential as Antagonists and Biocontrol Agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 1044–1051.
- Chowdhury EK, Jeon J, Rim SK, Park YH, Lee SK, Bae H, 2017. Composition, Diversity and Bioactivity of Culturable Bacterial Endophytes in Mountain-Cultivated Ginseng in Korea. *Scientific Reports*. 7, 1–10.
- Cruz-Martin M, Mena E, Sanchez-Garcia C, Roque B, Acosta-Suarez M, Pichardo T, Leiva-Mora M, Alvarado-Capo Y, 2015. The Effects of Plant Growth Promoting *Bacillus pumilus* CCIBPC5 on ‘Grande Naine’ (Musa AAA) Plants in Acclimatization Stage. *Biotechnología Vegetal*, 15, 151–156.
- Duca D, Lorv J, Patten CL, Rose D, Glick BR, (2014). Indole-3-Acetic Acid in Plant–Microbe Interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106, 85–125.
- Egamberdieva D, 2015. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria Isolated from Calcisol in a Semi-Arid Region of Uzbekistan: Biochemical Characterization and Effectiveness. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168, 94–99.
- Felsenstein J, 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39, 783–791.
- Ferreira CMH, Soares HMVM, Soares EV, 2019. Promising Bacterial Genera for Agricultural Practices: An Insight on Plant Growth-Promoting Properties and Microbial Safety Aspects. *Science of the Total Environment*, 682, 779–799.
- Ferchichi N, Toukabri W, Boularess M, Smaoui A, Mhamdi R and Trabelsi D, 2019. Isolation, Identification and Plant Growth Promotion Ability of Endophytic Bacteria Associated with Lupine Root Nodule Grown in Tunisian Soil. *Archives of Microbiology*, 201, 1333–1349.
- Gu Y, Wang J, Zhenyuan X, Wei HL, 2020. Characterization of a Versatile Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas mediterranea* Strain S58. *Microorganism*, 8, 1–15.

- Gupta S, Pandey S, 2019. ACC Deaminase Producing Bacteria with Multifarious Plant Growth Promoting Traits Alleviates Salinity Stress in French Bean (*Phaseolus vulgaris*) Plants. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–17.
- Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R, Ahmed I, 2010. Soil Beneficial Bacteria and Their Role in Plant Growth Promotion: A Review. *Annals of Microbiology*, 60, 579–598.
- Junior AFC, De Oliveira AG, De Oliveira LA, Dos Santos GR, Chagas LFB, Da Silva ALL, Costa J, 2015. Production of Indole-3-Acetic Acid by *Bacillus* Isolated from Different Soils. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 21, 282–287.
- Kadioglu G, Koseoglu M, Ozdal M, Sezen A, Ozdal O, Algur OF, 2016. Isolation of Cold Tolerant and ACC Deaminase Producing Plant Growth Promoting Rhizobacteria from High Altitudes. *Romanian Biotechnological Letters*, 23, 13479–13486.
- Kloepper JW, Schroth MN, 1978. Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Radish. In: *Proceedings of The 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Angers, France, 2017, pp: 879–882.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K, 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549.
- Lebrazi S, Fadil M, Chraibi M, Fikri–Benbrahim K, 2020. Screening and Optimization of Indole-3-Acetic Acid Production by *Rhizobium* sp. Strain Using Response Surface Methodology. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18, 1–10.
- Mesa–Marin J, Perez–Romero J, Mateos–Naranjo E, Bernabeu–Meana M, Pajuelo E, Rodriquez–Llorente ID, Redondo–Gomez S, 2019. Effect of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on *Salicornia ramosissima* Seed Germination under Salinity, CO<sub>2</sub> and Temperature Stress. *Agronomy*, 9, 1–14.
- Misra S, Chauhan PS, 2020. ACC Deaminase Producing Rhizosphere Competent *Bacillus* spp. Mitigate Salt Stress and Promote *Zea mays* Growth by Modulating Ethylene Metabolism. *3 Biotech*, 10, 1–14.
- Mohite B, 2013. Isolation and Characterization of Indole Acetic Acid (IAA) Producing Bacteria from Rhizospheric Soil and Its Effect on Plant Growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13, 638–649.
- Montano FP, Alias – Villegas C, Bellogin RA, Cerro P, Espunsa MR, Jimenez-Guerrero I, Baena L, Ollero FJ, Cubo T, 2014. Plant Growth Promotion in Cereal and Leguminous Agricultural Important Plants: From Microorganism Capacities to Crop Production. *Microbiological Research*, 169, 325–336.
- Pawlik M, Cania B, Thijs S, Vangronsveld J, Piotrowska Seget Z, 2017. Hydrocarbon Degradation Potential and Plant Growth Promoting Activity of Culturable Endophytic Bacteria of *Lotus corniculatus* and *Oenothera biennis* from a Long-Term Polluted Site. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 19640–19652.
- Penrose DM, Glick BR, 2003. Methods for Isolating and Characterizing ACC Deaminase-Containing Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, 118, 10–15.
- Phetcharat P, Duangpaeng A, 2012. Screening of Endophytic Bacteria from Organic Rice Tissue for Indole Acetic Acid Production. *Procedia Engineering*, 32, 77–183.
- Ray S, Singh S, Sarma BK, and Singh HB, 2016. Endophytic *Alcaligenes* Isolated from Horticultural and Medicinal Crops Promotes Growth in Okra (*Abelmoschus esculentus*). *Journal of Plant Growth Regulation*, 35, 401–412.
- Rodríguez-Romero AS, Guerra MS, Jaizme-Vega MD, 2005. Effect of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Rhizobacteria On Banana Growth and Nutrition. *Agronomy for Sustainable Development*, 25, 395–399.
- Saitou N, Nei M, 1987. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425.
- Samayoa BE, Shen FT, Lai WA, Chen WC, 2020. Screening and Assessment of Potential Plant Growth-promoting Bacteria Associated with *Allium cepa* Linn. *Microbes and Environment*, 35, 1–10.

- Sharan BS, Nehra V, 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. Life Sciences and Medicine Research, 2011, 1-30.
- Shim J, Kim JW, Shea P, Oh BT, 2014. IAA production by *Bacillus* sp. JH 2-2 Promotes Indian Mustard Growth in the Presence of Hexavalent Chromium. Journal of Basic Microbiology, 55, 652–658.
- Sing BP, 2015. Isolation and Characterization of Multifarious Plant Growth Promoting Bacteria *Enterobacter ludwigii* PGP 19 Isolated from Pearl Millet. International Journal of Science and Research, 1, 262–265.
- Qin S, Zhang YJ, Yuan B, Xu PY, Xing K, Wang J, Jiang JH, 2014. Isolation of ACC Deaminase-Producing Habitat-Adapted Symbiotic Bacteria Associated with Halophyte *Limonium sinense* (Girard) Kuntze and Evaluating Their Plant Growth-Promoting Activity under Salt Stress. Plant Soil, 374, 753–766.
- Tamura K, Nei M, Kumar S, 2004. Prospects for Inferring Very Large Phylogenies by Using the Neighbor-Joining Method. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 101, 11030-11035.
- Vaikuntapu PR, Dutta S, Samudrala RB, Rao VRVN, Kalam S, Podile AR, 2014. Preferential Promotion of *Lycopersicon esculentum* (Tomato) Growth by Plant Growth Promoting Bacteria Associated with Tomato. Indian Journal of Microbiology, 54, 403–412.
- Vinayarani G, Prakash HS, 2018. Growth Promoting Rhizospheric and Endophytic Bacteria from *Curcuma Longa* L. as Biocontrol Agents Against Rhizome Rot and Leaf Blight Diseases. Plant Pathology Journal, 34, 218–235.
- Wilson K, 1997. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smit JA, Struhl K, (eds) Current Protocols in Molecular Biology. (Volume 1). Wiley Interscience, pp. 241-245, Brooklyn, New York-USA.
- Wozniak M, Gałazka A, Tyskiewicz R, Sciseł JJ, 2019. Endophytic Bacteria Potentially Promote Plant Growth by Synthesizing Different Metabolites and Their Phenotypic/Physiological Profiles in the Biolog GEN III MicroPlate™ Test. International Journal of Molecular Sciences, 20, 1–24.

**Atf İçin:** Elmas S, 2021. *Salvia officinalis* (Tıbbi Adaçayı) Bitkisinin Bazı Abiyotik Stres Faktörlerine Yanıtları. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 943-959.

**To Cite:** Elmas S, 2021. Responses of *Salvia officinalis* (Common Sage) to Some Abiotic Stress Factors. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 943-959.

## ***Salvia officinalis* (Tıbbi Adaçayı) Bitkisinin Bazı Abiyotik Stres Faktörlerine Yanıtları**

Sinem ELMAS<sup>1\*</sup>

**ÖZET:** *Salvia officinalis* (tıbbi adaçayı) türünün dünyada kullanım alanı ve pazar talebi giderek artmaktadır. Son yıllarda ülkemizin farklı illerinde yetiştiriciliği yapılmakta olan bu türün her yıl dünya çapında pek çok ülkeye ihraç edilmesiyle önemli miktarlarda döviz girdisi elde edilmektedir. İç ve dış pazarda önemli bir yere sahip olan *Salvia officinalis* yetiştiriciliğinde kalite ve verim söz konusu olduğunda çevresel faktörlerin bitki üzerine etkilerinin bilinmesi önemlidir. Bu derlemede *Salvia officinalis* yetiştiriciliği uygulamalarında bitkilerin bazı abiyotik stres faktörlerine verdikleri yanıtlar araştırılmıştır. Araştırmalarda farklı abiyotik streslerin *Salvia officinalis* türünde farklı tepkileri tetiklediği anlaşılmıştır. Bazı abiyotik stres faktörlerinin *Salvia officinalis* üzerinde avantaj olarak görülebilecek en önemli etkisi ise, fitofarmakon olarak kullanılabilen etkili bileşiklerin istenen konsantrasyonlarının söz konusu stres faktörlerinin, yetiştiricilikte kasıtlı olarak uygulanması ile elde edilebilir olmasıdır.

**Anahtar Kelimeler:** *Salvia officinalis*, Tıbbi adaçayı, Abiyotik stres, Kuraklık, Tuzluluk, Işık

### **Responses of *Salvia officinalis* (Common Sage) to Some Abiotic Stress Factors**

**ABSTRACT:** In the world the usage area and market demand of *Salvia officinalis* (common sage) species is gradually increasing. In recent years, this species, which has been cultivated in different provinces of our country, is exported to many countries around the world every year, and a significant amount of foreign currency input is obtained. It is important to know the effects of environmental factors on the plant when it comes to quality and yield in *Salvia officinalis* cultivation, which has an important place in domestic and foreign markets. In this review, the responses of plants to some abiotic stress factors in *Salvia officinalis* cultivation practices were investigated. Research has shown that different abiotic stresses trigger different responses in the *Salvia officinalis* species. The most important advantage of some abiotic stress factors on *Salvia officinalis* is that the high concentration of an active substance desired to be used as a phytopharmakon can be achieved by deliberate application of some stress factors.

**Keywords:** *Salvia officinalis*, Common sage, Abiotic Stress, Drought, Salinity, Light

<sup>1</sup>Sinem ELMAS (Orcid ID: 0000-0002-2872-9990), Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Muğla, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Sinem ELMAS, e-mail: sinemelmas@hotmail.com.tr

## GİRİŞ

Bitkiler normal yaşam süreçleri içerisinde büyüme ve gelişmelerini olumsuz etkileyen, verimlerini sınırlandıran elverişsiz koşullarla karşılaşabilirler. Bu elverişsiz koşulların oluşmasına neden olan faktörlere 'stres' adı verilir. Bitkisel üretimi etkileyen stres faktörleri biyotik (bitkiler, funguslar, nematodlar, mikroorganizmalar, hayvanlar, antropojenik etkiler vb.) ve abiyotik stres faktörleri (kuraklık, tuzluluk, yetersiz beslenme, radyasyon, atmosfer kirliliği, yüksek veya düşük sıcaklık, yüksek veya düşük ışık şiddeti vb.) olmak üzere ikiye ayrılır (Büyük ve ark., 2012). Bitkiler eş zamanlı ya da farklı zamanlarda bir veya birden fazla stres faktörüyle karşılaşabilirler. Karşılaştıkları streslere karşı dayanıklılıklarını arttırmak, canlılıklarını devam ettirebilmek, gelişimlerini sürdürebilmek, nesillerinin devamını sağlayabilmek için yapılarında, en az etkilenecek (zarar görecektir) şekilde, anatomik, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler meydana getirerek uyum mekanizmaları oluşturmaya çalışırlar (Öztürk, 2015).

Bitkilerde farklı stres faktörleri, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve birikimini artırarak ciddi metabolik işlev bozukluklarına neden olur, bu da DNA'da hasara, enzimlerin inaktivasyonuna ve lipid peroksidasyonuna yol açabilen bir oksidatif stres ile sonuçlanır (Tounekti ve ark.,2013). Bitkiler, oksidatif stresle başa çıkabilen, ROS kontrolü ve detoksifikasyonunu sağlayan fenolik bileşikler ve flavonoidler gibi düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlara sahiptirler (Büyük ve ark., 2012). Bu metabolitlerin çeşitli savunma fonksiyonları vardır ve biyosentezleri, genellikle biyotik ve abiyotik streslerine yanıt olarak indüklenir (Bettaieb ve ark., 2011). Bitkilerin bu antioksidan savunma sistemleri ile çevresel streslere gösterdikleri direnç arasında yakın bir ilişki söz konusudur (Bettaieb ve ark., 2011; Büyük ve ark., 2012). Stresiz koşullarda, bitki hücrelerinin antioksidatif savunma sistemi, hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidanların koordineli hareketi ile zararlı radikalleri etkili bir şekilde temizleyebilir ve lipid oksidasyonunu stabilize edebilirken; stres durumunda serbest radikaller ile antioksidan sistemin aktivitesi arasındaki denge bozulur ve serbest radikaller biyolojik moleküllerle hızlı bir şekilde reaksiyona girerek hücreye zarar vermeye başlar (Asada, 1999; Hernández ve ark., 2004; Bettaieb ve ark., 2011).

Tıbbi ve aromatik bitkilerle yapılan çalışmalarda, geleneksel bitki ürünlerinden farklı olarak, fitokimyasal kompozisyonunun oluşumunda, bitkinin genetik özelliklerinin, anatomik, morfolojik gelişim aşamalarının yanı sıra stres faktörlerinin de rolü olduğu düşünülmektedir (Lakušić ve ark., 2013). Çünkü stresle ilişkili metabolizma diğer tüm metabolik olayları büyük ölçüde etkilediğinden, sekonder metabolitlerin sentezi ve birikimini de etkilemektedir (Selmar ve Kleinwächter, 2013). Bu nedenle, tıbbi ve ekonomik öneme sahip bitkilerde, çeşitli stres faktörleri etkilerinin değerlendirilip incelenmesi bitki ıslahında dayanıklı çeşitlerin elde edilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Ballıbabagiller (Lamiaceae) familyasının, çift çenekliler sınıfına (Magnoliopsida) ait *Salvia* L. türleri, Anadolu'da eski zamanlardan beri halk hekimliğinde kullanılan şifalı bitkilerdir. *Salvia* L. cinsinin tıbbi amaçlı kullanımı dışında aromaterapi, parfümeri, kozmetik sektöründe; baharat, bitkisel boya ve gıda koruyucu olarak birçok kullanım alanına sahip bir türü de tıbbi adaçayı olarak tanımlanan *Salvia officinalis*'tir (Elmas ve Elmas, 2021).

1753 yılında Carl Linnaeus tarafından tanımlanan bu tür, Batı Balkanlar'da özellikle Dalmaçya ve Makedonya'da ve Avrupa'nın güney ve orta kısımlarında doğal yayılış göstermektedir (Güner ve ark., 2012; O'Leary ve Moroni, 2016). Lektotip bir tür olan *Salvia officinalis*, 60-100 cm arası uzunlukta, beyaz, mavi veya mor çiçekli, yaprakları gümüş renkli, tüylü ve basit, çok yıllık ve yarı çalimsı bir bitkidir (Bayram ve Sönmez, 2006). Bitkinin yapraklarından genellikle hidrodistilasyon yöntemi ile ortalama %1-2.5 oranında uçucu yağ elde edilir. *Salvia officinalis*'teki uçucu yağların başlıca kimyasal

bileşimi monoterpenler (borneol, bornil asetat,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen,  $\alpha$ -thujon,  $\beta$ -thujon, kafur), diterpenler (karnosol) ve triterpenlerdir (oleanolik, ursolik asit) (Başer, 2002; Topçu, 2006). Bitki uçucu yağının fenolik asitler, flavonoidler, kafeik asit, rosmarinik asit, fumarik asit ve glikozidler açısından çok zengin olduğu bildirilmiştir (Lu ve Foo, 2001). *Salvia officinalis* ile yürütülen çalışmalarda bitkinin antioksidan, antimikrobiyal, anti-kanser, anti-stres, antidepresan, antidiyabetik, antiinflamatuvar etkiler gibi bir dizi terapötik özellik sergilediği belirtilmiştir (Miraj ve Kiani, 2016). İngiliz Farmakopesi'nde resmi bir ilaç olarak kullanımı kabul edilmiş *Salvia officinalis* türü uluslararası ticarete önemli bir yere sahiptir (Topçu, 2006). Tıbbi adaçayı, dişotu ya da meryemiye olarak da bilinen bu tür ülkemizde doğal yayılış göstermemektedir ancak, Güney Fransa, Almanya, Macaristan, Amerika ve Rusya'da olduğu gibi ülkemizde de yetiştiriciliği yapılmaktadır (Bayram ve Sönmez, 2006; Güner ve ark., 2012). Çizelge 1'de ülkemizin farklı illerinde (Adana, Antalya, Denizli, Düzce, Eskişehir, Karaman, Kayseri, Kütahya, Manisa, Muğla, Tekirdağ, Uşak ve İzmir) 2012-2019 yılları arasında yetiştiriciliği yapılmış *Salvia officinalis* bitkisinin üretim miktarları (ton) ve verim (kg/da) değerleri sunulmuştur (TÜİK, 2021).

**Çizelge 1.** Ülkemizde adaçayı yetiştiriciliği verim ve üretim miktarı verileri (2012-2019)

| İller            | Adana                      | Antalya    | Denizli    | Düzce      | Eskişehir  | Karaman    | Kayseri     | Kütahya  | Manisa     | Muğla      | Tekirdağ   | Uşak       | İzmir      |            |
|------------------|----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Verim<br>(kg/da) | 2012                       |            |            |            |            | 130        |             |          |            |            |            |            |            |            |
|                  | 2013                       |            |            |            |            | 133        |             |          |            |            |            |            |            |            |
|                  | 2014                       |            |            |            |            | 133        |             |          |            | 150        |            |            |            |            |
|                  | 2015                       |            |            | 160        |            | 129        |             | 149      |            | 150        |            |            |            |            |
|                  | 2016                       |            | 200        | 101        |            | 200        | 143         |          | 152        |            | 149        | 100        | 167        |            |
|                  | 2017                       | 153        | 200        | 98         |            | 200        | 133         | 0        | 281        | 151        | 144        | 150        | 100        | 167        |
|                  | 2018                       | 153        | 200        | 94         |            | 200        | 148         | 0        | 126        | 151        | 138        | 135        | 100        | 167        |
|                  | 2019                       | 400        | 345        | 96         | 111        | 200        | 130         | 0        | 129        | 151        | 139        | 138        | 100        | 167        |
|                  | <b>Toplam</b>              | <b>706</b> | <b>945</b> | <b>549</b> | <b>111</b> | <b>800</b> | <b>1079</b> | <b>0</b> | <b>837</b> | <b>453</b> | <b>870</b> | <b>523</b> | <b>300</b> | <b>668</b> |
|                  | Üretim<br>Miktarı<br>(Ton) | 2012       |            |            |            |            | 7           |          |            |            |            |            |            |            |
| 2013             |                            |            |            |            |            | 4          |             |          |            |            |            |            |            |            |
| 2014             |                            |            |            |            |            | 4          |             |          |            | 15         |            |            |            |            |
| 2015             |                            |            |            | 8          |            | 4          |             | 53       |            | 15         |            |            |            |            |
| 2016             |                            |            | 1          | 275        |            | 1          | 5           | 97       |            | 17         | 14         |            | 1          |            |
| 2017             |                            | 13         | 1          | 273        |            | 1          | 4           | 0        | 181        | 28         | 17         | 36         | 2          | 1          |
| 2018             |                            | 13         | 1          | 246        |            | 1          | 4           | 0        | 62         | 28         | 28         | 42         | 2          | 1          |
| 2019             |                            | 4          | 883        | 157        | 5          | 1          | 3           | 0        | 70         | 28         | 29         | 50         | 2          | 1          |
| <b>Toplam</b>    |                            | <b>30</b>  | <b>886</b> | <b>959</b> | <b>5</b>   | <b>4</b>   | <b>35</b>   | <b>0</b> | <b>463</b> | <b>84</b>  | <b>121</b> | <b>142</b> | <b>6</b>   | <b>4</b>   |

Ülkemiz topraklarında yetiştiriciliği yapılan bu türün, 2020 yılı itibarıyla ABD, Almanya, Afganistan, Avusturya, Avusturalya, Azerbaycan, Bahreyn, Belarus, Belçika, Birleşik Krallık, Fransa, Güney Afrika, Hollanda, Irak, İsrail, İsveç, İsviçre, İtalya, Kanada, Katar, Kazakistan, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti, Şili ve Ukrayna'ya farklı miktarlarda ihracatı yapılarak, 2019 yılında 6.936 kg *Salvia officinalis* ihracatı karşılığı 119.559 dolar, 2020 yılında ise 10.755 kg karşılığı 184.596 dolarlık döviz girdisi ülke ekonomisine kazandırılmıştır (TÜİK, 2020). Bu durum *Salvia officinalis* bitkisinin üretimini, sanayisini ve ticaretini daha da önemli bir hale getirmektedir.

Ülkemizin farklı illerinde yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan *Salvia officinalis* bitkisinde, tarımsal başarı sağlayabilmek için, maruz kaldığı stres kaynaklarının çeşitleri, şiddeti, süresi, strese maruz kaldığı doku ve organ türü, bitkinin stres koşulları altında verdiği fizyolojik tepkiler ve tepki süreçleri, oluşturdukları tolerans mekanizmaları, bitkide oluşan fizyolojik hasarın süresi ve kalıcılığı ile bitkide hücre ve gen seviyesinde meydana gelen değişikliklerin belirlenmesi, bitkide verimliliğin artırılması çalışmalarına katkı sağlayacaktır (Yuan ve ark., 2013; Selmar ve Kleinwächter, 2013; Sönmez, 2015). Bu derlemede, daha önceki yıllarda yapılan çalışmalar referans alınarak, bazı abiyotik stres faktörlerine



karşı *Salvia officinalis* bitkisinde meydana gelen çeşitli agronomik ve biyometrik parametrelerdeki değişiklikler ile fizyolojik tepkiler özetlenmiştir.

### **Kuraklık Stresine Karşı İndüklenen Yanıtlar**

Kuraklık, bir bölgedeki yağışların uzun yıllar ortalamasının veya normal yağış değerlerinin altına düşmesi sonucu oluşan sistematik yağış açığı olarak tanımlanır (Mansori ve ark., 2019). Bitkiler, kökleri yeterli su alamadığında veya terleme oranının çok yüksek olduğu durumlarda kuraklık stresiyle karşılaşır (Güneş ve ark., 2006). Kuraklık stresi bitki gelişimini etkileyen önemli stres faktörlerinden biridir. Çünkü besin ve mineral madde taşınmasının yanı sıra bitki bünyesinde gerçekleşen pek çok metabolik faaliyet su sayesinde gerçekleşir. Çeşitli nedenlerle meydana gelen kuraklık stresi bitki hücrelerinde su potansiyelini ve turgor basıncını azaltarak konsantrasyonunda değişiklikler oluşturmaktadır. Oluşan değişiklikler gaz ve iyon değişimi, karbon asimilasyonu, solunum, fotosentez, hormon dengesi, yağ sentezi, protein sentezi gibi birçok yaşamsal faaliyeti etkileyebilmektedir. Bu nedenle bitkide meydana gelen kuraklık stresi bitkiye zarar vermekte hatta bitkinin ölümüne dahi neden olabilmektedir (Yurdcu, 2019). Yapılan çalışmalar *Salvia officinalis* bitkisinin kuraklık stresi karşısında bünyesinde fizyolojik ve metabolik değişiklikler oluşturarak yanıt verdiğini göstermiştir.

Son yıllarda biyoteknolojik gelişmelere paralel olarak bitki büyüme düzenleyicilerinin de verim üzerine etkileri olduğu görülmüştür. Doğal veya sentetik olabilen bu bileşikler, bitkilerde tohumların çimlenme gücünü arttırmak, çiçeklenmeyi teşvik etmek veya geciktirmek, soğuğa ve hastalıklara karşı direnci arttırmak, olgunlaşmayı hızlandırmak gibi bir veya birden çok fizyolojik olayı kontrol veya modifiye edebilmektedir. Genellikle dolaylı yoldan etkileri olan bu bitki büyüme düzenleyicilerinin başlıcaları oksinler, sitokininler, gibberellinler, etilen, Indol-Butirik Asit (IBA) ve Naftalin Asetik Asit (NAA)'tir (Kumlay ve Eryiğit, 2011). Çalışmalarda stres durumlarında bitkinin genetik yapısında doğal olarak mevcut olduğu bilinen bu düzenleyicilerde meydana gelen değişiklikler araştırılmıştır.

Bitkilerde kökler tarafından algılanan su kıtlığının gövdeye iletimi absisik asit (ABA), sitokininler, etilen ve malat gibi faktörler tarafından yapılır. ABA, potasyum iyonlarının ( $K^+$ ) akışını değiştirir ve stomaların daralmasını veya kapanmasını sağlar (Anjum ve ark., 2011; Öztürk, 2015). Bitkilerde stomaların daralması veya kapanması bitkinin terleme ile su kaybını engellemek için yapılan ilk adaptasyon mekanizması olarak kabul edilir (Osakabe ve ark., 2014). *Salvia officinalis* ile yürütülen çalışmalarda, bitkinin kuraklık stresinde fotosentez oranında düşüş bildirilmiştir (Sönmez, 2015). Bitkilerde fotosentez oranı, açık stomalardan alınan gaz formundaki karbondioksit miktarı ile ilişkilidir. Dolayısıyla kuraklık stresinde stomaların kapanması veya daralmasıyla birlikte karbondioksit alımı sınırlandığından fotosentez oranında düşüş meydana gelir (Chaves ve ark., 2003; Mansori ve ark., 2019). Kuraklık stresiyle stomaların kapanması bitkinin büyümesi için gerekli olan karbonhidrat molekülleri ve enerji, fotosentez yoluyla üretildiğinden, bu düşüş bitki büyümesi ve gelişimini de etkiler (Öztürk, 2015). *Salvia officinalis* bitkisinin farklı kuraklık stresi uygulamalarında bitki yapraklarının, kontrol bitkilere kıyasla daha az, kuru, küçük yapraklı ve ince gövdelere sahip olduğu bildirilmiştir (Bettaieb ve ark., 2009). Kuraklık stresi bu türde bitkinin topraküstü kısımlarının büyümesini (Bettaieb ve ark., 2009), nispi su içeriğini, biyokütlesini (Nowak ve ark., 2010; Sönmez, 2015), toplam klorofil içeriğini (Bettaieb ve ark., 2009) azaltmıştır. Kurak koşullarının olduğu ilk zamanlarda, bitkiler daha fazla suya ulaşabilmek için gövde uzamasını yavaşlatıp kök gelişimini hızlandırır (Öztürk, 2015). *Salvia officinalis*'in kuraklık stresi koşulları altında büyüme parametrelerindeki azalmanın nedeni bitkinin biyokütle üretimini tercihli olarak köklere tahsis etmesi veya -fotosentez veriminin düşmesine ve dolayısıyla biyokütle üretiminde bir azalmaya neden olan- klorofil içeriğinin azalmasının bir sonucu olabileceği belirtilmiştir (Bettaieb ve ark., 2011). Çalışmalarda şiddetli su açığına maruz kalan bitkilerde

büyüme ile ilgili parametrelerin orta dereceli su açığına maruz kalan bitkilerden daha az olduğu tespit edilmiştir (Bettaieb ve ark., 2009). Bu nedenle araştırmacılar *Salvia officinalis* bitkisini orta derecede kuraklığa toleranslı bitki olarak tanımlamışlardır (Taarit ve ark., 2010). Buna ek olarak, orta dereceli kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde, kontrol gruplarına kıyasla daha yüksek uçucu yağ içeriği, uçucu yağ verimleri ve yüksek terpen konsantrasyonları elde etmişlerdir (Nowak ve ark., 2010; Sönmez, 2015; Yurdcu, 2019). Bazı araştırmacılar kuraklık stresi altında, yaprak alanındaki azalmaya bağlı olarak, yağ bezlerinin yüksek yoğunluğunun, daha yüksek miktarda uçucu yağ birikmesine yol açabileceği öne sürmüşler (García-Caparrós ve ark., 2019), bazı araştırmacılar ise kuraklık stresi altında *Salvia officinalis* uçucu yağ içeriğinin artmasına ilişkin olarak topraküstü kısımlarının kuraklığa karşı toleransının yaprakların zengin polifenol içeriği ile ilişkili olduğunu, bu nedenle polifenol biriktirme kapasitesinin bu türün büyüme ve savunma arasında denge oluşturarak, kuraklık toleransına katkıda bulunduğu belirtmişlerdir (Bettaieb ve ark., 2011; Selmar ve Kleinwächter, 2013; Govahi ve ark., 2015). Ayrıca bu türde şiddetli su açığının fenolik bileşiklerin biyosentezinde yer alan enzimlerin aktivitesinde düşüş meydana getirdiğini tespit etmişlerdir (Bettaieb ve ark., 2011). Kuraklık stresinin neden olduğu monotermen sentezinin fazlalığı, stresli yapraklardaki yüksek indirgeme gücünün, biyosentezi yüksek oranda indirgenmiş bileşiklere doğru ittiğini göstermektedir ve dolayısıyla bu fizyolojik durumun sadece bir semptomunu temsil edebilir (Nowak ve ark. 2010). *Salvia officinalis*'te monotermen içeriğinde belirlenen değişiklikler, kuraklık stresinden etkilenen monotermen sentaz ekspresyonunu ile ilişkilidir. Bu anahtar enzimlerin, 1,8-sineole için sineol sentaz, kafur için bornildifosfat sentaz,  $\alpha$  ve  $\beta$ -thujone için sabinen sentaz olduğu bildirilmiştir (Selmar ve Kleinwächter, 2013).

Kuraklık stresinin *Salvia officinalis* bitkilerinde yağ asitlerinin terkebini de etkilediği gösterilmiştir (Bettaieb ve ark., 2009). Yağ asitlerinin, membran akışkanlığının korunmasını sağlayarak stres koşullarında bitkilere adaptasyon süreçleri için uygun ortamı sağlayan faktör oldukları bilinmektedir (Xu ve Beardall, 1997). Orta dereceli kuraklıkta *Salvia officinalis*'te linoleik ve linolenik asitler gibi doymamış yağ asitleri oranlarında önemli bir azalma; şiddetli kuraklık koşullarında ise stearik ve araşidik asitlerin kaybolduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kuraklık stresinde keton ve eter içerikleri artışının bu türde uçucu yağ bileşiklerinin biyosentezini uyardığı düşünülmüştür (Bettaieb ve ark., 2009).

Kuraklık stresinin metabolik arka planı oldukça karmaşıktır. Bitkiler kuraklık stresiyile karşılaştıklarında yaprakların absorbe ettiği ışık miktarı ve yararlanılan ışık arasındaki denge bozulur ve fotosentez metabolizması inhibe olur (Foyer ve Noctor, 2000). Fotosentez aktivitesinin engellenmesi nedeniyle fotosistem II'de elektronların oluşumu ve kullanımı arasındaki denge bozulur. Kloroplastlarda meydana gelen bu fotokimyasal değişimlerde, fotosistem II'de çok fazla miktarda biriken ve kullanılmayan ışık enerjisi dokularda süperoksit, oksijen, hidrojen peroksit ve hidroksil gibi aktif oksijen türevlerinin oluşumuna neden olur (Peltzer ve ark., 2002). Stomaların kapanmasıyla yaprakların mezofil dokularındaki CO<sub>2</sub> seviyesi hızla düşer, böylece artan süperoksit radikalleri (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ile bitki dokularında moleküler oksijen ile rekabet eden NADP'ler indirgenerek NADPH birikmeye başlar. Ortamda miktarları azalan NADP'ler oksijen alternatif elektron alıcısı olarak görev yapar. Daha sonra bitki dokularında Haber-Weiss adı verilen reaksiyon ile aktif oksijen çeşitleri olarak adlandırılan hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), süperoksit radikalleri (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ve hidroksil (OH<sup>-</sup>) radikalleri oluşur. Aslında stres koşullarında birikimi gerçekleşen süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türleri, hücre metabolizmasının doğal bir yan ürünüdür ancak aşırı birikimleri bitki hücresinde membran ve lipid peroksidasyonuna, protein oksidasyonuna, enzim inhibisyonuna, klorofil parçalanmasına, RNA ve DNA gibi yapılarda bozulmaya yol açarak hücre hasarı veya hücre ölümüne sebep olurlar (Anjum ve ark., 2011; Öztürk, 2015). Bitkilerde oksidatif strese neden olan bu reaktif

oksijen bileşiklerinin indirgenmesi ve birikimlerinin engellenmesi, süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), peroksidaz (POD), monodehidroksiaskorbat redüktaz (MDAR), dehidroksiaskorbat redüktaz (DHAR) ve glutatyon peroksidaz (GPX) gibi enzimatik; veya bunların metabolitleri olan askorbat, glutatyon (GSH),  $\alpha$ - tokoferoller, karotenoidler ve fenolik bileşikler gibi enzimatik olmayan düşük molekül ağırlıklı antioksidan bileşikler aracılığıyla gerçekleşir (Güneş ve ark., 2006). Stresli koşullarda bu antioksidanlardan enzimatik oksidan molekülleri reaktif oksijen bileşiklerini indirgeyerek birikimlerini engellerken, enzimatik olmayan antioksidan molekülleri ise fotosentetik membranların korunmasıyla görevlidir (Anjum ve ark., 2011; Dolferus, 2014; Osakabe ve ark., 2014; Öztürk, 2015).

*Salvia officinalis* türü ile yürütülen çalışmalarda, daha çok enzimatik olmayan antioksidan bileşiklerin rolleri anlaşılmasına çalışılmıştır. Bunlardan biri önemli bir fotosentetik pigment olan karotenoidlerdir. Karotenoidler, fotosentetik anten komplekslerindeki mavi ışığı absorbe etmekle kalmaz, aynı zamanda bitkilerdeki fazla enerjinin zararsız bir şekilde dağıtılması için fotosentetik membranların korunmasında diğer antioksidanlarla işbirliği yapar. Karotenoidler, kloroplastlardaki aşırı uyarma enerjisinin bir sonucu olarak oluşan triplet klorofili, singlet oksijeni ve diğer ROS'ları temizleyerek tilakoidlerdeki fazla enerjiyi dağıtmaya katkıda bulunur ve böylelikle stres altında fotosistem II yapısını ve işlevini korumaya yardımcı olur (Dall'Osto ve ark., 2006). Araştırmacılar tarafından, *Salvia officinalis* bitkisinde kuraklık nedenli yaprak yaşlanması sırasında karoten ve lutein karotenoid seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Abreu ve Munné-Bosch, 2008).

*Salvia officinalis* 'te bir başka antioksidan karnosik asittir. Bitkinin kuraklık stresli yapraklarında karnosik asit oksidasyonu sonucu, rosmanol ve izorosmanol diterpenlerinin artışı tespit edilmiştir. Kuraklık stresine maruz kalan yapraklarda, hücrelerde çalışan diğer koruyucu mekanizmaların yanı sıra, kloroplastlarda bulunan karnosik asidin ROS'ları temizleyerek antioksidan koruma sağladığı düşünülmüştür (Tounekti ve ark., 2012). Ancak başka bir çalışmada karnosik asidin artmış antioksidan aktivitesine rağmen, kuraklık stresli *Salvia officinalis* bitkilerinde şiddetli bir yaprak dökülmesi gözlemlenmiştir (Munné-Bosch ve ark., 2001). Araştırmacılar ayrıca, *Salvia officinalis* bitkisinde  $\alpha$ - tokoferol gibi antioksidanların artan sentezini, kuraklığa ve diğer çevresel streslere karşı, hem fotokoruyucu hem de antioksidatif savunma mekanizması ile ilişkilendirmişlerdir (Munné-Bosch ve Alegre, 2000; Munné-Bosch ve ark., 2001).

Kuraklığın bitkiler üzerindeki bir diğer etkisi olan yaprak yaşlanmasıdır. Araştırmacılar, *Salvia officinalis* 'te kuraklık stresi nedenli yaprak yaşlanmasının semptomlarını ilk olarak kloroplastlarda belirlemiş, stromada plastoglobuli birikimi, tilakoidlerin gevşemesi ve distorsiyonu, çok daha az grana yığılımı ile belirgin bir değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Munne'-Bosch ve ark., 2001). Ayrıca şiddetli fotosentetik pigment kaybına paralel olarak meydana gelen salisilik asit birikimi ve jasmonik asit düzeylerinde azalma tespit etmişlerdir (Abreu ve Munné-Bosch, 2008). Kuraklık stresi nedeniyle yaşanan yapraklarda artmış lipid peroksidasyonu, klorofil kaybı, azalmış fotosentetik aktivite ve - kloroplastlarda oksidatif stresin göstergesi olan- membrana bağlı kloroplastik antioksidan savunmalarında güçlü düşüşler tespit etmişlerdir (Munne'-Bosch ve ark., 2001). Kuraklığa bağlı yaprak yaşlanmasının düzenlenmesinde salisilik asidin diğer fitohormonlarla birlikte rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır (Abreu ve Munné-Bosch, 2008).

Bitkiler kuraklık koşullarında değişen ozmotik durumlarını düzenleyebilmek için glisin, betain, prolin, organik asitler ve polioller gibi ozmolit olarak adlandırılan düşük molekül ağırlıklı çözünür madde sentezler ve biriktirirler. Bu ozmolitler bitkide kuraklık toleransına doğrudan katkı yapmazlar ancak turgor kaybının dengelenmesine, stomatal iletkenliğin arttırılmasına ve fotosentezin devamlılığını sağlamaya katkıda bulunur. Böylelikle stres koşullarında hücre metabolik faaliyetlerinin

devam etmesi için kısa süreli dayanıklılık kazandırır (Öztürk, 2015; Mansori ve ark., 2019). Ancak literatürde kuraklık koşullarında *Salvia officinalis* bitkisinin değişen ozmolit içeriği ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır.

*Salvia officinalis* bitkisinde kuraklık koşullarında indüklenen tüm metabolik sendromun aydınlatılması için, stresli ve stressiz bitkiler arasında karşılaştırmalı olarak analiz yapılması, çeşitli belirteçlerin kombinasyonlarının kullanılması gerekmektedir. Çünkü ışık yoğunluğundaki artış çoğunlukla yüksek sıcaklıklarla ilişkilidir, yüksek sıcaklıklar kuraklık stresine neden olur ve daha düşük su mevcudiyeti, toprakta daha yüksek tuz konsantrasyonlarına neden olur (Selmar ve Kleinwächter, 2013). Bu nedenle *Salvia officinalis* gibi doğada yetişen/yetiştirilen bitkilerde sadece bir stres faktörünü kapsamlı bir şekilde ele almak zordur ve birçok çalışmada elde edilen sonuçlar gerçekten kesin değildir.

### Tuz Stresine Karşı İndüklenen Yanıtlar

Tuzluluk, dünyanın birçok bölgesindeki tarımsal üretim alanlarında toprak verimini, bitki büyümesini, verim ve kalitesini etkileyen, tarımsal sürdürülebilirliği zorlaştıran önemli sorunlardan biridir (Aziz ve ark., 2013; Torun, 2019). Tuzluluk yağış oranının yetersiz, buharlaşmanın fazla olduğu, kurak ve yarı kurak ekolojilerde sıkça görülmektedir. Ayrıca bilinçsiz sulama, drenaj imkanlarının yetersizliği, toprağın yanlış işlenmesi, yüksek taban suyu, hatalı ve gereksiz gübreleme işlemleri sonucu da tuzluluk ortaya çıkabilmektedir. Tuzluluk problemi sadece NaCl varlığı düşünülse de klorür, sülfat, nitrat, karbonat, bikarbonat ve borat bileşikleri de tuzluluğa neden olmaktadır (Eroğlu, 2007; Kulak ve ark., 2020). Tuzluluk, bitkilerde ozmotik potansiyeli azaltarak su, besin ve mineral alımını zorlaştırır, toksisiteye yol açarak bitkinin fizyolojik ve biyokimyasal metabolizmasında bozulmaya neden olur (Jouyban, 2012). Yapılan çalışmalarda tıbbi ve aromatik bitkilerin tuz ve kuraklık stresine karşı gösterdiği tepkilerin ortak noktaları olduğu anlaşılmıştır (Tiryaki, 2018). Bitkilerde tuz stresi nedeniyle oluşan hasarın genel semptomları, kuraklık stresinde olduğu gibi bitki büyüme hızında düşüş, uzun süreli maruz kalmada ise yaşlanma ve ölümdür (Jouyban, 2012). *Salvia officinalis* orta derecede tuza dayanıklı glikofit bir türdür. İster glikofit ister halofit olsun, tüm bitki türlerinde tuzluluk, belirli bir eşiği aştığında bitki biyokütlesinde azalmaya yol açar (Tounekti ve ark., 2012). Çalışmalarda *Salvia officinalis* bitkisinde büyüme inhibisyonunun kapsamı uygulanan tuz tipine ve konsantrasyonuna bağlı olarak farklılık göstermiştir. Birçok araştırmacı tarafından *Salvia officinalis* bitkisinin tuz stresi koşulları altında bitki boyu, dal sayısı, yeşil ve drog herba, biyokütle gibi birçok vejetatif büyüme karakterini olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Hendawy ve Khalid, 2005; Taarit ve ark., 2009; Taarit ve ark., 2010; Çamlıca ve ark., 2019; Torun, 2019; Kulak ve ark., 2020).

Tuz stresi genel olarak bitkilerin fotosentez ve solunum hızını düşürür. Bunun nedeni bitkiler tuz stresini algıladıklarında, hücreleri korumak için stomaları kapatan absisik asit (ABA) sentezini indüklemesidir (Said-Al Ahl ve Omer, 2011). Tuz stresi koşullarında bitkideki absisik asitin işlevi tam anlaşılammıştır. Ancak, NaCl'nin bitki büyümesi, fotosentez ve asimilatların taşınımı üzerindeki inhibitör etkisinin ABA tarafından hafifletildiği, ayrıca ABA'nın bitki membran bütünlüğünü korunmaya katkıda bulunduğu, yapraklarda toksik Cl<sup>-</sup> iyonlarının birikimini azaltarak, tuz stresi altında etilen salınımını ve yaprak absisyonunu azalttığı bildirilmiştir (Es-sbihi ve ark., 2020).

Tuz stresi gibi abiyotik bir strese maruz kalan bitkilerdeki hücrel oksidatif hasarın derecesi, bitkilerin antioksidan maddeler üretme kapasitesi tarafından kontrol edilir (Aziz ve ark., 2013). *Salvia officinalis* bitkisinin abiyotik stres faktörlerine tepkisi uçucu yağlar ve fenolik bileşikler dahil sekonder metabolitler seviyelerinin düzenlenmesini içerir. Fenolik bileşikler, serbest radikalleri inaktive ederek ve/veya hidroperoksitlerin serbest radikallere ayrışmasını önleyerek antioksidan aktivite sergiler

(Valifard ve ark., 2014). *Salvia officinalis* ile yürütülen çalışmalarda orta derecede tuzluluğun bitkide uçucu yağ biyosentezinin ve özellikle oksijenli monoterpenlerin arttığı gösterilmiştir (Hendawy ve Khalid, 2005; Taarit ve ark., 2009; Aziz ve ark., 2013). Yüksek tuzluluk seviyelerinin ise köklerden sürgünlere sitokin tedarikini engelleyerek, yapraktaki sitokin ile absisik asit arasındaki oranı değiştirmesi sonucu uçucu yağ verimini azalttığı bildirilmiştir (Taarit ve ark., 2009). Farklı tuz çeşitleri ve konsantrasyonlarının ise *Salvia officinalis* uçucu yağının kimyasal bileşimini önemli ölçüde etkilediği ve farklı yeni kemotiplerin ortaya çıktığı tespit edilmiştir (Kulak ve ark., 2020). Ayrıca *Salvia officinalis*'te tuzluluğun artmasıyla çoklu doymamış yağ asitleri azalırken, tekli doymamış yağ asitleri artmış, bu şekilde bitkide, membranların yeniden yapılandırılması yoluyla tuz iyonlarının oksidatif etkilerine karşı geliştirdiği bir adaptasyon olduğu düşünülmüştür (Taarit ve ark., 2010).

*Salvia officinalis* bitkisinde tuzluluk stresinin neden olduğu oksidatif hasarlara karşı koruyan diğer antioksidanlar ise karotenoidler ve  $\alpha$ -tokoferollerdir. Kloroplastlar, zarlarını oksidatif hasardan koruyan karotenoidler ve  $\alpha$ -tokoferoller olmak üzere düşük moleküler ağırlıklı lipofilik antioksidanlar içerir (Asada, 1999; Falk ve Munné-Bosch, 2010). Bitkide membran yapısının stabilizasyonunu sağlamaya katkı sağlayan  $\alpha$ -tokoferol, elektron transferi ile  $\alpha$ -tokoferol radikali oluşturarak ve  $^1O_2$  ile etkileşime girerek iki elektron transferi ile  $H_2O_2$  oluşturur. Oluşan  $\alpha$ -tokoferol radikali ve  $H_2O_2$ , askorbat peroksidaz (APX) tarafından indirgenir. Bu şekilde  $\alpha$ -tocopherol, fotosentetik membranlarda lipid peroksidasyonunun yayılmasını engelleyerek bitkiyi oksidatif hasardan korur (Falk ve Munné-Bosch, 2010; Çulha ve Çakırlar, 2011). *Salvia officinalis*'te orta derecede tuzluluğun bitki yapraklarında karoten ve  $\alpha$ -tokoferol birikimlerini arttırarak antioksidan korumayı desteklediği, ancak daha yüksek tuzluluk derecelerinde fotosentetik enzimleri, klorofilleri ve karotenoidleri bozarak fotosentetik süreci etkilediği bildirilmiştir (Tounekti ve ark., 2011; Tounekti ve ark., 2012).

*Salvia officinalis* bitkisinde, tuz stresine direnebilmek için kullanılan bir diğer mekanizmanın prolin ve çözünen şeker gibi uyumlu ozmolitlerin birikmesi yoluyla olduğu belirtilmiştir. Bitki hücresi tuz stresi kaynaklı plazmoliz oluşumundan kaçınmak için sükrözün, glikoza ve fruktoza; nişastanın da glikoza parçalanmasıyla ozmotik basıncını artırır. Dolayısıyla tuzluluk stresi sırasında kökteki tüm çözünebilir karbonhidratların artması, ozmotik basınca karşı dengede etkilidir (Sahar ve ark., 2011). Bu türde tuz stresi altında salisilik asit tarafından arttırılan karbonhidrat konsantrasyonunun, tuz stresinin neden olduğu su kıtlığı nedeniyle oluşan oksidatif hasarın önlenmesine ve protein yapısının korunmasına yardımcı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca serbest amino asitlerin, özellikle de salin koşullarda enerji ve nitrojen rezervuarı olarak işlev yapan prolinin üretimi ve birikimi *Salvia officinalis*'in tuz stresine karşı geliştirdiği adaptif bir tepki olarak değerlendirilmiştir (Sahar ve ark., 2011; Torun, 2019).

Tuzlulukla ilgili yürütülen çalışmalarda bitkilerin, tuzu bünyeye almama, tuzun seyreltilmesi, tuz eliminasyonu, bitki dokularında sukkulentlik kazanma, tuzun yeniden dağılımı şeklinde geliştirdikleri savunma mekanizmaları ile tuz stresine karşı koyabildikleri bildirilmiş, bunun yanı sıra seçici olarak iyonların biriktirilmesi veya atılması, kökten iyon alımının ve sürgüne iletiminin kontrolü, tüm bitkide ve hücrelerde iyonların vakuollerde biriktirilmesi ile ozmotik düzenleyicilerin sentezi gibi dolaylı savunma mekanizmalarının da tuz stresine karşı koyabilmede etkili olduğu ortaya konmuştur (Çulha ve Çakırlar, 2011). Araştırmacılar *Salvia officinalis* bitkisinde, tuzluluğun neden olduğu stres semptomlarını dengeleyen veya hafifletebilen kinetin, kobalt, çinko ve selenyum uygulamaları bildirmişlerdir (Hendawy ve Khalid, 2005; Tounekti ve ark., 2011; Torun, 2019; Çamlıca ve ark., 2019). Hendawy ve Khalid, (2005), tuzlu koşullarda çinko ile muamele edilen *Salvia officinalis* bitkilerinin vejetatif büyüme karakterlerinin (bitki boyu, dal sayısı, taze ve kuru ağırlık), sadece tuzlu toprak koşullarında yetiştirilenlerden daha yüksek olduğunu bildirmiş, Çamlıca ve ark., (2019), tuzlu

koşullarda 20 mg/L selenyum dozuna kadar olan uygulamalarda, bu türde büyüme parametrelerinde olumlu gelişmeler saptamış, Tounekti ve ark., (2011), kinetinin yaprakta uygulamalarının iyon ve pigment içerikleri ile yaprak fenolik diterpen ve  $\alpha$ - tokoferol içeriklerini arttırdığını, Torun, (2019) ise tuz+kobalt uygulamasının fenolik bileşikleri arttırdığını, ozmotik potansiyeli ve nispi büyüme oranını daha az etkilediğini ve kobaltın tuz stresinin olumsuz etkilerini hafiflettiğini bildirmiştir.

### Sıcaklık Stresine Karşı İndüklenen Yanıtlar

Hükümetlerarası İklim Değişikliği Paneli (IPCC), önümüzdeki yıllarda özellikle Akdeniz tipi ekosistemlerde görülmesi olası ani sıcaklık artışlarının, bitki fizyolojileri üzerinde olumsuz etkilerinin olacağını öngörmüştür (Asensi-Fabado ve ark., 2013). Akdeniz ortamında, bitkiler genellikle yaz aylarında sıklıkla kuraklık ve yüksek ışık yoğunluğu ile birleşen yüksek sıcaklıklara maruz kalırlar. Akdeniz sklerofil bitkileri 48-55 °C'ye kadar dayanabilmektedir ancak bitkilerde metabolik hasarlar 35 ila 40 °C arasında oluşmaya başlar. 42 °C 'nin üzerindeki yaprak sıcaklıkları, tilakoid sıvılaşması ve protein denatürasyonu nedeniyle fotosentetik düzeneğe doğrudan zarar verir (Larcher, 2000; Chaves ve ark., 2003; Asensi-Fabado ve ark., 2013). Bitki hücreleri sıcaklıklarını çok hızlı artırabildiklerinden sıcaklık stresi etkisi, diğer streslerden daha hızlı bir şekilde bitkiyi etkiler (Larcher, 2000). Düşük veya yüksek sıcaklık gibi çevresel stresler, bitki yaşam döngüsü boyunca birkaç ay arayla veya daha kısa bir süre ardi ardına aynı zamanda veya farklı zamanlarda meydana gelebilir. Stres olayları arasındaki zaman aralığı önemli bir faktördür çünkü bitkilerin müteakip streslere daha hızlı ve/veya daha verimli bir şekilde yanıt vermesini sağlayan, bir önceki stresin izini hafızasında tutma kapasitesidir (Bruce ve ark., 2007). Yapılan çalışmalarda bitkilerin morfolojisinde oluşan sürekli değişikliklerin, anahtar sinyal proteinleri ve transkripsiyon faktörü değişiklik seviyelerinin, bitkinin sonraki streslere yanıtında uzun vadeli değişiklikler sağlayarak stres "hafızasında" rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Bruce ve ark., 2007; Galis ve ark., 2009). *Salvia officinalis* bitkisinin sıcaklık stresine karşı yanıtının araştırıldığı bir çalışmada, bitkiler ilk kez sıcaklık stresine maruz kaldığında ABA, MDA (malondialdehit) ve  $\alpha$ - tokoferol seviyelerinin yükseldiği, yaprak bağıl su içeriği ve Fv/Fm seviyelerinin düştüğü; ancak ikinci kez maruz kaldığında ABA ve Fv/Fm seviyelerinde bir hafif bir düşüş, klorofil,  $\alpha$ - tokoferol ve MDA seviyelerinin ise sabit kalması nedeniyle daha düşük bir oksidatif stres olarak değerlendirmişlerdir. Tekrarlanan streslere maruz kalan *Salvia officinalis* bitkisinde biyokimyasal mekanizmaların ve fitohormonların, sıcaklık stresinin izini sürdürüp "hafıza" etkisi uygulayabileceği belirtilmiştir (Asensi-Fabado ve ark., 2013).

Birçok türde, orta dereceli sıcaklıklara önceden maruz kalmanın, edinilmiş termotoleransa müteakip daha şiddetli ısı stresine karşı bitki toleransını arttırdığı bilinmektedir. Edinilmiş termotoleransta, ısı şoku proteinlerinin gen ekspresyonu ve biyosentezi, antioksidan enzimlerin artan aktiviteleri ve ilgili genlerin ekspresyonu, daha yüksek antioksidan, çözünür şeker ve prolin seviyeleri de dahil olmak üzere bir dizi metabolik süreç yer alır (Wang ve ark., 2011). Stres izini sürdürme yeteneği, bitkilerin sonraki stres olayına daha verimli bir şekilde yanıt vermesine olanak tanır (Heil ve Baldwin, 2002). Ancak literatürde *Salvia officinalis* bitkisinin sıcaklık stresine verdiği yanıtların anlaşılmasına dair çalışmalar çok nadirdir, çünkü sadece sıcaklık stresini oluşturmak deneysel tasarımın karmaşıklığından dolayı genellikle zordur, ancak doğada sıklıkla meydana gelen sıcaklık stres faktörünün bitki üzerine etkilerinin anlaşılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

### Işık Stresine Karşı İndüklenen Yanıtlar

Işık, bitkilerin anatomik, morfolojik, fizyolojik gelişme ve büyüme süreçlerini etkileyen önemli abiyotik faktörlerden biridir. Bitkilerin metabolik faaliyetleri ve optimum büyümesi, aydınlıkta biriken karbon ve nitrojenin karanlıkta harekete geçirilmesine bağlıdır (Graf ve Smith, 2011). Bu nedenle ışık,

bitkinin yaşam döngüsünde kritik önem taşıyan fotosentez için gerekli olan enerji kaynağı ve aynı zamanda bir sinyal molekülüdür. Bitkilerde 24 saatlik periyotta, -aydınlık ve karanlık evrelerin koordinasyonu ile- rezervlerin büyümesi ve dönüşümü metabolizmayı düzenleyen sirkadiyen saat tarafından sağlanır (Kılıç ve Bölükbaşı, 2020). Sirkadiyen saat, bitkilerde hücre bölünmesini organize ederek stomatal açıklıkların gelişim ve farklılaşma sürecinde değişikliklere neden olur. Böylece bitkiler aydınlık/karanlık arasındaki değişikliklere adaptasyon sağlar, çeşitli metabolik faaliyetleri düzenler ve geliştirdiği fizyolojik adaptasyon sayesinde büyüme ve gelişmelerini sürdürmeyi sağlar. Ayrıca karbon fiksasyonu, terleme, çiçeklenme zamanı, gen ekspresyonu gibi tüm fizyolojik olaylar sirkadiyen saat tarafından düzenlenir (McClung, 2008). Lamiaceae familyasının *Salvia* üyeleri 'sun species' yani "güneş türlerinden" biri olarak tanımlanmaktadır (Castrillo ve ark., 2005). Ancak ışık yoğunluğu, kontrol edilmesi en zor çevresel faktördür (Rezai ve ark., 2018). Işık süresi, ışık yoğunluğu, dalga boyu gibi ışıkla ilgili pek çok faktörün *Salvia officinalis* bitkisinin morfoparametrelerinde ve biyokimyasal mekanizmalarında değişikliğe neden olduğu bildirilmiştir.

*Salvia officinalis*'te farklı ışık rejimlerinin (kısa gün, orta gün ve uzun gün şartları; sırasıyla 4, 8 ve 16 saat) bazı büyüme parametrelerine etkileri, optimal sirkadiyen ritim düzenlemelerini belirlemek için araştırılmıştır. Araştırmacılar, gövde uzunluğu açısından en çok büyümenin 16 saatlik, en az büyümenin 8 saatlik sürede olduğu belirlemiştir (Kılıç ve Bölükbaşı, 2020). Işık rejimi ve bitki büyümesi ile ilgili olarak, yüksek ışımada büyüyen bitkilerde genellikle aşırı ışık enerjisi emmeleri nedeniyle fotosentetik aparatın inaktivasyonu veya kloroplastların klorofil içeren reaksiyon merkezlerinde bozulma sonucu, düşük ışımada büyüyen bitkilerde ise genellikle stomatal iletkenlik ve fotosentez oranında meydana gelen düşüş sonucu (Rezai ve ark., 2018) her iki durumda da bitki büyüme oranında azalma görülür. *Salvia officinalis* bitkisinde ışık koşullarına tepki olarak meydana gelen değişiklikler ise şu şekildedir: Düşük ışık yoğunluğunda bitki boyunda artış (Mapes ve Xu, 2014; Kılıç ve Bölükbaşı, 2020), yaprak boyutu, genişliği (Kılıç ve Bölükbaşı, 2020), yaprak çıkış hızı (Mapes ve Xu, 2014) ve sayısı (Zervoudakis ve ark., 2012) ile biyokütlede azalma (Zervoudakis ve ark., 2012; Rezai ve ark., 2018) şeklindedir.

*Salvia officinalis*'te stres faktörlerine karşı savunma sağlayan sekonder metabolitler, çoğunlukla yaprak yüzeyinde glandüler, peltat ve kapitat trikolar tarafından ve nadiren gövdenin trikoları tarafından üretilir ve depolanır (Kılıç ve Bölükbaşı, 2020). Kapitat trikoları, savunma mekanizmasında kullanılan savunma proteinlerinin, bileşiklerinin salgılanması ve birikiminden, peltat trikoları, bitkileri biyotik ve abiyotik stresten koruyan yarı uçucu organik bileşiklerin salgılanması ve birikiminden (Martínez- -Natarén ve ark., 2018), glandüler trikom salgıları ise biyotik faktörler olmak üzere çeşitli stres faktörlerine karşı korumada, büyüme ve gelişmeyi düzenlemede görev alır. Bu yapılar bitki fitokimyasallarının üretildiği ve depolandığı salgı yapılarıdır. Bitkideki konumu ve yoğunluğu, genetik bir temele sahip olmakla birlikte, bitkinin yaşına ve maruz kaldığı stres faktörlerine bağlı olarak değişebilir. *Salvia officinalis* bitkisi üzerinde farklı fotoperiyot uygulamaları sonucu, kapitat trikom sayılarının yaprak üst yüzeyinde daha fazla olduğu, bu sayıların en fazla 8 saatlik uygulamada, en az ise 4 saatlik uygulamada tespit edildiği belirlenmiş ayrıca en uzun kapitat tüylerinin 16 saatlik fotoperiyot uygulamasında bulunduğu bildirilmiştir. Peltat tüylerin ise yaprak alt yüzeyde yaprak üst yüzeye oranla daha fazla bulunduğu; en fazla 16 saatlik uygulamada, en az ise 4 saatlik uygulamada bulunduğu belirtilmiştir (Kılıç ve Bölükbaşı, 2020).

Tıbbi ve aromatik bir bitkide glandüler trikoların yoğunluğu ve boyutu, bitkinin fitokimyasal içeriği ve kalitesi hakkında bilgi verebilir. Özellikle monoterpen hidrokarbon miktarının ışık süresiyle doğrusal bir ilişkisi vardır (Rguez ve ark., 2019). *Salvia officinalis*'in en yüksek uçucu yağ ve oksijenli monoterpen miktarı 8 saatlik fotoperiyotta belirlenmiştir (Kılıç ve Bölükbaşı, 2020). Bu türde ışık

spektral kalitesinin uçucu yağ oranı ve monotерpenler üzerindeki etkisinin incelediği başka bir çalışmada ise araştırmacılar beyaz ve kırmızı +mavi LED ışıklı rejimlerde en fazla uçucu yağ miktarını; kırmızı LED ışık ve yüksek basınçlı sodyum lamba ışığında en yüksek kafur biyosentezini, kırmızı LED'ler ile büyüyen bitkilerde ise en yüksek 1,8 cineol oranını belirlemişlerdir (Ivanitskikh ve Tarakanov, 2014). Zervoudakis ve ark., (2012), ise %45'lik ışık seviyesinde en yüksek uçucu yağ konsantrasyonu ile daha yüksek (+) - thujanone içeriği ve daha düşük kafur birikimi tespit etmiştir.

*Salvia officinalis* bitkisinin farklı ışık rejimlerinde değişen klorofil miktarlarıyla ilgili olarak, Kılıç ve Bölükbaşı, (2020) en yüksek seviyeyi 8 saatlik fotoperiyot uygulamasında tespit ederken, Zervoudakis ve ark., (2012), %25 gölgede yetişen bitkilerde daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca çalışmalarda gölgede yetiştirilen *Salvia officinalis*'te diğer bir fotosentetik pigment karotenoid, tam güneş ışığına maruz kalan bitkiler ile karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur (Zervoudakis ve ark., 2012; Mapes ve Xu, 2014; Rezai ve ark., 2018).

Bitkilerde ışığın neden olduğu stres durumlarının etkilediği bir diğer unsur fotosentez verimliliğidir (Fv/Fm). Düşük ışık, iki fotosistem (PS I ve II) arasında dengelenen ışık toplama ve/veya elektron taşınması yoluyla, genellikle bitkilerdeki ışık reaksiyonlarının oranını düşürür. Bu nedenle, karanlık reaksiyonlarda karbon fiksasyonunu ve genel fotosentez oranını sınırlanır (Maxwell ve Johnson 2000). Çalışmalarda *Salvia officinalis* bitkilerinde Fv /Fm'nin düşük ışık yoğunluğunda azaldığı belirlenmiştir (Mapes ve Xu, 2014).

### Ozon Stresine Karşı İndüklenen Yanıtlar

Troposferik ozon (O<sub>3</sub>), değişen iklim koşulları ve antropojenik faaliyetler nedeniyle dünyanın birçok yerinde seviyesi artması beklenen gaz halindeki en önemli kirleticidir. Konsantrasyonuna ve çevresel koşullara bağlı olarak O<sub>3</sub>'ün, *Salvia officinalis* bitkilerinde belirli biyokimyasal ve moleküler yanıtları indükleyerek fonksiyonel ve genik seviyelerde bir dizi olumsuz etkiye neden olduğu bildirilmiştir (Pellegrini ve ark., 2015; Marchica ve ark., 2019).

O<sub>3</sub> stresinin bitkilerde neden olduğu fizyolojik etkilerden biri, metabolik ve hücrede ultra yapısal değişiklikler, hücresel entegrasyonun parçalanması, fotosentetik aktivitede azalma ve klorofil bozunması sonucu meydana gelen yaşlanmadır (Munné Bosch ve Alegre, 2004). Çalışmacılar, *Salvia officinalis* bitkilerine 90 ardışık gün (5 saat gün<sup>-1</sup>) 120 ppb uyguladıkları ozon fümigasyonu sonunda bitkilerde, membran hasarına ve hücresel su kaybına bağlı olarak yaprak yaşlanması, yaprak sararması ve absisyon görüldüğünü bildirmişlerdir (Pellegrini ve ark., 2015).

O<sub>3</sub> gibi abiyotik stresler sırasında, aşırı üretilen ROS'un atılmasında fenolik bileşiklerin yanı sıra, ozmoprotektan adlı uyumlu çözünebilir maddeler de hücre içi biyokimyayı bozmadan yüksek seviyelerde birikebilir. Yapılan bir çalışmada, ozon stresine maruz kalan *Salvia officinalis* yapraklarında monosakkarit ve disakkarit konsantrasyonu, şeker alkol seviyeleri ve toplam karbonhidratların artışı bildirilmiştir. Ozon stresli yapraklarda azalmış fotosentetik aktivite, ksantofil pigmentlerinde azalma (anteraxanthin + violaxanthin), klorofil kaybı (klorofil a ve b) ve fenol birikimi tespit edilmiştir. Tüm bu olaylar, ksantofil döngüsü, antioksidan bileşikler (kafeik asit ve rosmarinik asit) ve suda çözünür karbonhidratlar (özellikle monosakkaritler) tarafından sağlanan fotoprotektif etkiye rağmen kloroplastlardaki oksidatif stresin göstergesi olarak kabul edilmiştir. Ek olarak, fotoinhibitör hasarlardan korunmada karotenoidlerin ozon stresindeki görevi önemi araştırılmış ve ROS'a karşı fotosentetik membranların koruyucuları olarak görev yaptığı, özellikle O<sub>3</sub> stresli *Salvia officinalis* türünde ksantofil döngüsünün aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (Pellegrini ve ark., 2015).

*Salvia officinalis* bitkilerinde, O<sub>3</sub>'ün maruziyetine karşı toleranslarını artırmak için belirli biyokimyasal ve moleküler yanıtları indükleyerek gen ekspresyonunu uygun düzenlemelerle



etkinleştirdiği de belirlenmiştir (Marchica ve ark., 2019). Bitkilerde oksidatif stres, genik ekspresyonun pozitif veya negatif düzenleyicileri olarak işlev görebilen WRKY'ler gibi bazı transkripsiyon faktörü (TF) familyalarının aktivasyonunu harekete geçirebilir. WRKY TF'ler, bitkilerde büyük bir düzenleyici protein ailesidir. Çoğu WRKY proteinleri, hem stres algısında hem de sinyal iletiminde ve redoks düzenlemesinde yer alan biyotik ve abiyotik stres indükleyici genlere bitki toleransında önemli bir rol oynamaktadır (Khan ve ark., 2018; Marchica ve ark., 2019). O<sub>3</sub>'e maruz bırakılan *Salvia officinalis* bitkisinde WRKY'leri için altı gen dizisi tanımlanmış, 2 ve 5 saatlik maruziyette WRKY4, WRKY5, WRKY11, WRKY46 genlerinin transkript seviyelerinde ciddi bir artış, WRKY23 gen ekspresyonunda ise azalma tespit etmişlerdir. WRKY'lerin *Salvia officinalis*'in O<sub>3</sub> stresi sırasında sinyal mekanizmalarında önemli bir rol oynayabileceğini gösterilmiştir. Araştırmacılar, *Salvia officinalis* bitkisinde O<sub>3</sub>'e maruz kalmanın ilk saatlerinde, anyon süperoksitin hızlı bir şekilde artış göstermesinin geçici bir oksidatif patlamaya neden olduğu bildirilmiştir. Ek olarak, O<sub>3</sub>'ün membran yağ asitleri ile reaksiyonu -tiyobarbitürik asit reaktif madde konsantrasyonunun artmasıyla belirlenen-peroksidatif süreçleri uyarılmış ve bitkinin oksidatif patlamayı en aza indirmek için hücrel antioksidan mekanizmaları indükleyerek salisilik ve jasmonik asit birikimi ve absisik asit artışı gösterdiği belirlenmiştir (Marchica ve ark., 2019).

## SONUÇ

Bitkiler, optimum büyümelerini sürdürmek için enerji, su ve mineral gibi kaynak dengelerine ihtiyaç duyar. Ancak bitkisel üretimde bitkinin gelişmesini ve farklılaşmasını etkileyen biyotik ve abiyotik stres faktörleri bulunabilir. Stres faktörlerinin şiddeti, süresi, strese maruz kaldığı doku ve organ türü bitkisel üretimi doğrudan veya dolaylı etkilemektedir (Öztürk, 2015). Bitkiler, çevresel stres faktörlerinin oluşturduğu dengesizlikleri telafi etmek için hücreden ekosisteme kadar değişebilen etkileyici bir adaptasyon sergileyebilirler.

Dünyada kullanım alanı ve talebi artan *Salvia officinalis* türünün son yıllarda ülkemizin farklı illerinde yetiştiriciliği yapılmakta her yıl tonlarca adaçayı ihraç edilerek ülkeye döviz girdisi sağlanmaktadır. Ülkemizin farklı iklim, toprak yapısı ve coğrafik koşullarında tarımı yapılan, iç ve dış pazarda önemli bir yere sahip olan *Salvia officinalis*'in yetiştiriciliğinde dünya piyasalarının ihtiyaç duyduğu standartlarda, kaliteli ve yüksek verimli üretimi söz konusu olduğunda çevresel faktörlerin tarımsal başarıya etkisinin bilinmesi gereklidir. Bu derlemede *Salvia officinalis* yetiştiriciliği uygulamalarında bitkilerin bazı abiyotik stres faktörlerine verdikleri yanıtlar araştırılmıştır. Araştırmalarda farklı abiyotik streslerin bu türde farklı tepkileri tetiklediği anlaşılmıştır.

Özetle, *Salvia officinalis* bitkisinde orta dereceli kuraklıkta yaprak yaşlanmasının görüldüğü (Munne'-Bosch ve ark., 2001), yapraklarının kontrol bitkilere kıyasla daha az, kuru, küçük ve ince gövdeli olduğu (Bettaieb ve ark., 2009), topraküstü kısımlarında yavaşlamış büyüme (Bettaieb ve ark., 2009), azalmış nispi su içeriği ve biyokütlesi (Nowak ve ark., 2010; Sönmez, 2015) ile toplam klorofil içeriğinde azalma (Bettaieb ve ark., 2009) ve fotosentez oranında düşüş (Sönmez, 2015) tespit edilmiştir. Ancak orta dereceli kuraklıkta, kontrol gruplarına göre daha yüksek uçucu yağ içeriği, uçucu yağ verimleri ve yüksek terpen konsantrasyonları elde edildiği bildirilmiştir (Nowak ve ark., 2010; Sönmez, 2015; Yurducu, 2019). Bitkinin orta dereceli tuzluluk koşullarında ise boyu, dal sayısı, yeşil ve drog herba, biyokütle gibi birçok vejetatif büyüme karakterinin olumsuz etkilendiği bildirilmiştir (Hendawy ve Khalid, 2005; Taarit ve ark., 2009; Taarit ve ark., 2010; Kulak ve ark., 2020). Daha yüksek tuzluluk koşullarında ise fotosentetik enzimlerin, klorofil ve karotenoidlerin bozularak fotosentetik sürecin olumsuz etkilendiği, bunun sonucu olarak yaşlanma ve ölümün kaçınılmaz hale geldiği belirtilmiştir (Tounekti ve ark., 2011; Jouyban, 2012; Tounekti ve ark., 2012). Işık stresi ile ilişkili olarak, ışık

yoğunluğunun düşük olduğu koşullarda bitki boyunda artış (Mapes ve Xu, 2014; Kılıç ve Bölükbaşı, 2020), yaprak boyutu, genişliği (Kılıç ve Bölükbaşı, 2020), yaprak çıkış hızı (Mapes ve Xu, 2014) ve sayısı (Zervoudakis ve ark., 2012) ile biyokütlede azalma (Zervoudakis ve ark., 2012; Rezai ve ark., 2018) görülürken, yüksek ışımada büyüyen bitkilerde genellikle ışık enerjisini aşırı emmeleri nedeniyle fotosentetik aparatın inaktivasyonu veya kloroplastların klorofil içeren reaksiyon merkezlerinde bozulma sonucu bitki büyüme oranında azalma (Rezai ve ark., 2018) tespit edilmiştir. *Salvia officinalis*'te sıcaklık ve ozon stresinin etkileri ise moleküler düzeyde araştırılmış, tekrarlanan sıcaklık stresinde bitkinin biyokimyasal mekanizmalar ve fitohormonlar sayesinde, sıcaklık stresinin izini sürdürüp "hafıza" etkisi uygulayabildiği (Asensi-Fabado ve ark., 2013), ozon stresinde ise oksidatif patlamayı en aza indirmek için hücrel antioksidan mekanizmaları indükleyerek yanıt verdiği belirtilmiştir (Marchica ve ark., 2019).

*Salvia officinalis* ile yapılan pek çok çalışmada bitkilerin tepkilerine ve çevrenin tekil özelliklerine karşı oluşturdukları adaptasyonlarına odaklanılmıştır, ancak yetiştirilme ortamında doğadaki diğer bitkiler gibi eş zamanlı ya da farklı zamanlarda birden fazla stresle karşılaşabilirler. Bu nedenle adaçayı yetiştiriciliği uygulamalarında bitkilerin farklı abiyotik stres faktörlerinin kombinasyonuna verdikleri moleküler yanıtlar ve bu yanıtlarla indüklenen tolerans mekanizmalarının belirlenebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Adaçayı yetiştiriciliğinde bitkinin ihtiyaç duyduğu kaynakları belirlemek, su, tuz, ışık, sıcaklık, besin gibi birden fazla çevresel bileşenin bitki üzerine etkilerini bilmek ve bunları uygun tarımsal tekniklerle geliştirmek hem maliyet açısından fayda sağlar hem de kaliteli ürün yetiştiriciliğine katkıda bulunur.

### Çıkar Çatışması

Makaleye ait çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve makalenin yazılması aşamalarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederim.

### Yazar Katkısı

Makalenin planlanması, yürütülmesi ve yazılması makale tek yazarı olarak tarafımda yapıldığı beyan ederim.

### KAYNAKLAR

- Abreu ME, Munné-Bosch S, 2008. Salicylic acid may be involved in the regulation of drought-induced leaf senescence in perennials: a case study in field-grown *Salvia officinalis* L. plants. *Environmental and Experimental Botany*, 64 (2):105-112.
- Anjum SA, Xie XY, Wang LC, Saleem MF, Man C, Lei W, 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6 (9): 2026-2032.
- Asada K, 1999. The Water-Water Cycle in Chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annual Review Of Plant Biology*, 50 (1): 601-639.
- Asensi-Fabado MA, Oliván A, Munné-Bosch S, 2013. A comparative study of the hormonal response to high temperatures and stress reiteration in three Labiatae species. *Environmental and Experimental Botany*, 94: 57-65.
- Aziz EE, Sabry RM, Ahmed SS, 2013. Plant Growth and Essential Oil Production of Sage (*Salvia Officinalis* L.) and Curly-Leafed Parsley (*Petroselinum Crispum* Ssp. *Crispum* L.) Cultivated Under Salt Stress Conditions. *World Applied Sciences Journal*, 28:785-796.
- Başer KHC, 2002. Aromatic Biodiversity Among the Flowering Plant Taxa of Turkey. *Pure and Applied Chemistry*, 74 (4): 527-545.
- Bayram E, Sönmez Ç, 2006. Adaçayı Yetiştiriciliği. EÜ Tar. Uyg. ve Araş. Merkezi Yayın Bülteni, (48).

- Bettaieb I, Hamrouni-Sellami I, Bourgou S, Limam F, Marzouk B, 2011. Drought Effects on Polyphenol Composition and Antioxidant Activities in Aerial Parts of *Salvia officinalis* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33 (4): 1103-1111.
- Bettaieb I, Zakhama N, Wannas WA, Kchouk M, Marzouk B, 2009. Water Deficit Effects on *Salvia officinalis* Fatty Acids and Essential Oils Composition. *Scientia Horticulturae*, 120 (2): 271-275.
- Bruce TJ, Matthes MC, Napier JA, Pickett JA, 2007. Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. *Plant Science*, 173 (6): 603-608.
- Büyük İ, Soydam-Aydın S, Aras S, 2012. Bitkilerin Stres Koşullarına Verdiği Moleküler Cevaplar. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, 69 (2).
- Castrillo M, Vizcaino D, Moreno E, Latorraca Z, 2005. Specific Leaf Mass, Fresh: Dry Weight Ratio, Sugar and Protein Contents in Species of Lamiaceae From Different Light Environments. *Revista De Biología Tropical*, 53 (1-2): 23-28.
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS, 2003. Understanding Plant Responses to Drought—From Genes to the Whole Plant. *Functional Plant Biology*, 30 (3): 239-264.
- Çamlıca M, Yıldız G, Özen F, Başol A, Aşkın H, 2019. Effects of Selenium Applications on Salt Stress in Sage and Mountain Tea. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7 (sp2): 29-35.
- Çulha Ş, Çakırlar H, 2011. Tuzluluğun Bitkiler Üzerine Etkileri ve Tuz Tolerans Mekanizmaları. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 11 (2): 11-34.
- Dall'Osto L, Lico C, Alric J, Giuliano G, Havaux M, Bassi R, 2006. Lutein is needed for efficient chlorophyll triplet quenching in the major LHClI antenna complex of higher plants and effective photoprotection in vivo under strong light. *BMC Plant Biology*, 6 (1): 32.
- Dolferus R, 2014. To grow or not to grow: a stressful decision for plants. *Plant Science*, 229: 247-261.
- Elmas S, Elmas O, 2021. *Salvia fruticosa*'nın (Anadolu Adaçayı) Terapötik Etkileri. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 4 (1-2): 114-137.
- Eroğlu İ, 2007. Tuz Stresinin Bazı Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Kültür Çeşitlerinde Tohum Çimlenmesi ve Fide Gelişimi Üzerine Etkileri. *Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış)*.
- Es-sbihi FZ, Hazzoumi Z, Joutei KA, 2020. Effect of salicylic acid foliar application on growth, glandular hairs and essential oil yield in *Salvia officinalis* L. grown under zinc stress. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 7 (1): 1-11.
- Falk J, Munné-Bosch S, 2010. Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *Journal of Experimental Botany*, 61 (6): 1549-1566.
- Foyer CH, Noctor G, 2000. Tansley review No. 112: oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytologist*, 146 (3): 359-388.
- Galis I, Gaquerel E, Pandey SP., Baldwin IT, 2009. Molecular mechanisms underlying plant memory in JA-mediated defence responses. *Plant, Cell & Environment*, 32(6): 617-627.
- García-Caparrós P, Romero MJ, Llanderal A, Cermeño P, Lao MT, Segura ML, 2019. Effects of Drought Stress on Biomass, Essential Oil Content, Nutritional Parameters, and Costs of Production in Six Lamiaceae species. *Water*, 11 (3): 573.
- Govahi M, Ghalavand A, Nadjafi F, Sorooshzadeh A, 2015. Comparing different soil fertility systems in Sage (*Salvia officinalis*) under water deficiency. *Industrial Crops and Products*, 74: 20-27.
- Graf A, Smith AM, 2011. Starch and the clock: the dark side of plant productivity. *Trends in Plant Science*, 16 (3): 169-175.
- Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babac M, 2012. A checklist of the Flora of Turkey (Vascular Plants). *Flora Dizisi*, 1:1290.
- Güneş A, Adak S, İnal A, Alpaslan M, Eraslan F, Çiçek N, Kayan N, Soylu B, 2006. Mercimek ve Nohut Bitkilerinde Kuraklığa Bağlı Oksidatif Stres ve Fizyolojik Tolerans Mekanizmalarının Belirlenmesi. *Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu*.
- Heil M, Baldwin I T, 2002. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science*, 7 (2):61-67.

- Hendawy S, Khalid KA, 2005. Response of Sage (*Salvia officinalis* L.) Plants to Zinc Application Under Different Salinity Levels. *J. Appl. Sci. Res* 1 (2): 147-155.
- Hernández I, Alegre L, Munné-Bosch S, 2004. Drought-induced changes in flavonoids and other low molecular weight antioxidants in *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. *Tree physiology*, 24 (11): 1303-1311.
- Ivanitskikh A, Tarakanov I, 2014. Effect of light spectral quality on essential oil components in *Ocimum basilicum* and *Salvia officinalis* plants. *International Journal of Secondary Metabolite*, 1 (1): 19.
- Jouyban Z, 2012. The effects of salt stress on plant growth. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences*, 2 (1): 7-10.
- Khan SA, Li MZ, Wang SM, Yin HJ, 2018. Revisiting the role of plant transcription factors in the battle against abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (6): 1634.
- Kılıç S, Bölükbaşı M, 2020. Phytochemical accumulation with photomorphogenesis and physiology of *Salvia officinalis* L. *Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus*, 19 (5): 101-113.
- Kulak M, Gul F, Sekeroglu N, 2020. Changes in growth parameter and essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves in response to various salt stresses. *Industrial Crops and Products*, 145: 112078.
- Kumlay AM, Eryiğit T, 2011. Bitkilerde büyüme ve gelişmeyi düzenleyici maddeler: bitki hormonları. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 1 (2): 47-56.
- Lakušić B, Ristić M, Slavkowska V, Stojanović D, Lakušić D, 2013. Variations in Essential Oil Yields and Compositions of *Salvia officinalis* (Lamiaceae) at Different Developmental Stages. *Botanica Serbica*, 37 (2): 127-139.
- Larcher W, 2000. Temperature stress and survival ability of Mediterranean sclerophyllous plants. *Plant biosystems*, 134 (3): 279-295.
- Lu Y, Foo LY, 2001. Antioxidant Activities of Polyphenols from Sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, 75 (2): 197-202.
- Mansori M, Farouk I, Hsissou D, El Kaoua M, 2019. Seaweed extract treatment enhances vegetative growth and antioxidant parameters in water stressed *Salvia officinalis* L. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 10 (8): 756-766.
- Mapes C, Xu Y, 2014. Photosynthesis, Vegetative Habit and Culinary Properties of Sage (*Salvia officinalis*) in Response to Low-Light Conditions. *Canadian Journal of Plant Science*, 94 (5): 881-889.
- Marchica A, Lorenzini G, Papini R, Bernardi R, Nali C, Pellegrini E, 2019. Signalling molecules responsive to ozone-induced oxidative stress in *Salvia officinalis*. *Science of The Total Environment*, 657: 568-576.
- Martínez-Natarén DA, Villalobos-Perera PA, Munguía-Rosas MA, 2018. Morphology and density of glandular trichomes of *Ocimum campechianum* and *Ruellia nudiflora* in contrasting light environments: A scanning electron microscopy study. *Flora*, 248: 28-33.
- Maxwell K, Johnson GN, 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51 (345): 659-668.
- McClung CR, 2008. Comes a time. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(5): 514-520.
- Miraj S, Kiani S, 2016. A Review Study of Therapeutic Effects of *Salvia officinalis* L. *Der Pharmacia Lettre*, 8 (6).
- Munné-Bosch S, Alegre L, 2000. Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta*, 210 (6): 925-931.
- Munné-Bosch S, Alegre L, 2004. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology*, 31 (3): 203-216.
- Munné-Bosch S, Mueller M, Schwarz K, Alegre L, 2001. Diterpenes and Antioxidative Protection in Drought-Stressed *Salvia officinalis* Plants. *Journal of Plant Physiology*, 158 (11): 1431-1437.
- Nowak M, Kleinwaechter M, Manderscheid R, Weigel HJ, Selmar D, 2010. Drought stress increases the accumulation of monoterpenes in sage (*Salvia officinalis*), an effect that is compensated by elevated carbon dioxide concentration. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 83 (2): 133-136.

- O'Leary N, Moroni P, 2016. Las especies de *Salvia* (Lamiaceae) para Argentina. *Darwiniana*, 4 (1):91-131.
- Osakabe Y, Osakabe K, Shinozaki K, Tran L-SP, 2014. Response of Plants to Water Stress. *Frontiers in Plant Science*, 5:86.
- Örs S, Ekinçi M, 2015. Kuraklık Stresi ve Bitki Fizyolojisi. *Derim*, 32 (2): 237-250.
- Öztürk NZ, 2015. Bitkilerin kuraklık stresine tepkilerinde bilinenler ve yeni yaklaşımlar. *Turkish Journal Of Agriculture-Food Science And Technology*, 3 (5): 307-315.
- Pellegrini E, Francini A, Lorenzini G, Nali C, 2015. Ecophysiological and antioxidant traits of *Salvia officinalis* under ozone stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 22 (17): 13083-13093.
- Peltzer D, Dreyer E, Polle A, 2002. Differential temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species: *Fagus sylvatica* and *Coleus blumei*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40 (2): 141-150.
- Rezai S, Etemadi N, Nikbakht A, Yousefi M, Majidi MM, 2018. Effect of Light Intensity on Leaf Morphology, Photosynthetic Capacity, and Chlorophyll Content in Sage (*Salvia officinalis* L.). *Horticultural Science and Technology*, 36 (1): 46-57.
- Rguez S, Msaada K, Daami-Remadi M, Chayeb I, Bettaieb Rebey I, Hammami M, Hamrouni-Sellami I, (2019). Chemical composition and biological activities of essential oils of *Salvia officinalis* aerial parts as affected by diurnal variations. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 153 (2): 264-272.
- Sahar K, Amin B, Taher NM, 2011. The salicylic acid effect on the *Salvia officinalis* L. sugar, protein and proline contents under salinity (NaCl) stress. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 7 (4).
- Said-Al Ahl H, Omer E, 2011. Medicinal and aromatic plants production under salt stress. A review. *Herba Polonica*, 57 (2).
- Selmar D, Kleinwächter M, 2013. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 42, 558-566.
- Sönmez Ç, 2015. Bitki-Su İlişkilerinin Tıbbi Adaçayı (*Salvia officinalis* L.)'nin Verim, Uçucu Yağ Üretimi ve Kalitesi Üzerine Etkileri: Biyometrik Ve Fizyolojik İncelemeler. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi (Basılmış).
- Taarit MB, Msaada K, Hosni K, Hammami M, Kchouk ME, Marzouk B, 2009. Plant Growth, Essential Oil Yield and Composition of Sage (*Salvia officinalis* L.) Fruits Cultivated Under Salt Stress Conditions. *Industrial Crops and Products*, 30 (3): 333-337.
- Taarit MB, Msaada K, Hosni K, Marzouk B, 2010. Changes in Fatty Acid and Essential Oil Composition of Sage (*Salvia Officinalis* L.) Leaves Under NaCl Stress. *Food Chemistry*, 119 (3): 951-956.
- Tiryaki İ, 2018. Bazı Tarla Bitkilerinin Tuz Stresine Gösterdikleri Adaptasyon Mekanizmaları. *Tarım ve Doğa Dergisi*, 21 (5): 800.
- Topçu G, 2006. Bioactive Triterpenoids from *Salvia* Species. *Journal of Natural Products*, 69 (3): 482-487.
- Torun H, 2019. Cobalt+ Salt-Stressed *Salvia officinalis*: ROS Scavenging Capacity and Antioxidant Potency. *International Journal of Secondary Metabolite*, 6 (1): 49-61.
- Tounekti T, Abreu ME, Khemira H, Munné-Bosch S, 2012. Canopy Position Determines the Photoprotective Demand and Antioxidant Protection of Leaves in Salt-Stressed *Salvia officinalis* L. *Plants. Environmental and Experimental Botany*, 78:146-156.
- Tounekti T, Hernández I, Müller M, Khemira H, Munné-Bosch S, 2011. Kinetin Applications Alleviate Salt Stress and Improve the Antioxidant Composition of Leaf Extracts in *Salvia officinalis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49 (10): 1165-1176.
- Tounekti T, Hernández I, Munné-Bosch S, 2013. Salicylic acid biosynthesis and role in modulating terpenoid and flavonoid metabolism in plant responses to abiotic stress. *Salicylic acid*. Springer, 141-162.
- TÜİK (2020): Dış Ticaret İstatistikleri.  
<https://biruni.tuik.gov.tr/disticaretapp/disticaret.zul?param1=25&param2=0&sitcrev=0&isicrev=0&sayac=5802>, (Erişim tarihi: 23.12. 2020).

- TÜİK (2021): Bitkisel Üretim İstatistikleri. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Bitkisel-Uretim-Istatistikleri-2020-33737>, (Erişim tarihi 25.02.2021).
- Valifard M, Mohsenzadeh S, Kholdebarin B, Rowshan V, 2014. Effects of salt stress on volatile compounds, total phenolic content and antioxidant activities of *Salvia mirzayanii*. South African Journal of Botany, 93: 92-97.
- Wang X, Cai J, Jiang D, Liu F, Dai T, Cao W, 2011. Pre-anthesis high-temperature acclimation alleviates damage to the flag leaf caused by post-anthesis heat stress in wheat. Journal of Plant Physiology, 168 (6): 585-593.
- Xu X Q, Beardall J, 1997. Effect of salinity on fatty acid composition of a green microalga from an antarctic hypersaline lake. Phytochemistry, 45 (4): 655-658.
- Yuan L, Liu X, Luo M, Yang S, Wu K, 2013. Involvement of Histone Modifications in Plant Abiotic Stress Responses. Journal of Integrative Plant Biology, 55 (10): 892-901.
- Yurdcu S, 2019. Bazı Tıbbi Adaçayı (*Salvia Officinalis* L.) Hatlarının Kuraklık Stresine Dayanıklılığının Belirlenmesi. Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış).
- Zervoudakis G, Salahas G, Kaspiris G, Konstantopoulou E, 2012. Influence of Light Intensity on Growth and Physiological Characteristics of Common Sage (*Salvia officinalis* L.). Brazilian Archives of Biology and Technology, 55 (1): 89-95.

**Atıf İçin:** Gümüş D, Gümüş F, 2021. Taguchi Deneysel Tasarım Yöntemi Kullanılarak Bromfenol Mavisi Biyosorpsiyonunun Modellenmesi ve Denge İzotermi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 960-968.

**To Cite:** Gümüş D, Gümüş F, 2021. Modeling of Bromphenol Blue Biosorption Using Taguchi Experimental Design Method and Equilibrium Isotherms. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 960-968.

### Taguchi Deneysel Tasarım Yöntemi Kullanılarak Bromfenol Mavisi Biyosorpsiyonunun Modellenmesi ve Denge İzotermi

Dilek GÜMÜŞ<sup>1\*</sup>, Fatih GÜMÜŞ<sup>2</sup>

**ÖZET:** Su ortamında boyaların varlığı, ekosistem kalitesini olumsuz etkilediği için küresel bir sorundur. Tehlikeli boyaların biyosorpsiyon yöntemiyle ayrılması düşük maliyetli ve etkili bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada *Fomes fomentarius* (L.) Fr. ve *Trametes versicolor* (L.) Lloyd biyosorbent olarak kullanılarak sulu çözeltiden Bromfenol Mavisinin giderimi çalışılmıştır. Taguchi deney tasarımında L<sub>9</sub> (3<sup>3</sup>) ortogonal dizi (OD) kullanılarak başlangıç pH değeri (2, 7, 12) başlangıç boya konsantrasyonu (25, 50, 75 mg L<sup>-1</sup>) ve temas süresi gibi (30, 150, 270 dk) kontrol edilebilir 3 faktör ve her faktörün 3 farklı seviyesinin biyosorpsiyon sürecindeki istatistiksel ilişkileri araştırılmış ve sistemin optimizasyonu yapılmıştır. Deneysel çalışmalar sonucunda parametrelerin optimum değerleri *F. fomentarius* ile biyosorpsiyonda temas süresi 270 dk, başlangıç pH değeri 2 ve başlangıç boya konsantrasyonu 50 mg L<sup>-1</sup>, *T. versicolor* ile biyosorpsiyonda temas süresi 150 dk, başlangıç pH değeri 2 ve başlangıç boya konsantrasyonu 50 mg L<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullardaki boya giderim verimleri *F. fomentarius* için %78.34, *T. versicolor* için %69.28 olarak bulunmuştur. Biyosorpsiyon izotermi Langmuir ve Freundlich denklemleri kullanılarak modellenmiştir. *F. fomentarius* ile yapılan deneylerde en iyi model uyumu Freundlich izotermi ile *T. versicolor* ile yapılan deneylerde en iyi uyum Langmuir izotermi ile sağlanmıştır. Giderim performansları göz önünde bulundurulduğunda her iki biyosorbentten de boya endüstrisi atıksularının gideriminde düşük maliyetli ve etkili biyosorbentler olarak değerlendirilebilecekleri sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Biyosorpsiyon, Bromfenol Mavisi, *Fomes fomentarius*, deney tasarımı, doğrusal olmayan izoterm, *Trametes versicolor*.

#### Modeling of Bromphenol Blue Biosorption Using Taguchi Experimental Design Method and Equilibrium Isotherms

**ABSTRACT:** The presence of dyes in the aquatic environment is a global problem because of the negative consequences on the ecosystem quality. Adsorption process is used as a low cost and effective method for removing hazardous dyes. This study investigated removal of Bromophenol Blue from aqueous solutions by *Fomes fomentarius* and *Trametes versicolor*. The statistical relationships of the parameters in the biosorption process by considering three controllable factors including initial pH value (2, 7, 12), initial dye concentration (25, 50, 75 mg L<sup>-1</sup>) and contact time (30, 150, 270 minutes) were investigated at three different levels and the biosorption process was optimized using Taguchi orthogonal array (L<sub>9</sub> OA) experimental design. As a result of experimental studies, the optimal dye removal conditions were determined as the contact time of 270 minutes, pH: 2 and initial Bromophenol Blue concentration of 50 mg L<sup>-1</sup> for *F. fomentarius*. The optimal dye removal conditions were determined as the contact time of 150 minutes, pH: 2 and initial Bromophenol Blue concentration of 50 mg L<sup>-1</sup> for *T. versicolor*. For *F. fomentarius* and *T. versicolor*, the removal efficiencies at optimum conditions were 78.34% and 69.28%, respectively. Biosorption isotherms were modeled using the Langmuir and Freundlich models. The biosorption of Bromophenol Blue on *F. fomentarius* and *T. versicolor* fitted better in the Freundlich and Langmuir models by non-linearized equations, respectively. Both biosorbents can be promising for dyes removal from aqueous environment.

**Keywords:** Biosorption, Bromophenol Blue, *Fomes fomentarius*, experimental design, non-linear isotherm, *Trametes versicolor*.

<sup>1</sup> Dilek GÜMÜŞ (Orcid ID: :0000-0001-7665-3057), Sinop Üniversitesi, Yapı İşleri ve Teknik Daire Başkanlığı, 57010 Sinop-Türkiye

<sup>2</sup> Fatih GÜMÜŞ (Orcid ID: 0000-0002-4660-7591), Sinop Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Bbiyoloji Bölümü, Sinop-Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Dilek GÜMÜŞ, e-mail: dilek.gumus@gmail.com

## GİRİŞ

Canlı yaşamı için hayati öneme sahip su kaynakları çeşitli endüstrilerin zararlı kimyasal atıklarını uygun şekilde bertaraf etmemesi neticesinde hızla kirlenmekte ve küresel çapta oluşacak su krizlerine de zemin hazırlamaktadır (Zare ve ark., 2018). Bu endüstriler arasında ticari boya kullanan tekstil, deri, kozmetik, gıda, baskı ve kağıt endüstrileri de yer almakta ve 100 000'den fazla ticari boya türü içeren renkli atıksu alıcı ortama deşarj edilmektedir (Katheresan ve ark., 2018). Boya endüstrisi atıksuları canlı organizmalar üzerindeki toksik etkilerinin yanı sıra çok düşük konsantrasyonlarda bile güneş ışığı ve oksijen girişini engelleyerek sucul sistemlerin fotosentetik faaliyetleri üzerinde ciddi hasara neden olabilmektedir. Üstelik boyalar karmaşık kimyasal yapılarından dolayı buldukları ortamda stabilitelelerini uzun süre koruyabilmektedirler (El-Gamal ve ark., 2015). Tüm bunlardan dolayı boya kullanan endüstrilerin atıksularını deşarj etmeden önce renklendirici maddeleri elimine etmeleri son derece önemlidir.

Boya endüstrisi atıksularının arıtılmasında adsorpsiyon, elektrokoagülasyon, membran filtrasyon, fotodegradasyon, ozonlama gibi birçok yöntem önerilmiştir (Seow ve Lim, 2016). Ancak tüm bu yöntemlerin çoğu maliyetli ve pratikte uygulanabilirlikleri sınırlıdır. Bu noktada adsorpsiyon işlemleri tasarım ve kullanım kolaylıklarının yanı sıra farklı karakterdeki boyaların giderimine elverişli olmaları ve nispeten daha düşük maliyetleri nedeniyle tercih sebebi olmuştur. Bu bağlamda sürdürülebilir ve doğa dostu biyosorbent araştırmaları halen popülerliğini yitirmemiştir.

Bu çalışmada biyosorbent olarak *Fomes fomentarius* ve *Trametes versicolor* makro mantarları kullanılarak başta tekstil endüstrisi olmak üzere birçok endüstride sıklıkla kullanılan bir boya türü olan Bromfenol Mavisi giderimi çalışılmıştır. Yerel olarak elde edilebilen mantar atıklarının doğal haliyle kullanılabilmesi, ucuz ve bol bulunabilir olması hem maliyet hem de sürdürülebilirlik açısından bir avantaj olarak görülmüş ve alternatif bir biyosorbent olabilecekleri girişimiyle araştırma yapılmıştır. Literatürde daha önce *F. fomentarius* ile Metilen Mavisi ve Rhodamine B boyalarıyla (Maurya ve ark., 2006) *T. versicolor* ile kadmiyum, kurşun gibi çeşitli ağır metaller ve boyalarla ilgili biyosorpsiyon çalışmaları yapılmış (Subbaiah ve ark., 2011) ancak Bromfenol Mavisi ile bu kapsamda bir çalışma yapılmamıştır.

Çalışmada pH, biyosorpsiyon süresi ve kirletici konsantrasyonu gibi en önemli parametrelerin giderim verimi üzerine etkileri araştırılmış ve Taguchi deneysel tasarım metodu kullanılarak proses optimizasyonu sağlanmıştır. İstatistiksel tekniklere dayanan deney tasarım yöntemlerinin kullanımının, sağlam tasarım çözümleri sunmanın yanı sıra maliyetleri düşürme ve kaliteyi iyileştirmede de avantajlar sağladığı bilinmektedir (Googerdchian ve ark., 2018). Deneysel veriler denge izoterm modelleri açısından da analiz edilerek değerlendirilmiş ve karşılaştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

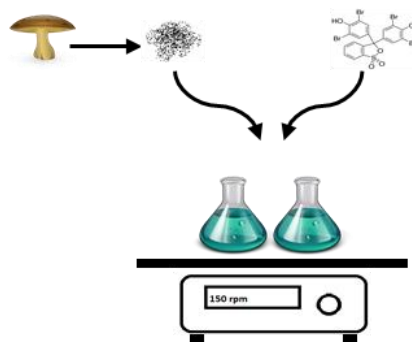
### Materyal

Çalışmada kullanılan aromatik boya Sigma (Aldrich) firmasından temin edilmiştir. Tüm kimyasallar analitik saflıktadır. Çift damıtılmış su ile stok boya çözeltisi ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) hazırlanmış ve karanlık koşullarda saklanmıştır. Çözeltilerin ilk pH'ları 0.1 N hidroklorik asit (HCl) ve 0.1 N sodyum hidroksit (NaOH) çözeltileriyle ayarlanmıştır. Çalışmada kullanılan biyosorbentler Sinop bölgesindeki ormanlık alandan toplanmıştır.

Mantarlar ilk önce distile su ile yıkanmış daha sonra  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tartıma gelene kadar kurutulmuştur. Kurutulan biyosorbentler Waring marka laboratuvar tipi öğütücüde öğütülerek standart bir elek yardımıyla  $250 \text{ }\mu\text{m}$  partikül boyutuna getirilmiştir. Kullanıma hazır olarak uygun bir cam şişede muhafaza edilmiştir.



Kesikli biyosorpsiyon deneyleri oda sıcaklığında 100 mL hacimli bir dizi erlenmeyer şişesine 50 mL boya çözeltisi ve ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) biyosorbent ilave edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Şişeler 150 rpm hızında periyodik olarak çalkalanmıştır. Biyosorpsiyondan sonra, biyosorbenti çözülden ayırmak için, çözelti santrifüjlenmiştir ve boya konsantrasyonu UV–visible spektrofotometre kullanılarak 433 nm’de ölçülmüştür (Zeroual ve ark., 2006). Boya çözeltisi için hazırlanan kalibrasyon eğrisi yardımıyla konsantrasyonlar hesaplanmıştır. Deneysel çalışmanın şematik gösterimi Şekil 1’de verilmiştir. Kirleticinin molekülleri ile biyosorbentin yüzeyi arasındaki etkileşimi tanımlayabilmek için denge verileri Langmuir ve Freundlich izoterm denklemleri kullanılarak MS Excel veri çözücü (solver) ile modellenmiş ve hata değerleri (SSE) programda hesaplanmıştır. Tutarlı ve tekrarlanabilir deneysel veriler elde edebilmek için deneysel çalışmalar iki tekrarlı yapılmış ve ortalama değerler kullanılmıştır.



Şekil 1. Deneysel çalışmanın şematik gösterimi

### Taguchi Deney Tasarımı

Taguchi deney tasarımı yöntemi en aza indirgenmiş deney sayısı ile optimize edilmiş en uygun parametre kombinasyonlarını belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (Googerdehian ve ark., 2018; Taguchi, 1990). Ortogonal dizilerden (OD) yararlanılan tasarım metodunda  $L_9$  ( $3^3$ ) OD kullanılmış pH, başlangıç boya konsantrasyonu ve biyosorpsiyon zamanı gibi kontrol edilebilir üç önemli faktörün etkisi incelenmiştir. Her faktör için üç farklı seviye belirlenmiştir. Bu belirlemeler yapılırken literatürde daha önce yapılan çalışmalar ve ön deneylerin sonuçları dikkate alınmıştır.

Deney planı Çizelge 1’de sunulmuştur. Bu plan doğrultusunda 9 farklı deney yapılmıştır (Çizelge 2). Tasarım yönteminde değerlendirme ölçütü sinyal/gürültü (S/N) faktörü oranıdır. Giderim performansı değerlendirilirken hedef maksimum giderim kapasitesi olduğu için “daha büyük daha iyidir” performans istatistiği tercih edilmiştir. Taguchi’nin ve önemli parametrelerin etkisi ve süreçteki katkısı varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Tasarım ve değerlendirme çalışmaları Minitab 17 istatistiksel yazılım programı ile yapılmıştır.

Çizelge 1. Tasarımının faktörleri ve seviyeleri

| Faktör               | Birim              | L <sub>1</sub> | L <sub>2</sub> | L <sub>3</sub> |
|----------------------|--------------------|----------------|----------------|----------------|
| Başlangıç pH değeri  |                    | 2              | 7              | 12             |
| Boya konsantrasyonu  | mg L <sup>-1</sup> | 25             | 50             | 75             |
| Biyosorpsiyon zamanı | dk                 | 30             | 150            | 270            |

Çizelge 2. Taguchi L<sub>9</sub> OD deneysel dizaynı

| Deney no | t (dk) | pH | C (mg L <sup>-1</sup> ) |
|----------|--------|----|-------------------------|
| 1        | 30     | 2  | 25                      |
| 2        | 30     | 7  | 50                      |
| 3        | 30     | 12 | 75                      |
| 4        | 150    | 2  | 50                      |
| 5        | 150    | 7  | 75                      |
| 6        | 150    | 12 | 25                      |
| 7        | 270    | 2  | 75                      |
| 8        | 270    | 7  | 25                      |
| 9        | 270    | 12 | 50                      |

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Taguchi Deney Tasarımı Yöntemi ile Biyosorpsiyon Prosesinin Optimizasyonu

Biyosorbentlerin boya giderme verimliliği (%) materyalin Taguchi L<sub>9</sub> OD yaklaşımında bir performans parametresi olarak seçilmiş ve elde edilen yanıt verileri S/N oranına dönüştürülmüştür (daha büyük daha iyidir). Boya giderimi yüzdeleri (% giderim) ve S/N oranları *F. fomentarius* ve *T. versicolor* için sırasıyla Çizelge 3 ve Çizelge 4’te verilmiştir. Önemli parametrelerin etkisi ve süreçteki katkısı varyans analizi ile değerlendirilmiştir.

Çizelge 3. *F. fomentarius* ile biyosorpsiyon prosesinde Taguchi L<sub>9</sub> OD deneysel tasarımında boya giderimi yüzdeleri ve S/N oranları

| No | t (dk) | pH | C (mg L <sup>-1</sup> ) | % giderim | S/N   |
|----|--------|----|-------------------------|-----------|-------|
| 1  | 30     | 2  | 25                      | 44.75     | 33.01 |
| 2  | 30     | 7  | 50                      | 9.56      | 19.61 |
| 3  | 30     | 12 | 75                      | 1.07      | 0.57  |
| 4  | 150    | 2  | 50                      | 82.20     | 38.30 |
| 5  | 150    | 7  | 75                      | 9.71      | 19.75 |
| 6  | 150    | 12 | 25                      | 3.09      | 9.80  |
| 7  | 270    | 2  | 75                      | 75.66     | 37.58 |
| 8  | 270    | 7  | 25                      | 10.6      | 20.50 |
| 9  | 270    | 12 | 50                      | 5.42      | 14.68 |

Çizelge 4. *T. versicolor* ile biyosorpsiyon prosesinde Taguchi L<sub>9</sub> OD deneysel tasarımında boya giderimi yüzdeleri ve S/N oranları

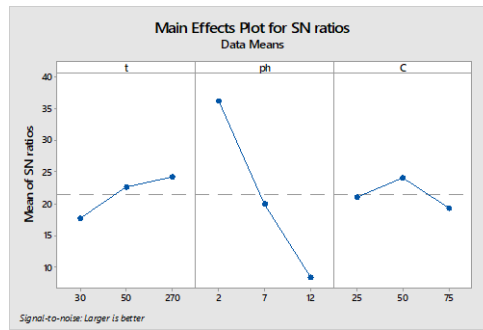
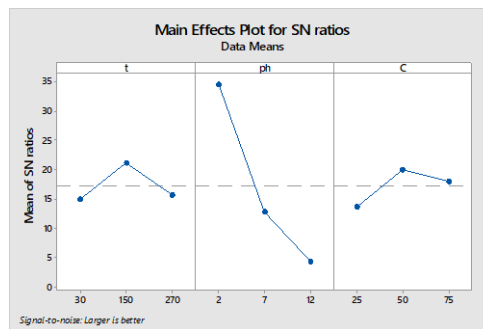
| No | t (dk) | pH | C (mg L <sup>-1</sup> ) | % giderim | S/N   |
|----|--------|----|-------------------------|-----------|-------|
| 1  | 30     | 2  | 25                      | 31.65     | 30.01 |
| 2  | 30     | 7  | 50                      | 6.71      | 16.53 |
| 3  | 30     | 12 | 75                      | 0.82      | -1.72 |
| 4  | 150    | 2  | 50                      | 69.28     | 36.81 |
| 5  | 150    | 7  | 75                      | 8.69      | 18.78 |
| 6  | 150    | 12 | 25                      | 2.46      | 7.82  |
| 7  | 270    | 2  | 75                      | 68.82     | 36.75 |
| 8  | 270    | 7  | 25                      | 1.45      | 3.23  |
| 9  | 270    | 12 | 50                      | 2.21      | 6.89  |

**Çizelge 5.** *F. fomentarius* ile biyosorpsiyon prosesinde boya gideriminde ANOVA çalışmasının sonuçları

| kaynak | df | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS  | F     | P     |
|--------|----|---------|---------|---------|-------|-------|
| t (dk) | 2  | 68.94   | 68.94   | 34.47   | 5.06  | 0.165 |
| pH     | 2  | 1182.33 | 1182.33 | 591.167 | 86.75 | 0.011 |
| C      | 2  | 36.73   | 36.73   | 18.364  | 2.69  | 0.271 |
| hata   | 2  | 13.63   | 13.63   | 6.815   | -     | -     |
| toplam | 8  | 1301.63 | -       | -       | -     | -     |

**Çizelge 6.** *T. versicolor* ile biyosorpsiyon prosesinde boya gideriminde ANOVA çalışmasının sonuçları

| Kaynak | df | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS  | F     | p     |
|--------|----|---------|---------|---------|-------|-------|
| t (dk) | 2  | 16.33   | 16.33   | 8.163   | 0.23  | 0.811 |
| pH     | 2  | 1949.68 | 1949.68 | 974.842 | 27.83 | 0.035 |
| C      | 2  | 412.23  | 412.23  | 206.115 | 5.88  | 0.145 |
| Hata   | 2  | 70.06   | 70.06   | 35.031  | -     | -     |
| Toplam | 8  | 2448.30 | -       | -       | -     | -     |

**Şekil 2.** *F. fomentarius* ile biyosorpsiyon prosesi optimizasyonunda parametrelerin etkileri**Şekil 3.** *T. versicolor* ile biyosorpsiyon prosesi optimizasyonunda parametrelerin etkileri

En yüksek yanıt değeri her değişkenin en iyi seviyesini belirlemiştir ve çalışılan parametreler arasında optimum olarak yorumlanmış ve seçilmiştir. Şekil 2 ve 3 incelendiğinde *F.fomentarius* için zamanda en iyi yanıt 3. seviye olan 270 dk, başlangıç pH değeri için 1. seviye olan 2 ve başlangıç boya konsantrasyonu için 2. seviye olan 50 mg L<sup>-1</sup> belirlenmiştir. *T. versicolor* için zamanda en iyi yanıt 2. seviye olan 150 dk, başlangıç pH değeri için 1. seviye olan 2 ve başlangıç boya konsantrasyonu için 2.

seviye olan  $50 \text{ mg L}^{-1}$  belirlenmiştir. Çizelge 5 ve 6'da verilen ANOVA sonuçlarından hesaplanan F ve p değerleri doğrultusunda başlangıç pH değerlerinin ( $p < 0.05$  olduğu için) biyosorpsiyonda istatistiksel olarak anlamlı ve etkili bir parametre olduğu söylenebilir. Analiz sonucunda *F. fomentarius* ile biyosorpsiyonda 270 dk sonunda, başlangıç pH değeri 2 ve  $50 \text{ mg L}^{-1}$  başlangıç boya konsantrasyonu koşullarında %76.7 giderim, 41.68 (S/N) oranı ve *T. versicolor* ile biyosorpsiyonda 150 dk sonunda, başlangıç pH değeri 2 ve  $50 \text{ mg L}^{-1}$  başlangıç boya konsantrasyonu koşullarında %66.77 giderim 41.27 (S/N) oranı belirlenmiştir. Belirlenen koşullar için yapılan doğrulama deneylerinde *F. fomentarius* ile biyosorpsiyonda %78.34 boya giderimi ve *T. versicolor* ile biyosorpsiyonda %69.28 boya giderimi edilmiştir. Elde edilen değerlerin birbirleri ile tutarlı olması modelin parametrelerin etkisini açıklamada oldukça başarılı olduğunun göstergesidir.

Her iki biyosorbent için de düşük pH değerinde çok daha iyi sonuçlar elde edilebileceği görülmüştür. Boyanın kimyasal yapısına da bağlı olarak çözelti pH'sı düştüğünde  $\text{H}^+$  iyonları artışıyla boyanın adsorplanma kabiliyetinde artış olmuştur. Benzer bulgulardan literatürde bahsedilmektedir. Bromfenol Mavisi giderimi için mantar biyokütlesi ile adsorpsiyonda ve grafen oksit fonksiyonlu manyetik kitosan kompozit ile adsorpsiyonda maksimum giderimler asidik pH (2) değerinde olmuştur (Zeroual ve ark., 2006; Sohni ve ark., 2018). Boyanın asidik pH'da alımının artması, biyosorbent ve boya arasındaki elektrostatik etkileşimler açısından açıklanabilir. Azalan pH ile biyosorbentte fazlaca zayıf baz grubu protonlanır ve net bir pozitif yük elde edilir. Bu yüklü bölgeler, Bromfenol Mavisi boyası gibi anyonik gruplara bağlanmak için kullanılabilir hale gelir. Hidrojen iyonları ayrıca biyosorbent ile boya molekülü arasında bir köprü ligandı olarak işlev görür (Zeroual ve ark., 2006). Mantar hücre duvarı, boya moleküllerini bağlayabilen çeşitli fonksiyonel gruplarla (amino, karboksil, tiol ve fosfat grupları gibi) polisakkaritler (kitin ve kitosan), proteinler, lipitler ve melaninden oluşmaktadır. Ayrıca mantar biyokütlesi pürüzlü ve gözenekli bir yüzeye sahiptir. Bu yüzey özelliği, toplam yüzey alanında artış sağlayan bir faktör olarak düşünülmektedir (Bayramoğlu ve Arıca, 2007).

### Biyosorpsiyon Prosesinin İzoterm Modellemesi

Biyosorpsiyon sisteminin denge verileri Freundlich (1906) ve Langmuir (1918) izotermleri kullanılarak modellenmiştir. Deneyler, Taguchi tasarımı kullanılarak belirlenen parametrelerin optimum seviyesi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *F. fomentarius* için 270 dk ve başlangıç pH değeri 2 ile *T. versicolor* için 150 dk ve başlangıç pH değeri 2 olarak başlangıç konsantrasyon 25, 50 ve  $75 \text{ mg L}^{-1}$  olarak değişen oranlarda çalışılmıştır.

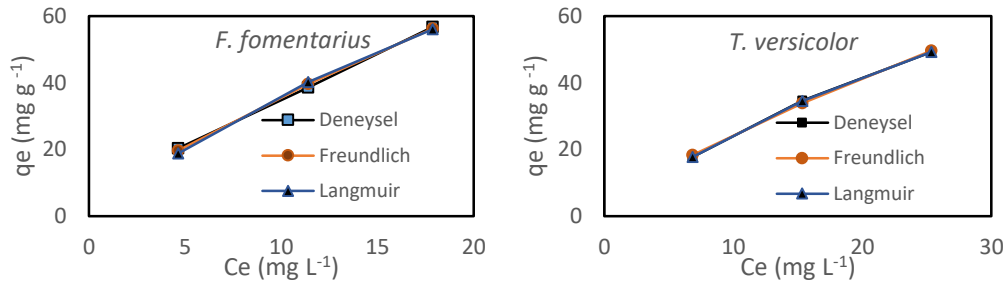
$$\text{Freundlich} \quad qe = K_F C_e^{1/n_F} \quad (1)$$

$$\text{Langmuir} \quad qe = \frac{q_m K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (2)$$

$q_e$  ve  $q_m$  denge ve maksimum biyosorpsiyon kapasiteleri ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $K_F$ ,  $n_F$  ve  $K_L$  Freundlich ve Langmuir model sabitleri ve  $C_e$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) kirletici konsantrasyonudur. Lineer olmayan model denklemleriyle hesaplanan biyosorpsiyon kapasiteleri Çizelge 7'de verilmiştir. En küçük hata değeri ve en yüksek  $R^2$  değeri en uygun modeli belirlemiştir. Her iki modelde de yüksek  $R^2$  değeri ile uyum elde edilmiştir. *F. fomentarius* ile yapılan deneylerde en iyi model uyumu Freundlich izoterminde sağlanırken *T. versicolor* ile yapılan deneylerde en iyi uyum en düşük hata değeri ile Langmuir izotermi ile sağlanmıştır. Langmuir denklemiyle maksimum biyosorpsiyon kapasitesi *F. fomentarius* için  $182.23 \text{ mg g}^{-1}$ , *T. versicolor* için  $142.33 \text{ mg g}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Langmuir ve Freundlich lineer olmayan izoterm denklemleri ile modelleme uyumu Şekil 4'te gösterilmiştir.

Çizelge 7. Model parametreleri

| Model parametreleri  | <i>F. fomentarius</i> | <i>T. versicolor</i> |
|--|-----------------------|----------------------|
| <b>Freundlich izoterm modeli</b>                           |                       |                      |
| $K_F$ ( $\text{mg}^{1-1/n} \text{L}^{1/n} \text{g}^{-1}$ ) | 5.94                  | 4.24                 |
| $1/n_F$  | 0.779                 | 0.761                |
| Hata (SSE)   | 1.67                  | 1.026                |
| $R^2$  | 0.9975                | 0.9999               |
| <b>Langmuir izoterm modeli</b>                             |                       |                      |
| $q_m$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )                               | 182.23                | 142.33               |
| $K_L$ ( $\text{L mg}^{-1}$ )                               | 0.0249                | 0.021                |
| $R_L$  | (0.35-0.62)           | (0.39-0.66)          |
| Hata (SSE)   | 5.26                  | 0.008                |
| $R^2$  | 0.9931                | 0.9971               |



Şekil 4. Langmuir ve Freundlich lineer olmayan izoterm denklemleri ile modelleme

### Karşılaştırma Çalışması

Literatürde yer alan çeşitli adsorbanların Bromfenol Mavisi giderim kapasitelerinin karşılaştırılması Çizelge 8'de verilmiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan biyosorbentlerin doğrusal olmayan Langmuir model denklemleriyle hesaplanan maksimum giderim kapasiteleri de hesaplanarak çizelgede sunulmuştur. Her iki biyosorbent de Bromfenol Mavisi gideriminde literatürdeki birçok adsorbana göre yüksek bir adsorplama kabiliyeti sergilemiştir.

Çizelge 8. Çeşitli adsorbanların Bromfenol Mavisi giderme kapasitelerinin karşılaştırılması

| ( $q_{max}$ ) ( $\text{mg g}^{-1}$ ) | Adsorbent                  | Referans                    |
|--------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 30.32                                | Nano CuO                   | Rashad ve Al-Aoh 2019       |
| 22.72                                | $\alpha$ -chitin           | Dhananasekaran ve ark.,2016 |
| 1.89                                 | Aktif karbon               | Dada ve ark., 2012          |
| 182.23                               | <i>Fomes fomentarius</i>   | Bu çalışma                  |
| 142.33                               | <i>Trametes versicolor</i> | Bu çalışma                  |

### SONUÇ

Bu çalışmada kolay erişilebilir ve çevre dostu sorbentler olan *F. fomentarius* ve *T. versicolor* kullanılarak sulu çözeltiden Bromfenol Mavisi giderimi çalışılmıştır. Biyosorpsiyon için optimum koşullar Taguchi yöntemi ile tasarlanmış ve deneysel olarak belirlenmiştir. Analiz sonucunda *F. fomentarius* ile 270 dk sonunda, başlangıç pH değeri 2 ve başlangıç boya konsantrasyonu  $50 \text{ mg L}^{-1}$  koşullarında %76.7 giderim verimi, 41.68 (S/N) oranı ve *T. versicolor* ile 150 dk sonunda, başlangıç pH değeri 2 ve başlangıç boya konsantrasyonu  $50 \text{ mg L}^{-1}$  koşullarında %66.77 giderim verimi, 41.27 (S/N) oranı belirlenmiştir. Belirlenen koşullar için yapılan doğrulama deneylerinde *F. fomentarius* ile

biyosorpsiyonda %78.34 boya giderim verimi ve *T. versicolor* ile biyosorpsiyonda %69.28 boya giderim verimi elde edilmiştir. Denge izotermi Langmuir ve Freundlich izoterm denklemleri kullanılarak modellenmiştir. *F. fomentarius* ile yapılan deneyler Freundlich izotermi ile *T. versicolor* ile yapılan deneyler Langmuir izotermi ile daha iyi uyum sağlamıştır. Elde edilen sonuçlar ışığında deneysel tahminler ve doğrulama sonuçları birbirine çok yakın değerler olduğu için Taguchi ( $L_9 (3^3)$  OD) deney tasarımının boya endüstrisi atıksularının arıtımında biyosorpsiyon prosesi tasarımında kullanılması önerilmektedir. Bununla birlikte *Fomes fomentarius* ve *Trametes versicolor*'un literatürdeki çoğu adsorbente kıyasla oldukça yüksek boya giderim kapasitesi sergilediği belirlenmiştir.

### Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

### Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

### KAYNAKLAR

- Bayramoğlu G, Arıca MY, 2007. Biosorption of benzidine based textile dyes Direct Blue 1 and Direct Red 128 using native and heat-treated biomass of *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials*, 143, 1-2, 135-143.
- Dada AO, Inyinbor AA, Oluyori AP, 2012. Comparative adsorption of dyes onto activated carbon prepared from maize stems and sugar cane stems. *Journal of Applied Chemistry*, 2: 38-43.
- Dhananasekaran S, Palanivel R, Pappu S, 2016. Adsorption of methylene blue, bromophenol blue, and coomassie brilliant blue by  $\alpha$ -chitin nanoparticles. *Journal of advanced research*, 7: 113-124.
- El-Gamal SMA, Amin MS, Ahmed MA, 2015. Removal of methyl orange and bromophenol blue dyes from aqueous solution using Sorel's cement nanoparticles. *Journal of environmental chemical engineering*, 3(3): 1702-1712.
- Freundlich H, 1906. Over the adsorption in solution. *Zeitschrift für physikalische Chemie*. 57: 385-470.
- Googerdchian F, Moheb A, Emadi R, Asgari M, 2018. Optimization of Pb (II) ions adsorption on nanohydroxyapatite adsorbents by applying Taguchi method. *Journal of hazardous materials*, 349: 186-194.
- Katheresan V, Kansedo J, Lau SY, 2018. Efficiency of various recent wastewater dye removal methods: a review. *Journal of environmental chemical engineering*, 6(4): 4676-4697.
- Langmuir I, 1918. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of the American Chemical society*. 40(9): 1361-1403.
- Maurya NS, Mittal AK, Cornel P, Rother E, 2006. Biosorption of dyes using dead macro fungi: effect of dye structure, ionic strength and pH. *Bioresource technology*, 97(3): 512-521.
- Rashad M, Al-Aoh, HA, 2019. Promising adsorption studies of bromophenol blue using copper oxide nanoparticles. *Desalination and Water Treatment*, 139: 360-368.
- Seow TW, Lim CK, 2016. Removal of dye by adsorption: a review. *International Journal of Applied Engineering Research*, 11(4): 2675-2679.
- Sohni S, Gul K, Ahmad F, Ahmad I, Khan A, Khan N, Bahadar Khan S, 2018. Highly efficient removal of acid red-17 and bromophenol blue dyes from industrial wastewater using graphene oxide functionalized magnetic chitosan composite. *Polymer Composites*, 39(9): 3317-3328.
- Subbaiah MV, Yuvaraja G, Vijaya Y, Krishnaiah A, 2011. Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies on biosorption of Pb (II) and Cd (II) from aqueous solution by fungus (*Trametes versicolor*) biomass. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(6): 965-971.
- Taguchi G, 1990. *Introduction to Quality Engineering*. McGraw-Hill, New York, USA.

Zare EN, Motahari A, Sillanpää M, 2018. Nanoadsorbents based on conducting polymer nanocomposites with main focus on polyaniline and its derivatives for removal of heavy metal ions/dyes: a review. *Environmental research*, 162: 173-195. 3.

Zeroual Y, Kim BS, Kim CS, Blaghen M, Lee KM, 2006. Biosorption of bromophenol blue from aqueous solutions by *Rhizopus stolonifer* biomass. *Water, air, and soil pollution*, 177(1-4): 135-146.

## GIS and Multicriteria Decision Analysis for Landfill Site Selection in Edirne Province, Turkey

Azem KURU<sup>1</sup>, Ezgi TOK<sup>1</sup>, Merve GUROGLU AGDAS<sup>1</sup>, Hacer Handan DEMİR<sup>2</sup>,  
Hüseyin Kurtulus OZCAN<sup>3</sup>, Goksel DEMİR<sup>4</sup>

**ABSTRACT:** A sustainable solid waste management system planning is a complex and interdisciplinary subject, which requires considering technical, environmental, economic, and social factors. Landfills play an essential role in solid waste management strategies, and landfilling is an extensively accepted preference for the clearance of solid waste worldwide. Site selection of landfill facilities can be a considerable problem as all infrastructural projects can deteriorate the ecology of the site on which they are developed because of changing land uses, loss of habitats, and displacement of fauna. These effects are mainly specific for location and need to be evaluated on every example. Landfill site selection is related to certain factors and limitations defined by natural and artificial thresholds and/or legislation. Legal provisions may vary according to the country's policy and even to the provincial policies. In addition to these features of study zones or sites, landfill site selection methods may have different criteria and sub-criteria in identifying parameters. This paper aims to identify landfill site(s) multicriteria decision analysis depending on Edirne's environmentally sensitive areas by using the Geographic Information System (GIS) technique. Data of land use, geologic features, protected areas, natural and archeological sites, transportation network, hydrological data, soil suitability for agricultural activities, and land capability classes which have been acquired from the relevant public authorities were used to proposed model. Regional factors were identified and assessed according to the risk of contamination for environmental components such as natural resources, sensitive ecosystems, and unique habitats. The chosen criteria were graded in this context, and alternative landfill sites were proposed by applying GIS-based analysis. According to the analysis, the northern subprovince of the study area, Lalapasa, has the most appropriate landfill sites.

**Keywords:** Landfill, Site Selection, GIS, Multi Criteria Decision Analysis, Edirne

<sup>1</sup> Azem KURU ([Orcid ID: 0000-0002-3239-1179](https://orcid.org/0000-0002-3239-1179)), Ezgi TOK ([Orcid ID: 0000-0002-0427-5904](https://orcid.org/0000-0002-0427-5904)), Merve GUROGLU AĞDAŞ ([Orcid ID: 0000-0003-4416-0842](https://orcid.org/0000-0003-4416-0842)), Kırklareli University, Faculty of Architecture, Department Urban and Regional Planning, Kayali Campus, 39100, Kırklareli, Turkey

<sup>2</sup> Hacer Handan DEMİR ([Orcid ID: 0000-0001-6157-9181](https://orcid.org/0000-0001-6157-9181)), Istanbul Gelişim University, School of Applied Science Department of Logistics, 34310, Avcılar, Istanbul, Turkey

<sup>3</sup> Hüseyin Kurtulus OZCAN ([Orcid ID: 0000-0002-9810-3985](https://orcid.org/0000-0002-9810-3985)) University-Cerrahpasa, Engineering Faculty, Department of Environmental Engineering, 34320 Avcılar, Istanbul, Turkey

<sup>4</sup> Goksel DEMİR ([Orcid ID: 0000-0002-7815-1197](https://orcid.org/0000-0002-7815-1197)) Health Sciences University, Turkey, Department of Occupational Health and Safety Department, 34668 Uskudar, Turkey

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Hüseyin Kurtuluş Özcan e-mail: [hkozcan@istanbul.edu.tr](mailto:hkozcan@istanbul.edu.tr)



## INTRODUCTION

The population growth in urban areas boosts consumption per capita, which results in waste production. The natural environment and public health are under the pressure of waste production. Therefore, waste management is a vital requirement to maintain a sustainable environment and reduce the negative effects of wastes on the environment and public health (Di Vaio et al., 2019). A landfill is an engineered technic for disposing of waste in specially built and preserved bodies on the land surface or in excavations into the land surface. Within the landfill, biological, chemical, and physical processes occur, and they promote the degradation of wastes and result in the formation of leachate and gases. Landfills play an essential role in waste management strategies, and landfilling is a feasible and commonly accepted solution for the disposal of solid waste worldwide and in Turkey (Vaverková et al., 2019). Site selection of waste management facilities can be a significant issue, as all infrastructural projects can damage the site's ecology. They are developed, causing landscape changes, loss of habitats, and displacement of fauna. Such impacts are generally site-specific and need to be assessed on a case-by-case basis (Danthurebandara et al., 2012). During the process of site selection, an environmental impact assessment should be done so that the optimum solution that provides the lowest cost and promotes the lowest range in ecological impact risk assessment is accomplished (Beskese et al., 2015)

Landfill site selection is related to specific factors and limitations defined by natural and artificial thresholds and legislation. Legal provisions may vary according to the country's policy and even to the provincial policies. In addition to these features of study zones or sites, landfill site selection methods may have different criteria and sub-criteria in identifying parameters (Wang et al., 2018). Consequently, various researches have different factors and limitations depending on the characteristics of the study sites, governmental policies, and socio-economic structure. In this context, potential/non-potential lands are determined for landfill site selection according to national and international legislation and suitability criteria. In this study criteria were grouped into four categories as follows: Natural, Morphological, Environmental, Public Health and Socio-economic criteria. Suitable landfill site selection analyses require processing a large amount of spatial data, which involve complicated factors and strict regulations. However, within these criteria, these parameters may vary according to the subjective case of the study area (Ball, 2005; Sener et al., 2006; Guiqin et al., 2009; Sener et al., 2010; Donevska et al., 2012).

Multicriteria evaluation for landfill site selection is difficult and time-consuming using traditional methods. In such studies, Geographical Information Systems (GIS) serve the multicriteria analysis function to evaluate complicated and various parameters on location selection and provide different scenarios. In addition, GIS allows accurate and precise results for site selection of landfill (Sadek et al., 2006; Moeinaddini et al., 2010; Nazari et al., 2011; Gorsevski et al., 2012; Khan et al., 2019). GIS is an integrative approach to solve complex planning and management problems efficiently by using spatial querying, spatial analysis, decision analysis, model analysis, visualization, and intelligent map functions (Lunkapis et al., 2002; Vatalis and Manoladis, 2002; Sadek et al., 2006; Akbari et al., 2008; Baskurt and Aydin 2018). Therefore, GIS are utilized in many applications, including spatial data analysis such as identification, monitoring, evaluation and optimization of landfill site selection processes (Sadek et al., 2006; Ersoy and Bulut, 2009; Nas et al., 2010; Vasilyevic et al., 2012; Alavi et al., 2013; Chicherin et al., 2018; Ali et al., 2019). Nas et al. (2010) has conducted a GIS-based site selection for municipal solid waste in Konya. Land cover map and land slope map of the study area, proximity to transportation facilities, wells, archaeological sites and urban areas are the factors used. Sener et al. (2011) select the most proper locations for a landfill in Uluborlu Basin of Isparta by using GIS environment. Lithology,

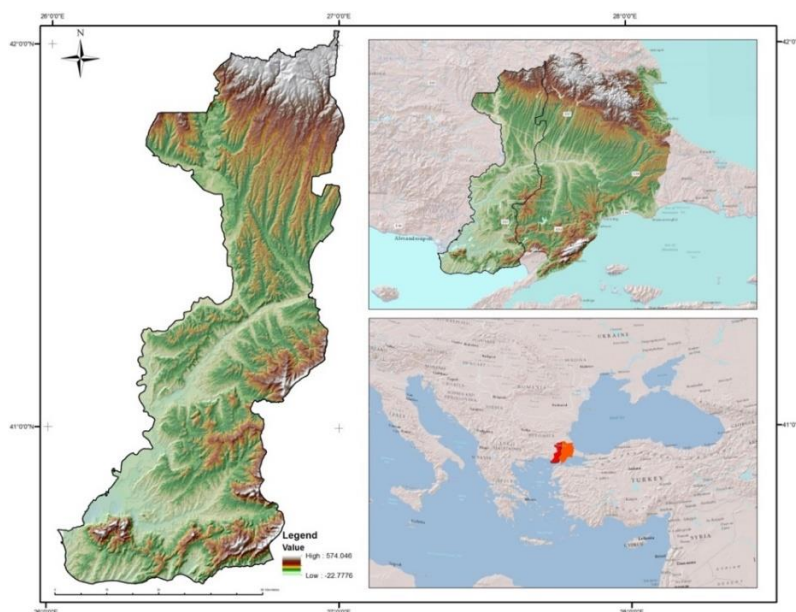
surface water, groundwater depth, elevation, slope, aspect, land use, aquifer, and proximity to roads are the mainly used criteria for the process. Arkoc (2014), performing a series of analyses for choosing municipal solid waste landfills in the study area of Corlu, the subdistrict of Tekirdag by using factors consist of geological and natural, environmental, social, and economical. GIS based overlay analysis and graduation methods used in the study. Sener et al. (2011) has chosen sites for a landfill in the study area of Beysehir Lake Catchment area with the help of multicriteria decision analysis and GIS applications. Proximity to settlements and roads, water bodies, protected areas; geology and hydrogeology, land use, aspect, and slope are the main criteria. Celiker et al. (2019) has conducted a landfill site selection process by using GIS and multicriteria decision method in Elazig, Turkey. They consider nine different criteria: proximity to transportation network, residential areas, streams, wells; geology, aspect, slope, land use, and land capability classification. Bilgilioglu and Bilgilioglu (2017) select suitable sites for landfill for Aksaray, Turkey, by using analytical hierarchy process and GIS. They use mainly the same criteria as before explained.

This paper aims to identify landfill site(s) multicriteria decision analysis depending on environmentally sensitive areas in Edirne by using the GIS technique. Regional factors were identified and assessed according to the risk of contamination for environmental components such as natural resources, sensitive ecosystems, and unique habitats. The chosen criteria were graded in this context, and alternative landfill sites were proposed by applying GIS-based analysis.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Area

The city of Edirne is located in the Thrace part of the Marmara Region in northwestern Turkey on the south coast of the Aegean Sea at an altitude of 41 meters above sea level. The province has 88 kilometers of land border with Bulgaria in the west and has 204 kilometers of land border with Greece in the southwest (Figure 1). It has a total population of 401 701 with 6276 km<sup>2</sup> surfaces. Continental climate zone covers the region (EUPDE, 2015).



**Figure 1.** Location of Study Area

Eighty percent of the provincial land is suitable for agriculture in the study area and surrounds Ergene and Maritza Plains. Most of the local land is comprised of class I., II., and III. soils with respect to the land capability classification system. Therefore provincial land is considered prime agricultural

land due to the Soil Protection and Land Use Law (Soil Protection and Land Use Law, 2005). The selected study area also has significant underground and surface water resources such as Maritza, Tunca, and Ergene rivers. Conservation statutes cover up to 38.60 % of the overall protected areas in the region of Thrace. Also, the study area has 40 % of Urban and Historical Conservation Areas in Thrace: Gala Lake National Park (6087 ha), Gökçetepe National Park (50 ha), Danişment National Park (13.19 ha), and Wild Life Protection Area of Mount Koru areas. In the Gala Lake National Park, 163 bird species, 16 fish species, and 300 plant species have been identified, of which 5 are endemic plant species. The Maritza delta consists of the most sensitive ecosystems in the region, which encompasses the Gala Lake National Park (EUPDE, 2015).

The population growth rate is slow in the Edirne district (Figure 2). Most of the population lives in urban areas. Population growth rate directly increases waste production, while inappropriate landfill site selection can cause various environmental problems. The unsuitable landfill site selection has a negative impact on the city's natural resources and has a socio-economic cost. There is an urgent need for landfill site selection in the city to conserve ecological balance and sustainable solid waste management. According to national statistical data, a total of 200 000 tonnes of municipal solid waste was generated and collected yearly. The average amount of municipal waste per capita per day was 1.81 kg for the study area (TUIK, 2014).

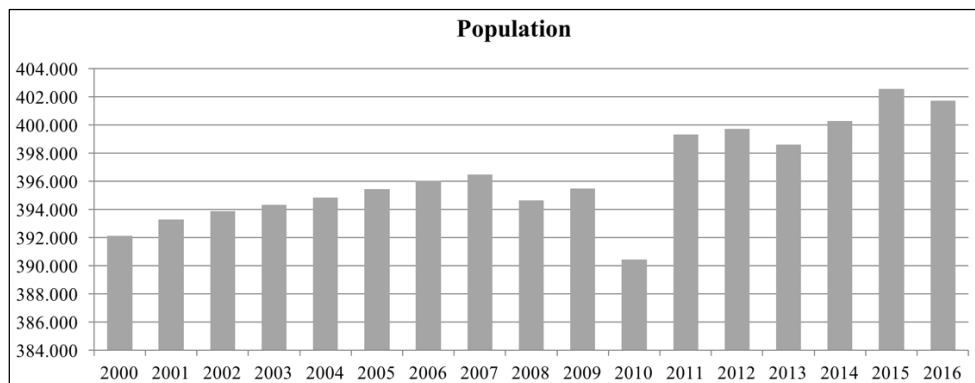


Figure 2. Yearly population of study site (TUIK, 2017)

## Methods

The location selection of a new landfill area is closely related to various socio-economic and environmental aspects, such as soil science, hydrology, geology, topography, and land use. These parameters vary according to the characteristics of the study area. The first step for the study includes identifying the assessment criteria and sub-criteria in accordance with regional characteristics for use in multi-criteria decision analysis. The second step is the designation of grading values for the criteria and the sub-criteria due to the relative importance and determining the potential/non-potential areas regarding their suitability grades (Figure 3: Suitability Analysis).

In the study, the multiple-criteria ranking approach was applied for assigning scores to each identified criterion to measure the performance of the alternatives on these criteria. Environmental factors especially provide a quantitative assessment of the potential risks between a landfill area and its environment because of the siting of the landfill area.

The main criteria are selected based on the literature review explained in the introduction part of the paper and expert knowledge. Selected criteria are compiled from a comprehensive review of related literature, guidelines, researches, and legislation on landfill site selection (Figure 3. Parameter

Definition). Parameters include slope, soil erosion, urban-industrial area, surface water, road network, forest, agricultural lands, environmentally protected areas, geology, and other aspects. Collected data are utilized in the study was shown in Table 1.

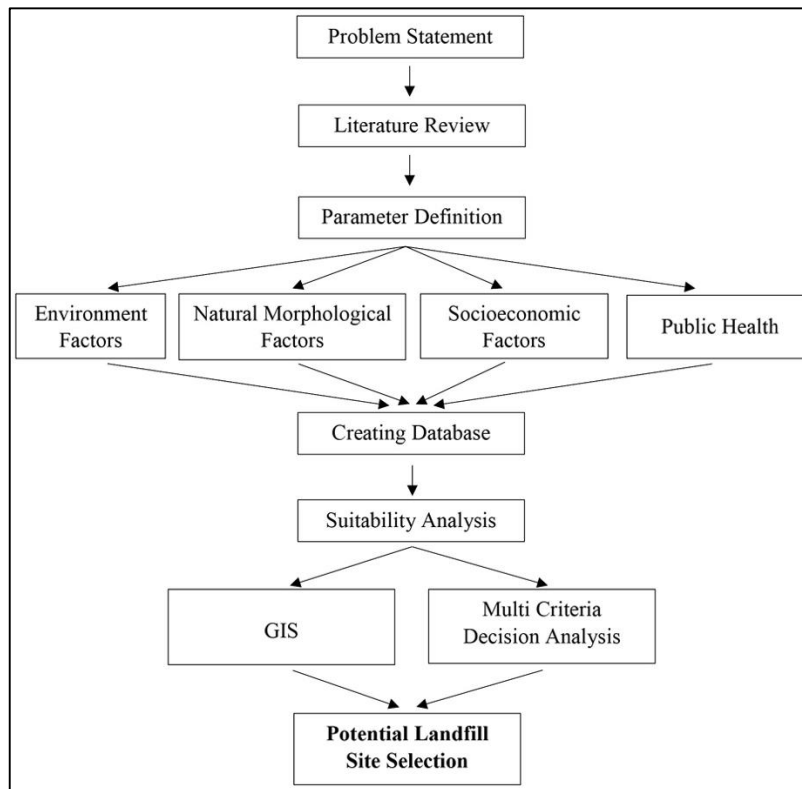


Figure 3. Flowchart of the study

Table 1. Collected Data Sources

| Data   | Data Source/Provider  | Data Type | Scale    |
|--|---|-----------|----------|
| Land Use and Land Capability Classes         | General Directorate of Rural Services   | Vector    | 1/50 000 |
| Soil Suitability for Agricultural Activities | Ministry of Agriculture and Rural Affairs   | Vector    | 1/25 000 |
| Geology                                      | General Directorate of Mineral Research and Exploration                           | Vector    | 1/25 000 |
| Hydrology                                    | Ministry of Agriculture and Rural Affairs   | Vector    | 1/50 000 |
| Meadow Lands                                 | Ministry of Agriculture and Rural Affairs   | Vector    | 1/50 000 |
| Natural and Archeological Sides              | Culture and Tourism Ministry and the Provincial Department of Culture and Tourism | Vector    | 1/50 000 |
| Protection Zone Data                         | Culture and Tourism Ministry and The Provincial Department of Culture And Tourism | Vector    | 1/50 000 |
| Transportation Data                          | General Directorate of Highways   | Vector    | 1/50 000 |

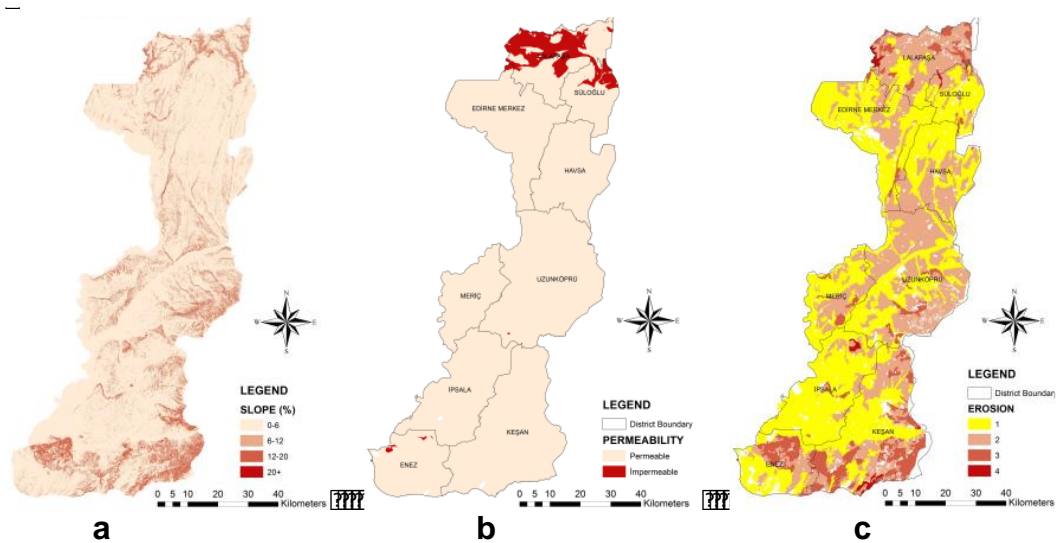
Data of land use, geologic features, protected areas, natural and archeological sites, transportation network, hydrological data, soil suitability for agricultural activities, and land capability classes have been acquired from the relevant public authorities (Table 1). Wind direction map produced in the GIS environment by using land orientation. The data collected from relevant public authorities were designed for composing a database for the study. After data acquiring and update of the received data, the assignment of grading the criteria and sub-criteria was appraised to conduct a multi-criteria evaluation and proximity analysis to map land suitability for each criterion. Table 2 points out the parameters and their classes and grades. Graduation is made with the help of expert knowledge. When the classes take the value of 0 means unsuitable, 1 means low suitable, 3 means suitable, 5 means moderate suitable, 7 means high suitable.

**Table 2.** Factors, Classes, Value and Level of Suitability

| 9,5                                  | Factors   | Class   | Value             | Level of Suitability |
|--------------------------------------|---|---|-------------------|----------------------|
| <i>Environmental Factors</i>         | <b>Distance from Domestic Water Supply</b>            | 0 – 5000 (m)  | 0                 | Unsuitable           |
|                                      |   | 5000 - 6000   | 1                 | Low Suitable         |
|                                      |   | 6000 - 7000   | 3                 | Suitable             |
|                                      |   | 7000 – 10 000   | 5                 | Moderate suitable    |
|                                      |   | >10 000   | 7                 | Highly suitable      |
|                                      | <b>Distance From Rivers</b>                           | 0 – 500 (m)   | 0                 | Unsuitable           |
|                                      |   | 500 – 1000  | 1                 | Low Suitable         |
|                                      |   | 1000 – 2000   | 3                 | Suitable             |
|                                      |   | >2000   | 5                 | Moderate suitable    |
|                                      | <b>Distance From Lakes and Ponds</b>                  | 0 – 2000 (m)  | 0                 | Unsuitable           |
|                                      |   | 2000 – 3000   | 1                 | Low Suitable         |
|                                      |   | 3000 - 4000   | 3                 | Suitable             |
|                                      |   | 4000 – 5000   | 5                 | Moderate suitable    |
|                                      |   | >5000   | 7                 | Highly suitable      |
|                                      | <b>Distance From Conservation and Protected Areas</b> | 0 – 1000 (m)  | 0                 | Unsuitable           |
|                                      |   | 1000 – 3000   | 1                 | Low Suitable         |
| 3000 – 5000                          |   | 3   | Suitable          |                      |
| 5000 – 7000                          |   | 5   | Moderate suitable |                      |
| 7000 – 10 000                        |   | 7   | Highly suitable   |                      |
| <b>Forest Lands</b>                  | Forest lands  | 0   | Unsuitable        |                      |
| <i>Natural Morphological Factors</i> | <b>Slope</b>  | 0 – 6 (%)   | 7                 | Highly suitable      |
|                                      |   | 6 – 12  | 5                 | Moderate suitable    |
|                                      |   | 12 – 20   | 1                 | Low suitable         |
|                                      |   | >20   | 0                 | Unsuitable           |
|                                      | <b>Soil Erosion</b>                                   | 1   | 7                 | Highly suitable      |
|                                      |   | 2,3,4   | 0                 | Unsuitable           |
|                                      | <b>Geology</b>  | Permeable   | 0                 | Unsuitable           |
| Impermeable                          |   | 7   | Highly Suitable   |                      |
| <i>Socio-Economic Factors</i>        | <b>Accessibility (Distance from Roads)</b>            | 0 – 100 (m)   | 0                 | Unsuitable           |
|                                      |   | 100 – 1000  | 1                 | Low Suitable         |
|                                      |   | 1000 – 5000   | 5                 | Moderate suitable    |
|                                      |   | 5000 – 10 000   | 7                 | Highly suitable      |
|                                      | <b>Agricultural Lands</b>                             | >10 000   | 1                 | Low Suitable         |
|                                      |   | Absolute protected areas                                      | 0                 | Unsuitable           |
|                                      |   | Limited agricultural use and non-agricultural permitted areas | 7                 | Highly suitable      |
| <i>Public Health</i>                 | <b>Distance from Urban and Industrial Areas</b>       | 0 – 1000 (m)  | 0                 | Unsuitable           |
|                                      |   | 1000 – 3000   | 1                 | Low Suitable         |
|                                      |   | 3000 – 5000   | 3                 | Suitable             |
|                                      |   | 5000 – 10 000   | 5                 | Moderate suitable    |
|                                      |   | >10 000   | 7                 | Highly suitable      |
|                                      | <b>Wind Direction</b>                                 | NE – E  | 1                 | Low Suitable         |
|                                      |   | SE – NW   | 1                 | Low Suitable         |
|                                      |   | N – SW  | 5                 | Moderate Suitable    |
|                                      |   | S - W   | 3                 | Suitable             |

## RESULTS AND DISCUSSION

Slope, soil erosion, and geology were analyzed to determine the potential suitability for natural morphological criteria. In this study, the slope values were categorized into four classes due to the 1:25 000 scale of the National Soil Database. The optimum percentage of slope for the landfill area was determined as 0-6%. 516 037 ha (82%) (Figure 4a, Table 2). The geological database of the study area was categorized according to permeability. The province has two water basins with alluvial soils, which are not convenient for landfill siting. The infiltration water generated from landfill areas can pollute groundwater. In this context, the lowest ranks were appointed to these permeable units. Also, impermeable units were scored the highest value (Figure 4b).

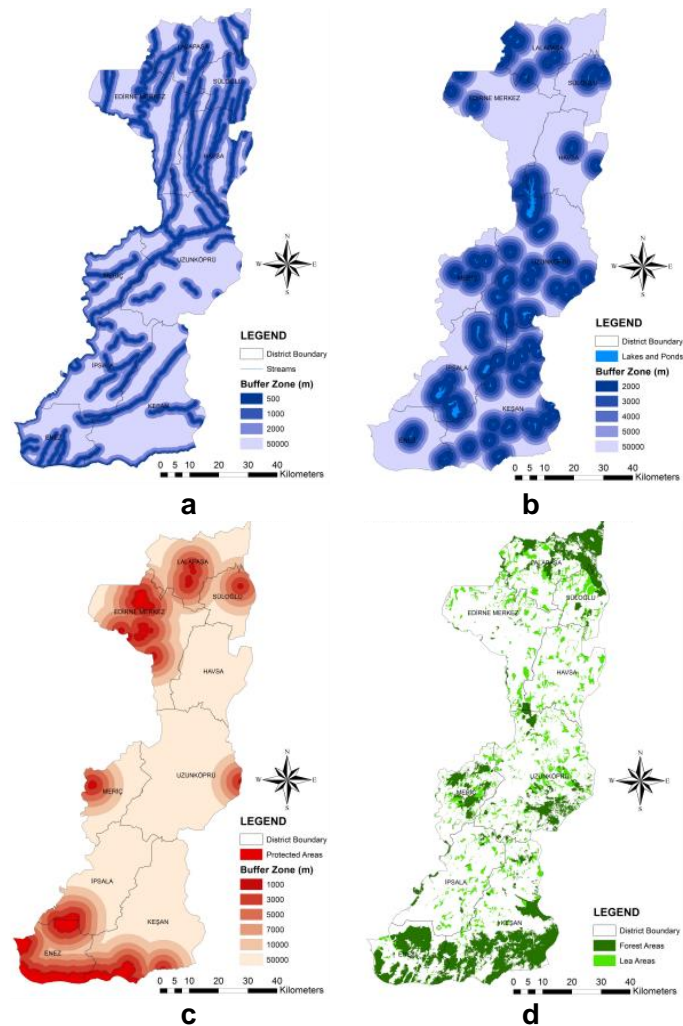


**Figure 4.** Thematic Map of Natural Morphological Factors ( a- slope, b- permeability, c-soil erosion)

There are four classes according to the intensiveness of soil erosion. Class 1 indicates none or very little erosion intensity. The rest of the categories (2, 3, 4) were taken as one group containing lands with erosion in this process (Figure 4c). The lands with erosion haven't been included because of the Waste Management Regulation (WMR, 2015).

Landfill areas should be determined by water basin and water protection- control regulations prohibiting activities that defile the environment or natural resources. Water Pollution and Control Regulation remarks gradual precaution for domestic water and irrigation supplies. According to the foresight of regulations, the closest range protection buffer, absolute protection (0-300 m), has a strict prohibition. In this buffer zone, any public or private construction or activity has been banned. The short-range conservation area (300-1000 m) also has strict prohibitions, but only recreational activities are allowed. In the third buffer zone, the medium-range conservation area (1000-2000 m), industrial services are not allowed. In the long-range conservation buffer zone (2000-3000 m), the activities that generate industrial wastewater and hazardous waste are prohibited (WPCR, 2004). In this context, the lowest value is assigned to the minimum distance to the last conservation buffer zone (Figure 5 a, b ).

The region of study has various sensitive ecosystems. One of the crucial issues for the region is natural protected areas. At the same time, archeological protected areas, urban and historical conservation areas were also assessed in this section (EUPDE, 2015). The environmental choosing of the proper waste facility site is crucial because of the specific ecological, historical, and urban characteristics of the study area. As required by the regulations, archeological, historical, and protected areas are excluded from consideration (TLPCNA, 1983). The first buffer zone is not allowed or recommended (0-1000 m), the minimum grade is given to the second buffer zone (1000-3000 m). The last buffer zone is scored as 5 (Figure 5-c). The protection of forest areas is one of the critical criteria. However, some researchers take into account the forest land as proper lands for landfill. In this study, forest lands in the province were excluded because of sensitive ecosystems (Figure 5-d).



**Figure 5.** Thematic Map of Environmental Factors (a- streams and bufer zones, b- lakes and ponds, c-protected areas, d- forest and leas)

There are certain obligations because of the potential impacts on urban and industrial areas. Also, wind directions and frequency are factors for urban areas to forbear the scent and noise. Landfill areas should be sited far from the residential areas (at least 1 km) to minimize environmental impact. 1-km distance from any residential area was used according to the Waste Management Regulation. The buffer distance for urban areas within a population greater than 500 people is designated as 1000 m by Cantwell (Cantwell, 1999) (Figure 6a). Site morphology and wind direction are affected by the scent caused by wastes. The southeast and northwest, east and west winds are the less frequent winds; therefore, the areas affected by these wind directions were graded the highest value (Figure 6b).

Landfill should not be placed too close to roads because of health and aesthetic impacts or too far away from existing road networks to avoid high transportation costs. The index value of transportation criteria is varied in studies; 100 m to 1000 m is the most suitable distance from highways (Lunkapis et al., 2002; Leao et al., 2004; Mahini and Gholamalifard, 2006). The study area was buffered and reclassified according to its suitability by assigning a grading system from 1 to 5. Distances of 0-100 m and 10 000+ m have the lowest grades in the study region (Figure 7a).

The study area has 80 % fertile land, most of which is also legally protected (EUPD, 2015). In accordance with the Soil Protection and Land Use Law, absolute agricultural lands, special product lands, planted lands, and irrigated agricultural lands cannot be used for purposes other than agricultural production purposes (SPLUL, 2005). Based on Soil Protection and Land Use Law (SPLUL), absolute

agricultural lands, special product lands, planted lands, irrigated agricultural lands, including pasture lands, were grouped as fundamental protected agricultural areas. In this step, there are four classes, absolute protected agricultural areas, primarily protected agricultural areas, limited agricultural use areas (III land capability classes), and non-agriculture permitted areas (IV, V, VI, VII, VIII land capability classes) (Figure 7b). In the study area, there are not any military zones, airport areas, or fault lines. On account of this, these factors are not taken into consideration.

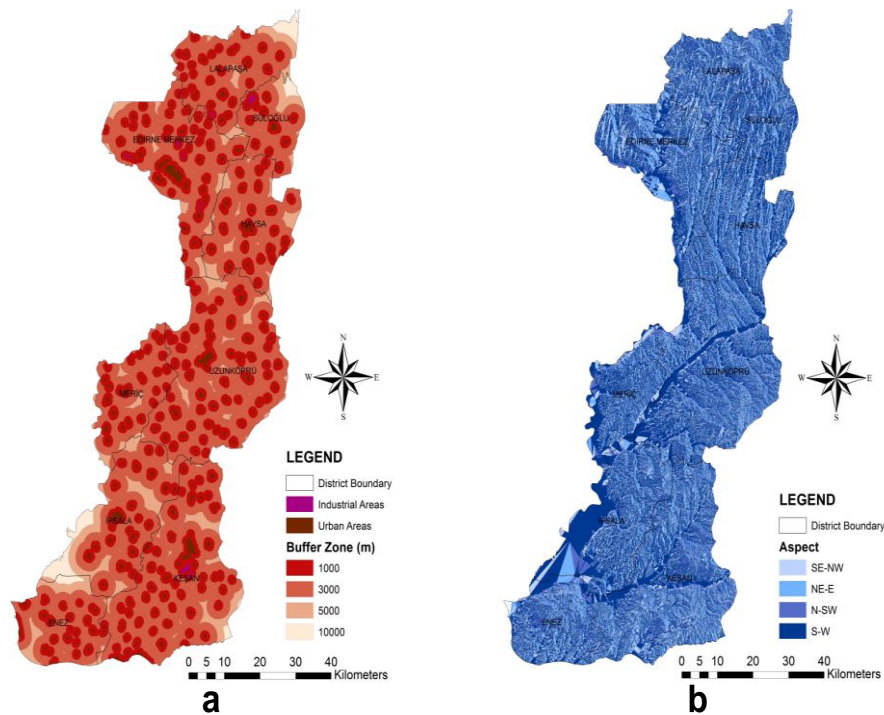


Figure 6. Thematic Map of Public Health Factors (a- urban and industry, b- wind direction)

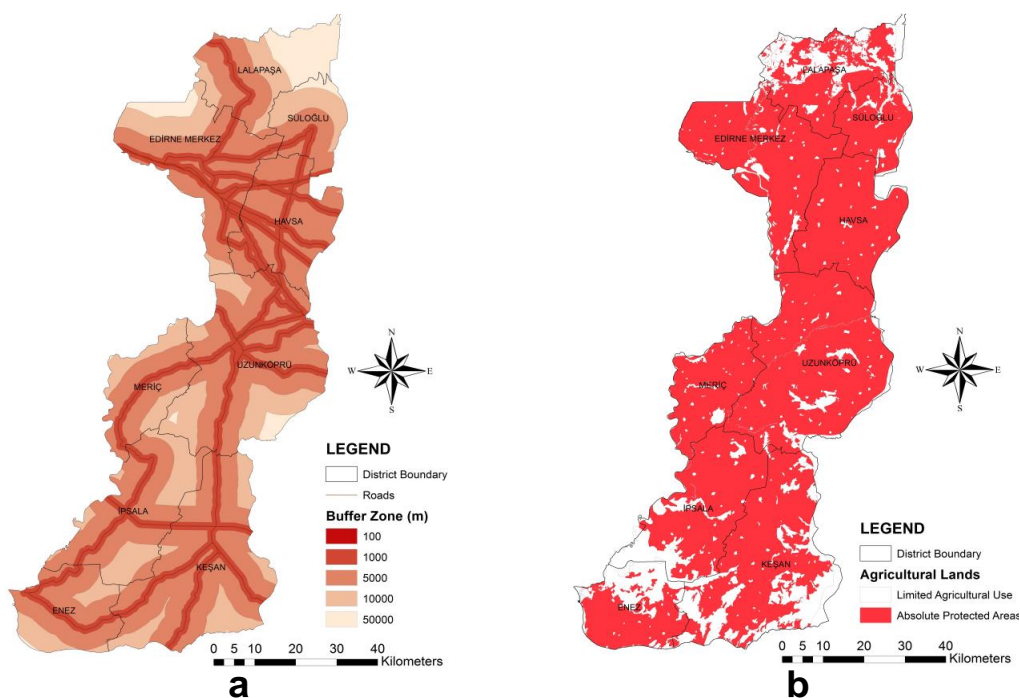
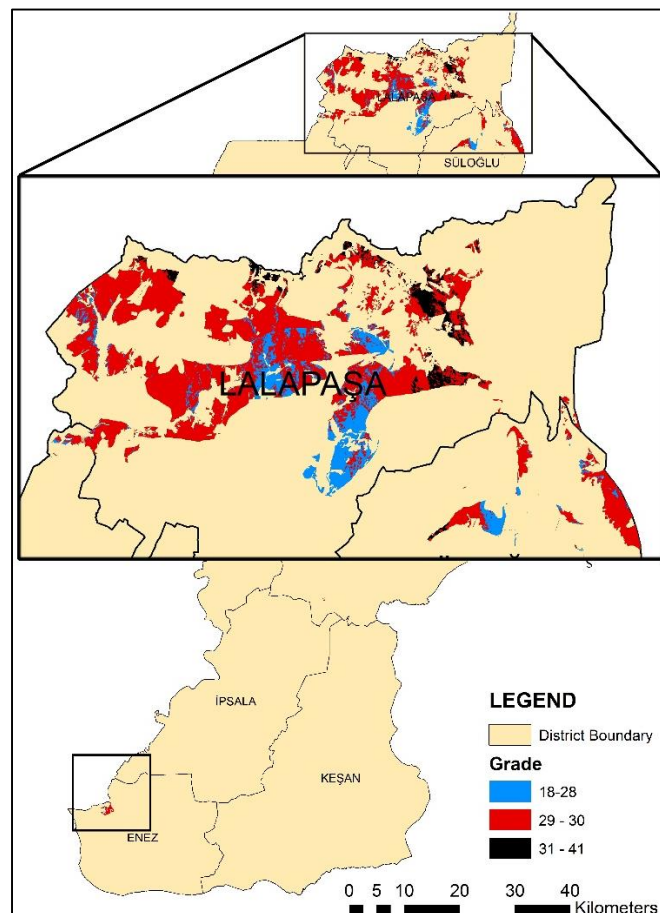


Figure 7. Thematic Map of Socio-Economic Factors (a- roads, b- agricultural areas)



The synthesis of the grades was illustrated in the map that specifies the most suitable areas in the study area for a new landfill site (Figure 8). The total scores of all overlaid layers were determined, and the highest/lowest values were obtained. According to their grades, potential lands were grouped using Natural Breaks Methods performed on natural groupings (Jenks, 1967). There are three potential groups according to their grade range. The highest valued areas have higher potential areas. The highest value is 41. These grades are the highest of all the other potential area scores. Generally, the minimum area size for a landfill site is approximately 5 ha. The total suitable area (18-41) is 13 744 ha in the province. The first potential area (31-41) is 1991 ha. The largest undivided site is 604 ha in the second potential area (29-30).



**Figure 8.** Suitability map for possible landfill area

## CONCLUSION

This study uses spatial data analysis by Geographic Information Systems (GIS) on a new landfill site. Assessment criteria were analyzed with overlaying processes, mapped the criteria preparing in a GIS environment, and acquired appropriate regions with quantitative valuation. The final suitability map shows that potentially suitable areas are quite limited for proposed landfill sites in Edirne Province.

Edirne Province has Ergene and Maritza Water Basins, rich underground water, fertile lands, and many habitats and socio-economic values that need precaution and protection. Anthropogenic pressures are the most devastating impact on environmental retrogression. From this perspective, this study will be considered an example for other areas with similar ecological properties.

GIS is a powerful tool to examine a spatial multicriteria decision analysis and to deliver a decision about the landfill site selection process. If the solid waste management strategies and landfill site selection processes are neglected, solid wastes become one of the most significant causes of environmental destruction. The local municipalities need technical and financial improvements on the implementation of GIS-based models. They can evolve with qualified training and the arrangement of financial resources according to these activities and data. After all these stages, it has been concluded that using multicriteria decisions in a GIS environment is a convenient tool for the landfill site selection process. Selection criteria may vary based on region and purpose. Additionally, scoring conditions may differ to provide a more ecologically friendly approach.

### Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

### Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

### REFERENCES

- Akbari V, Rajabi MA., Chavoshi SH, Shams R, 2008. Landfill Site Selection by Combining GIS and Fuzzy Multi Criteria Decision Analysis, Case Study: Bandar Abbas, Iran. *World Applied Sciences Journal*, 3(1): 39-47.
- Ali S, Taweekun J, Techato K, Waewsak J, Gyawali S, 2019. GIS Based Site Suitability Assessment For Wind and Solar Farms in Songkhla, Thailand, *Renewable Energy*, 132: 1360-1372.
- Alavi N, Goudarzi G, Babaei AA, Jaafarzadeh N, Hosseinzadeh M, 2013. Municipal Solid Waste Landfill Site Selection with Geographic Information Systems and Analytical Hierarchy Process: A Case Study In Mahshahr County, Iran. *Waste Management & Research*, 31(1): 98-105.
- Arkoc, O. (2014). Municipal solid waste landfill site selection using geographical information systems: a case study from Çorlu, Turkey. *Arabian Journal of Geosciences*, 7(11), 4975-4985.
- Ball JM, 2005. Landfill Site Selection. Tenth International Waste Management and Landfill Symposium S. Margherita di Pula, Cagliari. Italy, October 3-7, 2005, pp: 3-7.
- Baskurt ZM, Aydin CC, 2018. Nuclear power plant site selection by Weighted Linear Combination in GIS environment, Edirne, Turkey, *Progress in Nuclear Energy*, 104: 85-101.
- Beskese A, Demir HH, Ozcan HK, Okten HE, 2015. Landfill Site Selection Using Fuzzy AHP and Fuzzy TOPSIS: A Case Study for Istanbul. *Environmental Earth Science*, 73: 3513–3521.
- Bilgilioğlu, S. S., Bilgilioğlu, B. B. (2017). Selection of suitable site for municipal solid waste disposal sites for the Aksaray (Turkey) using AHP and GIS methods. *The Journal of Scientific and Engineering Research*, 4(11), 36-45.
- Cantwell R, 1999. Putting Data to Work-GIS and Site Selection Studies for Waste Management Facilities. Conference Proceedings, Eurogise 1999, Galway, March 26, 1999, pp:152-163.
- Chicherin S, Volkova A, Latšov E, 2018, GIS-Based Optimisation for District Heating Network Planning. *Energy Procedia*, 149: 635-641.
- Celiker, M., Yildiz, O., Nacar Koçer, N. (2019). Evaluating solid waste landfill site selection using multi-criteria decision analysis and geographic information systems in the city of Elazığ, Turkey. *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences*, 25(6).
- Danthurebandara M, Van Passel S, Nelen D, Tielemans Y, Van Acker K, 2012. Environmental and Socio-Economic Impacts of Landfills. ECO-TECH'12, International Conference on Natural Sciences and Environmental Technologies for Waste and Wastewater Treatment Remediation Emissions Related to Climate Environmental and Economic Effects, November 26-28, 2012, Kalmar, Sweden.
- Di Vaio A, Varriale L, Trujillo L, 2019. Management Control Systems in Port Waste Management: Evidence From Italy. *Utilities Policy*, 56: 127-135.

- Donevska KR, Gorsevski PV, Jovanovski M, Peševski I, 2012, Regional Non-Hazardous Landfill Site Selection by Integrating Fuzzy Logic, AHP and Geographic Information Systems. *Environmental Earth Sciences*, 67(1): 121-131.
- EUPDE, Environment and Urbanisation Provincial Directorate of Edirne, 2015. Edirne İli 2015 Yılı Çevre Durum Raporu (*in Turkish*), S: 1-3, 57.
- Ersoy H, Bulut, F, 2009. Spatial and Multi-Criteria Decision Analysis-Based Methodology for Landfill Site Selection in Growing Urban Regions. *Waste Management & Research*, 27(5): 489-500.
- Gorsevski PV, Donevska KR, Mitrovski CD, Frizado JP, 2012. Integrating Multi-Criteria Evaluation Techniques with Geographic Information Systems for Landfill Site Selection: A Case Study Using Ordered Weighted Average. *Waste Management*, 32(2): 287-296.
- Guiqin W, Li Q, Guoxue L, Lijun C, 2009. Landfill Site Selection Using Spatial Information Technologies and AHP: A Case Study of Beijing, China. *Journal of Environmental Management*, 90: 2414–2421.
- Khan MUH, Vaezi M, Kumar A, 2019. Optimal Siting of Solid Waste-To-Value-Added Facilities Through a GIS-Based Assessment. *Science of The Total Environment*, 610-611: 1065-1075.
- Lunkapis JG, Ahmad N, Shariff ARM, Mansor S, Mispan RM, 2002. GIS as Decision Support Tool For Landfills Siting. 2nd World Engineering Congress, July 22-25, 2002, Sarawak, Malaysia.
- Leao S, Bishop I, Evans D, 2004. Spatial–Temporal Model for Demand and Allocation of Waste Landfills in Growing in Urban Regions. *Computers, Environment And Urban Systems*, 28: 353–385.
- Mahini SA Gholamalifard M, 2006. Siting MSW Landfills With a Weighted Linear Combination (WLC) Methodology in a GIS Environment. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 3(4): 435-445.
- Moeinaddini M, Khorasani N, Danehkar A, Darvishsefat AA, Zienalyan M, 2010, Siting MSW landfill Using Weighted Linear Combination and Analytical Hierarchy Process (AHP) Methodology in GIS Environment (Case Study: Karaj). *Waste Management*, 30: 912–920.
- Nas B, Cay T, Iscan F, Berktaş A 2010, Selection of MSW landfill site for Konya, Turkey using GIS and multi-criteria evaluation. *Environmental Monitoring and Assessment*, 160(1): 491-500.
- Nazari A, Salarirad MM, Bazzazi AA, 2012. Landfill Site Selection by Decision-Making Tools Based on Fuzzy Multi-Attribute Decision-Making Method. *Environmental Earth Sciences*, 65(6): 1631-1642.
- Sadek S, El-Fadel M, Freiha F, 2006. A Multi-Criterion Modular and Flexible Decision-Aid Tool for Landfill Siting Using GIS. Twenty First International Conference on Solid Waste Technology And Management, March 26-29, 2006, USA.
- Sener B, Süzen ML, Doyuran V, 2006. Landfill Site Selection by Using Geographic Information Systems. *Environmental Geology*, 49(3): 376-388.
- Sener S, Sener E, Nas B, Karagüzel R, 2010, Combining AHP with GIS for Landfill Site Selection: A Case Study in the Lake Beyşehir Catchment Area (Konya, Turkey). *Waste Management*, 30(11): 2037-2046.
- Şener, Ş., Şener, E., Nas, B. (2011). Landfill Site Selection by using GIS and Multicriteria Decision Analysis. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 1(3), 134-144.
- Şener, Ş., Sener, E., Karagüzel, R. (2011). Solid waste disposal site selection with GIS and AHP methodology: a case study in Senirkent–Uluborlu (Isparta) Basin, Turkey. *Environmental monitoring and assessment*, 173(1-4), 533-554.
- SPLUL, Soil Protection and Land Use Law, 2005. The Official Gazette of the Turkish Republic, No: 5403.
- TLPCNA, The Law of Protection of Cultural and Natural Assets, 1983. The Official Gazette of the Turkish Republic, No: 2863.
- TUIK, Turkish Statistical Institute, 2014 <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=119&locale=tr>, Date of Access: 02.10.2018.
- Vasiljević TZ, Srdjević Z, Bajčetić R, Miloradov MV, 2012. GIS and The Analytic Hierarchy Process for Regional Landfill Site Selection in Transitional Countries: A Case Study From Serbia. *Environmental Management*, 49(2): 445-458.

- Vatalis K, Manoliadis O, 2002. A Two-Level Multicriteria DSS for Landfill Site Selection Using GIS: Case Study in Western Macedonia, Greece. *Journal of Geographic Information and Decision Analysis*, 6(1): 49-56.
- Vaverková MD, Winkler J, Adamcová D, Radziemsk R, Uldrij D, Zloch J, 2019. Municipal Solid Waste Landfill – Vegetation Succession in an Area Transformed by Human Impact. *Ecological Engineering*, 129: 109-114.
- Wang Y, Li J, An D, Xi B, Tang J, Wang Y, Yang Y, 2018. Site selection for municipal solid waste landfill considering environmental health risks. *Resources Conservation and Recycling*, 138: 40-46.
- WMR, Waste Management Regulation, 2015. The Official Gazette of the Turkish Republic, No: 29314.
- WPCR, Water Pollution and Control Regulation, 2004. The Official Gazette of the Turkish Republic No: 25687.

**Atf İçin:** Çınar S M ve Arseven B, 2021. Kısmi Gölgeleme Etkilerini Modelleyebilen Bir Pv Emülatör Tasarımı. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 982-997.

**To Cite:** Çınar S M and Arseven B, 2021. Kısmi Gölgeleme Etkilerini Modelleyebilen Bir Pv Emülatör Tasarımı. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 982-997.

## Kısmi Gölgeleme Etkilerini Modelleyebilen Bir PV Emülatör Tasarımı

Said Mahmut ÇINAR<sup>1\*</sup>, Burak ARSEVEN<sup>1</sup>

**ÖZET:** Güneş ışınımından elektrik enerjisi üretmekte kullanılan güneş (photovoltaic-PV) panellerinin çıkış karakteristikleri ışınım, sıcaklık, gölgeleme ve panel yüzeyinin temizliği gibi pek çok parametreden etkilenmektedir. Bu parametrelerden ışınım, sıcaklık ve gölgeleme çevresel şartlara bağlıdır ve PV paneli içeren sistemlerin testi söz konusu olduğunda aynı çevresel şartların tekrar elde edilmesi mümkün olmamaktadır. PV paneli emülatörleri belirli bir zaman dilimini kapsayan ışınım, sıcaklık ve gölgeleme veri setlerini kullanarak o zaman dilimindeki çevresel şartların oluşturulmasını ve böylece PV paneli sistemindeki testlerin aynı çevresel koşullarda tekrar edilmesini sağlayabilir. Bu çalışmada kısmi gölgeleme etkilerini modelleyebilen bir PV paneli emülatörü tasarımı gerçekleştirilmiştir. Söz konusu PV emülatörü, her biri yirmi hücreden oluşan ve atlama diyotları ile köprülenmiş hücre gruplarını temsil eden üç düşüren DC/DC dönüştürücüye, 250 W çıkış gücüne ve 32-bit mikro-denetleyici kontrol kartına sahiptir. Tasarlanan PV emülatörü iki farklı ışınım ve modül sıcaklığı senaryosuyla test edilmiştir. Elde edilen deneysel sonuçlar, MATLAB/Simulink ortamında alınan simülasyon sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Son olarak istatistikî analizlerle deneysel ve simülasyon sonuçlarının oldukça yüksek oranda örtüştükleri saptanmıştır. Performansı oldukça yüksek çıkan emülatör sayesinde herhangi bir saha, çatı ve cepheye kurulabilecek PV sistemlerinin tekno-ekonomik fizibilite analizi rahatlıkla yapılabilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** PV emülatörü, PV paneli, Kısmi gölgeleme, ARM mikro-denetleyici, Yapay sinir ağları

### A PV Emulator Design That Can Model Partial Shading Effects

**ABSTRACT:** The output characteristics of the photovoltaic (PV) panels used to generate electricity from solar radiation are influenced by many parameters such as radiation, temperature, shading, and cleaning of the panel surface. Radiation, temperature, and shading, which are among these parameters, depending on environmental conditions. When testing systems with PV panels, it is not possible to repeat the same environmental conditions. PV panel emulators use the radiation, temperature, and shading data sets that cover a given period to create environmental conditions in that period. This allows the tests in the PV panel system to be repeated under the same environmental conditions. In this study, a PV emulator design which can model partial shading effects is realized. The PV emulator has three DC / DC buck converters -each representing three groups of PV cells that are consisting of twenty cells and bridged by bypass diodes-, 250 W output power, and a 32-bit microcontroller control card. The designed PV emulator was tested with two different radiation and module temperature scenarios. The experimental results were compared with the simulation results obtained in MATLAB/Simulink environment. Finally, it was determined that the experimental and simulation results overlapped with statistical analysis. Thanks to the highly-performing emulator, the techno-economic feasibility analysis of PV systems that can be installed on any field, roof and facade can be done easily.

**Keywords:** PV emulator, PV panel, Partial shading, ARM microcontroller, Artificial neural network

<sup>1</sup> Said Mahmut ÇINAR ([Orcid ID: 0000-0002-8683-3884](https://orcid.org/0000-0002-8683-3884)), Burak ARSEVEN ([Orcid ID: 0000-0002-2303-7872](https://orcid.org/0000-0002-2303-7872)) Afyon Kocatepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Elektrik Mühendisliği Bölümü, Afyonkarahisar, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Said Mahmut ÇINAR, e-mail: smcinar@aku.edu.tr

Bu çalışma Burak ARSEVEN' in Yüksek Lisans tezinden türetilmiştir.

## GİRİŞ

Güneş ışınımından elektrik enerjisi üretiminde güneş (PhotoVoltaic - PV) panelleri oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Yarı iletken hücrelerin seri ve paralel olarak bağlanmasıyla istenilen çıkış gücünde üretimleri gerçekleştirilebilen PV panelleri, yarı iletken malzemelerden üretilmeleri sebebiyle doğrusal olmayan güç üretim karakteristiğine sahiptirler. Dolayısıyla, PV panellerinden maksimum verimi elde edebilmek adına panellerin maksimum güç noktasında (Maximum Power Point - MPP) çalıştırılmaları oldukça önemlidir. Bunun için literatürde MPP takibi (Maximum Power Point Tracking-MPPT) olarak adlandırılan kontrol yöntemleri kullanılmaktadır. MPPT yöntemleri üzerine gerçekleştirilen çalışmaların testinde çoğunlukla bilgisayar ortamında oluşturulmuş benzetim ortamları veya gerçek PV sistemleri tercih edilmektedir. Ancak güneş ışınımı ve ortam sıcaklığı gibi parametrelerin çevresel etkilere bağlı olması sebebiyle gerçek PV sistemlerinde gerçekleştirilen bir testin aynı koşullarda tekrarlanması mümkün olmadığından PV emülatörlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

PV emülatörleri, yazılımsal ve donanımsal bileşenleri bulunan doğrusal olmayan güç kaynaklarıdır. PV emülatörleri; PV modeli, kontrol stratejisi ve güç dönüştürücüleri olmak üzere üç ana kısımdan oluşmaktadır. Bu kısımlardan PV modeli, taklidi gerçekleştirilecek PV paneli ile aynı akım-gerilim ( $I-V$ ) karakteristiğini üretmekte kullanılmaktadır. PV modeli, elektrik devre elemanlarıyla oluşturulmuş belirli bir devre topolojisine sahip bir eşdeğer devresidir. PV modelde, PV panelinin karakteristik eşitliği Kirchhoff'un akım yasası kullanılarak türetilmektedir (Piazza ve Vitale, 2012). PV panelinin elektriksel devre modeli, kullanılan diyot sayısına göre tek diyotlu veya çift diyotlu olarak isimlendirilmektedir (Ayop ve Tan, 2017). Yapısının sadeliği ve oldukça yüksek oranda doğruluk sağlaması gibi avantajlarından dolayı daha sıklıkla tek diyotlu model PV emülatörlerinde tercih edilmektedir (Koran ve ark., 2010; Agrawal ve Aware, 2012; Arseven ve Çınar, 2017; Arseven, 2019). Buna karşılık literatürde yer alan bazı çalışmalarda çift diyotlu elektriksel devre modelinin kullanımına da rastlanılmaktadır (Midtgard, 2007; Atoche ve ark., 2015). PV modeli ile ilgili diğer bir önemli husus bu modelin emülatöre nasıl uygulanacağıdır. Yapay sinir ağı (YSA) yönteminde farklı ışınım, sıcaklık ve yük değerleri için modellenecek güneş paneli  $I-V$  karakteristiği deneylerinden veya PV paneli modelinin simülasyonundan elde edilen veri setleriyle YSA'nın çevrim dışı şekilde eğitilmesiyle PV modeli elde edilir ve uygulanır (Di Piazza ve ark., 2010; Gomez-Castaneda ve ark., 2014).

PV emülatörlerinde, güç dönüştürücüsünün çalışma noktası kontrolü belirlenen kontrol stratejisi ile gerçekleştirilmektedir. Akım modu kontrollü ve gerilim modu kontrollü olmak üzere iki türü bulunan doğrudan referanslama yönteminin kullanımına emülatör yapılarında oldukça sık rastlanılmaktadır. Gerilim modu kontrollü doğrudan referanslama yönteminde çıkış akımı değeri başlangıçta sıfırdır ve bu durum için belirli bir ışınım ve sıcaklık değerindeki açık devre gerilimine ( $V_{oc}$ ) eşit olan gerilim değeri hesaplanır. Ardından PV modeli  $I-V$  karakteristiği üzerindeki çıkış akımı ( $I_{pv}$ ) ve gerilimi ( $V_{pv}$ ) değerlerine karşılık gelen nokta bulunana kadar çıkış akımı kademeli olarak artırılır ve sonuç olarak emülatör sabit çalışma noktasına ulaşır (Di Piazza ve ark., 2010). Akım modu kontrollü doğrudan referanslama yöntemindeyse gerilim modu yöntemine benzer; fakat akım ve gerilim parametreleri yer değiştirilerek uygulanır (Agrawal ve Aware, 2012; Ottieri ve ark., 2020).

PV emülatörlerinde yer alan DC/DC dönüştürücüler ise emülatör kontrol birimince üretilen referansa uygun bir biçimde gerçek PV paneliyle aynı çıkışı oluşturmak amacıyla kullanılırlar. PV paneli açık devre geriliminin ( $V_{oc}$ ) dönüştürücü giriş geriliminden büyük olduğu durumlarda emülatörlerde düşüren (buck) DC/DC dönüştürücüler kullanılmaktadır (Koran ve ark., 2010; Di Piazza ve ark., 2010; Ayop ve Tan, 2019). Çıkış geriliminin giriş geriliminden büyük olduğu durumlarda da yükselten (boost) DC/DC dönüştürücüler PV uygulamalarında kullanılmaktadır. Yükselten (boost), düşüren-yükselten

(buck-boost) ve iki kademeli (two quadrant) DC/DC dönüştürücüler de yine PV emülatör çalışmalarında kullanılan diğer dönüştürücü topolojilerdir (Lu ve Nguyen, 2012; Chavarria ve ark., 2014; Cordeiro ve ark., 2015; Moussa ve ark., 2017; Carralero ve ark., 2019). Programlanabilir DC güç kaynağı kullanımına da PV emülatör yapılarında rastlanılmaktadır (Ebrahim ve ark., 2015). Yarikkaya ve Çınar (2015); aynı PV panelini modelleyen biri programlanabilir güç kaynağı (PGK) ile oluşturulmuş, diğeri ise kendi özgün tasarımları olan düşüren DC/DC dönüştürücü temelli iki farklı PV emülatör yapısı oluşturularak PGK tasarımlarının PV panelini daha yüksek performansla modellediğini gözlemlemişlerdir.

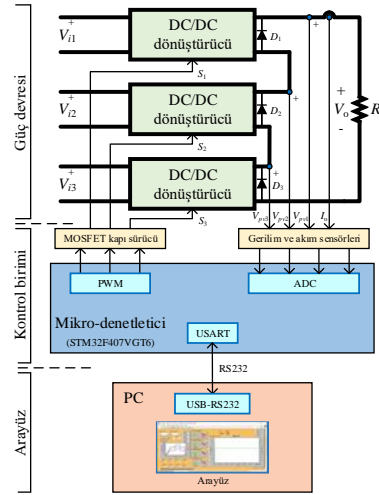
Bu çalışmada PV panellerindeki kısmi gölgeleme etkilerini modelleyebilen bir PV emülatörü tasarlanmıştır. Kısmi gölgeleme paneli oluşturan hücrelerin farklı ışınım şiddetine maruz kalma sonucunu oluşturan gölgeleme durumudur. Tasarlanan emülatör maksimum 250 W güce ve her biri yirmi hücreden oluşan seri bağlı üç hücre grubuna sahip bir PV panelini modelleyebilmektedir. Bu emülatörün PV modeli YSA yöntemiyle oluşturulmuş olup, kontrol stratejisinde doğrudan referanslama yöntemi tercih edilmiş ve güç dönüştürücü biriminde düşüren tür DC/DC dönüştürücü kullanılmıştır. Ayrıca emülatörün kontrol biriminde ARM tabanlı 32-bit mikrodenetleyiciye yer verilmiş ve MATLAB/Simulink ve MATLAB/Kod Üretici (Code Generator) araçlarıyla programlanmıştır. Emülatörün istenilen veri setleriyle işletilebilmesi için LabVIEW ortamından bir arayüz programı tasarımı da bu çalışmaya özel olarak gerçekleştirilmiştir. Son olarak, sadece ışınım değerlerinin ve hem ışınım hem de modül sıcaklığı değerlerinin zamanla değiştiği iki farklı gölgeleme senaryosu içeren veri setleriyle deneyler gerçekleştirilmiş ve gerçekleştirilen deneylerin sonuçları ile simülasyon sonuçları karşılaştırılarak emülatör performansı incelenmiştir.

Aşağıda ilk olarak “Materyal ve Yöntem” başlığı altında tasarımı gerçekleştirilen emülatörün yapısı ve özellikleri, tasarım ayrıntıları, kullanılan modelleme, kontrol strateji ve programlama yöntemleri ayrıntılı olarak sunulacaktır. Ardından “Bulgular ve Tartışma” bölümünde emülatörün doğrulama testleri için oluşturulan test senaryoları ve bu senaryolarla gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçlar simülasyon sonuçlarıyla karşılaştırmalı olarak sunulacak ve sonuçlar üzerinde gerçekleştirilen istatistikî analiz sonuçları verilecektir. Son olarak ise “Sonuçlar” kısmında bu çalışmanın sonuçları ve gelecekte yapılabilecek çalışmalar üzerine bir projeksiyon verilecektir.

## MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada PV panellerini kısmi gölgeleme etkileriyle modelleyebilecek bir PV emülatörü gerçekleştirilmiştir. Emülatörle, seri bağlı üç hücre grubundan oluşan ve 250 W güce kadar PV panelleri modellenebilmektedir. Emülatör yapısında yer alan PV panelinin seri bağlı hücre grupları düşüren tür DC/DC dönüştürücülerle oluşturulmuştur. Emülatör tasarımında 32-bit ARM tabanlı bir mikrodenetleyici kullanılmış olup, aygıt yazılımı MATLAB/Simulink ortamında grafiksel olarak tasarlanmıştır. LabVIEW platformunda ise emülatörü kontrol etmek ve emülatörden veri toplamak için bir arayüz tasarlanmıştır.

Şekil 1’ de PV emülatörünün yapısını resmeden blok şema görülmektedir. PV emülatörü; güç devresini oluşturan DC/DC dönüştürücüler, kontrol birimi ve bilgisayarda çalışan arayüz yazılımı olmak üzere üç ana bölümden oluşmaktadır. DC/DC dönüştürücüler, PV panelindeki seri bağlı hücre gruplarının güç üretimlerini gerçekleştirmek işlemi ile sorumludur. Kontrol birimi, DC/DC dönüştürücülerin çıkış akımı ve gerilimlerinin ölçümü, dönüştürücü anahtarlama sinyallerinin üretimi ve arayüz yazılımıyla veri alışverişinin gerçekleştirilmesi görevlerini yerine getirmektedir. Arayüz yazılımı ise ışınım ve modül sıcaklığı veri setlerini aygıt yazılımına göndermek ve aygıt yazılımından gelen çalışma noktası verilerini toplamak gibi iki temel görevi yürütmektedir.



Şekil 1. PV emülatörünün blok şeması

Emülatörün yapısı aşağıda; “Güç Devresi”, “Kontrol Birimi” ve “Arayüz Yazılımı” alt başlıkları altında ayrıntılarıyla verilmektedir.

### Güç Devresi

Emülatör tasarımında düşüren tür DC/DC dönüştürücü topolojisine sahip üç adet dönüştürücü kullanılmıştır. Burada üç adet DC/DC dönüştürücü kullanılmasının sebebi, taklidi yapılacak PV panelin her biri yirmi hücreden oluşan ve atlama diyotları ile köprülenmiş üç adet seri bağlı hücre grubundan oluşuyor olmasıdır. Kullanılan dönüştürücülerin giriş gerilimleri 15-24 V, çıkış gerilimleri 0-13 V aralığında, çıkış akımları ise en fazla 9 A olacak şekilde seçilmiştir.

Dönüştürücüde güç anahtarı olarak bir MOSFET (Metal Oxide Field Effect Transistor) kullanılmıştır ve bu MOSFET 15 kHz temel frekansa ( $f_{PWM}$ ) sahip bir PWM (Pulse Width Modulation - Darbe Genişlik Modülasyonu) sinyaliyle kontrol edilmiştir. Dönüştürücü çıkış gerilimi aşağıda yer alan Eşitlik 1. de verilmiştir.

$$V_o = D \cdot V_s \quad (1)$$

Burada;

$D$  = PWM sinyalinin doluluk oranı, [%],

$V_s$  = Kaynak gerilimi, [V],

$V_o$  = Çıkış gerilimi, [V] dir.

Dönüştürücüde kullanılan bobinin ve filtre kondansatörünün boyutlandırılması dalgasız bir çıkış gerilimi elde edilebilmesi için oldukça önemlidir. Söz konusu bobin ve filtre kondansatörünün değerleri sırasıyla Eşitlik 2. ve Eşitlik 3. kullanılarak hesaplanmıştır.

$$L \geq \frac{V_o}{\Delta I_L \cdot f_{PWM}} (1 - D) \quad (2)$$

$$C \geq \frac{V_o \cdot (1 - D)}{\Delta V_o \cdot 8 \cdot L \cdot f_{PWM}} \quad (3)$$

Burada;



$\Delta I_L =$  Bobin akımının dalgalanma genliği ( $I_{L_{max}} - I_{L_{min}}$ ), [A],

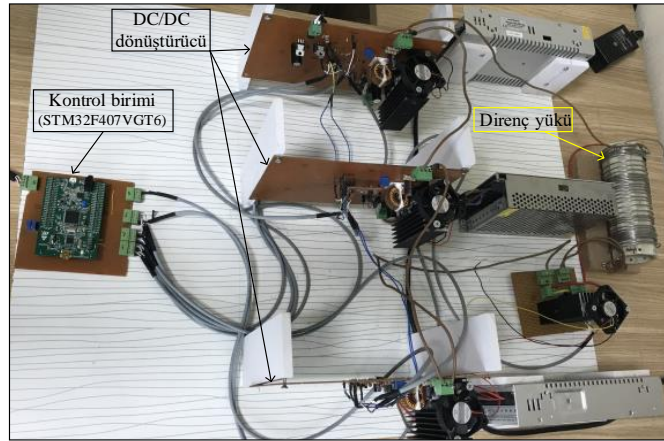
$L =$  Bobin, [H],

$f_{PWM} =$  PWM sinyalinin frekansı, [Hertz],

$\Delta V_o =$  yük/çıkış geriliminin dalgalanma genliği ( $V_{o_{max}} - V_{o_{min}}$ ), [V],

$C =$  Filtre kondansatörü, [F], ifade etmektedir.

DC/DC dönüştürücüler devre elemanlarının boyutlandırılmasının ardından baskı devre kartları hazırlanıp imal edilmiştir (Şekil 2). Dönüştürücülerde anahtarlama sırasında ortaya çıkan ısıyı MOSFET' ten uzaklaştırabilmek için soğutucu bloklar kullanılmış ve soğutucularda da fan ile cebri hava dolaşımı sağlanmıştır.



Şekil 2. PV emülatörü güç devresi görünümü

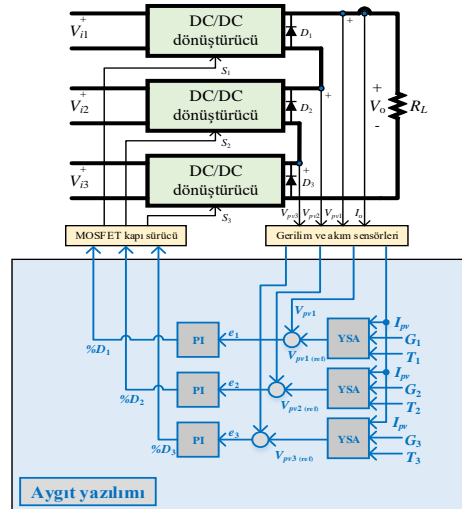
### Kontrol Birimi

PV emülatörün kontrol biriminin tasarımında, ST firmasının Discovery F4 geliştirme kartı kullanılmış olup bu kartta ARM Cortex®M3 mimarisine sahip 32-bitlik STM32F407VGT6 tipi mikrodenetleyicisi bulunmaktadır (Şekil 3). DC/DC dönüştürücülerin kontrolü, mikrodenetleyicide bulunan çok sayıdaki zamanlayıcılardan biri PWM üretici modunda çalıştırılmasıyla üretilen PWM sinyalleri ile sağlanmıştır. Dönüştürücülerin çıkış akımını ve gerilimlerini ölçmek için mikrodenetleyicinin 12 bit çözünürlüğe sahip olan analog sayısal dönüştürücü (Analog to Digital Converter - ADC) biriminin dört girişi kullanılmıştır. Ayrıca arayüz yazılımıyla veri alışverişi için bir seri haberleşme birimi kullanılmıştır.

PV emülatörünün güç devresi çıkışındaki 250 W güç akışı, 40 V gerilim ve 9 A akım seviyelerinde gerçekleştiğinden dolayı güç devresiyle kontrol birimi arasındaki tüm ölçme işlemleri ile PWM sinyal geçişleri elektriksel olarak birbirlerinden yalıtılarak sağlanmıştır. Böylece kontrol biriminin olası yüksek gerilim şoklarına karşı korunması temin edilebilmiştir. Bu amaçla akım ölçümü için manyetik yalıtımlı ACS712 sensörü ve gerilim ölçümleri için optik yalıtımlı ACPLC87 sensörleri tercih edilmiştir. Dönüştürücü MOSFET' lerini kontrol etmek üzere kullanılan PWM sinyalleri de optik bağlayıcı (optocoupler) üzerinden geçirilmiştir.

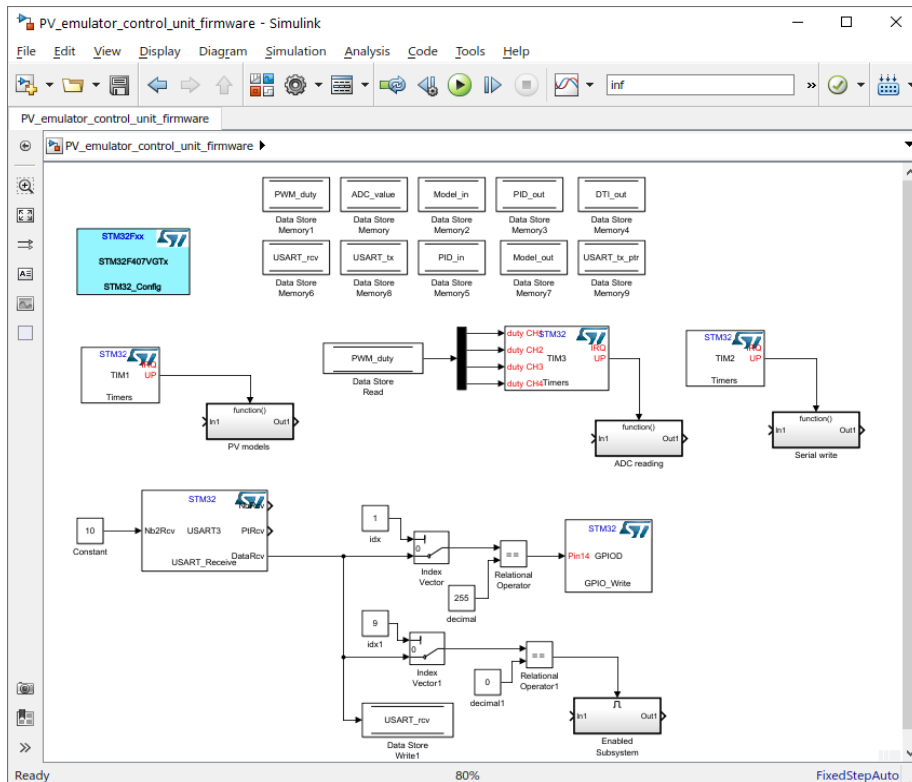
Şekil 3' te özetlenen PV emülatörünün kontrol stratejisi mikrodenetleyiciye gömülen aygıt yazılımıyla hayata geçirilmektedir. Aygıt yazılımı MATLAB/Simulink ortamında grafiksel olarak ST firmasının MATLAB blok setleri kullanılarak tasarlanmıştır (Şekil 4). Böylece kontrol biriminin tasarımında esneklik sağlanabilmiş ve tasarım süreci önemli ölçüde kısaltılabilmektedir. Bu yazılım

tasarımı süreci öncelikle ST firmasının CubeMX yapılandırma yazılımında mikrodenetleyicinin işlemci ve çevresel donanımlarının emülatör kontrol biriminde ihtiyaç duyulan biçimde yapılandırılmasıyla başlamaktadır. Ardından bu yapılandırma ayarları MATLAB/Simulink ortamındaki aygıt yazılımı blok diyagramına aktarılmakta ve kodlama tamamlandıktan sonra MATLAB/Code Generator ile C kodları oluşturulmaktadır. Son olarak oluşturulan C kodları tercih edilen bir derleyici ile makine diline (hex kodu) çevrilmekte ve mikrodenetleyiciye gömülmektedir.



Şekil 3. PV emülatörü kontrol stratejisi blok şeması

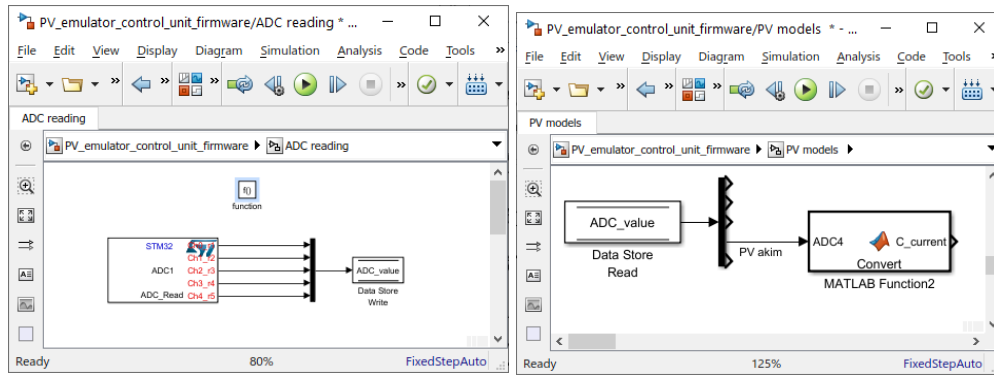
Aygıt yazılımında; geri besleme sinyallerinin ölçülmesi, PV paneli modelinin işletilmesi, çalışma noktası kontrolörlerinin işletilmesi, dönüştürücü kontrol sinyallerinin üretilmesi ve arayüz yazılımıyla veri alışverişinin sağlanması gibi beş temel fonksiyon icra edilmektedir. Bu beş temel fonksiyon sırasıyla aşağıda yer alan alt başlıklar altında ayrıntılarıyla açıklanmıştır.



Şekil 4. MATLAB/Simulink ortamında oluşturulmuş aygıt yazılımı

### Geri besleme sinyallerinin ölçülmesi

PV emülatörü DC/DC dönüştürücülerinin çıkışları seri bağlandığından yük akımı bütün dönüştürücülerden akmaktadır. Bu nedenle yük akımı ölçümü için bir ADC girişi ve dönüştürücü çıkış gerilimleri için üç ADC girişi olmak üzere toplam dört ADC girişi kullanılmıştır. Söz konusu ADC girişleri mikrodenetleyicinin ADC1 birimi üzerinden ölçülmüştür. ADC1 birimi 12-bit çözünürlüğe ayarlanmış olup dönüştürme süreci PWM üretici olarak kullanılan zamanlayıcı birimiyle tetiklenmiştir. Dönüştürülen sinyal verileri doğrudan bellek erişimi (Direct Memory Access - DMA) birimi kullanılarak tampon belleğe aktarılmıştır. Tampondan alınan veriler sensörlerin off-set değerleri ve dönüştürme oranları dikkate alınarak gerçek değerlerine ölçeklenmiştir. Şekil 5’ te geri besleme sinyallerinin tamponlanıp ölçeklenmesi işlemlerinin yapıldığı blok setler ve fonksiyon kodları görülmektedir.



Şekil 5. Geri besleme sinyallerinden tamponlanması ve ölçeklenmesi

### PV paneli modelinin işletilmesi

Bu çalışmada YSA yöntemiyle modelleme tercih edilmiştir. YSA modeli, hücre tipi multikristal silikon olan modülün etiket değerleri (Çizelge 1) kullanılarak ve bir tek bu modül türü için geçerli olacak şekilde geliştirilmiştir.

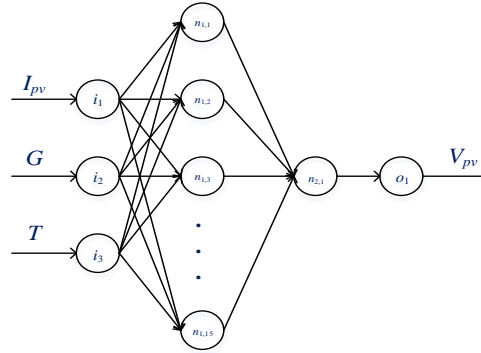
Çizelge 1. Modülün etiket değerleri.

| Argüman                      | Etiket Değeri |
|------------------------------|---------------|
| Maksimum Güç [W]             | 250           |
| Maksimum Güç Gerilimi [V]    | 29,98         |
| Maksimum Güç Akımı [A]       | 8,34          |
| Açık Devre Gerilimi [V]      | 37,41         |
| Kısa Devre Akımı [A]         | 8,79          |
| Maksimum Sistem Gerilimi [V] | 1000          |

PV panelinin YSA modeli, MATLAB’ da yer alan sinir ağı uydurma aracıyla (Neural Network Fitting Toolbox - NNFT) oluşturulmuştur. Emülatörde kullanılan YSA’ nın tasarımını dört aşamada incelemek mümkündür;

- YSA’nın eğitim ve testinde kullanılacak I-V karakteristik eğrisi verilerini içeren veri setinin oluşturulması: Simulink ortamında 250W bir güneş paneli modeli 400-1200 W/m<sup>2</sup> aralığında ışınım ve 10-70 °C aralığında modül sıcaklıkları için çalıştırılmış ve I-V karakteristik eğrisi veri seti hazırlanmıştır.
- YSA’ nın tasarım parametrelerinin belirlenmesi: YSA’ nın katman sayısı (giriş, çıkış ve gizli katmanlar), katmanlardaki nöron sayıları, çıkış aktivasyon fonksiyonu ve eğitim algoritması gibi parametreler ağın doğruluğunu ve performansını doğrudan etkilemektedir. Literatürde güneş paneli modellemede kullanılan YSA örnekleri de dikkate alınarak söz konusu YSA parametreleri

belirlenmiştir. Buna göre giriş katmanında modül sıcaklığı, ışıınım ve panel akımı girişleri için üç nöron, çıkış katmanında ise panel gerilimi için bir nöron kullanılmıştır. Giriş ve çıkış katmanları arasında 15 nöronlu bir gizli katman tercih edilmiştir (Şekil 6). Gizli katmanda sigmoid aktarma fonksiyonu kullanılırken çıkış katmanında doğrusal aktivasyon fonksiyonu seçilmiştir. Ayrıca YSA'nın eğitimi için Lavenberg-Marquardt algoritması kullanılmıştır.

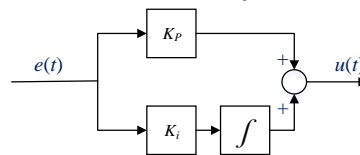


Şekil 6. Emülatörde kullanılan YSA topolojisi

- *MATLAB/NNFT yazılımında YSA'nın tasarlanması ve test edilmesi:* YSA verileri NNFT grafiksel arayüzüne girilerek ağı eğitimi ve testi gerçekleştirilmiştir. Veri setinin %80'i ağı eğitimi, %10'u ağı doğrulanmasında ve %10'u ağı testinde kullanılmıştır.
- *Tasarlanan YSA'nın aygıt yazılımına aktarılması:* NNFT arayüzünde tasarlanan YSA modeli; MATLAB fonksiyonu, C kodu veya Simulink bloğu olarak istenilen bir forma dönüştürülebilmektedir. Bu çalışmada emülatör aygıt yazılımı Simulink ortamında tasarlandığından dolayı YSA modelinin de Simulink bloğu olarak oluşturulması tercih edilmiştir. Her bir hücre grubunu ayrı ayrı modellemek için üç adet YSA bloğu kullanılmıştır. PV panelinin YSA bloğu, girişlerine uygulanan ışıınım, modül sıcaklığı ve PV panel akımı değerlerine bağlı olarak bir PV panel gerilimi değeri üretmektedir. YSA girişine uygulanan ışıınım ve modül sıcaklığı parametreleri arayüz yazılımından girilen veri setinden alınırken PV panel akımı güç devresinden ölçülen yük akımı geri besleme sinyalidir.

### Çalışma noktası kontrolörlerinin işletilmesi

PV panelinin YSA modeli tarafından üretilen PV panel gerilimi değeri, ilgili hücre grubunun çalışma noktası gerilimidir. Bu çalışma noktası gerilimi aygıt yazılımında belirli zaman aralıklarında üretilmektedir ve bu zaman aralığı arayüz yazılımından girilen bir parametreyle ayarlanabilmektedir. DC/DC dönüştürücü çıkışlarının, yeni çalışma noktası üretilene kadar geçen sürede, bu çalışma noktasında işletilmesi gerekmektedir. Dönüştürücü çıkışlarının söz konusu çalışma noktasında işletilebilmesi için kapalı çevrim bir kontrol döngüsü kurulmuş (Şekil 7) ve bu döngüde bir oransal-toplamsal (Proportional-Integral - PI) kontrolör kullanılmıştır.



Şekil 7. Çalışma noktası PI kontrolörünün yapısı

Kontrol döngüsünde referans gerilimi YSA tarafından üretilen çalışma noktası gerilimidir ve bu gerilimden DC/DC dönüştürücü çıkış gerilimi geri besleme sinyali çıkarılarak hata sinyali elde

edilmektedir. Hata sinyali paralel topolojiye sahip PI kontrolörle işlenerek DC/DC dönüştürücüyü kontrol eden PWM sinyalinin doluluk boşluk oranı (Duty Cycle -  $D$ ) ayarlanmaktadır. PI kontrolörün çıkış formülü Eşitlik 4. te verilmiştir.

$$u(t) = K_p \cdot e(t) + K_i \int e(t) \cdot dt \quad (4)$$

Burada;

$u(t)$ : Kontrolör çıkış sinyali, (%),

$e(t)$ : Hata sinyali, (V),

$K_p$ : Oransal kontrolör kazancı,

$K_i$ : Toplamsal kontrolör kazancıdır.

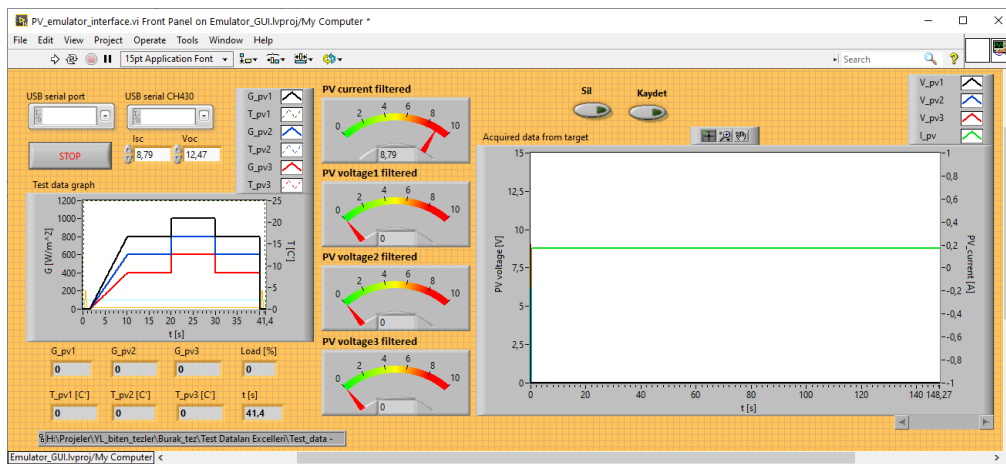
PI kontrolörün  $K_p$  ve  $K_i$  değerleri deneme yanılma yöntemiyle belirlenmiştir. Bu değerler sırasıyla 20 ve 5' tir.

### DC/DC dönüştürücü kontrol sinyallerinin üretilmesi

DC/DC dönüştürücüler yukarıda güç devresi bölümünde açıklandığı gibi PWM sinyalleri ile kontrol edilmektedir. Mikrodenetleyicinin gelişmiş zamanlayıcı birimlerinden TIMER3 PWM sinyallerini üretmek üzere yapılandırılmıştır. Üretilen PWM sinyalleri 15 kHz frekansa sahiptir ve doluluk oranı kaydedicisi (register) 16-bit çözünürlüktedir.

### Arayüz yazılımıyla veri alışverişinin sağlanması

Aygıt yazılımının önemli özelliklerinden birisi de arayüz yazılımıyla veri alışverişini gerçekleştirme fonksiyonudur. Bu fonksiyon emülasyon veri setinin arayüzden alınması ve emülatörden toplanan verilerin arayüze gönderilmesini kapsamaktadır. Bunu gerçekleştirmek için mikrodenetleyicinin seri haberleşme terminallerinden biri veri alma ve veri gönderme kesmeleriyle işletilmiştir.



Şekil 8. Arayüz yazılımı

### Arayüz Yazılımı

Arayüz yazılımı emülatörün işletileceği test verilerinin mikrodenetleyici aygıt yazılımına gönderilmesi ve emülatörden toplanan verilerin kayda alınması gibi iki temel görevi yerine getirmektedir. Aşağıda LabVIEW grafiksel programlama ortamında tasarımı gerçekleştirilen arayüz yazılımının ön paneli görülmektedir (Şekil 8). Arayüz üzerinde bulunan soldaki grafik ekranında emülasyonu yapılacak PV panelinin ışınım ve modül sıcaklığı parametreleri görüntülenmekte olup bu değerler bir tablo dosyası (Microsoft Excel) ile arayüze yüklenmektedir. Yükleme işleminin ardından veri setinde tanımlı olan

zaman aralığında kontrol birimine gönderilmekte ve emülatörden toplanan çalışma noktası akım ve gerilim verileri belirli bir zaman aralığında sağda görülen grafik bileşenine toplanıp görüntülenmektedir. Emülasyon tamamlandıktan sonra toplanan veriler arayüzde bulunan “Kaydet” tuşuna basılarak bir kayıt dosyasına kaydedilebilmektedir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Yukarıda tasarım bilgileri verilen emülatörün performansını test etmek için bir dizi deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu bölümde ilk olarak gerçekleştirilen performans testlerinin prosedürü verilecektir. Ardından bu testlerde kullanılan emülasyon senaryoları hakkında bilgiler verilecek ve bu senaryolarla gerçekleştirilmiş deneylerden elde edilen sonuçlar sunulacaktır. Son olarak test sonuçlarının karşılaştırılması yapılacak ve bunlar üzerinde gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonuçları sunulacaktır.

### Emülatörün Test Prosedürü

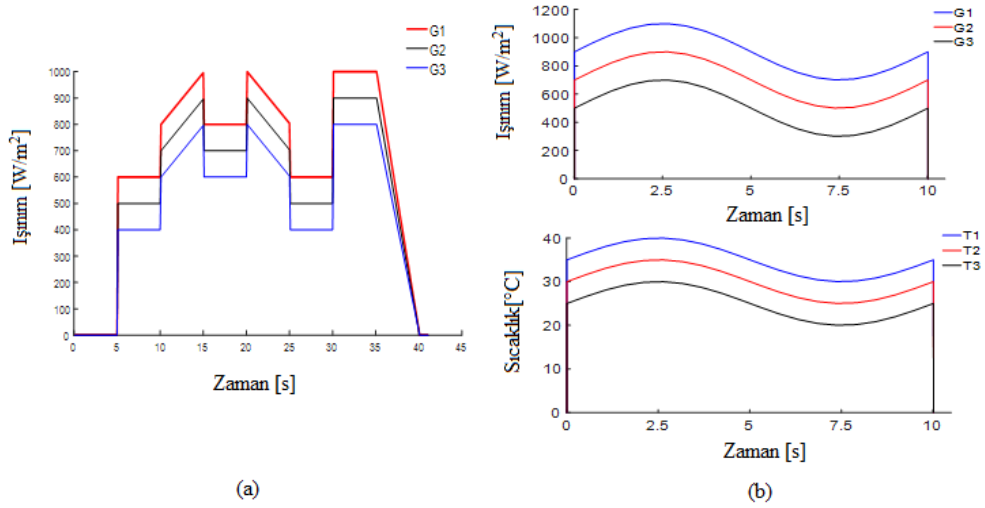
PV panellerinin çıkışı genellikle invertör veya DC/DC dönüştürücü gibi cihazlar üzerinden şebekeye veya çeşitli yüklerle bağlanmaktadır. İntertör ve DC/DC dönüştürücü gibi yükler doğrusal olmayan karakteristiğe sahiptirler ve bu yüklerin, özellikle bağlandıkları kaynağın güç kalitesine, olumsuz etkileri vardır. Bu çalışmada söz konusu doğrusal olmayan bu yüklerin etkilerini devre dışı bırakmak için emülatör çıkışının bir dirençle yüklendiği varsayılmış ve buna göre bir test prosedürü uygulanmıştır.

Öncelikle emülatörden alınan verilerin doğrulanabilmesi için Simulink ortamında emüle edilen PV panelinin bir modeli oluşturulmuştur. Bu PV modeli, emülatörün işletildiği test senaryolarıyla çalıştırılmış ve böylece PV modelinin simülasyon sonuçları elde edilebilmiştir. Emülasyon sürecinde ilk olarak bu çalışmaya özel tasarlanmış test senaryo dosyaları arayüz yazılımına yüklenerek emülasyon deneyi başlatılmaktadır. Ardından arayüz yazılımı test senaryolarındaki ışınım ve modül sıcaklığı verilerini, senaryoda belirtilen zaman aralıklarında aygıt yazılımına göndermekte ve aygıt yazılımı yine belirli bir zaman aralığında (bu çalışmada 50ms) güç devresinden topladığı çalışma noktası akım ve gerilim değerlerini arayüze göndermektedir. Sonra toplanan veriler bir dosyaya kaydedilerek deney sonlandırılmaktadır. Son olarak kaydedilen veriler ile PV modeli simülasyonundan elde edilen veriler MATLAB’da işlenerek grafiksel ve istatistiksel analizler gerçekleştirilmektedir.

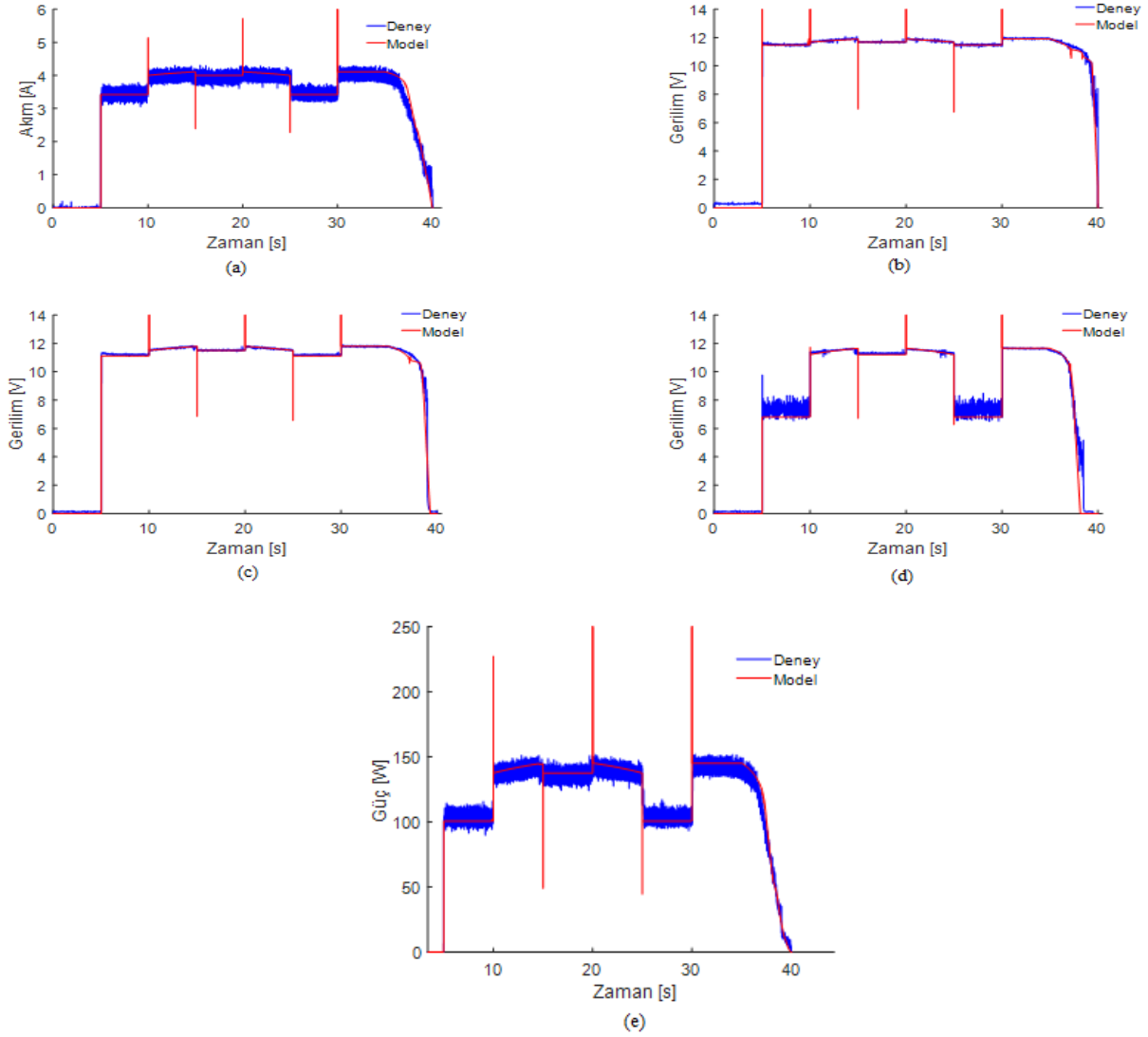
### Emülatör Test Senaryoları

Bu çalışmada, emülatörü test etmek için iki test senaryosu oluşturulmuştur. Bu senaryolarda emülatörün dinamik ve kalıcı durum performanslarını test etmek amaçlanmıştır. Oluşturulan senaryolar sırasıyla 40 ve 10 saniyelik senaryolardır. Tasarlanan emülatörün performansını ortaya koyabilmek adına, aslında çevresel koşullarda pek de mümkün gözükmeyen, gerçek ölçüm verileri yerine kısa zamanda daha rijit değişimlerin yaşandığı senaryolar oluşturma yöntemi tercih edilmiştir. Emülatörün dinamik performansını ortaya koymak için ani değişim gösteren ışınım ve modül sıcaklığı karakteristikleri oluşturulurken kalıcı durum performansını test etmek için sabit genlikle ya da sabit eğimle değişim gösteren karakteristikler oluşturulmuştur.

Şekil 9(a)’da birinci test senaryosuna ait zamana karşılık meydana gelen ışınım değişimleri verilmektedir. Verilen grafiklerde üç ışınım değişimi görülmekte olup bunlar emülatörün üç hücre grubunun ışınımını temsil etmektedir. Bu senaryoda üç hücre grubunun da modül sıcaklıklarının 25 °C değerinde sabit kaldığı varsayılmıştır. Hücre ışınım grafiklerinin genlikleri farklı olmakla birlikte üçü de aynı karakterde değişim göstermektedir. Bu senaryoda ani ışınım değişimleri oluşturularak emülatörün dinamik performansının testi ön planda tutulmuştur. Ayrıca sabit genlikli ve sabit eğimli değişimlerle de emülatörün kalıcı durum davranışı test edilebilmiştir.

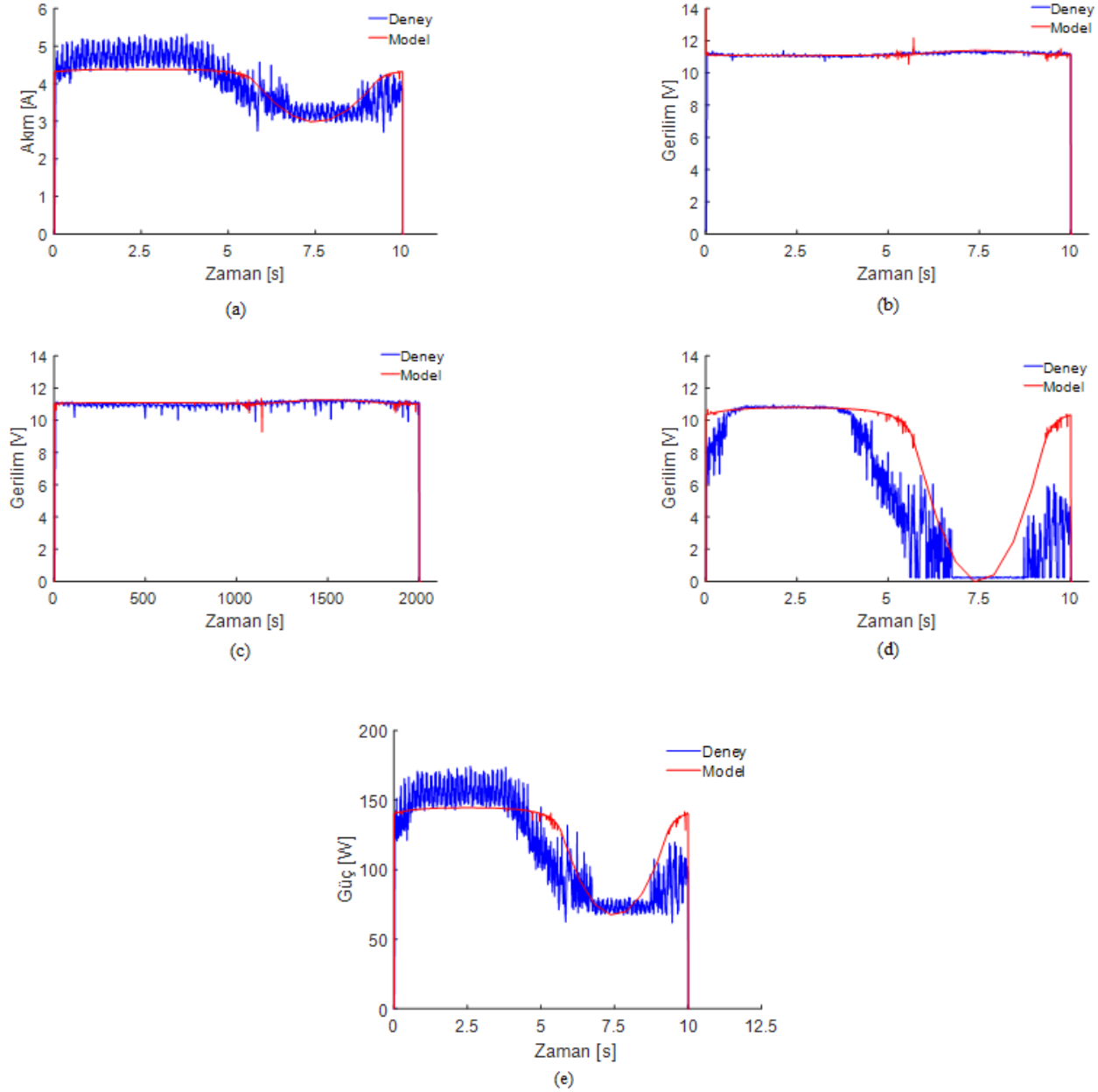


Şekil 9. Değişken ışınlam ve sabit modül sıcaklığı senaryosu (a) ve değişken ışınlam ve değişken modül sıcaklığı senaryosu (b)



Şekil 10. Senaryo 1' e ait deney ve model sonuçları: Senaryo 1 için akım sonuçlarının karşılaştırılması (a), Senaryo 1 için birinci hücre grubunun gerilim sonuçlarının karşılaştırılması (b), Senaryo 1 için ikinci hücre grubunun gerilim sonuçlarının karşılaştırılması (c), Senaryo 1 için üçüncü hücre grubunun gerilim sonuçlarının karşılaştırılması (d) ve Senaryo 1 için güç sonuçlarının karşılaştırılması (e)

Şekil 9(b)' de verilen ikinci senaryoda ise ışınım ve modül sıcaklıklarının birlikte benzer karakterde değişim gösterdiği bir senaryo görülmektedir. Burada ışınım ve modül sıcaklıkların periyodu 10 saniye olan bir sinüs fonksiyonu biçiminde değişim gösterdiği varsayılmıştır. Çünkü gerçekte de PV panelinde güç üretiminin artışına bağlı olarak hücrelerin modül sıcaklıkları da artış göstermektedir.



**Şekil 11.** Senaryo 2' ye ait deney ve model sonuçları: Senaryo 2 için akım sonuçlarının karşılaştırılması (a), Senaryo 2 için birinci hücre grubunun gerilim sonuçlarının karşılaştırılması (b), Senaryo 2 için ikinci hücre grubunun gerilim sonuçlarının karşılaştırılması (c), Senaryo 2 için üçüncü hücre grubunun gerilim sonuçlarının karşılaştırılması (d) ve Senaryo 2 için güç sonuçlarının karşılaştırılması (e)

### Elde Edilen Test Sonuçları

Birinci test senaryosundan elde edilen sonuçlar PV modelinin simülasyon sonuçlarıyla birlikte verilmiştir. Şekil 10(a), (b), (c), (d) ve (e)' de verilen sonuçlar PV çıkış gücü, PV akımı ve hücre gerilimleri grafiklerinden oluşmaktadır. Bütün grafiklerde PV model ve emülatör sonuçları oldukça yüksek oranda birbirleriyle örtüşmektedir. Şekil 10(e)' de yer alan güç grafiğine bakıldığında emülatörün maksimum gücünün yaklaşık %60' ında işletildiği görülmektedir. Şekil 10(b)' de en yüksek



ışınım ile beslenen hücre grubunun geriliminin MPP gerilimine ( $V_{mpp}$ ) yakın değerlerde salındığı görülmektedir. Şekil 10(d)' de yer alan üçüncü hücre grubunun gerilimine bakıldığında, ışınımın düşük olduğu aralıkta emülatör gerilimindeki salınımların arttığı ve bunun sebebinin PV panelinin doğrusal olmayan  $I-V$  karakteristiğinden kaynaklandığı değerlendirilmektedir.

İkinci test senaryosundan elde edilen sonuçlar da PV modelinin simülasyon sonuçlarıyla birlikte verilmiştir. Şekil 11(a), (b), (c), (d) ve (e)' de verilen sonuçlar ikinci senaryoya ait PV çıkış gücü, PV akımı ve hücre gerilimleri grafiklerinden oluşmaktadır. Üçüncü hücre grubunun gerilimindeki salınımlar, birinci ve ikinci hücre gruplarının gerilimindeki salınımlara göre daha fazladır. Bu durumun sebeplerinden ilki panelin doğrusal olmayan  $I-V$  karakteristiğine sahip olması, ikincisi ise emülatör yapısındaki YSA' nın eğitiminde kullanılan ışınım veri setinin 400-1200 W/m<sup>2</sup> aralığında olması ve üçüncü hücre grubuna uygulanan ışınımın bu aralığın dışında kaldığı durumlarda hatalı çıkış gerilimi üretebiliyor olmasıdır.

Ayrıca MATLAB ortamında elde edilen simülasyon sonuçlarından özellikle birinci senaryoda ışınımın düşen veya yükselen kenarlarında güç, akım ve gerilim grafiklerinde sıçramalar meydana gelmektedir. Bu durumun MATLAB simülasyon ortamında kullanılan modelin ani ışınım değişimlerine gösterdiği geçici rejim cevabından kaynaklandığı düşünülmektedir. İkinci senaryonun sinüzoidal yapısı nedeniyle burada diğer senaryodaki sıçramalar gözlemlenmemiştir.

Emülatörden ve simülasyondan elde edilen sonuçların ortalama değerleri karşılaştırmalı olarak Çizelge 2' de verilmiştir.

**Çizelge 2.** Ortalama değerler.

| İstatistiksel Yöntem | Argüman       | Deney   | Model   |
|----------------------|---------------|---------|---------|
| Senaryo 1            | $P_{pv}$ [W]  | 90,2234 | 92,9762 |
|                      | $I_{pv}$ [A]  | 3,1401  | 3,1945  |
|                      | $V_{pv1}$ [V] | 9,9556  | 10,098  |
|                      | $V_{pv2}$ [V] | 9,6898  | 9,8243  |
|                      | $V_{pv3}$ [V] | 8,4217  | 8,5562  |
|                      | $P_{pv}$ [W]  | 79,8201 | 82,7595 |
| Senaryo 2            | $I_{pv}$ [A]  | 2,8922  | 3,0234  |
|                      | $V_{pv1}$ [V] | 9,9239  | 10,7168 |
|                      | $V_{pv2}$ [V] | 9,5431  | 10,2517 |
|                      | $V_{pv3}$ [V] | 6,8962  | 8,0554  |

### Sonuçların İstatistiksel Yöntemler ile Karşılaştırılması

Bu bölümde emülatör ve simülasyon deneylerinden elde edilen sonuçların istatistiksel yöntemlerle analizi gerçekleştirilmiştir. Emülatör ve simülasyon sonuçlarının farkı alınıp bu farklar üzerinde, mutlak hataların integrali (Integral Absolute Error - IAE), karesel hataların ortalamasını karekökü (Root Mean Square Error - RMSE) ve korelasyon istatistiksel performans inceleme yöntemleri uygulanmıştır.

IAE genellikle kontrol sistemlerinde ve tahmin uygulamalarında kullanılan bir hata analizi türüdür. IAE, zaman içindeki tüm hataların toplamıdır. IAE hesaplamada kullanılan formül Eşitlik 5' te yer almaktadır. IAE değerinin küçüklüğü performansın iyi olduğunu göstermektedir.

$$IAE = \sum_{j=1}^n (y_j - y_j') \quad (5)$$

RMSE Eşitlik 6 kullanılarak hesaplanır. RMSE değerinin sıfıra yakın olması performansın yüksek olmasını ya da emülatör ve simülasyon sonuçlarının birbirine yakınlığını gösterir.

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{j=1}^n (y_j - y'_j)^2} \quad (6)$$

Korelasyon değeri Eşitlik 7 yardımıyla hesaplanır. Korelasyon, bağımsız ve bağımlı bir değişken arasındaki ilişkinin gücünü açıklarken, korelasyon katsayısı olan  $r_{xy}$  bir değişkenin varyansının ne kadarının ikinci değişkenin varyansını açıkladığını gösterir.

$$r_{xy} = \frac{\sum(x_i - x')(y_i - y')}{\sqrt{(\sum(x_i - x')^2)(\sum(y_i - y')^2)}} \quad (7)$$

Emülatör ve simülasyon deneylerinden elde edilen sonuçların istatistiki yöntemlerle analizi sonucu elde edilen sonuçlar Çizelge 3' te verilmiştir.

Çizelge 3 yakından incelendiğinde özellikle birinci senaryo için korelasyon değerlerinin bire çok yakın olduğu ikinci senaryo için ise 0,8-0,9 aralığında olduğu görülmektedir. Birinci senaryoda korelasyon değerlerinin yüksek çıkmasının sebebi sadece ışınım değerlerinin değiştirilip modül sıcaklıklarının sabit tutulması olabilir. Diğer taraftan ikinci senaryoda korelasyon değerlerinin düşük çıkmasının iki sebebi bulunabilir. Bunlardan ilki düşük ihtimal olmakla birlikte ışınım ve modül sıcaklıklarının birlikte değiştirilmiş olmasıdır. Daha yüksek ihtimalli olan ikincisi ise özellikle üçüncü hücre grubunun ışınım değerlerinin YSA eğitim veri setinin dışında değerler alması ve buna bağlı olarak YSA' nın hata payının yükselip model sonuçlarından farklı sonuçlar üretmesidir.

**Çizelge 3.** IAE, RMSE ve  $R^2$  değerleri.

| İstatistiki Yöntem | Argüman   | Senaryo 1 | Senaryo 2 |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|
| IAE                | $P_{pv}$  | 973       | 679       |
|                    | $I_{pv}$  | 1119      | 678       |
|                    | $V_{pv1}$ | 986       | 227       |
|                    | $V_{pv2}$ | 910       | 280       |
|                    | $V_{pv3}$ | 1192      | 2137      |
| RMSE               | $P_{pv}$  | 1,17      | 5,82      |
|                    | $I_{pv}$  | 4,91      | 2,63      |
|                    | $V_{pv1}$ | 6,18      | 2,63      |
|                    | $V_{pv2}$ | 5,70      | 3,80      |
|                    | $V_{pv3}$ | 13,41     | 40,73     |
| $R^2$              | $P_{pv}$  | 0,9895    | 0,8202    |
|                    | $I_{pv}$  | 0,9901    | 0,8547    |
|                    | $V_{pv1}$ | 0,9868    | 0,8823    |
|                    | $V_{pv2}$ | 0,9958    | 0,8727    |
|                    | $V_{pv3}$ | 0,9914    | 0,8353    |

## SONUÇ

Bu çalışma kapsamında kısmi gölgeleme etkilerini modelleyebilen bir PV emülatörünün tasarlanma aşamaları ve tasarlanan PV emülatörü performans testi sonuçları sunulmaktadır. Tasarlanan emülatörde kullanılan ARM tabanlı mikrodenetleyicinin MATLAB/Simulink ortamında grafiksel programlanması ve kontrol algoritmalarının aygıt yazılımına kolayca gömülebilmesi çalışmaya özgün bir boyut kazandırmaktadır. Yine emülatör tasarımındaki PV modeli YSA yöntemiyle oluşturulmuştur. Ayrıca bu çalışmaya özel tasarlanan arayüz yazılımı sayesinde emülatörün bilgisayardan kontrolü ve performans testlerinde veri toplanması basitleştirilmiştir. Gerçekleştirilen performans testlerinden elde edilen sonuçlar üzerinde yapılan istatistiki karşılaştırmalar tasarlanan emülatörün PV panellerinin

emülasyonunda kullanılabileceğini göstermiştir. Gelecekte emülatörde kullanılan PV modeli; arama tablosu, doğrudan referanslama gibi yöntemlerle elde edilebilir ve çalışma noktası kontrol döngüsünde; bulanık denetleyici, kendinden uyarlamalı PID gibi kontrolörler kullanılarak yeni çalışmalar yapılabilir. Yine geliştirilen PV emülatörünü gerçek ışınım ve sıcaklık ölçüm verilerini kullanarak daha uzun süreli testler yaparak emülatörün doğruluğunu kanıtlamak ve farklı tip ve etiket değerlerindeki modüller için yeni YSA' lar geliştirilerek tasarlanan emülatörün etki alanının genişletilmesi yine gelecekte yapılması planlanan çalışmalar arasındadır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü biriminin 16.FEN.BIL.33 numaralı projesiyle desteklenmiştir.

## Çıkar Çatışması

Bu makalenin yazarları Said Mahmut ÇINAR ve Burak ARSEVEN arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

## Yazar Katkısı

Bu makalenin yazarları Said Mahmut ÇINAR ve Burak ARSEVEN makaleye eşit oranda katkı sağlamışlardır.

## KAYNAKLAR

- Agrawal J H, Aware M V, 2012. Photovoltaic System Emulator. IEEE International Conference on Power Electronics, Drives and Energy Systems, 16-19 Aralık 2012, Bangaluru.
- Arseven B, Çınar, S M, 2017. Kısmi Gölgeleme Etkilerini Modelleyebilen Bir Güneş Paneli Emülatörü Tasarımı. International Advanced Researches and Engineering Congress, 16-18 Kasım 2017, Osmaniye.
- Arseven B, 2019. Kısmi Gölgeleme Etkilerini Modelleyebilen Bir PV Emülatör Tasarımı, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış).
- Atoche A C, Castillo J V, Ortegon-Aguilar J, Carrasco-Alvarez R, Gio J S, Colli-Menchi A, 2015. A High-Accuracy Photovoltaic Emulator System Using ARM Processors. Solar Energy, 120: 389-398.
- Ayop R, Tan C W, 2017. A Comprehensive Review on Photovoltaic Emulator. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 80: 430-452.
- Ayop R, Tan C W, 2019. Rapid Prototyping of Photovoltaic Emulator Using Buck Converter Based on Fast Convergence Resistance Feedback Method. IEEE Transaction on Power Electronics, 34: 8715-8723.
- Carralero L O L, Silva G S B S, Costa F F, Tahim A P N, 2019. PV Emulator Based on a Four-Switch Buck-Boost DC-DC Converter. 2019 IEEE 15th Brazilian Power Electronics Conference, 1-4 Aralık 2019, Santos.
- Chavarria J, Biel D, Guinjoan F, Poveda A, Masana F, Alarcon E, 2014. Low Cost Photovoltaic Array Emulator Design for the Test of PV Grid-Connected Inverters. 11th International Multi-Conference on Systems, Signals & Devices, 11-14 Şubat 2014, Barselona.
- Cordeiro A, Foito D, Fernão Pires V, 2015. A PV Panel Simulator Based on a Two Quadrant DC/DC Power Converter with a Sliding Mode Controller. International Conference on Renewable Energy Research and Applications, 22-25 Kasım 2015, Palermo.
- Ebrahim F A, Ahmed S M W, Elmasry S E, Mohammed O A, 2015. Implementation of a PV Emulator Using Programmable DC Power Supply. SoutheastCon 2015, 9-12 Nisan 2015, Fort Lauderdale.

- Gomez-Castaneda F, Tornez-Xavier G M, Flores-Nava N M, Arellano-Cardenas O, Moreno-Cadenas J O, 2014. Photovoltaic Panel Emulator in FPGA Technology Using ANFIS Approach. 11th International Conference on Electrical Engineering, Computing Science and Automatic Control, 29 Eylül-3 Ekim 2014, Campeche.
- Koran A, Sano K, Rae-Young K, Jih-Sheng L, 2010. Design of a Photovoltaic Simulator with a Novel Reference Signal Generator and Two-Stage LC Output Filter. IEEE Transactions on Power Electronics, 25: 1331-1338.
- Lu D D C, Nguyen Q N, 2012. A Photovoltaic Panel Emulator Using a Buck-Boost DC/DC Converter and a Low Cost Micro-Controller. Solar Energy, 86: 1477-1484.
- Midtgard O M, 2007. A Simple Photovoltaic Simulator for Testing of Power Electronics. 12th European Conference on Power Electronics and Applications, 2-5 Eylül 2007, Aalborg.
- Moussa I, Bouallegue A, Khedher A, 2017. New MPPT Algorithm Modeling for Photovoltaic Emulator Designed in FPGA. 2017 International Conference on Green Energy Conversion Systems, 23-25 Mart 2017, Hammamet.
- Ottieri C, Ojiako K, Alarefi S M S, 2020. Simulink Simulation of a Current Mode Control DC-DC Based PV Emulator: Sustainable Application of Power Electronics in Solar PV Education. 2020 International Symposium on Power Electronics, Electrical Drives, Automation and Motion, 24-26 Haziran 2020, Sorrento.
- Piazza M C D, Pucci M, Ragusa A, Vitale G, 2010. Analytic versus Neural Real-Time Simulation of a Photovoltaic Generator Based on a DC-DC Converter. IEEE Transactions on Industry Applications, 46: 2501-2510.
- Piazza M C D, Vitale G, 2012. Photovoltaic Sources: Modelling and Emulation. Springer-Verlag, Londra-İngiltere.
- Yarıkkaya S, Çınar S M, 2015. Bir Güneş Paneli Emülatörü Tasarımı. Otomatik Kontrol Ulusal Toplantısı, 10-12 Eylül 2015, Denizli.

**Atf İçin:** Erdoğan D, Yiğit K, Acarkan B, 2021. Bir Rüzgâr Enerji Santralının Güç Kapasitesine Bağlı Olarak Üretebileceği Elektrik Enerjisi Potansiyelinin Belirlenmesi – Artvin İli Örneği. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 998-1013.

**To Cite:** Erdoğan D, Yiğit K, Acarkan B, 2021. Determination of the Electrical Energy Production Potential of a Wind Power Plant Depending on the Power Capacity: a Case Study for Province of Artvin. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 998-1013.

**Bir Rüzgâr Enerji Santralının Güç Kapasitesine Bağlı Olarak Üretebileceği Elektrik Enerjisi Potansiyelinin Belirlenmesi – Artvin İli Örneği**

**Durukan ERDOĞAN<sup>1</sup>, Kenan YİĞİT<sup>2</sup>, Bora ACARKAN<sup>1\*</sup>**

**ÖZET:** Bu çalışmada, Weibull olasılık yoğunluk fonksiyonu ve simülasyon yaklaşımı kullanılarak Artvin ili Merkez ilçesinin rüzgâr enerjisi potansiyeli hesaplanmıştır. Weibull olasılık yoğunluk fonksiyonun şekil ve ölçek parametrelerinin hesaplanmasında ortalama ve standart sapma, moment, enerji örneği, grafik, maksimum olabirlik ve modifiye edilmiş maksimum olabirlik yöntemleri kullanılarak 24 metre, 59 metre ve 120 metre kule yüksekliğindeki rüzgâr hızlarının modellenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu modellemelerin  $R^2$ , RMSE, MSE ve  $X^2$  yöntemleri ile hata analizleri yapılarak en tutarlı matematiksel yöntemin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca 100 kW, 1 MW ve 5 MW kurulu güce sahip rüzgâr enerji santrali için kapasite faktörleri hesaplanmış ve üretilen elektrik enerjisi potansiyeli analiz edilmiştir. Çalışma neticesinde maksimum olabirlik ve modifiye edilmiş maksimum olabirlik yöntemlerinin hata oranı en az olan yöntemler olduğu saptanmıştır. Daha yüksek rakımlarda daha yüksek enerji üretim potansiyelinin sağlanacağı ve daha yüksek kurulu güce sahip rüzgâr enerji santralının en iyi kapasite faktörünü ihtiva edeceği sonucuna ulaşılmıştır. Weibull olasılık yoğunluk fonksiyonu ve simülasyon yaklaşımı sonucunda Artvin ilinin yıllık elektrik enerjisi ihtiyacının 100 kW kurulu güce sahip bir sistem ile %0.036 ila %0.075 oranında, 1 MW güce sahip bir sistem ile %0.384 ila %0.773 oranında, 5 MW güce sahip bir sistem ile %1.983 ila %4.051 arasında karşılanabileceği tahmin edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Rüzgâr Enerji Santrali, Weibull, Kapasite Faktörü, Elektrik Enerjisi, Enerji Verimliliği

**Determination of the Electrical Energy Production Potential of a Wind Power Plant Depending on the Power Capacity: a Case Study for Province of Artvin**

**ABSTRACT:** In this study, wind energy potential of the central district of Artvin province was calculated by using Weibull probability density function and simulation approaches. In the calculation of the shape and scale parameters of the Weibull probability density function, the modeling of the wind speeds of the central district of Artvin at 24 meters, 59 meters and 120 meters altitudes was performed using the average and standard deviation, moment, energy pattern, graphical, maximum likelihood and modified maximum likelihood methods. It is aimed to calculate the most consistent mathematical method by evaluating these models with  $R^2$ , RMSE, MSE, and  $X^2$  error analysis. Also, the capacity factors were calculated for the 100 kW, 1 MW and 5 MW wind power plants and the potential of electrical energy that can be produced has been analyzed. As a result of the study, it has been determined that the maximum likelihood and modified maximum likelihood methods have the lowest error rate. It has been concluded that higher energy production potential will be achieved at higher altitudes and that the wind power plant with higher installed power will contain the best capacity factor. As a result of the Weibull probability density function and simulation approaches, the annual electrical energy need of Artvin province can be met between at 0.036% and 0.075% with a system of 100 kW, between at 0.384% and 0.773% with a system of 1 MW, and between at 1.983% and 4.051% with a system of 5 MW installed power capacity.

**Keywords:** Wind Power Plant, Weibull, Capacity Factor, Electrical Energy, Energy Efficiency

<sup>1</sup> Durukan ERDOĞAN (Orcid ID: 0000-0003-2395-7668), Bora ACARKAN (Orcid ID: 0000-0002-5697-3157), Yıldız Teknik Üniversitesi, Elektrik Elektronik Fakültesi, Elektrik Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup> Kenan YİĞİT (Orcid ID: 0000-0002-4165-4081), Yıldız Teknik Üniversitesi, Gemi İnşaatı ve Denizcilik Fakültesi, Gemi Makineleri İşletme Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Durukan ERDOĞAN, e-mail: drukanerdogan@gmail.com

Bu çalışma Durukan ERDOĞAN'ın Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

## GİRİŞ

Yenilenebilir enerji kaynaklarından olan rüzgâr enerjisinin kullanım oranı gün geçtikçe artmakta ve ülkelerin öncelikli yatırım yaptığı alanlar içerisine girmektedir. Konu Türkiye açısından ele alındığında, yenilenebilir enerji kaynaklarının her geçen gün ulusal elektrik sistemine dâhil edildiğini ve kurulu güç oranlarının sürekli arttığını söylemek mümkündür. Türkiye’de elektrik enerjisi kurulu gücü Ekim 2020 sonu itibarı ile yaklaşık 93919 MW olmuştur. Güneş enerjisi, rüzgâr enerjisi, jeotermal enerji ve hidrolik enerji gibi yenilenebilir enerji kaynakları toplam kurulu gücün %49’unu oluşturmaktadır. Hidrolik enerji (%31.8) kaynağından sonraki en yüksek kurulu güç oranı ise rüzgâr enerjisine (%8.9) aittir (Anonim, 2020a). 2020 yılı ekim ayı itibarı ile Türkiye’deki Rüzgâr Enerjisi Santrali (RES) kurulu gücü yaklaşık 8330 MW seviyesine çıkmıştır. Türkiye’nin 30 ilinde RES uygulanmakta ve bu illerden İzmir ve Balıkesir RES kapasitesi bakımından ilk iki sırayı almaktadır (Anonim, 2020b).

Dünyada olduğu gibi Türkiye’de de RES sistemleri farklı açılardan incelemekte ve kullanım potansiyelleri üzerine araştırmalar yapılmaktadır. İlkiliç ve Aydın (2015), Türkiye’nin kıyı bölgelerine ait rüzgâr enerjisi potansiyelini incelemiş ve bu bölgelerde RES sisteminin kullanımına yönelik çalışmalar yapmışlardır. Şenel ve Koç (2015), çalışmalarında Dünya’da ve Türkiye’de rüzgâr enerjisinin kullanım potansiyelini ve kurulu güçlerini inceleyerek karşılaştırma analizleri yapmışlardır. Kaya ve ark. (2016), rüzgâr türbin modelleri kullanarak Kastamonu ili için elektrik enerjisi üretim potansiyelini incelemişlerdir. Aydın ve Çunkaş (2019), Artvin ili Çoruh Üniversitesi Seyitler Yerleşkesine ait bir tesis için 400 kW kurulu güce sahip fotovoltaik güneş paneli ve 100 kW kurulu güce sahip rüzgâr türbini sisteminin fizibilite çalışmasını yapmışlardır.

Rüzgâr türbinlerinin en önemli iki dezavantajı, yüksek kurulum bedelleri ve üretimin belirsiz olmasıdır. Bu açıdan doğru rüzgâr türbin seçimi hayati önem taşımaktadır. En uygun rüzgâr türbinin seçilebilmesi için, rüzgâr potansiyel analizlerinin oldukça hassas yapılması büyük önem taşımaktadır. Rüzgâr potansiyel analizlerinde Weibull olasılık fonksiyonu yöntemi en çok kullanılan istatistiksel dağılımlardan biridir (Kurban ve ark., 2007). Literatürde, Hulio ve Jiang (2020), Weibull olasılık fonksiyonunu kullanarak Karacahi bölgesi için iki farklı yükseklikteki güç yoğunluklarını ve kapasite faktörlerini tespit etmişlerdir. Liu ve ark. (2019), Weibull olasılık fonksiyonunu kullanarak Çin’in rüzgâr enerji haritasını oluşturmayı amaçlamışlardır. Shoaib ve ark. (2019), çalışmalarında Jhampir bölgesinin rüzgâr enerji üretimini hesaplamışlardır. Sedaghat ve ark. (2020), Weibull olasılık fonksiyonunu kullanarak kapasite faktörünün optimizasyonunu yapmışlardır. Türkiye’de de bu konu üzerine bazı çalışmalar yapılmıştır. Kaplan (2016), Rayleigh ve Weibull yöntemlerini kullanarak Osmaniye bölgesi için rüzgâr enerjisi potansiyelini analiz etmiştir. Dinçer ve ark. (2017), Kilis ili için farklı yüksekliklerdeki rüzgâr hızlarını kullanarak bu yüksekliklere ait rüzgâr potansiyellerini Weibull olasılık fonksiyonunu kullanarak hesaplamışlardır. Arslan ve ark. (2018), Weibull olasılık fonksiyonunu kullanarak Çanakkale ve İstanbul illerinin rüzgâr güç yoğunluklarını hesaplamışlardır. Doğanşahin ve ark. (2019), Weibull olasılık fonksiyonunun parametrelerini moment yöntemi, grafik yöntemi, maksimum olasılık yöntemi ve en küçük kareler yöntemlerini kullanarak hesaplamış ve kapasite faktörlerini belirlemişlerdir. Gungor ve ark. (2020), Weibull olasılık fonksiyonunun parametrelerini en küçük kareler yöntemini, ortalama ve standart sapma yöntemini, maksimum olasılık yöntemi ve enerji örneği yöntemi ile hesaplanmış ve bölgenin ekonomik ve performans analizlerini yapmışlardır. Almalı ve ark. (2013) ortalama rüzgâr hızı ve güç yoğunluğunun tahmin edilmesinde maksimum olasılık, en küçük kareler ve moment yöntemlerini test etmişlerdir.

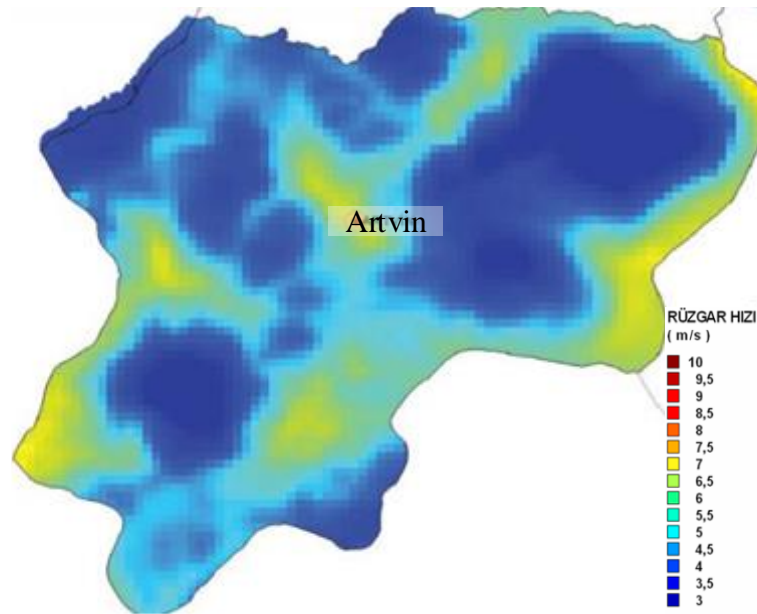
Literatürden görüleceği üzere Artvin İli için rüzgâr enerjisi potansiyelinin tespitine yönelik bazı çalışmaların yapıldığı fakat bu çalışmalarda Weibull olasılık fonksiyonu ve simülasyon yaklaşımı

yönteminin yeterince incelenmediği gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, Weibull olasılık yoğunluk fonksiyonu ve simülasyon yaklaşımı kullanılarak henüz RES uygulaması bulunmayan Artvin ili Merkez ilçesi şartlarında kurulabilecek 100 kW, 1 MW ve 5 MW kapasiteli RES sistemleri için rüzgâr enerjisi potansiyeli hesaplanmıştır. Weibull olasılık fonksiyonu analizine ait parametrelerin belirlenmesi için standart sapma ve ortalama yöntemi, moment yöntemi, enerji örneği yöntemi, grafik yöntemi, maksimum olasılık yöntemi ve modifiye edilmiş maksimum olasılık yöntemi kullanılmıştır. Hesaplamalar sonucunda  $R^2$ , kök ortalama kare hata (RMSE), ortalama kare hata (MSE) ve  $X^2$  hata analiz yöntemleri ile parametre tespitinde kullanılan yöntemlerin analizleri yapılmıştır. Simülasyon çalışmasında ise Matlab&Simulink programı kullanılarak RES sistemine ait kapasite faktörü ve elektrik enerjisi üretim potansiyeli analiz edilmiştir.

## MATERYAL VE METOT

### Çalışma Alanı

RES kullanım potansiyelini incelemek amacıyla çalışma alanı olarak Türkiye'nin Artvin ili Merkez ilçesi seçilmiştir. Yenilenebilir Enerji Genel Müdürlüğü (YEGM) tarafından hazırlanan rüzgâr enerjisi potansiyeli atlasına (Şekil 1) ve kurulabilecek RES kapasitesi verilerine (Çizelge 1) göre Artvin ilinin Merkez ilçesinde ve bazı bölgelerde RES kurulumu için yeterli uygun alan ve rüzgâr hızı potansiyelinin olduğu görülmektedir (Anonim, 2019a).

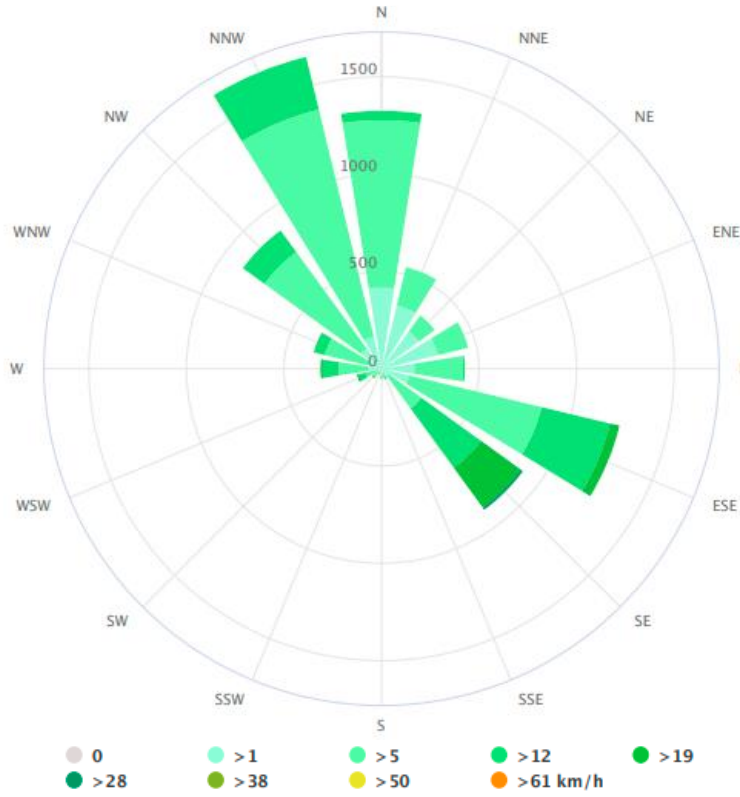


Şekil 1. Artvin ili rüzgâr hızı dağılımı – 50m

Çizelge 1. Artvin iline kurulabilecek RES güç kapasitesi

| Yıllık Güç Yoğunluğu -<br>50 m ( $W m^{-2}$ ) | Yıllık Ortalama Rüzgâr Hızı -<br>50 m ( $m s^{-1}$ ) | Toplam Alan<br>( $km^2$ ) | Toplam Kapasite<br>(MW) |
|---|--|---------------------------|-------------------------|
| 300- 400                                      | 6.8 - 7.5  | 1.94                      | 9.68                    |
| 400- 500                                      | 7.5 - 8.1  | 0.02                      | 0.08                    |
| 500- 600                                      | 8.1 - 8.6  | 0.00                      | 0.00                    |
| 600- 800                                      | 8.6 - 9.5  | 0.00                      | 0.00                    |
| > 800   | > 9.5  | 0.00                      | 0.00                    |
|   |  | 1.96                      | 9.76                    |

Ayrıca, Artvin ili rüzgâr hızları ve yönleri rüzgârgülü şeklinde Şekil 2’de verilmiştir (Anonim, 2020c).



Şekil 2. Artvin ili rüzgârgülü haritası

Şekil 1, Artvin iline ait coğrafi alanlara göre rüzgâr hızlarının dağılımını, Şekil 2 ise rüzgâr hızlarının coğrafi yönler göre dağılımını göstermektedir. Rüzgârgülü haritası ile yılda kaç saat, belirtilen yönde rüzgâr estiği gözlemlenebilir. Rüzgârın belirli alanlarda ve yönlerde yoğunlaşmış olması o bölgenin RES kurulumu için daha elverişli olduğu anlamına gelmektedir.

### Weibull Olasılık Fonksiyonu

Rüzgâr enerji potansiyelinin belirlenmesinde en çok kullanılan yöntemlerden birisi de Weibull olasılık fonksiyonudur (Hulio ve Jiang, 2020). Weibull olasılık yoğunluk fonksiyonu ile rüzgâr hızları modellenebilir (Akpınar ve Akpınar, 2005). Birçok farklı bölge için uygulanabilir olan esnekliği ve güvenilirliği yüksek bir yöntemdir. İki parametrelili Weibull olasılık yoğunluk fonksiyonu  $f(V)$  ve kümülatif dağılım fonksiyonu  $F(V)$  sırasıyla Eşitlik 1. ve Eşitlik 2. ile ifade edilebilir.

$$f(V) = \left(\frac{k}{c}\right) \left(\frac{V}{c}\right)^{k-1} \exp \left[ -\left(\frac{V}{c}\right)^k \right] \quad (1)$$

$$F(V) = 1 - \exp \left[ -\left(\frac{V}{c}\right)^k \right] \quad (2)$$

Burada,  $V$  rüzgâr hızını,  $k$  şekil parametresini,  $c$  ise ölçek parametresini ifade eder.  $k$  parametresinin düşük olması o bölgenin daha fırtınalı olduğuna işaret ederken, yüksek  $k$  parametresi o bölgede daha istikrarlı rüzgârların olduğunu gösterir.  $c$  parametresi ise rüzgâr verisinin yatay olarak dağılımının genişliğini göstermektedir (Anonim, 2020d).



Weibull parametrelerinin hesaplanmasında standart sapma ve ortalama yöntemi, moment yöntemi, enerji örneği yöntemi, grafik yöntemi, maksimum olabirlik yöntemi ve modifiye edilmiş maksimum olabirlik yöntemi gibi farklı yaklaşımlar uygulanmıştır.

Standart sapma ve ortalama yöntemi kullanılarak rüzgâr hızının ortalamasının ve standart sapmasının, Weibull parametrelerine bağlı olduğu fonksiyonlar ile Eşitlik 3. ve Eşitlik 4 kullanılarak şekil ve ölçek parametreleri bulunabilmektedir (Keyhani ve ark., 2019).

$$k = \left( \frac{\sigma}{V_{ort}} \right)^{-1.086} \quad (3)$$

$$c = \frac{V_{ort}}{\Gamma\left(1 + \frac{1}{k}\right)} \quad (4)$$

Burada,  $\sigma$  rüzgâr hızının standart sapmasını,  $V_{ort}$  ise rüzgâr hızının ortalamasını,  $\Gamma$  ise gama fonksiyonunu ifade eder. Gama fonksiyonu ve ortalama rüzgâr hızı sırasıyla Eşitlik 5. ve Eşitlik 6. ile gösterilebilir.

$$\Gamma(k) = \int_0^{\infty} t^{k-1} e^{-t} dt \quad (5)$$

$$V_{ort} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N V_i \quad (6)$$

Burada,  $N$  rüzgâr hızı verisi sayısını,  $V_i$  ise ilgili rüzgâr hızını ifade eder. Rüzgâr hızının standart sapması ise Eşitlik 7. ile hesaplanabilir.

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (V_i - V_{ort})^2} \quad (7)$$

Moment yönteminde Eşitlik 8. ve Eşitlik 9. kullanılarak,  $k$  ve  $c$  parametrelerine ulaşılabilir (Doğanşahin ve ark., 2019).

$$M_r = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n x_i^r \quad (8)$$

$$M_r = c^r \Gamma\left(1 + \frac{r}{k}\right) \quad (9)$$

Burada,  $x_i$  i numaralı veriyi,  $M_r$  ise rüzgâr hızı verisinin  $r$ . dereceden momentini ifade eder.

Enerji örneği yönteminde  $k$  parametresi Eşitlik 10. ve Eşitlik 11. ile  $c$  parametresi ise Eşitlik 4. ile hesaplanabilir (Akdağ ve Güler, 2015).

$$k = 1 + \frac{3.69}{(E_{pf})^2} \quad (10)$$

$$E_{pf} = \frac{(V^3)_{ort}}{(V_{ort})^3} \quad (11)$$

Burada  $E_{pf}$  enerji örneği katsayısını,  $V$  ise rüzgâr hızını ifade eder.

Eşitlik 12. ile ifade edilen grafik yönteminde Eşitlik 2'ye çift logaritmik dönüşüm uygulanır. Bu işlem sonucunda ulaşılan denklemin sol kısmı denklemin sağ kısmına göre lineer bir değişim gösterecektir (Chang, 2011). Bu doğrunun eğimi  $k$  parametresini vermektedir.  $c$  parametresi ise doğrunun  $y$  eksenini kesişim noktasını ifade etmektedir.

$$\ln[-\ln(1 - F(V))] = k \ln V - k \ln c \quad (12)$$

Maksimum olabilirlik yönteminde k ve c ifadeleri Eşitlik 13. ve Eşitlik 14. ile elde edilebilir (Ahmed, 2015).

$$k = \left[ \frac{\sum_{i=1}^N V_i^k \ln(V_i)}{\sum_{i=1}^N V_i^k} - \frac{\sum_{i=1}^N \ln(V_i)}{N} \right]^{-1} \quad (13)$$

$$c = \left[ \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N V_i^k \right]^{1/k} \quad (14)$$

Burada,  $V_i$  ilgili rüzgâr hızını ifade eder.

Modifiye edilmiş maksimum olabilirlik yönteminde ise k ve c ifadeleri Eşitlik 15. ve Eşitlik 16. kullanılarak elde edilebilir (Ahmed, 2015).

$$k = \left[ \frac{\sum_{i=1}^N V_i^k \ln(V_i) p(V_i)}{\sum_{i=1}^N V_i^k p(V_i)} - \frac{\sum_{i=1}^N \ln(V_i) p(V_i)}{p(V \geq 0)} \right]^{-1} \quad (15)$$

$$c = \left[ \frac{1}{p(V \geq 0)} \sum_{i=1}^N V_i^k p(V_i) \right]^{1/k} \quad (16)$$

Burada,  $V_i$  ilgili rüzgâr hızını ifade eder.  $p(V_i)$  ile ifade edilen parametre ilgili rüzgâr hızının dâhil olduğu grubun frekansını ifade ederken,  $p(V \geq 0)$  ile gösterilen parametre ise rüzgâr hızının 0 veya 0'dan büyük olma olasılığını ifade eder.

### İstatistiksel Hata Analizi

İstatistiksel hata analiz yöntemleri kullanılarak mevcut verilere en tutarlı Weibull olasılık dağılım fonksiyonu tespit edilebilmektedir. Bu çalışmada, rüzgâr hızı veri analizi için literatürde sıklıkla karşılaşılan hata analiz yöntemleri seçilerek Weibull olasılık dağılım fonksiyonlarının uyumluluğu analiz edilmiştir. Hata analizlerinde, gerçek rüzgâr hızı dağılım frekansları ile Weibull olasılık dağılım fonksiyonlarının frekansları analiz edilmiş ve karşılaştırması yapılmıştır.

Weibull olasılık fonksiyonunun şekil ve ölçek parametrelerinin bulunması için kullanılan standart sapma ve ortalama yöntemi, moment yöntemi, enerji örneği yöntemi, grafik yöntemi, maksimum olabilirlik yöntemi ve modifiye edilmiş maksimum olabilirlik yöntemleri için hata analizleri yapılmıştır. Hata analizinde  $R^2$ , RMSE, MSE ve  $X^2$  analiz yöntemleri kullanılmıştır.

$R^2$  hata analizi için Eşitlik 17.'den faydalanılmıştır.

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - z_i)^2 - \sum_{i=1}^N (y_i - x_i)^2}{\sum_{i=1}^N (y_i - z_i)^2} \quad (17)$$

Burada,  $y_i$  ölçülmüş rüzgâr verisini,  $x_i$  tahmin edilen rüzgâr verisini,  $z_i$  ise  $y_i$  parametresinin ortalamasını ifade eder.

RMSE hata analizi için Eşitlik 18. kullanılmıştır.

$$RMSE = \left[ \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_i - x_i)^2 \right]^{1/2} \quad (18)$$

MSE hata analizi için Eşitlik 19. kullanılmıştır.

$$MSE = \left[ \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_i - x_i)^2 \right] \quad (19)$$

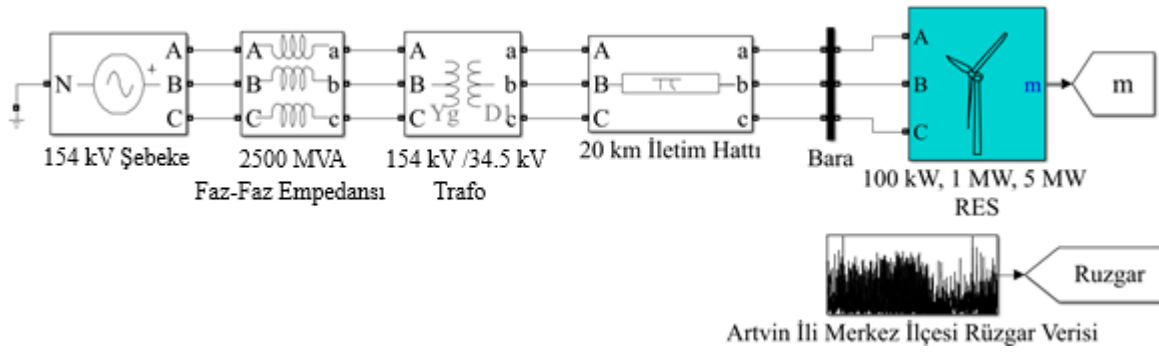
$X^2$  hata analizi için Eşitlik 20. kullanılmıştır.

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \frac{(y_i - x_i)^2}{x_i} \quad (20)$$

Hata analizi yöntemlerinde en iyi sonucu belirlemek için  $R^2$  analizinde en yüksek değere, RMSE, MSE ve  $X^2$  yöntemlerinde ise en düşük değere bakılması gerekmektedir.

### Simülasyon Yöntemi

Simülasyon çalışmasında Matlab&Simulink programı kullanılmıştır. Şekil 3'te görüldüğü gibi RES sistemi Türkiye elektrik sistemine entegre edilerek modelleme işlemi yapılmıştır. Modelleme sonrası simülasyon çalışmaları ile RES sistemine ait kapasite faktörü ve elektrik enerjisi üretim potansiyeli incelenmiştir.



Şekil 3. RES sistemi modeli genel görünümü

Şekil 3'teki modelin sol kısmı ulusal elektrik şebeke sistemi için tasarlanmıştır. Sistemin gerilim değeri 154/34.5 kV seviyesine, frekans değeri ise Türkiye güç sisteminin değeri olan 50 Hz seviyesine ayarlanmıştır. Modelin sağ kısmı ise RES sistemi için tasarlanmıştır. Bu kısımda Artvin ili Merkez ilçesine ait bir yıllık saatlik rüzgâr verisi modele tanımlanmıştır.

### Kapasite Faktörü

Bir bölgenin rüzgâr potansiyelinin hesaplanmasında en önemli faktör rüzgâr hızlarıdır. Rüzgâr hızları üzerinden yapılacak hesaplamalarda kapasite faktörü ise çok belirleyici bir özelliktir. Kapasite faktörü Eşitlik 21. ile açıklanabilir.

$$KF = \frac{P_{ort}}{P_n} \quad (21)$$

Burada,  $P_{ort}$  ortalama üretilmiş olan gücü,  $P_n$  ise sistemin nominal gücünü ifade eder.  $P_{ort}$  parametresinin Weibull olasılık fonksiyonları üzerinden hesaplanabilmesi için Eşitlik 22. kullanılabilir.

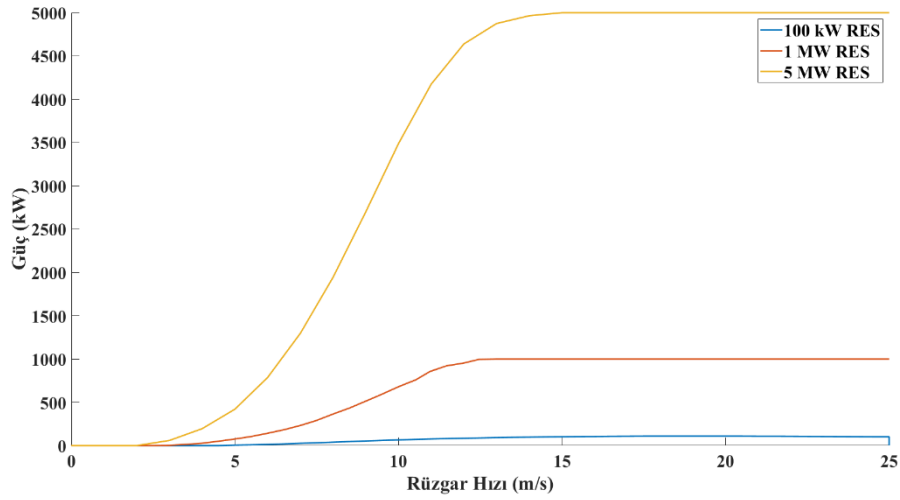
$$KF = \frac{1}{P_n} \int_0^{\infty} P(V) f(V) \cdot dv \quad (22)$$

Burada,  $f(V)$  olasılık yoğunluk fonksiyonunu,  $P(V)$  ise türbinin belli rüzgâr aralıklarındaki güç değerlerini ifade eder. Belli aralıklardaki rüzgâr güç çıkışı değerleri Eşitlik 23. ile ifade edilir.

$$P_{ort} \rightarrow \begin{cases} V < V_{cin} \rightarrow P_{ort} = 0 \\ V_{cin} \leq V < V_n \rightarrow P_{ort} = P(v) \\ V_n \leq V < V_{Cout} \rightarrow P_{ort} = P_n \\ V_{Cout} \leq V \rightarrow P_{av} = 0 \end{cases} \quad (23)$$

Burada,  $V_{cin}$  parametresi devreye girme rüzgâr hızını,  $V_n$  nominal hızı,  $V_{Cout}$  devreden çıkma rüzgâr hızını,  $P(v)$  ise türbinin devreye girdiği rüzgâr hızı ile nominal güce ulaştığı hız arasında kalan bölgeyi

ifade eder (Shoaib ve ark., 2019). Bu bölgenin fonksiyon çıktısı için türbinlerin güç çıkışı eğrileri Şekil 4’te verilmiştir.



Şekil 4. RES'e ait güç eğrileri

Yukarıdaki eğrilerin,  $P(V)$  ile ifade edilen bölgeye ait fonksiyonları, fonksiyon yerleştirme ile elde edilmiştir. Elde edilen fonksiyonlar Eşitlik 24., Eşitlik 25. ve Eşitlik 26. ile ifade edilmiştir.

$$P_{100kW}(V) = 0.009592V^4 - 0.463V^3 + 7.422V^2 - 36.16V + 51.08 \quad (24)$$

$$P_{1MW}(V) = -0.2946V^4 + 7.697V^3 - 58.3V^2 + 202.2V - 259.5 \quad (25)$$

$$P_{5MW}(V) = -0.5519V^4 + 9.394V^3 + 21.88V^2 - 329.1V + 665.5 \quad (26)$$

İfade edilen eşitlikler, ilgili fonksiyonda yerine yazılarak kapasite faktörleri hesaplanmıştır.

### RES ve Rüzgâr Hızı Tanımı

Farklı kapasitelere sahip RES sistemlerinin enerji üretim potansiyelini belirlemek için 100 kW, 1 MW ve 5 MW kurulu güce sahip rüzgâr türbini modelleri kullanılmıştır. Literatürden elde edilen 24 m (Anonim, 2020e), 59 m (Anonim, 2020f) ve 120 m (Anonim, 2020g) kule yüksekliğine sahip rüzgâr türbinlerine ait teknik özellikler sırasıyla Çizelge 2’de gösterilmiştir.

Çizelge 2. Hesaplamalarda kullanılan rüzgâr türbinlerinin teknik özellikleri

| Parametre                  | 100 kW RES            | 1 MW RES             | 5 MW RES             |
|----------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| Nominal güç                | 100 kW                | 1 MW                 | 5 MW                 |
| Nominal Kule yüksekliği    | 24 m                  | 59 m                 | 120 m                |
| Rotor çapı                 | 20 m                  | 58.6 m               | 128 m                |
| Devreye girme rüzgâr hızı  | 4.5 m s <sup>-1</sup> | 3 m s <sup>-1</sup>  | 2 m s <sup>-1</sup>  |
| Nominal rüzgâr hızı        | 13 m s <sup>-1</sup>  | 13 m s <sup>-1</sup> | 14 m s <sup>-1</sup> |
| Devreden çıkma rüzgâr hızı | 25 m s <sup>-1</sup>  | 25 m s <sup>-1</sup> | 27 m s <sup>-1</sup> |

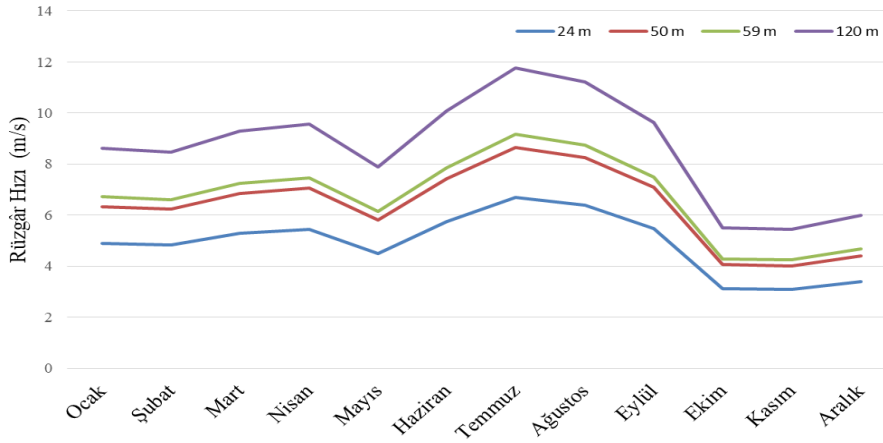
Rüzgâr hızı, rüzgâr enerji potansiyeli hesaplamalarında en önemli yere sahiptir. Bu çalışmada Meteoroloji Genel Müdürlüğü (MGM) tarafından sağlanan Artvin ili Merkez ilçesine ait saatlik rüzgâr hızı verileri kullanılmıştır. Kullanılan saatlik rüzgâr verileri Mart 2018 ile Mart 2019 tarihleri arasında kapsamaktadır (MGM, 2019). MGM’den temin edilen veriler YEGM Rüzgâr Enerjisi Potansiyeli

Atlasında Artvin ili için verilen değerler ile harmanlanarak 100 kW, 1 MW ve 5 MW kapasiteli RES için 24 m, 59 m ve 120 m yüksekliğine normalize edilmiştir. İstenilen yüksekliklerdeki rüzgâr hızları Hellman katsayısı ( $\alpha$ ) kullanılarak tahmin edilmiştir. Hellman katsayısı Eşitlik 26. ile hesaplanabilir.

$$\left(\frac{H_1}{H_2}\right)^\alpha = \left(\frac{V_1}{V_2}\right) \quad (26)$$

Burada,  $V_1$   $H_1$  yüksekliğindeki rüzgâr hızını ( $m s^{-1}$ ),  $V_2$  ise  $H_2$  yüksekliğindeki rüzgâr hızını ( $m s^{-1}$ ) ifade eder.

Rüzgâr türbinleri için nominal yüksekliklerde çalışmaları esastır ancak kapasite faktörünün daha net karşılaştırılmasının yapılması için tüm RES'ler farklı yükseklikler için de değerlendirilmiştir. Farklı yüksekliklere normalize edilen rüzgâr hızları Şekil 5'te verilmiştir. Ekonomik bir RES yatırımı için rüzgâr hızı alt sınırı ise  $7 m s^{-1}$  olarak belirlenmiştir (Anonim, 2019a).



Şekil 5. Farklı yüksekliklerde normalize edilmiş rüzgâr hızları

## BULGULAR VE TARTIŞMA

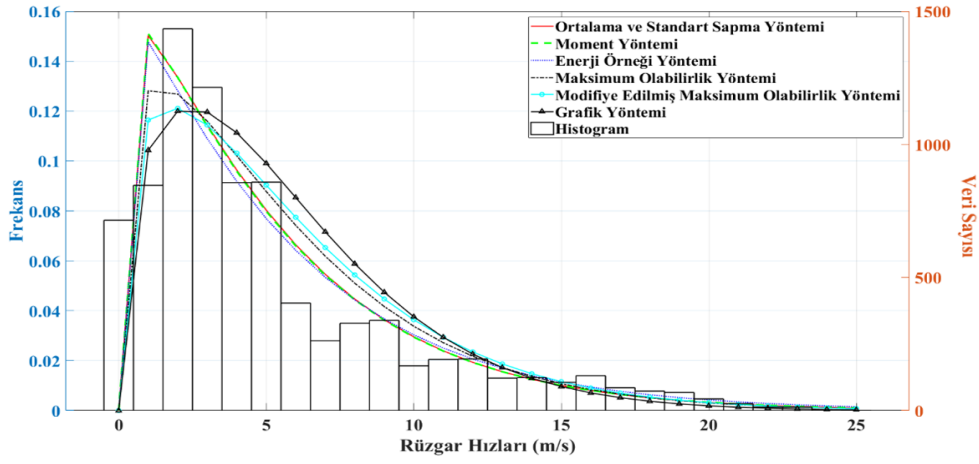
Bu çalışmada farklı kurulu güçlere sahip rüzgâr enerji sistemleri için, farklı kule yüksekliklerindeki kapasite faktörleri ve elektrik enerjisi üretim potansiyelleri hesaplanmıştır. Hesaplama yöntemi olarak Weibull olasılık fonksiyonu ve simülasyon yaklaşımı yöntemleri kullanılmıştır. Weibull olasılık fonksiyonunun şekil ve ölçek parametrelerinin hesaplanmasında standart sapma ve ortalama, moment, enerji, enerji örneği, maksimum olabirlik ve modifiye edilmiş maksimum olabirlik fonksiyonları kullanılmıştır. Her bir yöntem ile elde edilen sonuçlar karşılaştırılmış ve rüzgâr enerji potansiyelinin hesaplanmasında en doğru yöntem belirlenmiştir.

24 m, 59 m ve 120 m kule yüksekliğine sahip RES için Weibull olasılık fonksiyonunun şekil ve ölçek parametrelerinin değerleri Çizelge 3'te verilmiştir.

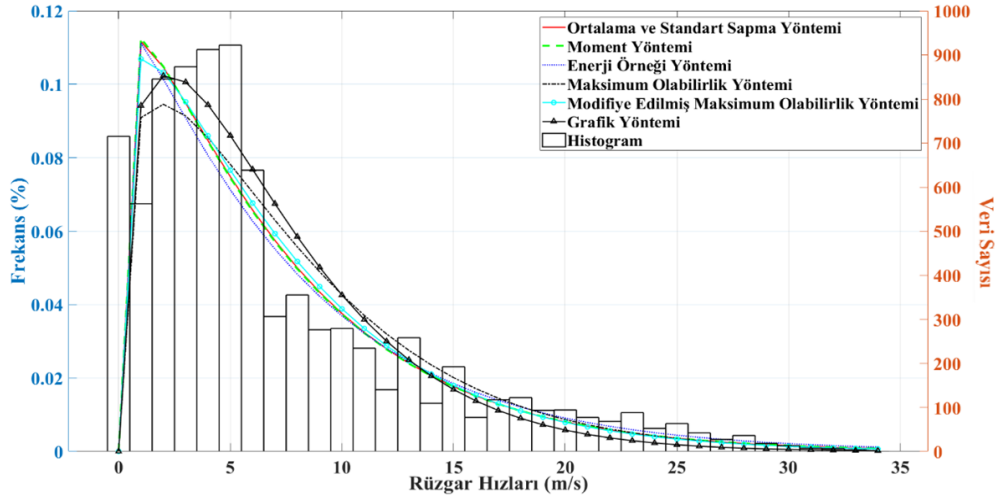
Çizelge 3. Weibull olasılık fonksiyonu için hesaplanan şekil (k) ve ölçek (c) parametreleri

| Yöntem                                      | 24 m  |       | 59 m  |       | 120 m |        |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
|   | k     | c     | k     | c     | k     | c      |
| Standart Sapma ve Ortalama Yöntemi          | 1.094 | 5.297 | 1.093 | 7.257 | 1.094 | 9.304  |
| Moment Yöntemi                              | 1.087 | 5.286 | 1.087 | 7.242 | 1.087 | 9.285  |
| Enerji Örneği Yöntemi                       | 1.051 | 5.523 | 1.051 | 7.567 | 1.051 | 9.701  |
| Grafik Yöntemi                              | 1.392 | 6.068 | 1.292 | 7.885 | 1.313 | 8.790  |
| Maksimum Olabirlik Yöntemi                  | 1.211 | 5.791 | 1.211 | 7.933 | 1.211 | 10.171 |
| Modifiye Edilmiş Maksimum Olabirlik Yöntemi | 1.263 | 6.090 | 1.196 | 8.003 | 1.302 | 9.001  |

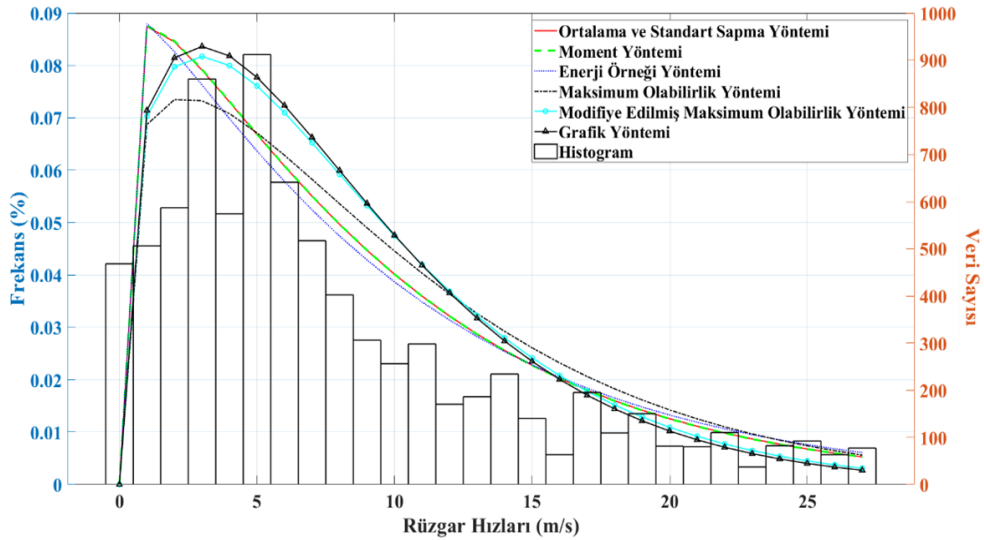
Weibull olasılık fonksiyonları kullanılarak hesaplanan şekil ve ölçek parametreleri ve 24 m, 59 m ve 120 m'deki rüzgâr hızlarına ait histogram gösterimi Şekil 6, Şekil 7 ve Şekil 8'de verilmiştir.



Şekil 6. 24 m kule yüksekliği için Weibull olasılık dağılım fonksiyonları



Şekil 7. 59 m kule yüksekliği için Weibull olasılık dağılım fonksiyonları



Şekil 8. 120 m için Weibull olasılık dağılım fonksiyonları

$R^2$ , RMSE, MSE ve  $X^2$  analiz yöntemleri kullanılarak yapılan şekil ve ölçek parametrelerinin hata analizleri Çizelge 4, Çizelge 5 ve Çizelge 6’da verilmiştir.

**Çizelge 4.** 24 m kule yüksekliği için Weibull olasılık dağılım fonksiyonu için hata analizleri

| Yöntem                                | $R^2$   | RMSE    | MSE      | $X^2$  |
|---------------------------------------|---------|---------|----------|--------|
| Standart Sapma ve Ortalama Yöntemi    | 0.98687 | 0.02235 | 0.000500 | 0.0757 |
| Moment Yöntemi                        | 0.98674 | 0.02243 | 0.000503 | 0.0756 |
| Enerji Örneği Yöntemi                 | 0.98580 | 0.02275 | 0.000518 | 0.0739 |
| Grafik Yöntemi                        | 0.98726 | 0.02312 | 0.000534 | 0.1239 |
| Maksimum Olabilirlik Yöntemi          | 0.98792 | 0.02180 | 0.000475 | 0.0789 |
| Modifiye Edilmiş Maksimum Olabilirlik | 0.98733 | 0.02231 | 0.000498 | 0.0864 |

**Çizelge 5.** 59 m kule yüksekliği için Weibull olasılık dağılım fonksiyonu için hata analizleri

| Yöntem                                | $R^2$   | RMSE    | MSE      | $X^2$   |
|---------------------------------------|---------|---------|----------|---------|
| Standart Sapma ve Ortalama Yöntemi    | 0.98633 | 0.01836 | 0.000337 | 0.08683 |
| Moment Yöntemi                        | 0.98620 | 0.01842 | 0.000339 | 0.08697 |
| Enerji Örneği Yöntemi                 | 0.98564 | 0.01859 | 0.000346 | 0.08409 |
| Grafik Yöntemi                        | 0.98837 | 0.01761 | 0.000310 | 0.10431 |
| Maksimum Olabilirlik Yöntemi          | 0.98780 | 0.01763 | 0.000311 | 0.08495 |
| Modifiye Edilmiş Maksimum Olabilirlik | 0.98761 | 0.01768 | 0.000313 | 0.08270 |

**Çizelge 6.** 120 m kule yüksekliği için Weibull olasılık dağılım fonksiyonu için hata analizleri

| Yöntem                                | $R^2$   | RMSE    | MSE      | $X^2$   |
|---------------------------------------|---------|---------|----------|---------|
| Standart Sapma ve Ortalama Yöntemi    | 0.99038 | 0.01664 | 0.000277 | 0.08362 |
| Moment Yöntemi                        | 0.99039 | 0.01663 | 0.000277 | 0.08424 |
| Enerji Örneği Yöntemi                 | 0.98942 | 0.01717 | 0.000295 | 0.09158 |
| Grafik Yöntemi                        | 0.99288 | 0.01546 | 0.000239 | 0.09319 |
| Maksimum Olabilirlik Yöntemi          | 0.99061 | 0.01655 | 0.000274 | 0.08824 |
| Modifiye Edilmiş Maksimum Olabilirlik | 0.99262 | 0.01557 | 0.000242 | 0.08753 |

Hata analizlerinde  $R^2$  analizinin sonucunun yüksek olması istenmektedir. RMSE, MSE ve  $X^2$  analizlerinin sonuçlarının ise düşük olması istenmektedir. Çizelge 4, Çizelge 5 ve Çizelge 6 incelendiğinde üç farklı kule yüksekliğindeki rüzgâr fonksiyonları için hata oranı daha düşük olan yöntemin maksimum olabilirlik ve modifiye edilmiş maksimum olabilirlik yöntemleri olduğu tespit edilmiştir. Grafik yönteminin  $R^2$  analizinin sonucun diğer yöntemlere göre daha yüksek çıkmış olmasına karşın,  $X^2$  testinin de diğer yöntemlere göre daha yüksek çıktığı görülmüş ve dolayısıyla hata oranı diğer yöntemlere göre yüksek olabileceği belirlenmiştir. Buradan hareketle söz konusu yöntemlerin arasından maksimum olabilirlik ve modifiye edilmiş maksimum olabilirlik yöntemlerinin en doğru ve tutarlı sonucu vereceği söylenebilir. Rüzgâr enerji santralleri 20 senelik yatırımlar olması nedeniyle en doğru yöntemin belirlenmesi önemlidir. Hata arttıkça üretilecek enerji de yanıltıcı bir biçimde sonuç verebilir.

Bu bilgiler ışığında en tutarlı yöntem olarak belirlenmiş olan maksimum olabilirlik yöntemi ve modifiye edilmiş maksimum olabilirlik yöntemi ile hesaplanmış aylık kapasite faktörleri Çizelge 7 ve Çizelge 8 ile gösterilmiştir. Bu yöntemler ile hesaplanan kapasite faktörü değişimleri ise Şekil 9 ve Şekil 10’da gösterilmiştir.

Şekil 9 ve Şekil 10 incelendiğinde en yüksek kapasite faktörlerinin genel olarak Temmuz ve Ağustos aylarında yakalandığı görülmüştür. En düşük kapasite faktörleri ise Ekim ve Kasım aylarında görüldüğü belirlenmiştir. Ayrıca, kurulu gücün artışına bağlı olarak kapasite faktörünün arttığı gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin kurulu güç arttıkça ilgili türbinin çalışma aralığının artması olduğu

söylenbilir. Ek olarak, kule yüksekliğinin artışı ile kapasite faktörünün de arttığı görülmüştür. Bu artış daha yüksek seviyelere erişildikçe daha hızlı rüzgarla karşılaşılmasından kaynaklıdır.

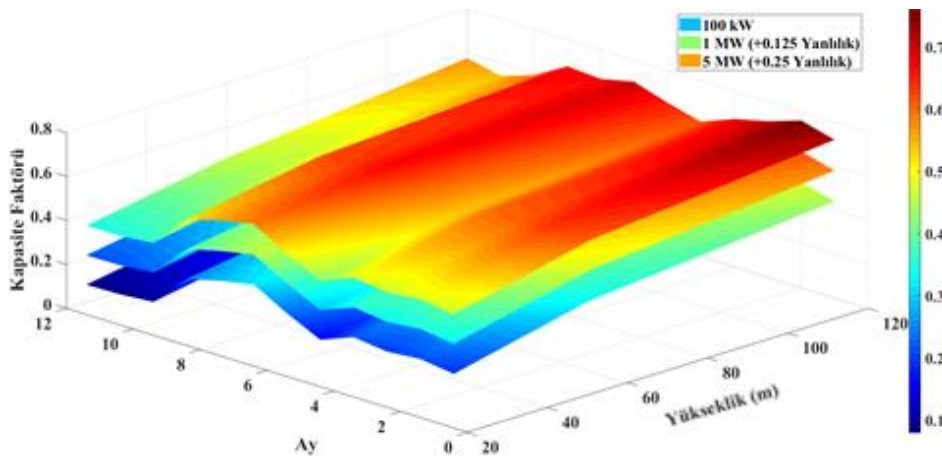
Farklı yöntemler kullanılarak RES'ler için hesaplanan yıllık kapasite faktörü değerleri ise Çizelge 9'da verilmiştir.

Çizelge 7. Maksimum olabilirlik yöntemi kullanılarak elde edilen aylık kapasite faktörleri

| Kule Yüksekliği | 100 kW RES |         |         | 1 MW RES |        |        | 5 MW RES |         |         |
|-----------------|------------|---------|---------|----------|--------|--------|----------|---------|---------|
|                 | 24 m       | 59 m    | 120 m   | 24 m     | 59 m   | 120 m  | 24 m     | 59 m    | 120 m   |
| Ocak            | 0.19112    | 0.33335 | 0.44036 | 0.2022   | 0.3472 | 0.4551 | 0.21277  | 0.35809 | 0.47055 |
| Şubat           | 0.21179    | 0.36721 | 0.47988 | 0.2234   | 0.3820 | 0.4953 | 0.23437  | 0.39262 | 0.51110 |
| Mart            | 0.19846    | 0.33297 | 0.42954 | 0.2096   | 0.3465 | 0.4438 | 0.21981  | 0.35801 | 0.46059 |
| Nisan           | 0.21701    | 0.32388 | 0.39109 | 0.2278   | 0.3362 | 0.4037 | 0.23799  | 0.35034 | 0.42383 |
| Mayıs           | 0.15839    | 0.25961 | 0.33647 | 0.1679   | 0.2710 | 0.3487 | 0.17707  | 0.28252 | 0.36446 |
| Haziran         | 0.23211    | 0.31973 | 0.36962 | 0.2427   | 0.3313 | 0.3812 | 0.25381  | 0.34756 | 0.40312 |
| Temmuz          | 0.31541    | 0.38750 | 0.41215 | 0.3273   | 0.3995 | 0.4234 | 0.34204  | 0.42176 | 0.45192 |
| Ağustos         | 0.28523    | 0.35273 | 0.38052 | 0.2963   | 0.3641 | 0.3914 | 0.31062  | 0.38490 | 0.41759 |
| Eylül           | 0.24582    | 0.34064 | 0.39276 | 0.2569   | 0.3528 | 0.4048 | 0.26808  | 0.36929 | 0.42760 |
| Ekim            | 0.09495    | 0.20498 | 0.31656 | 0.1038   | 0.2163 | 0.3301 | 0.11393  | 0.22682 | 0.34084 |
| Kasım           | 0.08242    | 0.17429 | 0.26817 | 0.0904   | 0.1846 | 0.2804 | 0.09950  | 0.19441 | 0.29111 |
| Aralık          | 0.07899    | 0.18461 | 0.29939 | 0.0877   | 0.1956 | 0.3129 | 0.09797  | 0.20648 | 0.32331 |

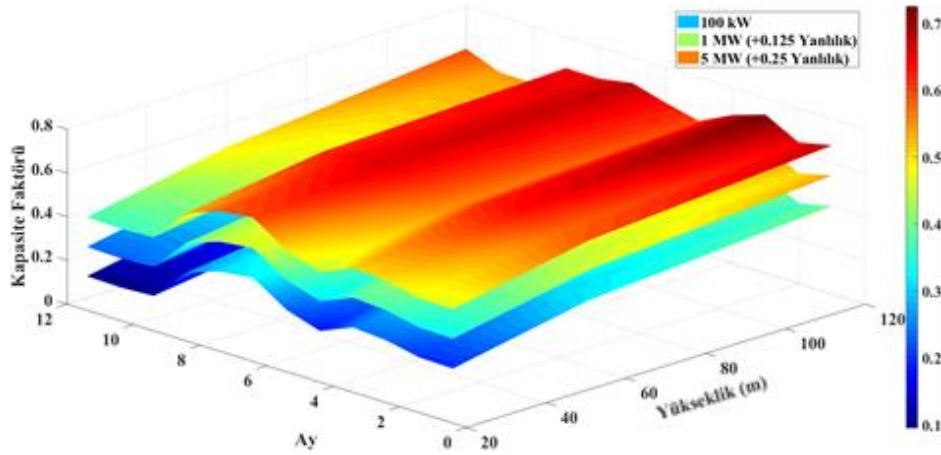
Çizelge 8. Modifiye edilmiş maksimum olabilirlik yöntemi kullanılarak elde edilen aylık kapasite faktörleri

| Kule Yüksekliği | 100 kW RES |         |         | 1 MW RES |        |        | 5 MW RES |         |         |
|-----------------|------------|---------|---------|----------|--------|--------|----------|---------|---------|
|                 | 24 m       | 59 m    | 120 m   | 24 m     | 59 m   | 120 m  | 24 m     | 59 m    | 120 m   |
| Ocak            | 0.19462    | 0.31460 | 0.40152 | 0.2058   | 0.3279 | 0.4161 | 0.21648  | 0.33898 | 0.42929 |
| Şubat           | 0.19798    | 0.30054 | 0.36612 | 0.2089   | 0.3128 | 0.3788 | 0.21896  | 0.32521 | 0.39577 |
| Mart            | 0.22944    | 0.36480 | 0.44668 | 0.2414   | 0.3791 | 0.4621 | 0.25201  | 0.39065 | 0.47545 |
| Nisan           | 0.24172    | 0.34729 | 0.39753 | 0.2535   | 0.3602 | 0.4114 | 0.26379  | 0.37453 | 0.42676 |
| Mayıs           | 0.17841    | 0.28017 | 0.32701 | 0.1887   | 0.2921 | 0.3401 | 0.19833  | 0.30394 | 0.35241 |
| Haziran         | 0.22750    | 0.33543 | 0.35950 | 0.2395   | 0.3474 | 0.3723 | 0.25081  | 0.36406 | 0.38817 |
| Temmuz          | 0.32609    | 0.38057 | 0.39706 | 0.3383   | 0.3924 | 0.4093 | 0.35309  | 0.41464 | 0.43176 |
| Ağustos         | 0.30862    | 0.36319 | 0.37306 | 0.3204   | 0.3748 | 0.3854 | 0.33482  | 0.39602 | 0.40462 |
| Eylül           | 0.25770    | 0.33877 | 0.37519 | 0.2692   | 0.3508 | 0.3879 | 0.28042  | 0.36758 | 0.40583 |
| Ekim            | 0.10340    | 0.19076 | 0.26767 | 0.1122   | 0.2013 | 0.2797 | 0.12204  | 0.21115 | 0.29062 |
| Kasım           | 0.09513    | 0.18971 | 0.27016 | 0.1037   | 0.2004 | 0.2826 | 0.11347  | 0.21028 | 0.29315 |
| Aralık          | 0.09921    | 0.21644 | 0.32818 | 0.1085   | 0.2282 | 0.3426 | 0.11992  | 0.23939 | 0.35287 |



Şekil 9. Maksimum olabilirlik yöntemi ile hesaplanan kapasite faktörü değişimi





Şekil 10. Modifiye edilmiş maksimum olabilirlik yöntemi ile hesaplanan kapasite faktörü değişimi

Çizelge 9. Farklı güçteki RES'ler için hesaplanan yıllık kapasite faktörleri

| Yöntem/Kule Yüksekliği                        | 100 kW RES |       |       | 1 MW RES |       |       | 5 MW RES |       |       |
|---|------------|-------|-------|----------|-------|-------|----------|-------|-------|
|   | 24 m       | 59 m  | 120 m | 24 m     | 59 m  | 120 m | 24 m     | 59 m  | 120 m |
| Standart Sapma ve Ortalama Yöntemi            | 0.189      | 0.282 | 0.345 | 0.198    | 0.294 | 0.345 | 0.208    | 0.307 | 0.376 |
| Moment Yöntemi                                | 0.189      | 0.281 | 0.344 | 0.198    | 0.293 | 0.344 | 0.208    | 0.306 | 0.374 |
| Enerji Örneği Yöntemi                         | 0.204      | 0.291 | 0.345 | 0.214    | 0.302 | 0.345 | 0.224    | 0.317 | 0.377 |
| Grafik Yöntemi                                | 0.210      | 0.317 | 0.358 | 0.222    | 0.330 | 0.358 | 0.231    | 0.343 | 0.385 |
| Maksimum Olabilirlik Yöntemi                  | 0.207      | 0.316 | 0.387 | 0.218    | 0.328 | 0.387 | 0.228    | 0.342 | 0.419 |
| Modifiye Edilmiş Maksimum Olabilirlik Yöntemi | 0.221      | 0.282 | 0.345 | 0.232    | 0.333 | 0.365 | 0.242    | 0.344 | 0.393 |
| Simülasyon Yöntemi                            | 0.196      | 0.270 | 0.290 | 0.205    | 0.270 | 0.310 | 0.205    | 0.289 | 0.338 |

Daha yüksek seviyelere erişildikçe daha hızlı rüzgârlar yakalanacaktır. Kurulu gücün artması ile türbinin çalışma aralığı da artacaktır. Çizelge 9'dan görüleceği üzere kule yüksekliği ve kurulu gücün artması kapasite faktörünün de artması anlamına gelmektedir. Yıllık kapasite faktörü hesabında kullanılan yöntemlerden maksimum olabilirlik ve modifiye edilmiş maksimum olabilirlik yöntemlerinin en uygun yöntem olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca farklı güçteki RES'ler için ifade edilen yöntemler kullanılarak hesaplanan yıllık elektrik enerjisi üretim potansiyelleri Çizelge 10'da verilmiştir.

Çizelge 10. RES'ler için hesaplanan yıllık elektrik enerjisi üretim potansiyeli (MWh yıl<sup>-1</sup>)

| Yöntem/<br>Kule Yüksekliği                    | 100 kW RES |       |       | 1 MW RES |         |         | 5 MW RES |          |          |
|---|------------|-------|-------|----------|---------|---------|----------|----------|----------|
|   | 24 m       | 59 m  | 120 m | 24 m     | 59 m    | 120 m   | 24 m     | 59 m     | 120 m    |
| Standart Sapma ve Ortalama Yöntemi            | 165.2      | 247.3 | 302.6 | 1 737.6  | 2 571.7 | 3 129.0 | 9 114.4  | 13 445.9 | 16 451.9 |
| Moment Yöntemi                                | 165.1      | 246.5 | 301.2 | 1 737.3  | 2 563.6 | 3 114.4 | 9 113.2  | 13 407.4 | 16 379.7 |
| Enerji Örneği Yöntemi                         | 178.7      | 254.7 | 302.6 | 1 873.6  | 2 644.8 | 3 125.8 | 9 819.8  | 13 866.5 | 16 494.9 |
| Grafik Yöntemi                                | 181.4      | 276.6 | 338.9 | 1 907.6  | 2 874.3 | 3 500.1 | 9 974.1  | 14 961.7 | 18 345.7 |
| Maksimum Olabilirlik Yöntemi                  | 193.7      | 278.3 | 320.0 | 2 034.2  | 2 890.5 | 3 315.6 | 10 614.2 | 15 058.6 | 17 226.9 |
| Modifiye Edilmiş Maksimum Olabilirlik Yöntemi | 184.3      | 278.0 | 313.7 | 1 942.0  | 2 892.3 | 3 252.9 | 10 154.7 | 15 004.7 | 16 883.3 |
| Simülasyon Yöntemi                            | 171.7      | 236.5 | 254.0 | 1 795.8  | 2 365.2 | 2 715.6 | 8 979.0  | 12 658.2 | 14 804.4 |

Kule yüksekliği arttıkça, rüzgâr hızı artacaktır. Buna bağlı olarak rüzgâr hızının küpü ile orantılı olan enerji üretimi de önemli ölçüde artış gösterecektir. Çizelge 10, daha yüksekler erişildikçe enerji

üretiminin de önemli ölçüde artacağını göstermektedir. Enerji Piyasası Denetleme Kurulu'nun raporuna göre Artvin ilinin elektrik enerji tüketim miktarı 452 895.3 MWh yıl<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir (Anonim, 2019b). Çalışmada incelenen 7 farklı yöntem neticesinde Artvin ilinin enerji talebinin yüzde olarak karşılanabileceği miktarlar Çizelge 11'de gösterilmiştir.

**Çizelge 11.** Artvin ilinin yıllık elektrik enerjisi talebinin karşılanma oranı yüzdesi (%)

| Yöntem/Kule Yüksekliği                        | 100 kW RES |       |       | 1 MW RES |       |       | 5 MW RES |       |       |
|---|------------|-------|-------|----------|-------|-------|----------|-------|-------|
|   | 24 m       | 59 m  | 120 m | 24 m     | 59 m  | 120 m | 24 m     | 59 m  | 120 m |
| Standart Sapma ve Ortalama Yöntemi            | 0.036      | 0.055 | 0.067 | 0.384    | 0.568 | 0.691 | 2.012    | 2.969 | 3.633 |
| Moment Yöntemi                                | 0.036      | 0.054 | 0.067 | 0.384    | 0.566 | 0.688 | 2.012    | 2.960 | 3.617 |
| Enerji Örneği Yöntemi                         | 0.039      | 0.056 | 0.067 | 0.414    | 0.584 | 0.690 | 2.168    | 3.062 | 3.642 |
| Grafik Yöntemi                                | 0.040      | 0.061 | 0.075 | 0.421    | 0.635 | 0.773 | 2.202    | 3.304 | 4.051 |
| Maksimum Olabilirlik Yöntemi                  | 0.043      | 0.061 | 0.071 | 0.449    | 0.638 | 0.732 | 2.344    | 3.325 | 3.804 |
| Modifiye Edilmiş Maksimum Olabilirlik Yöntemi | 0.041      | 0.061 | 0.069 | 0.429    | 0.639 | 0.718 | 2.242    | 3.313 | 3.728 |
| Simülasyon Yöntemi                            | 0.038      | 0.052 | 0.056 | 0.397    | 0.522 | 0.600 | 1.983    | 2.795 | 3.269 |

Çizelge 11, 24 m kule yüksekliğinde 100 kW RES'in Artvin ilinin elektrik enerjisi talebinin %0.036 ile %0.043'lük kısmını karşılayabileceğini, 1 MW RES'in enerji talebinin %0.384 ile %0.449'lük kısmını karşılayabileceğini, 5 MW RES'in ise enerji talebinin %1.983 ile %2.344'lük kısmını karşılayabileceğini göstermektedir. Ayrıca, 59 m kule yüksekliğinde 100 kW RES'in Artvin ilinin elektrik enerjisi talebinin %0.052 ile %0.061'lik kısmını karşılayabileceği, 1 MW RES'in enerji talebinin %0.522 ile %0.639'lük kısmını karşılayabileceği, 5 MW RES'in ise enerji talebinin %2.795 ile %3.325'lik kısmını karşılayabileceği görülmektedir. Bununla birlikte, 120 m kule yüksekliğinde 100 kW RES'in Artvin ilinin elektrik enerjisi talebinin %0.056 ile %0.075'lik kısmını karşılayabileceği, 1 MW RES'in enerji talebinin %0.600 ile %0.773'lük kısmını karşılayabileceği, 5 MW RES'in ise enerji talebinin %3.269 ile %4.051'lik kısmını karşılayabileceği anlaşılmaktadır.

## SONUÇ

Bu çalışmada Weibull olasılık yoğunluk fonksiyonu ve simülasyon yaklaşımı kullanılarak Artvin ili Merkez ilçesi şartlarında kurulabilecek 100 kW, 1 MW ve 5 MW rüzgâr enerjisi santralleri için rüzgâr hızı potansiyeli, kapasite faktörü ve elektrik enerjisi üretim potansiyeli incelenmiştir. Weibull olasılık yoğunluk fonksiyonu parametrelerini belirlemek için standart sapma ve ortalama yöntemi, moment yöntemi, enerji örnekleme yöntemi, grafik yöntemi, maksimum olabilirlik yöntemi ve modifiye edilmiş maksimum olabilirlik yöntemi kullanılmıştır. Parametre belirlemede kullanılan yöntemler R<sup>2</sup>, Ortalama Karekök Hata (RMSE), Ortalama Hata (MSE) ve X<sup>2</sup> hata analizi teknikleri ile değerlendirilmiştir. Simülasyon çalışmasında ise Matlab&Simulink programı kullanılarak rüzgâr enerjisi santraline ait kapasite faktörü ve elektrik enerjisi üretim potansiyeli analiz edilmiştir.

Sonuç olarak, hata analizlerinde maksimum olabilirlik yöntemi ve modifiye edilmiş maksimum olabilirlik yönteminin en tutarlı ve doğru sonucu verdiği görülmektedir. Ayrıca, en yüksek rüzgâr hızlarının, daha yüksek rakımlarda ve yaz aylarında elde edileceği elde edilmiştir. Bununla birlikte, daha yüksek rakımlarda ve daha yüksek kurulu güce sahip rüzgâr türbinleri ile daha yüksek kapasite faktörünün elde edilebileceği analiz edilmiştir. Artvin İli Merkez İlçesi için düşünülen farklı kapasitelere sahip rüzgâr enerji santralleri için kapasite faktörünün en yüksek olacağı aylar genel olarak temmuz ve ağustos ayları olarak tespit edilmiştir. Bu aylarda 1 MW ve 5 MW kapasiteli rüzgâr enerji santralleri için kapasite faktörlerinin birbirlerinin çok yakın olduğu iki türbinle de uygun üretim yapılabileceği söylenebilir. Buna karşılık 100 kW kapasiteli rüzgâr enerji santrali için kapasite faktörünün sene boyunca çok düşük kalacağı ve bu kurulu güce sahip bir sistemin kurulmasının yetersiz olacağı tespit

edilmiştir. Çalışma neticesinde, Artvin ilinin 100 kW kapasiteli bir rüzgâr enerjisi santrali kurulması durumunda %0.036 ila %0.075 arasında, 1 MW kapasiteli bir sistemin kurulması durumunda %0.384 ila %0.773 arasında, 5 MW kapasiteli bir sistemin kurulması durumunda ise %1.983 ila %4.051 arasında yıllık elektrik enerjisi ihtiyacının karşılanabileceği öngörülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Yazarlar, Artvin ili Merkez ilçesine ait rüzgâr verilerini sağlayan T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Meteoroloji Genel Müdürlüğü, Meteorolojik Veri İşlem Dairesi Başkanlığı'na teşekkür ederler.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Anonim, 2019a. Yenilenebilir Enerji Genel Müdürlüğü. Rüzgâr enerjisi potansiyeli atlası. <http://www.yegm.gov.tr/YEKrepa/ARTVIN-REPA.pdf> (Erişim Tarihi: 03.10.2019).
- Anonim, 2019b. Enerji Piyasası Denetleme Kurulu. 2019 yılı elektrik piyasası gelişim raporu. <https://www.epdk.gov.tr/Detay/Icerik/3-0-24/elektrikiyillik-sektor-raporu> (Erişim Tarihi: 04.12.2020).
- Anonim, 2020a. Türkiye Elektrik İletim A.Ş. Türkiye elektrik sistemi kuruluş ve kaynaklara göre kurulu güç raporu. <https://www.teias.gov.tr/tr-TR/kurulu-guc-raporlari> (Erişim Tarihi: 02.12.2020).
- Anonim, 2020b. Türkiye Rüzgâr Enerjisi Birliği. Türkiye rüzgâr enerjisi istatistik raporu. <https://www.tureb.com.tr/bilgi-bankasi/turkiye-res-durumu> (Erişim Tarihi: 04.12.2019).
- Anonim, 2020c. Meteoblue. Artvin ili iklim verileri. [https://www.meteoblue.com/tr/hava/historyclimate/climate-modelled/artvin\\_t%C3%BCrkiye\\_751817](https://www.meteoblue.com/tr/hava/historyclimate/climate-modelled/artvin_t%C3%BCrkiye_751817) (Erişim Tarihi: 20.12.2020).
- Anonim, 2020d. Weibull k value. [https://www.homerenergy.com/products/pro/docs/latest/weibull\\_k\\_value.html](https://www.homerenergy.com/products/pro/docs/latest/weibull_k_value.html) (Erişim Tarihi: 01.12.2020).
- Anonim, 2020e. Vestas V20 wind turbine datasheet. <https://en.wind-turbine-models.com/turbines/618-vestas-v20> (Erişim Tarihi: 12.02.2020).
- Anonim, 2020f. Enercon E-58/10.58 wind turbine datasheet. [https://www.thewindpower.net/turbine\\_en\\_218\\_enercon\\_e58-1000.php](https://www.thewindpower.net/turbine_en_218_enercon_e58-1000.php) (Erişim Tarihi: 04.12.2020).
- Anonim, 2020g. Gamesa G128-5.0MW wind turbine datasheet. <https://en.wind-turbine-models.com/turbines/767-gamesa-g128-5.0mw> (Erişim Tarihi: 04.12.2020).
- Ahmed S, 2015. Wind energy: theory and practice. PHI Learning Pvt. Ltd.
- Akdağ SA, Güler Ö, 2015. A novel energy pattern factor method for wind speed distribution parameter estimation. *Energy Conversion and Management*, 106, 1124-1133.
- Akpınar EK, Akpınar S, 2005. An assessment on seasonal analysis of wind energy characteristics and wind turbine characteristics. *Energy conversion and management*, 46(11-12), 1848-1867.
- Almalı MN, Rüstemli S, Gürçam K, 2013. Ortalama Rüzgâr hızı ve güç yoğunluğunun tahmin edilmesinde kullanılan farklı yöntemler. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3(1), 73-78.
- Arslan H, Baltacı H, Akkoyunlu OB, Karanfil S, Tayanc M, 2020. Wind speed variability and wind power potential over Turkey: Case studies for Çanakkale and İstanbul. *Renewable Energy*, 145, 1020-1032.
- Aydın, EH, Çunkaş M, 2019. Artvin Çoruh Üniversitesi Seyitler Yerleşkesi enerji talebinin yenilenebilir enerji kaynaklarıyla karşılanması. *Selçuk Üniversitesi Mühendislik, Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(1), 241-252.
- Chang TP, 2011. Performance comparison of six numerical methods in estimating Weibull parameters for wind energy application. *Applied Energy*, 88(1), 272-282.
- Diñer F, Rüstemli S, Yılmaz Ş, Çingı A, 2017. Kilis ili için farklı yüksekliklerdeki rüzgâr potansiyelinin belirlenmesi. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 6(1), 12-20.

- Doğanşahin K, Uslu AF, Kekezoğlu B, 2019. İki Bileşenli Weibull Dağılımı ile Rüzgâr Hızı Olasılık Dağılımlarının Modellenmesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (15), 315-326.
- Gungor A, Gokcek M, Uçar H, Arabacı E, Akyüz A, 2020. Analysis of wind energy potential and Weibull parameter estimation methods: a case study from Turkey. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 17(2), 1011-1020.
- Hulio ZH, Jiang W, 2020. Wind energy potential assessment for KPT with a comparison of different methods of determining Weibull parameters. *International Journal of Energy Sector Management*.
- İlkiliç C, Aydın H, 2015. Wind power potential and usage in the coastal regions of Turkey. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 44, 78-86.
- Kaplan YA, 2016. Rayleigh ve Weibull dağılımları kullanılarak osmaniye bölgesinde rüzgâr enerjisinin değerlendirilmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(1).
- Kaya Ü, Caner M, Oğuz Y, 2016. Rüzgâr türbin modelleri kullanarak Kastamonu ili rüzgâr ile elektrik üretim potansiyeli tahmini. *Technological Applied Sciences*, 11(3), 65-74.
- Keyhani A, Ghasemi-Varnamkhasti M, Khanali M, and Abbaszadeh R, 2010. An assessment of wind energy potential as a power generation source in the capital of Iran, Tehran. *Energy*, 35(1), 188-201.
- Kurban M, Kantar MY, Hoccoğlu FO, 2007. Weibull dağılımı kullanılarak rüzgâr hız ve güç yoğunluklarının istatistiksel analizi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 7(2), 205-218.
- Liu F, Sun F, Liu W, Wang T, Wang H, Wang X, Lim W H, 2019. On wind speed pattern and energy potential in China. *Applied Energy*, 236, 867-876.
- MGM, 2019. Meteoroloji Genel Müdürlüğü. Mart 2018 – Mart 2019 tarihleri arası Artvin ili saatlik rüzgâr verileri.
- Sedaghat A, Alkhatip F, Eilaghi A, Mehdizadeh A, Borvayeh L, Mostyafaepour A, Hassanzadeh A, Jahangiri M, 2020. Optimization of capacity factors based on rated wind speeds of wind turbines. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 1-22.
- Shoab M, Siddiqui I, Rehman S, Khan S, 2019. Assessment of wind energy potential using wind energy conversion system. *Journal of Cleaner Production*, 216, 346-360.
- Şenel MC, Koç E, 2015. Dünyada ve Türkiye’de rüzgâr enerjisi durumu-Genel değerlendirme. *Mühendis ve Makina*, 56(663), 46-56.

**Atıf İçin:** Yılmaz M, Can K, Başçı A, 2021. İkili Tank Sisteminin Sıvı Seviye Kontrolü için Genetik Algoritma Tabanlı PI+İleri Besleme Kontrolcü. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1014-1026.

**To Cite:** Yılmaz M, Can K, Başçı A, 2021. PI+Feed Forward Controller Tuning Based on Genetic Algorithm for Liquid Level Control of Coupled-Tank System. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1014-1026.

## **PI+Feed Forward Controller Tuning Based on Genetic Algorithm for Liquid Level Control of Coupled-Tank System**

Mehmet YILMAZ<sup>1</sup>, Kaan CAN<sup>1</sup>, Abdullah BAŞÇI<sup>1\*</sup>

**ABSTRACT:** One of the main problems in the control of the coupled tank liquid level systems, which are used frequently in water treatment systems and petrochemical industry today, is to determine the water flow rate between the two tanks. In this paper, proportional-integral +feed forward control method (PI+FF), whose parameters are determined using genetic algorithm (GA), one of the heuristic optimization methods, is used to solve this problem. In addition, in order to show the performance of the GA-based controller, the PI+FF controller that PI parameters obtained using the Ziegler-Nichols (Z-N) method are applied to the same system and the real-time application results of both controllers are compared. The experimental results showed that the controller, which parameters are determined by GA, reached the desired reference value with less settling time and less overshooting when it compared to the Z-N method based controller, and also it has given faster response to sudden changes in the system.

**Keywords:** Liquid level systems, Ziegler-Nichols method, Genetic Algorithm, PI controller

### **İkili Tank Sisteminin Sıvı Seviye Kontrolü için Genetik Algoritma Tabanlı PI+İleri Besleme Kontrolcü**

**ÖZET:** Günümüzde su arıtma sistemlerinde ve petrokimya endüstrisinde sıklıkla kullanılan ikili tank sıvı seviye sistemlerinin kontrolündeki en temel problemlerden biri iki tank arasındaki sıvı akış oranının belirlenmesidir. Bu çalışmada bu problemi gidermek amacıyla oransal-integral (PI) + ileri besleme (FF) kontrolcünün (PI+FF) parametreleri sezgisel optimizasyon yöntemlerinden genetik algoritma (GA) kullanılarak belirlenmiş ve ikili tank sistemine uygulanmıştır. Ayrıca GA tabanlı kontrolcünün performansını göstermek amacıyla Ziegler-Nichols (Z-N) yöntemi kullanılarak parametreleri elde edilen PI+FF kontrol yöntemi aynı sisteme uygulanmış ve her iki kontrolcünün gerçek zamanlı uygulama sonuçları karşılaştırılmıştır. Deneysel sonuçlar, parametreleri GA ile belirlen kontrolcünün Z-N yöntemi kullanılarak elde edilen kontrolcüye oranla istenilen referans değere daha küçük yerleşme zamanı ve daha az yüzde aşım ile ulaştığı ve ayrıca sistemde meydana gelen ani değişimlere daha hızlı tepki verdiği gözlemlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Sıvı seviye sistemleri, Ziegler-Nichols yöntemi, Genetik Algoritma, PI kontrolör

<sup>1</sup> Mehmet YILMAZ ([Orcid ID: 0000-0001-7624-4245](https://orcid.org/0000-0001-7624-4245)), Kaan CAN ([Orcid ID: 0000-0002-6597-2797](https://orcid.org/0000-0002-6597-2797)), Abdullah BAŞÇI ([Orcid ID: 0000-0003-4141-2880](https://orcid.org/0000-0003-4141-2880)), Atatürk Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Elektrik Elektronik Mühendisliği Bölümü, Erzurum, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Abdullah BAŞÇI, e-mail: abasci@atauni.edu.tr

## INTRODUCTION

The main problem in liquid level control systems, which are frequently used in nuclear power plants, water treatment plants and petrochemical industry in recent years, is to determine the liquid flow rate between tanks (Başçi and Derdiyok, 2016; Sekban et al., 2020). In such a high-cost systems, a large amount of product and cost is lost as a result of incorrect design of the control systems. Traditional PI controller is generally used for the control of these systems because of its advantages such as simple and easy to apply (Khalkhali, 2016). There are many studies in the literature to determine the optimum values of the parameters to increase the performance of the PI controller. Singh et al. designed a proportional-integral-derivative (PID) controller for controlling of a coupled tank liquid level system used in water treatment plants and facilities such as food processing (Singh et al., 2014). Traditional methods and GA were used to determine the gain expressions of the designed controller. It has been observed that the PID controller whose parameters were determined with the GA showed better results than the others. Nawi et al. proposed a new optimization algorithm for determining PI controller parameters used in liquid level control systems (Nawi et al., 2011). The proposed new algorithm consists of GA and artificial immune system. Simulation results showed that the proposed algorithm is more robust than the others. Lian et al. designed a neuro-fuzzy logic controller (NFLC) that parameters are determined by GA for a coupled tank liquid level control system (Lian et al., 1998). Experimental results showed that the NFLC is more robust than the FLC and PID controller. Mohideen et al. used model reference adaptive control method whose parameters were determined by real-coded GA for hybrid tank system (Mohideen et al., 2013). Simulation results showed that the proposed controller followed the reference level better than PID controller in nonlinear system. Liang proposed the fuzzy PID control method for the coupled tank liquid level control (Liang, 2011). Experimental results showed that the proposed control method improved the control effect. Katal et al. used PID controller that parameters were determined by Bat algorithm (BA) for liquid level control of coupled tank system (Katal et al., 2014). Simulation results showed that BA based PID controller showed better results than PID controller whose parameters were determined with different algorithms. Tijjani et al., applied PI, PI+FF and model predictive control (MPC) methods for the liquid level control of the coupled tank system (Tijjani et al., 2017). In order to determine the PI controller parameter values Z-N, pole placement and Ciancone correlation methods were used. As a result of the simulation studies, they observed that the PI+FF and MPC methods have shown similar successful results in liquid level control. In addition, it has been observed that MPC have shown better results than PI and PI+FF in terms of time response and disturbance handling criteria. John et al., performed liquid level control of a tank with the backstepping algorithm (John et al., 2017). They compared the performance of PID and backstepping control methods for different reference liquid levels. Simulation results showed that the backstepping algorithm have given better response than the PID controller while tracking the desired reference liquid level without overshoot and in less settling time.

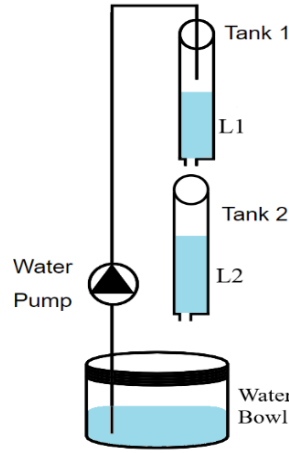
In this paper, PI+FF controller is designed to control of single and coupled tank liquid level system. In order to determine the PI controller parameters Z-N and GA methods are used. Also, real-time applications have been realized to compare the performances of the two algorithms in a single tank and coupled tank liquid level control system.

## MATERIALS AND METHODS

### Mathematical Model of Tank Liquid Level Control System

Most of the systems used in industrial applications are nonlinear systems due to their complex structure. While designing the controllers for these systems, a mathematical model is often needed. Generally, the mathematical model of the liquid level control system shown in Figure 1, which consists

of 2 tanks, 1 water pump and 1 water container, is modeled separately for a single tank and a coupled tank, respectively.



**Figure 1.** The coupled tank liquid level model

Before the beginning, we give the nomenclature used in this paper as:

- $f_{1i}$  Volumetric flow rate of liquid input to the tank 1 ( $\frac{cm^3}{s}$ )
- $f_{1o}$  Volumetric flow rate of the liquid output to the tank 1 ( $\frac{cm^3}{s}$ )
- $f_{2o}$  Volumetric flow rate of the liquid output to the tank 2 ( $\frac{cm^3}{s}$ )
- $m$  Pump flow constant ( $\frac{cm^3}{s.V}$ )
- $V_p$  Pump voltage ( $V$ )
- $S_{1o}$  Tank 1 liquid flow outlet cross sectional area ( $cm^2$ )
- $S_{2o}$  Tank 2 liquid flow outlet cross sectional area ( $cm^2$ )
- $V_{1o}$  Outflow velocity of tank 1 ( $\frac{cm}{s}$ )
- $V_{2o}$  Outflow velocity of tank 2 ( $\frac{cm}{s}$ )
- $D_{1o}$  Outlet diameter of tank 1 ( $cm$ )
- $D_{2o}$  Outlet diameter of tank 2 ( $cm$ )
- $L_1$  Tank 1 liquid level ( $cm$ )
- $L_2$  Tank 2 liquid level ( $cm$ )
- $S_{1t}$  Tank 1 liquid flow inside cross sectional area ( $cm^2$ )
- $S_{2t}$  Tank 2 liquid flow inside cross sectional area ( $cm^2$ )
- $g$  Gravity constant ( $\frac{cm}{s^2}$ )

### Single Tank Liquid Level Model

In the single tank liquid level control system, liquid flow is provided to tank 1 by the voltage applied to the pump. The control system depends on the volumetric flow rate of the liquid input and output to the tank 1. The volumetric flow rate of the liquid input for tank 1 is given in Equation 1 and volumetric flow rate of the liquid leaving from tank 1 is given in Equation 2 (Quanser, 2005), respectively.

$$f_{1i} = mV_p \quad (1)$$

$$f_{1o} = S_{1o} V_{1o} \quad (2)$$

The cross-sectional area of the place where the liquid is filled into tank 1 by the pump is given in Equation 3, and the outflow velocity from the tank 1 is given in Equation 4.

$$S_{l_0} = \frac{(\pi D_{l_0}^2)}{4} \quad (3)$$

$$V_{l_0} = \sqrt{2L_1g} \quad (4)$$

When the expressions in Equation 3 and Equation 4 are rewritten in Equation 2 and the mass balance principle is taken into consideration, the expression in Equation 5 and 6 is obtained.

$$\dot{L}_1 = \frac{(f_{l_i} - f_{l_0})}{S_{l_i}} \quad (5)$$

$$\dot{L}_1 = \frac{(mV_p - S_{l_0}\sqrt{2L_1g})}{S_{l_i}} \quad (6)$$

Since the expression in Equation 6 is nonlinear, the static balance point  $(V_{p_0}, L_{1_0})$  should be selected in order to determine the pump voltage suitable for the desired liquid level. In case of equilibrium, the derivative expression in Equation 6 will be zero and the pump voltage will be as in Equation 7.

$$V_{p_0} = \frac{S_{l_0}\sqrt{2L_{1_0}g}}{m} \quad (7)$$

In order to control the pump voltage, the equation of motion is linearized around the operating point. The operating limits of the system are determined with small deviations  $(V_{p_1}, L_{1_1})$  around the operating point. In this case, the pump voltage and liquid level are expressed as in Equation 8 and Equation 9, respectively.

$$V_p = V_{p_0} + V_{p_1} \quad (8)$$

$$L_1 = L_{1_0} + L_{1_1} \quad (9)$$

The result of the Taylor series is the linear model of the system and given in Equation 10.

$$\dot{L}_{1_1} = \frac{mV_{p_1}}{S_{l_i}} - \frac{(S_{l_0}\sqrt{2L_{1_0}g})}{2S_{l_i}\sqrt{gL_{1_0}}} \quad (10)$$

In this case, the open loop transfer function of the tank 1 is obtained as given below;

$$G_1(s) = \frac{m\sqrt{2gL_{1_0}}}{S_{l_i}\sqrt{2gL_{1_0}}s + S_{l_0}g} = \frac{3.24}{15.23s + 1} \quad (11)$$

### Coupled Tank Liquid Level Model

In the coupled tank liquid level model, liquid flow is provided to tank 1 by the voltage applied to the pump. The desired amount of liquid for tank 2 is provided by tank 1. The volumetric flow rate of the liquid input to tank 2 is given in Equation 12.



$$\dot{f}_{2_0} = S_{2_0} V_{2_0} \quad (12)$$

The cross-sectional area of the place where the liquid output from tank 1 to tank 2 is given in Equation 13, and the outflow velocity from the tank 2 is given in Equation 14, respectively.

$$S_{2_0} = \frac{(\pi D_{2_0}^2)}{4} \quad (13)$$

$$V_{2_0} = \sqrt{2L_2g} \quad (14)$$

The mathematical model of the coupled tank system according to the mass balance principle is given in Equation 15.

$$\dot{L}_2 = \frac{(-S_{2_0} \sqrt{2L_2g} + S_{1_0} \sqrt{2L_1g})}{S_{2_0}} \quad (15)$$

Since the expression in Equation 15 is nonlinear, the static balance point  $(L_{1_0}, L_{2_0})$  should be selected in order to determine the nominal liquid level which is suitable for the desired liquid level for the tank 2. In the case of equilibrium, the derivative expression will be zero in the Equation 15, and the nominal water level can be expressed as given in Equation 16.

$$L_{1_0} = \frac{S_{2_0}^2 L_{2_0}}{S_{1_0}^2} \quad (16)$$

In order to control the liquid level of the tank 2, the equation of motion is linearized around the operating point. The operating limits of the system are determined by small deviations around the operating point  $(L_{1_1}, L_{2_1})$ .

$$L_1 = L_{1_0} + L_{1_1} \quad (17)$$

$$L_2 = L_{2_0} + L_{2_1} \quad (18)$$

With the Taylor series approach, the linear model of the tank 2 system is obtained in Equation 19.

$$\dot{L}_{2_1} = \frac{1}{2} \left( \frac{S_{1_0} \sqrt{2L_1g}}{S_{2_0} \sqrt{gL_{1_0}}} - \frac{S_{2_0} \sqrt{2L_2g}}{S_{2_0} \sqrt{gL_{2_0}}} \right) \quad (19)$$

In this case, the open loop transfer function of the tank 2 is obtained as;

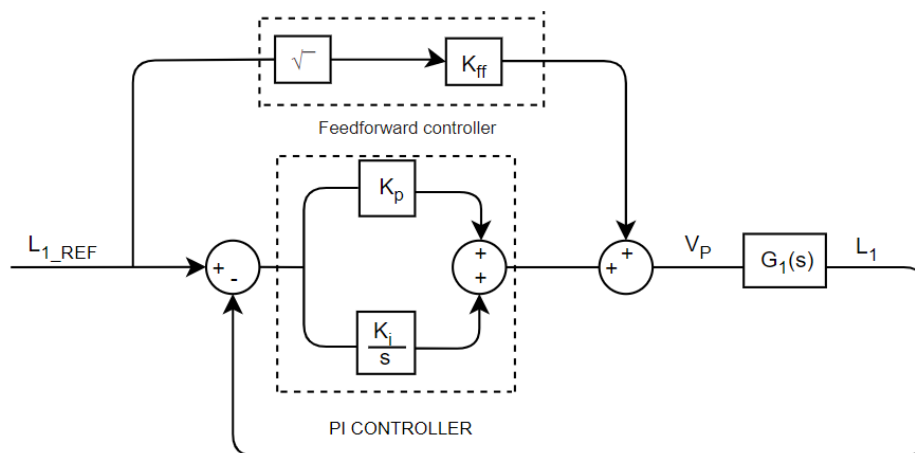
$$G_2(s) = \frac{S_{1_0} g \sqrt{L_{2_0}}}{S_{2_0} \sqrt{2gL_{1_0}L_{2_0}} s + S_{2_0} g \sqrt{L_{1_0}}} = \frac{1}{15.23s + 1} \quad (20)$$

Moreover, the transfer function of coupled tank system is obtained as given below;

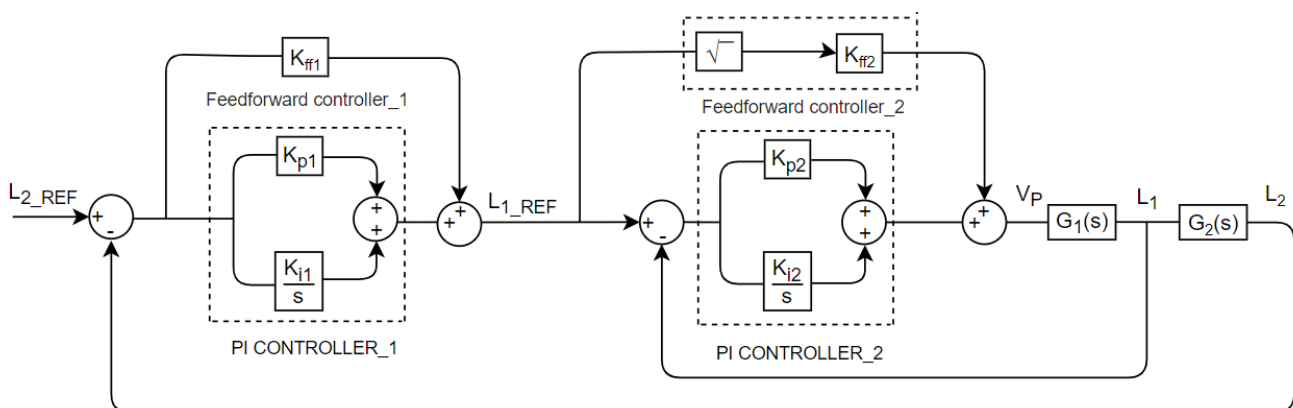
$$G(s) = G_1(s).G_2(s) = \frac{0.01396}{s^2 + 0.1313s + 0.004309} \quad (21)$$

## Control Method

In this paper, PI+FF control technique is used to control the liquid level in the tanks. The feed forward control technique has been used to eliminate the disturbance effect that may occur during liquid leaving from the tank. The PI controller is formed by adding the integral (I) effect to the proportional (P) controller. The most important advantage of this controller is that it eliminates the steady state error and compensates dynamic deviations by taking the past values of the error into consideration (Ogata,2015). Basically, the working principle is to multiply the error expression obtained by comparing the reference signal and the output signal with the appropriate gain parameters ( $K_p$ ,  $K_i$ ) and send the new control signal to the system. It is frequently used in real-time applications due to its simple structure. Figure 2 shows the liquid level control block diagram for single tank and Figure 3 shows coupled tank liquid level control block diagram.



**Figure 2.** Liquid level control block diagram for single tank

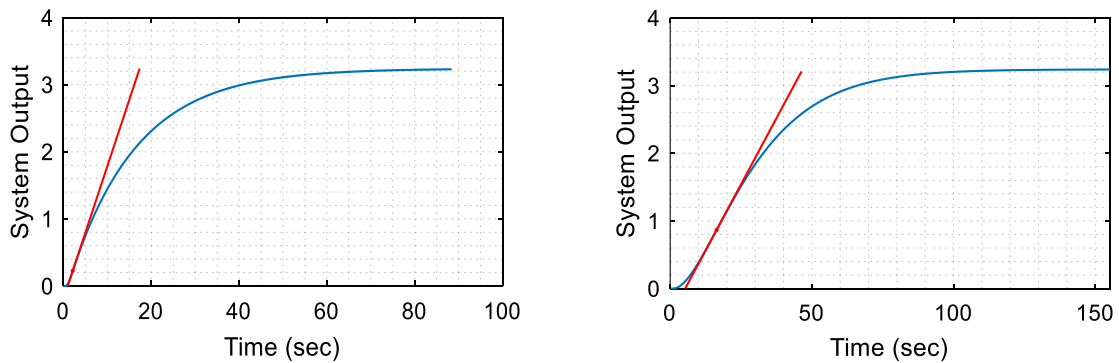


**Figure 3.** Liquid level control block diagram for the coupled tank

## Determining the Controller Gain Parameters

In order to determine PI controller parameters, Z-N and GA methods are used. The Z-N method was discovered in 1942 by John G. Ziegler and Nathaniel B. Nichols. It is one of the most preferred methods to find the optimum PI parameters ( $K_p$ ,  $K_i$ ). In this study, optimum parameters were found by using open loop Z-N method. In the open loop Z-N method, the open loop gain of the system is obtained by applying unit step to the input. The open loop gains for single and coupled tank are given in Figure 4. The inflection point is determined in the unit step response of the system. The delay time ( $L$ ) and time

constant ( $T$ ) of the system are calculated by drawing a tangent to the x axis from the inflection point. With the help of Table 1, PI controller parameters are found.



**Figure 4.** a) Step response of single tank

b) Step response of coupled tank

**Table 1.** Optimum parameter values according to open loop Z-N method

| Controllers | Parameters |          |       |
|-------------|------------|----------|-------|
|             | $K_P$      | $T_i$    | $T_d$ |
| <b>P</b>    | $T/L$      | $\infty$ | 0     |
| <b>PI</b>   | $0.9T/L$   | $L/0.3$  | 0     |
| <b>PID</b>  | $1.2T/L$   | $2L$     | $L/2$ |

Where  $L = 0.9755 \text{ sec}$  and  $T = 16.373 \text{ sec}$  are obtained for tank 1 and also,  $L = 5.287 \text{ sec}$  and  $T = 40.96 \text{ sec}$  are found for tank 2, respectively. The GA developed for the first time by John Holland in 1975, is the first and most well-known heuristic optimization algorithm. The algorithm consists of 3 basic concepts: reproduction, crossover and mutation (Çelebi and Başçi, 2016). The most frequently preferred fitness functions in solving optimization problems with GA are integral absolute error (IAE), integral square error (ISE), integral time absolute error (ITAE) and integral time square error (ITSE).

$$IAE = \int |e(t)| dt \quad (22)$$

$$ISE = \int e(t)^2 dt \quad (23)$$

$$ITAE = \int t |e(t)| dt \quad (24)$$

$$ITSE = \int t e(t)^2 dt \quad (25)$$

Besides, GA flowchart is given in Figure 5. Fitness functions are used when finding PI parameters with the GA. The parameter values that make the fitness function minimum are taken as optimal values (Khalkhali, 2016). One of the important functions created with parameter combinations is given in Equation 26.

$$\text{Cost}F = \lambda M + (1 - \lambda)t_s \quad (26)$$

In Equation 26,  $M$  is the overshooting and  $t_s$  indicates the settling time. If  $\lambda = 0.5$ , then the expression in Equation 27 is obtained as;

$$CostF = (0.5)M + (0.5)t_s \tag{27}$$

Thus, the minimum value for the *CostF* system, which goes through the calculation process with GA, will provide the optimal parameters.

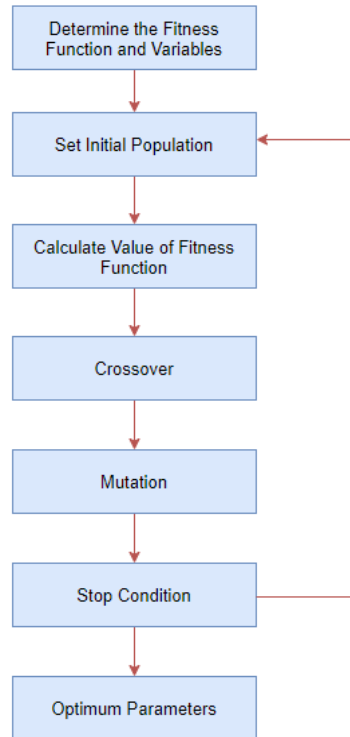


Figure 5. Genetic algorithm flowchart

Moreover, the controller parameters obtained for the single tank and the coupled tank systems are given in Table 2 and Table 3, respectively. Also, the experimental setup for coupled tank system is given in Figure 6.

Table 2. The obtained parameters of the both controllers for single tank

| Parameters | Controllers                |                           |
|------------|----------------------------|---------------------------|
|            | Z-N based PI+FF Controller | GA based PI+FF Controller |
| $K_{ff}$   | 2.3911                     | 0.5455                    |
| $K_p$      | 15.108                     | 99.99                     |
| $K_i$      | 4.446                      | 19.99                     |

Table 3. The obtained parameters of the both controllers for coupled tank

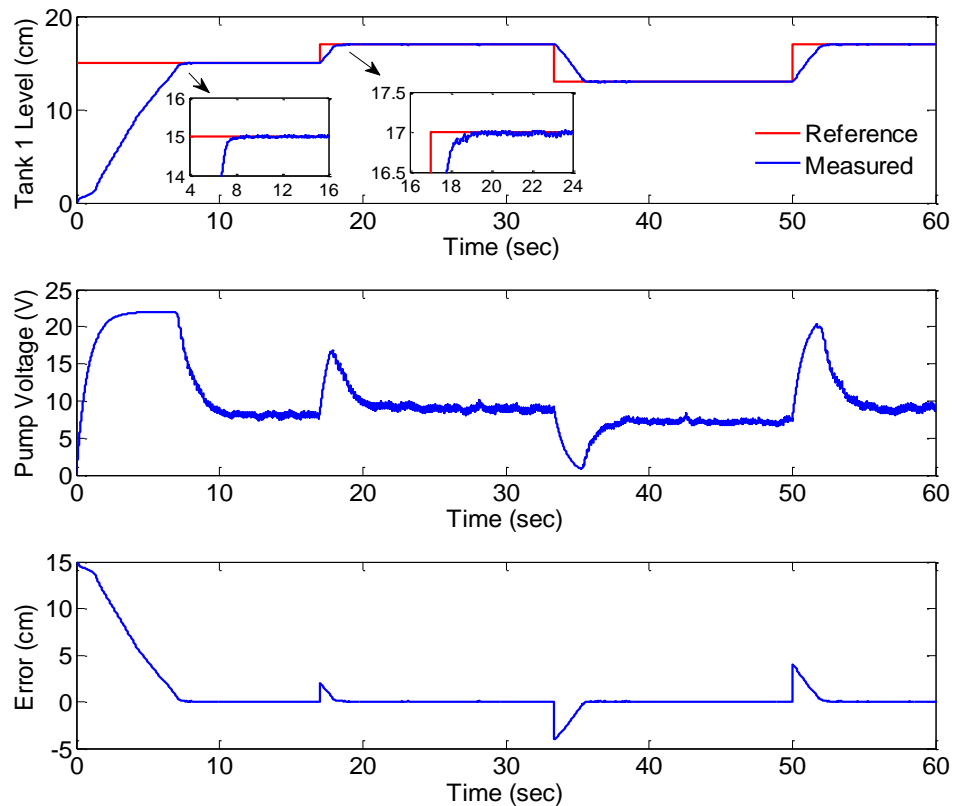
| Parameters | Controllers                |                           |
|------------|----------------------------|---------------------------|
|            | Z-N based PI+FF Controller | GA based PI+FF Controller |
| $K_{ff1}$  | 1                          | 0.9                       |
| $K_{p1}$   | 6.9723                     | 2.68                      |
| $K_{i1}$   | 0.3956                     | 15.27                     |
| $K_{ff2}$  | 2.3911                     | 0.25                      |
| $K_{p2}$   | 15.108                     | 99.384                    |
| $K_{i2}$   | 4.446                      | 20.945                    |



**Figure 6.** The experimental setup (Quanser, 2005)

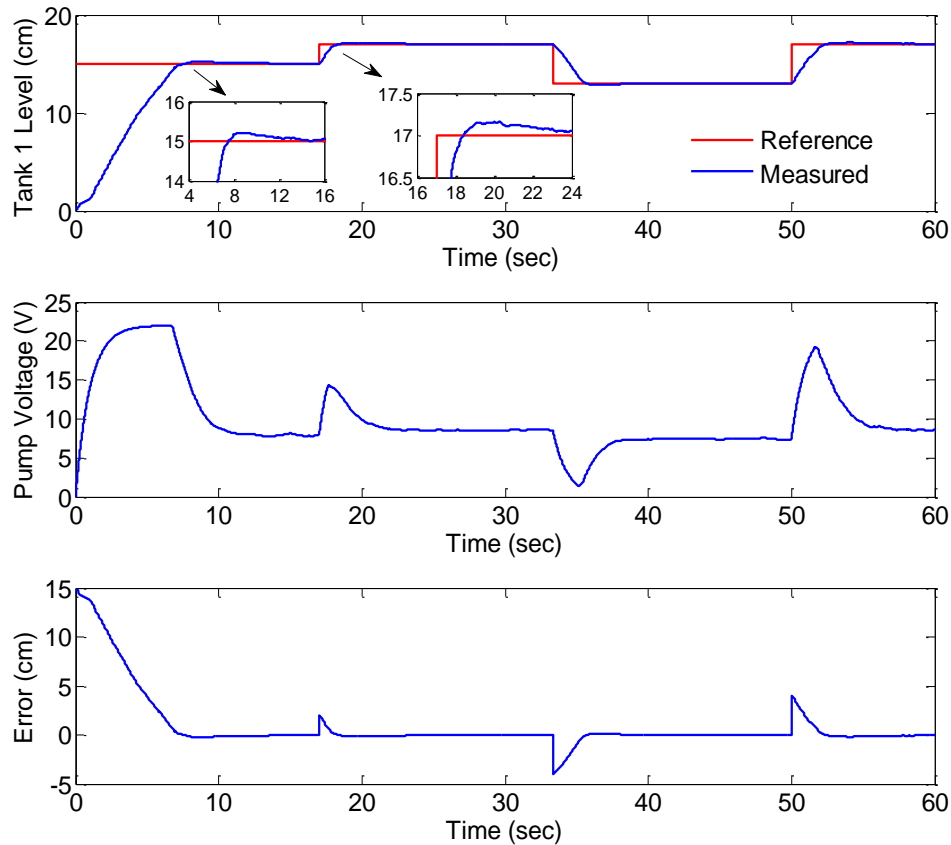
## RESULTS AND DISCUSSION

In this section, the proposed controller are tested on Quanser coupled tank liquid-level system and experimental results are presented. The GA and the Z-N based PI+FF controller results for step (15 cm) + square ( $\pm 2$  cm) reference signal for tank1 are shown in Figure 7 and 8, respectively.



**Figure 7.** The GA based PI+FF controller results for single tank

For step part of the reference signal, The Z-N based controller has bigger overshoot and longer settling time when it compared to GA based controller. When square part of the reference signal is applied, the GA based controller has managed to follow the reference signal without overshoot.



**Figure 8.** The Z-N based PI+FF controller for single tank

Moreover, 12.20% improvement has been achieved with the parameter values obtained by the GA as seen in Table 4 compared to the Z-N method. Although, the GA based controller has produced more chattering control signal due to reacting more sensitive and faster to error changes, it has provided more successful parameter optimization than the Z-N method and better reference level tracking as well.

**Table 4.** Mean absolute error values of the controllers for both tanks

| Mean Absolute Error (MAE) (cm½) |                            |            |                   |                           |            |                   |                     |
|---------------------------------|----------------------------|------------|-------------------|---------------------------|------------|-------------------|---------------------|
|                                 | Z-N based PI+FF Controller |            |                   | GA based PI+FF Controller |            |                   | Total Improvement % |
| Single Tank                     | step                       | square     | step + square     | step                      | square     | step + square     | 12.20               |
|                                 | 0.0935                     | 0.2748     | 0.2434            | 0.0155                    | 0.2552     | 0.2137            |                     |
| Coupled Tank                    | step                       | sinusoidal | step + sinusoidal | step                      | sinusoidal | step + sinusoidal | 68.79               |
|                                 | 0.2295                     | 0.1823     | 0.1910            | 0.0961                    | 0.0513     | 0.0596            |                     |

In Figure 9 and 10, the GA based and Z-N based controllers' results have been given for step (10 cm) + sinusoidal ( $\pm 2$  cm) reference signal for coupled tank, respectively. For tank 2, the GA based controller has lower overshoot and is able to track the step reference very well when it compared to the Z-N based controller. Also, the GA based controller has a lower settling time as well. Moreover, when the time varying part of the reference signal is applied, the GA based controller has followed the sinusoidal reference with minimum deviation when compared with the result of the Z-N based controller

as seen from the Figure 9 and 10. Moreover, thanks to the parameters obtained by the GA, an improvement of 68.79% has been achieved throughout the reference signal tracking as seen from the Table 4.

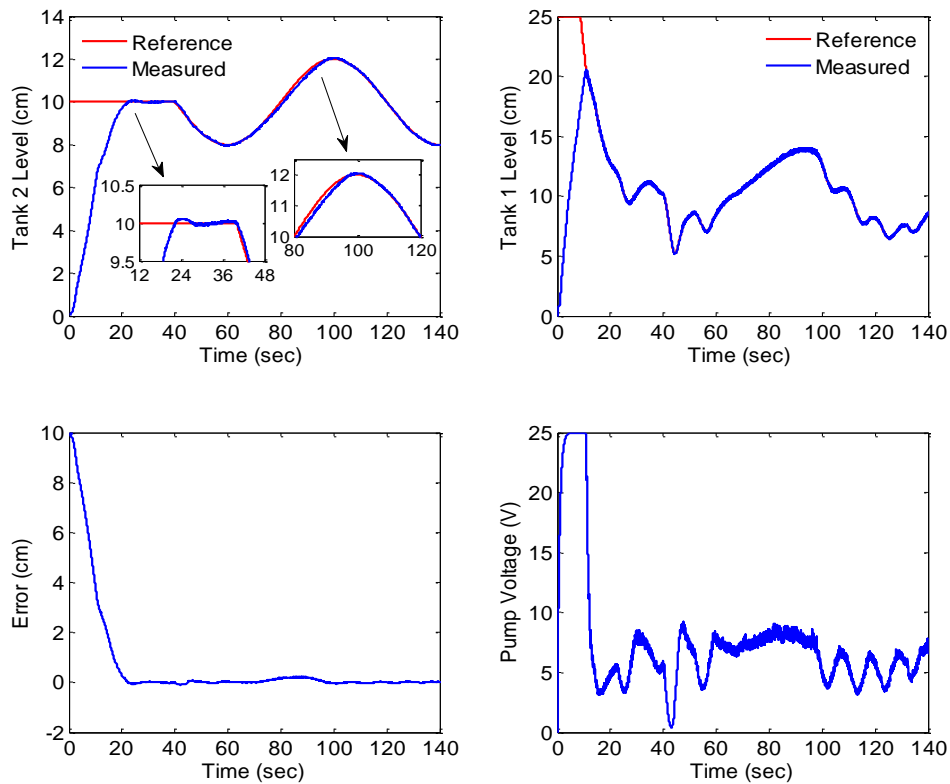


Figure 9. The GA based PI+FF controller results for coupled tank

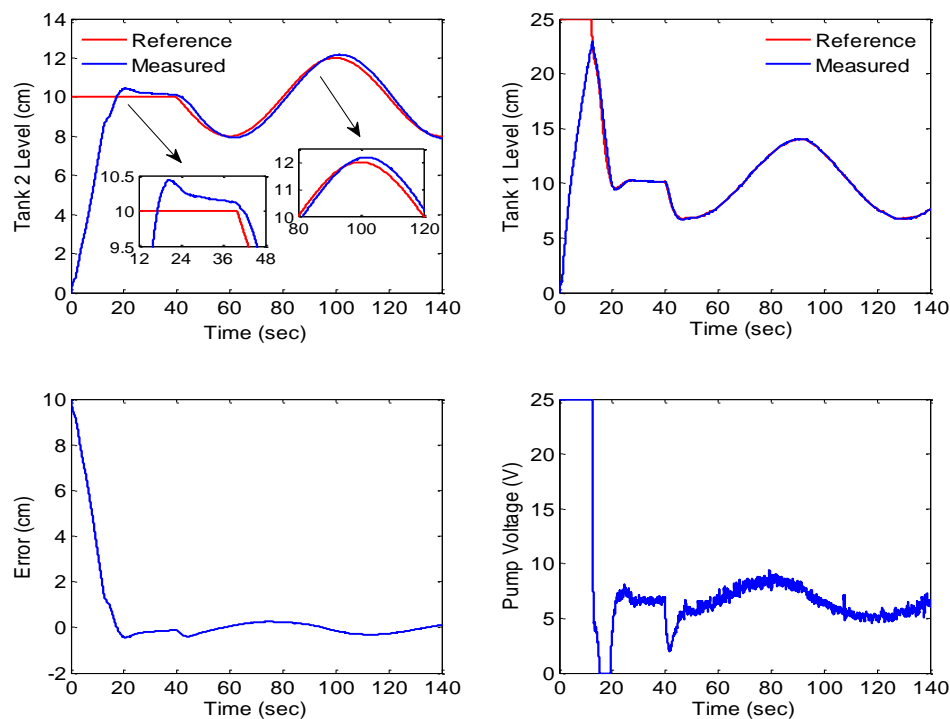


Figure 10. The Z-N based PI+FF controller results for coupled tank

## CONCLUSION

In this paper, the GA and Z-N optimization methods have been used to obtain PI+FF controller's parameters to realize liquid level control of tank system. The obtained parameters by two optimization methods are tested in real time in terms of reference tracking performances, error elimination capability and compared to their ability to respond quickly to the sudden reference changes. For single tank, although both optimization-based PI controllers performed similarly, the GA based PI controller has provided an improvement of 12.20%. Also, for sudden changes applied for single tank, the GA based PI controller is able to set to reference without overshoot compared to the Z-N based PI controller. Besides, for coupled tank, the GA based PI controller has set the reference with less overshoot and also followed the sinusoidal reference signal with minimum deviation when it is compared with the Z-N based PI controller's result. Moreover, the GA based PI controller has provided 68.79% total improvement while tracking the whole reference signal compared to the Z-N based PI controller. As a result, the GA gives more successful results than the Z-N method due to its advantages such as researching the fitness function in a wide spectrum, studying with multiple parameters, obtaining more than one optimum solution, and optimizing complex fitness function parameters.

## Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

## Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

## REFERENCES

- Abiodun FT, Habeeb BS, Mikail OO, Wahab NA, 2013. Control of a Two Layered Coupled Tank: Application of IMC, IMC-PI and Pole-Placement PI controllers. *International Journal of Multidisciplinary Sciences and Engineering*, 4(11): 1-6.
- Başçi A, Derdiyok A, 2016. Implementation of an Adaptive Fuzzy Compensator for Coupled Tank Liquid Level Control System, *Measurement*, 91(2016):12-18.
- Çelebi M, Başçi A, 2016. Fractional Order Control of A Sinusoidal Output Inverter. *Istanbul University-Journal of Electrical and Electronics Engineering*, 16(2): 3037-3042.
- John JA, Jaffar NE, Francis RM, 2015. Modelling and Control of Coupled Tank Liquid Level System using Backstepping Method. *International Journal of Engineering Research & Technology*, 4(6): 667-671.
- Khalkhali A, 2016. Control of Two Tank System with Genetic Algorithm. Atatürk University Graduate School of Natural and Applied Sciences, Master Thesis (Printed).
- Katal N, Kumar P, Narayan S, 2014. Optimal PID Controller for Coupled-Tank Liquid-Level Control System Using Bat Algorithm. 2014 International Conference on Power, Control and Embedded Systems (ICPCES), Allahabad, December 26-28, 2014, pp: 1-4.
- Lian ST, Marzuki K, Rubiyah Y, 1998. Tuning of a Neuro-Fuzzy Controller by Genetic Algorithms with an Application to a Coupled-Tank Liquid-Level Control System. *Engineering Applications of Artificial Intelligence*, 11(4): 517-529.
- Liang L, 2011. The Application of Fuzzy PID Controller in Coupled-Tank Liquid-Level Control System. 2011 International Conference on Electronics, Communications and Control (ICECC), Ningbo, September 9-11, 2011, pp: 2894-2897.



- Mohideen KA, Saravanakumar G, Valarmathi K, Devaraj D, Radhakrishnan TK, 2013. Real-Coded Genetic Algorithm for System Identification and Tuning of a Modified Model Reference Adaptive Controller for a Hybrid Tank System. *Applied Mathematical Modelling*, 37(6): 3829-3847.
- Nawi SM, Abdalla AN, Ramli MS, 2011. Improved Coupled Tank Liquid Levels System based on Hybrid Genetic-Immune Adaptive Tuning of PI Controller. *International Conference on Electrical, Control and Computer Engineering 2011 (InECCE)*, Pahang, June 21-22, 2011, pp: 247-252.
- Ogata K, 2010. *Modern Control Engineering*, Prentice Hall, New Jersey.
- Sekban HT, Can K, Başçi A, 2020. Model-based Dynamic Fractional-order Sliding Mode Controller Design for Performance Analysis and Control of a Coupled Tank Liquid-level System. *Advances in Electrical and Computer Engineering*, 20(3): 93-100.
- Singh SK, Katal N, Modani SG, 2014. Multi-Objective Optimization of PID Controller for Coupled-Tank Liquid-Level Control System Using Genetic Algorithm. *Proceedings of the Second International Conference on Soft Computing for Problem Solving*, New Delhi, December 28-30, 2014, pp: 59-66.
- Tijjani AS, Shehu MA, Alsabari AM, 2017. Performance Analysis for Coupled - Tank System Liquid Level Control Using MPC, PI and PI-plus-Feedforward Control Scheme. *J Robotics Autom*, 1(1): 42-53.
- Quanser manufacturer, *Two Tank Manuel*, 2005.

**Atf için:** Ceylan Z, Arslan M, Arslan T, 2021. Bir Hafif Raylı Ulaşım Sisteminde Makinist Çizelgeleme Problemi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1027-1039.

**To Cite:** Ceylan Z, Arslan M, Arslan T, 2021. Machinist Scheduling Problem in a Light Rail Transportation System. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1027-1039.

### **Bir Hafif Raylı Ulaşım Sisteminde Makinist Çizelgeleme Problemi**

Zeynep CEYLAN<sup>1\*</sup>, Merve ARSLAN<sup>2</sup>, Tuba ARSLAN<sup>2</sup>

**ÖZET:** Hızlı kentleşme ve nüfus artışından dolayı raylı ulaşım sisteminin kullanımı giderek artmaktadır. Ancak, raylı ulaşım sistemlerin şehir içi taşımacılıkta yaygın kullanımı beraberinde büyük boyutlu ve çözülmesi zor problemlere sebep olmaktadır. Özellikle, tren seferlerinin düzenlenmesinde dengesizlikler, makinistlerin vardiya planlamasının ve çalışma-dinlenme sürelerinin uygun şekilde ayarlanamaması gibi pek çok sorun ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, bu sistemlerin planlanması, işletilmesi ve sürekliliğin sağlanması için sorunlara hızlı ve uygun çözümler üretilmesi zorunlu hale gelmiştir. Bu çalışmada, hafif raylı ulaşım sisteminde hizmet eden bir işletmenin tüm makinistlerinin toplam çalışma süresini ve vardiya sayısını eşitleyerek adil bir görev çizelgesi oluşturulması hedeflenmektedir. Mevcut durumda işletmede makinist görev çizelgesinin manuel olarak yapılması zaman kaybına sebep olmaktadır. Ayrıca, oluşturulan çizelgede eşit iş dağılımının sağlanamaması çalışan memnuniyetsizliğine yol açmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada, söz konusu işletmede makinist çizelgeleme problemi için hedef programlama modeli geliştirilmiş ve GAMS/CPLEX programı ile çözülmüştür. Önerilen matematiksel model ile adil görev ataması sağlanmış ve çalışanların artan motivasyon ve memnuniyeti ile hizmet kalitesinin artması beklenmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Çizelgeleme, hedef programlama, raylı ulaşım sistemi, makinist, vardiya

### **Machinist Scheduling Problem in a Light Rail Transportation System**

**ABSTRACT:** Due to rapid urbanization and population growth, the use of the rail transportation system is gradually increasing. However, the widespread use of rail transportation systems in urban transport causes large-scale and difficult-to-solve problems. In particular, many problems arise, such as imbalances in the planning of train trips, inability to adjust shift scheduling and working-rest periods of the machinists. For this reason, it has become obligatory to generate fast and appropriate solutions to the problems in order to plan, operate and maintain these systems. In this study, it is aimed to create a fair task schedule by equalizing the total working time and the number of shifts of all the machinists of a company serving in the light rail transportation system. In the current situation, it is very time-consuming to manually perform the task schedule of the machinist. In addition, the lack of equal work distribution in the schedule created leads to employee dissatisfaction. Therefore, in this study, the goal programming model for the machinist scheduling problem has been developed and solved by using GAMS/CPLEX program. With the proposed mathematical model, fair task assignment has been achieved and it is expected that the quality of service will increase with the increased motivation and satisfaction of the employees.

**Keywords:** Scheduling, goal programming, rail transportation system, machinist, shift

<sup>1</sup>Zeynep CEYLAN ([Orcid ID: 0000-0002-3006-9768](https://orcid.org/0000-0002-3006-9768)), Samsun Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Endüstri Mühendisliği Bölümü, Samsun, Türkiye

<sup>2</sup>Merve ARSLAN ([Orcid ID: 0000-0002-8873-4732](https://orcid.org/0000-0002-8873-4732)), Tuba ARSLAN ([Orcid ID: 0000-0001-9902-8705](https://orcid.org/0000-0001-9902-8705)), Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Endüstri Mühendisliği Bölümü, Samsun, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Zeynep CEYLAN, e-mail: [zeynep.ceylan@samsun.edu.tr](mailto:zeynep.ceylan@samsun.edu.tr)

## GİRİŞ

Çizelgeleme, üretim ve hizmet sektöründe, işlerin veya görevlerin belirli kurallar ve performans kriterleri göz önüne alınmasıyla nasıl, nerede ve ne zaman yapılacağını belirli bir sıraya dizme, atama ve zamanlama işlemidir (Pinedo, 2012; Ceylan ve ark., 2019a). Üretim faaliyetlerinde çizelgeleme, elde olan kaynakların optimum kullanımı için yapılır. Var olan işler ilgili ekipmanlara atanır. Bu atama ile işlerin hangi sırayla yapılacağı ve hangi makinelerde işlem görecekları belirlenmiş olur. Bu planlama sonucunda müşteri bekleme süresi azaltılmış, stok miktarı minimize edilmiş, müşteri memnuniyeti sağlanmış, personel ve eldeki ekipman en etkin şekilde kullanılmış olur (Kayacı ve Yiğit, 2012).

Hizmet sistemlerinde çizelgeleme, işgücünün ve kaynakların etkin kullanımı için yapılır (Huang ve ark., 2011). Günümüz ekonomisinde hizmet sektöründeki en önemli ve en pahalı olan işgücünü çizelgeleme, personele uygun olarak oluşturulan çalışma planıdır. Ancak, uygun bir çalışma planı oluşturmak için uyulması zorunlu olan yasal gereklilikler, talep ve memnuniyetlerin karşılanması gibi pek çok kısıtlama yer almaktadır. Ayrıca, sağlık, koruma hizmetleri, ulaşım ve çağrı merkezinde yer alan pek çok meslek farklı gereksinimleri karşılamak için farklı çalışma planı gerektirir. Bu nedenle, her hizmet sektörünün çalışma prensibi aynı olmadığından uygun bir çalışma planı oluşturmak için geliştirilen modeller ve çözüm teknikleri de birbirinden farklıdır (Özder ve ark., 2019).

Görev çizelgeleme, son yıllarda araştırmacılar tarafından oldukça fazla incelenen çizelgeleme problemlerinden biridir. İşletmelerde, hastanelerde, okullarda, havalimanlarında ve buna benzer pek çok yerde görev çizelgeleme problemi ile karşılaşmaktayız (Jütte ve ark., 2017). Bu problemde temel amaç en düşük personel/çalışan/görevli sayısı ile en düşük maliyetli ve iş yüklerinin ve izin günlerinin dengeli olduğu uygun görev çizelgesinin bulunmasıdır. Böylelikle, çalışanın daha adil koşullarda çalışması sağlanarak memnuniyetinin ve performansının artırılması sağlanmış olur. Ayrıca, çalışanın ihtiyaç ve tercihlerinin dikkate alınması hem çalışanın hem de ilgili işletmenin planlı ve sistemli bir şekilde devam etmesini sağlar.

Ekip çizelgeleme problemi, demiryolu, havayolu ve hızlı transit gibi toplu taşıma sistemleri için önemli bir problem haline gelmiştir (Fuentes ve ark., 2019; Su ve ark., 2019; Heil ve ark., 2020). Bu çalışma kapsamında, raylı sistem taşımacılığı planlama sürecinde karşılaşılan en kapsamlı ve zor problemlerden biri olan makinist çizelgeleme problemi ele alınmıştır. Bu problemde, belirlenen plan takvimi içerisinde planlanan tüm seferleri kapsayacak şekilde makinistler için çalışma çizelgesi oluşturulur. Bu çizelgede görevler, izin, dinlenme süreleri ile ilgili listeler bulunur. Bu listeler devletin çalışma politikalarına ilişkin kısıtlama ve sınırlamalar dikkate alınarak haftalık veya aylık olarak yapılır. Bu sayede makinist çizelgeleme ile hazırlanan görevler her günü içerecek şekilde her makiniste sırasıyla atanır. Literatürde, demiryolu ekip çizelgeleme ve ekip atama problemleri üzerine pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar genellikle tamsayı programlama modeli, çok amaçlı matematiksel model, küme kapsama modeli gibi çeşitli optimizasyon modelleri kullanılarak sezgisel ve meta-sezgisel algoritmalar ile çözülmüştür. Çizelge 1' de bu alanda yapılan bazı çalışmaların özeti sunulmaktadır.

Örneğin, Sarucan (1999) çalışmasında, raylı sistemde tramvay hareketleri arasındaki kalkış süresinin bulunması için simülasyon çalışması yapmış ve buna göre yeni bir tarife oluşturulmaya çalışmıştır. Geliştirilen model ile raylı sistem için gerekli vatman sayısını ve vatmanların hangi gün ve vardiyada çalışması gerektiğini belirlemiştir. Kroon ve Fischetti (2001) çalışmalarında, sürücülere uygun bir görev çizelgesinin oluşturulması ile tren hizmetlerinin daha kaliteli ve daha dakik olacağını belirtmişlerdir. Çalışmada, ek kısıtlamalar içeren küme kapsama modeli kullanılmış ve sütun türetme

algoritması, Lagrange gevşetmesi yöntemi ve sezgisel algoritmalar ile model çözülmüştür. Moudani ve ark. (2001) çalışmalarında ekip atama problemi için çok amaçlı matematiksel model önermişlerdir.

**Çizelge 1.** Demiryolu ekip çizelgeleme problemi üzerine yapılan bazı çalışmalar

| Referans                     | Amaç/Vurgu   | Model                         | Çözüm Yaklaşımı  |
|------------------------------|--|-------------------------------|--|
| Sarucan, 1999                | -İhtiyaç duyulan vatman sayısını belirlemek ve bulunan vatmanların hangi gün ve vardiyalarda çalışacağını belirlemek.  | Tamsayı doğrusal model        | Steepest Ascent sezgiseli, Simülasyon                                    |
| Kroon ve Fischetti, 2001     | -Tren hizmetlerinin kalitesini ve dakiklığını artırmak.  | Küme kapsama modeli           | Sütun türetme algoritması, Lagrange gevşetme yöntemi, Sezgisel algoritma |
| Moudani ve ark. (2001)       | -Ekip operasyon maliyetlerini en aza indirmek.<br>-Ekip üyelerinin memnuniyetini arttırmak.  | Çok amaçlı matematiksel model | Genetik algoritma  |
| Valdes (2005)                | -İhtiyaç duyulan makinist sayısını belirlemek.   | Küme kapsama modeli           | Doğrusal programlama gevşetmesi  |
| Huang ve ark. (2011)         | -Tüm görevleri üstlenebilecek toplam makinist sayısını en aza indirmek ve çizelgeleme planındaki boşta kalma süresini en aza indirmek.   | Matematiksel model            | Karınca kolonisi algoritması   |
| Damış Öncül (2012)           | -İstasyonlarda bekleyen yolcu sayısını ve sefer yapan tren sayısını en aza indirmek.<br>-Makinistlerin tatil günü tercihlerinin ve vardiya tercihlerinin dikkate alınmamasının ceza maliyeti, dengelenmemiş iş yükünün ceza maliyeti ve 1 günde çalışan toplam makinist sayısının maliyeti gibi maliyetlerin lineer toplamını en küçüklemek. | Karma tamsayı model           | Matematiksel programlama   |
| Üstündağ (2014)              | -Önceden belirlenen bir tren çizelgesindeki tüm tren seferlerini tam olarak kapsayan en düşük maliyetli ekip eşleştirmeleri kümesini bulmak.<br>-Tren öncelikleri ve maliyetlerini dikkate alarak makinistleri trenlere atamak.  | Küme kapsama modeli           | Sütun türetme algoritması, Rassel atama yöntemi                          |
| Hanafi ve Kozan (2014)       | -Seyahat süresi boyunca toplam âtil süreyi en aza indirerek görevli ekip sayısını en aza indirmek.   | Matematiksel model            | Benzetilmiş tavlama  |
| Suyabatmaz ve Şahin (2015)   | -İhtiyaç duyulan minimum ekip sayısı belirlemek.   | Küme kapsama modeli           | Sütun türetme algoritması, Doğrusal programlama gevşetmesi               |
| Tapkan ve ark. (2018)        | -Çalışan toplam personel sayısı, her personelin haftalık çalışma süresinin yasal çalışma süresini aşım miktarlarının toplamı ve ortalama dinlenme süresi ile gerçekleşen dinlenme süresi arasındaki en büyük farkı en aza indirmek.  | Çok amaçlı matematiksel model | Hedef programlama  |
| Lin and Tsai (2019)          | -Ekip çizelgeleme ve ekip atama problemlerini entegre ederek sürücü sayısını en aza indirmek.  | Karma tamsayı model           | Dal-ücret/ Dal-sınır algoritması, Derinlik arama algoritması             |
| Hoffmann ve Buscher (2019)   | -Operasyon koşullarını ve yasal gereklilikleri karşılarken mürettebat maliyetlerini en aza indirmek.   | Ağ akış problemi              | Tam sayılı programlama   |
| Rählmann ve Thonemann (2020) | -Operasyonel bir yük demiryolu sisteminde zaman çizelgesini ve mürettebat programını koordine etmenin etkisini araştırmak.   | Küme kapsama modeli           | Sütun türetme algoritması  |

Önerilen modelde, ekip operasyon maliyetlerinin azaltmak ve ekip üyelerinin memnuniyetini arttırmak hedeflenmiştir. Sezgisel yaklaşımı genetik algoritma ile birleştirerek maliyetleri düşürecek

çözümler aramışlardır. Ernst ve ark. (2004) çalışmalarında, literatürde makinist çizelgeleme problemi için geliştirilen model ve algoritmaları detaylı incelemişlerdir. Problemi talep modelleme, izin günü çizelgeleme, vardiya çizelgeleme, iş sıralarının oluşturulması, görev atama ve personel atama olmak üzere altı modüle ayırmış ve bu modüller için farklı çözüm yaklaşımlarının uygulanabileceğini belirtmişlerdir.

Valdes (2005) tez çalışmasında ekip çizelgeleme ve ekip atama problemini entegre etmiştir. Her iki problemi aynı anda çözmek için ihtiyaç duyulan toplam makinist sayısını optimize eden bir küme kapsama modeli önermiştir. Huang ve ark. (2011) makinist çizelgeleme problemini araç rotalama problemine dönüştürmüşlerdir. Problemi çözmek için karınca kolonisi optimizasyonu algoritmasına dayalı bir algoritma geliştirmişlerdir. Tayvan Demiryolları İdaresi'nden alınan gerçek veriler ile önerilen model ve algoritmayı test etmişlerdir. Sonuçlar, model ve algoritmanın problemi etkili ve verimli bir şekilde çözebildiğini ve daha az makinist ve daha kısa boşa kalma süresi açısından daha iyi bir çözüm elde edebildiğini göstermiştir.

Danış Öncül (2012) tez çalışmasında, hafif-raylı sistem tarife oluşturma ve makinist atama problemi için iki yeni matematiksel model önermiştir. Geliştirilen tarife oluşturma modelinde istasyonlarda bekleyen yolcu sayısının ve sefer yapan tren sayısının azaltmak hedeflenmiştir. Üstündağ (2014) Eskişehir merkezli bir işletme için tren çizelgesinde yer alan 62 adet tren seferi için ekip çizelgeleme ve ekip atama problemini çalışmıştır. Daha sonra, ekip eşleştirme probleminin sonuçlarını kullanarak makinist atama problemi için sezgisel bir algoritma geliştirmiştir. Hanafi ve Kozan (2014) çalışmalarında, demiryolu ekip çizelgeleme probleminin çözümü için yeni bir matematiksel model önermişlerdir. Matematiksel model ile, seyahat süresi boyunca toplam âtil süreyi en aza indirerek görevli ekip sayısını en aza indirmeyi amaçlamışlardır. Geliştirilen model çok sayıda karar değişkeni ve kısıt içerdiğinden dolayı modelin çözümü için yeni bir hibrit sezgisel algoritma geliştirmişlerdir.

Suyabatmaz ve Şahin (2015) çalışmalarında demiryolu ekip çizelgeleme problemi üzerinde durmuşlardır. Gerekli ekip sayısını en küçükleyen matematiksel model geliştirmişlerdir. Tapkan ve ark. (2018) Kayseri Ulaşım A.Ş.'nin raylı sistem planlama sürecinde yer alan görev çizelgeleme problemi için çok amaçlı 0-1 karma tam sayılı matematiksel model geliştirmişlerdir. Önerilen matematiksel model ile çalışan toplam personel sayısını, her personelin haftalık yasal çalışma süresinin aşım miktarlarının toplamını ve ortalama dinlenme süresi ile gerçekleşen dinlenme süresi arasındaki en büyük farkı en küçükmeye çalışmışlardır. Lin and Tsai (2019) ekip çizelgeleme ve ekip atama problemlerini entegre eden karma tamsayı programlama modeli önermişlerdir. Problemin çözümü için, dal-ücret/sınır algoritması ve derinlik arama algoritmasını kullanmışlardır.

Hoffmann ve Buscher (2019) demiryolu ekip çizelgeleme problemi için bir ark akış modeli sunmuşlardır. Rählmann ve Thonemann (2020) ekip çizelgeleme problemi için matematiksel model geliştirmiş ve sütun türetme yöntemi ile çözüm elde etmişlerdir. Geliştirdikleri modeli büyük bir Avrupa Nakliye Demiryolu Operatörünün üç gerçek veri kümesi üzerinde test etmişlerdir. Modelin çözümü ile boşa kalma süresi ve maliyette önemli bir azalma elde ettiklerini göstermişlerdir. Bu çalışmada, bir hafif raylı ulaşım sisteminde hizmet veren bir şirketin planlama sürecindeki makinist çizelgeleme problemi ele alınmıştır. Tüm yasal kısıtlamalar ve sınırlamalar dikkate alınarak hedef programlama modeli geliştirilmiş ve GAMS programında CPLEX çözücüsü kullanılarak çözülmüştür. Geliştirilen model ile bir aylık zaman periyodunda haftanın her gününü kapsayacak şekilde makinistlerin izin sayısı ve görev yükünün dengelenmesi ve böylece iş memnuniyetlerinin ve performanslarının artırılması hedeflenmiştir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmanın bu bölümünde ele alınan makinist çizelgeleme probleminin tanımı, çözümü için geliştirilen yöntemler ve önerilen matematiksel programlama modeline ilişkin ayrıntılara yer verilmiştir.

### Problemin Tanımı

Bu çalışmada, Türkiye’de ulaşım sektöründe faaliyet gösteren bir firmanın hafif raylı sistem işletmesinde yer alan makinistlerin vardiyalarının çizelgelenmesi incelenmiştir. Söz konusu işletmede, toplam 72 makinist bulunmaktadır. Makinistler her gün 06:15-23:45 saatleri arasında sabah ve akşam vardiyası olmak üzere iki vardiya halinde çalışmaktadır. Sabah vardiyasında ihtiyaç duyulan makinist sayısı minimum 26, 3 yedek ile maksimum 29 olmaktadır. Akşam vardiyasında ise minimum 27, 3 yedek ile birlikte maksimum 30 makiniste ihtiyaç duyulmaktadır.

Hafif raylı sistem işletmesinde makinist çizelgelemede bazı kurallar dikkate alınmalıdır. Bu kuralların bir kısmı çalışma politikalarındaki yasal sınırlamalardan doğan kurallar, diğer kurallar ise hafif raylı sistem işletmesinde uygulanan operasyonel kurallardır. Çalışma kapsamında dikkate alınan tüm kurallar aşağıda listelenmiştir.

- Makinist ataması için planlama süresi bir haftadır. Her hafta pazartesi günü başlar ve pazar günü biter.
- Bir personel haftalık maksimum 6 gün çalışabilir. Çalışma şartları gereğince haftalık izin süresi 5 çalışma günü için 2, 6 çalışma günü için 1 gündür.
- Bir personelin günlük çalışma süresi 11 saati geçemez.
- Bir makinistin haftalık çalışma süresi yasalarla 45 saat olarak belirlenmiştir. Haftalık 5 gün çalışma planı için günlük vardiya süresi 9 saat, 6 gün çalışma planı için ise günlük vardiya süresi 7,5 saattir.
- Makinistlerin vardiya tatilleri dengeli olmalıdır.
- Bir makinist 1 haftanın tüm iş günlerinde aynı vardiya tipinde (ya akşam ya da sabah) çalışmalıdır.

### Hedef Programlama

Hedef programlama modeli, birden fazla amacı olan problemi tek bir amacı olan probleme dönüştürmeye çalışan optimizasyon yöntemidir. Hedef programlama üzerine çalışmalar 1970’li yıllarda Charnes ve Chooper tarafından başlatılmıştır (Charnes ve Chooper, 1977). Bu çalışmaların ilk aşamasında hedef programlama modelinin genel yapısı belirlenmiş, ikinci aşamasında hedef fonksiyonunun öncelik kavramlarına değinilmiş ve son olarak ortaya koyulan önceliklere ait ağırlıklar belirlenmiştir. Hedef programlama modeli oluşturulurken ilk önce hedefler belirlenir, amaçlar birer kısıt haline dönüştürülür. Bu modelde, hedefleri doğrudan optimize etmek yerine tahmini/beklenen hedef değerlere ulaşılmak istenir.

Hedef programlama modelinde amaç, tahmini/beklenen hedef değerlerinden sapma miktarını en küçükmeye çalışmaktır. Sapma değişkeni, hedeflenen amaç ile modelin çözümü ile elde edilen sonuç arasındaki farkı ölçer. Bu sapma miktarları pozitif ve negatif olarak ikiye ayrılmaktadır. Ulaşılmak istenen hedef aşıldıysa sapma pozitif ( $S_i^+$ ), hedefin altında bir değer elde edildiyse sapma negatiftir ( $S_i^-$ ). Burada  $i$  ulaşılmak istenen hedef sayısını gösterir (Kaçmaz ve ark., 2019; Bakhtavar ve ark., 2020).

Literatürde hedef programlama çeşitleri tek hedefli programlama, eşit ağırlıklı çok hedefli programlama, ağırlıklı hedef programlama, öncelikli hedef programlama ve ağırlıklı öncelikli hedef

programlama olarak sınıflandırılmaktadır (Ünal ve ark., 2019). Ağırlıklı, öncelikli ve ağırlıklı öncelikli hedef programlama modellerinde karar vericinin belirlediği önem derecesi ve önceliğe göre sapma değişkenlerine ağırlıklar ve/veya öncelikler verilir. Hedef programlama modellerinde kullanılan amaç fonksiyonlarının genel gösterimi Eşitlik (1-5)' te gösterilmiştir.

- Tek hedefli hedef programlama

$$\min Z = (S_1^+ + S_1^-) \quad (1)$$

- Eşit ağırlıklı çok hedefli hedef programlama

$$\min Z = \sum_{i=1}^m (S_i^+ + S_i^-) \quad \forall i \quad (2)$$

- Ağırlıklı hedef programlama

$$\min Z = \sum_{i=1}^m w_i (S_i^+ + S_i^-) \quad \forall i \quad (3)$$

- Öncelikli hedef programlama

$$\min Z = \sum_{i=1}^m P_i (S_i^+ + S_i^-) \quad \forall i \quad (4)$$

- Ağırlıklı öncelikli hedef programlama

$$\min Z = \sum_{i=1}^m w_i P_i (S_i^+ + S_i^-) \quad \forall i \quad (5)$$

Bu çalışma kapsamında, tek hedefli programlama modeli geliştirilmiştir. Tek hedefli programlama, hedef programlama çeşitleri içerisinde en basit olanıdır. Amaç fonksiyonuna etki eden öncelik ve ağırlıklar olmadığı için amaç fonksiyonu sadece sapma değişkenlerinden oluşmaktadır. Bu modelde, ulaşılmak istenen tek bir hedef olduğu için sapma değişkenlerinden biri ya da her ikisi amaç fonksiyonunda kullanılabilir (Ceylan ve ark., 2019b).

### Önerilen Matematiksel Model

Çalışmanın bu bölümünde yukarıda listelenen tüm bilgiler eşliğinde bir hafif raylı sistem işletmesine özel makinist çizelgeleme problemi tanımlanmış ve yeni tek hedefli hedef programlama modeli geliştirilmiştir. Önerilen matematiksel modele ait indeks kümeleri, parametreleri, karar değişkenleri, amaç fonksiyonu ve kısıtlar aşağıdaki gibi tanımlanmıştır.

Geliştirilen hedef programlama modelinde, 6. denklem hedef için belirlenen değerden pozitif ve negatif sapma değerlerinin toplamının minimize edilmesini sağlar. 7. kısıt sabah vardiyası için gerekli olan makinist sayısının en az 26 olmasını sağlar. 8. kısıt sabah vardiyası için gerekli makinist sayısının en fazla 29 olmasını sağlar. 9. kısıt akşam vardiyası için gerekli makinist sayısının en az 27 olmasını sağlar. 10. kısıt akşam vardiyası için gerekli makinist sayısının en fazla 30 olmasını sağlar. 11. kısıt her makinistin günde sadece bir vardiyada çalışmasını veya o gün izinli olmasını sağlar. 12. ve 13. kısıtlar çalışma politikaları gereği her makinistin haftada 5 ya da 6 gün çalışmasını sağlar. 14. ve 15. kısıtlar söz konusu işletmenin operasyonel kuralları gereği bir makinistin bir hafta boyunca ya sabah vardiyasında ya da akşam vardiyasında çalışmasını sağlar.

16. kısıt bir makinist herhangi bir hafta sabah vardiyasına atanmıyorsa o haftanın tüm çalışma günlerinde sabah vardiyasında çalışmasını engeller. 17. kısıt bir makinist herhangi bir hafta akşam vardiyasına atanmıyorsa o haftanın tüm çalışma günlerinde akşam vardiyasında çalışmasını engeller. 18. ve 19. kısıtlar işletmenin operasyonel kısıtlarıdır. 18. kısıt herhangi bir hafta sabah vardiyasında çalışan

bir makinistin gelecek hafta akşam vardiyasına atanmasını sağlar. 19. kısıt herhangi bir hafta akşam vardiyasında çalışan bir makinistin gelecek hafta sabah vardiyasına atanmasını sağlar. 20-26 aralığındaki kısıtlar her makinistin arka arkaya en fazla 6 gün çalışmasını sağlar. 27. ve 28. kısıtlar her makinistin arka arkaya 3 gün izin yapmasını engeller. 29. kısıt her makinistin bir ay boyunca izinli olduğu günlerin en az 2 gününün hafta sonuna denk gelmesini sağlar. 30. kısıt hedef kısıttır ve her makinistin bir ay boyunca çalıştığı gün sayısını 22 gün olacak şekilde birbirine eşitler. 31. ve 32. numaralı kısıtlar matematiksel modelde yer alan karar değişkenlerine ait işaret kısıtlarıdır.

| <i>İndisler</i> | <i>Tanım Kümesi</i> |                         |
|-----------------|---------------------|-------------------------|
| $i$             | Gün indisi          | $i = \{1,2, \dots, I\}$ |
| $k$             | Makinist indisi     | $k = \{1,2, \dots, K\}$ |
| $h$             | Hafta indisi        | $h = \{1,2, \dots, H\}$ |
| $I$             | Gün sayısı          | $I = 7$                 |
| $K$             | Makinist sayısı     | $K = 72$                |
| $H$             | Hafta sayısı        | $H = 4$                 |

| <i>Parametre</i> | <i>Parametre Tanımı</i>    |
|------------------|----------------------------|
| $M$              | Çok büyük pozitif bir sayı |

#### *Karar Değişkenleri*

|             |  |
|-------------|--|
| $Y_{h,k}$   | $k$ . makinist $h$ . haftada sabah vardiyasına atanırsa 1; aksi takdirde 0.                |
| $T_{h,k}$   | $k$ . makinist $h$ . haftada akşam vardiyasına atanırsa 1; aksi takdirde 0.                |
| $X_{h,i,k}$ | $k$ . makinist $h$ . haftanın $i$ . gününde sabah vardiyasına atanırsa 1; aksi takdirde 0. |
| $Z_{h,i,k}$ | $k$ . makinist $h$ . haftanın $i$ . gününde akşam vardiyasına atanırsa 1; aksi takdirde 0. |
| $C_{h,i,k}$ | $k$ . makinist $h$ . haftanın $i$ . gününde izinli ise 1; aksi takdirde 0.                 |
| $S_1^-$     | Hedef için belirlenen değerden negatif sapma miktarı                                       |
| $S_1^+$     | Hedef için belirlenen değerden pozitif sapma miktarı                                       |

#### *Amaç Fonksiyonu ve Kısıtlar*

Geliştirilen modelde, tüm makinistlerin aylık toplam vardiya atamalarının mümkün olduğunca eşit ve her bir makinistin 22 gün çalışması 6 gün izin yapması hedeflenmiştir. Aşağıda, önerilen modele ait amaç fonksiyonu ve kısıtlar yer almaktadır.

$$\text{Min } Z = S_1^- + S_1^+ \quad (6)$$

$$\sum_{k=1}^{72} X_{h,i,k} \geq 26 \quad \forall i,h \quad (7)$$

$$\sum_{k=1}^{72} X_{h,i,k} \leq 29 \quad \forall i,h \quad (8)$$

$$\sum_{k=1}^{72} Z_{h,i,k} \geq 27 \quad \forall i,h \quad (9)$$



$$\sum_{k=1}^{72} Z_{h,i,k} \leq 30 \quad \forall i,h \quad (10)$$

$$X_{h,i,k} + Z_{h,i,k} + C_{h,i,k} = 1 \quad \forall i,h,k \quad (11)$$

$$\sum_{i=1}^7 Z_{h,i,k} + \sum_{i=1}^7 X_{h,i,k} \geq 5 \quad \forall h,k \quad (12)$$

$$\sum_{i=1}^7 Z_{h,i,k} + \sum_{i=1}^7 X_{h,i,k} \leq 6 \quad \forall h,k \quad (13)$$

$$\sum_{i=1}^7 Z_{h,i,k} \leq M \times (1 - Y_{h,k}) \quad \forall h,k \quad (14)$$

$$\sum_{i=1}^7 X_{h,i,k} \leq M \times (1 - T_{h,k}) \quad \forall h,k \quad (15)$$

$$X_{h,i,k} \leq Y_{h,k} \quad \forall i,h,k \quad (16)$$

$$Z_{h,i,k} \leq T_{h,k} \quad \forall i,h,k \quad (17)$$

$$X_{h,i,k} + X_{h+1,i,k} \leq 1 \quad \forall i,k,h=1,2,3 \quad (18)$$

$$Z_{h,i,k} + Z_{h+1,i,k} \leq 1 \quad \forall i,k,h=1,2,3 \quad (19)$$

$$C_{h,i_1,k} + C_{h,i_2,k} + C_{h,i_3,k} + C_{h,i_4,k} + C_{h,i_5,k} + C_{h,i_6,k} + C_{h,i_7,k} \geq 1 \quad \forall k,h=1,2,3 \quad (20)$$

$$C_{h,i_2,k} + C_{h,i_3,k} + C_{h,i_4,k} + C_{h,i_5,k} + C_{h,i_6,k} + C_{h,i_7,k} + C_{h+1,i_1,k} \geq 1 \quad \forall k,h=1,2,3 \quad (21)$$

$$C_{h,i_3,k} + C_{h,i_4,k} + C_{h,i_5,k} + C_{h,i_6,k} + C_{h,i_7,k} + C_{h+1,i_1,k} + C_{h+1,i_2,k} \geq 1 \quad \forall k,h=1,2,3 \quad (22)$$

$$C_{h,i_4,k} + C_{h,i_5,k} + C_{h,i_6,k} + C_{h,i_7,k} + C_{h+1,i_1,k} + C_{h+1,i_2,k} + C_{h+1,i_3,k} \geq 1 \quad \forall k,h=1,2,3 \quad (23)$$

$$C_{h,i_5,k} + C_{h,i_6,k} + C_{h,i_7,k} + C_{h+1,i_1,k} + C_{h+1,i_2,k} + C_{h+1,i_3,k} + C_{h+1,i_4,k} \geq 1 \quad \forall k,h=1,2,3 \quad (24)$$

$$C_{h,i_6,k} + C_{h,i_7,k} + C_{h+1,i_1,k} + C_{h+1,i_2,k} + C_{h+1,i_3,k} + C_{h+1,i_4,k} + C_{h+1,i_5,k} \geq 1 \quad \forall k,h=1,2,3 \quad (25)$$

$$C_{h,i_7,k} + C_{h+1,i_1,k} + C_{h+1,i_2,k} + C_{h+1,i_3,k} + C_{h+1,i_4,k} + C_{h+1,i_5,k} + C_{h+1,i_6,k} \geq 1 \quad \forall k,h=1,2,3 \quad (26)$$

$$C_{h,i_6,k} + C_{h,i_7,k} + C_{h+1,i_1,k} \leq 2 \quad \forall k,h=1,2,3 \quad (27)$$

$$C_{h,i_7,k} + C_{h+1,i_1,k} + C_{h+1,i_2,k} \leq 2 \quad \forall k,h=1,2,3 \quad (28)$$

$$C_{h_1,i_6,k} + C_{h_1,i_7,k} + C_{h_2,i_6,k} + C_{h_2,i_7,k} + C_{h_3,i_6,k} + C_{h_3,i_7,k} + C_{h_4,i_6,k} + C_{h_4,i_7,k} \geq 2 \quad \forall k \quad (29)$$

$$\sum_{h=1}^4 \sum_{i=1}^7 X_{h,i,k} + \sum_{h=1}^4 \sum_{i=1}^7 Z_{h,i,k} + S_1^- - S_1^+ = 22 \quad \forall k \quad (30)$$

$$Y_{h,k}, T_{h,k}, X_{h,i,k}, Z_{h,i,k}, C_{h,i,k} \in \{0,1\} \quad \forall i,h,k \quad (31)$$

$$S_1^-, S_1^+ \geq 0 \quad (32)$$

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Modelin çözümü için Intel CORE (TM) i5-CPU 2.70 GHz işlemcisi, 8 GB belleği ve Windows 10 işletim sistemine sahip bilgisayar kullanılmıştır. Geliştirilen hedef programlama modeli GAMS/CPLEX paket programı kullanılarak çözülmüş ve amaç fonksiyonun değeri sıfır çıkmıştır. Başka bir deyişle, belirlenen hedef değerinden pozitif ve negatif sapmaların değeri 0 çıkmış ve her makiniste aylık 22 vardiya olacak şekilde eşit sayıda atama yapılarak vardiya sayısı dengelenmiştir. Geliştirilen hedef programlama modelin çözümü ile;

- Her makiniste aylık eşit sayıda vardiya (22 gün) ve izin günü (6 gün) sağlanarak adil bir iş çizelgesi oluşturulmuştur.
- Her makinistin 1 günde en fazla 1 vardiyaya atanması ya da o gün izinli olması sağlanmıştır.
- Oluşturulan çizelge ile işletme tarafından belirlenen sabah ve akşam vardiyalarında ihtiyaç duyulan makinist sayısı sağlanmıştır. Çizelge 2’ de sabah ve akşam vardiyalarına atanan makinist sayısı verilmiştir.
- Her makinistin haftada en az 5, en fazla 6 gün çalışması sağlanmıştır.
- Hafta içerisinde 5 günlük (9 saat/gün) veya 6 günlük (7,5 saat/gün) çalışma planı ile her makinistin haftada 45 saatten fazla çalışması engellenmiştir.
- Makinistlerin herhangi bir haftanın tüm görev günlerinde sadece ya sabah ya da akşam vardiyasında çalışması sağlanmıştır. Örneğin, 1.makinist 1. haftanın 6 iş gününde sadece akşam vardiyasında, 2. makinist ise aynı haftanın 5 iş gününde sadece sabah vardiyasında çalışmaktadır.
- Bir makinistin 2 hafta üst üste aynı vardiyada çalışması engellenmiştir. Örneğin, 1. makinist 1. hafta sabah vardiyasında çalışırken 2. hafta akşam vardiyasında çalışmaktadır. 3. makinist ise 1. hafta akşam vardiyasında çalışırken 2. hafta sabah vardiyasında çalışmaktadır.
- Bir makinistin art arda en fazla 6 gün çalışabilme kısıtı yerine getirilmiştir.
- Makinistlerin aylık izinlerinin en az 2 gününün hafta sonuna denk gelme kısıtı yerine getirilmiştir. Örneğin, 1. makinist 2.ve 4. haftanın 7. gününde izinli iken, 2.makinist 1. haftanın 7. günü ve 2. haftanın 6. gününde izinli olmuştur (Haftanın 6. ve 7. günlerinin sırasıyla cumartesi ve pazar günleri olduğu varsayılarak model geliştirilmiştir).
- Her makinistin arka arkaya 3 gün izin yapması engellenmiştir.

**Çizelge 2.** Sabah ve akşam vardiyalarına atanan makinist sayısı

| Vardiya      | Hafta | Gün |    |    |    |    |    |    |
|--------------|-------|-----|----|----|----|----|----|----|
|              |       | 1   | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  |
| <i>Sabah</i> | 1     | 29  | 29 | 29 | 27 | 28 | 26 | 28 |
|              | 2     | 28  | 28 | 28 | 29 | 29 | 26 | 26 |
|              | 3     | 29  | 28 | 29 | 29 | 29 | 27 | 26 |
|              | 4     | 29  | 26 | 29 | 28 | 29 | 28 | 26 |
| <i>Akşam</i> | 1     | 30  | 29 | 29 | 30 | 30 | 27 | 27 |
|              | 2     | 30  | 30 | 27 | 28 | 27 | 27 | 27 |
|              | 3     | 29  | 28 | 30 | 30 | 28 | 27 | 29 |
|              | 4     | 30  | 28 | 30 | 29 | 30 | 27 | 27 |

Çizelge 3’te makinistlerin yasal şartlar ve operasyonel kurallar dikkate alınarak gerçekleştirilen makinist çizelgeleme tablosu yer almaktadır.

Çizelge 3. Aylık vardiya çizelgesi

| Gün/<br>Makinist | 1.Hafta |   |   |   |   |   |   | 2.Hafta |   |   |   |   |   |   | 3.Hafta |   |   |   |   |   |   | 4.Hafta |   |   |   |   |   |   |
|------------------|---------|---|---|---|---|---|---|---------|---|---|---|---|---|---|---------|---|---|---|---|---|---|---------|---|---|---|---|---|---|
|                  | 1       | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1       | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1       | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1       | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 1                | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 2                | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 3                | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 4                | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 5                | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 6                | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 7                | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 8                | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 9                | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 10               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 11               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 12               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 13               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 14               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 15               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 16               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 17               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 18               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 19               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 20               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 21               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 22               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 23               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 24               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 25               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 26               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 27               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 28               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 29               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 30               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 31               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 32               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 33               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 34               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 35               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 36               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 37               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 38               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 39               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 40               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 41               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 42               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |

Çizelge 3. Aylık vardiya çizelgesi (devamı)

| Gün/<br>Makinist | 1.Hafta |   |   |   |   |   |   | 2.Hafta |   |   |   |   |   |   | 3.Hafta |   |   |   |   |   |   | 4.Hafta |   |   |   |   |   |   |
|------------------|---------|---|---|---|---|---|---|---------|---|---|---|---|---|---|---------|---|---|---|---|---|---|---------|---|---|---|---|---|---|
|                  | 1       | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1       | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1       | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1       | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 43               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |   |
| 44               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 45               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 46               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 47               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 48               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 49               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 50               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 51               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 52               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 53               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 54               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 55               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 56               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 57               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 58               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 59               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 60               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 61               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 62               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 63               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 64               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 65               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 66               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 67               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 68               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 69               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 70               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 71               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 72               | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1       | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |



Akşam Vardiyası



Sabah Vardiyası



İzinli gün

## SONUÇ

Bu çalışmada, ülkemizde hafif raylı sistemlerin kullanımının yaygınlaşmasıyla ortaya çıkan makinist çizelgeleme problemi üzerinde durulmuş ve bir hafif raylı sistem işletmesinin planlama sürecinde bulunan makinist çizelgeleme problemi ele alınmıştır. Mevcut durumda firmada makinist görev ataması manuel olarak yapılmaktadır. Bu şekilde hazırlanan görev çizelgesi ile adil bir çizelge oluşturulması ve uygun çalışma şartlarının sağlanması zor ve yorucu bir süreç olup bu durum zaman kaybına sebep olmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada tüm operasyonel ve yasal kısıtlar göz önünde alınarak makinistlere dengeli görev yükü sağlayabilmek için hedef programlama modeli geliştirilmiştir. Geliştirilen model GAMS/CPLEX paket programı ile çözülmüş ve aylık görev çizelgesi elde edilmiştir.

Modelin çözümünde makinistlere eşit sayıda görev dağıtılıp ve izin günlerinin sayısı dengelenmiştir. Bu çalışma ile makinistlerin etkin ve adil şekilde vardiyalara atanması sağlanarak performanslarının ve memnuniyetinin artırılması hedeflenmiştir.

Bu çalışmada, 72 makiniste ait 1 aylık görev çizelgeleme problemi ele alınmıştır. Geliştirilen modelde, makinistlerin hastalık, izin vs. gibi durumları dikkate alınmamıştır. Gelecek çalışmalarda, daha fazla çalışan ve daha fazla çalışma günü için matematiksel model güncellenebilir. Ayrıca, görevlilerin özel istekleri dikkate alınarak özel kısıtlı hedef programlama ile yeni çözümler üretilebilir.

### Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedirler.

### Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

### KAYNAKLAR

- Bakhtavar E, Prabatha T, Karunathilake H, Sadiq R, Hewage K, 2020. Assessment of renewable energy-based strategies for net-zero energy communities: A planning model using multi-objective goal programming. *Journal of Cleaner Production*, 272, 122886.
- Ceylan Z, Karan RE, Bakırcı Ç, Sabuncu S, 2019a. Sıra Bağımlı Hazırlık Süreli Tek Makine Çizelgeleme Problemi: Beyaz Eşya Sektöründe Bir Uygulama. *International Journal of Multidisciplinary Studies and Innovative Technologies*, 3(1): 14-21.
- Ceylan Z, Yüksel A, Yıldız A, Şimşak B, 2019b. Sınav Çizelgeleme Problemi için Hedef Programlama Yaklaşımı ve Bir Uygulama. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12(2): 942-956.
- Charnes A, Cooper WW, 1977. Goal programming and multiple objective optimizations: Part 1. *European Journal of Operational Research*, 1(1): 39-54.
- Danış Öncül S, 2012. Hafif raylı sistemlerde tarife oluşturma ve ekip atama problemlerinin bütünleştirilmesi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi.
- Ernst AT, Jiang H, Krishnamoorthy M, Sier D, 2004. Staff scheduling and rostering: A review of applications, methods and models. *European journal of operational research*, 153(1): 3-27.
- Fuentes M, Cadarso L, Marín Á, 2019. A hybrid model for crew scheduling in rail rapid transit networks. *Transportation Research Part B: Methodological*, 125: 248-26.
- Hanafi R, Kozan E, 2014. A hybrid constructive heuristic and simulated annealing for railway crew scheduling. *Computers & Industrial Engineering*, 70: 11-19.
- Heil J, Hoffmann K, Buscher U, 2020. Railway crew scheduling: Models, methods and applications. *European Journal of Operational Research*, 283(2), 405-425.
- Hoffmann K, Buscher U, 2019. Valid inequalities for the arc flow formulation of the railway crew scheduling problem with attendance rates. *Computers & Industrial Engineering*, 127, 1143-1152.
- Huang SH, Yang TH, Wang RT, 2011. Ant colony optimization for railway driver crew scheduling: from modeling to implementation. *Journal of the Chinese Institute of Industrial Engineers*, 28(6): 437-449.
- Jütte S, Müller D, Thonemann UW, 2017. Optimizing railway crew schedules with fairness preferences. *Journal of Scheduling*, 20(1), 43-55.
- Kaçmaz Ö, Alakaş HM, Eren T, 2019. Shift scheduling with the goal programming method: a case study in the glass industry. *Mathematics*, 7(6): 561.
- Kayacı M, Yiğit, V, 2012. Üretim çizelgeleme problemlerine bulanık yaklaşım. *Atatürk Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Dergisi*, 26(3-4): 287-296.
- Kroon L, Fischetti M, 2001. Crew scheduling for Netherlands railways “destination: customer”. *Computer-Aided Scheduling of Public Transport*, Springer, pp: 181-201.
- Lin DY, Tsai MR, 2019. Integrated crew scheduling and roster problem for trainmasters of passenger railway transportation. *IEEE Access*, 7, 27362-27375.

- Moudani El W, Cosenza, CAN, MoraCamino F, 2001. An Intelligent Approach for Solving the Airline Crew Rostering Problem. ACS/IEEE International Conference on Computer Systems and Applications, Beirut, Lebanon, June 25-29, 2001, pp: 73-79.
- Özder EH, Özcan E, Eren, T, 2019. Staff Task-Based Shift Scheduling Solution with an ANP and Goal Programming Method in a Natural Gas Combined Cycle Power Plant. Mathematics, 7(2): 192.
- Pinedo M, 2012. Scheduling, 29, Springer, New York.
- Rählmann C, Thonemann UW, 2020. Railway crew scheduling with semi-flexible timetables. OR Spectrum, 42(4), 835-862.
- Sarucan A, 1999. Bir raylı ulaşım sisteminde personel çizelgeleme problemine bütünlük yaklaşım, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi.
- Su Z, Jamshidi A, Núñez A, Baldi S, De Schutter B, 2019. Integrated condition-based track maintenance planning and crew scheduling of railway networks. Transportation Research Part C: Emerging Technologies, 105, 359-384.
- Suyabatmaz AÇ, Şahin G, 2015. Railway crew capacity planning problem with connectivity of schedules. Transportation Research Part E: Logistics and Transportation Review, 84: 88-100.
- Tapkan P, Özbakır L, Kulluk S, Telcioğlu B, 2018. Raylı sistemlerde görev çizelgeleme probleminin modellenmesi ve çözümü. Journal of the Faculty of Engineering & Architecture of Gazi University, 33(3): 953-965.
- Ünal Z, Güven S, Çetin Eİ, 2019. Otel İşletmelerinin Tedarikçi Seçiminde Bulanık AHP ile Ağırlıklandırılmış Hedef Programlama Uygulaması. Hitit Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi, 12(1), 188-204.
- Üstündağ Y, 2014. Ekip Çizelgeleme Problemi. Demiryolu Mühendisliği, (1): 72-83.
- Valde VA, 2010. Integrating Crew Scheduling and Rostering Problems. Universit di Bologna, PhD thesis.

**Atf İçin:** Kayakökü H, 2021. Bitlis Aygır Gölü (Türkiye) Yüzey Su Örneklerinde Radon Konsantrasyonunun Belirlenmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1040-1049.

**To Cite:** Kayakökü H, 2021. Determination of Radon Concentrations in Surface Water Samples of Aygır Lake in Bitlis (Turkey). Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1040-1049.

## Determination of Radon Concentrations in Surface Water Samples of Aygır Lake in Bitlis (Turkey)

Halime KAYAKÖKÜ<sup>1,\*</sup>

**ABSTRACT:** Aygır Lake is located in the province of Bitlis, Adilcevaz, in the east of Turkey. It is located on the south side of Süphan Mountain and is a tectonically formed lake. Since the waters of Aygır Lake are fresh, it is an important water source in terms of meeting the water needs of the agricultural areas in the south. For this reason, it was tried to determine whether the water of the lake would pose a health risk in terms of radon if it was consumed as drinking water and used in agricultural activities and fish farming. In the study, radon (<sup>222</sup>Rn) concentrations, the annual effective dose rate (AED) and the amount of dose the stomach takes (SED) in the surface water samples taken from Aygır Lake were tried to be determined. For this purpose, water samples were taken from 13 different points in the lake. Saphymo GmbH AlphaGUARD Professional radon monitor was used to measure the radon activities of the water samples. As a result of the measurements, it is seen that the radon concentrations vary between  $0.15 \pm 0.01$  Bq L<sup>-1</sup> and  $0.71 \pm 0.08$  Bq L<sup>-1</sup>. In addition, in the study, AED values ranged from  $0.38 \pm 0.03$  nSv y<sup>-1</sup> to  $1.81 \pm 0.20$  nSv y<sup>-1</sup>, while SED values ranged from  $0.05 \pm 0.00$  nSv y<sup>-1</sup> to  $0.22 \pm 0.02$  nSv y<sup>-1</sup>. When the results obtained are compared with the average international values, it is noticed that the results are below these values.

**Keywords:** Aygır Lake, radon, alphaGUARD, surface water

### Bitlis Aygır Gölü (Türkiye) Yüzey Su Örneklerinde Radon Konsantrasyonunun Belirlenmesi

**ÖZET:** Aygır Gölü, Türkiye'nin doğusunda, Bitlis'in Adilcevaz ilçesinde yer almaktadır. Süphan Dağı'nın güney tarafında yer almakta olup, tektonik oluşumlu bir göldür. Suları tatlı olduğu için güneyindeki tarım alanlarının su ihtiyacını karşılaması bakımından Aygır Gölü önemli bir su kaynağıdır. Bu sebeple, göl suyunun içme suyu olarak tüketilmesi, tarımsal faaliyetlerde ve balık yetiştiriciliğinde kullanılması durumunda, radon açısından, sağlık için risk oluşturup oluşturmayacağı belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmada, Aygır Gölü'nden alınan yüzey su örneklerinin radon (<sup>222</sup>Rn) konsantrasyonları, yıllık etkin doz oranı (AED) ve midenin aldığı doz miktarı (SED) belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, gölde 13 farklı noktadan su örnekleri alınmıştır. Su örneklerinin <sup>222</sup>Rn aktivite konsantrasyonlarının ölçülmesinde Saphymo GmbH AlphaGUARD Professional radon monitörü kullanılmıştır. Ölçümler sonucunda radon konsantrasyonlarının,  $0,15 \pm 0,01$  Bq L<sup>-1</sup> ile  $0,71 \pm 0,08$  Bq L<sup>-1</sup> aralığında değiştiği görülmektedir. Ayrıca çalışmada AED değerleri  $0,38 \pm 0,03$  nSv y<sup>-1</sup> ile  $1,81 \pm 0,20$  nSv y<sup>-1</sup>, SED değerleri  $0,05 \pm 0,00$  nSv y<sup>-1</sup> ile  $0,22 \pm 0,02$  nSv y<sup>-1</sup> arasında değişmektedir. Elde edilen sonuçlar uluslararası önerilen değerler ile kıyaslandığı zaman, sonuçların, bu değerlerin altında olduğu görülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Aygır Gölü, radon, alphaGUARD, yüzey su

<sup>1</sup> Halime KAYAKÖKÜ (Orcid ID: 0000-0003-4036-4012), Bitlis Eren University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Physics, Bitlis, Turkey.

\*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Halime KAYAKÖKÜ, e-mail: hkayakoku@beu.edu.tr

## INTRODUCTION

Water plays an important role in the life of living beings. The natural radioactivity of the water comes from the radioactive masses or minerals through which water flows. In natural waters, the uranium family is more common than the actinium and thorium family (Şahin, 2004).

$^{238}\text{U}$  is the main component of natural uranium in the earth's crust (99.275%). Radon ( $^{222}\text{Rn}$ ) is the first gas isotope in the  $^{238}\text{U}$  decay chain. In parallel with this, thoron ( $^{220}\text{Rn}$ ) and actinon ( $^{219}\text{Rn}$ ) appear as the first gas isotopes in the  $^{232}\text{Th}$  and  $^{235}\text{U}$  decay series. The decay of radon by alpha propagation creates three short-lived isotopes. These are  $^{218}\text{Po}$ ,  $^{214}\text{Pb}$  and  $^{214}\text{Bi}$  (Valkovic, 2000). Radon is a colorless, odorless radioactive gas that cannot be detected by sensory organs. It is found more or less almost everywhere in nature. Radon has a half-life of 3.82 days (George, 2007). Radon gas spreads through diffusion to the soil and from there to the atmosphere or environment. With the accumulation of the gas, the radon density can reach critical values in closed or poorly ventilated places. Radon poses many dangers, especially lung cancer, when exposed to high doses (UNSCEAR, 1993; WHO, 2004; USEPA, 2011).

There are many methods of measuring radon. Usually, alpha count is used to measure radon gas and radon products. Radon measurement methods are divided into two as active and passive methods (Urban and Piesch, 1981). In the active measurement method, alpha particles are counted. Active measurement method requires devices such as electronic systems, pumps, power supplies. Ion chambers, scintillation cells or spectroscopic counting devices are used in the active system. AlphaGUARD measuring device works on the principle of active measurement method. In the passive measurement method, indirect measurements are made. In the passive measurement method, thermoluminescence detectors or solid state nuclear trace detectors cellulose nitrate (LR-115) or allyl diglycol carbonate (CR-39) are used.

In Turkey, many studies have been made for determining the radon concentration in water. At the same time, in different parts of the world, there are various studies in which the radioactivity of utility water, well water and thermal water are measured resulting dose calculations (Gosink et al., 1990; Al-Masri and Blackburn, 1999; Karahan et al., 2000; Çevik et al., 2006; Ereeş et al., 2006; Baykara and Dogru, 2006; Tarim et al., 2011; Yalcin et al., 2011; Bal et al., 2017).

According to WPCR (Water Pollution Control Regulation), Aygır Lake water was found in the first class quality water. It has been observed that the lake water complies with the limit values given by EPA ( $500\text{ mg L}^{-1}$ ) and WHO ( $1000\text{ mg L}^{-1}$ ) (Tebbutt, 1998; WPCR, 2004).

The purpose of the present study is to determine the radon concentrations, the annual effective dose rates and the amount of dose the stomach takes of surface water samples taken from Aygır Lake located in Adilcevaz district of Bitlis province. Thus, it will be attempted to determine whether the lake water will pose a health risk in terms of radon if it is consumed as drinking water and used in agricultural activities and fish farming. Radon concentration levels were measured with the Saphymo GmbH AlphaGUARD Professional radon monitor using the active measurement method.

## MATERIALS AND METHODS

### Sampling and Measurement

Aygır Lake is located in the province of Bitlis, Adilcevaz, in the east of Turkey. The lake is at the coordinates  $38^{\circ} 50' 14''$  North,  $42^{\circ} 49' 20''$  East, the height of the lake is 1942 m and its area is approximately  $1.6\text{ km}^2$  (Dogu and Deniz, 2015; Çavuş, 2018). It is located on the south side of Süphan Mountain and is a tectonically formed lake. The lake is fed by rain and snow waters as well as groundwater. There are no streams or strong springs that constantly carry water to the lake. Since its



waters are fresh, Aygır Lake is an important water resource in terms of meeting the water needs of the agricultural areas in the south. Additionally, this lake, which contains different fish species, plays an important role in terms of fishing.

In this study, samples were taken from 13 different points from the lake in June 2020 from a depth of 20 cm from the surface and placed in 1 liter polyethylene bottles. After the samples brought to the laboratory, they were filtered by filter paper, and then the samples were measured and analyzed immediately. Sampling points are shown in Figure 1.

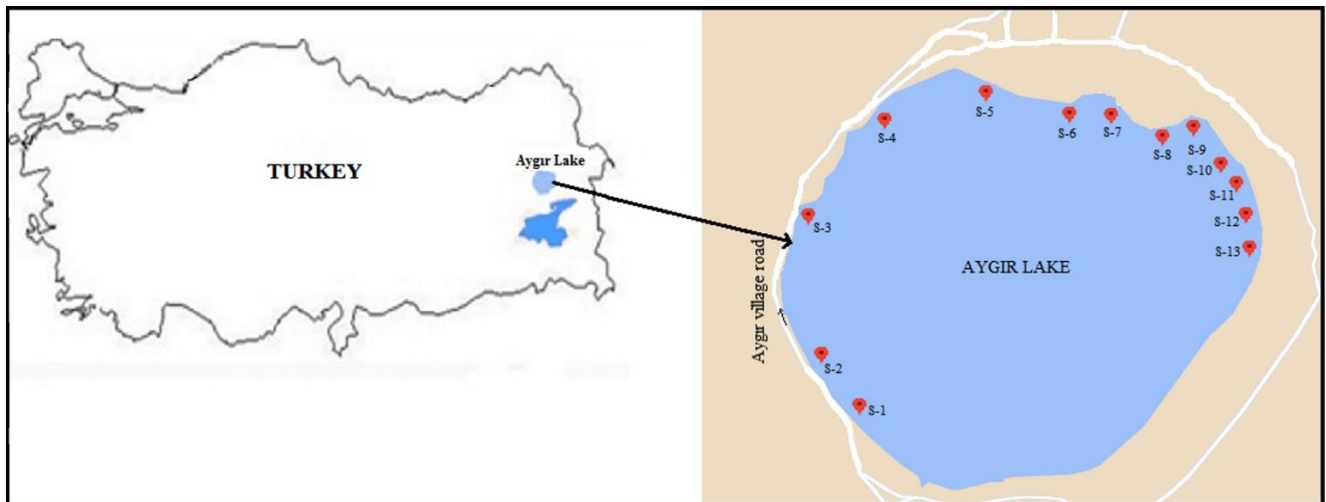


Figure 1. Water sampling points from Aygır Lake

Figure 2 shows an view of the AlphaGUARD radon measurement system in water.

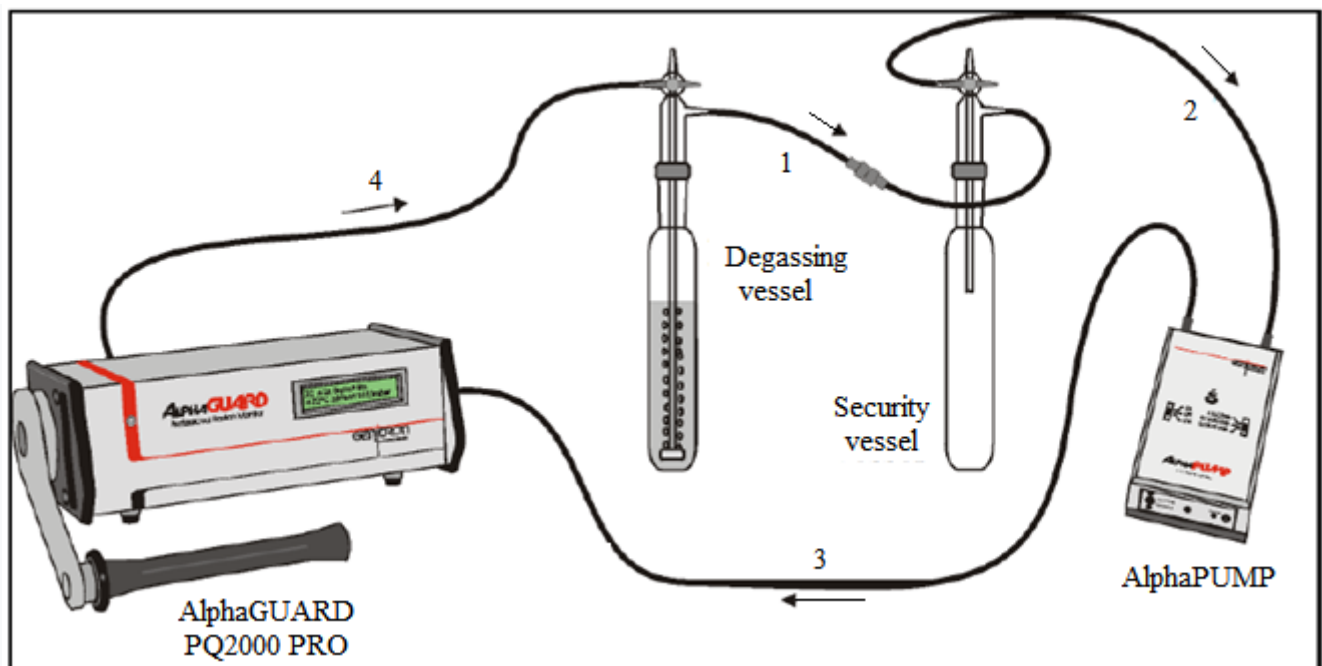


Figure 2. The AlphaGUARD radon measurement setup in water (GENITRON INSTRUMENTS, 2001; Tanrıverdi, 2016)

Radon measurement system in waters consists of AquaKIT, AlphaPUMP, AlphaGUARD PQ2000 PRO. Radon concentration measurement can be made with AlphaGUARD radon detector in the range of 2–2,106 Bq m<sup>-3</sup>. Despite this wide range, there is a 3% margin of error resulted from the system itself.

The AlphaGUARD detector, which gives the measurement results in  $\text{Bq m}^{-3}$ , can simultaneously measure three different climatic parameters such as temperature, atmospheric pressure and humidity. The units of these parameters are  $^{\circ}\text{C}$ , mbar and rH%, respectively (Genrich, 2006). The measurement was made for 10 minutes before filling the purification bottle section with the water sample. The result of this measurement is  $C_0$  (natural background value). The clarification vessel was filled with 100 ml of water sample. The measurements made for 10 minutes while the pump was on and 20 minutes while the pump was off which makes 30 minutes in total (Nikolopoulos et al., 2010; Meisenberg et al., 2017). The concentration value obtained as a result of this measurement was also recorded as  $C_{\text{air}}$ . Sample and background counts were performed three times for each samples. Before filling each sample, the system, gases etc. are cleaned in order to carry out the measurement process. Cleaning the measuring device continued until the radon value reached ambient concentration. After this step, the measurement procedure was made again for another sample. All data obtained as a result of the measurements were evaluated in the DataEXPERT program.

Radon concentrations of the water samples were calculated using the equation 1.

$$C_{RnW} = \frac{C_{\text{air}} \left( \frac{V_{\text{system}} - V_{\text{sample}} + k}{V_{\text{sample}}} \right) - C_0}{1000} \quad (1)$$

herein,  $C_{RnW}$  is the radon concentration of the water sample ( $\text{Bq L}^{-1}$ );  $C_{\text{air}}$  is the concentration value specified in the measurement result ( $\text{Bq m}^{-3}$ );  $C_0$  is the natural background concentration ( $\text{Bq m}^{-3}$ );  $V_{\text{system}}$  is the interior volume of the measurement setup (560 mL);  $V_{\text{sample}}$  is the volume of the sample (100 mL); and  $k$  is the radon distribution coefficient (GENITRON INSTRUMENTS, 2007; Davutoğlu, 2008).

According to WPCR, the water of Aygır Lake was found in first class quality water (WPCR, 2004). According to RWIHC (Regulation on Water Intended for Human Consumption), the pH value of the water is between 6.5 and 9.5, so it is suitable for drinking water (Türkman et al., 1999; RWIHC, 2005; Emre and Kürüm, 2007). If the lake water is consumed as drinking water, the annual effective dose (AED) contribution from radon gas to the body for adults can be calculated by using equation 2.

$$AED = C_{RnW} \times C_W \times D_{CW} \quad (2)$$

herein, AED is dose exposed over a period of one year due to drinking water;  $C_{RnW}$  is  $^{222}\text{Rn}$  concentration in water;  $C_W$  is estimated amount of water used over a year for adults ( $730 \text{ L y}^{-1}$ );  $D_{CW}$  is dose conversion factor ( $3.5 \times 10^{-9} \text{ Sv Bq}^{-1}$ ).

After drinking the water goes directly to the stomach. As a result of studies conducted in water, it has been stated that if the concentration of radon in drinking water is high, it may pose a risk of cancer in the stomach. Accordingly, it is of great importance to calculate the amount of dose the stomach takes. With the help of equation 3, the dose to which the stomach will be exposed can be calculated.

$$SED = AED \times W_T \quad (3)$$

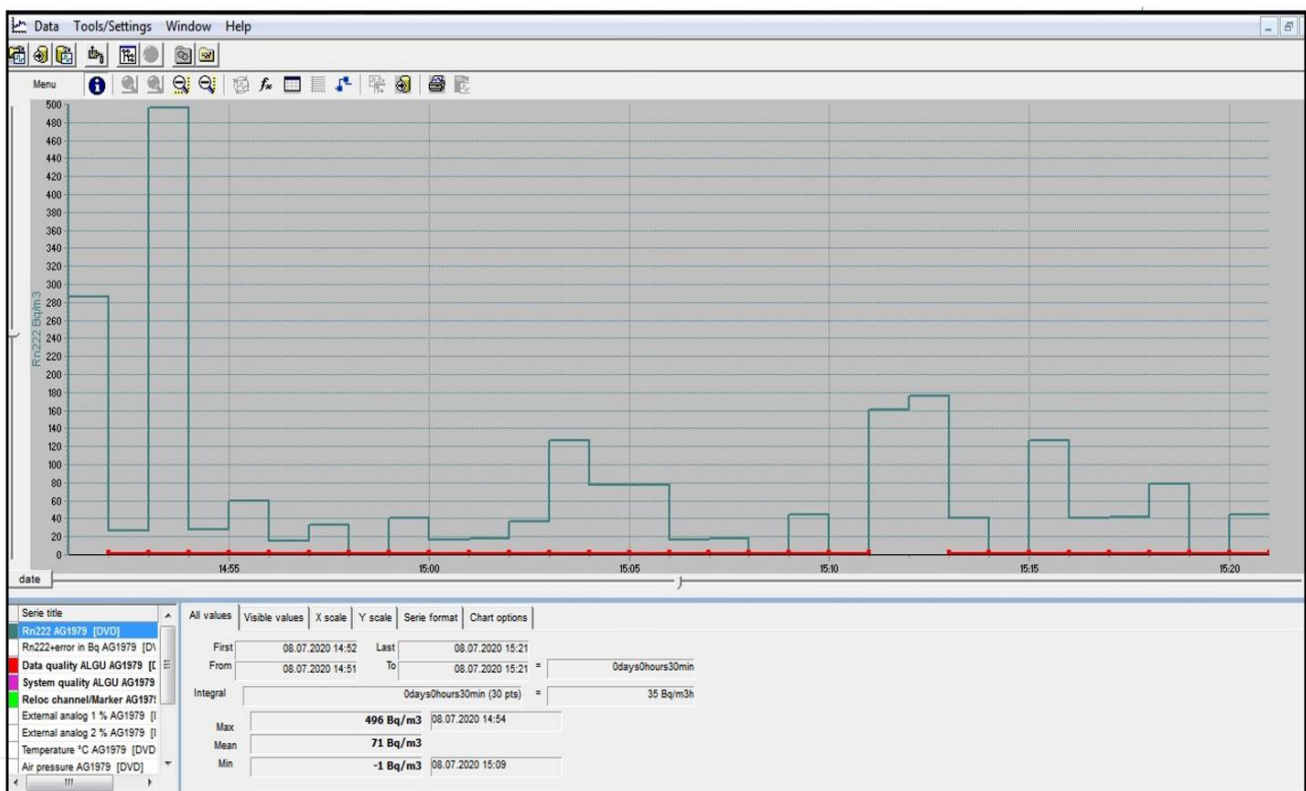
herein, SED is the annual dose that the stomach takes;  $W_T$  is the weight factor used for the stomach in dose calculations ( $W_T=0.12$ ) (Prasad, 2008). The tissue weight factor used in dose calculations was taken from the report published by the ICRP in 1993 (ICRP, 1993).

## RESULTS AND DISCUSSION

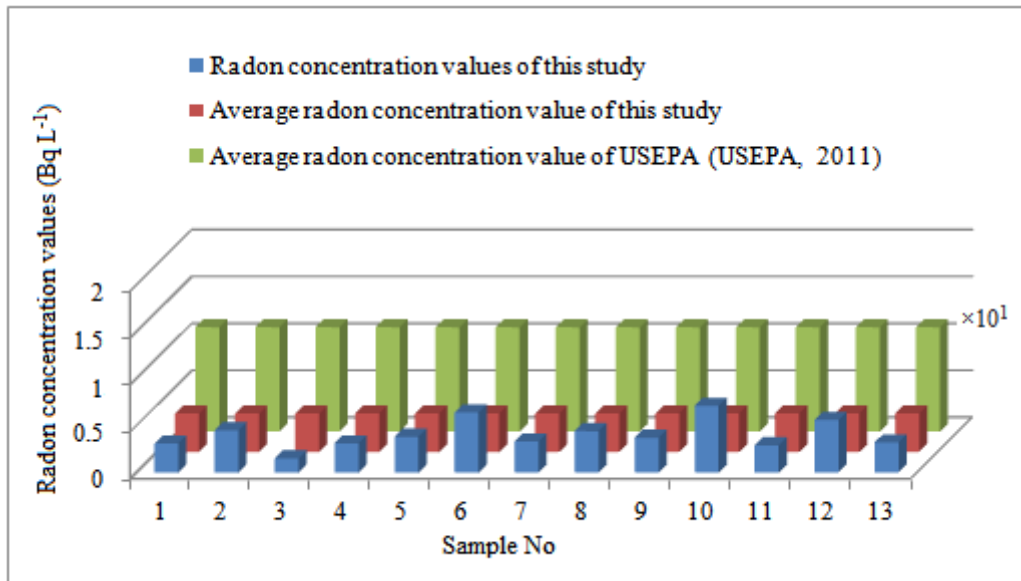
The  $^{222}\text{Rn}$  concentration results ( $C_{\text{RnW}}$ ), AED and SED values obtained after measurement and calculations in this study are given in Table 1 and Figure 5. In addition, the analysis results of the sample S-10 in the AlphaGUARD radon measurement system are given in Figure 3 to give an example.

**Table 1.**  $C_{\text{RnW}}$ , AED and SED values in water samples of Aygır Lake, Turkey

| Sample No      | Temperature (°C) | Humidity (%) | Pressure (mbar) | k           | $C_{\text{RnW}}$ (Bq L <sup>-1</sup> ) | AED (nSv y <sup>-1</sup> ) | SED (nSv y <sup>-1</sup> ) |
|----------------|------------------|--------------|-----------------|-------------|--|----------------------------|----------------------------|
| S-1            | 27.4             | 37.8         | 816             | 0.21        | 0.31 ± 0.03                            | 0.79 ± 0.08                | 0.10 ± 0.01                |
| S-2            | 27.3             | 38.8         | 816             | 0.21        | 0.45 ± 0.05                            | 1.15 ± 0.13                | 0.14 ± 0.02                |
| S-3            | 27.2             | 38.0         | 816             | 0.21        | 0.15 ± 0.01                            | 0.38 ± 0.03                | 0.05 ± 0.00                |
| S-4            | 27.4             | 41.7         | 816             | 0.21        | 0.31 ± 0.03                            | 0.79 ± 0.08                | 0.10 ± 0.01                |
| S-5            | 27.3             | 38.6         | 816             | 0.22        | 0.38 ± 0.06                            | 0.97 ± 0.15                | 0.12 ± 0.02                |
| S-6            | 26.9             | 40.9         | 816             | 0.22        | 0.64 ± 0.08                            | 1.64 ± 0.20                | 0.20 ± 0.02                |
| S-7            | 26.5             | 44.3         | 817             | 0.22        | 0.33 ± 0.06                            | 0.84 ± 0.15                | 0.10 ± 0.02                |
| S-8            | 26.8             | 44.0         | 817             | 0.22        | 0.44 ± 0.04                            | 1.12 ± 0.10                | 0.13 ± 0.01                |
| S-9            | 27.2             | 47.2         | 817             | 0.21        | 0.37 ± 0.01                            | 0.95 ± 0.03                | 0.11 ± 0.00                |
| S-10           | 27.5             | 46.2         | 817             | 0.21        | 0.71 ± 0.08                            | 1.81 ± 0.20                | 0.22 ± 0.02                |
| S-11           | 27.1             | 39.2         | 817             | 0.21        | 0.29 ± 0.04                            | 0.74 ± 0.10                | 0.09 ± 0.01                |
| S-12           | 27.3             | 39.2         | 817             | 0.21        | 0.56 ± 0.05                            | 1.43 ± 0.13                | 0.17 ± 0.02                |
| S-13           | 27.0             | 34.8         | 817             | 0.21        | 0.32 ± 0.02                            | 0.82 ± 0.05                | 0.10 ± 0.01                |
| <b>Average</b> | <b>27.2</b>      | <b>40.8</b>  | <b>817</b>      | <b>0.21</b> | <b>0.41 ± 0.05</b>                     | <b>1.03 ± 0.13</b>         | <b>0.12 ± 0.02</b>         |



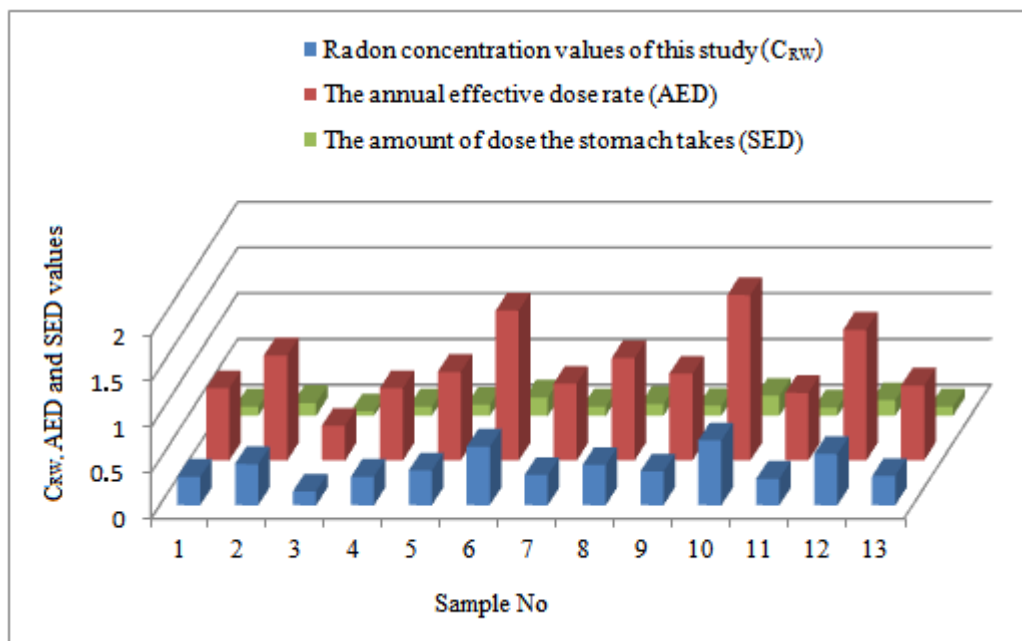
**Figure 3.** The analysis results of the sample S-10 in the AlphaGUARD radon measurement system



**Figure 4.** Radon concentration values in present study

In present research,  $^{222}\text{Rn}$  activity concentrations of samples ranged from  $0.15 \pm 0.01 \text{ Bq L}^{-1}$  to  $0.71 \pm 0.08 \text{ Bq L}^{-1}$ , with an average activity of  $0.41 \pm 0.05 \text{ Bq L}^{-1}$ . The AED values ranged from  $0.38 \pm 0.03 \text{ nSv y}^{-1}$  to  $1.81 \pm 0.20 \text{ nSv y}^{-1}$ , while SED values ranged from  $0.05 \pm 0.00 \text{ nSv y}^{-1}$  to  $0.22 \pm 0.02 \text{ nSv y}^{-1}$ .

The  $C_{\text{RnW}}$ , AED and SED values in water samples are shown in Figure 5.



**Figure 5.**  $C_{\text{RnW}}$ , AED and SED values in water samples

When Table 1, Figure 4 and Figure 5 are examined together, it is seen that the lowest  $C_{\text{RnW}}$ , AED and SED values belong to the sample number S-3 and the highest  $C_{\text{RnW}}$ , AED and SED values belong to the sample number S-10. The higher the concentration of radon in the water, the higher the AED and SED values.

Erdoğdu (2015) collected water samples from 36 different points in the province of Osmaniye (Turkey). As a result of the measurements and calculations performed using the AphaGUARD PQ 2000 PRO radon detector, the average  $C_{RnW}$ , AED and SED were found as  $0.426 \text{ Bq L}^{-1}$ ,  $1.088 \mu\text{Sv y}^{-1}$  and  $0.131 \mu\text{Sv y}^{-1}$ , respectively (Erdoğdu, 2015).

Gyuk et al. (2017) calculated the average  $C_{RnW}$  and AED values in 25 well water samples as  $9.46 \text{ Bq L}^{-1}$  and  $0.0721 \text{ mSv y}^{-1}$ , respectively (Gyuk et al., 2017).

In another similar study, Hussein (2020) made radon measurements in different types of drinking water samples in Egypt using nuclear track detectors (LR-115 Type II). As a result of the study, the average  $C_{RnW}$  in water samples was determined as  $0.634 \text{ Bq L}^{-1}$  and the average AED value for adults was  $9.953 \mu\text{Sv y}^{-1}$  (Hussein, 2020).

**Table 2.** Comparison of the average  $^{222}\text{Rn}$  activity concentration obtained in present study with the averages obtained in similar studies and the recommended limit values

| Lake, Country                   | $^{222}\text{Rn}$ activity concentration ( $\text{Bq L}^{-1}$ )                          | Reference                      |
|---------------------------------|--|--------------------------------|
| England (English Lake District) | $(53.70 \pm 8.15) \times 10^{-3}$ -<br>$(1130.74 \pm 35.92) \times 10^{-3}$              | (Al-Masri and Blackburn, 1999) |
| Darbandakhan Lake, Iraq         | 18.17  | (Shivakumara et al., 2014)     |
| Manzala Lake, Egypt             | 1.73 - 6.40  | (Yousef et al., 2017)          |
| Çavuşçu Lake, Turkey            | 0.170– 32.631  | (Tüfekcioğlu, 2015)            |
| Van Lake, Turkey                | $(40.43 \pm 3.73) \times 10^{-3}$ (Spring)<br>$(64.94 \pm 5.99) \times 10^{-3}$ (Autumn) | (Kayakökü and Doğru, 2020)     |
| WHO                             | 100  | (WHO, 2004)                    |
| UNSCEAR                         | 40   | (UNSCEAR, 1993)                |
| USEPA                           | 11.1   | (USEPA, 2011)                  |
| Aygır Lake, Turkey              | <b><math>0.41 \pm 0.05</math></b>  | This study                     |

If radon concentrations are compared for this study with studies that have been taken from lakes located in different cities and countries, it is noticed that the result values are generally lower than the results of other studies (According to Table 2).

Zorer et al. (2013) investigated the radon concentrations of the water samples taken from two points in Aygır Lake using CR-39 passive nuclear trace detectors. At the end of the study, they calculated the radon concentrations for these two points as  $0.048$  and  $0.355 \text{ Bq L}^{-1}$ , respectively (Zorer et al., 2013). These values are consistent with the values obtained in the present study. In addition, radon concentration measurements were made in other lake waters in regions close to the study area. Average radon concentrations were calculated as  $0.150 \text{ Bq L}^{-1}$  and  $0.102 \text{ Bq L}^{-1}$  for Arin and Nazik Lakes, respectively, and  $0.175 \text{ Bq L}^{-1}$ ,  $0.106 \text{ Bq L}^{-1}$  and  $0.068 \text{ Bq L}^{-1}$  for Ilık Lake, Soğuk Lake and Kara Lake respectively, which are from the Nemrut Lakes (Zorer et al., 2013). These results are lower than the average value obtained in present study,  $0.41 \pm 0. \text{ Bq L}^{-1}$ .

Kayakökü and Doğru (2020) calculated the radon concentrations in Van Lake surface water samples. Experimental studies were carried out using CR-39 passive radon trace detectors and Radosys radon measurement system. The average radon concentration was calculated as  $0.040 \text{ Bq L}^{-1}$  in spring, whereas as  $0.065 \text{ Bq L}^{-1}$  in autumn (Kayakökü and Doğru, 2020). Likewise, these average values are lower than the values obtained in this study.

Differences in meteorological parameters may cause different radon content in samples. The rock types of Bitlis and its districts are generally composed of limestone and magmatic granite, granitic gneiss, andesite, and some of their features are shaped by basaltic lavas (Bal et al., 2017). When water touches rocks throughout the medium they pass through, some substances are dissolved and carried by the water. Aygır Lake is located on the south side of Süphan Mountain and it is a tectonically

formed lake. In addition, fault lines pass through the land where the lake is located. This may be the reason for the high concentration of radon in the lake.

## CONCLUSION

In this study, the radon concentrations were measured by using the Saphymo GmbH AlphaGUARD Professional radon monitor in Bitlis Eren University Physics Department. While the lowest  $C_{RnW}$ , AED and SED values belong to the S-3 sample, the highest  $C_{RnW}$ , AED and SED values belong to the S-10 sample. The southern part of the lake is Pliocene sedimentary units, the western part is Miocene sedimentary units, northern and eastern sections are surrounded by lava flows  $(760 \pm 40 - 150 \pm 40) \times 10^3$  years old (Özdemir et al., 2016). In addition, Süphan Volcanic Mountain is located in the northern part of the lake and there is also a fault line passing through the north of the lake. S-3 point, where radon activity is the lowest, is a flat area in the southwestern part of the lake, and is located on the right side of the highway to Aygır village. S-10 point, where radon activity is highest, is in the northeastern part of the lake and this is the mountainous area. This place is close to both the Süphan Mountain and the fault line. It is also a point close to the area where people go for picnics. This region is a region where intensive agricultural activities are carried out. The fact that this area is surrounded by  $(760 \pm 40 - 150 \pm 40) \times 10^3$  years old lava flows and the soil structure can be shown among the reasons that affect the high radon level. Radon concentrations obtained from the calculations determined to be lower than  $100 \text{ Bq L}^{-1}$ ,  $40 \text{ Bq L}^{-1}$  and  $11.1 \text{ Bq L}^{-1}$ , which are the limit values for drinking water set by World Health Organization (WHO), United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR) and the US Environmental Protection Agency (USEPA).

When the dose taken as a result of ingestion of radon in drinking water is examined, it is seen that the amount of dose changes according to the radon concentration. The International Atomic Energy Agency (IAEA) and World Health Organization (WHO) have determined the total dose for the dose taken from drinking water in one year; this value is  $0.1 \text{ mSv y}^{-1}$  ( $10^5 \text{ nSv y}^{-1}$ ) (IAEA, 2002; WHO, 2004). When the results obtained in this study are compared with this limit value, it is seen that the results are below this limit value. Therefore, the  $^{222}\text{Rn}$  concentration values determined in the waters of Aygır Lake do not cause any harm to health.

The data obtained as a result of this study show that using the Aygır Lake water in agriculture (irrigation etc.) and fish farming will not result in radiological hazard. Additionally, the natural and artificial radionuclide concentrations and heavy metal contents of the lake can be determined by doing a more detailed study.

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank Prof. Dr. Sezai YALÇIN and Assoc. Prof. Sultan ŞAHİN BAL for sharing their knowledge and experiences with me during the measurement and analysis processes.

## Conflict of Interest

I declare that there is no conflict of interest during the planning, execution and writing of the article.

## Author's Contributions

I hereby declare that the planning, execution and writing of the article was done by me as the sole author of the article.

## REFERENCES

Al-Masri MS, Blackburn R, 1999. Radon-222 and related activities in surface waters of the English Lake district. Applied Radiation and Isotopes 50(6): 1137-1143.

- Bal SŞ, Kılıç Ö, Gönültaş F, 2017. Determination of radon concentration on the Bitlis spring waters. *Sakarya University Journal of Science* 21(3): 302-306.
- Baykara O, Doğru M, 2006. Measurements of radon and uranium concentration in water and soil samples from east anatolian active fault systems (Turkey). *Radiation Measurements* 41(3): 362-367.
- Çavuş A, 2018. An investigation on water quality and management of Aygır Lake. Van Yüzüncü Yıl University Graduate School of Natural and Applied Sciences, PhD. Thesis.
- Çevik U, Damla N, Karahan G, Çelebi N, Kobya Aİ, 2006. Natural radioactivity in tap waters of eastern Black Sea region of Tukey. *Radiation Protection Dosimetry* 118(1): 88-92.
- Davutoğlu H, 2008. Methods of radon gas measurement. Dumlupınar University Graduate School of Natural and Applied Sciences Master Thesis.
- Doğu AF, Deniz O, 2015. Morphologic features and tourism facilities of Aygır Lake. *Journal of International Social Research* 8(41): 692-702.
- Emre Y, Kürüm V, 2007. Trout Farming in Pools and Cages. Posta Printing House No:272, Seyrantepe, İstanbul.
- Erdoğan M, 2015. Determination of radon (Rn-222) concentration in drinkable and processed water in and around Osmaniye. Osmaniye Korkut Ata University Institute of Science, Master Thesis.
- Erees FS, Yener G, Salk M, Özbal Ö, 2006. Measurements of radon content in soil gas and in the thermal waters in western Turkey. *Radiation Measurements* 41(3): 354-61.
- GENITRON INSTRUMENTS, 2001. AlphaPUMP Technical Description. Genitron Instruments GmbH HeerstraBe No: 149, pp. 6-7, Germany.
- GENITRON INSTRUMENTS, 2007. AquaKIT Accessory for Radon in Water Measurement in Combination with the Radon Monitor AlphaGUARD. Genitron Instruments GmbH HeerstraBe No: 149, pp.15, Germany.
- Genrich V, 2006. AlphaGUARD PQ2000/MC50. Multiparameter Radon Monitor, Characterisation of its Physical Properties Under Normal Climatic and Severe Environmental Conditions, Genitron Instruments GmbH. User Manual, Frankfurt, Germany.
- George AC, 2007. "World history of radon research and measurement from the early 1900s to today." *Natural Radiation Environment Conference VIII (NRE VIII) in Buzios, Brazil, Radon Bulletin of the CRCPD*, reprinted in November 2007.
- Gosink TA, Baskaran M, Holleman DF, 1990. Radon in the human body from drinking water. *Health Physics* 59(6): 919-920.
- Gyuk PM, Aruwa A, Dogara MD, Daniel IH, 2017. Annual effective dose of Radon-222 in well water samples in male adults: Idah, Nigeria *American Journal of Optics and Photonics* 5(4): 45-49.
- Hussein AS, 2019. Evaluation of the radiation dose from radon ingestion from different types of drinking water samples in Egypt using nuclear track detectors (LR-115 Type II). *Radiat Prot Environ* 42: 168-72.
- IAEA, 2002. International Atomic Energy Agency. Specification of Radionuclide Content in Comities Requiring Regulation for Purposes of Radiation Protection Safety Guide.
- ICRP, 1994. International Commission on Radiological Protection, Protection Against Radon-222 at Home and at Work. Pergamon Press ICRP Publication No:65, pp. 45.
- Karahan G, Öztürk N, Bayülken A, 2000. Natural radioactivity in various surface waters in İstanbul. *Water Research* 34(18): 4367-4370.
- Kayakökü H, Dogru M, 2020. Radon concentration measurements in surface water samples from Van Lake, Turkey using CR-39 Detectors. *Bitlis Eren University Journal of Science and Technology* 10(1): 35-42.
- Meisenberg O, Mishra R, Joshi M, Gierl S, Rout R, Guoa L, Agarwal T, Kanse S, Irlinger J, Sapra BK, Tschiersch J, 2017. Radon and thoron inhalation doses in dwellings with earthen architecture: comparison of measurement methods. *Science of the Total Environment* 579: 1855-1862.
- Nikolopoulos D, Vogianis E, Petraki E, Zisos A, Louizi A, 2010. Investigation of the exposure to radon and progeny in the thermal Spas of Loutraki (Attica-Greece): Results from measurements and modelling. *Science of the Total Environment* 408(3): 495-504.

- Özdemir Y, Akkaya İ, Oyan V, Kelfoun K, 2016. A debris avalanche at Süphan Stratovolcano (Turkey) and implications for hazard evaluation. *Bulletin of Volcanology* 78(9): 1-17.
- Prasad G, Prasad Y, Gusain GS, Ramola RC, 2008. Measurement of radon and thoron levels in soil, water and indoor atmosphere of Budhakedar in Garhwal Himalaya, India. *Radiation Measurements* 43: 375–379.
- RWIHC, 2005. Regulation on Water Intended for Human Consumption, O.G. date: 17 Feb 2005, O.G. number: 25730. O.G. Annex 1 (Amended attachment: RG-7/3/2013-28580). Ministry of Health <http://shsm.gov.tr>. (Date of access: 25 July 2020).
- Shivakumara BC, Chandrashekara MS, Kavitha E, Paramesh L, 2014. Studies on  $^{226}\text{Ra}$  and  $^{222}\text{Rn}$  concentration in drinking water of Mandya region, Karnataka State, India. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 7(4): 491-498.
- Şahin S, 2004. Determination of gross alpha and gross beta radioactivity levels of Kangal (Sivas) Fish Spa. Fırat University Graduate School of Natural and Applied Sciences, Master Course Seminar.
- Tanrıverdi E, 2016. Determination of radon activity in waters in the Bitlis region. Bitlis Eren University Graduate School of Natural and Applied Sciences, Master Thesis.
- Tarım UA, Gurler O, Akkaya G, Kilic N, Yalcin S, Kaynak G, Gundogdu O, 2011. Evaluation of radon concentration in well and top waters in Bursa. *Radiation Protection Dosimetry* 150(2): 207-212.
- Tebbutt THY, 1998. *Principles of Water Quality Control (Fifth Edition)*. Elsevier Ltd. ISBN: 978-0-7506- 3658-2.
- Tüfekcioğlu F, 2015. The measurement of radon concentration and investigation of discontinuities. Selçuk University Graduate School of Natural and Applied Sciences PhD. Thesis.
- Türkman A, Tokgöz S, Sarptaş H, 1999. Drinking water standards and safe drinking water. 3rd National Environmental Engineering Congress, İzmir, November. 25-26, 1999.
- UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation), 1993. Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. United Nations Sales Publication E.94.IX.2. United Nations, New York.
- Urban M, Piesch E, 1981. Low-level environmental radon dosimetry with a passive track etch detector device. *Radiation Protection Dosimetry* 1(2): 97-109.
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2011. Proposed Radon in Drinking Water Regulation. DC, EPA: 600/R-09/ 052F.
- Valkovic V, 2000. *Radioactivity in the environment*. Elsevier Science B.V. Netherlands.
- Yalcin S, Gurler O, Akar UT, Incirci F, Kaynak G, Gundogdu O, 2011. Measurements of radon concentration in drinking water samples from Kastamonu (Turkey). *Isotopes in Environmental and Health Studies* 47(4): 438-445.
- Yousef HA, El-Farrash AH, Magdy A, 2017. Radon levels in surface water samples from Manzala Lake East Nile Delta, Egypt using Nuclear Track Detectors. *Journal of Nuclear and Particle Physics* 7(2): 36-42.
- WHO (World Health Organization), 2004. Guidelines for Drinking Water Quality Recommendations, 1: 206-209.
- WPCR, 2004. Water Pollution Control Regulation, <http://mevzuat.basbakanlik.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=7.5.7221&sourceXmlSearch=&MevzuatIliski=0>. (Date of access: 25 July 2020).
- Zorer ÖS, Şahan T, Ceylan H, Doğru M, Şahin S, 2013.  $^{238}\text{U}$  and  $^{222}\text{Rn}$  activity concentrations and total radioactivity levels in lake waters. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 295(3):1837-1843.



## Electrical Characterization of CdO Based Au/p-Si Rectifier

Mehmet YILMAZ<sup>1\*</sup>

**ABSTRACT:** Cadmium oxide (CdO) film was developed using a chemical spray pyrolysis technique on the p-type silicon (p-Si) substrate. The solution of the CdO was obtained by dissolving cadmium acetate salt in a mixture of distilled water and methanol. High-quality Au and Al contacts were evaporated on the polished and unpolished side of p-Si, respectively to create 4Au/CdO/p-Si/Al device architecture. In this context, four Au/CdO/p-Si/Al devices that were arbitrarily favored were analyzed and compared in depth. Current-Voltage (I-V) measurements were carried out to find out the performance of the CdO interlayer in the Au/p-Si device. The obtained data were analyzed using the Thermionic emission theory, Norde, and Cheung approach. Results indicated that CdO films grown by simple chemical spray pyrolysis technique could be used as barrier modifiers in Au/p-Si rectifier device.

**Keywords:** CdO, Spray pyrolysis, Schottky Junction, rectifier

<sup>1</sup>Mehmet YILMAZ ([Orcid ID: 0000-0002-4368-8453](https://orcid.org/0000-0002-4368-8453)), Atatürk University, K.K Education Faculty, Department of Science Teaching, Erzurum, Turkey

\*Corresponding Author: Mehmet YILMAZ, e-mail: yilmazmehmet32@gmail.com

## INTRODUCTION

In recent years, TCO films (such as ITO and SnO<sub>2</sub>) have gained attention due to their low resistance and high transparency (Ferro, 1999). Besides, indium's recently included as critical raw material and it's being very expensive has forced researchers to work on materials alternative to ITO (Ylä-Mella et al., 2016). At this stage, the electrical resistance of the CdO film is between  $10^{-2}$ – $10^{-4}$  Ω.cm, and the optical band gap between 2.2 and 2.7 eV. These behaviors highlight the potential of CdO to be used as an alternative to ITO in device applications. Moreover, native defects such as oxygen vacancies and cadmium interstitials are responsible for the electrical conduction of pure CdO. Controllable of conductivity and optical properties of CdO films by controlling natural defects makes CdO films interesting in hetero-junction applications. Although these properties can be adjusted for the desired application with external effects such as doping, they can also be changed depending on the experimental method (Sankarasubramanian et al., 2015). In this context, depending on the growth method, the natural defect rates that affect the characteristics of CdO films can be changed by controlling some process parameters such as the concentration of the solution, the temperature of the substrate and the solution flow rate, the pressure of the growth condition (Gupta et al., 2008; Murthy et al., 1999).

According to the literature, the CdO films are obtained with many growth methods. Among them, pulsed laser deposition (Menazea et al., 2020), radiofrequency magnetron sputtering (Saha et al., 2008), metalorganic chemical vapor deposition (MOCVD) (Jin et al., 2004) are frequently used to obtain high-quality CdO films, which are suitable for many applications. However, these techniques require a lot of time to reach the desirable vacuum rate as well as being expensive can be thought the disadvantages of these techniques (Wang et al., 2018). Recently, the spray pyrolysis technique provides an easy way to obtain high-quality metal oxide-based thin films (Khodair et al., 2020; Mahesh et al., 2020). The chemical spray pyrolysis technique (CST), one of the important production methods, provides one-stage production and homogeneous particle composition. In CST, the primary preparation conditions affecting film properties are precursors and solvents (Afify et al., 2014). Therefore, it is important to investigate the performance of CdO films obtained by CST in device applications in order to reveal the performance of the CST.

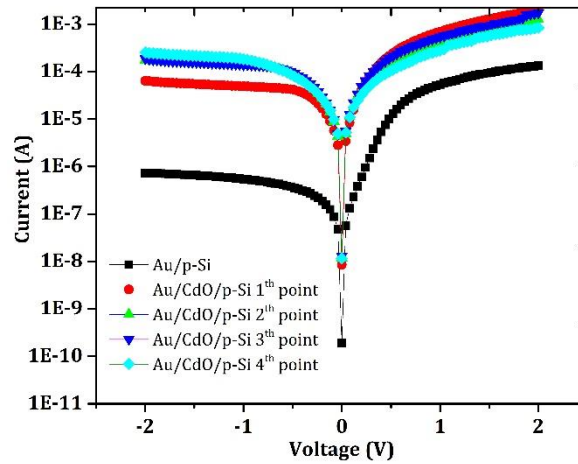
This article examines the performance of the CdO thin film made by the solution-based CST in Au/p-Si device as an alternative to the CdO films growth by vacuum-requiring growth methods mentioned above. The obtained Au/CdO/p-Si/Al was characterized by current-voltage (I-V) analyses at room temperature.

## MATERIALS AND METHODS

To obtain better performance, the p-Si wafer was firstly cleaned up by a cleaning procedure called the RCA (Kern, 1990). The Al contact (100 nm) was then vaporized to the unpolished side of the p-Si and thermally annealed at 500 ° C for 5 minutes for ohmic contact. A simple experimental setup was used to perform the deposition of CdO thin films by the CST. As source material, the cadmium acetate (Cd(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O) was preferred and it was dissolved in a mixture of deionized water and methanol (volumetric ratio of deionized water/methanol was adjusted as 1: 1). The final solution was sprayed onto the p-Si substrate at a flow rate of 2 mL/min at 250°C substrate temperature. The properties of the p-Si substrate were given in our previous publications (Turgut et al., 2021). Finally, Au dot contacts were evaporated by thermal evaporation onto the CdO films to create Au/CdO/p-Si/Al device architecture. Electrical evaluations were made by taking into account the current-voltage (I-V) measurements obtained using the KEITHLEY 487 Picoammeter/Voltage Source and the results were discussed in detail.

## RESULTS AND DISCUSSION

Semi-logarithmic I-V plots of the Au/p-Si/Al (reference) and Au/CdO/p-Si/Al device points have been given in Fig.1. According to the semi-logarithmic I-V curves of the samples, the fabricated devices exhibited strong rectifying properties, but the rectifying properties changed from device to device. Variations in I-V graphs can be due to metallic contacts or measurement errors as well as non-uniform interface layers, as we noted in our previous publication (Kocyigit et al., 2019).



**Fig.1.** I-V plot of the various Au/p-Si/Al and Au/CdO/p-Si/Al device points

We performed I-V analysis considering the thermionic emission theory to obtain detailed information regarding the influence of layer inhomogeneity on the properties of Au/CdO/p-Si/Al device. In the presence of the interfacial layer of CdO, the correlations between current and voltage can be associated with Eq.(1), taking into account the thermionic emission (TE) principle (Karataş et al., 2003).

$$I = I_0[\exp(qV/nkT) - 1] \quad (1)$$

where,  $I_0$  is the current of saturation and given via the following formula:

$$I_0 = AA^*T^2 \exp(-q\phi_b/kT) \quad (2)$$

Some of the notations seen in Eqs.(1-2) such as  $q$ ,  $T$ ,  $\phi_b$ ,  $V$ ,  $k$ ,  $A^*$ ,  $R_s$ ,  $A$ , and  $n$  are electron charge, temperature, height of the zero bias barrier, applied voltage, Boltzmann constant, Richardson constant ( $32 \text{ A}/(\text{cm}^2 \cdot \text{K}^2)$  for p-Si), series resistance, diode area, and, ideality factor, respectively. If  $V > 3kT/q$ , the ideality factor may be organized from eq.(1) as below (Karataş et al., 2007):

$$n = q/kT \left[ dV/d(\ln I) \right] \quad (3)$$

The meaning of the ideality factor "n" is unity for the ideal device according to simple TE theory.

However, variation from the unity is inevitable because of certain factors such as the presence of the oxide layer between the materials of the junctions and the decrease in IRs caused by the effect of series resistance  $R_s$  (Grilli et al., 2016). Also, this behavior is called a non-ideal diode feature. For the non-ideal diode, zero bias barrier height values can be calculated using Eq. (4):

$$\phi_b = \frac{kT}{q} \ln(AA^*T^2/I_0) \quad (4)$$

Table 1 provides the measured barrier height values and ideality factor obtained from the standard I-V approximation for the Au/p-Si/Al and Au/CdO/p-Si/Al device points.

**Table 1.** Comparing device points of Au/p-Si/Al and Au/CdO/p-Si/Al's characteristics

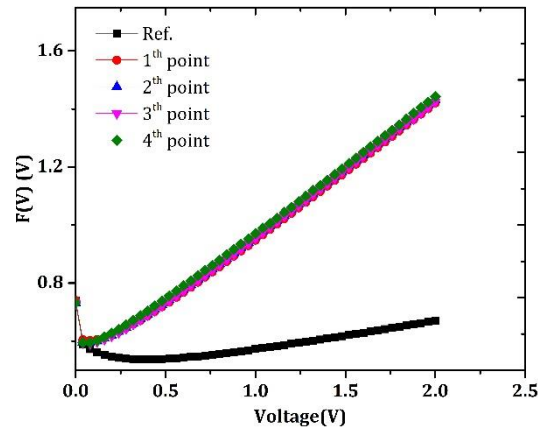
| Sample                | Saturation Current ( $I_0$ ) | $n$ (TE) | $\varphi_b$ (eV) (TE) | Cheung |                  | Norde            |                     |
|-----------------------|------------------------------|----------|-----------------------|--------|------------------|------------------|---------------------|
|                       |                              |          |                       | $n$    | $\varphi_b$ (eV) | $\varphi_b$ (eV) | $R_s$ (k $\Omega$ ) |
| Ref.                  | $7.80 \times 10^{-8}$        | 7.73     | 0.68                  | 8.12   | 0.63             | 0.71             | 1.29                |
| 1 <sup>th</sup> point | $4.04 \times 10^{-8}$        | 1.52     | 0.70                  | 3.86   | 0.56             | 0.61             | 1.48                |
| 2 <sup>th</sup> point | $5.19 \times 10^{-8}$        | 1.55     | 0.69                  | 3.90   | 0.35             | 0.60             | 1.02                |
| 3 <sup>th</sup> point | $6.55 \times 10^{-8}$        | 1.54     | 0.69                  | 4.02   | 0.54             | 0.60             | 0.93                |
| 4 <sup>th</sup> point | $4.38 \times 10^{-8}$        | 1.57     | 0.70                  | 6.57   | 0.48             | 0.58             | 2.13                |

According to Table 1, it is seen that the values of the ideality factor for different device points are larger than the unity. This situation demonstrates that, as stated before, the fabricated devices exhibit non-ideal diode behavior. Besides, it has been found that the ideality factor's value of the reference sample is very high. In the literature (Gupta et al., 2009a, 2009b), a higher ideality factor is seen for devices with different device architectures, especially in calculations using data in the high forward bias area. The high ideality factor may be attributed to many factors, such as the rapid recombination of electrons and holes in the area of depletion, interface state density effect, and the presence of imperfections between metal/semiconductor interlayer (Akinn et al., 2019; Yeganeh et al., 2010). Moreover, a considerable decrease in the ideality factor has been observed with the use of CdO as the interface material in the Au/p-Si device. This situation can be shown as evidence that CdO affects the barrier height of conventional Au/p-Si contacts. As for the CdO/p-Si contact, the silicon and CdO electron affinities are 4.05 eV and 3.45 eV, respectively. Therefore, the Schottky barrier occurs at the CdO/p-Si junction (Bagal et al., 2016; Soylu et al., 2012). The values shown in Table 1 shows the correlation between the barrier height and the ideality factor. Hence, the barrier inhomogeneities can be seen with a slight difference with the change of diode points. The fact that all the  $\varphi_b$  values are similar to each other indicates the barrier height's homogeneous nature. Thus, the small inconsistency in the CdO diodes' barrier heights is thought to be because of the difference in the carrier concentration of CdO in the studied area because of CdO film is not homogeneously distributed on the surface.

An alternative way of calculating the diode parameters like the barrier height value of these types of devices is the Norde method. The following equation can be applied to compute the barrier height of four Au/CdO/p-Si devices (Lien et al., 1984):

$$F(V) = \frac{V}{\gamma} - \frac{kT}{q} \ln\left[\frac{I(V)}{AA^*T^2}\right] \quad (5)$$

where,  $\gamma$  indicates an integer that should be higher than the  $n$  defined by the TE, and the  $I(V)$  indicates bias based on current. The  $F(V)$ - $V$  diagram of four Au/CdO/p-Si devices have been shown in Fig. 2 and Table 1 provides these curves' estimated parameters have been given. From the values shown in Table 1, it can be concluded that the obtained values of  $\varphi_b$  differ slightly from the values obtained from other methods. Series resistance is another significant parameter for similar devices. Therefore, calculating the series resistance is essential in determining the performance of such devices (Ocak et al., 2009).



**Fig.2.** The Norde plot of the Au/p-Si/Al and Au/CdO/p-Si/Al device points

$$R_s = \frac{\gamma - n}{I} \left( \frac{kT}{q} \right) \quad (6)$$

The calculated series resistance values are given in Table 1, and values of  $k(\Omega)$  order have been obtained with the differences for each diode point. As mentioned earlier, the observed difference in both barrier height and series resistance values may be due to measurement errors as well as to the CdO interface growing inhomogeneously on the p-Si wafer.

According to Cheung method, the current expression of diode can be represented as follows depending on  $R_s$  (Kocyigit et al., 2019; Singh et al., 2015).

$$I = I_0 \exp \left( - \frac{q(V - IR_s)}{nkT} \right) \quad (7)$$

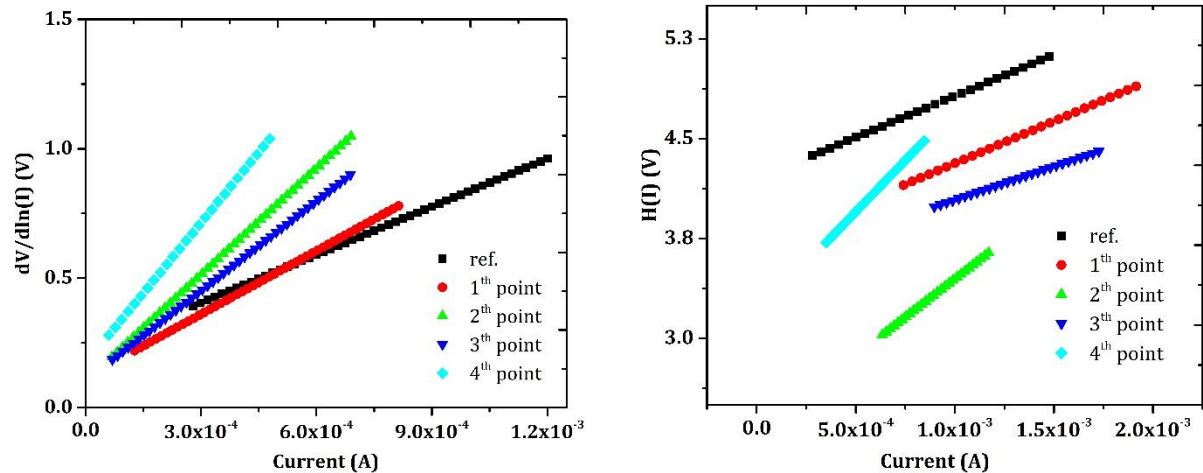
The  $IR_s$  is the drop at voltage because of the series resistance. Hence, diode parameters such as ideality factor and barrier height can be obtained using Cheung approximations under the effect of series resistance. For this, the equations known as Cheung approximations can be used.

$$\frac{dV}{d(\ln I)} = \frac{nkT}{q} + IR_s \quad (8)$$

$$H(I) = V - \left( \frac{nkT}{q} \right) \ln \left( \frac{I}{AA^*T^2} \right) \quad (9)$$

$$H(I) = n\phi_b + IR_s \quad (10)$$

By considering Eqs. (8-10),  $dV/d\ln(I)$  vs.  $(I)$  and  $H(I)$  vs.  $(I)$  curves can be drawn with a linear nature. In addition, some diode parameters such as series resistance, barrier height, and ideality factor are given by the slope and y-axis intercept of these curves. The  $dV/d\ln(I)$  vs.  $(I)$  and  $H(I)$  vs.  $(I)$  plots of the Au/p-Si/Al and Au/CdO/p-Si/Al device points have been shown in Fig. 3 and calculated diode parameters have been listed in Table 1. From the values given in Table 1, it is seen that the  $n$  and  $\phi_b$  values obtained by the Cheung approach are not in good agreement with those derived from values of thermionic emission theory. Non-ideal device configurations may be correlated with discrepancies between  $n$  and  $\phi_b$  values for the same device. (Yıldırım, 2019).



**Fig.3.** A plot of  $dV/d\ln(I)$  vs.  $(I)$  and  $H(I)$  vs.  $(I)$  of the Au/p-Si/Al and Au/CdO/p-Si/Al device points

Actually, this difference can be explained by taking differences in calculations into consideration. While the TE approach uses the data of the I-V plot in the linear region to measure the diode parameters, the Cheung method uses the data in the nonlinear region of the I-V curves where the interface states and  $R_s$  are efficient. Similar interpretations have been by other researchers to explain the differences between Norde, Cheung, and TE approximations (Sağlam et al., 2004; Tataroğlu et al., 2009; Yilmaz, 2019).

## CONCLUSION

The CdO thin film was grown on the p-type Si by the CST. To examine the device performance of the CdO film in the Au/p-Si device, Au gold contacts were evaporated on the CdO film and the 4 Au/CdO/p-Si/Al device structure was completed. In this context, the device parameters of 4 Au/CdO/p-Si/Al devices were determined using different methods depending on I – V analysis and compared in terms of various device point effects. Accordingly, while the ideality factor varied between 1.52-1.57, the barrier height varied between 0.70-0.69 eV, indicating the homogeneous nature of the barrier height. The small differences here were attributed to the difference in carrier concentration of CdO in the device being studied because the CdO film is not homogeneously distributed over the p-Si backing.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to thanks H.Kacus and A.Ozmen for their valuable contributions.

## Conflict of Interest

I declare that there is no conflict of interest during the planning, execution and writing of the article.

## Author's Contributions

I hereby declare that the planning, execution and writing of the article was done by me as the sole author of the article.

## REFERENCES

- Afify HH, Ahmed NM, Tadros MY, Ibrahim FM, 2014. Temperature dependence growth of CdO thin film prepared by spray pyrolysis. *Journal of Electrical Systems and Information Technology*, 1(2), pp:119–128. doi: 10.1016/j.jesit.2014.07.001
- Akinn Ü, Yüksel ÖF, Pakma O, Koralay H, Cavdar S, Tugluoglu N, 2019. A Novel Device Behavior Of Al / Coronene / n-GaAs / In Organic Based Schottky Barrier Diode. *New Materials, Compounds and Applications*, pp:15–22.

- Bagal VS, Patil GP, Deore AB, Suryawanshi SR, Late DJ, More MA, Chavan PG, 2016. Surface modification of aligned CdO nanosheets and their enhanced field emission properties. *RSC Advances*, 6(47), pp:41261–41267. doi: 10.1039/C5RA28000A
- Ferro R, 1999. Some physical properties of F-doped CdO thin films deposited by spray pyrolysis. *Thin Solid Films*, 347(1–2), pp:295–298. doi: 10.1016/S0040-6090(99)00006-1
- Grilli ML, Aydogan S, Yilmaz M, 2016. A study on non-stoichiometric p-NiOx/n-Si heterojunction diode fabricated by RF sputtering: Determination of diode parameters. *Superlattices and Microstructures*, 100, pp:924–933. doi: 10.1016/j.spmi.2016.10.059
- Gupta RK, Ghosh K, Kahol, PK, 2009a. Fabrication and electrical characterization of Au/p-Si/STO/Au contact. *Current Applied Physics*, 9(5), pp:933–936. doi: 10.1016/j.cap.2008.09.007
- Gupta RK, Ghosh K, Kahol PK, 2009b. Fabrication and electrical characterization of Schottky diode based on 2-amino-4, 5-imidazoledicarbonitrile (AIDCN). *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, 41(10), pp:1832–1834. doi: 10.1016/j.physe.2009.07.009
- Gupta RK, Ghosh K, Patel R, Mishra SR, Kahol PK, 2008. Structural, optical and electrical properties of In doped CdO thin films for optoelectronic applications. *Materials Letters*, 62(19), pp:3373–3375. doi: 10.1016/j.matlet.2008.03.015
- Jin S, Yang Y, Medvedeva JE, Ireland JR, Metz AW, Ni J, Kannewurf CR, Freeman AJ, Marks TJ, 2004. Dopant Ion Size and Electronic Structure Effects on Transparent Conducting Oxides. *Sc-Doped CdO Thin Films Grown by MOCVD*. *Journal of the American Chemical Society*, 126(42), pp:13787–13793. doi: 10.1021/ja0467925
- Karataş Ş, Altındal Ş, Türüt A, Çakar, M, 2007. Electrical transport characteristics of Sn/p-Si schottky contacts revealed from I–V–T and C–V–T measurements. *Physica B: Condensed Matter*, 392(1–2), pp:43–50. doi: 10.1016/j.physb.2006.10.039
- Karataş Ş, Altındal Ş, Türüt A, Özmen A, 2003. Temperature dependence of characteristic parameters of the H-terminated Sn/p-Si(1 0 0) Schottky contacts. *Applied Surface Science*, 217(1–4), pp:250–260. doi: 10.1016/S0169-4332(03)00564-6
- Kern W, 1990. The Evolution of Silicon Wafer Cleaning Technology. *Journal of The Electrochemical Society*, 137(6), pp:1887–1892. doi: 10.1149/1.2086825
- Khodai ZT, Abdulmunem Ibrahim B, Kaream Hassan M, 2020. Investigation on the structural and optical properties of copper doped NiO nanostructures thin films. *Materials Today: Proceedings*, 20, pp:560–565. doi: 10.1016/j.matpr.2019.09.189
- Kocigit A, Yılmaz M, Aydoğan Ş, İncekara Ü, 2019. The effect of measurements and layer coating homogeneity of AB on the Al/AB/p-Si devices. *Journal of Alloys and Compounds*, 790, pp:388–396. doi: 10.1016/j.jallcom.2019.03.179
- Lien CD, So FCT, Nicolet MA, 1984. An improved forward I-V method for nonideal Schottky diodes with high series resistance. *IEEE Transactions on Electron Devices*, 31(10), pp:1502–1503. doi: 10.1109/T-ED.1984.21739
- Mahesh D, Kumar MCS, 2020. Synergetic effects of aluminium and indium dopants in the physical properties of ZnO thin films via spray pyrolysis. *Superlattices and Microstructures*, 142, p:106511. doi: 10.1016/j.spmi.2020.106511
- Menazea AA, Mostafa AM, Al-Ashkar EA, 2020. Impact of CuO doping on the properties of CdO thin films on the catalytic degradation by using pulsed-Laser deposition technique. *Optical Materials*, 100, p:109663. doi: 10.1016/j.optmat.2020.109663
- Murthy LCS, Rao KSRK, 1999. Thickness dependent electrical properties of CdO thin films prepared by spray pyrolysis method. *Bulletin of Materials Science*, 22(6), pp:953–957. doi: 10.1007/BF02745685
- Ocak YS, Kulakci M, Kılıçoğlu T, Turan R, Akkılıç K, 2009. Current–voltage and capacitance–voltage characteristics of a Sn/Methylene Blue/p-Si Schottky diode. *Synthetic Metals*, 159(15–16), pp:1603–1607. doi: 10.1016/j.synthmet.2009.04.024

- Sağlam M, Biber M, Çakar M, Türüt A, 2004. The effects of the ageing on the characteristic parameters of polyaniline/p-type Si/Al structure. *Applied Surface Science*, 230(1–4), pp:404–410. doi: 10.1016/j.apsusc.2004.03.003
- Saha B, Thapa R, Chattopadhyay KK, 2008. Wide range tuning of electrical conductivity of RF sputtered CdO thin films through oxygen partial pressure variation. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 92(9), pp:1077–1080. doi: 10.1016/j.solmat.2008.03.024
- Sankarasubramanian K, Soundarrajan P, Sethuraman K, Ramamurthi K, 2015. Chemical spray pyrolysis deposition of transparent and conducting Fe doped CdO thin films for ethanol sensor. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 40, pp:879–884. doi: 10.1016/j.mssp.2015.07.090
- Singh BK, Tripathi S, 2015. Fabrication and characterization of Au/p-ZnO Schottky contacts. *Superlattices and Microstructures*, 85, pp:697–706. doi: 10.1016/j.spmi.2015.06.038
- Soylu M, Girtan M, Yakuphanoglu F, 2012. Properties of PEDOT:PEG/ZnO/p-Si heterojunction diode. *Materials Science and Engineering: B*, 177(11), pp:785–790. doi: 10.1016/j.mseb.2012.03.025
- Tataroğlu A, Altındal Ş, 2009. The analysis of the series resistance and interface states of MIS Schottky diodes at high temperatures using I–V characteristics. *Journal of Alloys and Compounds*, 484(1–2), pp:405–409. doi: 10.1016/j.jallcom.2009.04.119
- Turgut G, Aydoğan S, Yılmaz M, Özmen A, Kacus H, 2021. An Investigation of Spray Deposited CdO Films and CdO/p-Si Heterojunction at Different Substrate Temperatures. *JOM*. doi: 10.1007/s11837-020-04514-9
- Wang Q, Zhao Z, Li H, Zhuang J, Ma Z, Yang Y, Zhang L, Zhang Y, 2018. One-step RF magnetron sputtering method for preparing Cu(In, Ga)Se<sub>2</sub> solar cells. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 29(14), pp:11755–11762. doi: 10.1007/s10854-018-9274-y
- Yeganeh MA, Rahmatollahpur S, Sadighi-Bonabi R, Mamedov R, 2010. Dependency of barrier height and ideality factor on identically produced small Au/p-Si Schottky barrier diodes. *Physica B: Condensed Matter*, 405(16), pp:3253–3258. doi: 10.1016/j.physb.2010.04.055
- Yılmaz M, 2019. A function of external doping: Characteristics of inorganic nanostructure based diode. *Ceramics International*, 45(1), pp:665–673. doi: 10.1016/j.ceramint.2018.09.226
- Yıldırım M, 2019. Characterization of the framework of Cu doped TiO<sub>2</sub> layers: An insight into optical, electrical and photodiode parameters. *Journal of Alloys and Compounds*, 773, pp:890–904. doi: 10.1016/j.jallcom.2018.09.276
- Ylä-Mella J, Pongrácz E, 2016. Drivers and Constraints of Critical Materials Recycling: The Case of Indium. *Resources*, 5(4), p:34. doi: 10.3390/resources5040034



## Voltage Dependent Barrier Height, Ideality Factor and Surface States in Au/(NiS-PVP)/n-Si (MPS) type Schottky Barrier Diodes

Mahmut BUCURGAT<sup>1\*</sup>

**ABSTRACT:** Metal-Polymer-Semiconductor (MPS) Schottky Barrier Diodes (SBD) were manufactured and their basic electrical parameters were obtained by the measurement of the forward and reverse bias current-voltage ( $I-V$ ) in the wide bias voltage range ( $\pm 3V$ ) to determine the voltage dependent effects on Nickel-Sulphur (NiS) doped Poly Vinyl Pyrrolidone (PVP) polymer interlayer. The saturation current ( $I_0$ ), zero-bias barrier height ( $\Phi_{B0}$ ), rectifying rate (RR), ideality factor ( $n$ ) and the real value of series - shunt resistances ( $R_s - R_{sh}$ ) were calculated. The voltage dependent profile of  $n(V)$ ,  $\Phi_B(V)$ , and  $R_s(V)$  were derived. The forward bias  $\ln I-V$  plot of the MPS type SBD indicates a good rectifier behaviour and it has two distinctive linear parts with different slopes which correspond to low ( $0.288 \leq V \leq 0.625 V$ ) and moderate ( $0.672 \leq V \leq 0.960 V$ ) bias voltages and then deviates from linearity due to  $R_s$  and interlayer at high forward bias voltages. Energy dependent profile of  $N_{ss}$  was obtained from the forward bias  $I-V$  data by considering voltage dependent barrier height ( $\Phi_B$ ) and  $n$ .  $N_{ss}$  plot represents U-shape behaviour in the forbidden bandgap. The mean value of  $N_{ss}$  was found at about  $7.0 \times 10^{12} \text{ eV}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  and this value is in the acceptable limit for a semiconductor device and such lower values of  $N_{ss}$  are the consequences of the passivation effect on the surface states.

**Keywords:** MPS type SBD, Voltage dependent barrier height, Series resistance, Surface states, Double exponential  $I-V$  behavior

<sup>1</sup> Mahmut BUCURGAT ([Orcid ID: 0000-0002-6368-1945](https://orcid.org/0000-0002-6368-1945)), Gazi University Physics Department, Laboratory Building No: 324 Emniyet Mahallesi Bandırma Caddesi No: 6/8 06500 Yenimahalle / ANKARA

\*Corresponding Author: Mahmut BUCURGAT, e-mail: mahmut.bucurgat@gazi.edu.tr

## INTRODUCTION

The electrical and optical behaviours of metal-semiconductor (MS) junction with or without an interlayer such as insulator/oxide, polymer or its composites (MIS/MOS and MPS) depend on various factors; such as, the surface preparation or manufacture processes, the formation of interlayer which is native or deposited, its permittivity and homogeneity, the nature of barrier height, surface states, series resistance, bias voltage, device temperature and donor ( $N_D$ ) or acceptor atoms' ( $N_A$ ) doping concentration (Card and Rhoderick, 1971; Sze, 1981; Cheung and Cheung, 1986; Bohlin, 1986; Rhoderick and Williams, 1988; Tung, 2001; Tung, 2001; Tataroglu, 2013). The formation of an oxide or insulating interlayer such as  $\text{SiO}_2$  or  $\text{SnO}_2$  between metal and semiconductor by traditional methods is insufficient to reduce the leakage currents in the reverse bias region and formation of  $N_{ss}$  with dislocations between interlayer and semiconductor with energies in the forbidden bandgap of the semiconductor. Therefore, some polymers undoped or doped with, for example Ni, Zn, Co, graphene, have begun to be used instead of oxide materials due to their low cost, easy production techniques, flexibility and low weight per molecule (Demirezen et al., 2013; Guçlu et al., 2016; Akhlaghi et al., 2018; Badali et al., 2018; Altindal Yeriskin, 2019).

Both poly-vinyl-pyrrolidone (PVP) and poly-vinylalcohol (PVA) are semi-crystalline, water-soluble and have low conductivity, wide range crystallinity, high dielectric strength, good charge storage capacity, interesting physical and chemical properties which arise from OH groups and formation of hydrogen bonding (Lee et al. 2004). When polymers compared with semiconductors, they have low carrier mobility and dielectric constant, but this problem can be overcome by using a suitable dopant metal/graphene (Kaya et al. 2016; Altindal Yerişkin et al. 2017). For example, Altindal Yerişkin et al. 2017 have investigated the effects of (Gr-doped PVA) interfacial layer on Au/n-Si (MS) type structure by using various concentrations of graphene (% 0, 1, 3, 5, 7, 10) and they showed that Au/(0.07 Gr-PVA)/n-Si (MPS) has lower  $R_s$  and  $N_{ss}$ , higher  $R_{sh}$  and RR with considerable increase of dielectric constant compared to a traditional MS structure with an insulator/oxide (MIS or MOS). They showed that the value of RR of MPS structure is about 500 times higher and  $N_{ss}$  is about 95 times lower than the MS structure. Kaya et al. 2016 also showed that the value of  $\epsilon'$  for (GO-doped PrBaCoO) the nano-ceramic at 1 kHz is almost 200 times higher than the conventional  $\text{SiO}_2$  and 15 times higher than  $\text{TiO}_2$ .

Organic/polymer materials have also large surface area to volume ratio, energy/charge storage capacity with much mechanical and dielectrical strength. Moreover, they are soluble in water and easily grown on the surface of a semiconductor. Thus, some polymer materials such as polyvinyl alcohol (PVA) and PVP can be grown as an interfacial layer between metal and semiconductor. These attractive properties lead to this study and MPS type SBDs were manufactured; then, with forward and reverse bias  $I$ - $V$  measurements in the wide bias voltage range ( $\pm 3V$ ), the electrical parameters were derived to determine the effect of (NiS doped PVP) polymer interlayer with voltage dependent characteristics of these electrical parameters. By using the forward bias  $I$ - $V$  data with  $\Phi_B$  (V) and  $n$ , the  $N_{ss}$  dependence on the energy levels was evaluated.

## MATERIALS AND METHODS

The MPS type SBDs were grown on n-type (phosphorus-doped) Si wafer with 300  $\mu\text{m}$  thick and 1  $\Omega$  cm resistivity. First, it was cleaned in  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , and  $\text{NH}_4\text{OH}$  (3:1:1) solution at 70  $^\circ\text{C}$  in the ultrasonic bath and then rinsed in the ionized water at prolonged time and then rinsed in deionized water with high resistivity for 10 min and dried by dry nitrogen gas ( $\text{N}_2$ ) to clean any oxidation. Second, ohmic contact with high-purity Au (99.999%) with 1500  $\text{\AA}$  thick was thermally evaporated on the back side of

the Si wafer at  $10^{-6}$  Torr and then it was annealed at  $500^{\circ}\text{C}$  in the nitrogenic atmosphere for 5 min to get a low resistivity ohmic contact. 0.2 M from nickel chloride  $6\text{H}_2\text{O}(\text{NiCl}_2, \text{KBR})$  was dissolved in 40 ml distilled water and was stirred for 30 min, then 0.5 M  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (LOBA Chemie) was added to the solution drop by drop, until the pH of the solution is 7.0. Then, by adding 0.5 M NaOH (Merck), the reserved pH is 14. Next, the sample is kept 15 min in Power=180 microwave device (SAMSUNG). The sample was washed 5 times with water and was dried in oven for 48 h. Then, it was annealed at  $1000^{\circ}\text{C}$ . The prepared (NiS-PVP) composite was grown on the front side of the wafer by spin coating method. The thickness of (NiS-PVP) polymer interfacial layer was estimated to be 40 nm. Circular shaped Au Schottky dot contacts with  $7.85 \times 10^{-3} \text{cm}^2$  area and 1500 Å thick were formed on the polymer layer at  $10^{-6}$  Torr. *I-V* measurements were performed by the use of Keithley 2400 current/voltage source-meter in wide range of bias voltage ( $\pm 3\text{V}$ ) at room temperature.

## RESULTS AND DISCUSSION

The semilogarithmic forward and reverse bias *I-V* graph of the Au/(NiS-PVP)/n-Si (MPS) type SBD is given in Figure 1 to determine the effect of the (NiS-PVP) polymer layer at room temperature. In this figure, semilogarithmic *I-V* plot of the MPS type SBD represents a satisfactory rectifier behaviour, i.e. while the value of the current in the reverse bias region becomes almost independent of reverse bias voltage, it has two different linear parts in the forward bias region with different slopes which correspond to low ( $0.288 \leq V \leq 0.625\text{V}$ ) and moderate ( $0.672 \leq V \leq 0.960\text{V}$ ) bias regions. By the effects of  $R_s$  and interfacial polymer layer, the linearity of the *I-V* curve deviates in the high voltage region. This type of *I-V* relation with two different linear parts in the forward bias region is explained with “two parallel diode model” in literature and the current mechanism in the MIS and MS type diodes is defined by utilizing the thermionic emission (TE) theory ( $V \geq 3kT/q$  where  $k$  is Boltzmann constant,  $T$  is temperature and  $q$  is electric charge) (Bohlin, 1986).

As shown in Figure 1, due to the two linear regions the “two-parallel diode model” can be recalled and the double exponential current equation with different barrier heights (BH) and resistances is written as follows (Demirezen et al., 2013; Guclu et al., 2016):

$$I = I_{01} \left[ \exp\left(\frac{q(V-IR_s)}{n_1 kT}\right) - 1 \right] + I_{02} \left[ \exp\left(\frac{q(V-IR_s)}{n_2 kT}\right) - 1 \right] + \frac{(V-IR_s)}{R_{sh}} \quad (1)$$

Here  $I_{01}$  and  $I_{02}$  are the reverse saturation currents,  $n_1$  and  $n_2$  are the ideality factors for the low and moderate voltages and last term is the leakage current at very low voltages ( $\leq 3kT/q$ ).  $\Phi_{B_0}$  and  $n(V)$  can be calculated for the two linear parts of  $\ln I-V$  graph by the use of the following relations (Card, Rhoderick, 1971; Sze, 1981):

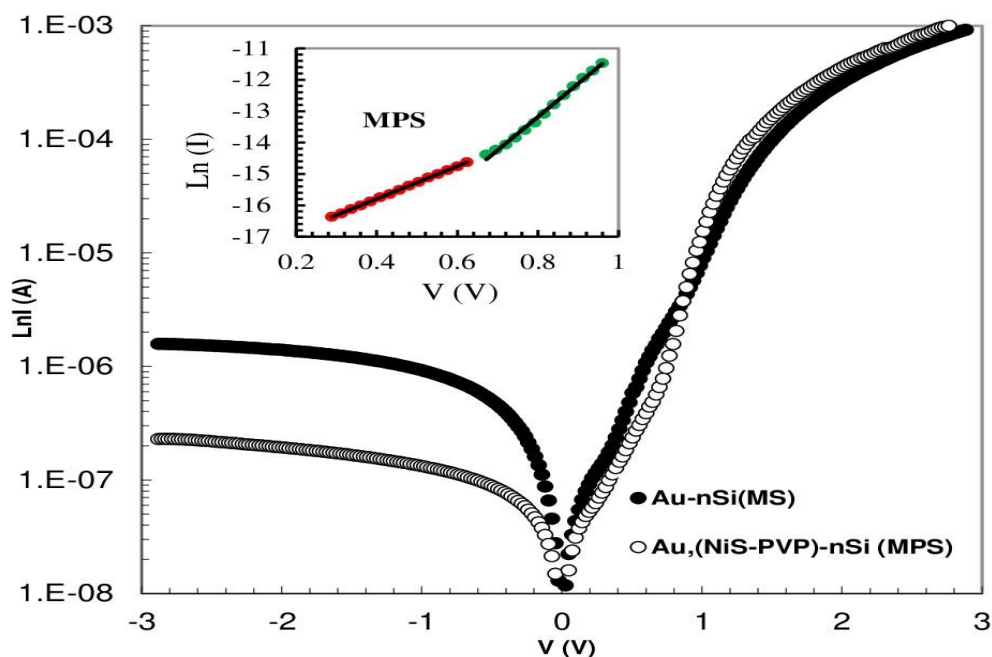
$$I_0 = AA^*T^2 \exp\left(-\frac{q\Phi_{B_0}}{kT}\right) \quad (2a)$$

$$\Phi_{B_0} = \frac{kT}{q} \ln\left(\frac{AA^*T^2}{I_0}\right) \quad (2b)$$

$$n(V) = \frac{q}{kT} \left( \frac{dV}{d(\ln I)} \right) = 1 + \frac{\delta}{\epsilon_i} \left[ \frac{\epsilon_s}{W_D} + qN_{ss}(V) \right] \quad (3)$$

In Equation (2a), (2b) and (3),  $A$  is  $7.85 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ ,  $A^*$  is the Richardson constant ( $112 \text{ Acm}^{-2}\text{K}^{-2}$  for n-Si). Thus, the main electrical parameters ( $I_0$ ,  $n$ ,  $\Phi_{B_0}$ ) of SBD were calculated as  $1.20 \times 10^{-8} \text{ A}$ , 7.23, and 0.683 eV for low bias region and  $3.20 \times 10^{-9} \text{ A}$ , 4.23 and 0.732 eV for moderate bias region, respectively. The ideal value of  $n$  which indicates conformity to TE theory and values higher than the ideal value for the two linear region of  $\ln I-V$  plot indicate deviation from TE theory. Such higher values of  $n$  are ascribed by the existence of (NiS-PVP) polymer interlayer,  $N_{ss}$  and inhomogeneities of the barrier between semiconductor and metal (Guttler and Werner, 1990; Schmitsdorf et al., 1995; Hudait et al., 2001; Orak and Kocyigit, 2016; Alptekin and Altindal, 2019). The high value of  $n$  usually stems from the existence of interfacial layer, its thickness ( $d_i$ ), homogeneity and permittivity ( $\epsilon_i$ ), barrier inhomogeneity at M/S interface,  $N_{ss}$ , and doping concentration atoms in semiconductor or depletion layer width ( $W_d$ ) as given in Equation (3). The tunneling through the barrier via surface states or dislocations, recombination-generation, and image-force lowering also affect the ideality factor and the conduction mechanism (CM) (Card and Rhoderick, 1971; Sze, 1981).

Both the forward and the reverse bias semi-logarithmic  $I-V$  plots for both the Au/n-Si (MS) and Au/(NiS-PVP)/n-Si/Au devices were drawn and given in Figure 1 to see the effects of (NiS-PVP) polymer interlayer on the  $I-V$  characteristics. As can be seen in Figure 1, RR at  $\pm 3\text{V}$  for the MPS structure is almost 10 times higher than the MS structure. In addition, while the forward bias semi-logarithmic  $I-V$  plot has only one linear region for MS structure, this plot for MPS structure has two distinctive linear regions with different slopes. In other words, such two linear behaviours for MPS structure are called as double exponential model or two-parallel diodes model with different  $R_s$  and  $\Phi_{B_0}$ . As it is also seen in Figure 1, (NiS-PVP) interfacial polymer layer leads to a decrease in reverse current at about 10 times when compared with the MS structure. All these results show that the used (NiS-PVP) polymer interlayer leads to improve the performance of MS and hence, can successfully be used instead of conventional  $\text{SiO}_2$  interlayer due to its low cost, easy preparation processes, flexibility and high dielectric/mechanical strength.



**Figure 1.** The  $\ln I-V$  plot of the Au/n-Si (MS) and Au/(NiS-PVP)/n-Si (MPS) SBDs at room temperature. Inset shows the linear fits of the low and moderate voltage region

$R_s$  and  $R_{sh}$  are more effective on the electrical characteristics, so they can cause serious errors in the calculations. The existence of  $R_s$  leads to serious error in the extraction of basic electrical parameters and conduction mechanisms of the MS structure with and without an interfacial layer. Usually,  $R_s$  can arise from four different sources: (i) the contact made by the probe wire to the rectifier contact; (ii) the back ohmic contact to the semiconductor; (iii) the resistance of the bulk semiconductor; (iv) inhomogeneous doping concentration of donor or acceptor atoms in the semiconductor (Nicollian and Brews, 1982). Therefore, the resistance of the diode structure ( $R_i$ ) with respect to varying voltage is plotted with respect to Ohm's Law ( $R_i = dV_i/dI_i$ ) and is given in Figure 2. The value of  $R_i$  proceeds constant both in the enough high forward and reverse bias region, shown in Figure 2. Therefore, the real value of  $R_s$  and  $R_{sh}$  for the MPS type SBD correspond to high forward and high reverse bias regions and they are found as 0.6 kΩ and 13 MΩ for (± 3V), respectively. RR of the diode is calculated at about  $10^4$ , which is a satisfactory rectifier property. All these obtained experimental electrical parameters from the  $I$ - $V$  characteristics ( $I_0$ ,  $n$ ,  $\Phi_{B_0}$ ,  $R_s$  and  $R_{sh}$ ) are also tabulated in Table 1.

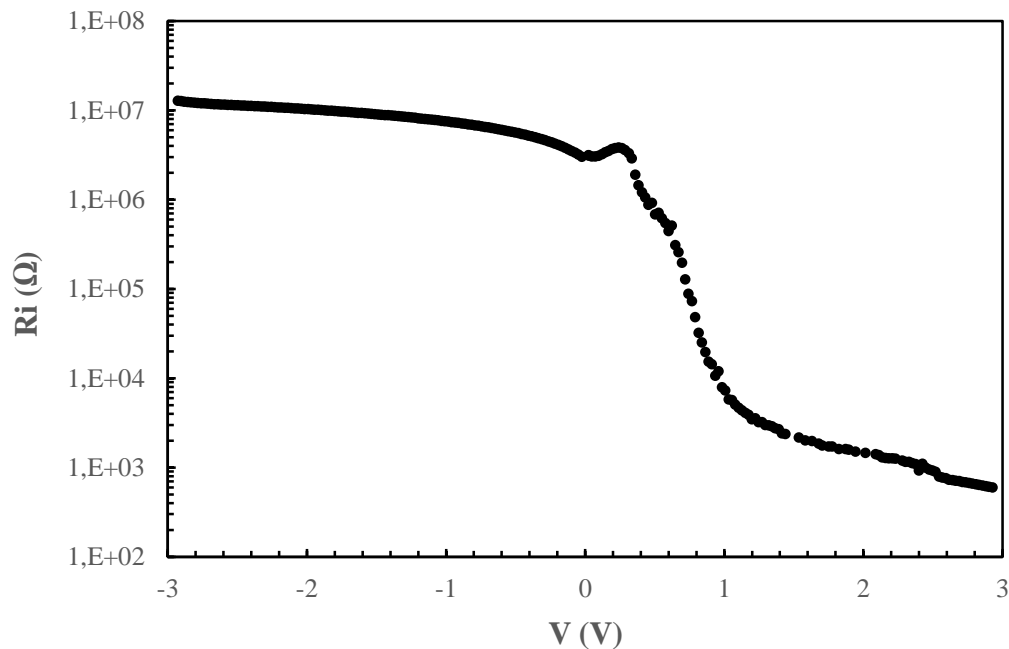


Figure 2. The  $R_i$ - $V$  plot of the Au/(NiS-PVP)/n-Si (MPS) SBD at room temperature.

Table 1. The obtained some main experimental electrical parameters of the Au/(NiS-PVP)/n-Si (MPS) SBD from the  $I$ - $V$  data at room temperature.

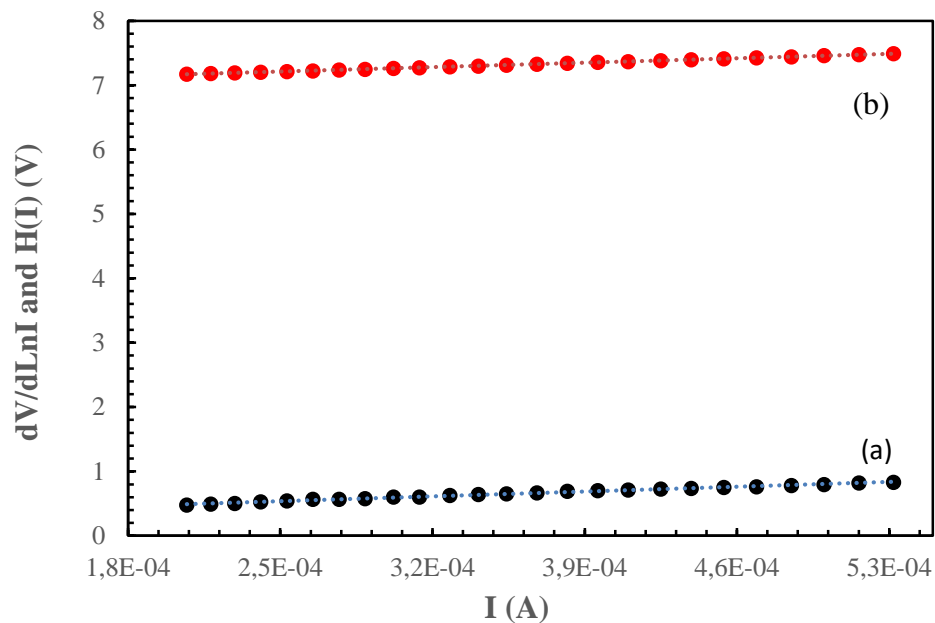
| Voltage Region | $I_0$ (A)             | $n$  | $\Phi_{B_0}$ (eV) | $R_s$ (at 3V) (kΩ) | $R_{sh}$ (at -3V) (MΩ) | Mean value of $N_{ss}$ ( $eV^{-1}cm^{-2}$ ) |
|----------------|-----------------------|------|-------------------|--------------------|------------------------|---|
| Low            | $1.20 \times 10^{-8}$ | 7.23 | 0.683             | 0.60               | 13.0                   | $7.0 \times 10^{12}$                        |
| Moderate       | $3.20 \times 10^{-9}$ | 4.23 | 0.732             |                    |                        |   |

In addition, values of the basic electrical parameters ( $R_s$ ,  $n$  and  $\Phi_B$ ) of the diode can be obtained from the Cheung functions as another way by using the equations (Cheung and Cheung, 1986):

$$\frac{dV}{d(\ln I)} = IR_s + \left(\frac{nkT}{q}\right) \tag{4a}$$

$$H(I) = V - \frac{nkT}{q} \ln\left(\frac{I}{AA^*T^2}\right) = IR_s + n\Phi_{B_0} \quad (4b)$$

The  $dV/d\ln(I)$  and  $H(I)$  versus current plots were calculated from Equation (4a) and (4b), respectively, and represented in Figure 3. As can be clearly seen in Figure 3 (a) and (b), both the  $dV/d\ln(I)$  vs  $I$  and  $H(I)$  vs  $I$  plots have a good linear representation in the enough high forward bias voltage which corresponds to concave curvature of the  $\ln I$  vs  $V$  plot. Firstly, the value of  $R_s$  is found from the slope of  $dV/d\ln(I)$  vs  $I$  and  $H(I)$  vs  $I$  plots in the same current range as  $1.063 \text{ k}\Omega$  and  $0.989 \text{ k}\Omega$ , respectively and these values are closer to the values obtained from Ohm's Law at room temperature. The value of ideality factor is found as 10.92 from the intercept of  $dV/d\ln(I)$  vs  $I$  plot using Equation (4a). Thus, by using this value of  $n$ ,  $\Phi_B$  is found 0.64 eV from the intercept of  $H(I)$  vs  $I$  graph by using Equation (4b). The observed discrepancies in the calculated basic electrical parameters ( $R_s$ ,  $n$ ,  $\Phi_B$ ) are attributed to the calculation method that corresponds to different voltage range (Bohlin, 1986; Cheung and Cheung, 1986; Tataroglu, 2013).

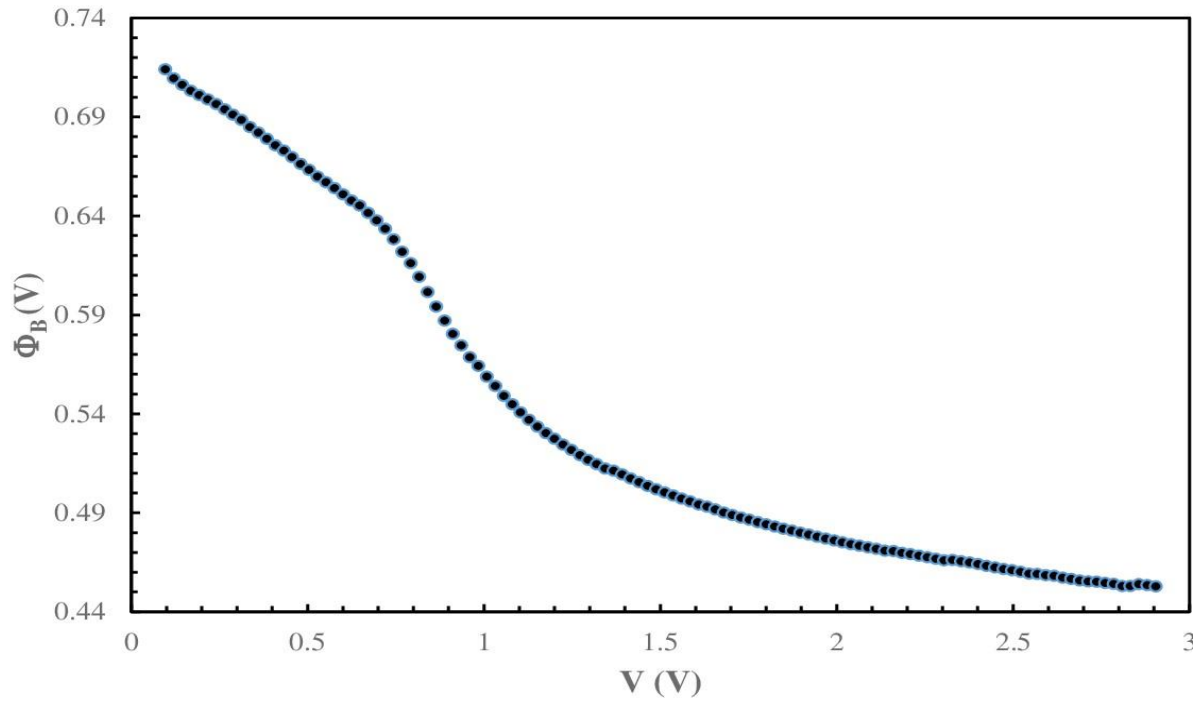


**Figure 3.** The  $dV/d\ln I$  (a) and  $H(I)$  (b) vs  $I$  plots for Au/(NiS-PVP)/n-Si (MPS) SBD at room temperature

The effect of voltage on the basic electrical parameters of SBDs is very important to detect the working capacity of the device. Therefore, the value of  $\Phi_B$  (V) is also obtained as a function of forward bias  $I$ - $V$  data except  $\Phi_{B_0}$  and is given in Figure 4. As can be seen in Figure 4, the value of the BH decreases with increasing applied bias voltage and it is changed from 0.714 eV at 0.1V to 0.450 eV at 3 V, due to the effect of image force-lowering,  $R_s$  of the SBD and interfacial polymer layer. The effect of  $R_s$  and interfacial layer is considerably so high that the applied bias voltage is degraded by the depletion layer.

Many surface states and dislocations may be occurred with energies located in the forbidden bandgap of semiconductor ( $E_g$ ) at layer/semiconductor interface, even though the diodes are fabricated in clean condition and they can considerably affect the performance of the devices. These states or traps are usually originated from defects such as dangling bonds in the interlayer/semiconductor interface with

energy states in the band gap ( $E_g$ ), unsaturated dangling bonds, some contaminating organic impurities in the laboratory environment and the chemical composition of the interface.



**Figure 4.** The voltage dependent barrier height of the Au/(NiS-PVP)/n-Si (MPS) SBD at room temperature

The energies of these states are usually in equilibrium with the semiconductor band structure rather than the metal when the interfacial layer thickness is higher than at about  $\sim 3$  nm (Card and Rhoderick, 1971). These states are effective on the electrical parameters; thus,  $N_{ss}$  vs  $(E_c - E_{ss})$  profile is obtained by the use of  $\Phi_B$  (V) and  $n$  at room temperature and is given in Figure 5 by using the following relations (Card and Rhoderick, 1971; Sze, 1981; Rhoderick and Williams, 1988; Tung, 2001; Tataroglu, 2013), where  $E_c$  and  $E_{ss}$  are the energies of the conduction band and the surface states, respectively:

$$n(V) = \frac{qV_d}{kT \ln(I/I_0)} \quad (5a)$$

$$E_c - E_{ss} = q(\Phi_e - V_i) \quad (5b)$$

$$\Phi_e - \Phi_{B_0} = \left(1 - \frac{1}{n(V)}\right) V \quad (5c)$$

$$N_{ss} = \frac{\epsilon_0}{q} \left\{ \frac{\epsilon_i}{d} [n(V) - 1] - \frac{\epsilon_s}{W_D} \right\} \quad (6)$$

In Equation (6),  $d$  is the interfacial polymer layer thickness,  $W_D$  is the depletion layer width,  $\epsilon_i$ ,  $\epsilon_s$  and  $\epsilon_0$  are dielectric values of the polymer interlayer, the semiconductor and the vacuum, respectively.

In Figure 5, the energy dependent profile of  $N_{ss}$  behaves like U-shape and the indicates that  $N_{ss}$  starts to increase from the center of the bandgap of Si to the bottom of the conduction band. The mean value of  $N_{ss}$  is found as  $7.0 \times 10^{12} \text{ eV}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  and they are considerably acceptable for the MPS type

structure. As a result, it can be said that the used (NiS-PVP) polymer interface between Au and n-Si wafer leads to an increase in the performance of MS. The investigation of interfacial layer effects on the electrical and performance of the MS structures were also investigated in very recently and they also obtained similar results (Orak and Kocyigit, 2016; Uluhan et al., 2019; Tataroglu et al., 2020; Eroglu et al., 2020).

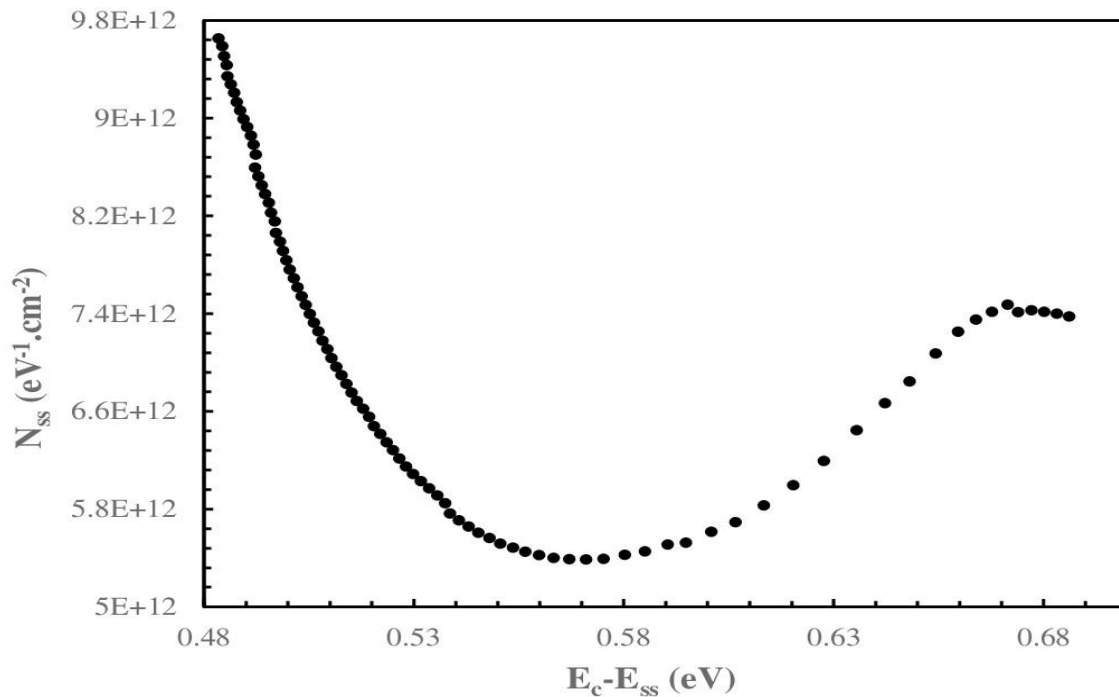


Figure 5. The energy dependent profile of  $N_{ss}$  for Au/(NiS-PVP)/n-Si (MPS) SBD at room temperature

## CONCLUSION

Au/n-Si (NiS doped-PVP) SBD with polymer interlayer grown by electrospinning technique is used to determine the effects of interfacial layer and bias voltage on the electrical characteristics. Main electrical parameters ( $I_0$ ,  $\Phi_{B_0}$ ,  $RR$ ,  $n$ ,  $R_s$  and  $R_{sh}$ ) are obtained at room temperature by using forward and reverse bias  $I$ - $V$  characteristics in the voltage range of ( $\pm 3V$ ). The forward bias  $\ln I$ - $V$  plot of the MPS type SBD represents a good rectifier behaviour and it has two linear regimes with different slopes between ( $0.288 \leq V \leq 0.625$  V) and ( $0.672 \leq V \leq 0.960V$ ) bias voltages. But it deviates from linearity because of  $R_s$  and interfacial polymer layer at enough high bias voltages ( $V \geq 1$  V).  $N_{ss}$  vs ( $E_c - E_{ss}$ ) profile is obtained by the use of  $\Phi_B$  and  $n$ . The mean value of  $N_{ss}$  is calculated as  $7 \times 10^{12}$  eV $^{-1}$ cm $^{-2}$ . Moreover, such lower values of  $N_{ss}$  can be attributed to the passivation effect on the surface states. The obtained experimental results indicate that  $R_s$  and  $N_{ss}$ , interfacial layer and bias voltage are very effective on the electrical behaviour of the device, which must be taken into consideration in the calculations to get more precise and reliable results on electrical features and conduction mechanisms.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research is supported by Gazi University Scientific Research Project. (Project Number: GU-BAP.05/2019-26).

## Conflict of Interest

I declare that there is no conflict of interest during the planning, execution and writing of the article.



### Author's Contributions

I hereby declare that the planning, execution and writing of the article was done by me as the sole author of the article.

### REFERENCES

- Akhlaghi EA, Badali Y, Altindal S, Azizian-Kalandaragh Y, 2018. Preparation of mixed Copper/PVA nanocomposites as an interface layer for fabrication of Al/Cu-PVA/p-Si Schottky structures. *Physica B-Condensed Matter*, 546: 93-98.
- Alptekin S, Altindal S, 2019. Comparative study on current/capacitance: Voltage characteristics of Au/n-Si (MS) structures with and without PVP interlayer. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 30: 6491-6499.
- Altindal Yeriskin S, Balbaşı M, Orak I, 2017. The effects of (graphene doped-PVA) interlayer on the determinative electrical parameters of the Au/n-Si (MS) structures at room temperature. *Journal of Material Science: Material Electronics*, 28: 14040–14048.
- Altindal Yerişkin S, 2019. The investiagtion of effects of (Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-PVP) organic interlayer, surface states, and series resistance on the electrical characteristics and sources of them. *Journal of Materials Science Materials in Electronics*, 30: 17032-17039.
- Badali Y, Nikravan A, Altindal S, Uslu I, 2018. Effects of a thin Ru-doped PVP interface layer on electrical behaviour of Ag/n-Si structures. *Journal of Electronic Materials*, 47: 3510-3520.
- Bohlin KE, 1986. Generalized Norde plot including determination of the ideality factor. *Journal of Applied Physics*, 60: 1223.
- Card HC, Rhoderick EH, 1971. Studies of tunnel MOS diodes I. Interface effects in silicon Schottky diodes. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 4: 1589–1601.
- Cheung SK, Cheung NW, 1986. Extraction of Schottky diode parameters from forward current-voltage characteristics. *Applied Physics Letters*, 49: 85.
- Demirezen S, Altindal S, Uslu I, 2013. Two diodes model and illumination effect on the forward and reverse bias I-V and C-V characteristics of Au/(PVA)(Bi-doped)/n-Si photodiode at room temperature. *Current Applied Physics*, 13: 53-59.
- Eroglu A, Demirezen S, Kalandaragh YA, Altindal S, 2020. A comparative study on the electrical properties and conduction mechanisms of Au/n-Si Schottky diodes with/without an organic interlayer. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* 31: 14466-14477.
- Guçlu CS, Ozdemir AF, Altindal S, 2016. Double exponential I–V characteristics and double gaussian distribution of barrier heights in (Au/Ti)/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/n-GaAs (MIS)-type Schottky barrier diodes in wide temperature range. *Applied Physics A*, 122: 1032.
- Guttler HH, Werner JH, 1990. Influence of barrier inhomogeneities on noise at Schottky contacts. *Applied Physics Letters*, 56: 1113-1115.
- Hudait MK, Venkateswarlu KP, Krupanidhi SB, 2001. Electrical transport characteristics of Au/n-GaAs Schottky diodes on n-Ge at low temperatures. *Solid-State Electronics*, 45: 133-141.
- Kaya A, Alialy S, Demirezen S, Balbaşı M, Altindal Yerişkin S, Aytimur A, 2016. The investigation of dielectric properties and ac conductivity of Au/GO-doped PrBaCoO nanoceramic/n-Si capacitors using impedance spectroscopy method. *Ceramics International*, 42: 3322-3329.
- Lee JS, Choi KH, Ghim HD, Kim SS, Chun DH, Kim HY, Lyoo WS, 2004. Role of molecular weight of atactic poly(vinyl alcohol) (PVA) in the structure and properties of PVA nanofabric prepared by electrospinning, *Journal of Applied Polymer Science*. 93: 1638-1646.

- Nicollian EH, Brews JR, 1982. MOS (Metal Oxide Semiconductor) Physics and Technology, Wiley, New York.
- Orak I, Kocyigit A, 2016. The electrical characterization effect of insulator layer between semiconductor and metal. *Igdir University Journal of the Institute of Science and Technology*, 6: 57-67.
- Rhoderick EH, Williams RH, 1988. *Metal Semiconductor Contacts*. Second Edition, Oxford. 257-267.
- Schmitsdorf RF, Kampen TU, Monch W, 1995. Correlation between barrier height and interface structure of Ag/ Si (111) Schottky diodes. *Surface Science*, 324: 249-256.
- Sze SM, 1981. *Physics of Semiconductor Devices*. Second Edition, New York, 362-380.
- Tataroglu A, 2013. Comparative study of the electrical properties of Au/n-Si (MS) and Au/Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/n-Si (MIS) Schottky diodes. *Chinese Physics B*, 22: 068402.
- Tataroglu A, Altindal S, Kalandaragh YA, 2020. Comparison of electrical properties of MS and MPS type diodes in respect of (In<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVP) interlayer. *Physica B*, 576: 411733.
- Tung RT, 2001. Formation of an electric dipole at metal-semiconductor interfaces. *Physical Review B*, 64: 205310.
- Tung RT, 2001. Recent advances in Schottky barrier concepts. *Material Science and Engineering R-Reports*, 35: 1.
- Ulusan AB, Tascioglu İ, Tataroglu A, Yakuphanoglu F, Altindal S, 2019. A comparative study on the electrical and dielectric properties of Al/Cd-doped ZnO/p-Si structures. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 30: 12122-12129.

**Atf İçin:** Candan İ, 2021. Hidrojen Moleküllerinin  $v = 1$  Durumuna Raman Uyarılması. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1068-1079.

**To Cite:** Candan I, 2021. Raman Excitation of Hydrogen Molecules to  $v = 1$  State. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1068-1079.

## Raman Excitation of Hydrogen Molecules to $v = 1$ State

İlhan CANDAN<sup>1\*</sup>

**ABSTRACT:** Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) can reveal a molecule's vibrational spectrum to a great extent. Instantaneous interaction of Stokes and pump beams stemming from powerful pulsed lasers excites a molecule's vibrational modes in CARS. In this technique, combining two visible laser beams could create spectra resonances relating to vibrational transitions. In this work, Raman excitation of Hydrogen molecules to  $v = 1$  state is achieved by CARS spectroscopy. CARS measurements are successfully carried out for H<sub>2</sub> S-branch and Q-branch transitions using our laser system. This measurement proves the feasibility of CARS experiment which could be employed to excite molecules to a specific rovibrational state. Moreover, experiments conducted for CARS signal with respect to various gas pressures differing between 200 and 600 torr for S-branch transition of H<sub>2</sub> molecule.

**Keywords:** H<sub>2</sub>, Coherent anti Stokes Raman scattering, S-branch, Q-branch

<sup>1</sup> İlhan CANDAN ([Orcid ID: 0000-0001-9489-5324](https://orcid.org/0000-0001-9489-5324)), Dicle Üniversitesi, Fen Fakültesi, Fizik Bölümü, Diyarbakır, Türkiye

**\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** İlhan CANDAN, e-mail: ilhan.candan@dicle.edu.tr

Bu çalışma İlhan CANDAN'nın Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir. Makale 14-17 Kasım 2018 tarihlerinde Diyarbakır'da düzenlenen "The 3rd International Engineering and Natural Sciences Conference 2018 (IENSC 2018)" kongresinde sözlü olarak sunulmuştur.

## INTRODUCTION

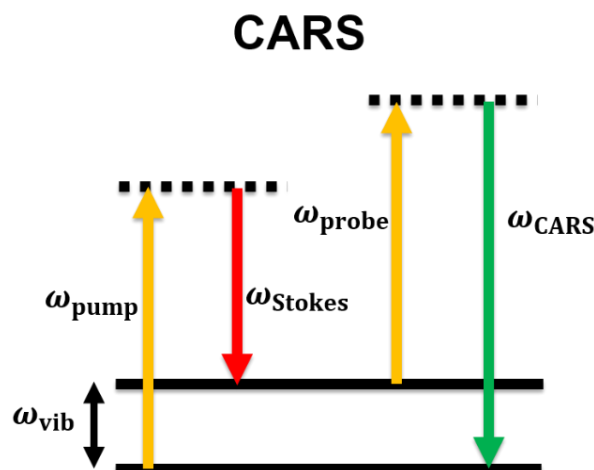
Terhune and Maker first observed coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS)(Maker & Terhune, 1965; Terhune & Maker, 1963). Non-linear Raman processes is one of such spectroscopic technique which has been feasible with employment of lasers. Spontaneous Raman (Anderson, 1971; Buric et al, 2009; Farahani & Gogolla, 1999; Tang et al, 2020), Resonance Raman(Kiefer & Bernstein, 1972; Liu et al, 2013; Saito et al, 2003; Xie et al, 2009), Inverse Raman(Takaya et al, 2019; Yeung, 1974), Hyper Raman scattering(Babenko et al, 2020; Madzharova et al, 2017; Verdieck et al, 1970; Zhu et al, 2018) and Raman-induced Kerr effect(Ando et al, 2020; Heiman et al, 1976; Kakinuma & Shirota, 2018) are amongst various examples of Raman processes. CARS is a very effective non-linear spectroscopic technique that has been used in various applications such as temperature and concentration measurements, molecular relaxation processes, gas-phase and plasma diagnostics and femtosecond chemistry(El-Diasty, 2011; Lempert & Adamovich, 2014; Tolles et al, 1977; Zheltikov, 2000). CARS spectroscopy has been a common means of detection for modern optical experiments and comprehensively mentioned in literature(Christensen et al, 2019; Eckbreth, 1996; Eesley, 2013; Harvey & Nibler, 1978; Jiang et al, 2020; Kifer, 1980; Short et al, 2015; Yan et al, 2018; Yang et al, 2018).

CARS is very promising for its potential to obtain analytical and spectroscopic knowledge relating to Raman active resonances in matter including gas, liquid and solid(Jones et al, 2019; Kushwaha et al, 2018; Portnov et al, 2010). CARS is generally used in applications such as in chemistry, physics, and related fields to determine a structural fingerprint through which molecules can be identified. CARS is also employed for species selective microscopy and combustion diagnostics by exploiting the selectivity of vibrational modes(Cutler et al, 2018; Ehn et al, 2017; Goodhead et al, 2015; Zhang & Cheng, 2018). In this technique, combining two visible laser beams could create spectra resonances relating to vibrational transitions. CARS exhibits a third-order non-linear process. Compared to second-order non-linear effect, it can be applied to both an isotropic and a non-centrosymmetric medium. Additionally, it has a conversion efficiency for coherently producing photons that are significantly greater than spontaneous Raman scattering (CARS can achieve  $10^5$  increase in efficiency of conversion (Begley et al, 1974)). That is a very practical tool to obtain luminescent samples' spectra such as electric discharges, impurities, fluorescent materials and combustion systems as well as some solutes(Butler et al, 2016; Dedic et al, 2017; Sarri et al, 2019; Teramoto & Ono, 2014; Tolles et al, 1977). Because of advantages mentioned above, in this paper, we employ CARS technique for experimentally determining the pump wavelength that will be used in the Stimulated Raman Pumping (SRP) scheme(Candan, 2016).

In CARS, two laser fields with  $\omega_1$  and  $\omega_2$  frequencies mix in a medium in order to produce a non-linear polarisation that oscillates at  $2\omega_1 - \omega_2$  frequency since it is an optical phenomenon that is coherent and third order non-linear process. This is resonantly enhanced when  $\omega_1 - \omega_2$  frequency difference coincides with a Raman active transition in the active sample as displayed in Figure 1.  $\omega_1$  and  $\omega_2$  are corresponding to  $\omega_{\text{pump}}$  and  $\omega_{\text{Stokes}}$  fields, respectively. The resulting field produced at  $2\omega_1 - \omega_2$  required to match in phase with non-linear polarisation produced by pump field in  $\omega_1$  and  $\omega_2$  frequencies. This process is described according to following expression:

$$2k(\omega_1) - k(\omega_2) = k(2\omega_1 - \omega_2). \quad (1)$$

The wave vector mismatch  $\Delta k$  becomes finite because of material dispersion(Ochkin, 2009; Regnier et al, 1974). Additionally, dispersion rate in dilute gases becomes very low. The rotation-vibration resonances' coherence length in Hydrogen molecule happens to be  $\approx 10$  cm for a collinear geometry(Regnier et al, 1974).



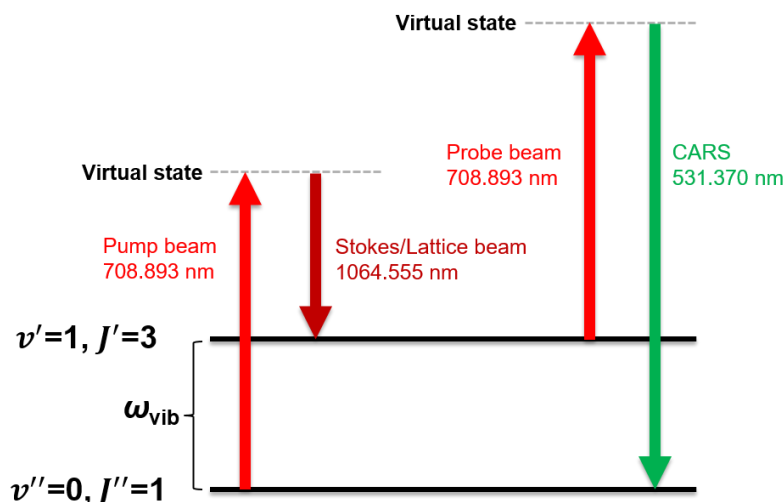
**Figure 1.** Energy levels of CARS is demonstrated. This process is a coherent and non-linear optical phenomenon of third order where  $\omega_{\text{pump}}$  and  $\omega_{\text{Stokes}}$  combine through a medium to produce a signal with frequency of  $2\omega_{\text{pump}} - \omega_{\text{Stokes}}$ . The resultant signal is resonantly improved once  $\omega_{\text{pump}} - \omega_{\text{Stokes}}$  coincide with vibrational constant of energy levels.

The CARS process needs two high-powered (commonly pulsed) laser fields that have  $\omega_p$  and  $\omega_s$  frequencies which are tightly focused into sample. Therefore, owing to non-linear mixing of two laser beams, an output beam is generated in the medium that is coherent and similar to a moderate intensity laser beam at frequency  $\omega_{\text{as}} = 2\omega_p - \omega_s$ . The efficiency rate of frequency  $\omega_{\text{as}}$  strongly depends on the present molecular resonances at a frequency difference that equals to  $\omega_p - \omega_s$ , the laser power, the number density of species and the resonance line width (Kliwer et al, 2012; Tolles et al, 1977).

### CARS wavelength calculation

In the Raman Spectrum, vibrations and rotations of molecules are in visible range. Molecules including  $\text{H}_2$ ,  $\text{N}_2$  or  $\text{O}_2$  can be studied only with Raman spectroscopy as their rotations and vibrations happens to be infra-red inactive. Raman active molecules needs to follow rules of selection for Raman spectrum. Raman spectroscopy happens to be two-photon phenomenon. For vibrational transitions, the selection rules follow  $\Delta v = \pm 1$  in the Raman spectrum, in which Stokes transitions are corresponding to  $\Delta v = +1$ , and anti-Stokes transitions to  $\Delta v = -1$ . Moreover, that obey  $\Delta J = 0, \pm 2$  for the rotational transitions in which the S-branch, Q-branch and O-branch transitions are labelled as  $\Delta J = +2$ ,  $\Delta J = 0$  and  $\Delta J = -2$ , respectively.

In this paper, wavelength of CARS is determined in  $\text{H}_2$ . For calculating CARS wavelength in  $\text{H}_2$ , S-branch transition is selected. This occurs from  $v'' = 0, J'' = 1$  to  $v' = 1, J' = 3$ .  $v'' = 0, J'' = 1$  quantum state is selected since at the room temperature it is the most populated state. For this particular transition, vibrational constant ( $\omega_{\text{vib}}$ ) is equal to  $4712.91 \text{ cm}^{-1}(\bar{\nu}_v)$  (Dabrowski, 1984; Turner et al, 1977). In our calculations, the wavenumber units are employed in terms of frequency. Initially, we established the Stokes laser (IR laser) wavelength. Therefore, the wavelength of Stokes line is determined to be at 1064.555 nm. Utilizing expression of  $\bar{\nu}_p = \bar{\nu}_v + \bar{\nu}_s$ , in which  $\nu_v$  and  $\nu_s$  are assigned to pump and Stokes wavenumbers, respectively. After that,  $\bar{\nu}_p = 14106.51 \text{ cm}^{-1}$  could be determined. Next, wavelength of CARS could be determined using  $\bar{\nu}_{\text{cars}} = \bar{\nu}_v + \bar{\nu}_p$  expression. Thus, that enable us to calculate  $\bar{\nu}_{\text{cars}} = 18819.42 \text{ cm}^{-1}$  as illustrated in Figure 2.



**Figure 2.** Figure shows CARS process in  $H_2$  molecules. 708.893 nm pump beam stimulates the  $H_2$  at  $v'' = 0$ ,  $J'' = 1$  to another level (virtual). After that, 1064.555 nm Stokes beam instantaneously brings the molecule down to a rovibrationally excited state of  $v' = 1$ ,  $J' = 3$ . Next, 708.893 nm probe beam excites it to another nonreal state once more. Finally, because it does not remain in this nonreal state, the molecule spontaneously must deexcite to the ground state together with releasing 531.370 nm CARS photon.

Moreover, wavelength of CARS signal is determined for Hydrogen molecule's Q-branch transition that stems from  $v'' = 0$ ,  $J'' = 1$  level and reaches to  $v' = 1$ ,  $J' = 1$ . Scattering rate is related to polarisability tensor of the transition squared (Eckbreth, 1996). Scattering intensity of Q-branch is greater than S-branch because the scattering intensity is related to the Placzek-Teller coefficients of each transition. Therefore, Q-branch transition's CARS signal is much higher compared to S-branch. Vibrational constant equals to  $4155.25 \text{ cm}^{-1}$  for this transition and the corresponding wavelengths are determined. Thus, if we apply 1064.555 nm Stokes beam, then 738.07 nm resulting pump beam can be determined. Therefore, 564.84 nm CARS signal occurs in the measurement.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental setup

In order to conduct CARS experiment, two laser beams need to be employed. Pump and Stokes beam are generated using a dye laser (Continuum, ND6000, USA) and custom-made laser (Continuum, USA), respectively. For realizing the experiment, we need to both spatially and temporally coincide these two beams in a  $H_2$  containing glass cell.

### Laser system

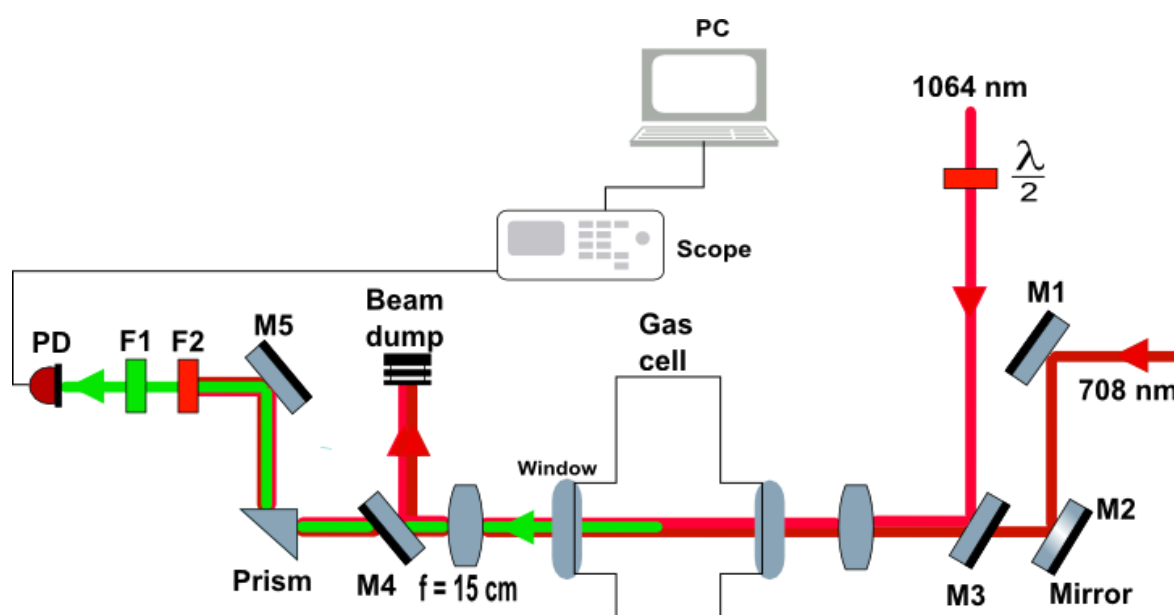
#### Dye laser

Dye laser is used to produce pump beam in the experiment. This laser is injected using pulsed laser comprising Nd:YAG crystal as gain medium (Quanta-Ray Pro-series, Spectra-Physics) that contains 532 nm frequency doubled output and has a repetition rate of 10 Hz. In order to produce the necessary tunable output of the dye laser (700 to 740 nm wavelength range), 114  $\text{mg L}^{-1}$  and 20  $\text{mg L}^{-1}$  dye solution of LDS 750 in methanol were employed for oscillator and amplifier, respectively. Thus, necessary tunable 719 nm output was generated.

#### IR laser (Custom-built)

IR laser beam is employed to be Stokes beam in the experiment. For optical Stark acceleration/deceleration, a high-energy, chirped laser has explicitly constructed and built at UCL (Coppendale et al, 2011; Maher-McWilliams et al, 2012). The laser system consists of two pulsed

outputs. It is primarily originated in a laser of 1064 nm Nd:YVO<sub>4</sub> microchip which could quickly tune the frequency using a cavity containing an electro-optic crystal. A laser diode is injection-locked the output and a fibre amplifier is used to magnifies the output to 1 W power. Next, the resultant beam is splitted into separate pulses employing pulse shaper. Later, generated pulses are separated and then connected to separate fibres in which one of them is 55 m longer compared to other one. The resultant difference in path generates 275 ns time delay. Once the microchip laser is being chirped, that produces a frequency variation which is well-defined. After exiting fibres, two pulses are magnified using different flash lamp stages and high intensities are produced using pulsed Nd:YAG amplifiers. Such laser system can produce two high power beams that have flat-top temporal shapes. In this system, the frequency change can be chirped by 1.1 GHz during the pulse of 140 ns (Coppendale et al, 2011). Prior to the experiment, wavemetre (HighFinesse GmbH, WS-6, Germany) and Burleigh wavemetre (WA- 2000, USA) are employed to calibrate ND6000 and custom-built laser wavelength, respectively.



**Figure 3.** Experimental setup of CARS in H<sub>2</sub> molecule is demonstrated. 708.893 nm pump beam and 1064.555 nm Stokes beam are nearly co-propagating as well as being spatially and temporally intersected in a gas cell containing H<sub>2</sub>. The resultant green beam is displayed and identified employing a PD while filtering remaining pump and Stokes beams is achieved.

### Optical layout

Optical setup of CARS experiment is demonstrated in Figure 3. Experiment contains different laser beams that are nearly co-propagating. 1064 nm IR beam is utilized as Stokes beam. 708 nm dye laser beam is employed as pump beam. Because linearly polarising pump and Stokes beams are very important (Bartlett et al, 2008), a  $\lambda/2$  plate is positioned in path of Stokes beam for parallel polarization. Once two fields possess same polarisation, output signal could be significantly improved. 15 cm lens is used for focusing two collinear beams into gas cell. Following the intersection of beams being spatial and temporal overlapped, a green colour CARS signal is produced as illustrated in Figure 3. For separating the resultant beam, a few additional optics are utilized. Another 15 cm lens is employed for collimating the beams at the end of the gas cell. M4 mirror is installed following the collimating lens for filtering majority of the remaining pump and Stokes beam. Next, F1 and F2 are used filters for filtering the residual small part of beams. F2 blocks residual part of Stokes one while F1 merely allows produced beam of CARS signal. Finally, just CARS beam gets to the photodiode and the generated signal is delivered to the scope for detection before we automatically record it on PC.

## Alignment

### Spatial overlap

Because CARS experiment involves two nearly co-propagating laser beams, we need to spatially align these beams into a confocal point. In order to successfully overlap them, a specifically devised plate having a hole is mounted onto both collimating and focussing lens as illustrated in Figure 3. Initially, 1064 nm Stokes beam needs to be aligned via the holes on the plate using beam walking technique. When that is accomplished, 708 nm pump beam is passed via both holes by the beam walking. Following that, pin hole with a 50  $\mu\text{m}$  diameter is positioned on a movable stage at beam focus for ensuring the two beams are fully aligned at focal point. At first, 50  $\mu\text{m}$  hole is modified in which the Stokes beam focuses. Next, the pump beam is passed via the pin hole. As a result, two beams are spatially intersected.

### Temporal overlap

The temporal overlapping of the pulses is accomplished using different delay generators (Stanford Research Systems, Model DG535, USA). Two pulses are initiated employing 5 V output from IR laser through autonomously controlled delay generators. Generated pulses are uncovered using a photodiode and directed to oscilloscope (LeCoy, Wavepro 7300, USA) in which level of overlapping could be seen and controlled.

### Data acquisition

A photodiode is used to identify produced signal as illustrated in Figure 3. We first observed on scope and then it is being logged on computer. In the measurement, the signal is attained using the photodiode and all data points are averaged before being saved. The dye laser is scanned around the anticipated peak to obtain the data. Once signal is detected, the data attained on the oscilloscope are logged on PC. Prior to examining the pump laser for recording the signal, as illustrated in Figure 2, the projected pump beam's peak wavelength is determined and then, the resultant wavelength of CARS signal is established.

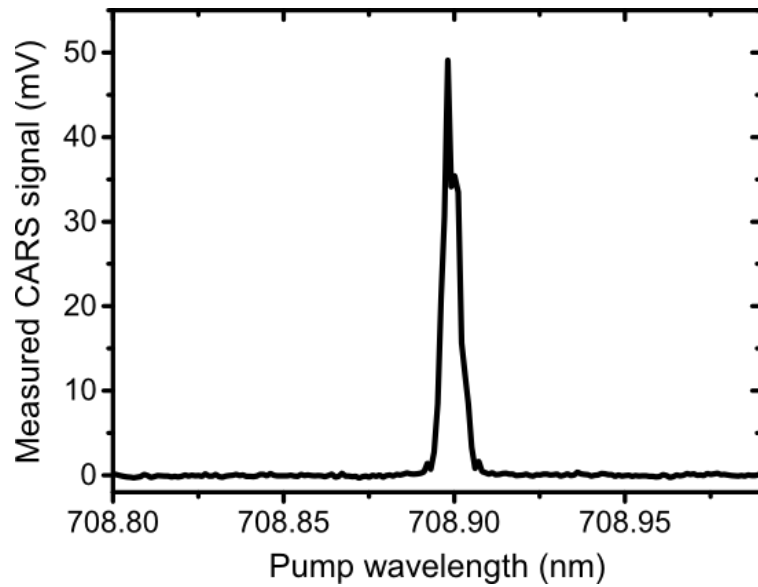
## RESULTS AND DISCUSSION

The parameters for experiment are needed to be optimized prior to carrying out the measurements. Firstly, dye laser and IR laser power outputs were improved to be adequately high in order to conduct the CARS experiment. The beam intensities are required to be roughly  $10^{10} \text{ W cm}^{-2}$  to accomplish the CARS measurement. Dye laser possessed  $5 \text{ mJ pulse}^{-1}$  output power and 10 ns pulse duration. Custom laser acquired  $70 \text{ mJ pulse}^{-1}$  output power and 140 ns pulse duration. The beam waist was evaluated to become 68  $\mu\text{m}$  for pump and 46  $\mu\text{m}$  for Stokes beam. Consequently, at focus, the pump and Stokes beam intensities were determined to be  $5 \times 10^9 \text{ W cm}^{-2}$  and  $1 \times 10^{10} \text{ W cm}^{-2}$ . Additionally, 10%  $\text{H}_2$  in Neon gas mixture was employed in the gas cell for carrying out the measurement.

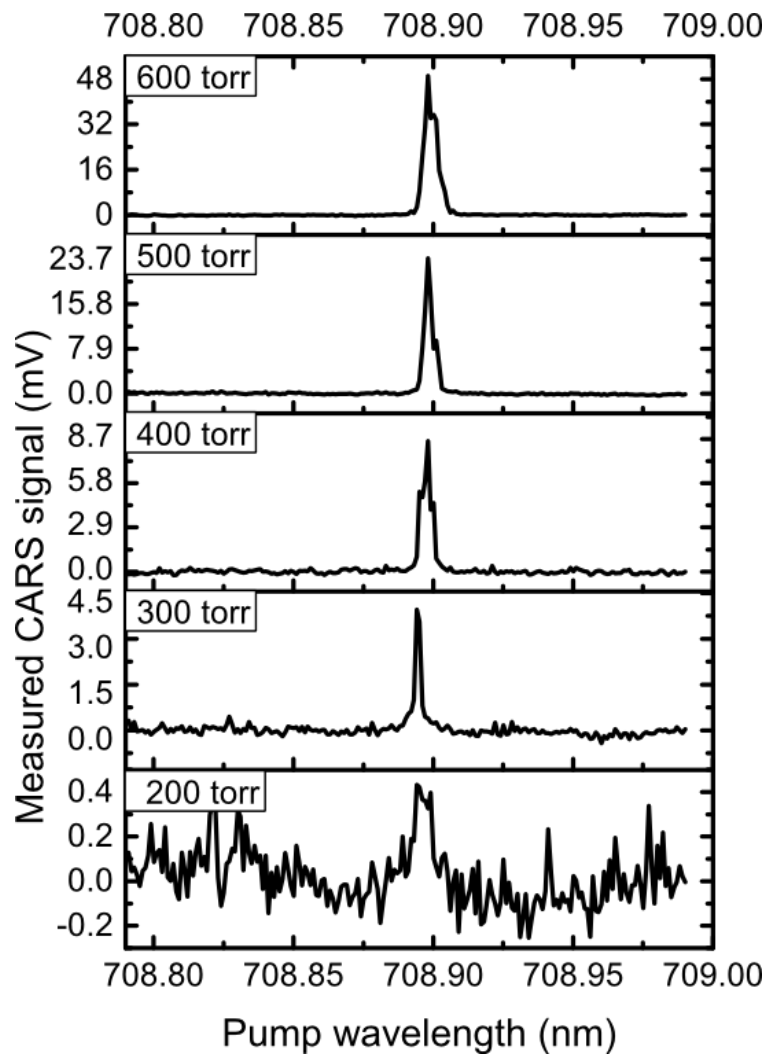
### Measured CARS signal

Initially S-branch transition in  $\text{H}_2$  was investigated for measuring the CARS signal. The obtained signal of the S-branch transition in  $\text{H}_2$  is demonstrated in Figure 4 at pressure of 600 torr. In this transition, the  $\text{H}_2$  molecules at  $v'' = 0, J'' = 1$  are promoted from to  $v' = 1, J' = 3$ . Between 708.800 and 709.000 nm, we scanned the pump laser in order to generate CARS signal meanwhile 1064.555 nm Stokes beam is being fixed. 0.005 nm step size was applied to dye laser during scanning stage for not skipping the resonant peak of the signal. 708.90 nm peak of CARS signal was obtained. Therefore, the resultant 531.370 nm CARS wavelength was measured which corresponds to green light.





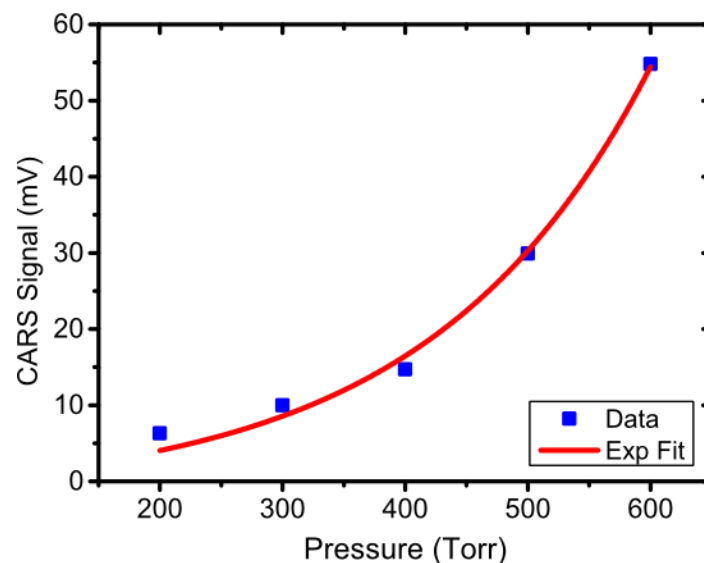
**Figure 4.** CARS signal of  $H_2$  molecule for transition of S-branch is demonstrated. 708.899 nm pump and 1064.555 nm Stokes beam are employed. Resultant 531.370 nm wavelength of CARS signal is found.



**Figure 5.** CARS signal with respect to various gas pressures in  $H_2$  molecule for S-branch transition that differ from 200 to 600 torr.

### CARS signal's pressure dependence

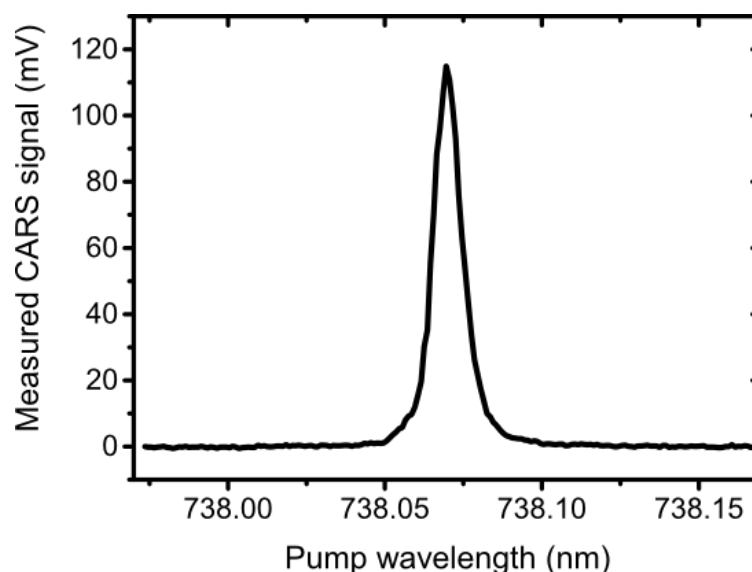
The signal's dependence on pressure measurement is conducted for determining the signal intensity on the pressure. Figure 5 indicates the dependence of CARS signal on pressure that is number density in interaction region. The measurement was performed for various pressures ranging between 200 and 600 torr. The signal rises with respect to increasing the molecules' number density as shown in Figure 5. Once pressure reaches to 200 torr, the signal practically vanishes. However, the CARS signal strength enhances dramatically by inserting additional amount of gas. A gas mix of 10% Hydrogen in Neon were utilized for measurements. Consequently, Hydrogen molecules produces a relative density of 10% in the gas mix.



**Figure 6.** CARS signal of  $H_2$  molecule for S-branch transition depending on various gas pressures that vary from 200 to 600 torr.

**Table 1:** Measured pressures with respect to obtained CARS signal.

| Pressure (Torr)  | 200 | 300 | 400 | 500 | 600 |
|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| CARS signal (mV) | 7   | 10  | 15  | 30  | 55  |



**Figure 7.** The enhanced CARS signal for transition of Q-branch in  $H_2$  is demonstrated. 738.070 nm pump beam wavelength occurs as 1064.555 nm Stokes beam is fixed. Thus, subsequent 564.840 nm CARS signal is generated.

Figure 6 demonstrates CARS signal at various gas pressures. These data are fitted to a function (i.e. an exponential) on the Origin lab program. The signal grows exponentially while the pressure increases in the measurements. Hence, an agreement between our data and CARS theory has been achieved.

### Q-branch transition measurement

An enhanced CARS signal is generated by investigating Q-branch transition of the  $H_2$ . The Q-branch signal strength is measured to be significantly enhanced compared to the preliminary measurements of the S-branch since Q-branch transition probability is much bigger than S-branch. In the Q-branch transition measurement,  $H_2$  molecules at  $v'' = 0, J'' = 1$  are excited to  $v' = 1, J' = 1$ . The signal of Q-branch transition is shown in Figure 7. Pump has a peak of 738.070 nm whereas it is 1064.555 nm for Stokes beam. Therefore, resultant beam has a peak at 564.840 nm that happens to be in the green region of the solar spectrum. In our measurement, the produced CARS signal is so intense that it could be observed by naked eyes. The fact that CARS signal could be viewed by naked eyes implies a substantial rise in the  $H_2$  molecules' numbers being promoted to excited vibrational state  $v' = 1$ .

### CONCLUSION

The wavelength of pump to be utilized in the SRP was successfully established. Measurements of CARS experiment are effectively carried out for transitions of S- and Q-branch in  $H_2$ . On one hand, the wavelength of pump was established to be used in projected SRP on the other hand, we validated the laser setup is feasible for generating  $H_2$  molecules at  $v' = 1$  quantum state.

Even though we evaluated the CARS signal of  $H_2$  S- and Q-branches in the measurements, the O-branch of  $H_2$  transition can be identified using the same procedure as well. Moreover, CARS experiment could be utilized to ascertain the temperature of the molecule by establishing a number of rovibrational level populations of a molecule. The constraint in CARS method is that it is not very effective at low number densities since its efficiency is exceedingly reliant on the molecules' number density.

CARS spectroscopy has become a well-established method. Many experiments are described on establishing of the gas, rotational and vibrational temperatures of  $H_2$  molecules in discharge plasmas (Dedic et al, 2017; Lempert & Adamovich, 2014; Shirley & Hall, 1977; Yatom et al, 2013) including concentration measurement (Jensen et al, 2019; Kearney et al, 2013; Ran et al, 2019; Regnier et al, 1974) by utilizing CARS method. CARS has similarly been employed in part to accomplish for preparing the oriented and aligned  $H_2$  and HD molecules using stimulated Raman pumping (Bartlett et al, 2008; Choi et al, 2019; Folick et al, 2011; Lim et al, 2020). CARS method has recently been applied in Raman microspectroscopy for both in-vivo and in-vitro tissue diagnostics (Gong et al, 2020; Krafft et al, 2012; Moura et al, 2016). CARS has a significant potential in bioanalytical and biomedical sciences because of its non-invasive and label-free nature.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Turkish Ministry of National Education via a scholarship. I would like to thank University College London (UCL) for making this research possible through its research facilities.

### Conflict of Interest

I declare that there is no conflict of interest during the planning, execution and writing of the article.

### Author's Contributions

I hereby declare that the planning, execution and writing of the article was done by me as the sole author of the article.

### REFERENCES

- Anderson A, 1971. The Raman Effect. Principles and Applications. Marcel Dekker: New York, 1973, 1-4.
- Ando M, Kawano M, Tashiro A, Takamuku T, Shirota H, 2020. Low-Frequency Spectra of 1-Methyl-3-octylimidazolium Tetrafluoroborate Mixtures with Methanol, Acetonitrile, and Dimethyl Sulfoxide: A Combined Study of Femtosecond Raman-Induced Kerr Effect Spectroscopy and Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 124(36): 7857-7871.
- Babenko V, Bunkin N, Sychev A, 2020. Role of gas nanobubbles in nonlinear hyper-Raman scattering of light in water. *JOSA B*, 37(9): 2805-2814.
- Bartlett NC, Miller DJ, Zare RN, Sofikitis D, Peter Rakitzis T, Alexander AJ, 2008. Preparation of oriented and aligned H<sub>2</sub> and HD by stimulated Raman pumping. *The Journal of chemical physics*, 129(8): 084312.
- Begley R, Harvey A, Byer RL, 1974. Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy. *Applied Physics Letters*, 25(7): 387-390.
- Buric MP, Chen KP, Falk J, Woodruff SD, 2009. Improved sensitivity gas detection by spontaneous Raman scattering. *Applied Optics*, 48(22): 4424-4429.
- Butler HJ, Ashton L, Bird B, Cinque G, Curtis K, Dorney J, Esmonde-White K, Fullwood NJ, Gardner B, Martin-Hirsch PL, 2016. Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nature protocols*, 11(4): 664-687.
- Candan I, 2016. Production and measurement of H<sub>2</sub> in rovibrationally excited states. UCL (University College London).
- Choi DS, Kim CH, Lee T, Nah S, Rhee H, Cho M, 2019. Vibrational spectroscopy and imaging with non-resonant coherent anti-Stokes Raman scattering: double stimulated Raman scattering scheme. *Optics express*, 27(16): 23558-23575.
- Christensen D, R  ther A, Kochan K, P  rez-Guaita D, Wood B, 2019. Whole-organism analysis by vibrational spectroscopy. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 12: 89-108.
- Coppendale N, Wang L, Douglas P, Barker P, 2011. A high-energy, chirped laser system for optical Stark deceleration. *Applied Physics B*, 104(3): 569.
- Cutler AD, Gallo EC, Cantu LM, Rockwell RD, Goyne CP, 2018. Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy of a premixed ethylene-air flame in a dual-mode scramjet. *Combustion and Flame*, 189: 92-105.
- Dabrowski I, 1984. The Lyman and Werner bands of H<sub>2</sub>. *Canadian Journal of Physics*, 62(12): 1639-1664.
- Dedic CE, Meyer TR, Michael JB, 2017. Single-shot ultrafast coherent anti-Stokes Raman scattering of vibrational/rotational nonequilibrium. *Optica*, 4(5): 563-570.
- Eckbreth AC, 1996. Laser diagnostics for combustion temperature and species, 3CRC press.
- Eesley GL, 2013. Coherent Raman Spectroscopy, Elsevier.
- Ehn A, Zhu J, Li X, Kiefer J, 2017. Advanced laser-based techniques for gas-phase diagnostics in combustion and aerospace engineering. *Applied spectroscopy*, 71(3): 341-366.
- El-Diasty F, 2011. Coherent anti-Stokes Raman scattering: Spectroscopy and microscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 55(1): 1-37.
- Farahani, MA, Gogolla T, 1999. Spontaneous Raman scattering in optical fibers with modulated probe light for distributed temperature Raman remote sensing. *Journal of Lightwave Technology*, 17(8): 1379.
- Folick A, Min W, Wang MC, 2011. Label-free imaging of lipid dynamics using Coherent Anti-stokes Raman Scattering (CARS) and Stimulated Raman Scattering (SRS) microscopy. *Current opinion in genetics & development*, 21(5): 585-590.
- Gong L, Zheng W, Ma Y, Huang Z, 2020. Higher-order coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy realizes label-free super-resolution vibrational imaging. *Nature Photonics*, 14(2): 115-122.
- Goodhead RM, Moger J, Galloway TS, Tyler CR, 2015. Tracing engineered nanomaterials in biological tissues using coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy—a critical review. *Nanotoxicology*, 9(7): 928-939.

- Harvey A, Nibler J, 1978. Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy of gases. *Applied Spectroscopy Reviews*, 14(1): 101-143.
- Heiman D, Hellwarth R, Levenson M, Martin G, 1976. Raman-induced Kerr effect. *Physical Review Letters*, 36(4): 189.
- Jensen BB, Glover ZJ, Pedersen SM, Andersen U, Duelund L, Brewer JR, 2019. Label free noninvasive spatially resolved NaCl concentration measurements using Coherent Anti-Stokes Raman Scattering microscopy applied to butter. *Food chemistry*, 297: 124881.
- Jiang H, Xu W, Ding Y, Chen Q, 2020. Quantitative analysis of yeast fermentation process using Raman spectroscopy: Comparison of CARS and VCPA for variable selection. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 228: 117781.
- Jones RR, Hooper DC, Zhang L, Wolverson D, Valev VK, 2019. Raman techniques: Fundamentals and frontiers. *Nanoscale research letters*, 14(1): 1-34.
- Kakinuma S, Shirota H, 2018. Femtosecond Raman-induced Kerr effect study of temperature-dependent intermolecular dynamics in molten bis (trifluoromethylsulfonyl) amide salts: effects of cation species. *The Journal of Physical Chemistry B*, 122(22): 6033-6047.
- Kearney SP, Scoglietti DJ, Kliwer CJ, 2013. Hybrid femtosecond/picosecond rotational coherent anti-Stokes Raman scattering temperature and concentration measurements using two different picosecond-duration probes. *Optics express*, 21(10): 12327-12339.
- Kiefer W, Bernstein H, 1972. The resonance Raman effect of the permanganate and chromate ions. *Molecular Physics*, 23(5): 835-851.
- Kifer W, 1980. Active Raman spectroscopy: high resolution molecular spectroscopical methods. *Journal of Molecular Structure*, 59: 305-319.
- Kliwer C, Bohlin A, Nordström E, Patterson B, Bengtsson PE, Settersten T, 2012. Time-domain measurements of S-branch N<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> Raman linewidths using picosecond pure rotational coherent anti-Stokes Raman spectroscopy. *Applied Physics B*, 108(2): 419-426.
- Krafft C, Dietzek B, Popp J, Schmitt M, 2012. Raman and coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy for biomedical applications. *Journal of biomedical optics*, 17(4): 040801.
- Kushwaha AS, Kumar A, Kumar R, Srivastava S, 2018. A study of surface plasmon resonance (SPR) based biosensor with improved sensitivity. *Photonics and Nanostructures-Fundamentals and Applications*, 31: 99-106.
- Lempert WR, Adamovich IV, 2014. Coherent anti-Stokes Raman scattering and spontaneous Raman scattering diagnostics of nonequilibrium plasmas and flows. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 47(43): 433001.
- Lim S, Choi DS, Rhee H, Cho M, 2020. An Efficient Switching-Off of Coherent Anti-Stokes Raman Scattering via Double Stimulated Raman Scattering Processes of Heteromolecular Vibrational Modes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 124(17): 3583-3590.
- Liu CH, Zhou Y, Sun Y, Li J, Zhou L, Boydston-White S, Masilamani V, Zhu K, Pu Y, Alfano R, 2013. Resonance Raman and Raman spectroscopy for breast cancer detection. *Technology in cancer research & treatment*, 12(4): 371-382.
- Madzharova F, Heiner Z, Kneipp J, 2017. Surface enhanced hyper Raman scattering (SEHRS) and its applications. *Chemical Society Reviews*, 46(13): 3980-3999.
- Maher-McWilliams C, Douglas P, Barker P, 2012. Laser-driven acceleration of neutral particles. *Nature Photonics*, 6(6): 386-390.
- Maker P, Terhune R, 1965. Study of optical effects due to an induced polarization third order in the electric field strength. *Physical Review*, 137(3A): A801.
- Moura CC, Tare RS, Oreffo RO, Mahajan S, 2016. Raman spectroscopy and coherent anti-Stokes Raman scattering imaging: prospective tools for monitoring skeletal cells and skeletal regeneration. *Journal of The Royal Society Interface*, 13(118): 20160182.
- Ochkin VN, 2009. *Spectroscopy of low temperature plasma*. John Wiley & Sons.
- Portnov A, Bar I, Rosenwaks S, 2010. Highly sensitive standoff detection of explosives via backward coherent anti-Stokes Raman scattering. *Applied Physics B*, 98(2): 529-535.

- Ran Y, Junghanns M, Boden A, Nolte S, Tünnermann A, Ackermann R, 2019. Temperature and gas concentration measurements with vibrational ultra-broadband two-beam femtosecond/picosecond coherent anti-Stokes Raman scattering and spontaneous Raman scattering. *Journal of Raman Spectroscopy*, 50(9): 1268-1275.
- Regnier P, Moya F, Taran J, 1974. Gas concentration measurement by coherent Raman anti-Stokes scattering. *AIAA Journal*, 12(6): 826-831.
- Saito R, Grüneis A, Samsonidze GG, Brar V, Dresselhaus G, Dresselhaus M, Jorio A, Cançado L, Fantini C, Pimenta M, 2003. Double resonance Raman spectroscopy of single-wall carbon nanotubes. *New Journal of Physics*, 5(1): 157.
- Sarri B, Chen X, Canonge R, Grégoire S, Formanek F, Galey JB, Potter A, Bornschlögl T, Rigneault H, 2019. In vivo quantitative molecular absorption of glycerol in human skin using coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) and two-photon auto-fluorescence. *Journal of Controlled Release*, 308: 190-196.
- Shirley J, Hall R, 1977. Vibrational excitation in H<sub>2</sub> and D<sub>2</sub> electric discharges. *The Journal of Chemical Physics*, 67(6): 2419-2421.
- Short L, Thoms AV, Cao B, Sinyukov AM, Joshi A, Scully R, Sanders V, Voronine DV, 2015. Facile residue analysis of recent and prehistoric cook stones using handheld Raman spectrometry. *Journal of Raman Spectroscopy*, 46(1): 126-132.
- Takaya T, Enokida I, Furukawa Y, Iwata K, 2019. Direct Observation of Structure and Dynamics of Photogenerated Charge Carriers in Poly (3-hexylthiophene) Films by Femtosecond Time-Resolved Near-IR Inverse Raman Spectroscopy. *Molecules*, 24(3): 431.
- Tang Y, He C, Zheng X, Chen X, Gao T, 2020. Super-capacity information-carrying systems encoded with spontaneous Raman scattering. *Chemical Science*, 11(11): 3096-3103.
- Teramoto Y, Ono R, 2014. Measurement of vibrationally excited N<sub>2</sub> ( $v$ ) in an atmospheric-pressure air pulsed corona discharge using coherent anti-Stokes Raman scattering. *Journal of Applied Physics*, 116(7): 073302.
- Terhune R, Maker P, 1963. Nonlinear optics. *Bull. Am. Phys. Soc*, 8(359): 0003-0503.
- Tolles WM, Nibler J, McDonald J, Harvey A, 1977. A review of the theory and application of coherent anti-Stokes Raman spectroscopy (CARS). *Applied Spectroscopy*, 31(4): 253-271.
- Turner J, Kirby-Docken K, Dalgarno A, 1977. The quadrupole vibration-rotation transition probabilities of molecular hydrogen. *The Astrophysical Journal Supplement Series*, 35: 281.
- Verdieck J, Peterson S, Savage C, Maker PD, 1970. Hyper-Raman spectra of methane, ethane and ethylene in gas phase. *Chemical Physics Letters*, 7(2): 219-222.
- Xie L, Ling X, Fang Y, Zhang J, Liu Z, 2009. Graphene as a substrate to suppress fluorescence in resonance Raman spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 131(29): 9890-9891.
- Yan M, Zhang L, Hao Q, Shen X, Qian X, Chen H, Ren X, Zeng H, 2018. Surface-Enhanced Dual-Comb Coherent Raman Spectroscopy with Nanoporous Gold Films. *Laser & Photonics Reviews*, 12(9): 1800096.
- Yang K, Wu Y, Jiang J, Ye P, Huang K, Hao Q, Zeng H, 2018. Fiber optical parametric oscillator and amplifier for CARS spectroscopy. *IEEE Photonics Technology Letters*, 30(10): 967-970.
- Yatom S, Tskhai S, Krasik YE, 2013. Electric field in a plasma channel in a high-pressure nanosecond discharge in hydrogen: A coherent anti-stokes Raman scattering study. *Physical review letters*, 111(25): 255001.
- Yeung, E. S. (1974) Inverse Raman effect: A quantitative spectroscopic technique. *Journal of Molecular Spectroscopy*, 53(3): 379-392.
- Zhang C, Cheng JX, 2018. Perspective: Coherent Raman scattering microscopy, the future is bright. *APL Photonics*, 3(9): 090901.
- Zheltikov A, 2000. Coherent anti-Stokes Raman scattering: from proof-of-the-principle experiments to femtosecond CARS and higher order wave-mixing generalizations. *Journal of Raman Spectroscopy*, 31(8-9): 653-667.
- Zhu S, Fan C, Ding P, Liang E, Hou H, Wu Y, 2018. Theoretical investigation of a plasmonic substrate with multi-resonance for surface enhanced hyper-Raman scattering. *Scientific reports*, 8(1): 1-7.

**Atf İçin:** Alıcı H, 2021. HnRNPA2'in LC(286-291) Domain Fibrili ve Onun D290V Mutasyonu Hakkında Teorik Bir Çalışma. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1080-1089.

**To Cite:** Alıcı H, 2021. A Theoretical Study About LC(286-291) Domain of hnRNPA2 and its D290V Mutation. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1080-1089.

## HnRNPA2'in LC(286-291) Domain Fibrili ve Onun D290V Mutasyonu Hakkında Teorik Bir Çalışma

Hakan ALICI<sup>1\*</sup>

**ÖZET:** Son zamanlarda, hnRNPA'lerin işlevindeki bozukluklar başta amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ve frontotemporal demans (FTD) olmak üzere birçok nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkilendirilmektedir. hnRNPA'lerin düşük karmaşıklık (LC) domainlerinin fibrilleşme eğilimlerinin bu işlev bozukluklarının temel nedeni olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada atomik yapısı çok yakın zamanda ortaya konulmuş D290V mutasyonuna sahip hnRNPA2'nin LC(286-291) fibril domaininin bir polimorfu (pdb kod:6WPQ) ve bu poliformun mutasyonsuz yani vahşi tip (WT) fibril formu hakkında bir moleküler Dinamik (MD) simülasyon çalışması sunuyoruz. MD simülasyon sonuçlarına göre önerilen fibril polimorf yapısı için D290V mutasyonun kararlı bir konformasyona sahip olduğu ancak onun WT formun bu fibril polimorf yapı konformasyonu için kararsız olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak çalışmada elde edilen bulgular gelecekteki muhtemel ilaç çalışmaları için yalnızca D290V fibril yapısının hedef yapı olarak ele alınabileceğini işaret etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Düşük karmaşıklık alanı, moleküler dinamik, simülasyon, D290V

### A Theoretical Study about LC(286-291) Domain of hnRNPA2 and its D290V Mutation

**ABSTRACT:** Recently, disorders in the function of hnRNPA's have been associated with many neurodegenerative diseases, especially amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD). In addition, the fibrillation tendency of the low complexity (LC) domains of hnRNPA's is thought to be the root cause of these dysfunctions. In this paper, we present a molecular dynamic (MD) simulation study for the recently crystalized a fibril polymorph of the LC (286-291) domain (pdb id:6WPQ) of hnRNPA2 with the D290V mutation and its wild-type (WT) fibril form, that is no mutation. According to the MD simulation results, it was detected that fibril polymorph with D290V mutation has stable conformations, but WT is unstable for this fibril polymorph. As a result, the findings of the study indicate that only the D290V fibril structure can be considered as the target structure for possible future drug studies.

**Keywords:** Low complexity domain, molecular dynamic, simulation, D290V

<sup>1</sup> Hakan ALICI ([Orcid ID: 0000-0001-5105-8331](https://orcid.org/0000-0001-5105-8331)), Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, Zonguldak, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Hakan ALICI, e-mail: hakanalici@beun.edu.tr

## GİRİŞ

Heterojen nükleer RNA (hnRNA) komplekslerinin bileşenlerinden biri olan hnRNPA2 proteini, RNA'nın stabilizasyonunda, bağlanmasında, translasyonunda ve nükleo-sitoplazmik taşınmada görev alır (Burd ve Dreyfuss 1994; Guil ve Cáceres 2007; White ve ark., 2008; Kato ve ark., 2012; Jean-Philippe ve ark., 2013; Kim ve ark., 2013; Jain ve ark., 2017; Amaya ve ark., 2018; Purice ve Taylor 2018). Ayrıca mesajcı RNA (mRNA)'ların korunmasında önemli işleve sahip olup, membransız organel (MLO) olarak adlandırılan sitoplazmik stres granüllerinin de bir bileşenidir (Kato ve ark., 2012; Gomes ve Shorter 2019).

HnRNPA2 341 adet aminoasite sahip olup yapısal olarak iki RNA tanıma motifi (RRM'ler), bir RNA bağlama alanı (RBD) ve C-terminal düşük karmaşıklık (LC) alanı olmak üzere dört domainden oluşmaktadır (Purice ve Taylor, 2018). HnRNPA'nın nükleo-sitoplazmik taşınmada veya dinamik faz ayrımında arızalanması, anormal amiloid toplanmasına ve nörodejenerasyona yol açmaktadır. HnRNPA'nın LC alanının ise hem dinamik sıvı-sıvı faz ayrışmasını hem de amiloid fibril toplanmasını (Kim ve ark., 2013; Molliex ve ark., 2015; Xiang ve ark., 2015; Duan ve ark., 2019; Gui ve ark., 2019) yönlendirdiği düşünülmektedir. Ayrıca hnRNPA2'in hem hüresel stres altında hem de nörodejeneratif koşullarda mutasyona uğramış formda fibril yapıları oluşturdukları da bilinmektedir (Gilks ve ark., 2004; Kim ve ark., 2013). Ancak bu hastalık mutasyonlarının atomik düzeyde fibril agregalarının polimorfları üzerinde nasıl yapısal değişime neden olduğu hakkında çok az şey bilinmektedir. Sahada yapılan tüm deneysel çabalara rağmen, agregaların amorf halde olmalarından dolayı standart protokoller kullanılarak bu polimorfların atomik düzeyde mikroskobik ayrıntılarla karakterize edilmesini zorlaştırmaktadır. Bundan dolayı protein yapı ve özelliklerini moleküler seviyede araştırmak için yaygın olarak kullanılan başlıca alternatif stratejiler arasında, bilgisayar simülasyonları giderek artan bir öneme sahiptir.

Bu çalışmada atomik yapısı çok yeni olarak çözülmüş olan hnRNPA2'nin LC domaininin 286-291 aminoasit dizilimini içeren bir fibril segment polimorf yapısını ele aldık (Pdb kod: 6WPQ (Lu ve ark., 2020)). Bu fibril segmenti D290V mutasyonunu içermektedir ve dolayısıyla bu fibril agrega konformasyonunun bu mutasyona sahip hastalar için muhtemel tedavi edici ilaç molekülleri için hedef fibril yapıları olarak ele alınması muhtemeldir. Ancak buna ilaveten bu fibril polimorfunun mutasyonsuz vahşi (doğal) tip yapısının benzer konformasyonel formda bulunup bulunamayacağını tespit etmek D290V için tasarlanması muhtemel ilaç moleküllerinin vahşi tip içinde kullanılıp kullanılmayacağını gösterebilir.

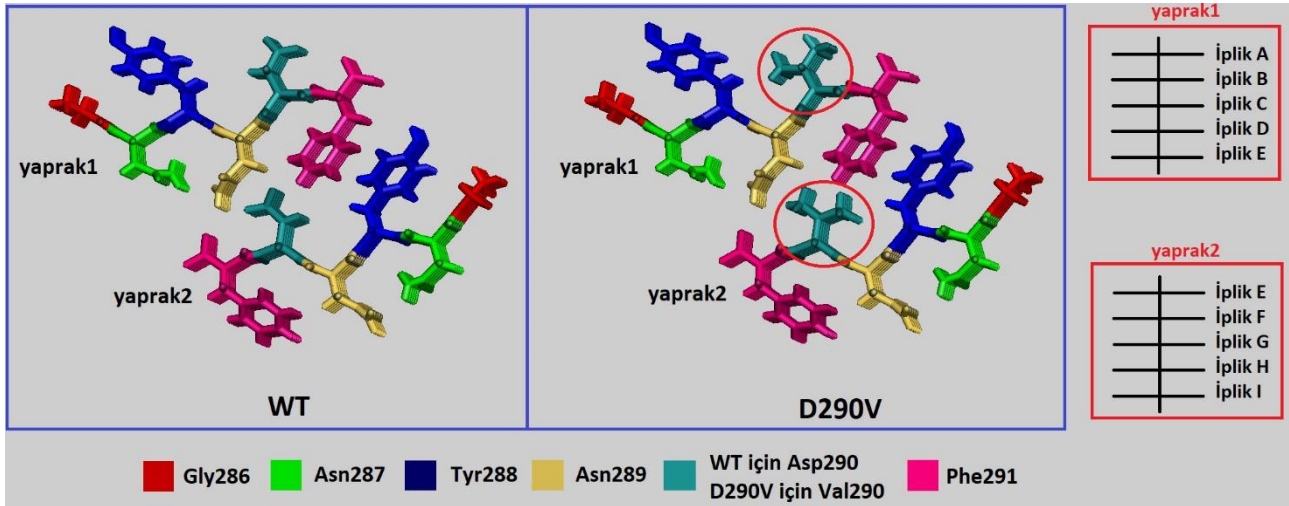
Bu bağlamda bu çalışmanın başlıca amacı Moleküler Dinamik (MD) simülasyon yöntemi kullanarak vahşi tip ve D290V mutasyonuna sahip hnRNPA2'nin LC(286-291) domain fibril segmentlerinin konformasyonel yapı özelliklerini ve onların kararlılıklarını araştırmaktır. Bu amaç doğrultusunda çalışmada elde edilen bulgulara göre vahşi tipin bahsi geçen fibril formunda bulunamayacağı dolayısıyla gelecekteki ilaç geliştirme çalışmalarında yalnızca D290V mutasyonlu fibril yapısının ele alınabileceği sonucuna varılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Sunulan çalışmadaki LC(286-291) domain fibril kesitinin 3B (üç boyutlu) yapısı için Protein Data Bank (PDB)' a 6WPQ kodu ile depo edilmiş olan X-ray kristal yapısı kullanılmıştır (Lu ve ark., 2020). Bu kristal yapısının 290. aminoasidi D290V hastalık mutasyonunu içermektedir. Çalışmamızda mutasyonlu yapı ile kıyaslama yapabilmek için bu fibril kesitinin mutasyonsuz vahşi tip fibril kesiti PyMOL (DeLano, 2002) programı kullanılarak elde edilmiş ve bu sistem çalışmamızda "WT" olarak



adlandırılmıştır. Bahsi geçen fibril polimorf sistemleri karşılıklı yerleştirilmiş iki adet protofilament yaprağından oluşmakta olup her bir yaprak tabakası da düzenli olarak üst üste istiflenmiş beş LC(286-291) domain ipliğine sahiptir. MD simülasyonlarına başlangıç yapısı olarak kullanılan D290V ve WT sistemlerinin 3B yapıları Şekil 1'de sunulmuştur. Şekilde yapıların aminoasit dizilimleri ve çalışmamızda yaprakların ve ipliklerin ele alındığı şekliyle adlandırılışları ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 1. HnRNPA2'nin LC(286-291) domain WT fibrili ve onun D290V mutasyonlu fibril yapılarının konformasyonlarının 3B'lu görselleştirmesi

MD simülasyon çalışmaları GROMACS programı (Abraham ve ark., 2015) ile gerçekleştirilmiştir. Simülasyonlarda atomik etkileşimleri tanımlayabilmek için CHARMM36 enerji fonksiyonu (Huang ve ark., 2017) ve TIP3P çözelti modeli (Jorgensen ve ark., 1983) kullanılmıştır. Şekilde verilen başlangıç yapılarının GROMACS' in pdb2gmx modülü kullanılarak hidrojen atomları önce silinmiş daha sonra CHARMM36'ya uygun olacak şekilde yeniden eklenmiştir. Daha sonra WT ve D290V sistemlerinin bu yapıları 6.5x6.5x6.5nm boyutlarında kübik bir simülasyon kutusunun merkezine yerleştirilmiştir. Simülasyonlarda PBC (Periodic Boundary Condition) kullanılmış olup PBC'nin gerçek olmayan bir atomik etkileşime sebebiyet vermemesi için simülasyon kutusu ile protein atomları arasındaki minimum uzaklık 1nm olarak ayarlanmıştır. Daha sonra simülasyon kutularına GROMACS'ın solute modülü kullanılarak 5246 adet su molekülü eklenmiştir. Ayrıca simülasyonlarda uzun erimli etkileşimleri tanımlayabilmek için PME (Particle Mesh Ewald) teorisi (Darden ve ark., 1993; Essmann ve ark., 1995) kullanılmış olup bu teori nötralize olmuş simülasyon sistemleri gerektirmektedir. D290V sistemi kendiliğinden nötralize iken -10 yüke sahip olan WT sistemine 10 adet Na<sup>+</sup> iyonu eklenerek WT sistemi de nötralize edilmiştir. Daha sonra nötralize olmuş sistemlerdeki protein atomları arasındaki kötü temasları ve uygun olmayan geometrik yönelimlerini yok etmek için "Steepest Descent" metodu kullanılarak enerji minimizasyonu yapılmıştır. Sistemlerin enerji minimizasyonlarının ardından ve gerçek (ürün) dinamik simülasyonlar öncesinde, çözelti atomlarının ve iyonların protein atomları etrafında gevşemesini sağlayabilmek adına iki aşamalı dengeleme dinamik simülasyonları yapılmıştır. Bu simülasyonların her biri 2ns simülasyon süresine sahip olup sırasıyla NVT ve NPT istatistiksel topluluklarda gerçekleştirilmişlerdir. Dengeleme dinamik simülasyonları tamamlandıktan sonra deneysel koşullara en yakın istatistiksel topluluk olan NPT'de 150ns'lik ürün dinamik simülasyonları gerçekleştirilmiştir. Dinamik simülasyonlarda sıcaklık v-rescale termostatı (Bussi ve ark., 2007) ile 310 K' de, basınç Parrinello–Rahman barostatı (Parrinello ve Rahman 1981) ile 1 bar da sabit tutulmuştur

Ayrıca bilindiği gibi, MD simülasyonlarının sonuçlarının deterministik olması beklenilir, bu nedenle güvenilir simülasyon bulguları için ilgilenilen sistem için yalnızca bir MD simülasyonunun çalıştırılması çok riskli sonuçlar ortaya çıkarılabilir. Bu nedenle, simülasyon sonuçlarının güvenilirliğini sağlamak için klasik MD simülasyonlarının farklı başlangıç koşullarında birden fazla kez tekrarlanması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Bu bağlamda WT ve D290V sistemlerinin her biri için farklı başlangıç hız dağılım setine sahip ikişer adet simülasyon oluşturulmuştur. Böylece, sistemlerin birden fazla bağımsız simülasyon çalışmasıyla, bulguların sadece bir simülasyon çalışmasıyla tesadüfen elde edilmediğini garanti etmiş olmaktadır.

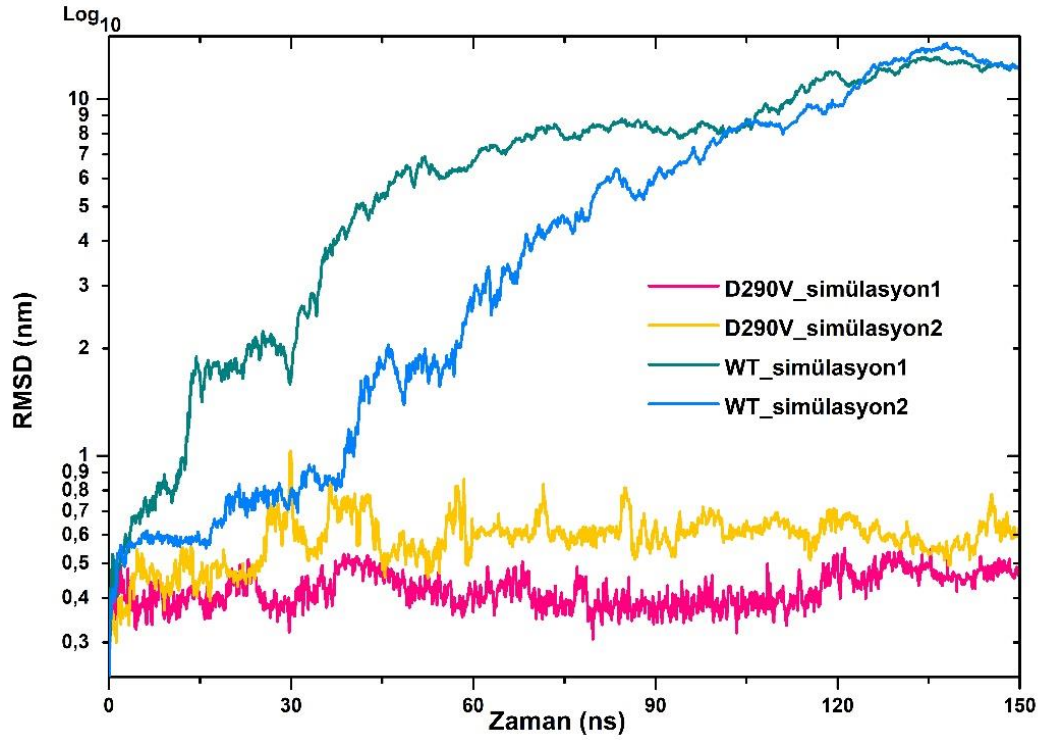
Sunulan çalışmada grafiklerde sergilenen metrik analizlerin sonuçları, tüm sonuçların aynı skala üzerinde gözlemlenebilmesi için Log10 ölçeğinde çizdirilmiştir. Ayrıca. 3B görselleştirilmeler için PyMOL programı kullanılmıştır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

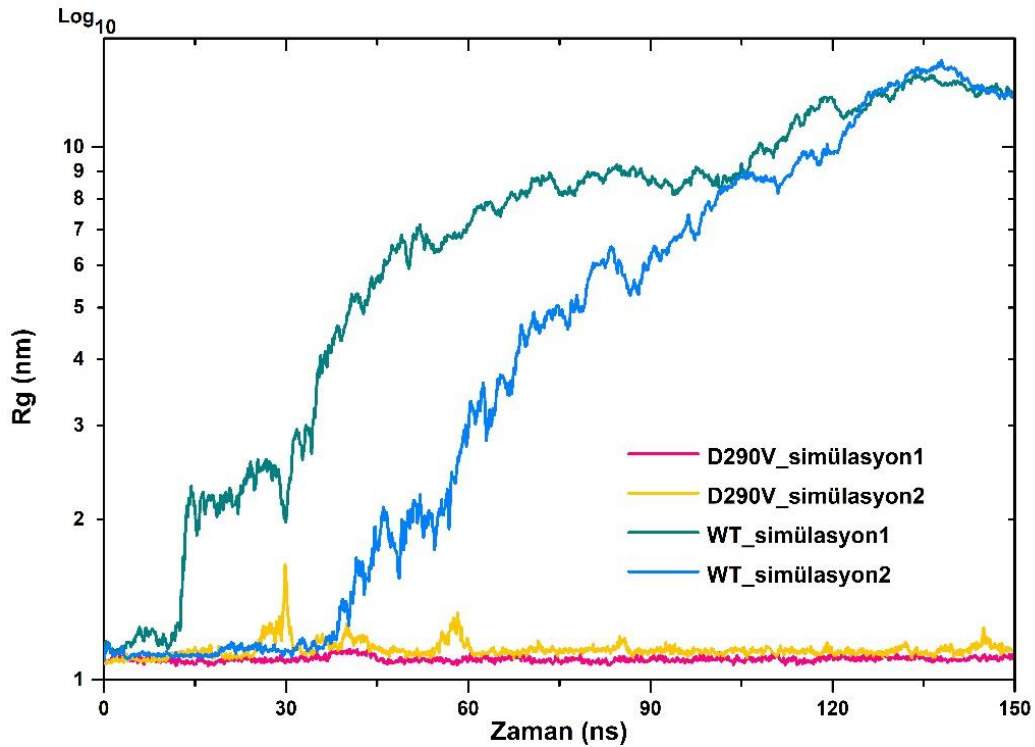
Çalışmada ele alınan fibril arayüz sistemlerinin konformasyonel kararlılığını araştırmak için ilk olarak RMSD (kök ortalama kare sapması: root mean square deviation) analizi gerçekleştirilmiştir. RMSD analizi protein konformasyonundaki atomların simülasyona başlamadan önceki yani doğal konumlarından simülasyonlar boyunca ne kadar uzaklaştığının bir göstergesidir. Başka bir deyişle RMSD analizi protein konformasyonundaki dinamik değişimleri takip etmeye imkân sağlamaktadır. WT ve D290V sistemlerine ait ikişer adet simülasyon için 150ns simülasyonlar boyunca RMSD değerleri Şekil 2'de verilmiştir. Şekil incelendiğinde her bir sistemin kendine ait simülasyon setlerinin benzer RMSD değer davranışına sahip olduğu açıkça gözlemlenmektedir. Bu durum simülasyonlar sonucunda elde edilen bulguların güvenilirliğini temin etmektedir. Log10 skalasında sergilenen RMSD değerlerinin değişimleri incelendiğinde WT sistemine ait simülasyonlar için elde edilen değerlerin özellikle 45ns'den sonra çok yüksek değerlere doğru gitmeye başladığını yaklaşık 140ns'den sonra ise ~14nm gibi aşırı derecede yüksek bir değere ulaşarak bu değerde sabit kaldığı gözlemlenmektedir. Literatürde bu türden yüksek ve değişken RMSD değerleri protein konformasyonlarındaki köklü değişimlere atfedilmektedir (Alıcı ve ark., 2018). Buna göre WT sistemin 10 adet düzenli istiflenmiş fibril ipliğine sahip konformasyonundaki tüm ipliklerinin birbirinden ayrıldığı ve böylece düzenli istif yapısının bozulduğu söylenebilir. Burada, D290V mutasyon sistemine ait simülasyonların RMSD değerlerindeki düşük ve kararlı (az değişen) değerler ise dikkat çekicidir. D290V sistemine ait ilk simülasyonunun ortalama RMSD değerlerinin ~0.45nm ikinci simülasyonun ise ~0.51nm civarında olduğu gözlemlenmektedir.

Çalışmamızda ele aldığımız WT ve D290V fibril sistemlerin konformasyonlarındaki değişimler üzerine yapılan araştırmamızı derinleştirebilmek adına, ikinci olarak Rg (jirasyon yarıçapı: Radius of gyration) analizi yapılmıştır. Rg analizi proteini oluşturan atomlar ile proteinin kütle merkezi arasındaki uzaklıkların simülasyonlar boyunca değişimlerinin bir ölçüsüdür. Başka bir ifadeyle Rg analizi ile protein konformasyonunun boyutlarındaki değişimleri simülasyonlar boyunca gözlemlemeye olanak sağlar. Şekil 3 WT ve D290V sistemleri için Rg değerlerinin simülasyonlar boyunca değişimlerini göstermektedir. Şekil 3 incelendiğinde Rg değerlerinin simülasyonlar boyunca değişim davranışlarının RMSD değerlerinde elde edilen davranış eğilimine benzer olduğu görülmektedir. Literatüre göre Rg değerlerindeki artış protein yapısındaki genişlemeye azalma ise protein konformasyonundaki büzüşmeye karşılık gelmektedir (Lobanov ve ark., 2008). Özellikle WT sistemi için elde edilen önemli derecede yüksek değerler bu sistemdeki fibril ipliklerinin birbirinden uzaklaştığının açık bir göstergesidir. RMSD ve Rg analizleri sonucunda elde edilen bulgular birlikte değerlendirildiğinde, ele alınan fibril polimorfu için D290V mutant fibril sistemi kararlı konformasyonlara sahip iken WT

konformasyonun bu polimorf yapısında var olamayacağı söylenebilir. Dolayısıyla ilgilenilen polimorf yapısı için yalnızca D290V mutant sistemin ilaç hedef yapısı olarak ele alınabileceğini sonucu çıkarılabilir.

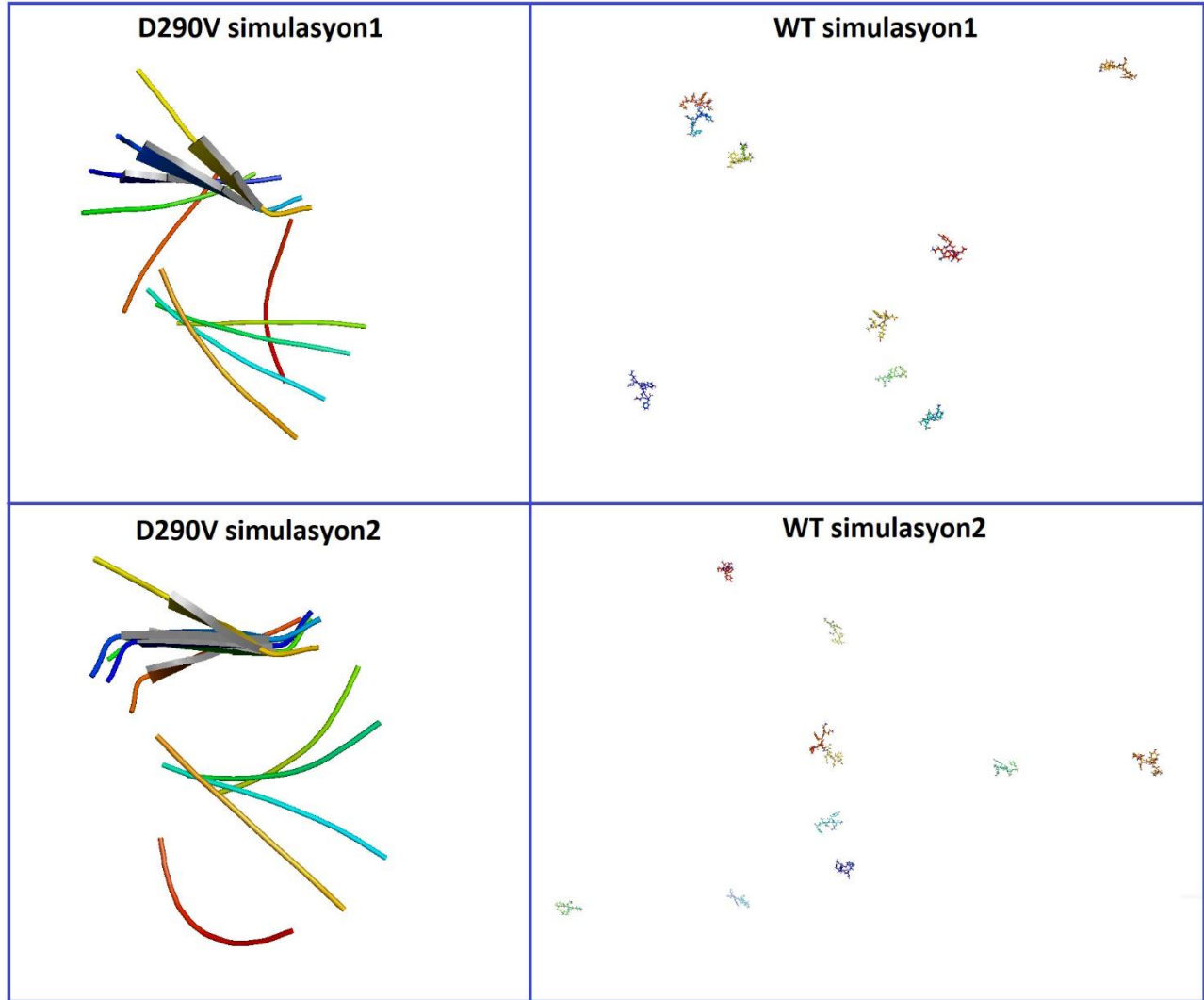


Şekil 2. hnRNPA2'nin LC(286-291) domain WT fibrili ve onun D290V mutasyonlu fibril yapıları için gerçekleştirilen 150ns'lik simülasyonlar boyunca RMSD değerlerinin değişimi



Şekil 3. hnRNPA2'nin LC(286-291) domain WT fibrili ve onun D290V mutasyonlu fibril yapıları için gerçekleştirilen 150ns'lik simülasyonlar boyunca Rg değerlerinin değişimi

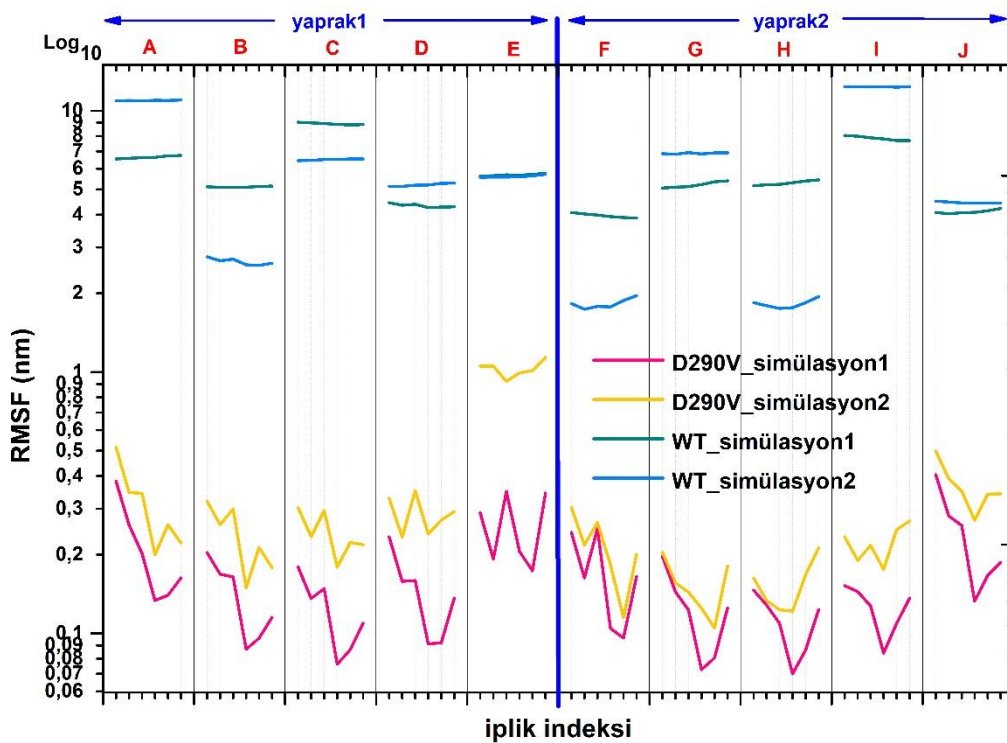
Ayrıca RMSD ve Rg analizlerinden elde edilen bulguların daha iyi özümsebilmesi için fibril sistemlerinin 150ns'lik simülasyonlarının sonundaki 3B konformasyonlarının bir görselleştirilmesi Şekil 4'de sergilenmiştir. Şekil incelendiğinde D290V sisteminin konformasyonel kararlılığını her iki simülasyonu için de büyük ölçüde koruduğu söylenebilir. Ancak yine de D290V sistemi içinde bazı ipliklerin doğal konformasyonel konumlarını bir miktar kaybettiği gözlemlenmektedir. Öte yandan WT sistemi için gerçekleştirilen her iki simülasyonun sonunda fibril ipliklerinin birbirinden ayrılarak uzaklaştığı ise açıkça görülmektedir.



**Şekil 4.** hnRNPA2'nin LC(286-291) domain WT fibrili ve onun D290V mutasyonlu fibril yapıları için gerçekleştirilen 150ns'lik simülasyonların sonundaki anlık 3B görüntüleri

Ayrıca fibril konformasyonlarındaki düzenli istifli yapılarıdaki bozulmaların hangi ipliklerde daha önce başladığını ve hangi fibril ipliğinde daha fazla bozulma meydana geldiğini tespit edebilmek büyük önem arz etmektedir. Bu amaç doğrultusunda fibril sistemlerinin her bir ipliği için ayrı ayrı aminoasit başına RMSF (kök ortalama kare dalgalanma: root mean square fluctuations) analizleri yapılmıştır. RMSF analizleri protein yapısındaki her bir aminoasitin doğal konumlarının simülasyonlar boyunca ortalama olarak değişimlerinin bir ölçüsü olup bu analiz sayesinde fibril konformasyonlarının kararlılığının bölgesel (lokal) olarak değerlendirilebilmesi mümkündür. Bu bağlamda, ilk olarak fibril sistemlerindeki düzenli istif yapısındaki bozulmaların hangi fibril ipliklerinde meydana geldiğinin tespit edilebilmesi için aminoasit başına RMSF değerleri her bir iplik için birbirinden bağımsız olarak Şekil 5'de

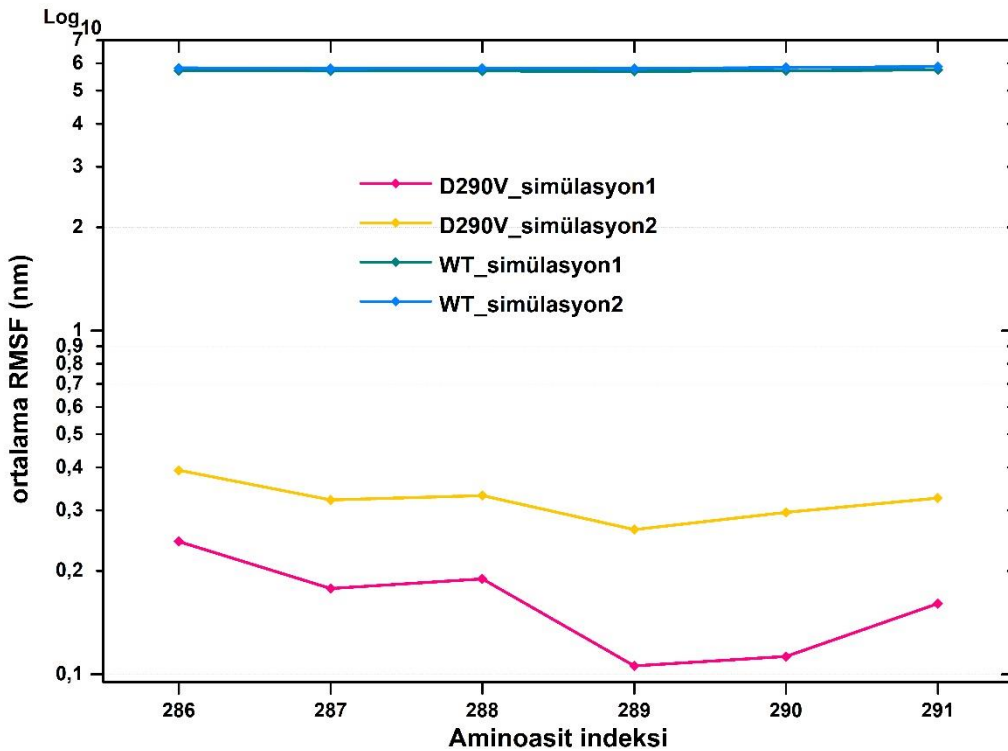
sergilenmiştir. Şekil incelendiğinde WT sistemi için elde edilen yüksek değerler diğer analizlerde olduğu gibi yapıdaki ipliklerin birbirinden ayrıldığı göstermektedir. D290V mutant sistemine odaklanıldığında her bir yaprağın en üstündeki ve en altındaki bölgelerde bulunan (bakınız Şekil 1: yaprak 1 için iplik A, E ve yaprak 2 için iplik F, J) fibril ipliklerinin her bir yaprağın merkez bölgelerinde bulunan fibril ipliklerine göre daha yüksek değerlere sahip olduğu görülmektedir. D290V sistemi için gözlemlenen düzenli istif yapılarındaki bozulmaların uç bölgedeki fibril ipliklerinden başlaması durumu aslında beklenen bir sonuç olup literatürde bir Alzhemier hastalık fibrili için de benzer davranış eğilimi gözlemlenmiştir (Xi ve Hansmann, 2017). Çünkü bu ipliklerin bir yüzü, merkezdeki ipliklere göre çözeltiliye daha fazla temas halindedir ve iplikleri bir arada tutan atomik etkileşimlere daha az maruz kalmaktadır. Ayrıca, D290V sistemi için elde edilen simülasyon sonundaki 3B görüntülerden de bozulmanın bu uç kısımlarda bulunan ipliklerden başladığını rahatlıkla görülebilir.



Şekil 5. hnRNPA2'nin LC(286-291) domain WT fibrili ve onun D290V mutasyonlu fibril yapılarındaki her bir ipliğin ayrı ayrı RMSF değerleri

Daha sonra konformasyonel değişimleri aminoasit bazında inceleyebilmek için her bir aminoasitin on iplik için elde edilen RMSF değerlerinin ortalaması Şekil 6'da sergilenmiştir. Bu analiz sayesinde ilgilenilen fibril yapılarının konformasyonel değişimlerine, aminoasit pozisyonlarının katkılarını değerlendirmek mümkün olacaktır. Diğer analizlerin sonuçlarında olduğu gibi WT sistemi yüksek değerlere sahiptir ve dolayısıyla bu sistem için bu RMSF analizlerinden de bir sonuç çıkarmak çok mümkün değildir. D290V sistemi değerlendirildiğinde ise bu sistemin her iki simülasyonda da aminoasitlerin benzer dinamik bir davranışı sergilediği söylenebilir. Fibril yapraklarının terminal aminoasitleri olan Gly286 ve Phe291'nin diğer aminoasitlere kıyasla bir miktar yüksek sonuçları vermesi bu bölgelerin daha esnek olmasına atfedilmiş olup literatürdeki trend raporu ile uyumludur (Zheng ve ark., 2006). Öte yandan, tamamı fibril tabakaları arasında kalan ve karşılıklı tabakalar arası etkileşime sahip olan Asn289 ve Val290 aminoasitlerinin (bakınız Şekil 1) en düşük değerlere sahip olduğu görülmektedir. Bu türden kararlı konformasyona sahip fibril yapılarının çözeltiliye daha az temas

halinde olan fibril merkezi (core) bölgelerinin düşük değerler vermesi beklenen bir sonuç olup literatürde farklı hastalıklar için tespit edilmiş fibril yapılarının simülasyon sonuçları ile tutarlıdır (Berhanu ve ark., 2012; Demir ve ark., 2018). Öte yandan, WT sisteminin 290. aminoasit pozisyonunda bulunan negatif yüklü Asp aminoasidinin sahip olduğu elektrostatik etkileşimlerin yaprak tabakaları arasında olumsuz bir etkiye sahip olma ihtimalinin çok yüksek olduğu sonucu çıkarılabilir ki yüklü aminoasitlerin fibril tabakaları üzerindeki bu türden olumsuz etkileri literatürde daha önceden rapor edilmiştir (Alıcı, 2020). Ayrıca fibril tabakaları üzerindeki farklı mutasyonların fibril yapılarını farklı polimorflara indükleyebileceği rapor edilmiştir (Fitzpatrick ve ark., 2013; Alfred ve ark., 2014). Özetle yapılan tüm analizler sonucunda elde edilen bilgiler ışığında WT'nin farklı bir şekillenime sahip fibril polimorf yapısında bulunacağı açıktır.



Şekil 6. HnRNPA2'nin LC(286-291) domain WT fibrili ve onun D290V mutasyonlu fibril yapılarındaki her bir aminoasidinin ortalama RMSF değerleri

## SONUÇ

Bu çalışmada kristal yapısı çok yakın zamanda çözülmüş olan HnRNPA2'nin LC domaininin 286-291 aminoasit dizilimini içeren bir fibril polimorf yapısı ele alınmıştır (Pdb kod: 6WPQ). Bu polimorf için D290V mutasyonunu içeren fibril yapısı ve mutasyonsuz vahşi tipteki fibril formunun yapısal özelliklerini ve kararlılığını araştırmak için MD simülasyon yöntemi kullanılmıştır. Simülasyon sonuçlarına göre, D290V yapısına sahip fibril formunun ilgili polimorf için kararlı, vahşi tipin ise kararsız bir konfigürasyona sahip olduğu, dolayısıyla bu fibril polimorfu için yalnızca D290V mutasyonlu fibril konformasyonun gelecek ilaç çalışmaları için hedef yapı olabileceği söylenebilir. Ayrıca, D290V yapısındaki düzenli istiflenmiş fibril yapısındaki bozulmaların her bir yaprak tabakasındaki beş ipliğin en üst ve alttaki ipliklerinden başladığı gözlemlenmiştir. Dahası, RMSF sonuçlarına göre D290V mutasyonundaki Asn289 ve Val290 aminoasitlerinin yüksek bölgesel kararlılıkları fibril bütünlüğünün korunmasında önemli rol oynadığı tespit edilmiştir.

Simulasyonlar sonucunda elde edilen tüm bulgularımızın literatür ile büyük uyum gösterdiği söylenebilir. Sonuç olarak çalışmamızın bulgularının, HnRNPA2'nin LC domaininin farklı fibril polimorf yapılarını hedef alacak gelecekteki muhtemel ilaç tasarımı çalışmaları için anahtarlar önseziler sağlamasını umut etmekteyiz.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmaya 2015-22794455-03 nolu Altyapı Projesi ile maddi kaynak sağlayan Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi'ne teşekkür ederiz.

## Çıkar Çatışması

Makaleye ait çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve makalenin yazılması aşamalarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederim.

## Yazar Katkısı

Makalenin planlanması, yürütülmesi ve yazılması makale tek yazarı olarak tarafımda yapıldığı beyan ederim.

## KAYNAKLAR

- Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindahl E, 2015. Gromacs: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers. *SoftwareX*, 1-2: 19-25.
- Alicı H, Karacaoğlan V, Demir K, 2018. İnsan Kemokin Reseptörü CXCR3'ün N-Terminal Bölgesinin Moleküler Dinamik Simülasyon Yöntemi ile Modellenmesi ve Yapısal Analizi. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 8 (2): 606-614.
- Alicı H, 2020. In Silico Analysis: Structural Insights About Inter-Protofilaments Interactions for A-Synuclein (50–57) Fibrils and its Familial Mutation. *Molecular Simulation*, 46 (12): 867-878.
- Alred EJ, Scheele EG, Berhanu WM, Hansmann UH, 2014. Stability of Iowa Mutant and Wild Type A B-Peptide Aggregates. *The Journal of Chemical Physics*, 141 (17): 175101.
- Amaya J, Ryan VH, Fawzi NL, 2018. The Sh3 Domain of Fyn Kinase Interacts with and Induces Liquid-Liquid Phase Separation of the Low-Complexity Domain of Hnrnpa2. *The Journal of Biological Chemistry*, 293 (51): 19522-19531.
- Berhanu WM, Hansmann UH, 2012. Side-chain Hydrophobicity and the Stability of A $\beta$ 16–22 Aggregates. *Protein Science*, 21 (12): 1837-1848.
- Burd CG, Dreyfuss G, 1994. Rna Binding Specificity of Hnrnp A1: Significance of Hnrnp A1 High-Affinity Binding Sites in Pre-Mrna Splicing. *The EMBO Journal*, 13 (5): 1197-1204.
- Bussi G, Donadio D, Parrinello M, 2007. Canonical Sampling through Velocity Rescaling. *The Journal of Chemical Physics*, 126 (1): 014101.
- Darden T, York D, Pedersen L, 1993. Particle Mesh Ewald: An N·Log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *The Journal of Chemical Physics*, 98 (12): 10089-10092.
- DeLano WL, 2002. Pymol: An Open-Source Molecular Graphics Tool. *CCP4 Newsletter on protein crystallography*, 40 (1): 82-92.
- Demir K, Alicı H, Yaşar F, 2018. Conformational Stability of the Tetrameric De Novo Designed Hexcoil-Ala Helical Bundle. *Chinese Journal of Physics*, 56 (1): 46-57.
- Duan Y, Du A, Gu J, Duan G, Wang C, Gui X, Ma Z, Qian B, Deng X, Zhang K, Sun L, Tian K, Zhang Y, Jiang H, Liu C, Fang Y, 2019. Parylation Regulates Stress Granule Dynamics, Phase Separation, and Neurotoxicity of Disease-Related Rna-Binding Proteins. *Cell Research*, 29 (3): 233-247.
- Essmann U, Perera L, Berkowitz ML, Darden T, Lee H, Pedersen LG, 1995. A Smooth Particle Mesh Ewald Method. *The Journal of Chemical Physics*, 103 (19): 8577-8593.
- Fitzpatrick, AW, Debelouchina GT, Bayro MJ, Clare DK, Caporini MA, Bajaj VS, MacPhee CE, 2013. Atomic Structure and Hierarchical Assembly of a Cross- $\beta$  Amyloid Fibril. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (14): 5468-5473.

- Gilks N, Kedersha N, Ayodele M, Shen L, Stoecklin G, Dember LM, Anderson P, 2004. Stress Granule Assembly Is Mediated by Prion-Like Aggregation of Tia-1. *Molecular Biology of The Cell*, 15 (12): 5383-5398.
- Gomes E, Shorter J, 2019. The Molecular Language of Membraneless Organelles. *The Journal of Biological Chemistry*, 294 (18): 7115-7127.
- Gui X, Luo F, Li Y, Zhou H, Qin Z, Liu Z, Gu J, Xie M, Zhao K, Dai B, Shin WS, He J, He L, Jiang L, Zhao M, Sun B, Li X, Liu C, Li D, 2019. Structural Basis for Reversible Amyloids of Hnrnpa1 Elucidates Their Role in Stress Granule Assembly. *Nature Communications*, 10 (1): 2006.
- Guil S, Cáceres JF, 2007. The Multifunctional Rna-Binding Protein Hnrnp A1 Is Required for Processing of Mir-18a. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14 (7): 591-596.
- Huang J, Rauscher S, Nawrocki G, Ran T, Feig M, de Groot BL, Grubmüller H, MacKerell AD, 2017. Charmm36m: An Improved Force Field for Folded and Intrinsically Disordered Proteins. *Nature Methods*, 14 (1): 71-73.
- Jain N, Lin H-C, Morgan CE, Harris ME, Tolbert BS, 2017. Rules of Rna Specificity of Hnrnp A1 Revealed by Global and Quantitative Analysis of Its Affinity Distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114 (9): 2206-2211.
- Jean-Philippe J, Paz S, Caputi M, 2013. Hnrnp A1: The Swiss Army Knife of Gene Expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (9): 18999-19024.
- Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML, 1983. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *The Journal of Chemical Physics*, 79 (2): 926-935.
- Kato M, Han Tina W, Xie S, Shi K, Du X, Wu Leeju C, Mirzaei H, Goldsmith Elizabeth J, Longgood J, Pei J, Grishin Nick V, Frantz Douglas E, Schneider Jay W, Chen S, Li L, Sawaya Michael R, Eisenberg D, Tycko R, McKnight Steven L, 2012. Cell-Free Formation of Rna Granules: Low Complexity Sequence Domains Form Dynamic Fibers within Hydrogels. *Cell*, 149 (4): 753-767.
- Kim HJ, Kim NC, Wang Y-D, Scarborough EA, Moore J, Diaz Z, MacLea KS, Freibaum B, Li S, Molliex A, Kanagaraj AP, Carter R, Boylan KB, Wojtas AM, Rademakers R, Pinkus JL, Greenberg SA, Trojanowski JQ, Traynor BJ, Smith BN, Topp S, Gkazi A-S, Miller J, Shaw CE, Kottlors M, Kirschner J, Pestronk A, Li YR, Ford AF, Gitler AD, Benatar M, King OD, Kimonis VE, Ross ED, Weihl CC, Shorter J, Taylor JP, 2013. Mutations in Prion-Like Domains in Hnrnpa2b1 and Hnrnpa1 Cause Multisystem Proteinopathy and Als. *Nature*, 495 (7442): 467-473.
- Lobanov MY, Bogatyreva NS, Galzitskaya OV, 2008. Radius of Gyration as an Indicator of Protein Structure Compactness. *Molecular Biology*, 42 (4): 623-628.
- Lu J, Cao Q, Hughes MP, Sawaya MR, Boyer DR, Cascio D, Eisenberg DS, 2020. Cryoem Structure of the Low-Complexity Domain of Hnrnpa2 and Its Conversion to Pathogenic Amyloid. *Nature Communications*, 11 (1): 4090-4090.
- Molliex A, Temirov J, Lee J, Coughlin M, Kanagaraj AP, Kim HJ, Mittag T, Taylor JP, 2015. Phase Separation by Low Complexity Domains Promotes Stress Granule Assembly and Drives Pathological Fibrillization. *Cell*, 163 (1): 123-133.
- Parrinello M, Rahman A, 1981. Polymorphic Transitions in Single Crystals: A New Molecular Dynamics Method. *Journal of Applied Physics*, 52 (12): 7182-7190.
- Purice MD, Taylor JP, 2018. Linking Hnrnp Function to Als and Ftd Pathology. *Frontiers in Neuroscience*, 12: 326-326.
- White R, Gonsior C, Krämer-Albers E-M, Stöhr N, Hüttelmaier S, Trotter J, 2008. Activation of Oligodendroglial Fyn Kinase Enhances Translation of Mrnas Transported in Hnrnp A2-Dependent Rna Granules. *The Journal of Cell Biology*, 181 (4): 579-586.
- Xi W, Hansmann UH, 2017. Ring-like N-fold Models of A $\beta$  42 Fibrils. *Scientific Reports*, 7 (1): 1-14.
- Xiang S, Kato M, Wu LC, Lin Y, Ding M, Zhang Y, Yu Y, McKnight SL, 2015. The Lc Domain of Hnrnpa2 Adopts Similar Conformations in Hydrogel Polymers, Liquid-Like Droplets, and Nuclei. *Cell*, 163 (4): 829-839.
- Zheng J, Ma B, Tsai CJ, Nussinov R, 2006. Structural Stability and Dynamics of an Amyloid-forming Peptide GNNQQNY from the Yeast Prion Sup-35. *Biophysical Journal*, 91 (3): 824-833.



**Atıf İçin:** Ertap H, Karabulut M, 2021. Bridgman Tekniği ile Büyütülen Saf ve Bor Katkılı InSe Tek Kristallerinin Morfolojik ve Optik Özelliklerinin Araştırılması. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1090-1101.

**To Cite:** Ertap H, Karabulut M, 2021. Investigation of Morphological and Optical Properties of Undoped and Boron Doped InSe Single Crystals Grown by Bridgman Technique. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1090-1101.

## Bridgman Tekniği ile Büyütülen Saf ve Bor Katkılı InSe Tek Kristallerinin Morfolojik ve Optik Özelliklerinin Araştırılması

Hüseyin ERTAP<sup>1\*</sup>, Mevlüt KARABULUT<sup>2</sup>

**ÖZET:** Bridgman tekniği ile büyütülen saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin morfolojik ve optik soğurma özellikleri araştırıldı. Saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin morfolojik ve optik soğurma özellikleri AFM, SEM ve UV-Vis spektrofotometre teknikleri ile araştırıldı. SEM analizleri geniş yüzeyli yüksek kalitede InSe tek kristallerinin stokiometrik eriyikten büyüdüğünü gösterdi. Optik soğurma spektrumlarının analizinden saf ve % 0.1 bor katkılı InSe tek kristallerine oranla % 0.5 bor katkılı InSe tek kristalinin eksiton pikinin genişlediği görüldü. Ayrıca, bor katkısı sonucu soğurma şiddetinin azaldığı ve soğurma kenarının daha uzun dalga boyuna doğru kaydığı görüldü. Optik soğurma ölçümlerinden, hem saf hem de bor katkılı InSe tek kristallerinin direkt yasak enerji bant aralığına sahip olduğu gözlemlendi. Ayrıca, saf InSe tek kristalinin yasak enerji bant aralığına oranla bor katkılı InSe tek kristallerinin yasak enerji bant aralıklarının katkı oranına bağlı olarak azaldığı görüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Bridgman, saf ve bor katılı InSe tek kristalleri, optik soğurma.

### Investigation of Morphological and Optical Properties of Undoped and Boron Doped InSe Single Crystals Grown by Bridgman Technique

**ABSTRACT:** Morphological and optical absorption properties of undoped, 0.1 at% and 0.5 at% boron doped InSe single crystals grown by Bridgman technique were investigated. Morphological and optical absorption properties of undoped, 0.1 at% and 0.5 at% boron doped InSe single crystals have been investigated by AFM, SEM and UV-Vis spectrophotometer techniques. SEM analysis showed that high quality InSe single crystals with large surface area were grown from the stoichiometric melt. From the analysis of optical absorption spectra showed that the exciton peak in 0.5 at% boron doped InSe single crystal expanded by relative to the undoped and 0.1 at% boron doped InSe single crystals. In addition, it was seen that the intensity of absorption decreased and absorption edge shifted to longer wavelengths as a result of boron doping. Optical absorption measurements showed that both undoped and boron doped InSe single crystals had direct forbidden band energies. Also, energy band gaps in boron doped InSe single crystals decreased with increasing boron concentration relative to the energy band gap of undoped InSe single crystal.

**Keywords:** Bridgman, undoped and boron doped InSe single crystals, optical absorption.

<sup>1</sup> Hüseyin ERTAP ([Orcid ID: 0000-0003-3896-6188](https://orcid.org/0000-0003-3896-6188)), Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, Kars, Türkiye

<sup>2</sup> Mevlüt KARABULUT ([Orcid ID: 0000-0002-0227-318X](https://orcid.org/0000-0002-0227-318X)), Gebze Teknik Üniversitesi, Temel Bilimler Fakültesi, Fizik Bölümü, Gebze, Kocaeli, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Hüseyin ERTAP, e-mail: huseyinertap@kafkas.edu.tr

Bu çalışma Hüseyin Ertap'ın Doktora Tezinin bir kısmından üretilmiştir.

## GİRİŞ

Tabakalı yarıiletken bir bileşik olan İndiyum Selenit (InSe) kristali, GaSe, GaTe ve GaS gibi yarıiletken bileşikler içerir. A<sup>III</sup>B<sup>VI</sup> yarıiletken ailesinin önemli bir üyesidir (Gouskov ve ark., 1982; Ertap ve ark., 2011; Yüksek ve ark., 2012; Ertap ve ark., 2015; Ertap ve ark., 2016; Ertap, 2018). InSe kristallerinde tabakalar arasında zayıf Van-der Waals bağı varken, tabakalar içinde atomlar birbirlerine güçlü kovalent bağlarla bağlanmıştır ve bu kristallerde gözlemlenen anizotropi bu durumdan kaynaklanmaktadır (Olguin ve ark., 2003; Zhirko ve ark., 2007; Ertap ve Karabulut, 2019). InSe kristalinde her bir paket sırasıyla Se-In-In-Se şeklinde sıkı paketlenmiş dört alt tabakadan oluşur ve bir In atomu üç Se atomu tarafından çevrelenerek tetragonal bağ oluşturur (Blasi ve ark., 1983; Zhirko ve ark., 2007). Eksiton seviyelerine sahip olan InSe kristali koyu siyah renktedir ve kolayca tabakalarına ayrılabilir (Cingolani ve ark., 1985). InSe yarıiletken bileşiği tek kristal olarak genellikle stokiometrik ve stokiometrik olmayan eriyiklerden Bridgman-Stockbarger yöntemi ile elde edilmektedir (Gouskov ve ark., 1982; Blasi ve ark., 1982; Gurbulak ve ark., 1999; Ertap ve Karabulut, 2019). Bridgman-Stockbarger yöntemine ek olarak, farklı boyutlardaki InSe yarıiletken bileşiklerini büyütme için birçok yöntem/teknik kullanılmaktadır. Bu yöntem/tekniklerden bazıları Czochralski (Chevy ve ark., 1978), Moleküler Demet Epitaksi (Emery ve ark., 1989), Kimyasal Banyo Depolama (CBD) (Asabe ve ark., 2008), Elektrodepozisyon (Gopal ve ark., 2005), Termal Buharlaştırma (Viswanathan ve ark., 2004) ve Modifiye Kimyasal Banyo Depolama (M-CBD) (Pathan ve ark., 2005) olarak bilinmektedir. A<sup>III</sup>B<sup>VI</sup> yarıiletken kristal ailesinin bir bireyi olan InSe kristalinin üç politipinin mevcut olduğu bilinmektedir. Bu politipler  $\gamma$ -InSe,  $\epsilon$ -InSe ve  $\beta$ -InSe olarak bilinir. Sırasıyla  $\gamma$ ,  $\epsilon$  ve  $\beta$  politiplerinin uzay grupları  $C_{3v}^5 (R3m)$ ,  $D_{3h}^1 (P\bar{6}m2)$ ,  $D_{6h}^4 (P6_3/mmc)$  olarak belirtilmiştir (Chevy ve ark., 1977; Gouskov ve ark., 1982; Blasi ve ark., 1982; Blasi ve ark., 1983; Blasi ve ark., 1990; Rushchanskii, 2004; Ertap ve Karabulut, 2019). InSe yarıiletken kristalleri genellikle  $\gamma$ -politipi ile rombohedral kristal yapıya sahip iken (Gouskov ve ark., 1982)  $\epsilon$  ve  $\beta$  politipleri hekzagonal yapıya sahiptir (Blasi ve ark., 1983; Blasi ve ark., 1990; Ertap ve Karabulut, 2019). Rombohedral yapıya sahip olan  $\gamma$ -InSe politipinin örgü parametrelerinin  $a = 4.002 \text{ \AA}$  ve  $c = 24.946 \text{ \AA}$  olduğu bilinmektedir (Chevy ve ark., 1977; Chevy, 1981; Blasi ve ark., 1983; Blasi ve ark., 1990; Ertap ve Karabulut, 2019). Ayrıca, hekzagonal yapıda sahip olan  $\beta$ -InSe politipinin örgü parametreleri  $a = 4.005 \text{ \AA}$  ve  $c = 16.640 \text{ \AA}$  (Blasi ve ark., 1983) iken  $\epsilon$ -InSe politipinin örgü parametreleri ise  $a = 4.00 \text{ \AA}$  ve  $c = 16.70 \text{ \AA}$  olarak verilmektedir (Blasi ve ark., 1990).

InSe yarıiletken kristalinin direkt ve indirekt yasak enerji bant aralığı değerleri sırasıyla 1.3 eV ve 1.25 eV olarak rapor edilmiştir (Segura ve ark., 1983; Ertap ve ark., 2015) ve bu özellik InSe kristalini güneş pili uygulamaları için önemli bir materyal yapmaktadır (Segura ve ark., 1983; Kobbı ve Kesri, 2004). InSe yarıiletken kristalinin fotovoltajik uygulama alanlarında ve heteroeklem aygıtlarında, Schottky diyotlarda, kapasitörlerde, gaz sensörlerinde, anahtarlama devrelerinde, detektörlerde ve mikrobatoryalar gibi mikro aygıtlarda, ticari ve endüstriyel alanlarda potansiyel uygulamaları mevcuttur (Di Giulio ve ark., 1983; Segura ve ark., 1983; Parlak ve ark., 1995; Kobbı ve Kesri, 2004; Viswanathan ve ark., 2004; Mustafa ve ark., 2010). Büyütme koşulları, büyütme parametreleri ve katkı elementine bağlı olarak InSe yarıiletken kristali p ve n tipi olarak büyütülebildiğinden oldukça ilgi çekici bir materyaldir (Ikari ve ark., 1981). InSe kristalleri uzun yıllardır saf kristal olarak büyütülmenin yanı sıra Er, Zn, Ho, Dy, Gd, Mn, Sn, As, Ag, N ve son zamanlarda B atomları ile farklı oranlarda katkılanarak bu katkıların elektrik, optik, fotoluminesans, vb. gibi özelliklerine etkisi araştırılmıştır (Ikari ve ark., 1981; Gürbulak ve ark., 1998; Gürbulak, 1999; Gurbulak ve ark., 1999; Shigetomi ve Ikari, 2003; Gürbulak, 2004; Deniz, 2004; Lashkarev ve ark., 2007; Bacıoğlu ve ark., 2014; Gürbulak ve ark., 2014; Ertap ve ark., 2015; Gürbulak ve ark., 2016; Ertap ve Karabulut, 2019). InSe, InSe:Er ve InSe:Ho

kristallerinin optik soğurma ölçümleri 10-320 K sıcaklık aralığında yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda InSe kristalinin 10 K, 200 K ve 300 K sıcaklıklarındaki direkt yasak enerji bant aralıkları sırasıyla 1.339 eV, 1.289 eV ve 1.256 eV, InSe:Er kristalinin aynı sıcaklık değerlerindeki direkt yasak enerji bant aralıkları sırasıyla 1.338 eV, 1.288 eV ve 1.253 eV (Gürbulak ve ark., 1999) ve InSe:Ho kristalinin 10 K, 100 K, 200 K ve 280 K sıcaklıkları için direkt yasak enerji bant aralıkları sırasıyla 1.332 eV, 1.313 eV, 1.283 eV ve 1.255 eV olarak hesaplanmıştır (Gürbulak ve ark., 1998). n-InSe ve n-InSe:Dy kristallerinin optik soğurma ölçümleri sıcaklığın bir fonksiyonu olarak gerçekleştirilmiş ve yapılan ölçümler sonucunda, 10 K ve 300 K'deki direkt yasak enerji bant aralıkları sırasıyla n-InSe kristali için 1.350 eV ve 1.267 eV, n-InSe:Dy kristali için ise 1.344 eV ve 1.263 eV olarak bulunmuştur (Gürbulak, 1999). Yapılan bir başka çalışmada ise 10 K ve 300 K'deki direkt yasak enerji bant aralıkları sırasıyla InSe kristali için 1.343 eV ve 1.259 eV ve InSe:Gd kristali için ise 1.335 eV ve 1.253 eV olarak bulunmuştur (Gürbulak, 2004). InSe tek kristalinin elektrik alan altındaki soğurma ölçümleri sıcaklığın bir fonksiyonu olarak gerçekleştirilmiş ve uygulanan 5 kV/cm elektrik alan altında, soğurma spektrumu şiddetinin azaldığı ve soğurma kenarının uzun dalga boyuna doğru kaydığı gözlemlenmiştir (Ateş ve ark., 2003).

Bu çalışmada, Bridgman tekniği ile büyütülen saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin morfolojik ve optik özellikleri Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM), Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve UV-Vis yöntemleri ile araştırıldı.

## MATERYAL VE METOT

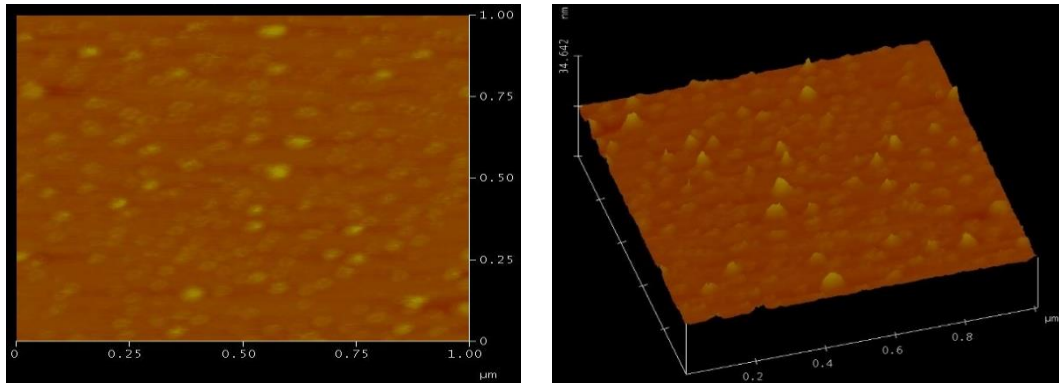
Saf ve bor katkılı InSe tek kristallerinin büyütme işleminden önce bu kristalleri oluşturan bileşiklerin sentez işleminin titizlikle gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Saf In (% 99.999), Se (% 99.999) ve B (% 99.7) elementlerinden stokiometrik oranlarda hazırlanan bileşimler çok titizlikle temizlenmiş kuvars ampullere doldurularak  $10^{-4}$  Hg.mm basınçta kapatılmıştır. In, Se ve B elementleri ile stokiometrik oranlarda doldurularak kapatılmış olan kuvars ampullerin bulunduğu sentezleme fırınının sıcaklığı 25 °C/saat ısıtma hızı ile 24 saatte 600 °C sıcaklığına getirildi. 600 °C sıcaklığında ergimiş halde bulunan elementlerin etkileşmesi sonucunda saf ve bor katkılı InSe yarıiletken bileşiklerinin oluşumu gerçekleşir. Bu sıcaklıklarda ampullerin titreştirilmesi büyütülmek istenen yarıiletken bileşiğin homojen olmasını sağladığından dolayı her sıcaklık artışında ampuller çalkalanmış/titreştirilmiştir. İçerisinde saf ve farklı oranlarda bor katkılı InSe yarıiletken bileşiklerinin bulunduğu kuvars ampuller 600 °C sıcaklığında 30 dakikalık periyotlarda 6 saat boyunca çalkalanarak/titreştirilerek bekletildi. Bu sıcaklık değerinden sonra sentezleme fırınının sıcaklığı 25 °C/saat hızı ile 800 °C sıcaklığına çıkarıldı. Bu son sıcaklıkta ampulde bulunan saf ve bor katkılı InSe yarıiletken bileşiklerinin sıvı durumda olduğu gözlemlendi. Bu sıcaklık değerinde 30 dakikalık periyotlarda 12 saat boyunca kuvars ampuller çalkalanarak/titreştirilerek bekletildi. Çalkalama/Titreştirme işleminden sonra saf ve bor katkılı InSe yarıiletken bileşikleri 800 °C sıcaklığında 48 saat bekletildi. Son olarak saf ve bor katkılı InSe yarıiletken bileşiklerinin sentezlendiği fırının sıcaklığı 800 °C sıcaklığından 25 °C/saat hızı ile oda sıcaklığına 32 saatte düşürüldü. Bütün bu işlemler sonucunda saf ve bor katkılı InSe yarıiletken bileşiklerinin sentezi gerçekleştirilmiş oldu. Sentezleme işlemi gerçekleştirilen saf InSe yarıiletken bileşiğinin doldurulmuş olduğu kuvars ampul merkezi olacak şekilde Bridgman fırınına yerleştirildi. Saf InSe yarıiletken bileşiğinin bulunduğu kuvars ampulün Bridgman fırınına yerleştirilmesi işleminden sonra Bridgman fırınının sıcaklığı 9 saat içerisinde 660 °C sıcaklık değerine çıkarıldı ve bu sıcaklıkta saf InSe yarıiletken bileşiği eriyik halde olduğu gözlemlendi. Termal dengenin sağlanması için Bridgman fırın bu sıcaklıkta 15 saat bekletildi. Bu işlemden sonra Bridgman fırınının 2 mm/saat hızıyla dikey hareketi gerçekleştirildi. Saf InSe yarıiletken tek kristalinin

büyütülme işlemi için gerekli olan Bridgman fırınının hareketinin tamamlanmasından sonra Bridgman fırını oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Saf InSe yarıiletken tek kristali için izlenen bu süreç bor katkılı InSe yarıiletken tek kristalleri içinde gerçekleştirilmiştir. Büyütme işlemi gerçekleştirilen saf ve bor katkılı InSe tek kristalleri yaklaşık olarak 18 mm çapa ve 40 mm uzunluğa sahiptirler. Bridgman tekniği ile büyütülen saf ve bor katkılı InSe tek kristalleri ayna gibi parlak, pürüzsüz ve temiz yüzeylere sahip olduklarından dolayı herhangi bir kimyasal işleme ve parlatma gibi bir işleme gerek yoktur. Tabakalı yapılarından dolayı saf ve bor katkılı InSe tek kristalleri neşter/jilet yardımıyla kolayca tabakalara ayrılıp deneyler için gerekli numuneler hazırlanabilmektedir. Büyütülen saf ve bor katkılı InSe tek kristallerinden analizler için  $20\pm 2$   $\mu\text{m}$  kalınlığında ve  $5\times 5$   $\text{mm}^2$  boyutlarında örnekler hazırlandı. Bu çalışmada, Bridgman yöntemi ile büyütülen saf ve bor katkılı InSe tek kristallerinin bor oranları İndüktif Eşleşmiş Plazma (Inductively Coupled Plasma-ICP) yöntemi ile belirlendi. ICP ölçümleri analizi sonucunda çalışılan numuneler saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristalleri olarak adlandırıldı.

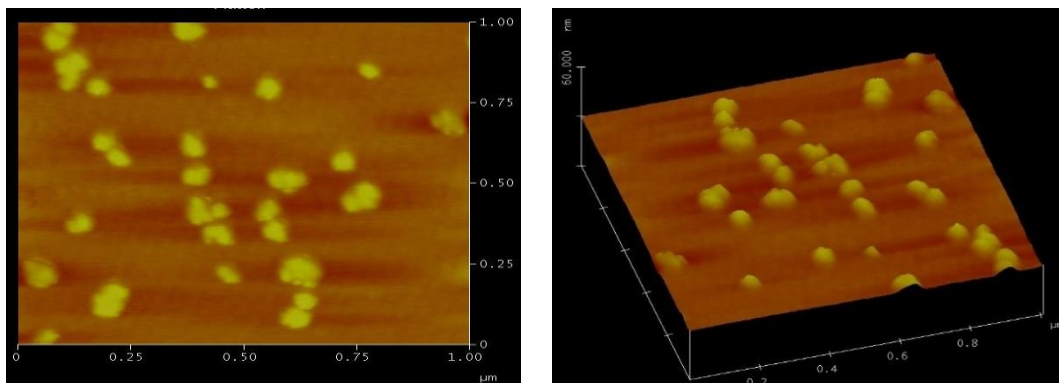
Saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin yüzey morfolojisi PSIA marka XE-100 model Atomik Kuvvet Mikroskobu ile 2.00 Hz tarama hızı ve  $1024\times 1024$  piksel çözünürlük parametreleriyle ve FEI marka Nova Nanosem 430 model Taramalı Elektron Mikroskobu ile 10 kV hızlandırma voltajında, 10.000X, 5.000X ve 1.000X büyütme oranları ile gerçekleştirildi. Bu analizlere ek olarak, optik soğurma ölçümleri ise Perkin-Elmer Lambda 25 UV-Vis spektrofotometre ile 190-1100 nm dalga boyu aralığında 0.5 nm'lik adımlarla oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

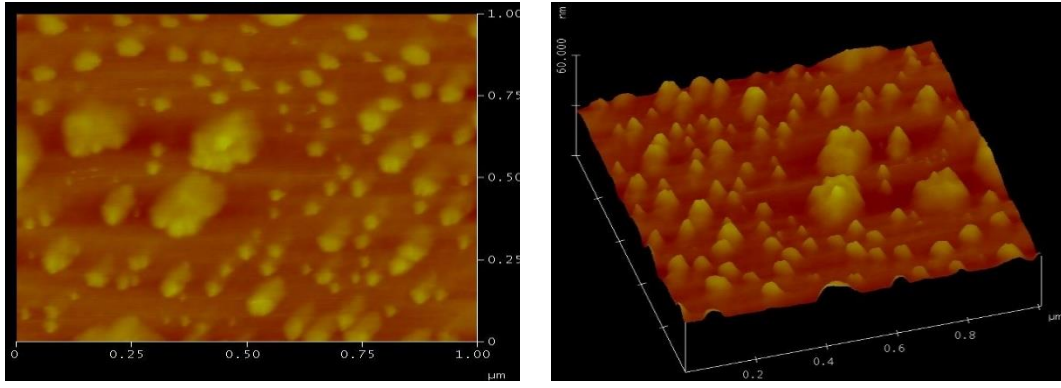
Saf, %0.1 ve %0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin morfolojik özellikleri AFM ve SEM ölçümleri ile gerçekleştirildi. Saf, %0.1 ve %0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin üç boyutlu ve tek boyutlu AFM görüntüleri sırasıyla Şekil 1, Şekil 2 ve Şekil 3'te verilmektedir.



Şekil 1. Saf InSe tek kristalinin AFM görüntüleri.



Şekil 2. % 0.1 bor katkılı InSe tek kristalinin AFM görüntüleri.



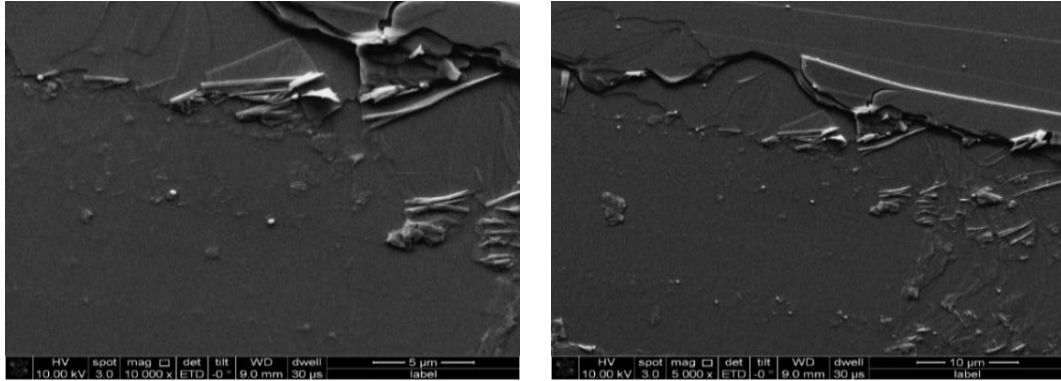
Şekil 3. % 0.5 bor katkılı InSe tek kristalinin AFM görüntüleri.

Saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinden hazırlanan örneklerin yüzeyleri tamamlanmış bağı sahiptirler. Bu çalışmada kullanılan Saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin AFM görüntülerinde çok az tepe ve çukurlar görülmektedir. Şekil 1, Şekil 2 ve Şekil 3'te sırasıyla saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin (0001) yüzeyinin AFM görüntüleri verilmektedir. Saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin AFM analizlerinden sırasıyla tanecik yükseklikleri 1.752 nm, 2.341 nm ve 4.107 nm ve Rms pürüzsüzlükleri ( $R_q$ ) ise 0.491 nm, 0.940 nm ve 1.627 nm olarak hesaplandı. Bu kristallerin XRD analizlerinden hesaplanan parçacık boyutunun bor katkı oranına bağlı olarak azaldığı (Ertap ve Karabulut, 2019) ve parçacık boyutunun azalmasına bağlı olarak yüzey pürüzsüzlüğü ve tanecik yüksekliğinin artması beklenen bir sonuçtur. Bu sonuçlardan da görüldüğü gibi bor katkı oranına bağlı olarak tanecik yüksekliği, ortalama pürüzsüzlük ve Rms pürüzsüzlük değerlerinin arttığı görülmektedir. Yine de bu değerlerin oldukça küçük olması büyütülen saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin AFM görüntülerinden alınan kesitlerde, tepe ve çukurların az olması büyütülen kristallerin kalitesini, politipizmden kaynaklanan kusurların ve örgü kusurlarının az olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin oda sıcaklığındaki optik soğurma ölçümlerinde eksiton soğurulması durumu açıkça görülmektedir ve bu durum da büyütülen tek kristallerin örgü kusurlarının az olduğunu göstermektedir. AFM görüntülerinde görülen tepe ve çukurlardan daha önce yapılan çalışmalarda da bahsedilmiştir (Uosaki ve Koinuma, 1993; Hirohata ve ark., 2006; Khandozhko ve ark., 2014). Atomik ölçekte InSe kristalindeki ayna yüzeylerde görülen düzensizlikler, dislokasyonlar ve politiplerden kaynaklanmaktadır (Blasi ve ark., 1985; Uosaki ve Koinuma, 1993; Balitskii ve ark., 2004; Bakhtinov ve ark., 2007; Khandozhko ve ark., 2014). Ayrıca, bir başka çalışmada ise InSe tek kristallerinde düzensizliğin azalması ile mükemmel tabakalı kristallerin oluşabileceği ve böylece eksiton oluşumunun gerçekleşeceği, ancak mükemmel olmayan InSe tek kristallerinde ise eksiton durumunun gözlemlenemeyeceği belirtilmiştir (Khandozhko ve ark., 2014). Saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin birkaç farklı büyütme oranı kullanılarak elde edilen SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4, Şekil 5 ve Şekil 6'da verilmektedir.

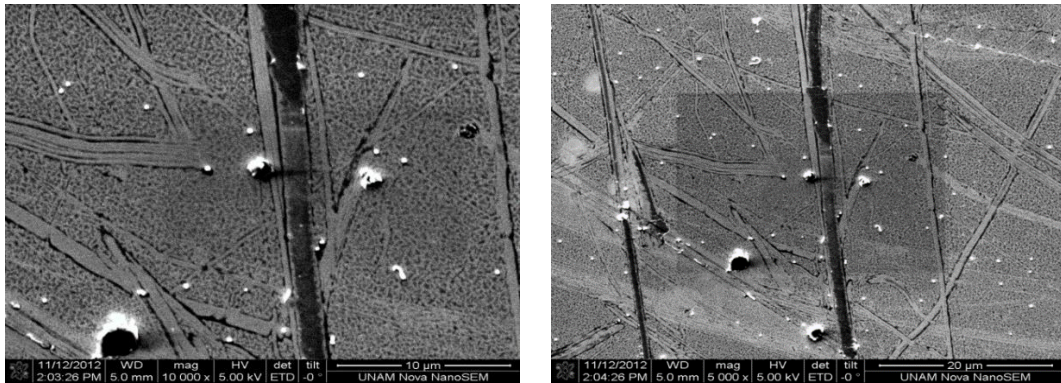
Yapılan analizler sonucunda saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin farklı kesitlerinden alınan birbirlerine oldukça yakın olan kristalit boyutlarının sırasıyla 140-62 nm, 120-58 nm ve 108-46 nm aralıklarında değiştiği hesaplandı. Bu sonuçlara göre bor katkı oranına bağlı olarak birbirlerine oldukça yakın olan kristalit boyutunun azaldığı görüldü ve benzer değişimler AFM analizlerinde de görülmektedir. Hesaplanan bu değerler daha önce saf, Ag ve Zn ile katkılanmış InSe kristalleri için yapılan çalışmalarla uyum içerisindedir (Gürbulak ve ark., 2014; Gürbulak ve ark., 2016). Ayrıca, bu kristaller için daha önce XRD analizlerinden yapılan hesaplamalarda kristalit boyutunun saf

InSe tek kristaline oranla bor katkılı InSe tek kristallerinde katkı oranına bağlı olarak azaldığı görüldü (Ertap ve Karabulut, 2019). Saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin yüzey pürüzlülüğünün çok az olduğu ve kristallerin ampulün keskin ucundan (büyütme ampulünün sivri kısmı) doğru büyüdüğü görülmektedir ve yüzey pürüzsüzlüğünün değişimi AFM ölçümlerin elde edilen sonuçlarda da görülmektedir. InSe tek kristalinin tabakalı yapısında tabakaların paketlenmesinden veya büyüme sürecinden kaynaklanan dislokasyonların olduğu bilinmektedir. Genellikle, stokiyometrik eriyikten büyütülen InSe tek kristallerinin *c* eksenine büyüme ampulünün eksenine dik olmaktadır. Saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin SEM görüntülerinin analizleri bu bilgileri doğrulamakta ve bu sonuçlar daha önce yapılan çalışmalar ile uyum içerisindedir (Blasi ve ark., 1982; Blasi ve ark., 1985; Blasi ve ark., 1989; Balitskii, 2006; Mustafa ve ark., 2010; Siciliano ve ark., 2011). InSe tek kristalleri için yapılan SEM analizleri sonucunda geniş yüzeyli mükemmel bölge InSe tek kristallerinin stokiyometrik eriyikten büyüdüğü belirtilmiştir (Blasi ve ark., 1982; Blasi ve ark., 1989). SEM ölçümlerinden elde edilen görüntülerde katkılı numunelerin yüzeylerinde değişimler olduğu görülmektedir. Bu değişimlerin, büyütülen tek kristallerin büyütülme koşulları, katkı oranı ve eklenen safsızlıklardan kaynaklanmaktadır.

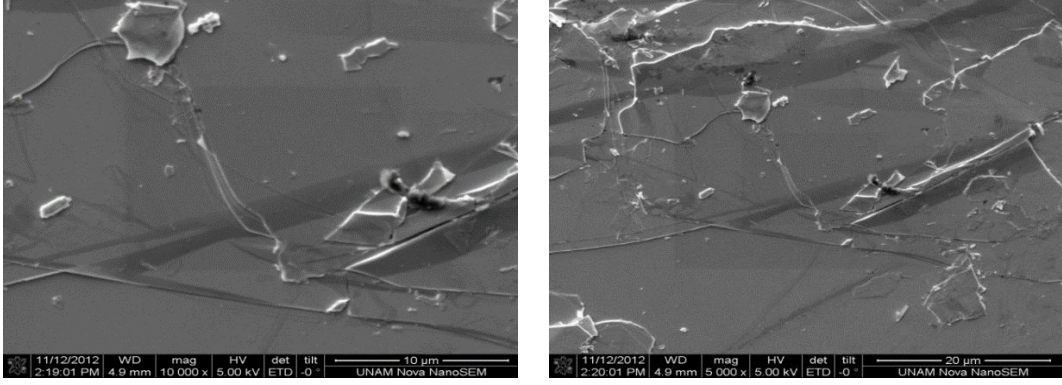
Saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin optik soğurma ölçümleri oda sıcaklığında (300 K) yapıldı ve optik soğurma spektrumlarından elde edilen grafikler sırasıyla Şekil 7, Şekil 8 ve Şekil 9'da verilmektedir.



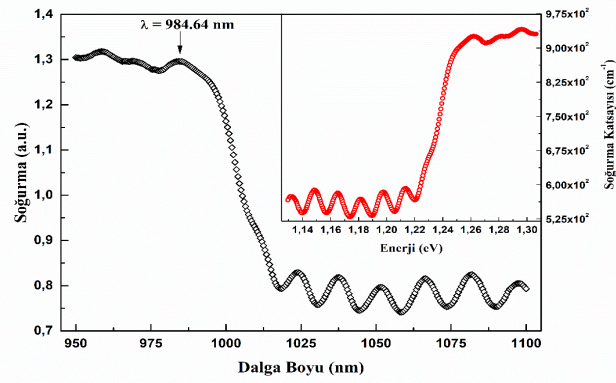
Şekil 4. Saf InSe tek kristalinin SEM görüntüleri.



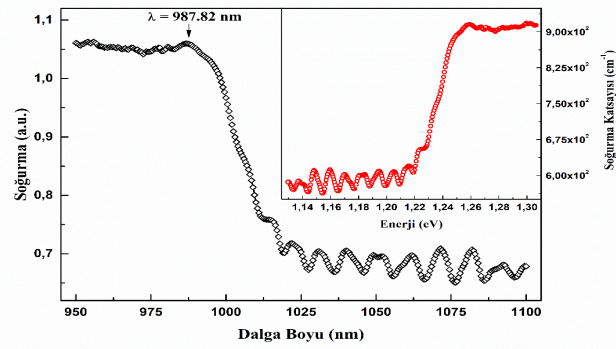
Şekil 5. % 0.1 bor katkılı InSe tek kristalinin SEM görüntüleri.



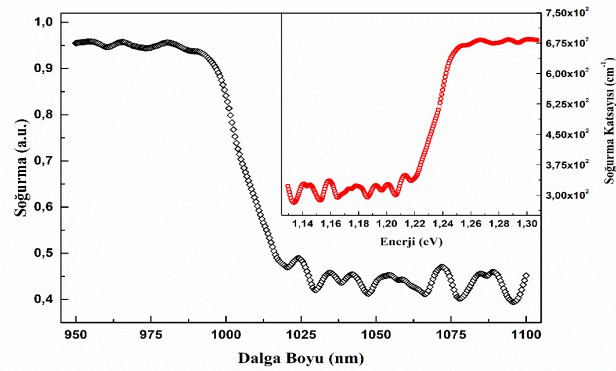
Şekil 6. % 0.5 bor katkılı InSe tek kristalinin SEM görüntüleri.



Şekil 7. Saf InSe tek kristalinin optik soğurma spektrumu.



Şekil 8. % 0.1 bor katkılı InSe tek kristalinin optik soğurma spektrumu.



Şekil 9. % 0.5 bor katkılı InSe tek kristalinin optik soğurma spektrumu.

Şekil 7 ve Şekil 8'den görüldüğü gibi saf ve % 0.1 bor katkılı InSe tek kristallerine ait optik soğurma spektrumlarında sırasıyla 984.64 nm ve 987.82 nm dalga boylarında gözlenen pikler eksiton pikleridir. Saf ve % 0.1 bor katkılı InSe tek kristallerinin optik soğurma spektrumlarında eksiton pikleri net olarak gözlenirken % 0.5 bor katkılı InSe tek kristalinin optik soğurma spektrumunda ise eksiton pikinin tam olarak kaybolmamakla birlikte genişlediği görülmektedir. Saf ve % 0.1 bor katkılı InSe tek kristallerindeki bu eksiton durumu iletim bandının hemen altında bulunmaktadır. Literatürden InSe tek kristallerinde direkt serbest eksiton bağlanma enerjisinin 14.5 meV (Camassel ve ark., 1978) olduğu bilinmektedir. Saf ve % 0.1 bor katkılı InSe tek kristalleri için eksiton bağlanma enerjisi dikkate alındığında oda sıcaklığındaki yasak enerji bant aralıkları sırasıyla 1.274 eV ve 1.270 eV olarak hesaplandı. Saf ve % 0.1 bor katkılı InSe tek kristallerinden farklı olarak % 0.5 bor katkılı InSe tek kristalinde eksiton durumu oda sıcaklığında genişlediğinden bantlararası geçiş durumu gerçekleşmektedir. Şekil 9'un analizden % 0.5 bor katkılı InSe tek kristalinin 1016 nm dalga boyuna denk gelen soğurma kenarına sahip olduğu görülmektedir. % 0.5 bor katkılı InSe tek kristalinin bu dalga boylarından daha düşük dalga boylarındaki ışığı şiddetli bir şekilde soğurduğu görülmektedir. Bundan dolayı, % 0.5 bor katkılı InSe tek kristalinin temel bant aralığının hemen altındaki foton enerjilerinde güçlü soğurma olduğu gözlemlenir. Bu durum, % 0.5 bor katkılı InSe tek kristalinin 1016 nm dalga boylarından daha düşük enerjili ışınları, değerlik bandındaki elektronları iletim bandının üstüne (rezonans durumu) uyuracağı anlamına gelmektedir. İşte bu soğurma bant kenarı, eksiton pikinin genişlediği % 0.5 bor katkılı InSe tek kristalinde yasak enerji bant aralığı değerini göstermektedir. Bu bilgilerden yola çıkarak % 0.5 bor katkılı InSe tek kristalinin oda sıcaklığındaki yasak enerji bant aralığı 1.222 eV olarak hesaplandı. Saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinde soğurma valans bandından iletim bandına direkt geçişlerle olduğundan bu çalışmada kullanılan bütün tek kristaller direkt yasak enerji bant aralığına sahiptirler. Bu çalışmada incelenen InSe tek kristalleri için bulunan yasak enerji bant aralıkları literatürde InSe kristalleri için verilen değerlerle uyumludur (Blasi ve ark., 1983; Shigetomi ve Ikari, 2003; Deniz, 2004). Saf ve azot (N) implante edilmiş numunelerde direkt yasak enerji bant aralığı her iki numune için de 1.22 eV olarak verilmiştir (Deniz, 2004). Genel olarak literatürde InSe tek kristali için yasak enerji bant aralığı değeri 1.2-1.3 eV civarında verilmiştir. Hesaplanan yasak enerji bant aralığı değerleri 1.2 eV (Di Giulio ve ark., 1983), 1.24 eV (Likforman ve ark., 1975), 1.29 eV (Ateş, 2002), 1.3 eV (Sreekumar ve ark., 2006) ve 1.3 eV (Segura ve ark., 1983) olarak belirtilmiştir. Kalay (Sn) katkılı InSe kristali üzerine yapılan çalışmada, Sn atomunun yarıçapının In ve Se atomlarının yarıçapından büyük olmasından dolayı örgü parametrelerini genişlettiğini ve böylece yasak enerji bant aralığı değerinin arttığı belirtilmiştir (Duman, 2006). InSe tek kristaline oranla bor katkı oranına bağlı olarak katkılı InSe tek kristallerinin yasak enerji bant aralığı değerlerinin azaldığı görüldü. Bor katkılı InSe tek kristallerinde görülen kaymalar örgü kusurlarına paralel olarak bor atomlarının örgüdeki konumuna etkisi ile ilgilidir. Küçük iyonik yarıçaplı bor ( $r_B = 0.41 \text{ \AA}$ ) atomlarının tetragonal bağda daha büyük iyonik yarıçaplı In ( $r_{In} = 0.94 \text{ \AA}$ ) ile yer değiştirmesinden dolayı kristalin örgü deformasyon potansiyelinde bir değişim gerçekleştirebilir. Bor katkılı InSe tek kristalleri için hesaplanan yasak enerji bant aralığı değerlerindeki azalma ise katkılanan bor atomlarının yarıçapının In ve Se ( $r_{Se} = 0.64 \text{ \AA}$ ) atomlarının yarıçap değerlerinden küçük olması ve bu nedenle örgü parametrelerinin küçülmesi ile açıklanabilir.

InSe tek kristali için deneysel sonuçlardan hesaplanan ve literatürde verilen yasak enerji bant aralığı değerlerinin bu şekilde değişmesi, büyütme koşullarına bağlı olarak kristallerin farklı oranlarda safsızlık ve kusur seviyeleri içerdiğini göstermektedir. Genel olarak bir tek kristalin oda sıcaklığında ölçülen soğurma spektrumunda eksiton pikinin gözlemlenmesi ölçümü yapılan kristalin kalitesinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Büyütülen saf ve % 0.1 bor katkılı InSe tek kristallerinde eksiton



piki görülmekle birlikte % 0.5 bor katkılı InSe tek kristalinde de bu eksiton pikinin tamamen kaybolmamakla birlikte genişlemesi büyütülen saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin kalitesini göstermektedir. Aynı kalınlıktaki saf ve bor katkılı InSe tek kristallerinin optik soğurma spektrumlarının analizlerinden, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin katılama oranına bağlı olarak soğurma katsayısının ve soğurma şiddetinin saf InSe tek kristaline oranla zayıfladığı (azaldığı) hesaplamalardan ve çizilen grafiklerden açıkça görülmektedir. Genellikle oda sıcaklığı ve yüksek sıcaklıklarda fonon-fonon ve fonon-elektron etkileşmeleri oldukça yoğundur ve bundan dolayı eksiton durumlarının gözlenmesi zordur. Eksitonların gözlenememesinin nedeni ise eksitonların fononlarla çarpışmalarıdır. Yüksek sıcaklıklarda çarpışma ihtimali artacağından eksitonların ömrü kısalacak ve böylece soğurma spektrumunda eksiton pikinin genişlemesi sonucu ortaya çıkacaktır. Ancak oda sıcaklığında bile büyütülen saf ve % 0.1 bor katkılı InSe tek kristallerinde eksiton piki net olarak görülmektedir. Ayrıca, % 0.5 bor katkılı InSe tek kristalinde soğurma kıyısının uzun dalga boyuna doğru kaydığı ve eksiton pikinin tamamen kaybolmamakla birlikte genişlediği gözlemlendi. Bu kaymalar da eksiton-fonon ve eksiton-kusur etkileşmesi ile açıklanmaktadır.

Ayrıca, saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin soğurma spektrumlarında da 1100-1025 nm dalga boyu aralığında görülen pikler, girişim çiftlerinin maksimumları ve minimumları olarak bilinmektedir (Blasi ve ark., 1983). Yüksek kalitede büyütülmüş tabakalı tek kristallerde eksitonun düşük enerji kuyruğunda girişim çiftleri açıkça gözlemlenir. Girişim çiftlerinin gözlemlendiği tek kristallerde maksimum ve minimumlar kolayca tayin edilebilir. Bu yöntem bantlararası geçiş aralığında kullanılabilir ancak eksiton bölgesinde uygulanamaz. Girişim çiftinin oluşması için incelenen tek kristalin büyük kırılma indisi ve eksiton bölgesine oranla düşük soğurma katsayısına sahip olması gerekmektedir. İncelenen kristaldeki dahili çatlaklar veya düzensiz kalınlık gibi kusurlar kırınımında  $\lambda$ 'nın tekrarlanmasında ve genliğinde düzensizlikler oluşturur (Antonioli ve ark., 1977). Saf InSe tek kristalinin soğurma spektrumundan görüldüğü gibi % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin soğurma spektrumlarında da girişim çiftlerinin maksimumları ve minimumları görülmektedir. InSe tek kristallerinde bor katkı oranına bağlı olarak soğurma spektrumlarında gözlenen girişim çiftlerindeki bozulma olayı daha fazla olmaktadır. Bu girişim çiftleri saf InSe tek kristalinde net olmak üzere ve % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinde gözlenmesi bir kez daha büyütülen kristallerin kalitesini göstermektedir.

## SONUÇ

Bu çalışmada, Bridgman tekniği ile büyütülen saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin morfolojik ve optik özellikleri araştırıldı. Saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin AFM görüntülerinde tepe ve çukurların az olması büyütülen bütün tek kristallerin kalitesini, politipizmden kaynaklanan kusurların ve örgü kusurlarının az olduğunu göstermektedir. Yapılan SEM analizleri sonucunda saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin birbirlerine oldukça yakın olan kristalit boyutları sırasıyla 140-62 nm, 120-58 nm ve 108-46 nm olarak hesaplandı ve benzer sonuçlar AFM analizlerinde de görüldü. Saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin çok az yüzey pürüzü olmakla birlikte genelde pürüzsüz olduğu ve kristallerin ampulünün sivri kısmından büyüdüğü görülmektedir. SEM analizleri sonucunda geniş yüzeyli mükemmel bölgeyi saf ve bor katkılı InSe tek kristallerinin stokiometrik eriyikten büyüdüğü görüldü. Saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin optik soğurma ölçümleri oda sıcaklığında gerçekleştirildi ve bütün tek kristallerin yasak enerji bant aralığı değerleri hesaplandı. Optik soğurma ölçümlerinden saf ve % 0.1 bor katkılı InSe tek kristallerinde eksiton pikinin net olarak görüldüğü ancak, % 0.5 bor katkılı InSe tek kristalinde eksiton pikinin genişlediği gözlemlendi. Saf, % 0.1 ve % 0.5 bor katkılı InSe tek kristallerinin yasak enerji bant

aralığı değerleri sırasıyla 1.274 eV, 1.270 eV ve 1.222 eV olarak hesaplandı. Hesaplanan yasak enerji bant aralıklarından görüldüğü gibi katkı oranı arttıkça soğurma kıyısı uzun dalga boyuna kaydığı ve yasak enerji bant aralığı değerinin azaldığı görüldü.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2012-FEF-05 proje numarası ile desteklenmiştir.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Antonioli G, Bianchi D, Canevari V, Emiliani U, Podini P, 1977. Optical constants of GaSe at the fundamental absorption edge. *Physica Status Solidi (b)*, 81(2): 665-670.
- Asabe MR, Chate PA, Delekar SD, Garadkar KM, Mulla IS, Hankare PP, 2008. Synthesis and characterization of chemically deposited indium selenide thin films at room temperature. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 69: 249-254.
- Ateş A, 2002. InSe ve InSe:Ho Tek Kristallerinin Büyütülmesi, Sıcaklığa Bağlı Elektriksel ve Optik Özelliklerinin İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi (Basılmış).
- Ateş A, Gürbulak B, Yıldırım M, Doğan S, 2003. Electric field influence on absorption measurement in InSe single crystal. *Physica E*, 16(2): 274-279.
- Bacıoğlu A, Ertap H, Karabulut M, Mammedov GM, 2014. Sub-bandgap analysis of boron doped InSe single crystals by constant photocurrent method. *Optical Materials*, 37: 70-73.
- Bakhtinov AP, Kovalyuk ZD, Sydor ON, Katerinchuk VN, Lytvyn OS, 2007. Formation of nanostructure on the surface of layered InSe semiconductor caused by oxidation under heating. *Physics of the Solid State*, 49(8): 1572-1578.
- Balitskii OA, Savchyn VP, Jaeckel B, Jaegermann W, 2004. Surface characterization of In<sub>4</sub>Se<sub>3</sub> single crystals. *Physica E*, 22: 921-923.
- Balitskii OA, 2006. Self-organised nanostructures, obtained by oxidation of III-VI compounds. *Materials Letters*, 60: 594-599.
- Blasi CDe, Micocci G, Rizzo A, Tepore A, 1982. Large InSe single crystals grown from stoichiometric and non-stoichiometric melts. *Journal of Crystal Growth*, 57: 482-486.
- Blasi CDe, Micocci G, Mongelli S, Tepore A, Zuanni F, 1983. Growth and characterization of high quality InSe single crystals. *Materials Chemistry and Physics*, 9(1-3): 55-64.
- Blasi C De, Manno D, Mongelli S, 1985. The stacking of polytypes in InSe crystals. *Physica Status Solidi (a)*, 90(1): K5.
- Blasi CDe, Drigo AV, Micocci G, Tepore A, 1989. Preparation and characterization of In<sub>2</sub>Se<sub>3</sub> crystals. *Journal of Crystal Growth*, 94: 455-458.
- Blasi CDe, Manno D, Rizzo A, 1990. Study of the polytypism in melt grown InSe single crystals by convergent beam electron diffraction. *Journal of Crystal Growth*, 100: 347-353.
- Camassel J, Merle P, Mathieu H, Chevy A, 1978. Excitonic absorption edge of indium selenide. *Physical Review B*, 17(12): 4718-4725.
- Chevy A, Kuhn A, Martin MS, 1977. Large InSe monocrystals grown from a non-stoichiometric melt. *Journal of Crystal Growth*, 38: 118-122.
- Chevy A, Gousskov A, Besson JM, 1978. Growth of crystalline slabs of layered InSe by the Czochralski method. *Journal of Crystal Growth*, 43: 756-759.

- Chevy A, 1981. Growth of indium selenides by vapour phase chemical transport; polytypism on indium monoselenide. *Journal of Crystal Growth*, 51: 157-163.
- Cingolani A, Cingolani R, Ferrara M, Lugara M, 1985. Excitons and electron-hole plasma in InSe. *Solid State Communications*, 55(11): 1007-1010.
- Deniz D, 2004. Growth and Characterization of InSe Single Crystals. Ortadoğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış).
- Di Giulio M, Micocci G, Rizzo A, Tepore A, 1983. Photovoltaic effect in gold-indium selenide Schottky barriers. *Journal of Applied Physics*, 54: 5839-5843.
- Duman S, 2006. n-InSe ve n-InSe:Sn Tek Kristallerinin Yasak Enerji Aralığına Elektrik Alanın Etkisi ve n-InSe:Sn Yarıiletkeninin Schottky Kontak Davranışı. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi (Basılmış).
- Emery JY, Brahimotsmane L, Jouanne M, Julien C, Balkanski M, 1989. Growth conditions of  $In_xSe_y$  films by molecular beam deposition. *Materials Science and Engineering B*, 3: 13-17.
- Ertap H, Mamedov GM, Karabulut M, Bacioğlu A, 2011. Pool-Frenkel thermoelectric modulation of excitation photoluminescence in GaSe crystals. *Journal of Luminescence*, 13: 1376-1379.
- Ertap H, Bacioğlu A, Karabulut M, 2015. Photoluminescence properties of boron doped InSe single crystals. *Journal of Luminescence*, 167: 227-232.
- Ertap H, Baydar T, Yüksek M, Karabulut M, 2016. Structural and optical properties of gallium sulphide thin film. *Turkish Journal of Physics*, 40(3): 297-303.
- Ertap H, 2018. Nonlinear absorption, SHG behavior and carrier dynamics of Nd and Pr doped GaSe single crystals. *Optical Materials*, 83: 99-103.
- Ertap H, Karabulut M, 2019. Structural and electrical properties of boron doped InSe single crystals. *Materials Research Express*, 6(3): 035901.
- Hirohata A, Moodera JS, Berera GP, 2006. Structural and electrical properties of InSe polycrystalline films and diode fabrication. *Thin Solid Films*, 510: 247-250.
- Ikari T, Shigetomi S, Koga Y, Shigetomi S, 1981. Photoluminescence properties of Zn doped InSe single crystals. *Physica Status Solidi (b)*, 103(1): K81-K83.
- Gopal S, Viswanathan C, Karunagaran B, Narayandass SK, Mangalaraj D, Yi J, 2005. Preparation and characterization of electrodeposited indium selenide thin films. *Crystal Research Technology*, 40: 557-562.
- Gousskov A, Camassel J, Gousskov L, 1982. Growth and characterization of III-VI layered crystals like GaSe, GaTe, InSe,  $Ga_{1-x}Te_x$  and  $Ga_xIn_{1-x}Se$ . *Progress in Crystal Growth and Characterization*, 5(4): 323-413.
- Gürbulak B, Yıldırım M, Abay B, Tüzemen S, Alieva M, Yoğurtçu YK, 1998. Growth and optical properties of Ho doped n-type indium selenide. *Physica Status Solidi (a)*, 168(2): 495-500.
- Gürbulak B, Yıldırım M, Ateş A, Doğan S, Yoğurtçu YK, 1999. Growth and temperature dependence of optical properties of Er doped and undoped n-type InSe. *Japan Journal of Applied Physics*, 38: 5133-5136.
- Gürbulak B, 1999. Growth and optical properties of Dy doped n-type InSe single crystal. *Solid State Communications*, 109: 665-669.
- Gürbulak B, 2004. Urbach tail and optical investigations of Gd doped and undoped InSe single crystals. *Physica Scripta*, 70(2-3): 197-201.
- Gürbulak B, Şata M, Dogan S, Duman S, Ashkhasi A, Keskenler EF, 2014. Structural characterizations and optical properties of InSe and InSe:Ag semiconductors grown by Bridgman/Stockbarger technique. *Physica E*, 64: 106-111.
- Gürbulak B, Ashkhasi A, Şata M, Özçelik FŞ, Duman S, 2016. Structural characterization of InSe:Zn binary semiconductor grown by Bridgman/Stockbarger technique. *International Journal of Thales Natural Sciences*, ISSN(print): 2149-5217, 18-28.
- Khandozhko VA, Kudrynskyi ZR, Kovalyuk ZD, 2014. Influence of low-temperature annealing on the quality of InSe layer single crystals and characteristics of n-InSe-p-InSe heterojunctions. *Fizika i Tekhnika Poluprovodnikov*, 48(4): 564-569.
- Kobbi B, Kesri N, 2004. Physico-chemical and electrical properties of InSe thin films. *Vacuum*, 75(2): 177-182.

- Lashkarev GV, Slynko VV, Kovalyuk ZD, Sichkovskiy VI, Radchenko MV, Aleshkevych P, Scymczak R, Dobrowolski W, Minikaev R, Zaslonkin AV, 2007. Anomalies of magnetic properties of layered crystals InSe containing Mn. *Materials Science and Engineering C*, 27: 1052-1055.
- Likforman A, Carre D, Etienne J, Bachet B, 1975. Crystal structure of indium monoselenide (InSe). *Acta Crystallographica B*, 31: 1252-1254.
- Mustafa FI, Gupta S, Goyal N, Tripathi SK, 2010. Effect of indium concentration on the electrical properties of InSe alloy. *Physica B*, 405: 4087-4091.
- Olguin D, Canterero A, Ulrich C, Syassen K, 2003. Effect of pressure on structural properties and energy band gaps of  $\gamma$ -InSe. *Physica Status Solidi (b)*, 235(2): 456-463.
- Parlak M, Erçelebi Ç, Günel I, Salaeva Z, Allakverdiev K, 1995. Growth and characterization of polycrystalline InSe thin films. *Thin Solid Films*, 258: 86-90.
- Pathan HM, Kulkarni SS, Mane RS, Lokhande CD, 2005. Preparation and characterization of indium selenide thin films from a chemical route. *Materials Chemistry and Physics*, 93: 16-20.
- Rushchanskii KZ, 2004. The influence of hydrostatic pressure on the static and dynamic properties of an InSe crystal: A first-principles study. *Physics of the Solid State*, 46(1): 179-187.
- Segura A, Guesdon JP, Besson JM, Chevy A, 1983. Photoconductivity and photovoltaic effect in indium selenide. *Journal of Applied Physics*, 54: 876-888.
- Shigetomi S, Ikari T, 2003. Electrical and optical properties of n- and p-InSe doped with Sn and As. *Journal of Applied Physics*, 93(4): 2301-2303.
- Siciliano T, Tepore A, Micocci G, Genga A, Siciliano M, Filippo E, 2011. Synthesis and characterization of indium monoselenide (InSe) nanowires. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 22(6): 649-653.
- Sreekumar R, Kumar PMR, Kartha CS, Vijayakumar KP, Kabiraj D, Khan SA, Avasthi DK, 2006. SHI Induced Single-Phase InSe Formation at Lower Annealing Temperature. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 244: 190-193.
- Uosaki K, Koinuma M, 1993. Atomic imaging of an InSe single-crystal surface with atomic force microscope. *Journal of Applied Physics*, 74(3): 1675-1678.
- Viswanathan C, Gopal S, Thamilselvan M, Premnazeer K, Mangalaraj D, Narayandass Sa. K, Yi, J, Ingram DC, 2004. Space charge limited current, variable hopping and mobility gap in thermally evaporated amorphous InSe thin films. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 15: 787-792.
- Yüksek M, Ertap H, Elmali A, Yaglioglu HG, Mamedov GM, Karabulut M, Öztürk MK, 2012. Two photon absorption characteristics of bulk GaTe crystal. *Optics and Laser Technology*, 44: 2178-2181.
- Zhirko Yu I, Kovalyuk ZD, Pyrlja MM, Boledzyuk VB, 2007. Application of layered InSe and GaSe crystals and powders for solid state hydrogen storage. *Hydrogen Materials Science and Chemistry of Carbon Nanomaterials*, 325-340.

**To Cite:** Bayram AB, Koç M, Akyürekli S, Kaleli M, 2021. Comparison of Structural and Electro-optical Properties of Thin Films Fabricated for Different Deposition Times Using TiO<sub>2</sub> Precursor Solutions with and without HCl by Ultrasonic Spray Pyrolysis. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1102-1113.

## Comparison of Structural and Electro-optical Properties of Thin Films Fabricated for Different Deposition Times Using TiO<sub>2</sub> Precursor Solutions with and without HCl by Ultrasonic Spray Pyrolysis

Ahmet Buğrahan BAYRAM<sup>1</sup>, Murat KOÇ<sup>2</sup>, Salih AKYÜREKLİ<sup>3</sup>, Murat KALELİ<sup>4\*</sup>

**ABSTRACT:** In this report, two different TiO<sub>2</sub> solutions with and without HCl were, firstly, prepared. Then, totally twelve number of thin film samples were obtained using these solutions for each of these two different group films by ultrasonic spray pyrolysis (USP). Of these twelve samples, each of the four was created at three different spray times (25, 50, 75 min), respectively, and they were annealed at 500 °C. Structural, morphological, and electro-optical properties of TiO<sub>2</sub> thin films were performed by X-ray diffractometer (XRD), scanning electron microscope (SEM), atomic force microscope (AFM), and ultraviolet-visible spectrophotometer (UV-VIS). It was seen that the HCl addition improves the crystallinity of the thin film samples dramatically even though at low deposition temperatures. HCl addition causes densification on the surface of the films and these films also exhibited the best morphological and structural properties compared to thin films without HCl. Also, the bandgap values of all thin films prepared with and without HCl decreases from 3.40 to 3.21 eV and 3.29 to 3.15 eV, respectively. Increase in the thickness of films by the addition of HCl plays a vital role on the morphological, structural, and electro-optical properties of the samples.

**Keywords:** Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>), Ultrasonic spray pyrolysis, Solution engineering

<sup>1</sup> Ahmet Buğrahan BAYRAM ([Orcid ID: 0000-0002-7364-8559](https://orcid.org/0000-0002-7364-8559)) Süleyman Demirel University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Isparta, 32260, Turkey

<sup>2</sup> Murat KOÇ ([Orcid ID: 0000-0002-1048-6150](https://orcid.org/0000-0002-1048-6150)) Isparta University of Applied Sciences, Vocational School of Technical Sciences, Department of Electricity and Energy, Isparta, 3200, Turkey

<sup>3</sup> Salih AKYÜREKLİ ([Orcid ID: 0000-0001-6005-667X](https://orcid.org/0000-0001-6005-667X)) Süleyman Demirel University, Innovative Technologies Application and Research Center, Isparta, 32260, Turkey

<sup>4</sup> Murat KALELİ ([Orcid ID: 0000-0002-3290-2020](https://orcid.org/0000-0002-3290-2020)) Süleyman Demirel University, Department of Physics, Faculty of Art and Sciences, Isparta, 32260, Turkey

\*Corresponding Author: Murat KALELİ, e-mail: muratkaleli@sdu.edu.tr

Bu çalışma Ahmet Buğrahan BAYRAM'ın Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

## INTRODUCTION

The metal oxide semiconductors, such as TiO<sub>2</sub>, ZnO, and In/Sn-O<sub>2</sub> are very well-known and widely studied material for various applications. Among these TiO<sub>2</sub> is the material which is extensively studied much by the researchers compared to the other materials due to its high chemical stability over a wide pH range chemical structure, biocompatibility, physical, optical and electrical properties such as suitable energy band structure, crystal structure and morphology (Karunagaran et al., 2005). The thin film form of TiO<sub>2</sub> has many applications such as gas sensor (Bharathi, 2014), solar cells (Vaičiulis et al., 2012; Mao et al., 2016), photo catalysts (Haynes et al., 2017), environmental pollution control (Pelaez et al., 2012), and “self-cleaning” coatings (Guo et al., 2016).

TiO<sub>2</sub> thin films are fabricated by using different techniques such as magnetron sputtering (Mazur, 2017), e-beam evaporation (Jang et al., 2000), dip coating (Biswas et al., 2018), spin coating (Golobostanfard and Abdizadeh, 2013; Patil et al., 2018), spray pyrolysis (Deshmukh et al., 2006; Ranasinghe et al., 2018), and ultrasonic spray pyrolysis (USP) (Nakaruk et al., 2010; Taziwa and Meyer, 2017). Among these, ultrasonic spray pyrolysis is a more precise, controllable, repeatable, and economic technique by reducing material consumption up to 80%.

Some properties of TiO<sub>2</sub> thin films, such as electric, optical, crystal structure, and morphology, have been studied by many researchers in detail (Supekar et al., 2013; Tsega and Dejene, 2017). Out of these studies, the effect of hydrochloric acid (HCl) addition into precursor solution on the physical and chemical properties of TiO<sub>2</sub> thin films has not been studied much. A few of the researchers have studied similar subjects. Tsega and Dejene (2017) examined the effect of HCl on the formulation of TiO<sub>2</sub> nanocrystalline powders and improvement of its photoluminescence property. In this study, they prepared solution four different pH values. They found that crystal structure changed with HCl addition. They also showed that; while the HCl content increased the strain value increased and the crystallite size decreased (Tsega and Dejene, 2017). Lee and Liu worked out the acid-hydrolysis method to prepare TiO<sub>2</sub> sol-gel with TiCl<sub>4</sub> as a precursor and they showed that nano-sized TiO<sub>2</sub> crystal could be formed at low temperature by addition of HCl acid (Lee and Liu, 2002). Nakaruk et al. (2010) examined the effect of the ultrasonic spray pyrolysis deposition time of TiO<sub>2</sub> thin films by keeping constant the precursor solution concentration, flow rate and substrate temperature. They showed that the thickness of the films depends on the deposition time (Nakaruk et al., 2010). Ramírez - Santos et al. (2012) deposited TiO<sub>2</sub> thin films onto glass slides by the sol-gel method assisted with polyethylene glycol (PEG). They found that; PEG added precursor solution films were crack-free and formed a porous structure after annealing at 500 °C (Ramírez-Santos et al., 2012). Arunachalam et al. (2015) produced TiO<sub>2</sub> thin film by spray pyrolysis method for solar cell applications. In their study, Titanyl Acetylacetonate (Tiacaac) as a precursor solution of TiO<sub>2</sub> was prepared in three different molarity (0.05 M, 0.10 M and 0.15 M). They showed that the best crystallization was obtained at 0.10 M (Arunachalam et al., 2015).

In this study, two different TiO<sub>2</sub> solutions with and without HCl were prepared. Then, totally twelve number of thin film samples were obtained using these solutions for each of these two different group films by ultrasonic spray pyrolysis (USP). Of these twelve samples, each of the four was created at three different spray times (25, 50, 75 min), respectively, and they were annealed at 500 °C. The characterization of these two groups of thin film samples were conducted by XRD, SEM, AFM, and UV-VIS. Finally, the effect of deposition parameters, such as deposition time and HCl addition, and also annealing effect on the crystal structure, surface morphology, and electro-optical properties of these two TiO<sub>2</sub> thin films were investigated.

## MATERIAL AND METHODS

### Experimental set-up

Titanium dioxide thin films with and without HCl were fabricated for three different deposition times by using ultrasonic spray pyrolysis set-up (Figure 1). It consists of five main parts which are a nozzle (for spraying the solution), syringe (to load the solution), syringe pump (to adjust the flow rate of the solution), moving table (a plate, moving in XYZ-three dimensions, on which the nozzle is mounted), and two piezoelectric transducers one of which is replaced at the exit of the syringe and the other one at the entrance of the nozzle (separating the solution into microstructure droplets).

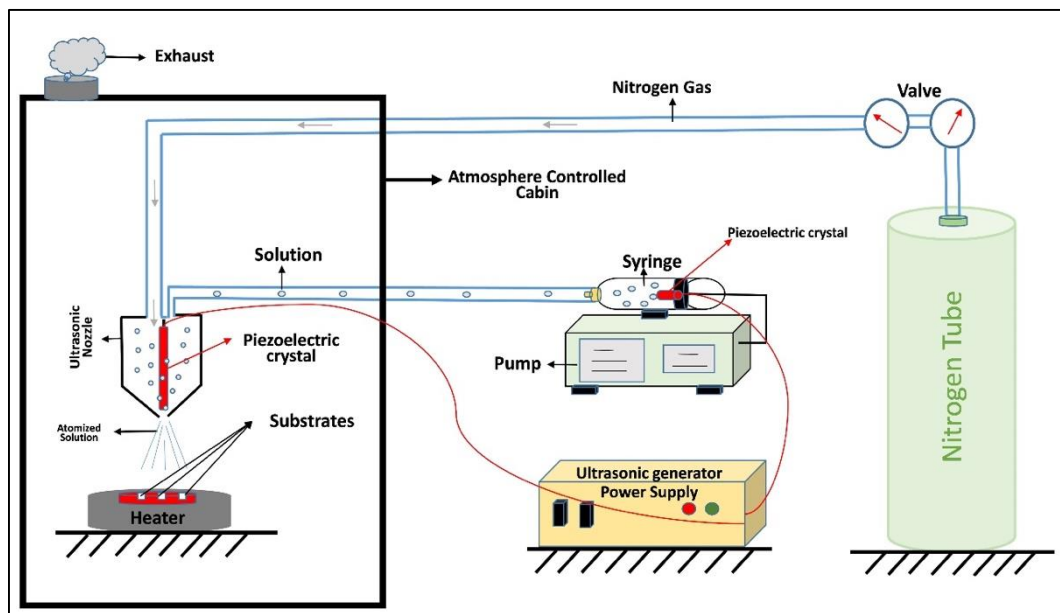


Figure 1. Schematic presentation of ultrasonic spray pyrolysis experimental set-up (Koç, 2018)

### Preparation of thin film samples

We prepared two different TiO<sub>2</sub> thin film samples using two different solutions prepared with or without HCl using the starting materials 0.1 M Titanium (IV)-bis(acetylacetonat)-diisopropoxide (%75) (TiAcAc) (Merck, %75 solution in 2-propanol) solution as following: we first added 96.4 ml ethanol into 3.6 ml pure TiO<sub>2</sub> starting solution in a glass beaker and this mixture was mixed with a magnetic stirrer for 30 min. Then, we divided this solution into equally two parts and kept them in two separate beakers to use one of these solutions for the fabrication of pure TiO<sub>2</sub> thin film samples without HCl (or pure TiO<sub>2</sub> thin film) and the other one with HCl. Hence, we prepared the solution that we will use for the fabrication of the TiO<sub>2</sub> samples prepared with the solution including HCl. To obtain this solution, we added 0.2 ml HCl into the second and mixed this solution with a magnetic stirrer for 30 min. After preparing these two solutions, we prepared the 12 substrates for each of the thin film samples with and without HCl from microscope glass with suitable dimensions and cleaned them applying RCA standard cleaning method. After this step, we prepared the ultrasonic spray pyrolysis system to operate adjusting solution flow rate (0.5 ml/min), nozzle frequency (120 kHz), the distance between the substrate and the tip of the nozzle (10 cm), the substrate temperature (215 °C), and the nitrogen flow into the cabin. After completing these processes, we poured the first solution into the syringe and started the USP system to fabricate the thin film samples without HCl. To do it, we replaced 4 of 12 substrates on the table which will be used for four different characterization measurements and the solution sprayed 25 minutes. Following the same ways, we fabricated the other two groups of thin film samples applying the spraying

time 50 and 75 minutes, respectively. Similarly, thin film samples belonging to the second group of thin films were fabricated using the solution with HCl following the same way. The samples were coded as in Table 1.

**Table 1.** Codes of the fabricated TiO<sub>2</sub> thin film samples prepared without and with HCl for three different spraying times (25, 50, 75 min)

| Sample Code | Number of the Samples | Samples fabricated without HCl |    |    | Samples fabricated with HCl |    |    |
|-------------|-----------------------|--------------------------------|----|----|-----------------------------|----|----|
|             |                       | Spraying time (min)            |    |    | Spraying time (min)         |    |    |
|             |                       | 25                             | 50 | 75 | 25                          | 50 | 75 |
| SA1         | 4                     | ×                              | -  | -  | -                           | -  | -  |
| SA2         | 4                     | -                              | ×  | -  | -                           | -  | -  |
| SA3         | 4                     | -                              | -  | ×  | -                           | -  | -  |
| SB1         | 4                     | -                              | -  | -  | ×                           | -  | -  |
| SB2         | 4                     | -                              | -  | -  | -                           | ×  | -  |
| SB3         | 4                     | -                              | -  | -  | -                           | -  | ×  |

On the other hand, since the thin film samples with and without HCl were thermally annealed at 500 °C and the new form of codes of the samples were presented as SA1-T, SA2-T, SA3-T, SB1-T, SB2-T and SB3-T adding, respectively. After completing all these thin film deposition processes, it was realized the characterization of these samples.

### Characterization of thin film samples

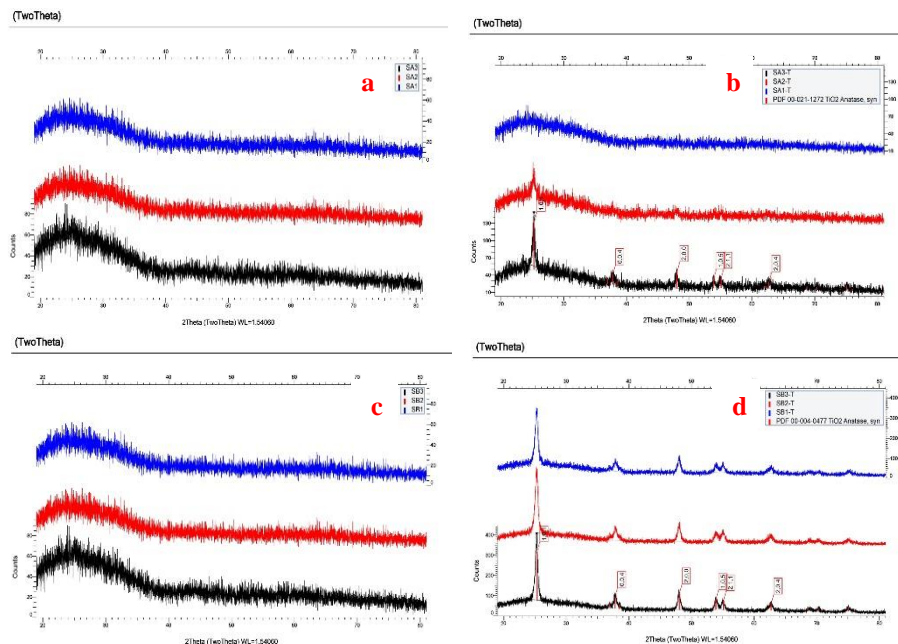
For the determination of the crystal structure of the samples, XRD measurements were conducted by using Cu-K $\alpha$  radiation source at a setting of 40 mA and 40 kV (Bruker D8 Advanced Twin-twin system). XRD Spectra of the films were recorded by scanning  $2\theta$  in the range 20-80°. Surface topography, elemental composition and thickness of the TiO<sub>2</sub> thin films samples were studied by scanning electron microscope (SEM) system (SEM: FEI Quanta FEG 250 – EDS: EDAX). The surface topology and roughness of the films were characterized by atomic force microscope (AFM) system (Nanomagnetics ez-AFM) with Si cantilever and tapping mode. The electro-optical properties of the TiO<sub>2</sub> films were characterized with a UV-VIS spectrophotometer (UV-VIS) (Perkin Elmer Lambda 950 UV/Vis).

## RESULTS AND DISCUSSION

### XRD measurements

Figure 2 a, b, and c, d show the XRD patterns of the samples (SA1, SA2 and SA3) as-grown and (SA1-T, SA2-T and SA3-T) thermally annealed at 500 °C and samples (SB1, SB2 and SB3) as-grown and (SB1-T, SB2-T and SB3-T) thermally annealed at 500 °C, respectively. As seen from Figure 2a, it is not seen any crystallization in each of the samples (SA1, SA2, and SA3), but in Figure 2b it is seen that crystallization in the samples (SA1-T, SA2-T and SA3-T) begins to appear and increases with the increasing of spraying time. These two results are the expected results. On the other hand, as seen from Figure 2c, it is not seen any crystallization in each of the samples (SB1, SB2, and SB3), but in Figure 2d it is seen that crystallization in the samples (SB1-T, SB2-T and SB3-T) begins and increases with the increasing of spraying time as expected. When the results obtained for the samples (SA1, SA2 and SA3) and (SB1, SB2 and SB3) not annealed are compared, it will be seen that there is no difference between them. Crystallizations are not good in both of these as-grown samples.





**Figure 2.** a, b, and c, d are the XRD patterns of the samples (SA1, SA2 and SA3) as-grown and (SA1-T, SA2-T and SA3-T) thermally annealed at 500 °C and samples (SB1, SB2 and SB3) as-grown and (SB1-T, SB2-T and SB3-T) thermally annealed at 500 °C, respectively

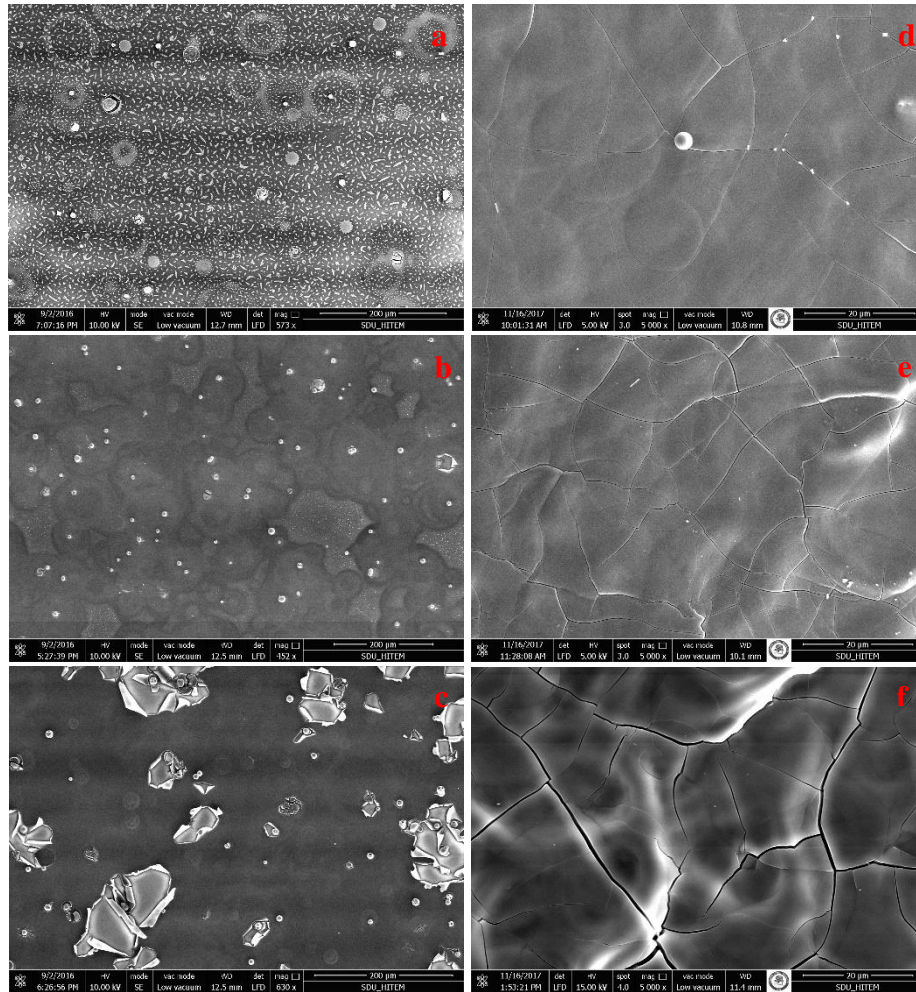
On the other hand, it is seen that the best crystallization forms in (SB1-T, SB2-T and SB3-T) samples. As seen from Figure 2d, the peaks appear at  $2\theta$  angles 25.3, 37.8, 48, 53.9, 54.8, 62.5 degrees and they are directed in the direction of planes (101), (004), (200), (105), (211), and (204), respectively. The type of the crystal structure of the samples was determined by means of PDF 00-021-1272 and PDF 00-004-0477 libraries and the obtained results showed that the samples have anatase phase. And also, all samples have a polycrystalline structure. This result is confirmed by some studies in the literature (Lee and Liu, 2002; Ramírez-Santos et al., 2012; Arunachalam et al., 2015; Tsega and Dejene, 2017; Biswas et al., 2018).

### SEM measurements

Figure 3. a, b, c, d, e and f show the SEM images of (SA1-T, SA2-T, and SA3-T) and (SB1-T, SB2-T, and SB3-T) samples annealed at 500 °C. The films without HCl are seen that their highly porous surface is covered with a lot of micro-sized TiO<sub>2</sub> spheres of whereas the films formed in the presence of HCl are cracked but dense structure just a few numbers of micro-sized TiO<sub>2</sub> spheres on the dense surface. When the particle size decreases to the nanometer size, surface activities and surface areas increase due to the increase in the number of surface atoms.

Nanoparticles tend to be uncontrolled agglomeration forming with spherical shapes due to their high surface energies (Li et al., 1999). On the other hand, HCl addition also decreases the droplet shadows on the film surfaces. It is clear from the SEM images that HCl addition to precursor solution increases the densification of the films and this is confirmed with our XRD results. It is evident that HCl addition modifies both the surface morphology and the structure of the films.

Figure 4. a, b, and c and d, e, and f show the cross-section SEM images of the SA1-T, SA2-T, and SA3-T samples and SB1-T, SB2-T, and SB3-T samples, respectively. The measured film thickness values of the samples are given in Table 2.

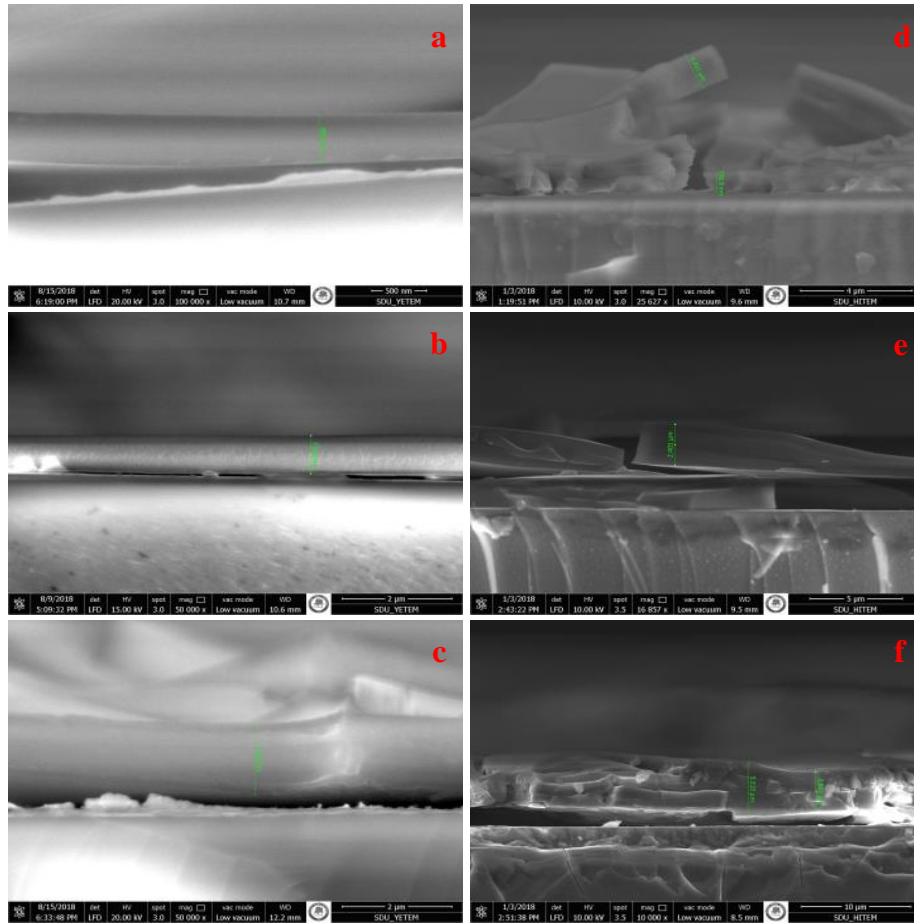


**Figure 3.** SEM images of (a) SA1-T, (b) SA2-T, and (c) SA3-T samples and (d) SB1-T, (e) SB2-T, and (f) SB3-T samples

**Table 2.** The film thickness of the SA1-T, SA2-T, and SA3-T and SB1-T, SB2-T, and SB3-T samples

| Sample code                | TiO <sub>2</sub> without HCl Annealed at 500 °C |       |       | TiO <sub>2</sub> with HCl Annealed at 500 °C |       |       |
|----------------------------|---|-------|-------|--|-------|-------|
|                            | SA1-T   | SA2-T | SA3-T | SB1-T  | SB2-T | SB3-T |
| Thickness of the film (µm) | 0.48  | 0.75  | 1.40  | 1.90   | 2.50  | 3.80  |

When the samples being in the same group are compared with each other, it is obvious that their thicknesses increase with spraying time. This result is normal and it may be said that it is an expected result. On the other hand, when the samples, taking place in two separate groups, fabricated at the same spraying time and thermally annealed at the same temperature are compared with each other, it is evident that the thicknesses of the samples with HCl are much larger than the samples without HCl. In this case, it may be said that use of the HCl in the solution plays a vital role on the thickness of the TiO<sub>2</sub> thin films. Solvent engineering plays a vital role for solution-based production techniques. HCl addition to the solution changes the physicochemical properties of the precursor solution by means of density, evaporation temperature, PH values and etc. SEM surface and cross-section images show that the solution drops evaporate before arriving the surface of substrate and then being blown away by the spray gas and this lead to formation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles which doesn't interact with substrate surface (Vaiculis et al., 2012). These are clue for micro-sized TiO<sub>2</sub> sphere formation on the surface for pure TiO<sub>2</sub> precursor solution and thick film formation for HCl added precursor solution.



**Figure 4.** Cross-sectional SEM images of (a) SA1-T, (b) SA2-T, and (c) SA3-T samples and (d) SB1-T, (e) SB2-T, and (f) SB3-T samples

### AFM measurements

AFM images of (a) SA1-T, (b) SA2-T, and (c) SA3-T samples and (d) SB1-T, (e) SB2-T, and (f) SB3-T samples are given in Figure. 5 a, b, c and d, e, f, respectively. When the samples SA1-T, SA2-T, and SA3-T are compared with each other, it is seen that their surface morphologies are nearly similar with each other.

Almost all of them have a lumpy surface structure. But, when the samples SB1-T, SB2-T, and SB3-T are compared with each other, it is seen that their surface morphologies differ from each other. While SB1-T has a surface morphology with cracks, cracks turn into valleys in sample SB2-T and surface morphology of the sample SB3-T turns into a surface formed with longitudinally cut cylinders. It will be seen that there is much difference between these two group samples when they are compared with each other.

Roughness ( $R_a$ ) values of the annealed samples (SA1-T, SA2-T and SA3-T) without HCl are 1.51, 1.65, and 3.14 nm and the samples (SB1-T, SB2-T and SB3-T) with HCl are 83.0, 104, and 128 nm, respectively. HCl addition to precursor solution increased the  $R_a$  values dramatically by creating the sharp cracks (channels into blocks). This  $R_a$  increment may improve the TiO<sub>2</sub> thin films solar cell efficiency by increasing the active surface area.

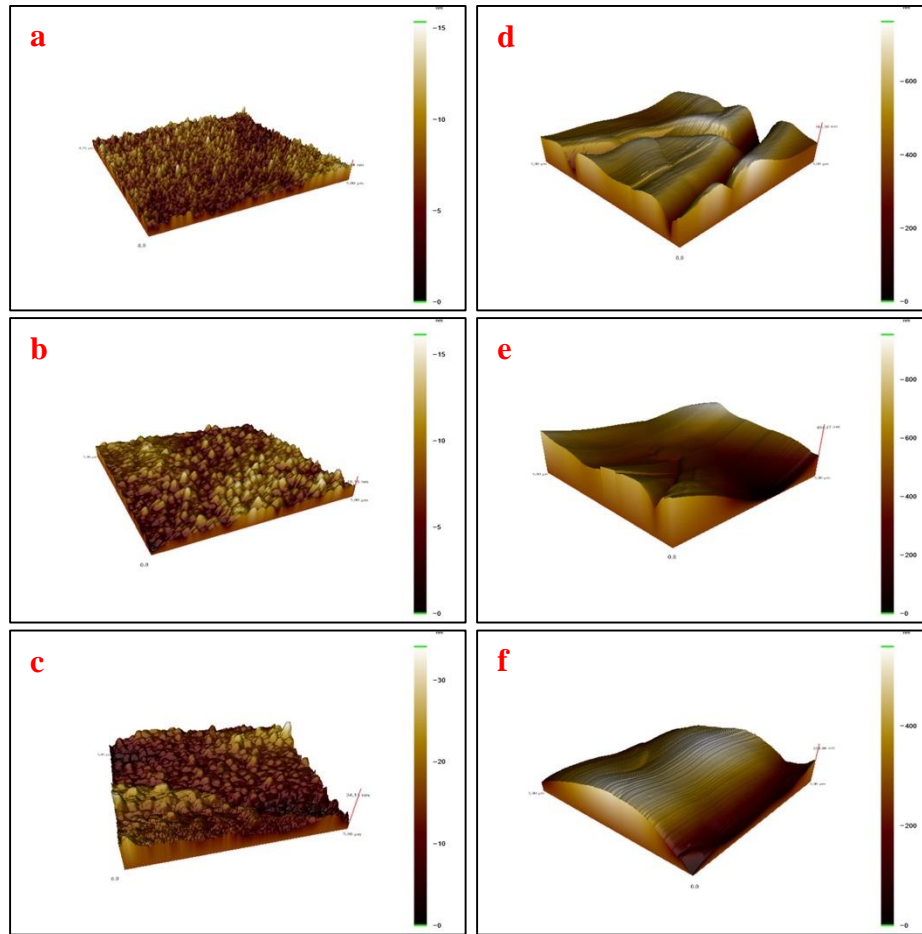


Figure 5. AFM images of (a) SA1-T, (b) SA2-T, and (c) SA3-T samples and (d) SB1-T, (e) SB2-T, and (f) SB3-T samples are given in Figure. 4 a, b, c and d, e, f, respectively

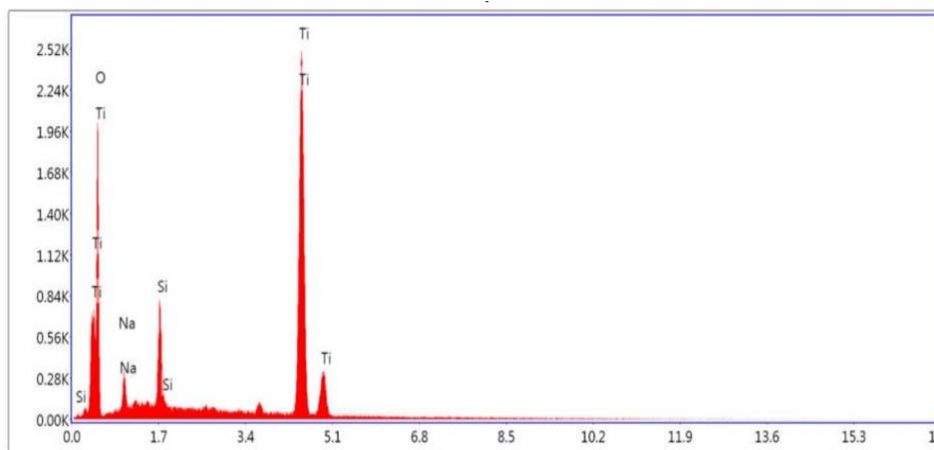


Figure 6. EDS spectrum of SB3 sample which presenting the composition of the elements included in the film

Table 3. Elements existing in the samples (SA1-T, SA2-T and SA3-T) and (SB1-T, SB2-T and SB3-T) and their percentages

| Sample code  | TiO <sub>2</sub> without HCl Annealed at 500 °C |       |       | TiO <sub>2</sub> with HCl Annealed at 500 °C |       |       |
|--------------|---|-------|-------|--|-------|-------|
|              | SA1-T   | SA2-T | SA3-T | SB1-T  | SB2-T | SB3-T |
| Elements (%) |   |       |       |  |       |       |
| O            | 54.3  | 53.2  | 53.8  | 67.1   | 64.9  | 66.4  |
| Ti           | 1.5   | 4.1   | 7.0   | 20.9   | 24.3  | 26.5  |

Figure 6 shows the EDS picture of SB3 sample and the graphics presenting the composition of the elements included in the sample. The same measurements were performed the other samples and the measured percentage values of O and Ti elements in all samples are given in Table 3. The existence of the Ti and O elements are expected resulting from TiO<sub>2</sub> thin films. But Si and Na are ingredients of the glass substrates.

### UV-VIS measurements

Band gap energy values of the samples were found using the data from the UV-VIS measurements. To do this, transmittance curves of the samples versus wavelength of the photon and we calculated the absorption coefficient,  $\alpha_i$ , corresponding to  $h\nu_i$  (photon energy) using the following equation,

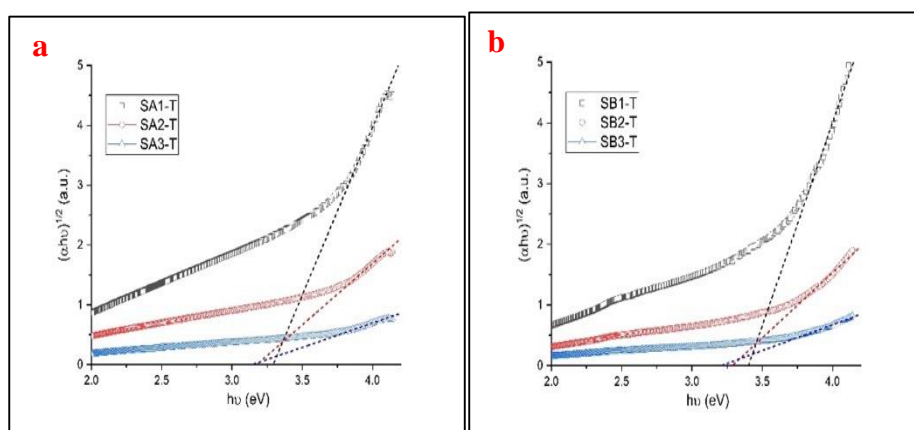
$$\alpha_i = \frac{1}{d} \ln \frac{1}{T} \quad (1)$$

where  $d$  and  $T$  are the thickness and the transmittance of the film, respectively. On the other hand, the energy band gap is found substituting the value of  $\alpha$  into the equation (Ramírez-Santos et al., 2012; Golobostanfard and Abdizadeh, 2013; Chandrasekhar et al., 2016),

$$(\alpha h\nu)^n = A(h\nu - E_g) \quad (2)$$

where  $E_g$  is the bandgap energy value of the sample. For the bandgap calculations, the  $n$  value was chosen as  $1/2$  since TiO<sub>2</sub> has an indirect bandgap. According to this equation, to find the bandgap energy values of the TiO<sub>2</sub> thin film samples a graph of  $(\alpha h\nu)^{1/2}$  versus  $h\nu$  has been plotted and then an extrapolation was applied to this graph. So, we drew a line lying on the part of the curve with a constant slope and cutting the  $h\nu$  versus. The point cut by this line gives the band gap energy of the sample.

Figure 7. a and b show the  $(\alpha h\nu)^{1/2}$  versus  $h\nu$  plots of SA1-T, SA2-T, SA3-T, and SB1-T, SB2-T, SB3-T, respectively. As seen from Figure 7. a and b, the bandgap of the TiO<sub>2</sub> thin films with and without HCl are ranging in between decreasing from 3.29 to 3.15 eV and 3.40 to 3.21 eV, respectively which are consistent with literature (Nakaruk et al., 2010; Golobostanfard and Abdizadeh, 2013; Essalhi et al., 2016).



**Figure 7.** Graphics of  $(\alpha h\nu)^{1/2}$  versus  $h\nu$  show the band gap energies of the samples (a) SA1-T, SA2-T and SA3-T and (b) SB1-T, SB2-T and SB3-T

This result can be explained as following: by increasing deposition time of the films with or without HCl addition to precursor solution, a redshift on the absorption edge of the TiO<sub>2</sub> films occurred, which involved a decrease of the bandgap energies. Increasing the film thickness results a band gap

decrease and absorption increase and this effects can be seen for a lots of previous TiO<sub>2</sub> thin film studies (Nakaruk et al., 2010; Golobostanfard and Abdizadeh, 2013).

**Table 4.** Band gap values for the samples (SA1-T, SA2-T and SA3-T) without HCl and the samples (SB1-T, SB2-T and SB3-T) with HCl annealed at 500 °C

| Sample code   | TiO <sub>2</sub> without HCl Annealed at 500 °C |       |       | TiO <sub>2</sub> with HCl Annealed at 500 °C |       |       |
|---------------|---|-------|-------|--|-------|-------|
|               | SA1-T   | SA2-T | SA3-T | SB1-T  | SB2-T | SB3-T |
| Band gap (eV) | 3.29  | 3.17  | 3.15  | 3.40   | 3.28  | 3.21  |

## CONCLUSIONS

In this project, TiO<sub>2</sub> thin films with and without HCl were deposited by ultrasonic spray pyrolysis system for three different spraying times (25, 50, 75 min) and the surface morphology, structural, electro-optical, and chemical composition of the films were investigated by means of SEM, AFM, XRD, UV-VIS, and EDS. SEM images of the films without HCl showed that the thicknesses of the films increased with spraying time and with the addition of the HCl increased the film thickness too. But the thickness of the thin films with HCl are larger compared to the samples without HCl. On the other hand, AFM images showed that the roughness of the samples with HCl are larger compared (~1.51 nm and 128 nm) the films without HCl. UV-VIS measurements indicated that the bandgap energy value of the films without HCl have a maximum and minimum band gap energy values are 3.29 and 3.15 eV while thin with HCl have a maximum and minimum band gap energy values are 3.40 and 3.21 eV. As a result, it can be said that the bandgap energy values of both of these thin film samples decreases to ~3.2 eV with the increase of the thickness.

The XRD analysis shows that TiO<sub>2</sub> films crystallize in anatase phase with the (101) preferred orientation at 500 °C annealing temperature and the HCl addition improve the crystallization of the films sharply. HCl addition favors faster crystalline phase formation compared to pure TiO<sub>2</sub> precursor solution. In EDS measurements it is seen that the pyrolysis completely removed the HCl from the structure causing a quality improvement of the crystallinity of the samples. As a result, it can be said that the addition of HCl to precursor solution plays a vital role on the thin films morphology, structure and electro-optical properties. Additionally, we are going to study the effect of the HCl addition with different concentration with changing the height of the nozzle from the plate, atomizing frequency, and substrate temperature on the morphology, structural, electro-optical properties of the TiO<sub>2</sub> thin films.

## ACKNOWLEDGMENT

This project was supported by Süleyman Demirel University “Scientific Research Projects Coordination Unit (S.D.U S.R.P. 4899-YL1-17)”. We also thank Prof. Dr. Refik KAYALI for his help in proofreading the manuscript.

## Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

## Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

## REFERENCES

- Arunachalam A, Dhanapandian S, Manoharan C, Sridhar R, 2015. Characterization of Sprayed TiO<sub>2</sub> on ITO Substrates for Solar Cell Applications. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Elsevier B.V., 149, pp. 904–912.

- Bharathi JJ, Pappayee N, 2014. Titanium Dioxide (TiO<sub>2</sub>) Thin Film Based Gas Sensors. National Conference on Green Engineering and Technologies for Sustainable Future, pp. 59-61.
- Biswas S, Rahman KH and Kar AK, 2018. Optical Properties of Titanium di-oxide Thin Films Prepared by Dip Coating Method. 2nd International Conference on Condensed Matter and Applied Physics AIP Conf. Proc. 1953, pp. 030004-1–030004-4.
- Chandrasekhar PS, Kumar N, Swami SK, Dutta V, Komarala VK, 2016. Fabrication of Perovskite Films Using an Electrostatic Assisted Spray Technique: The Effect of the Electric Field on Morphology, Crystallinity and Solar Cell Performance. *Nanoscale*. Royal Society of Chemistry, 8(12), pp. 6792–6800.
- Deshmukh HP, Shinde PS, Patil PS, 2006. Structural, Optical and Electrical Characterization of Spray-Deposited TiO<sub>2</sub> Thin Films. *Materials Science and Engineering: B*, 130(1–3), pp. 220–227.
- Essalhi Z, Hartiti B, Lfakir A, Siadat M, Thevenin P, 2016. Optical Properties of TiO<sub>2</sub> Thin Films Prepared by Sol Gel Method. *J. Mater. Environ. Sci.*, 7 (4), pp. 1328-1333.
- Golobostanfard MR, Abdizadeh H, 2013. Effects of Acid Catalyst Type on Structural, Morphological, and Optoelectrical Properties of Spin-Coated TiO<sub>2</sub> Thin Film. *Physica B: Condensed Matter*. Elsevier, 413, pp. 40–46.
- Guo MZ, Maury-Ramirez A, Poon CS, 2016. Self-Cleaning Ability of Titanium Dioxide Clear Paint Coated Architectural Mortar and Its Potential in Field Application. *Journal of Cleaner Production*. Elsevier Ltd, 112, pp. 3583–3588.
- Haynes VN, Ward JE, Russell BJ, Agrios AG, 2017. Photocatalytic Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on Aquatic Organisms-Current Knowledge and Suggestions for Future Research. *Aquatic Toxicology*. Elsevier B.V., 185, pp. 138–148.
- Jang HK, Whangbo SW, Choi YK, Chung YD, Jeong K, Whang CN, 2000. Titanium Oxide Films on Si(100) Deposited by E-beam Evaporation. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 18(6), pp. 2932–2936.
- Karunakaran B, Chung SJ, Suh EK, Mangalaraj D, 2005. Dielectric and Transport Properties of Magnetron Sputtered Titanium Dioxide Thin Films. *Physica B: Condensed Matter*, 369(1–4), pp. 129–134.
- Koç M, 2018. Investigation of Physical and Optical Properties Sn-Doped Indium Oxide Thin Films Fabricated by Ultrasonic Spray Pyrolysis Method and Heat Treatment under Different Nitrogen Flow Rate Atmospheres. Süleyman Demirel University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, PhD Thesis (Printed).
- Lee DS, Liu TK, 2002. Preparation of TiO<sub>2</sub> Sol Using TiCl<sub>4</sub> as A Precursor. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 25(2), pp. 121–136.
- Li B, Xie Y, Huang J, Su H, Qian Y, 1999. Solvothermal Synthesis to NiE<sub>2</sub> (E = Se, Te) Nanorods at Low Temperature. *Nanostructured Materials*, 11(8), pp. 1067–1071.
- Mao X, Zhou R, Zhang S, Ding L, Wan L, Qin S, Chen Z, Xu J, Miao S, 2016. High Efficiency Dye-sensitized Solar Cells Constructed with Composites of TiO<sub>2</sub> and the Hot-bubbling Synthesized Ultra-Small SnO<sub>2</sub> Nanocrystals. *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(1), p. 19390.
- Mazur M, 2017. Analysis of the Properties of Functional Titanium Dioxide Thin Films Deposited by Pulsed DC Magnetron Sputtering with Various O<sub>2</sub>:Ar Ratios. *Optical Materials*. Elsevier Ltd, 69, pp. 96–104.
- Nakaruk A, Ragazzon D, Sorrell CC, 2010. Anatase Thin Films by Ultrasonic Spray Pyrolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. Elsevier B.V., 88(1), pp. 98–101.
- Patil NB, Nimbalkar AR, Patil MG, 2018. ZnO Thin Film Prepared by a Sol-gel Spin Coating Technique for NO<sub>2</sub> Detection. *Materials Science and Engineering: B*. Elsevier, 227(2), pp. 53–60.
- Pelaez M, Nolan NT, Pillai SC, Seery MK, Falaras P, Kontos AG, Dunlop PSM, Hamilton JWJ, Byrne JA, O'Shea K, Entezari MH, Dionysios DD, 2012. A review on The Visible Light Active Titanium Dioxide Photocatalysts for Environmental Applications. *Applied Catalysis B: Environmental*. Elsevier B.V., pp. 331–349.
- Pradhan UU, Kumar, SKN, 2011. Characterization of Titanium Dioxide Thin Film Fabricated Using Spin Coating Technique. *Optoelectronics and Advanced Materials*. 5(7), pp. 799–801.
- Ramírez-Santos AA, Acevedo-Peña P, Córdoba EM, 2012. Enhanced Photocatalytic Activity of TiO<sub>2</sub> Films by Modification with Polyethylene Glycol. *Química Nova*, 35(10), pp. 1931–1935.
- Ranasinghe CSK, Vequizo JJM, Yamakata A, 2018. Fabrication of Robust TiO<sub>2</sub> Thin Films by Atomized Spray Pyrolysis Deposition for Photoelectrochemical Water Oxidation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. Elsevier BV, 358, pp. 320–326.
- Supekar AK, Bhise RB, Thorat SS, 2013. Optical, Structural and Morphological Study of TiO<sub>2</sub> Thin Film Using Sol-gel Spin Coating Techniques. *IOSR Journal of Engineering*, 3(1), pp. 38-41.

- Taziwa R, Meyer E, 2017. Fabrication of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles and Thin Films by Ultrasonic Spray Pyrolysis: Design and Optimization. Pyrolysis, Intech, Open Science, pp. 223-249.
- Tsega M, Dejene FB 2017. Influence of Acidic pH on The Formulation of TiO<sub>2</sub> Nanocrystalline Powders with Enhanced Photoluminescence Property. Heliyon Elsevier Ltd., 3(2), pp. e00246.
- Vaiciulis I, Girtan M, Stanculescu A, Leontie L, Habelhames F, Antohe S, 2012. On Titanium Oxide Spray Deposited Thin Films for Solar Cells Applications. Proceedings of the Romanian Academy Series a-Mathematics Physics Technical Sciences Information Science, 13(4), pp. 335–342.



**Atıf İçin:** Turhan MF, 2021. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörlerinin Foton Etkileşim Parametrelerinin İncelenmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2):1114-1126.

**To Cite:** Turhan MF, 2021. Investigation of Photon Interaction Parameters of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2):1114-1126.

## **Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörlerinin Foton Etkileşim Parametrelerinin İncelenmesi**

Mehmet Fatih TURHAN<sup>1, \*</sup>

**ÖZET:** Bu çalışmada bazı anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörlerinin kütle azaltma katsayıları, lineer azaltma katsayıları, yarı tabaka kalınlıkları, onda bir tabaka kalınlıkları, ortalama serbest yolları, etkin atom numaraları ve etkin elektron yoğunlukları  $1 \text{ keV} \leq E \leq 100 \text{ GeV}$  enerji aralığındaki farklı enerji için teorik olarak belirlenmiştir. Ayrıca, ADE inhibitörlerinin enerji soğurma yığılma faktörleri ve maruz kalma yığılma faktörleri  $0.015 \text{ MeV} \leq E \leq 15 \text{ MeV}$  enerji aralığındaki bazı enerji değerleri için 40 *mfp* ye kadar farklı penetrasyon derinliklerinde geometrik ilerleme (G-İ) fit katsayıları kullanılarak hesaplanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** ADE inhibitörleri, kütle azaltma katsayısı, tabaka kalınlığı, etkin atom numarası, etkin elektron yoğunluğu, yığılma faktörleri.

### **Investigation of Photon Interaction Parameters of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors**

**ABSTRACT:** In this study, mass attenuation coefficient, linear attenuation coefficient, half value layers, tenth value layers, mean free paths, effective atomic numbers and effective electron densities for different energies in the energy range from  $1 \text{ keV} \leq E \leq 100 \text{ GeV}$  for Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors were theoretically determined. Also, energy absorption build-up factors and exposure build-up factors for ACE inhibitors were calculated using the geometric progression (G-P) fitting coefficients for some energy values in the energy region of  $0.015 \text{ MeV} \leq E \leq 15 \text{ MeV}$  for different penetration depths up to 40 *mfp*.

**Keywords:** ACE inhibitors, mass attenuation coefficient, value layer, effective atomic number, effective electron density, build-up factors

<sup>1</sup> Mehmet Fatih TURHAN ([Orcid ID: 0000-0002-0676-9481](https://orcid.org/0000-0002-0676-9481)) Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Atatürk Sağlık Hizmetler Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikleri Bölümü, Tıbbi Görüntüleme Teknikleri Programı, Afyonkarahisar, Türkiye.

**\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Mehmet Fatih TURHAN, e-mail: m.f.turhan@hotmail.com

## GİRİŞ

Monokromatik fotonlar madde içerisinde geçerken, fotonların madde ile etkileşimi sonucu sayılarında bir azalma meydana gelir. Bu etkileşim fotoelektrik soğurma, Compton saçılması, Delbruck saçılması, Rayleigh saçılması, çift oluşumu gibi farklı süreçlerle sonuçlanabilir. Etkileşimler arasında en baskın olanları hiç şüphesiz fotoelektrik olay, Compton olayı ve çift oluşumdur. Fotonların madde ile etkileşimlerinden yararlanılarak element, bileşik, alaşım gibi farklı materyallerin kütle azaltma katsayıları, azaltma tesir kesitleri, fotoelektrik tesir kesitleri, Compton tesir kesitleri, çift oluşum tesir kesitleri, vb gibi temel parametrelerin elde edilmesi sağlanır. Bu parametreler hakkında güvenilir bilgi tıp, eczacılık, fizik, kimya alanları başta olmak üzere tarım, makine sanayi gibi diğer pek çok alandaki araştırma ve uygulamalar için oldukça büyük bir öneme sahiptir.

Literatürde çeşitli camlar (Singh ve ark., 2019; Kaur ve ark., 2019; Aşkın ve ark., 2019; Kilicoglu, 2019; Mahmoud ve ark., 2019; Uosif ve ark., 2020; Sayyed ve ark., 2019; Susoy, 2020; Tekin ve ark., 2020), alaşımlar (Agar ve ark., 2019; Manjunatha ve ark., 2019; Akman ve ark., 2019a, b), seramikler (Sayyed ve ark., 2018; Akman ve ark., 2019c) ve bileşikler (Sayyed, 2016; Singh ve Badiger, 2016; Al-Hamarneh ve ark., 2017; Sathiyaraj ve ark., 2017; Lokhande ve ark., 2017; Chen ve ark., 2018; Issa ve ark., 2018; Singh ve ark., 2018; Akman ve ark., 2019d; Al-Buriahı ve ark., 2019) için azaltma parametreleri ile ilgili deneysel ve teorik çalışmalara rastlamak mümkündür. Singh ve ark. (2019) bazı ZnO-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> cam sistemleri için toplam kütle azaltma katsayılarını, toplam foton etkileşim tesir kesitlerini, etkin atom numaralarını ve etkin elektron yoğunluklarını 59.54 keV foton enerjisinde ölçmüşlerdir. Mahmoud ve ark (2019) kurşun vanadat camlar için toplam kütle azaltma katsayılarını, etkin atom numaralarını, etkin elektron yoğunluklarını, yarı tabaka kalınlıklarını, enerji soğurma ve maruz kalma yığılma faktörlerini belirlemişlerdir. Li<sub>2</sub>O-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TeO<sub>2</sub> cam sistemleri için kütle azaltma katsayıları, etkin atom numaraları, yarı kalınlık, onda bir kalınlık, ortalama serbest yol, enerji soğurma ve maruz kalma yığılma faktörleri farklı enerjilerde teorik olarak Susoy (2020) tarafından belirlenmiştir. Bazı alüminyum-silikon alaşımları için kütle azaltma katsayıları, lineer azaltma katsayıları, yarı tabaka kalınlığı, onda bir tabaka kalınlığı, etkin atom numaraları, etkin elektron yoğunlukları, maruz kalma yığılma faktörleri Manjunatha ve ark. (2019) tarafından belirlenmiştir. Akman ve ark. (2019b) Ag<sub>92.5</sub>/Cu<sub>7.5</sub>, Ag<sub>72</sub>/Cu<sub>28</sub>, Pd<sub>94</sub>/Cr<sub>6</sub> ve Pd<sub>60</sub>/Cu<sub>40</sub> alaşımları için kütle azaltma katsayılarını, etkin atom numaralarını, etkin elektron yoğunluklarını ve etkin iletkenliklerini 81 keV ≤ E ≤ 1333 keV enerji aralığındaki 14 farklı enerji için deneysel ve teorik olarak elde etmişlerdir. Sayyed ve ark. (2018) baryum zirkonat, baryum titanat (IV), magnezyum nitrid, baryum pirofosfat ve silisyum karbür seramik malzemeleri için kütle azaltma katsayıları, yarı tabaka kalınlıkları, onda bir tabaka kalınlıkları, radyasyondan korunma verimleri, etkin atom numaraları ve ortalama serbest yolları gibi gama radyasyonu azaltma parametrelerini belirlemişlerdir. Bazı termoluminesans dozimetrik bileşik için etkin atom numaralarının ve kerma değerlerinin yanı sıra enerji soğurma yığılma faktörleri ve maruz kalma yığılma faktörleri 0.015 MeV ≤ E ≤ 15 MeV enerji aralığındaki bazı enerji değerleri için Singh ve Badiger (2016) tarafından geometrik ilerleme (G-İ) fit katsayıları kullanılarak hesaplanmıştır. Farklı moleküler ağırlıklardaki polietilen glikol bileşikleri için kütle azaltma katsayısı, atomik, elektronik, moleküler tesir kesitleri, etkin atom numaraları, etkin elektron yoğunlukları, yarı tabaka kalınlıkları, kütle enerji-soğurma katsayıları ve kerma gibi gama-ışını azaltma parametreleri 59.5 keV ≤ E ≤ 1332.5 keV enerji aralığındaki farklı enerji için deneysel ve teorik olarak Al-Hamarneh ve ark. (2017) tarafından belirlenmiştir. Sathiyaraj ve ark. (2017) altın ve gümüş katkılı polimer jeller için 10 keV ≤ E ≤ 1 GeV arasındaki farklı enerjilerde etkin atom numaralarını ve 0.015 MeV ≤ E ≤ 15 MeV enerji aralığındaki bazı enerji değerleri için enerji soğurma yığılma faktörleri ve maruz kalma yığılma faktörlerini

hesaplamışlardır. Lokhande ve ark. (2017) C-H-O-N temelli bazı amino grup biyo materyal için azaltma parametrelerini belirlemiştir. Issa ve ark. (2018)  $\text{Lu}_2\text{O}_3\text{Yb}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Er}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Sm}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Dy}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Eu}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Nd}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Pr}_6\text{O}_{11}$ ,  $\text{La}_2\text{O}_3$  ve  $\text{Ce}_2\text{O}_3$  lantanit oksitleri için kütle azaltma katsayılarını, etkin atom numaralarını, etkin elektron yoğunluklarını, yarı tabaka kalınlıklarını, ortalama serbest yollarını, onda bir tabaka kalınlıklarını ve kerma değerlerini teorik olarak hesaplamışlardır. Singh ve ark. (2018) etilen glikol, propilen glikol, gliserin, izoamil alkol, bütanon, asetofenon, sikloheksanon, furfural, benzaldehit, sinmalaldehit, glutaraldehit, anilin, benzylamine, nitrobenzen, etilbenzen, etil format ve su molekülleri için kütle azaltma katsayıları, yarı tabaka kalınlıkları, molar yok olma katsayıları, toplam azaltma tesir kesitleri, toplam elektronik tesir kesitleri, toplam enerji soğurma katsayıları gibi foton etkileşim parametrelerini 81 keV, 122 keV, 356 keV ve 511 keV enerjilerde deneysel ve teorik olarak belirlemiştir. Biyo moleküller ve bazı tıbbi aromatik bitkiler için kütle azaltma katsayıları, etkin atom numaraları, elektron yoğunlukları gibi foton azaltma parametreleri Al-Buriahi ve ark. (2019) ve Akman ve ark. (2019d) tarafından belirlenmiştir.

Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri günümüzde özellikle hipertansiyon, kalp yetmezliği gibi hastalıklar için oldukça etkili olmasına rağmen, bu enzim inhibitörlerinin radyasyon etkileşim özellikleri ile ilgili literatürde yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada bazı anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörlerinin (Benazepril, Kaptopril, Enalapril, Fosinopril, Lisinopril, Moeksipril, Perindopril, Kuinapril, Ramipril ve Trandolapril) kütle azaltma katsayıları, lineer azaltma katsayıları, yarı tabaka kalınlıkları, onda bir tabaka kalınlıkları, ortalama serbest yolları, etkin atom numaraları ve etkin elektron yoğunlukları  $1 \text{ keV} \leq E \leq 100 \text{ GeV}$  enerji aralığındaki farklı enerji için teorik olarak belirlenmiştir. Ayrıca, ADE inhibitörlerinin enerji soğurma yığılma faktörleri ve maruz kalma yığılma faktörleri  $0.015 \text{ MeV} \leq E \leq 15 \text{ MeV}$  enerji aralığındaki bazı enerji değerleri için 40 *mfp* ye kadar farklı nüfus etme derinliklerinde geometrik ilerleme (G-İ) fit katsayıları kullanılarak hesaplanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Lambert Beer yasası bir materyalin içinden geçen fotonun şiddetindeki azalmayı tanımlar ve Eşitlik 1 ile ifade edilir.

$$I = I_0 e^{-(\mu/\rho)\rho x} \quad (1)$$

Burada,  $I_0$  soğurucusuz alınan sayım değeri,  $I$  radyasyonun materyal kalınlığı boyunca nüfuz ettiği sayım değeri,  $\mu$  lineer soğurma katsayısı ( $\text{cm}^{-1}$ ),  $\rho$  materyal yoğunluğu ( $\text{g cm}^{-3}$ ),  $x$  ise numunenin kalınlığıdır (cm).

Eşitlik 1 yeniden düzenlenirse, Eşitlik 2 den kütle azaltma katsayısı elde edilir (Singh ve ark., 2018).

$$\frac{\mu}{\rho} = \frac{1}{\rho x} \ln \left( \frac{I}{I_0} \right) \quad (2)$$

Alaşım, karışım veya bileşik için kütle azaltma katsayısı Eşitlik 3 ile tanımlanır.

$$\left( \frac{\mu}{\rho} \right)_{\text{Bil.}} = \sum W_i \left( \frac{\mu}{\rho} \right)_i \quad (3)$$

Burada,  $W_i$   $i$ . elementin ağırlık kesridir ve Eşitlik 4 ile ifade edilir.

$$W_i = \frac{n_i A_i}{\sum_j n_j A_j} \quad (4)$$

$A_i$   $i$ . elementin atomik ağırlığını ve  $n_i$  bileşikteki  $i$ . elementin atom sayısını temsil eder.

Yarı tabaka kalınlığı (*YTK*), gelen fotonun materyal içinden geçmesi sonucunda foton şiddetinin yarıya düşmesi için gereken tabaka kalınlığıdır. Onda bir tabaka kalınlığı (*OTK*) ise gelen fotonun materyal içinden geçmesi sonucunda foton şiddetinin onda birine düşmesi için gereken tabaka

kalınlığıdır. Ortalama Serbest Yol (*OSY*) art arda iki çarpışma arasındaki ortalama mesafedir. *YTK*, *OTK* ve *OSY* sırasıyla Eşitlik 5, Eşitlik 6 ve Eşitlik 7 ile belirlenmiştir (Susoy, 2020).

$$YTK = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (5)$$

$$OTK = \frac{\ln 10}{\mu} \quad (6)$$

$$OSY = \frac{1}{\mu} \quad (7)$$

Burada  $\mu$  lineer soğurma katsayısıdır ve kütle azaltma katsayısının ( $\mu/\rho$ ) bileşiğin yoğunluğuna oranı ile belirlenebilir ( $\rho$ ). ADE inhibitörlerinin yoğunlukları Çizelge 1 de verilmiştir.

**Çizelge 1.** ADE inhibitörlerinin kimyasal formülleri, yoğunlukları ve moleküler ağırlıkları.

| Numune Adı   | Kimyasal Formül   | Yoğunluk (g cm <sup>-3</sup> ) | Moleküler ağırlık (g mol <sup>-1</sup> ) |
|--------------|---|--------------------------------|--|
| Benazepril   | C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | 1.26                           | 424.49                                   |
| Kaptopril    | C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub> S              | 1.3                            | 217.28                                   |
| Enalapril    | C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | 1.204                          | 376.44                                   |
| Fosinopril   | C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> NO <sub>7</sub> P             | 1.173                          | 563.66                                   |
| Lisinopril   | C <sub>21</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> | 1.3                            | 405.48                                   |
| Moeksipril   | C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> | 1.221                          | 498.56                                   |
| Perindopril  | C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | 1.15                           | 368.46                                   |
| Kuinapril    | C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | 1.2                            | 438.51                                   |
| Ramipril     | C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | 1.2                            | 416.51                                   |
| Trandolapril | C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | 1.181                          | 430.53                                   |

Etkin atom numarası ve etkin elektron yoğunluğu ise sırasıyla Eşitlik 8 ve Eşitlik 9 yardımıyla belirlenebilir (Akman ve ark., 2019a).

$$Z_{et} = \frac{\sum_i f_i A_i (\mu/\rho)_i}{\sum_j f_j \left(\frac{A_j}{Z_j}\right) (\mu/\rho)_j} \quad (8)$$

$$N_{et} = \frac{Z_{et}}{A_{top}} (N_A n_{top}) \quad (9)$$

Burada,  $f_i$  bileşikteki  $i$ . elementin atom sayısının bütün elementlerin toplam atom sayısına oranını,  $A_i$   $i$ . elementin atomik ağırlığını,  $Z_j$  atom numarasını,  $N_A$  Avogadro sayısını,  $A_{top}$  toplam atomik ağırlığı ve  $n_{top}$  bileşikteki toplam atom sayısını ifade eder.

Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin eşdeğer atom numaraları ( $Z_{eş}$ ) belirli bir enerjide  $(\mu/\rho)_{Compton}/(\mu/\rho)_{top}$  oranlarının aynı enerjideki bir elementin bu oranlarına karşılık gelmesiyle hesaplanabilir. Bu nedenle  $(\mu/\rho)_{Compton}/(\mu/\rho)_{top}$  değerleri WinXCOM (Gerward, 2001) programı kullanılarak atom numarası 4 ile 40 arasındaki elementler için 0.015 MeV – 15 MeV aralığındaki enerjiler için belirlenmiştir. Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü için  $R(\mu/\rho)_{Compton}/(\mu/\rho)_{top}$  oranı iki ardışık element oranı arasında kaldığında ADE inhibitörü için eşdeğer atom numarası ( $Z_{eş}$ ) Eşitlik 10 ile belirlenebilir (Turhan ve ark., 2020).

$$Z_{eş} = \frac{Z_1(\log R_2 - \log R) + Z_2(\log R - \log R_1)}{\log R_2 - \log R_1} \quad (10)$$

$Z_1$  ve  $Z_2$  sırasıyla  $R_1$  ve  $R_2$  oranlarına karşılık gelen elementlerin atom numaralarıdır.  $R$  ise belirli bir enerjide ADE inhibitörü oranıdır.

Geometrik ilerleme (G-İ) fit katsayıları eşdeğer atom numarası ( $Z_{eş}$ ) hesaplamalarına benzer şekilde hesaplanmıştır. ADE inhibitörleri için G-İ fit katsayıları ( $b$ ,  $c$ ,  $a$ ,  $X_k$  ve  $d$ ) aşağıdaki gibi belirlenir.

$$P = \frac{P_1(\log Z_2 - \log Z_{eş}) + P_2(\log Z_{eş} - \log Z_1)}{\log Z_2 - \log Z_1} \quad (11)$$

$P_1$  ve  $P_2$  belirli bir enerjide sırasıyla  $Z_1$  ve  $Z_2$  atom numaralarına karşılık gelen G-İ fit katsayıları temsil eder. Elementler için G-İ fit katsayıları ANSI / ANS-6.4.3 (1991) standart referans veri tabanından alınmıştır.

Enerji soğurma yığılma faktörü ve maruz kalma yığılma faktörlerinin hesaplanması için Eşitlik 12-14 kullanılmıştır.

$$B(E, x) = 1 + \frac{b-1}{K-1}(K^x - 1) \quad K \neq 1 \text{ için} \quad (12)$$

$$B(E, x) = 1 + (b-1)x \quad K = 1 \text{ için} \quad (13)$$

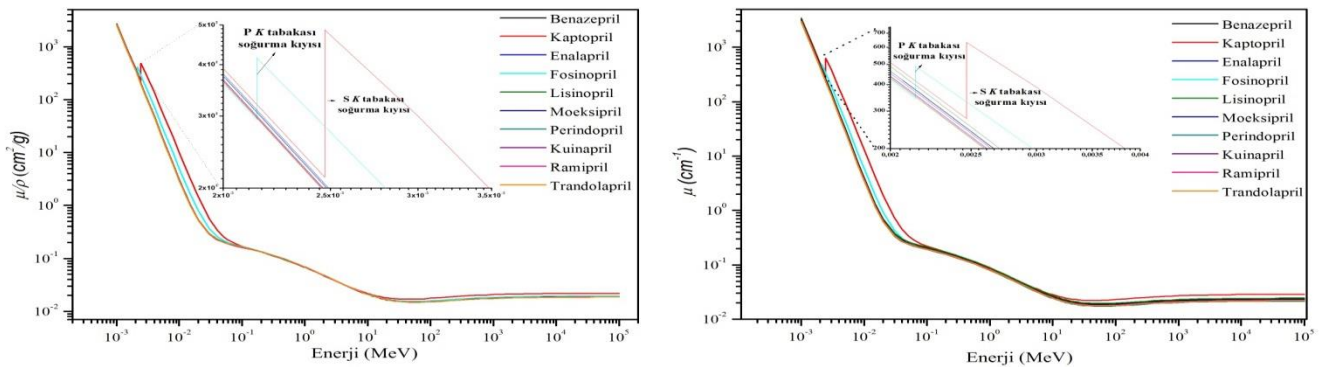
$$K(E, x) = cx^a + d \frac{\tanh(x/X_k - 2) - \tanh(-2)}{1 - \tanh(-2)} \quad x \leq 40 \text{ mfp için} \quad (14)$$

Burada  $E$  gelen fotonun enerjisini,  $x$  nüfus etme derinliğini,  $b$ ,  $c$ ,  $a$ ,  $X_k$  ve  $d$  ise G-İ fit katsayılarını temsil etmektedir.  $1 \text{ mfp}$ 'de yığılma faktörü değeri  $b$  ile temsil edilmektedir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Toplam Kütle Azaltma Katsayısı ve Lineer Azaltma Katsayısı

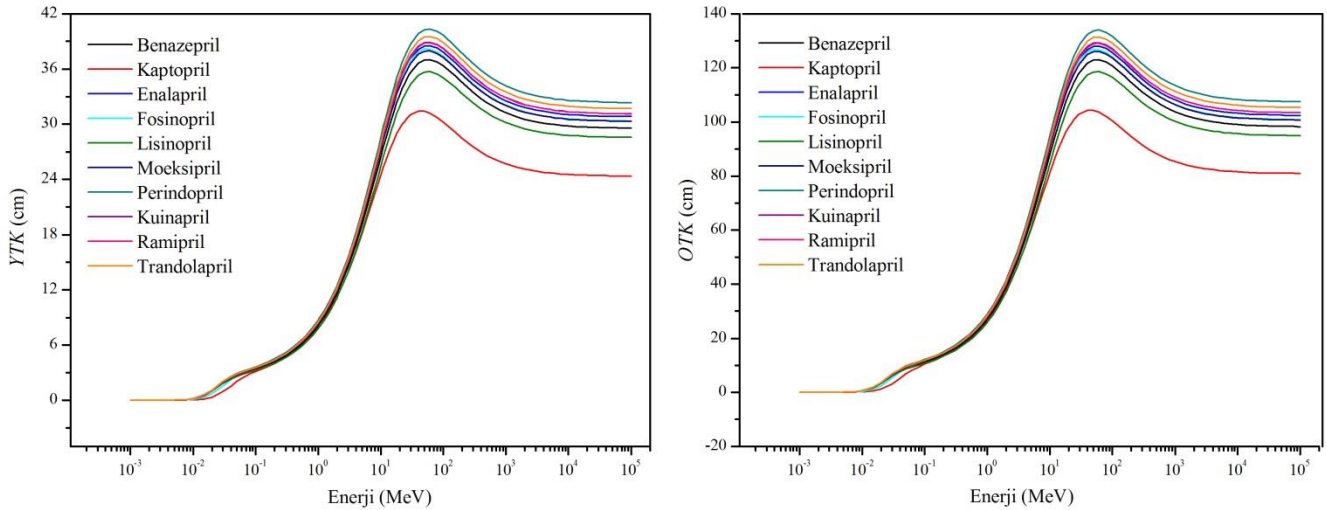
Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörlerinin kimyasal formülleri, yoğunlukları ve moleküler ağırlıkları Tablo 1'de verilmiştir. Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri için toplam kütle azaltma katsayıları ve lineer azaltma katsayılarının enerji ( $1 \text{ keV} \leq E \leq 100 \text{ GeV}$ ) ile değişimi sırasıyla Şekil 1 de verilmiştir. ADE inhibitörleri için toplam kütle azaltma katsayısı ve lineer azaltma katsayısı değerleri birbirine çok yakın olduğu Şekil 1'den açıkça görülmektedir.  $1 \text{ keV}$  ile  $100 \text{ GeV}$  arasındaki farklı enerjiler için Kaptoprilin aldığı toplam kütle ve lineer azaltma katsayı değerleri diğer ADE inhibitörlerine göre daha büyük olduğu görülmektedir. Ayrıca azaltma katsayılarının farklı enerji bölgelerinde farklı karakteristik özellikler gösterdiği görülmektedir. Düşük enerji bölgesinde soğurma kıyıları haricinde artan enerji ile azaltma katsayılarında keskin bir düşüş gözlenirken, bu düşüş orta enerji bölgesinde keskinliğini yitirmiştir. Yüksek enerji bölgesinde ise azaltma parametreleri neredeyse sabittir. ADE inhibitörlerinin toplam kütle azaltma katsayıları ve lineer azaltma katsayıları literatürde farklı materyaller için yapılan diğer çalışmalar (Sayyed, 2016; Manjunatha ve ark., 2019) ile benzer özellikler göstermiştir.



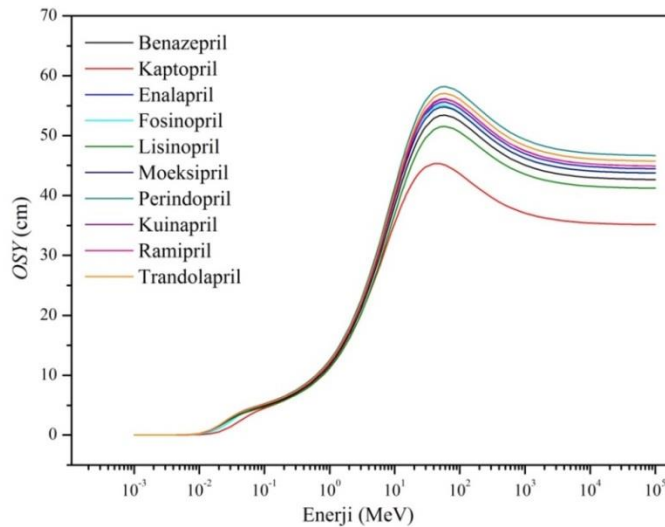
Şekil 1. Toplam kütle azaltma katsayıları ve lineer azaltma katsayılarının enerji ile değişimi.

### Yarı Tabaka Kalınlığı, Onda Bir Tabaka Kalınlığı ve Ortalama Serbest Yol

Yarı tabaka kalınlığı, onda bir tabaka kalınlığı ve ortalama serbest yol değerleri bize materyalin radyasyon azaltma özellikleri ile ilgili önemli bilgiler verir. Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin yarı tabaka ve onda bir kalınlık değerlerinin enerji ile değişimi Şekil 2'de gösterilmiştir. İnhibitörlerin ortalama serbest yol değerlerinin enerji ile değişimi ise Şekil 3'te verilmiştir. Şekil 2 ve Şekil 3'ten de görüleceği üzere düşük enerji bölgesinden orta enerji bölgesini kadar olan enerji aralığında ADE inhibitörlerinin *YTK*, *OTK* ve *OSY* değerleri artış göstererek orta enerji bölgesinde maksimuma ulaşmıştır. Yüksek enerji bölgesinde ise bu değerler artan enerji ile exponansiyel bir azalış göstermiş ve enerjinin artışı ile neredeyse sabitlenmiştir. Şekil 2 ve Şekil 3'ten görüldüğü üzere, Perindopril inhibitörü en yüksek *YTB*, *OTK* ve *OSY* değerlerini alırken Kaptopril inhibitörü ise en küçük *YTK*, *OTK* ve *OSY* değerlerini almıştır. 1 keV ile 100 GeV arasındaki farklı enerjilerde Perindopril için yarı tabaka kalınlıkları (*YTK*)  $23 \times 10^{-5}$ -40.34, onda bir tabaka kalınlıkları (*OBK*)  $76 \times 10^{-5}$ -134.03 ve ortalama serbest yol (*OSY*) değerleri  $33 \times 10^{-5}$ -58.21 aralıklarında bulunmuştur. Kaptopril için yarı tabaka kalınlığı, onda bir tabaka kalınlığı ve ortalama serbest yol değerleri 40 MeV de maksimum değerlerini almışlardır ve sırasıyla bu değerler 31.41, 104.36 ve 45.32 olarak bulunmuştur.



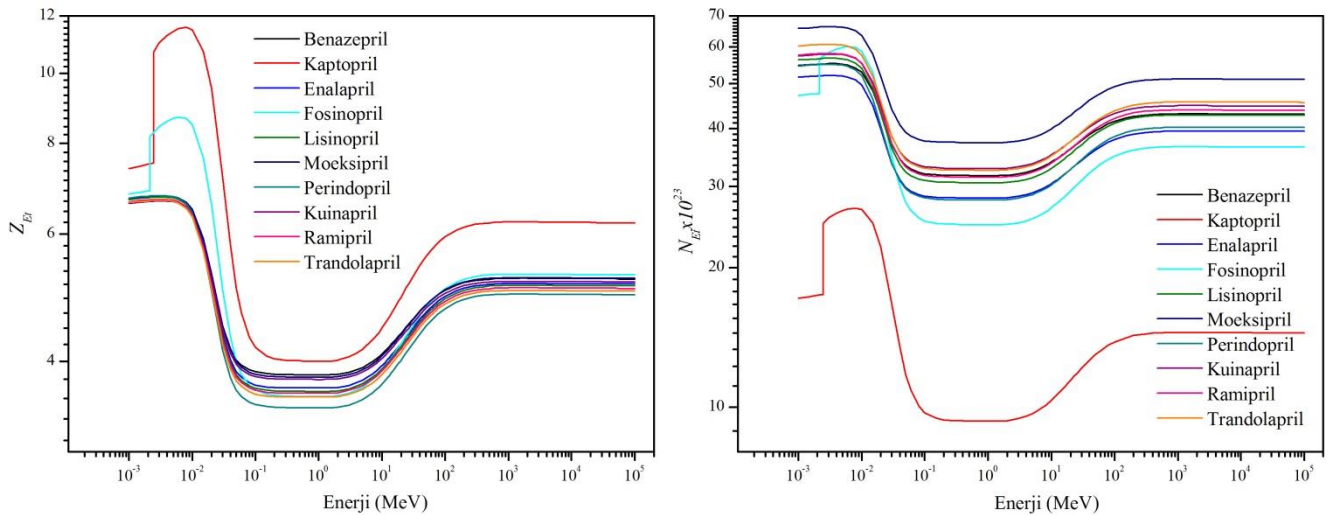
Şekil 2. Yarı tabaka kalınlığı ve onda bir tabaka kalınlığı değerlerinin enerji ile değişimi.



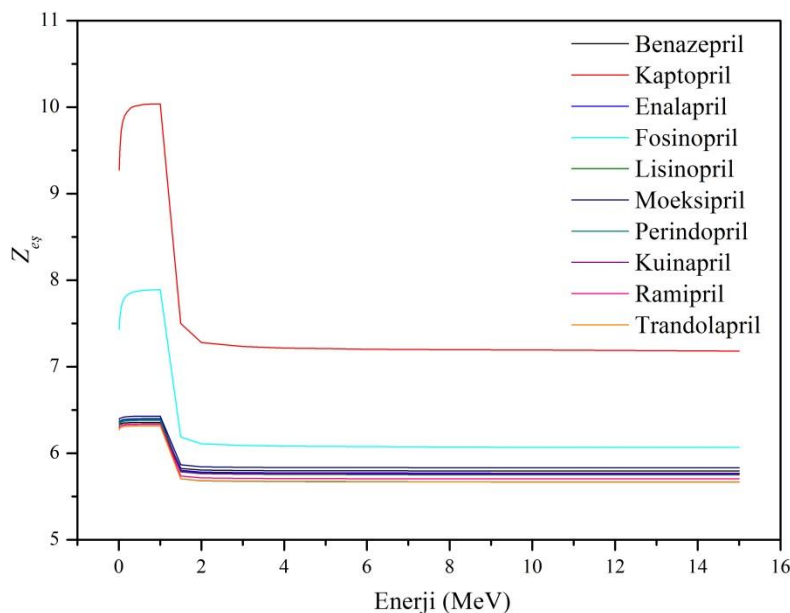
Şekil 3. Ortalama serbest yol değerlerinin enerji ile değişimi.

### Etkin Atom Numarası ve Etkin Elektron Yoğunluğu

Atom numarası birden fazla element içeren bir materyal için tek bir sayı olarak tanımlanamaz. Böyle bir materyal için atom numarası etkin atom numarası ( $Z_{Et}$ ) olarak tanımlanır ve farklı enerjiler için farklı değerler alabilir. Birim kütle başına elektron sayısı etkin elektron yoğunluğu ( $N_{Et}$ ) ile ifade edilir. ADE inhibitörlerinin etkin atom numarası ( $Z_{Et}$ ) ve etkin elektron yoğunluğu ( $N_{Et}$ ) değerlerini  $1 \text{ keV} \leq E \leq 100 \text{ GeV}$  enerji aralığında belirlemek için sırasıyla Eşitlik 8 ve Eşitlik 9 kullanılmıştır. Ayrıca,  $Z_{Et}$  ve  $N_{Et}$  değerleri Şekil 4'te enerjinin bir fonksiyonu olarak çizilmiştir. Şekil 4'ten görüldüğü üzere, Kaptopril en yüksek  $Z_{Et}$  değerlerini alırken, en düşük  $N_{Et}$  değerlerini almıştır. Kaptoprilin  $Z_{Et}$  değerleri 4-11.6 arasında bulunurken,  $N_{Et}$  değerleri  $9.3 \times 10^{23}$ - $26.9 \times 10^{23}$  arasında bulunmuştur. *YTK*, *OTK*, *OSY*,  $Z_{Et}$  ve  $N_{Et}$  değerleri literatürde farklı materyaller için yapılan diğer çalışmalar (Chen ve ark., 2018; Issa ve ark., 2018; Kaur ve ark., 2019; Manjunatha ve ark., 2019) ile benzer özellikler göstermiştir. Şekil 4'te de tıpkı Şekil 1-3 te olduğu gibi  $Z_{Et}$  ve  $N_{Et}$  değerleri farklı enerji bölgelerinde farklı karakteristik özellik göstermiştir. Şekil 1-4'ten görüldüğü gibi, fotoelektrik etki düşük enerji bölgesinde baskın iken orta enerji bölgesinde Compton saçılma etkisi baskındır. 1022 keV foton enerjisinden sonra ise çift oluşum etkisi gözlemlenmiştir.



Şekil 4. Etkin atom numarası ve etkin elektron yoğunluğu değerlerinin enerji ile değişimi.



Şekil 5. ADE inhibitörlerinin eşdeğer atom numaralarının enerji ile değişimi.

**Eşdeğer Atom Numarası, Enerji Soğurma Yığılma Faktörü ve Maruz Kalma Yığılma Faktörü**

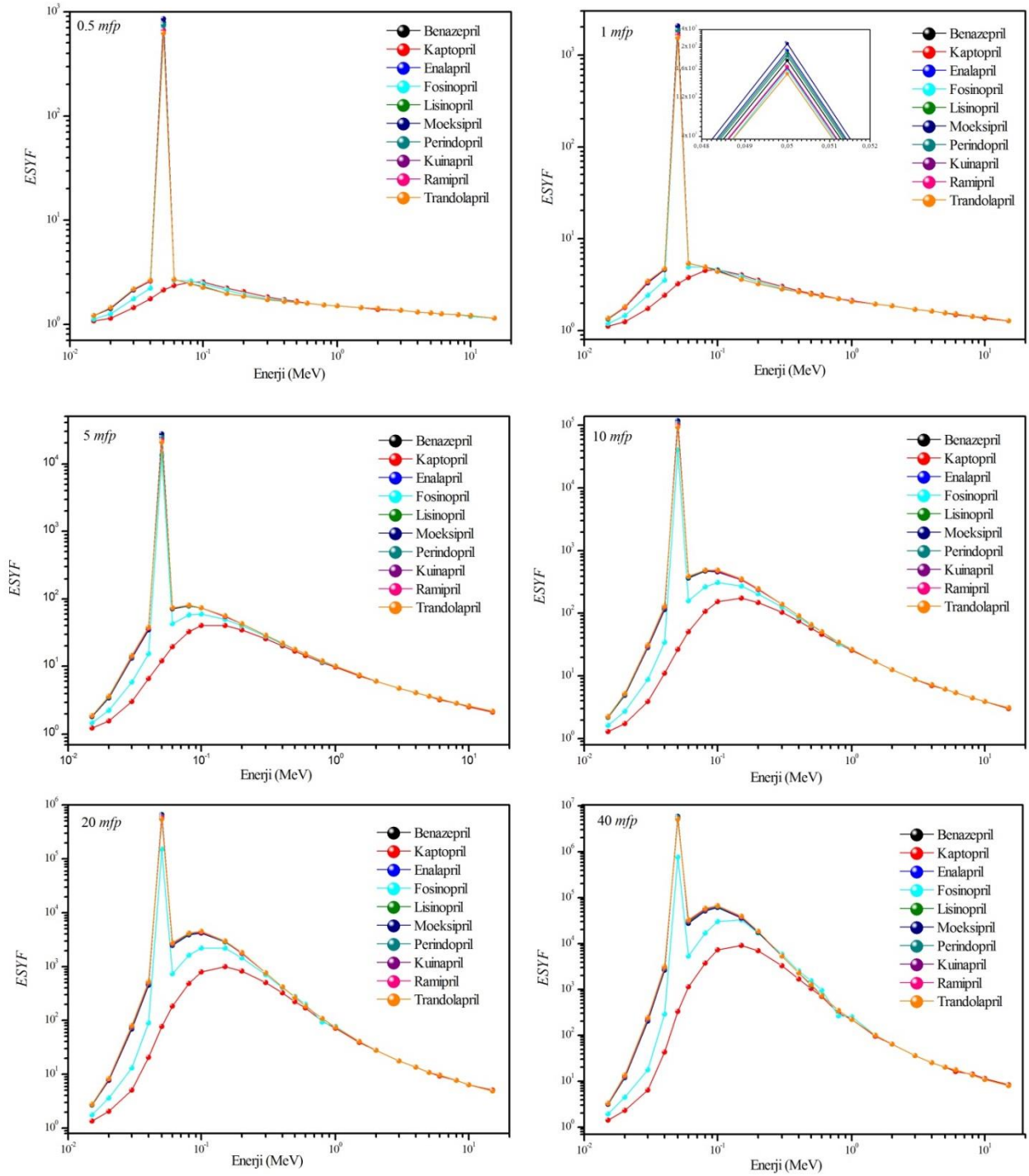
Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörlerinin eşdeğer atom numaraları Eşitlik 10 kullanılarak elde edilmiştir. ADE inhibitörlerinin  $0.015 \text{ MeV} \leq E \leq 15 \text{ MeV}$  enerji aralığındaki eşdeğer atom numaraları ( $Z_{eş}$ ) Şekil 5'de verilmiştir. Geometrik ilerleyen (G-P) enerji soğurma yığılma faktörü katsayıları ve maruz kalma yığılma faktörü katsayıları Eşitlik 11'den hesaplanmıştır. Ayrıca Benazepril için G-P enerji soğurma ve maruz kalma yığılma faktörü katsayıları Çizelge 2 te verilmiştir. Eşitlik 11 den elde edilen katsayılar Eşitlik 12 de kullanılarak enerji soğurma ve maruz kalma yığılma faktörleri  $0.015 \text{ MeV} \leq E \leq 15 \text{ MeV}$  enerji aralığında ADE inhibitörleri için hesaplanmıştır.

**Çizelge 3.** Benazepril için G-P enerji soğurma ve maruz kalma yığılma faktörü katsayıları.

| Enerji (MeV) | ESYF   |       |       |        |        | MKYF   |       |       |        |        |
|--------------|--------|-------|-------|--------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
|              | a      | b     | c     | d      | Xk     | a      | b     | c     | d      | Xk     |
| 0.015        | 0.156  | 1.343 | 0.512 | -0.078 | 14.471 | 0.155  | 1.334 | 0.517 | -0.077 | 14.296 |
| 0.02         | 0.096  | 1.780 | 0.682 | -0.047 | 15.910 | 0.097  | 1.759 | 0.680 | -0.047 | 16.016 |
| 0.03         | 0.001  | 3.367 | 1.043 | -0.008 | 13.801 | 0.001  | 3.196 | 1.043 | -0.008 | 13.843 |
| 0.04         | -0.100 | 4.684 | 1.571 | 0.042  | 13.994 | -0.102 | 4.794 | 1.580 | 0.044  | 13.793 |
| 0.05         | -0.145 | 1744  | 1.911 | 0.061  | 14.295 | -0.150 | 6.113 | 1.942 | 0.065  | 14.166 |
| 0.06         | -0.173 | 5.324 | 2.155 | 0.075  | 14.342 | -0.182 | 6.601 | 2.223 | 0.082  | 14.226 |
| 0.08         | -0.197 | 4.880 | 2.393 | 0.083  | 14.311 | -0.215 | 6.283 | 2.543 | 0.096  | 14.028 |
| 0.1          | -0.200 | 4.435 | 2.439 | 0.081  | 14.734 | -0.222 | 5.641 | 2.637 | 0.097  | 14.396 |
| 0.15         | -0.199 | 3.606 | 2.420 | 0.078  | 14.757 | -0.232 | 4.229 | 2.714 | 0.102  | 14.129 |
| 0.2          | -0.190 | 3.244 | 2.302 | 0.076  | 14.781 | -0.224 | 3.619 | 2.591 | 0.100  | 14.429 |
| 0.3          | -0.172 | 2.813 | 2.102 | 0.068  | 14.680 | -0.199 | 3.078 | 2.312 | 0.087  | 14.279 |
| 0.4          | -0.152 | 2.626 | 1.915 | 0.062  | 14.604 | -0.181 | 2.789 | 2.114 | 0.076  | 13.687 |
| 0.5          | -0.138 | 2.458 | 1.795 | 0.059  | 15.325 | -0.162 | 2.612 | 1.945 | 0.073  | 14.167 |
| 0.6          | -0.121 | 2.385 | 1.669 | 0.047  | 14.702 | -0.145 | 2.491 | 1.808 | 0.060  | 13.792 |
| 0.8          | -0.107 | 2.200 | 1.556 | 0.045  | 14.131 | -0.125 | 2.285 | 1.649 | 0.058  | 13.887 |
| 1            | -0.090 | 2.095 | 1.449 | 0.039  | 14.396 | -0.105 | 2.166 | 1.518 | 0.049  | 13.852 |
| 1.5          | -0.060 | 1.940 | 1.277 | 0.027  | 14.300 | -0.071 | 2.021 | 1.321 | 0.035  | 13.705 |
| 2            | -0.038 | 1.841 | 1.170 | 0.015  | 14.458 | -0.045 | 1.908 | 1.196 | 0.022  | 14.071 |
| 3            | -0.011 | 1.715 | 1.051 | 0.003  | 14.222 | -0.015 | 1.758 | 1.060 | 0.007  | 12.121 |
| 4            | 0.003  | 1.627 | 0.989 | -0.002 | 13.222 | 0.004  | 1.659 | 0.984 | -0.007 | 24.041 |
| 5            | 0.015  | 1.565 | 0.945 | -0.007 | 14.821 | 0.017  | 1.580 | 0.938 | -0.011 | 14.585 |
| 6            | 0.029  | 1.520 | 0.901 | -0.018 | 12.505 | 0.026  | 1.528 | 0.907 | -0.015 | 14.466 |
| 8            | 0.035  | 1.434 | 0.879 | -0.017 | 11.927 | 0.037  | 1.441 | 0.869 | -0.032 | 16.524 |
| 10           | 0.040  | 1.380 | 0.858 | -0.022 | 14.356 | 0.042  | 1.375 | 0.855 | -0.020 | 12.556 |
| 15           | 0.047  | 1.285 | 0.837 | -0.031 | 15.555 | 0.046  | 1.278 | 0.839 | -0.029 | 15.027 |

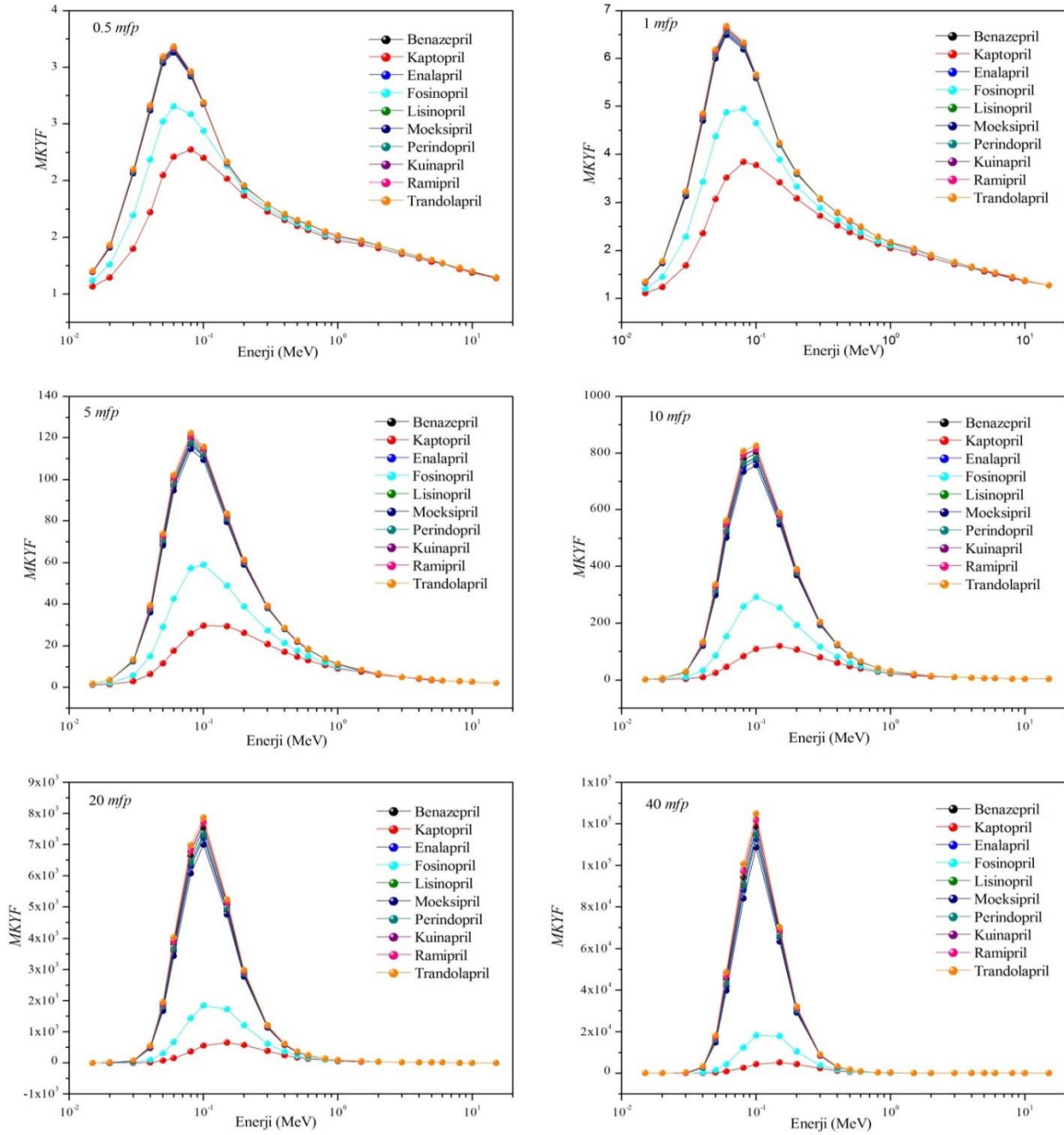
Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörlerinin 0.5, 1, 5, 10, 20 ve 40 *mfp* penetrasyon derinliklerinde  $0.015 \text{ MeV} \leq E \leq 15 \text{ MeV}$  enerji aralığındaki enerji soğurma yığılma faktörü (ESYF) değerlerinin enerji ile değişimleri Şekil 6 da verilmiştir. Maruz kalma yığılma faktörü değerlerinin enerji ile değişimleri ise Şekil 7 de farklı penetrasyon derinlikleri için verilmiştir. Şekil 7'den görüldüğü üzere 40 *mfp*'de MKYF değerleri incelenen anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörleri için 0.5 MeV'de maksimum değerlerini almıştır. Şekil 6 ve Şekil 7'den görüleceği üzere Kaptopril genellikle düşük enerji bölgesinde ve orta enerji bölgesinde en düşük ESYF ve MKYF değerlerini almıştır. Kaptopril in bu düşük değerleri incelenen anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörleri arasında en iyi soğurucu olduğunun bir kanıtı olarak görülebilir. Ayrıca, ESYF ve MKYF değerlerinin bileşiklerin kimyasına ve foton enerjisine bağlı olduğu söylenebilir.





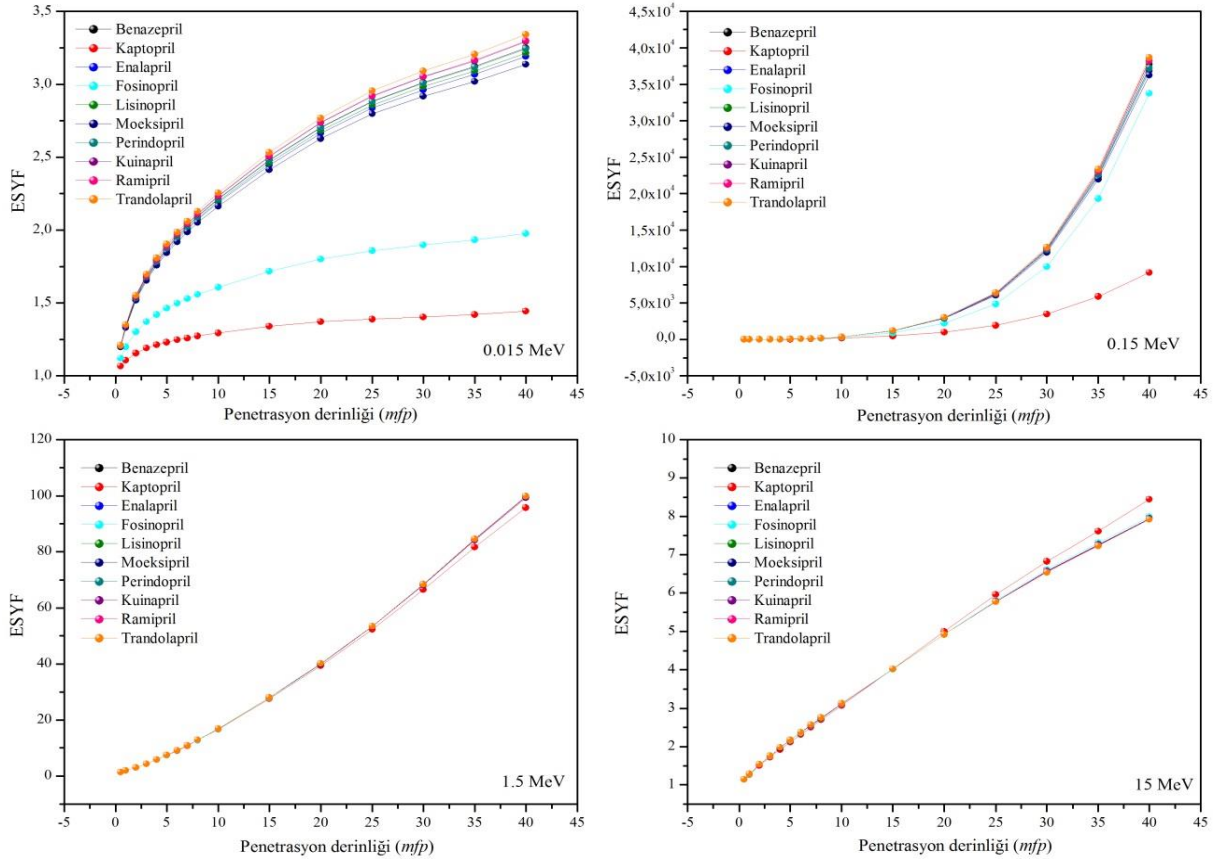
**Şekil 6.** ADE inhibitörlerinin 0.5, 1, 5, 10, 20 ve 40 *mfp* penetrasyon derinliklerinde  $0.015 \text{ MeV} \leq E \leq 15 \text{ MeV}$  enerji aralığındaki ESYF değerlerinin enerji ile değişimi.

Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin ESYF ve MKYF değerlerinin 0.015 MeV, 0.15 MeV, 1.5 MeV ve 15 MeV enerjilerde penetrasyon derinlikleri ile değişimi sırasıyla Şekil 8 ve Şekil 9 da verilmiştir. Artan penetrasyon derinlikleriyle birlikte yığılma faktörleri değerlerinin de arttığı gözlemlenmiştir. Örneğin, Ramipril için 0.15 MeV enerji için ESYF değerleri 0.5 *mfp*'de 1.98, 1 *mfp*'de 3.61, 5 *mfp*'de 55.37, 10 *mfp*'de 349.9, 20 *mfp*'de 2982 ve 40 *mfp*'de 38178 değerlerini almıştır.

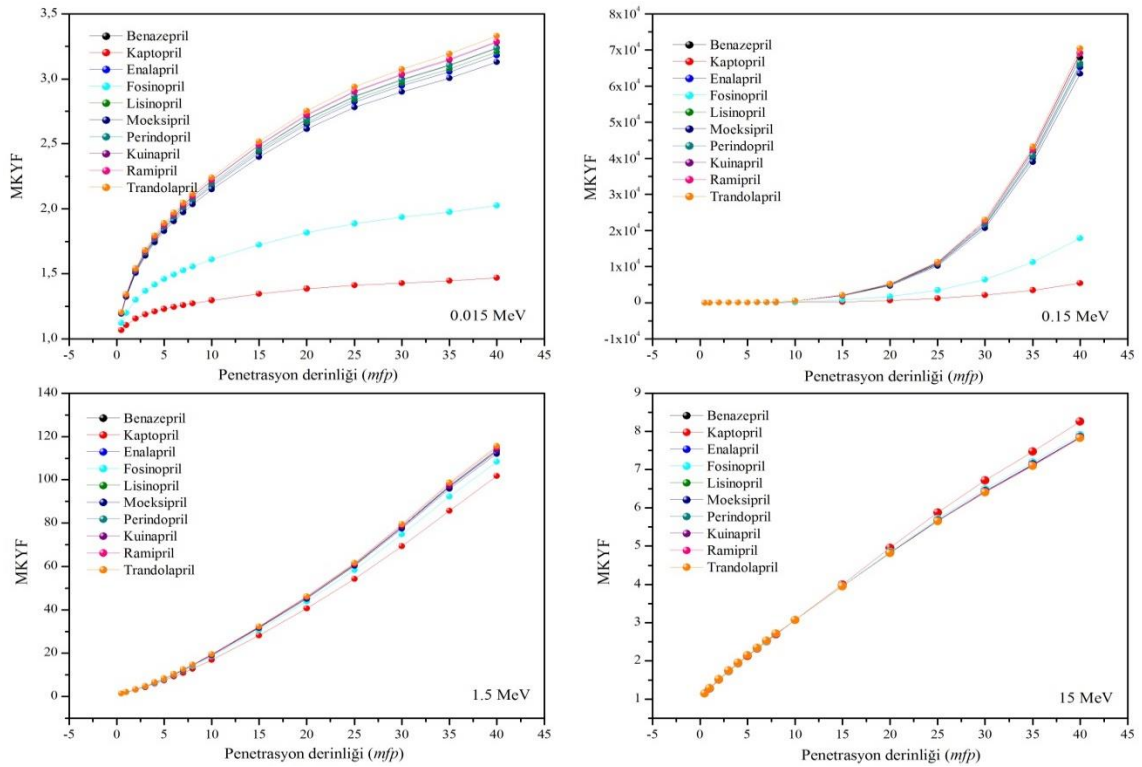


**Şekil 7.** ADE inhibitörlerinin 0.5, 1, 5, 10, 20 ve 40 *mfp* penetrasyon derinliklerinde  $0.015 \text{ MeV} \leq E \leq 15 \text{ MeV}$  enerji aralığındaki MKYF değerlerinin enerji ile değişimi.

Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri arasında Kaptoprilin ESYF ve MKYF değerleri genel olarak 0.015 MeV, 0.15 MeV ve 1.5 MeV'de en düşük değerlerini alırken 15 MeV'de ters eğilim göstermektedir. Kaptopril 15 MeV'de en yüksek ESYF ve MKYF değerlerini 15 *mfp* ile 40 *mfp* aralığındaki penetrasyon derinliklerinde almıştır. Düşük ve orta enerji bölgesine kıyasla yüksek enerji bölgesindeki bu ters eğilim, yüksek enerjili bölgede çift üretimin daha baskın olması ve yaklaşık olarak  $Z^2$ 'ye bağlı olması ile açıklanabilir. Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin ESYF ve MKYF değerleri literatürde bulunan camlar (Kaur ve ark., 2019; Mahmoud ve ark., 2019) alaşımlar (Manjunatha ve ark., 2019) ve bileşikler (Singh ve Badiger, 2016; Tekin ve ark., 2020; Sayyed ve ark., 2019) ile benzer özellikler sergilediği gözlemlenmiştir.



Şekil 8. ADE inhibitörlerinin ESYF değerlerinin 0.015 MeV, 0.15 MeV, 1.5 MeV ve 15 MeV enerjilerde penetrasyon derinlikleri ile değişimi.



Şekil 9. ADE inhibitörlerinin MKYF değerlerinin 0.015 MeV, 0.15 MeV, 1.5 MeV ve 15 MeV enerjilerde penetrasyon derinlikleri ile değişimi.

## SONUÇ

Bu çalışmada Benazepril, Kaptopril, Enalapril, Fosinopril, Lisinopril, Moeksipril, Perindopril, Kuinapril, Ramipril ve Trandolapril için 1 keV ile 100 GeV enerji aralığında  $\mu/\rho$ ,  $\mu$ , YTG, OTG, OSY,  $Z_{et}$  ve  $N_{et}$  değerleri belirlendi. Ayrıca  $Z_{eş}$ , ESYF ve MKYF değerleri, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri için 40 mfp'ye kadar farklı penetrasyon derinlikleri için  $0.015 \text{ MeV} \leq E \leq 15 \text{ MeV}$  enerji bölgesinde geometrik ilerleme (G-P) fit katsayıları kullanılarak hesaplandı. Azaltma parametrelerinde önemli farklılıklar gözlemlendi. Tüm parametrelerin birbirini desteklediği görüldü. Tablolar ve şekillerin gösterildiği üzere, Kaptopril incelenen anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri içerisinde radyasyonu daha fazla soğurmaktadır. Elde ettiğim sonuçların başta tıp ve eczacılık alanları olmak üzere radyasyon araştırmalarının çeşitli uygulama alanlarına katkı sağlayacağına inanıyorum.

## Çıkar Çatışması

Makaleye ait çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve makalenin yazılması aşamalarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederim.

## Yazar Katkısı

Makalenin planlanması, yürütülmesi ve yazılması makale tek yazarı olarak tarafımda yapıldığı beyan ederim.

## KAYNAKLAR

- Agar O, Sayyed MI, Akman F, Tekin HO, Kaçal MR, 2019. An extensive investigation on gamma ray shielding features of Pd/Agbased alloys. *Nuclear Engineering and Technology*, 51: 853-859.
- Akman F, Kaçal MR, Sayyed MI, Karataş HA, 2019a. Study of gamma radiation attenuation properties of some selected ternary alloys. *Journal of Alloys and Compounds*, 782: 315-322.
- Akman F, Sayyed MI, Kaçal MR, Tekin HO, 2019b. Investigation of photon shielding performances of some selected alloys by experimental data, theoretical and MCNPX code in the energy range of 81 keV-1333 keV. *Journal of Alloys and Compounds*, 772: 516-524.
- Akman F, Khattari ZY, Kaçal MR, Sayyed MI, Afaneh F, 2019c. The radiation shielding features for some silicide, boride and oxide types ceramics. *Radiation Physics and Chemistry*, 160: 9–14.
- Akman F, Geçibesler IH, Kumar A, Sayyed MI, Zaid MHM, 2019d. Evaluation of radiation absorption characteristics in different parts of some medicinal aromatic plants in the low energy region. *Results in Physics*, 12: 94–100.
- Al-Buriah MS, Arslan H, Tonguc BT, 2019. Investigation of photon energy absorption properties for some biomolecules. *Nuclear Science and Techniques* 30 (103): 1-9.
- Al-Hamarneh IF, Marshdeh MW, Almasoud FI, Alkaoud A, 2017. Determination of gamma-ray parameters for polyethylene glycol of different molecular weights. *Nuclear Science and Techniques* 28 (157): 1-8.
- ANSI/ANS-6.4.3, 1991. Gamma Ray Attenuation Coefficient and Buildup Factors for Engineering Materials. American Nuclear Society, La Grange Park, IL, USA.
- Aşkın A, Sayyed MI, Sharma A, Dal M, El-Mallawany R, Kaçal MR, 2019. Investigation of the gamma ray shielding parameters of  $(100-x) [0.5\text{Li}_2\text{O}-0.1\text{B}_2\text{O}_3-0.4\text{P}_2\text{O}_5]-x\text{TeO}_2$  glasses using Geant4 and FLUKA codes. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 521: 119489.
- Chen S, Chai Z, Xue D, Jiang X, Yang Y, 2018. Variation of gamma radiation shielding properties with incident photon energy and penetration depth for WC/Al composites. *Radiation Effects and Defects in Solids*. 173: 399-413.
- Gerward L, Guilbert N, Jensen KB, Levring H, 2001. X-ray absorption in matter. *Reengineering XCOM*. *Radiation Physics and Chemistry*, 60: 23–24.
- Issa SAM, Sayyed MI, Zaid MHM, Matori KA, 2018. Photon parameters for gamma-rays sensing properties of some oxide of lanthanides. *Results in Physics*, 9: 206–210.
- Kaur P, Singh KJ, Kurudirek M, Thakur S, 2019. Study of environment friendly bismuth incorporated lithium borate glass system for structural, gamma-ray and fast neutron shielding properties. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 223: 117309.

- Kilicoglu O, 2019. Characterization of copper oxide and cobalt oxide substituted bioactive glasses for gamma and neutron shielding applications. *Ceramics International*, 45: 23619–23631.
- Lokhande RM, More CV, Surung BS, Pawar PP, 2017. Determination of attenuation parameters and energy absorption build-up factor of amine group materials. *Radiation Physics and Chemistry*, 141: 292–299.
- Mahmoud SI, Issa SAM, Saddeek YB, Tekin HO, Kilicoglu O, Alharbi T, Sayyed MI, Erguzel TT, Elsaman R, 2019. Gamma, neutron shielding and mechanical parameters for lead vanadate glasses. *Ceramics International* 45, 14058-14072.
- Manjunatha HC, Sathish KV, Seenappa L, Gupta D, Raj SAC, 2019. A study of X-ray, gamma and neutron shielding parameters in Si- alloys. *Radiation Physics and Chemistry*, 165: 108414.
- Sathiyaraj P, Samuel EJJ, Valeriano CCS, Kurudirek M, 2017. Effective atomic number and buildup factor calculations for metal nano particle doped polymer gel. *Vacuum*, 143: 138-149.
- Sayyed MI, 2016. Investigation of shielding parameters for smart polymers. *Chinese Journal of Physics*, 54: 408–415.
- Sayyed MI, Akman F, Kumar A, Kaçal MR, 2018. Evaluation of radioprotection properties of some selected ceramic samples. *Results in Physics*, 11: 1100–1104.
- Sayyed MI, Tekin HO, Agar O, 2019. Gamma photon and neutron attenuation properties of MgO–BaO–B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>–TeO<sub>2</sub>–Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> glasses: The role of TeO<sub>2</sub>. *Radiation Physics and Chemistry*, 163: 58-66.
- Singh M, Tondon A, Sandhu BS, Singh B, 2018, Energy dependence of radiation interaction parameters of some organic compounds. *Radiation Physics and Chemistry*, 145: 80–88.
- Singh R, Singh D, Singh A, Dhaliwal AS, 2019. Photon Interaction Parameters Investigations for Some ZnO–Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>–Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Glasses at 59.4 keV Incident Photon Energy. *Glass Physics and Chemistry*, 45 (3): 202–207.
- Singh VP, Badiger NM, 2016. Studies on photon buildup for some thermoluminescent dosimetric compounds. *Indian Journal of Physics*. 90(3): 259-269.
- Susoy G, 2020. Effect of TeO<sub>2</sub> additions on nuclear radiation shielding behavior of Li<sub>2</sub>O–B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>–TeO<sub>2</sub> glass-system. *Ceramics International*, 46: 3844–3854.
- Tekin HO, Kassab LRP, Kilicoglu O, Magalhaes ES, Issa SAM, Mattos GRS. 2020. Newly developed tellurium oxide glasses for nuclear shielding applications: An extended investigation. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 528: 119763.
- Turhan MF, Akman F, Polat H, Kaçal MR, Demirkol İ, 2020. Gamma-ray attenuation behaviors of hematite doped polymer composites, *Progress in Nuclear Energy*, 129: 103504.
- Uosif MAM, Mostafa AMA, Issa SAM, Tekin HO, Alrowailia ZA, Kilicoglu O, 2020. Structural, mechanical and radiation shielding properties of newly developed tungsten lithium borate glasses: An experimental study. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 532: 119882.

**Atf İçin:** Günal-Köroğlu D, Süyünç G, Yıldırım R, Turan S, 2021. Farklı Çözücülerle Hazırlanan Bazı Meyve Ekstraktlarının Antioksidan Potansiyeli. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1127-1139.

**To Cite:** Günal-Köroğlu D, Süyünç G, Yıldırım R, Turan S, 2021. Antioxidant Potential of Some Fruit Extracts Prepared with Different Solvents. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1127-1139.

### **Farklı Çözücülerle Hazırlanan Bazı Meyve Ekstraktlarının Antioksidan Potansiyeli**

Deniz GÜNAL KÖROĞLU<sup>1</sup>, Gezzemhan SÜYÜNÇ<sup>1</sup>, Rabia YILDIRIM<sup>1</sup>, Semra TURAN<sup>1\*</sup>

**ÖZET:** Bu çalışmada çilek, ahududu, vişne ve kıvılcıkta ekstraksiyon çözücüsü olarak metanol, etanol, %80'lik metanol ve %80'lik etanol kullanılarak fenolik ekstraktlar elde edilmiştir. Herbir meyve ekstraktının toplam fenolik madde miktarı ve farklı konsantrasyonlarda (0.5, 1, 2 and 3 mg ml<sup>-1</sup>) antioksidan aktiviteleri (demir iyonları indirgeme gücü, linoleik asit emülsiyonunda antioksidan aktivite ve DPPH radikallerini yakalama gücü) belirlenmiştir. Tüm ekstraktların antioksidan aktiviteleri konsantrasyon arttıkça artmıştır. Toplam fenolik madde miktarı ile ekstraktların antioksidan aktiviteleri arasında bir korelasyon bulunmaktadır. Toplam fenolik madde miktarına ve antioksidan aktivite analiz sonuçlarına göre çilek ekstraktları diğer meyve ekstraktlarına kıyasla daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olmuştur ( $p<0.05$ ). Ahududu ekstraktının demir indirgeme gücü en düşük olup, aynı çözücü için vişne ekstraktında kıvılcık ekstraktından daha yüksek indirgeme gücü saptanmıştır. Linoleik asit emülsiyonunda meyve ekstraktlarının tüm konsantrasyonlarında sulu etanol ekstraktları daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olmuştur. Çilek ekstraktları dışında, ahududu %80 metanol ekstraktı en yüksek DPPH radikal yakalama gücüne sahip olup, onu kıvılcık ve vişne ekstraktları takip etmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Çilek, ahududu, vişne, kıvılcık, antioksidan aktivite

### **Antioxidant Potential of Some Fruit Extracts Prepared with Different Solvents**

**ABSTRACT:** In this study, phenolic extracts of strawberry, red raspberry, sour cherry, and cornelian cherry were obtained using methanol, ethanol, 80% methanol, and 80% ethanol as extraction solvents. Total phenolic content and antioxidant activities (ferric reducing power, antioxidant activity in linoleic acid emulsion, and DPPH radical scavenging activity) were determined for each fruit extracts at different concentrations (0.5, 1, 2 and 3 mg mL<sup>-1</sup>). Antioxidant activities of all extracts were increased with increased concentration ( $P<0.05$ ). There was a correlation between total phenol content and antioxidant activity of the extracts. According to total phenolic content and antioxidant activity analyses, strawberry extracts had significantly higher antioxidant activity compared to other fruit extracts ( $P<0.05$ ). Reducing power of raspberry ethanol extract was the lowest and sour cherry had higher reducing power than cornelian cherry for the same solvent. Aqueous ethanol extracts had higher antioxidant activity in linoleic acid emulsion among fruit extracts at all concentrations. Except for strawberry extracts, 80% methanol extract of red raspberry had the highest DPPH radical scavenging activity at all the concentration tested, followed by cornelian cherry and sour cherry extracts.

**Keywords:** Strawberry, red raspberry, sour cherry, cornelian cherry, antioxidant activity

Deniz Günal KÖROĞLU ([Orcid ID: 0000-0002-8642-9160](https://orcid.org/0000-0002-8642-9160)), Gezzemhan SÜYÜNÇ ([Orcid ID: 0000-0002-3759-7221](https://orcid.org/0000-0002-3759-7221)), Rabia YILDIRIM ([Orcid ID: 0000-0001-6514-1590](https://orcid.org/0000-0001-6514-1590)), Semra TURAN ([Orcid ID: 0000-0002-1005-3590](https://orcid.org/0000-0002-1005-3590)), Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bolu, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Semra TURAN, e-mail: [turan\\_s@ibu.edu.tr](mailto:turan_s@ibu.edu.tr)

Makale verilerinin bir kısmı 12-14 Ekim 2011 tarihinde İstanbulda düzenlenen "4<sup>th</sup> International Congress on Food and Nutrition/3<sup>rd</sup> SAFE Concertium International Congress on Food Safety" adlı kongrede ve 18-21 Eylül 2011 tarihinde Hollanda- Rotterdam'da düzenlenen "9<sup>th</sup> Euro Fed Lipid Congress, Oils, Fats and Lipids for Healthy and Sustainable World" adlı kongrede poster bildirisi olarak sunulmuştur.

## INTRODUCTION

Berries, sour cherry (also called tart cherries), and cornelian cherries are special foods with their unique aroma, color, flavor, texture, and chemical content such as minerals, vitamins, antioxidants, and secondary metabolites. Berries and cherries are consumed a lot in their seasons as fresh but their shelf life is very short. Therefore, it is common to consume these fruits as a processed product in the form of dried, frozen, or as jams, jellies, marmalade, syrups, wines, etc. (Cerezo et al., 2010; Bobinaite et al., 2012; Chen et al., 2013a; Mandave et al., 2014). For reasons such as they have a short shelf life or cannot be consumed fresh, they have recently been included in the literature due to their antioxidant properties. They are good sources of antioxidants that have been researched lately (Dragišić Maksimovic et al., 2013). Phenolic compounds in these fruits are flavonoids, especially anthocyanins, phenolic acids, and tannins (Cerezo et al., 2010; Bobinaite et al., 2012). Also, they are rich in anthocyanins, which are responsible for the red color and are powerful antioxidants. Many studies have studied anthocyanin content and antioxidant potential in strawberry (De Souza et al., 2014; Mandave et al., 2014; Chaves et al., 2017; Márquez-López et al., 2020), raspberry (Pantelidis et al., 2007; Çekiç and Özgen, 2010; Chen et al., 2013a; Dragišić Maksimovic et al., 2013; De Souza et al., 2014), sour cherry (Kim et al., 2005; Piccolella et al., 2008; Khoo et al., 2011; Kopjar et al., 2014) and cornelian cherry (Pantelidis et al., 2007; Yilmaz et al., 2009; Hassanpour et al., 2011; Celep et al., 2012; Moldovan et al., 2016). Potential health effects of these fruits associated with anthocyanin were studied in the literature (Ferretti et al., 2010; Chen et al., 2013b; Khoo et al., 2017).

Strawberry, raspberry, sour cherry, and cornelian cherry have a unique phenolic profiles and strong antioxidant activity. The major phenolic compounds in strawberries are ellagic acid, p-coumaric acid, and their esters (Häkkinen et al., 1999; Márquez-López et al., 2020), procyanidins, ellagitannins, (+)-catechin and p-coumaroyl esters (Cerezo et al., 2010). Dominant anthocyanin compounds in strawberry are cyanidin-3-O-glucoside, pelargonidin-3-O-glucoside, and pelargonidin-O-rutinoside (Chaves et al., 2017).

Main phenolics in red raspberries are anthocyanins such as cyanidin 3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside (Bobinaite et al., 2012; Chen et al., 2013a), flavonoids such as epicatechin (Dragišić Maksimovic et al., 2013), phenolic acids such as ellagic acid (Bobinaite et al., 2012) and tannins such as ellagitannins (Sanghiin H6 and Lambertianin C) (Mullen et al., 2002; Bobinaite et al., 2012). Raspberry also contains a wide variety of quercetin and kaempferol derivatives (Häkkinen et al., 1999; Mullen et al., 2002).

Sour cherry is rich in anthocyanins (cyanidin-3-glucosylrutinoside, cyanidin-3-sophoroside, cyanidin-3-rutinoside and cyanidin-3-glucoside) (Antolovich et al., 2000; Damar and Ekşi, 2012; Wojdyło et al., 2014; Homoki et al., 2016), beside hydroxycinnamates (neochlorogenic acid and p-coumaroylquinic acid), flavonols and flavan-3-ols (catechin, epicatechin, quercetin 3-glucoside, quercetin 3-rutinoside, and kaempferol 3-rutinoside) (Ferretti et al., 2010; Toydemir et al., 2013).

Cornelian cherry (*Cornus mas*) grows wild in Asia and Europe and is cultivated in Turkey being an important producer. Although fresh consumption is not preferred due to the acrid taste, it is consumed as marmalade and jam or in Turkish folk medicine against diabetes and diarrhea (Celep et al., 2012). Cornelian cherry had a high quantity of anthocyanins (cyanidin-3-O-galactoside, pelargonidin-3-O-glucoside, pelargonidin-3-O-rutinoside, pelargonidin-3-O-glucoside), phenolic acid (ellagic acid, (-) epicatechin) (Moldovan et al., 2016) and flavonoid (quercetin, kaempferol, and aromadendrin 3-O-glycosides) (Popović et al., 2012).

It is difficult to compare the phenolic content and antioxidant activities of extracts from different types of berries in the literature, due to the extracts obtained using different methods (Häkkinen et al., 1999). While many studies determined the phenolic profile of these fruits, there are limited studies that compare their phenolic content and antioxidative activity via different solvent extraction.

The aim of this study is to compare the phenolic content and antioxidant activities of different fruits or their extracts obtained with different solvents. Strawberry (*Fragaria recsa*), red raspberry (*Rubus idaeus*), sour cherry (*Prunus cerasus*), and cornelian cherry (*Cornus mas*) were used in this study and methanol, ethanol, 80% methanol, and 80% ethanol were the extraction solvents. Ferric reducing power, antioxidant activity in linoleic acid emulsion and DPPH radical scavenging activity were methods used to determine antioxidant activity.

## MATERIALS and METHODS

### Materials

Strawberry (*Fragaria recsa*), raspberry (*Rubus idaeus*), sour cherry (*Prunus cerasus*) and cornelian cherry (*Cornus mas*) were obtained from a local market in Bolu, Turkey. All extracts were stored at -18 °C until the analyses were done. DPPH reagent and linoleic acid (99%) were taken from Sigma-Aldrich (St Louis, USA). Iron (III) chloride hexahydrate was obtained from Acros Organics (New Jersey, USA). Other reagents were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

### Preparation of Extracts

Leaves, stems, and seeds of all fruits were removed after cleaning. All fruits were mashed by passing through a kitchen type blender. 40 g of mashed fruits were weighted in a 250 mL flask and 100 mL methanol, ethanol, 80% methanol: water or 80% ethanol: water (v/v) was added to separate flasks. Then, flasks were shaken at 150 rpm using a shaking water bath for 1 h. After waiting overnight at room temperature, all samples were filtered through a filter paper and a second extraction process was performed by adding 100 mL of solvent on the residue. Extracts obtained with the same solvent were combined and filtered through Whatman 1 paper. Alcohol in extracts was evaporated by using a rotary evaporator at 50°C under vacuum. Extracts were transferred into a colored bottle and nitrogen gas was given for 20 min in order to remove the remained alcohol. All extracts were dried using a freeze-dryer and were stored at -18°C. The extraction yield was calculated as g 100 g<sup>-1</sup> fresh weight (fw).

### Total Phenolic Content (TPC)

TPC of extracts was determined by the Folin-Ciocalteu method according to Iqbal et al. (2008). 0.01 g of extracts were weighted and were dissolved in 5 mL of deionized water. Analyzes were done by taking 0.20 mL of this solution and 0.20 mL deionized water was used for the control sample. A calibration graph was obtained with the absorbance values corresponding to gallic acid at different concentrations (0.01-0.10 mg mL<sup>-1</sup>). Using the calibration equation, TPC was determined as mg gallic acid equivalent (GAE) per gram of extracts. The analyses were done in triplicate and the results were given in the format of mean ± standard deviation.

### Antioxidant Activity of Extracts

Fruit extract solutions were prepared at 0.5, 1, 2 and 3 mg mL<sup>-1</sup> concentrations in 50% aqueous (v/v) alcohol from lyophilized extracts. Reducing power and DPPH radical scavenging activity were determined according to the method of Günal and Turan (2018). Conjugated diene method in the linoleic acid emulsion was done according to Günal-Köroğlu et al. (2019). The values of fruit extract solutions were compared to the values of antioxidants such as BHA, BHT, and α-tocopherol at 0.2 mg mL<sup>-1</sup>



concentration. The results were given as mean  $\pm$  standard deviation and analyzes were performed in triplicate.

### Statistical Analyses

The statistical analyses were performed with the SPSS package software, version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Results were expressed as means  $\pm$  standard deviation of the two or three replicates of each experiment. Analysis of variance was performed. The difference between the mean values was determined in the 95% confidence interval ( $P < 0.05$ ) using ANOVA and Duncan's multiple comparison test.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Extraction Yields

Extraction yields of the strawberry, sour cherry, red raspberry, and cornelian cherry were shown in Table 1. The extraction yields of their extracts were in the range of 5.01% - 12.72%.

Aqueous methanol or ethanol extracts of strawberry and sour cherry had higher extraction yield than their alcohol extracts. Otherwise, the extraction yield of raspberry and cornelian cherry methanol extracts were higher than that of their 80% methanol extracts. However, aqueous ethanol extracts of raspberry and cornelian cherry were higher than their ethanol extracts. Solvent polarity, degree of polymerization of phenols, the interaction between other components affect the solubility of phenolic compounds. Methanol, ethanol, acetone, water, ethyl acetate are generally used for the extraction of phenolic compounds (Naczka and Shahidi, 2004). Anthocyanins, flavonoids are soluble in water, methanol, ethanol, or their acidified solutions (Naczka and Shahidi, 2004; Khoo et al., 2017).

**Table 1.** Extraction yields and total phenolic contents of extracts

| Extract               | Solvent      | Yield<br>(g 100 g <sup>-1</sup> fresh weight) | Total phenolic content*<br>(mg GAE g <sup>-1</sup> extract) |
|-----------------------|--------------|---|---|
| Strawberry            | Methanol     | 11.76   | 33.32 $\pm$ 0.71abA   |
| <i>Fragaria vesca</i> | 80% Methanol | 12.72   | 33.94 $\pm$ 0.87aA  |
|                       | Ethanol      | 8.05  | 32.11 $\pm$ 0.83bcA   |
|                       | 80% Ethanol  | 9.35  | 31.73 $\pm$ 0.61cA  |
| Red Raspberry         | Methanol     | 10.51   | 17.31 $\pm$ 0.40cC  |
| <i>Rubus idaeus</i>   | 80% Methanol | 8.70  | 20.31 $\pm$ 0.27bC  |
|                       | Ethanol      | 8.31  | 13.25 $\pm$ 0.47dD  |
|                       | 80% Ethanol  | 9.35  | 21.45 $\pm$ 0.79aB  |
| Sour Cherry           | Methanol     | 9.31  | 18.63 $\pm$ 0.17cB  |
| <i>Prunus cerasus</i> | 80% Methanol | 12.26   | 21.56 $\pm$ 0.12cB  |
|                       | Ethanol      | 8.71  | 18.90 $\pm$ 0.57bB  |
|                       | 80% Ethanol  | 9.35  | 20.96 $\pm$ 0.12aB  |
| Cornelian cherry      | Methanol     | 8.41  | 18.02 $\pm$ 0.38aB  |
| <i>Cornus mas</i>     | 80% Methanol | 6.21  | 16.18 $\pm$ 0.25bD  |
|                       | Ethanol      | 5.01  | 17.69 $\pm$ 0.18aC  |
|                       | 80% Ethanol  | 7.54  | 15.37 $\pm$ 0.16cC  |

\*Analyses were done in triplicate and results were given as mean  $\pm$  standard deviation. <sup>a-d</sup> Small letters show the variation between the extraction solvent of the same fruit ( $P < 0.05$ ). <sup>A-D</sup> Capital letters show the variation between fruit extracts of the same solvent ( $P < 0.05$ ).

In this study, each fruit has a different solubility in different solvent systems depending on their phenolic compounds belong to the different groups. It is known that flavonoids, especially anthocyanins, phenolic acids, and tannins are the main phenolic compounds in these fruits (Cerezo et al., 2010;

Bobinaite et al., 2012). Strawberry, raspberry, sour cherry, and cornelian cherry are red colored fruits and anthocyanins are the main phenolic compounds that responsible for their red color (Khoo et al., 2017).

Celep et al. (2012) obtained higher extraction yields (19.69%) for 80% methanolic extract of cornelian cherry than our findings.

### Total Phenolic Content

Folin-Ciocalteu assay was used to determine the total phenolic content (TPC) of extracts. It is a colorimetric and indirect method based on oxidation/reduction reactions of molibdotunstate in reagent as a result of the formation of blue color at 760 nm (Singleton et al., 1999). Since the oxygen radical is not used in the method and reduction power of sample is assumed to be equal to the antioxidant capacity. As a result, a fairly good linear correlation is expected between total phenol content and antioxidant activity (Dragišić Maksimovic et al., 2013).

TPC of the strawberry, sour cherry, red raspberry, and cornelian cherry extracts were shown in Table 1. TPC of extracts were in the range of 13.25-33.94 mg GAE g<sup>-1</sup> extract. The variation of total phenolic contents of different fruit extracts prepared by the same solvent was found significant (P<0.05). Similarly, the effects of extraction solvent on the total phenolic content of the extracts was significant (P<0.05).

TPC of strawberry extracts among examined fruits was the highest and TPC in all strawberry extracts was close to each other. In addition to this, TPC of 80% methanol extracts was the highest (33.94 mg GAE g<sup>-1</sup> extract) among other solvent extracts of strawberry. Márquez-López et al. (2020) reported that methanol extracts of strawberries contained higher total phenolic compounds than ethanol extracts. It is explained by the higher polarity of methanol and the higher solubility of phenolic compounds as the polarity increases, because phenols in extracts are largely related to the polarity of the solvents used (Márquez-López et al., 2020).

TPC of strawberry extracts obtained in this study was found higher than some studies in the literature. When the total amount of phenolic compounds was calculated as mg GAE 100 g<sup>-1</sup> fresh weight (fw), mean TPC of strawberry was found as 361.00 mg 100 g<sup>-1</sup> fw in this study. Marquez-Lopez et al. (2020) were stated that ethanol and methanol extracts of strawberries were 226.89 and 361.03 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> fw, respectively. Another study by Mandave et al. (2014) was shown that 0.2% acetic acid and ethanol extracts from two different strawberry types (Camorasa and Sweet Charlie) had 224 and 207.4 mg GAE g<sup>-1</sup> fw, respectively. Chaves et al. (2017) emphasized that the highest amount of total phenolic compounds in seven different strawberry samples was 2.48 mg GAE g<sup>-1</sup> fw. Mendes et al. (2011) determined the TPC of the strawberry extract was 16.7 mg GAE g<sup>-1</sup> extract and was lower than strawberry extracts in this study. De Souza et al. (2014) found that TPC of strawberry extract was 621.92 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> fw and it was higher than all strawberry extracts in this study.

TPC of raspberry and sour cherry extracts were higher than the cornelian cherry extracts. TPC of aqueous methanol and ethanol extracts of raspberry (20.31 and 21.45 mg GAE g<sup>-1</sup> extract) and sour cherry (21.56 and 20.96 mg GAE g<sup>-1</sup> extract) were close to each other. TPC in sour cherry or raspberry methanol and ethanol extracts were lower than 80% methanol or 80% ethanol extracts.

It was stated that the TPC was between 214.71 and 619 mg 100 g<sup>-1</sup> fw in 15 different raspberry varieties (Chen et al., 2013a); were between 3.72 and 3.24 mg GAE g<sup>-1</sup> fw in two different varieties (Dragišić Maksimovic et al., 2013); were ranged from 1486 to 3479 µg g<sup>-1</sup> fw in wild and cultivated raspberries (Çekiç and Özgen, 2010) and were between 1052 and 2494 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> dw in 50% methanol extracts (Pantelidis et al., 2007) in literature. Average TPC of raspberry extracts in this study

was calculated as 167.33 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> fw and was like those data in the literature. De Souza et al. (2014) identified TPC as 357.83 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> fw in raspberry. This value was higher than all raspberry extracts in this study.

Low molecular weight phenolic compounds in sour cherry were responsible for highly water-soluble antioxidant activity (Homoki et al., 2016). Kopjar et al. (2014) examined the anthocyanin, flavonoid, and phenolic contents in sour cherry extracts obtained with water, methanol, ethanol, and their acidified solutions. Anthocyanin and phenolic contents were observed high to low in methanol > ethanol > water extracts. Ethanol extract had the highest flavonoid content followed by methanol and water extracts. In other words, methanol was more effective in extracting phenolic substances and anthocyanins, and ethanol was more effective in extracting flavonoids. Methanol acidified with hydrochloric acid was the most efficient extraction solvent for anthocyanin, phenol, and flavonoid. Besides, TPC of methanol, ethanol, and water extracts with 24 hours extraction was 295.75, 285.68, and 186.96 mg GAE kg<sup>-1</sup> fw, respectively (Kopjar et al., 2014).

Khoo et al. (2011) prepared samples with water extracts from 34 different sour cherries and determined TPC between 74 and 754 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> fw. They also emphasized that the total anthocyanin content of sour cherry extracts was quite low, while sour cherry samples had high content of total phenolics. Kim et al. (2005) determined TPC in methanol extracts of four different sour cherries between 146.1 to 312.4 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> fw. To compare with the data in the literature, the results were also calculated as mg 100 g<sup>-1</sup> fw in this study, and average TPC of sour cherry extracts was 199.54. These data showed compatibility with the literature.

Solutions containing aqueous alcohol were more effective in extracting phenolic compounds from sour cherry and raspberry, while the situation was just the opposite for cornelian cherry extracts. Also, ethanol and 80% ethanol extracts of cornelian cherry had lower TPC than methanol and 80% methanol. It was found that TPC of 80% methanol extract of cornelian cherry was 31.25 mg GAE g<sup>-1</sup> extract (Celep et al., 2012) and that of 50% methanol extracts were 1592 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> dw (Pantelidis et al., 2007). It was determined that TPC of cornelian cherries were between 26.59 and 74.83 mg GAE g<sup>-1</sup> dw in 12 different species (Yilmaz et al., 2009) and were between 1097.19 and 2695.75 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> fw in 6 different species (Hassanpour et al., 2011). Also, TPC in acetone extract of cornelian cherry was 489.94 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> fw in another study by Moldovan et al. (2016). Average TPC of cornelian cherry were 114.14 mg 100 g<sup>-1</sup> fw in this study and the lowest average TPC were belong to cornelian cherry among other fruits.

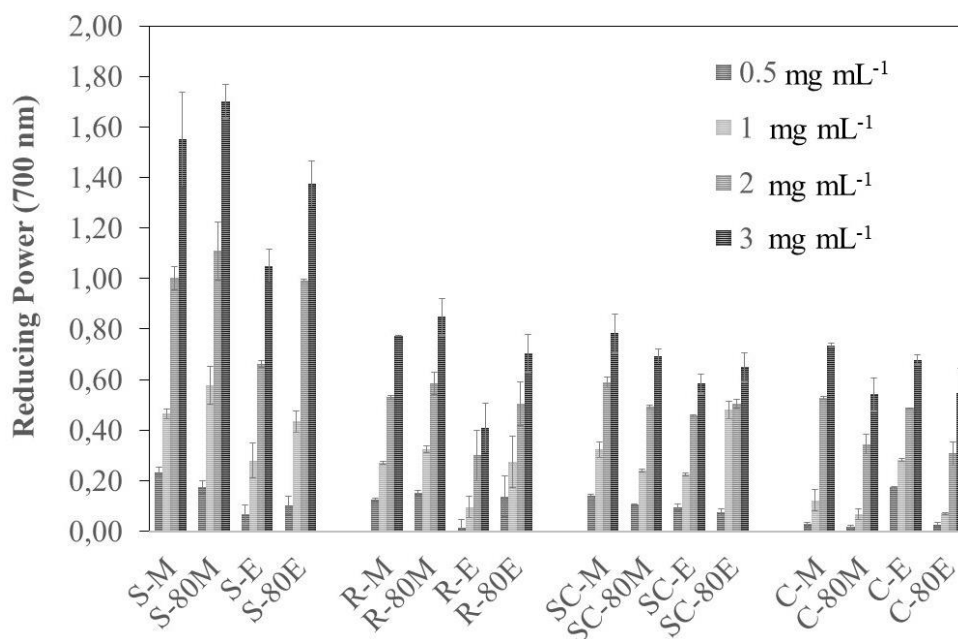
De Souza et al. (2014) divided the phenolic content into three separate groups: low content (<100 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> fw), medium (100-500 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> fw) and high (> 500 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> fw). According to this statement, cornelian cherry had lowest phenolic content among all studied fruits. Otherwise, all extracts in this study had generally medium phenolic content. Besides, strawberry had closer values to the upper limit of medium phenolic content. Sorting to higher to lower were as follows: strawberry (361.00 mg 100 g<sup>-1</sup> fw) > sour cherry (199.54 mg 100 g<sup>-1</sup> fw) > raspberry (167.33 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> fw) > cornelian cherry (114.14 mg 100 g<sup>-1</sup> fw).

### Ferric Reducing Antioxidant Power

The method based on the electron transfer reaction between Fe<sup>3+</sup> and Fe<sup>2+</sup> in a ferric salt, which is an oxidant agent by the antioxidant compound. A higher absorbance shows a higher reducing power (Piccolella et al., 2008).

Reducing power of all extracts were shown in Figure 1. In all samples, reducing power increased with concentration (P<0.05), and this increase was almost doubled between 1 and 2 mg mL<sup>-1</sup>

concentration. The effects of extraction solvent on the reducing power of the extracts was found significant ( $P < 0.05$ ) at the studied concentrations. Overall, among all extracts, strawberries had the highest reducing power and have almost more than twice the others. Also, the reducing power of strawberry ethanol extracts (S-E and S-80E) was lower than that of methanol (S-M and S-80M) and the strawberry extract prepared with absolute ethanol (S-E) had the lowest reducing power among strawberry extracts. Reducing powers of strawberry extracts were higher than 1.00 absorbance at 3 mg mL<sup>-1</sup> concentration and ranged from 1.050 to 1.701 absorbance.



Analyses were done in triplicate. S-M, strawberry methanol; S-80M, strawberry 80% methanol; S-E, strawberry ethanol; S-80E, strawberry 80% ethanol; R-M, raspberry methanol; R-80M, raspberry 80% methanol; R-E, raspberry ethanol; R-80E, raspberry 80% ethanol; SC-M, sour cherry methanol; SC-80M, sour cherry 80% methanol; SC-E, sour cherry ethanol; SC-80E, sour cherry 80% ethanol; C-M, cranberry methanol; C-80M, cranberry 80% methanol; C-E, cranberry ethanol; C-80E, cranberry 80% ethanol.

**Figure 1.** Reducing power of extracts.

R-E had the lowest reducing power compared to all fruit extracts at all analyzed concentrations. The highest reducing power values among raspberry extracts were belonged to R-80M and the values were between 0.151 and 0.848.

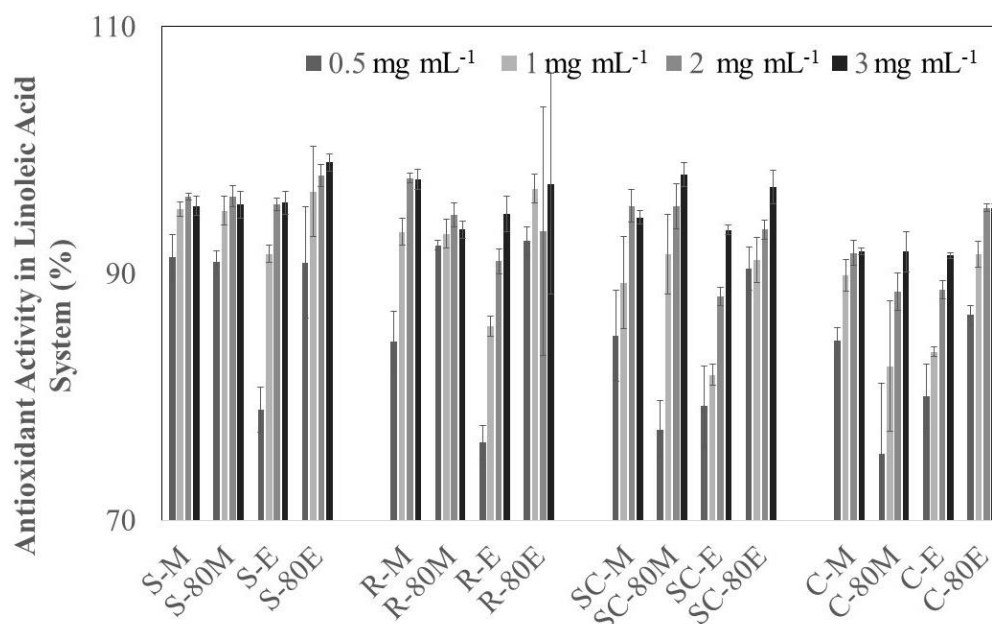
Reducing power of sour cherry extracts was the highest in SC-M (between 0.139 and 0.783) and the lowest in SC-E (between 0.095 and 0.584). Sour cherry had higher reducing power than cornelian cherry for the same solvent. Reducing power of C-80M and C-80E were quite low at 0.5 and 1 mg mL<sup>-1</sup> compared to all fruit extracts at that concentration. Piccolella et al. (2008) determined reducing power of sour cherry methanol, ethyl acetate, and hexane extracts at different concentrations (12.5-500 µg mL<sup>-1</sup>) and it was calculated as % of the control sample. Methanol, ethyl acetate, and hexane extracts had reducing power between 6.8 and 79.8, 20.3 and 80.7, 4.9 and 39.9, respectively. Reducing power of methanol extract was lower than ethyl acetate extracts at 12.5 and 25 µg mL<sup>-1</sup> and the values got closer to each other as the concentration increased. While an increase in concentration caused slightly higher antioxidant activity in the more polar solvents (methanol and ethyl acetate extracts), it was not the same for hexane extract.

However, at 0.2 mg mL<sup>-1</sup> concentration, reducing power of BHA, BHT, and  $\alpha$ -tocopherol were 2.095±0.015, 1.288±0.171, and 0.819±0.034, respectively. However, reducing power of extracts was lower than that of the BHA and BHT in the concentration range tested except strawberry extracts.

Strawberry extracts over  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  concentration had higher reducing power values than  $\alpha$ -tocopherol and at  $3 \text{ mg mL}^{-1}$  concentration they had close reducing power to that of BHT in this study. Also, R-80M had slightly higher reducing power than  $\alpha$ -tocopherol.

### Antioxidant activity in the linoleic acid system

An overall increase in antioxidant activity was observed with increased concentration ( $P < 0.05$ , Figure 2) except R-80E extract. The effects of solvent type on the antioxidant activities of the extracts were found significant ( $P < 0.05$ ) for all concentrations except red raspberry extracts at  $3 \text{ mg g}^{-1}$  concentration. At the highest concentration, the values of all fruit extracts were similar except cornelian cherry extracts. Antioxidant activity of aqueous ethanol extracts was generally higher than those of the methanol extracts. Among all fruit extracts, S-80M had the highest antioxidant activity at  $3 \text{ mg mL}^{-1}$ . Other extracts with the highest antioxidant activity were R-M at 2 and  $3 \text{ mg mL}^{-1}$ , R-80E at  $3 \text{ mg mL}^{-1}$ , SC-80M and SC-80E at  $3 \text{ mg mL}^{-1}$  and the values were close to that of BHT ( $98.65 \pm 1.12\%$ ). Additionally, aqueous ethanol extracts had higher antioxidant activity in linoleic acid emulsion among fruit extracts at all concentrations.



Analyses were done in triplicate. S-M, strawberry methanol; S-80M, strawberry 80% methanol; S-E, strawberry ethanol; S-80E, strawberry 80% ethanol; R-M, raspberry methanol; R-80M, raspberry 80% methanol; R-E, raspberry ethanol; R-80E, raspberry 80% ethanol; SC-M, sour cherry methanol; SC-80M, sour cherry 80% methanol; SC-E, sour cherry ethanol; SC-80E, sour cherry 80% ethanol; C-M, cranberry methanol; C-80M, cranberry 80% methanol; C-E, cranberry ethanol; C-80E, cranberry 80% ethanol.

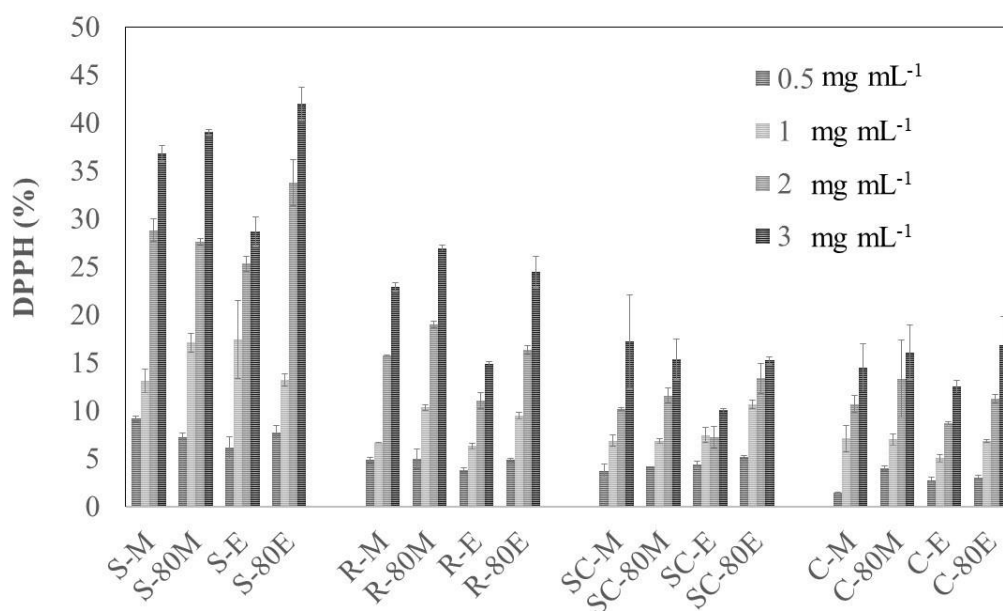
**Figure 2.** Antioxidant activity of extracts in linoleic acid system (%)

All strawberry extracts showed high antioxidant activities in the linoleic acid model system (78.9-99.0%). The antioxidant activity of all strawberry extracts above  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  concentrations was very close to each other and above that of BHA and BHT ( $95.70 \pm 1.72$  and  $98.65 \pm 1.12$ , respectively). While the antioxidant activity of R-M and R-E extracts were lower at lower concentrations ( $0.5$  and  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) compared to R-80M and R-80E, the values were close to each other as the concentration increased. Antioxidant activity of aqueous ethanol extracts was 97.3, 97.0, and 95.3% for raspberry, sour cherry, and cornelian cherry extracts at  $3 \text{ mg mL}^{-1}$ , respectively. At the same concentration, C-80E had the highest value among cornelian cherry extracts. In addition, C-80M has the lowest values among all fruit extracts at  $0.5$  and  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ .

### DPPH Radical Scavenging Activity

The method is based on measuring the ability to reduce the DPPH radical, a stable compound in purple. When the purple-colored DPPH<sup>•</sup> radical solution is mixed with the extract with antioxidant activity, the antioxidant compound gives a hydrogen atom to the environment, forming a stable form of DPPH. So, intense purple color (DPPH<sup>•</sup>) disappears simultaneously and yellow color (DPPH) occurs as a result of reduction (Celep et al., 2012; Chaves et al., 2017).

As with other tests, concentration-dependent change was observed ( $P < 0.05$ , Figure 3). Scavenging effects of strawberry extracts on DPPH radicals were ranged from 6.11% to 41.97% in the concentration range tested. Strawberry extracts have the highest values for the same concentration among all extracts followed by raspberry extracts. R-80M and R-80E had higher values than R-M and R-E, although they have similar values in the beginning. Except for strawberry extracts, raspberry aqueous methanol extract (5-29%) had the highest DPPH radical scavenging activity at all the concentration tested, followed by C-80M (4.2-15.4%) and SC-80M extracts (4-16%).



Analyses were done in triplicate. S-M, strawberry methanol; S-80M, strawberry 80% methanol; S-E, strawberry ethanol; S-80E, strawberry 80% ethanol; R-M, raspberry methanol; R-80M, raspberry 80% methanol; R-E, raspberry ethanol; R-80E, raspberry 80% ethanol; SC-M, sour cherry methanol; SC-80M, sour cherry 80% methanol; SC-E, sour cherry ethanol; SC-80E, sour cherry 80% ethanol; C-M, cranberry methanol; C-80M, cranberry 80% methanol; C-E, cranberry ethanol; C-80E, cranberry 80% ethanol.

**Figure 3.** DPPH radical scavenging activity (%) of extracts

DPPH radical scavenging activity of SC-80E was higher than other extracts of sour cherry except at 3 mg mL<sup>-1</sup> concentration and the highest value at 3 mg mL<sup>-1</sup> concentration were belong to SC-M in this study. Piccolella et al. (2008) determined that DPPH scavenging activity of sour cherry methanol and ethyl acetate extracts at the lowest concentration were 32.6 and 38.4%, respectively. While the concentration of the ethyl acetate extracts increased, DPPH scavenging activity was increased rapidly, but there was a softer increase in the methanol extract. They stated that saccharidic components in methanol extracts may have an inhibitory effect on antioxidant activity.

In addition, while sour cherry extracts at 0.5 mg mL<sup>-1</sup> (between 3.69 and 5.19) had higher values than cornelian cherry extracts (between 1.39 and 3.98), the values were closer to cornelian cherry extracts as the concentration increased. Hassanpour et al. (2011) stated that methanol extracts of six different cornelian cherry had DPPH scavenging activity between 38.98 and 82.37%.

DPPH radical scavenging activity of BHA, BHT and  $\alpha$ -tocopherol were  $49.96 \pm 1.75\%$ ,  $12.81 \pm 2.52\%$  and  $33.20 \pm 0.00\%$  at  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$ . In comparison to synthetic antioxidants, the values of the extracts at  $3 \text{ mg mL}^{-1}$  concentration were higher than that of the BHT but lower than that of the BHA.

Also,  $EC_{50}$  values were calculated as the concentration of extract that cause 50% decrease in DPPH radical concentration via Microsoft Excel Software from the curve of concentration-inhibition graph (Table.2).

In this study,  $EC_{50}$  values for strawberries were lower than other extracts. In other words, the concentration required for 50% inhibition was less in strawberry extracts than in other extracts. This suggested that strawberry extracts had better radical scavenging activity. It was reported that  $EC_{50}$  values of strawberry were  $0.79 \text{ mg mL}^{-1}$  for water extract (Mendes et al., 2011) and  $0.81 \text{ mg mL}^{-1}$  for 80% methanol extract (Huang et al., 2012). R-E ( $13.31 \text{ mg mL}^{-1}$ ) has the highest value among raspberry extracts. It was found that  $EC_{50}$  values of 15 different raspberry extracts ranged from 7.16 to  $13.31 \text{ mg mL}^{-1}$  (Chen et al., 2013a) and the values overlap with the data in this study.  $EC_{50}$  value of SC-E extract ( $28.11 \text{ mg mL}^{-1}$ ) has the highest value among all extracts.  $EC_{50}$  values of cornelian cherry were  $725 \mu\text{g mL}^{-1}$  for 80% methanol extract (Celep et al., 2012) and were between 0.29 and  $0.69 \text{ mg mL}^{-1}$  for acetone/methanol/water/formic acid (40:40:20:0.1) extracts of 24 species (Tural and Koca, 2008).

**Table 2.**  $EC_{50}$  values ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) of extracts by DPPH radical scavenging activity

| Solvent      | Strawberry | Red Raspberry | Sour Cherry | Cornelian cherry |
|--------------|------------|---------------|-------------|------------------|
| Methanol     | 5.35       | 8.43          | 11.78       | 12.21            |
| 80% Methanol | 5.08       | 7.16          | 13.07       | 11.90            |
| Ethanol      | 6.55       | 13.31         | 28.11       | 15.51            |
| 80% Ethanol  | 4.59       | 8.43          | 14.41       | 11.30            |

## CONCLUSION

In this study, a positive correlation was obtained between the total phenolic content and antioxidant activities of the extracts. In addition, antioxidant activities increased due to the increase in concentration of extracts. According to antioxidant activity and total phenolic content analysis, strawberry extracts showed higher antioxidant properties compared to other fruits investigated.

All fruits examined in this study had a different profiles and unique antioxidant capacity depending on these phenolic compounds. Other solvent systems may be examined to obtain phenolic extracts and phenolic profile or antioxidant activities may be compared in subsequent studies. Antioxidant effects can be examined individually by purifying phenolic compounds with different methods. Because the non-phenolic compounds (such as ascorbic acid, glucose, fructose) in the composition of the fruits may affect the determination of the phenolic content and antioxidant activity ( Piccolella et al., 2008; Chaves et al., 2017).

Although there are many studies on the phenolic profile and antioxidant properties of these fruits used in this study, limited researches were in the literature about using these fruits in different food systems as an alternative for synthetic antioxidants. Because the use of synthetic antioxidants is not particularly preferred by consumers, recently. Additionally, antioxidant activities and their bioavailability of phenolic compounds in these fruits can be investigated in different model systems such as bulk oils or emulsions or their antioxidative effects in high-temperature applications against oxidation reactions such as rancimat analysis, frying, thermal storage analysis.

## Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

## Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

## REFERENCES

- Antolovich M, Prenzler P, Robards K, Ryan D, 2000. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125: 989–1009.
- Bobinaite R, Viškėlis P, Venskutonis PR, 2012. Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars. *Food Chemistry*, 132: 1495–1501.
- Çekiç Ç, Özgen M, 2010. Comparison of antioxidant capacity and phytochemical properties of wild and cultivated red raspberries (*Rubus idaeus* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23: 540–544.
- Celep E, Aydın A, Yesilada E, 2012. A comparative study on the in vitro antioxidant potentials of three edible fruits: Cornelian cherry, Japanese persimmon and cherry laurel. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 3329–3335.
- Cerezo AB, Cuevas E, Winterhalter P, Garcia-Parrilla MC, Troncoso AM, 2010. Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in Camarosa strawberry. *Food Chemistry*, 123: 574–582.
- Chaves VC, Calvete E, Reginato FH, 2017. Quality properties and antioxidant activity of seven strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 225: 293–298.
- Chen L, Xin X, Zhang H, Yuan Q, 2013a. Phytochemical properties and antioxidant capacities of commercial raspberry varieties. *Journal of Functional Foods*, 5: 508–515.
- Chen N, Zhao M, Sun W, 2013b. Effect of protein oxidation on the in vitro digestibility of soy protein isolate. *Food Chemistry*, 5: 508–515.
- Damar I, Ekşi A, 2012. Antioxidant capacity and anthocyanin profile of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) juice. *Food Chemistry*, 135: 2910–2914.
- De Souza VR, Pereira PAP, Da Silva TLT, De Oliveira Lima LC, Pio R, Queiroz F, 2014. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, 156: 362–368.
- Dragišić Maksimović JJ, Milivojević JM, Poledica MM, Nikolić MD, Maksimović VM, 2013. Profiling antioxidant activity of two primocane fruiting red raspberry cultivars (Autumn bliss and Polka). *Journal of Food Composition and Analysis*, 31: 173–179.
- Ferretti G, Bacchetti T, Belleggia A, Neri D, 2010. Cherry antioxidants: From farm to table. *Molecules*, 15: 6993–7005.
- Günel-Köroğlu D, Turan S, Kiralan M, Ramadan MF, 2019. Oxidative stabilisation of sunflower oil enriched with olive mill wastewater and olive pomace phenolics-rich extracts with soy lecithin. *Rivista Italiana Sostanze Grasse*, 96 (4): 241–250.
- Günel D, Turan S, 2018. Effects of olive wastewater and pomace extracts, lecithin, and ascorbyl palmitate on the oxidative stability of refined sunflower oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42 (9): e13705.
- Häkkinen S, Heinonen M, Kärenlampi S, Mykkänen H, Ruuskanen J, Törrönen R, 1999. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International*, 32 (5): 345–353.



- Hassanpour H, Yousef H, Jafar H, Mohammad A, 2011. Antioxidant capacity and phytochemical properties of cornelian cherry (*Cornus mas L.*) genotypes in Iran. *Scientia Horticulturae*, 129: 459–463.
- Homoki JR, Nemes A, Fazekas E, Gyémánt G, Balogh P, Gál F, Al-Asri J, Mortier J, Wolber G, Babinszky L, Remenyik J, 2016. Anthocyanin composition, antioxidant efficiency, and  $\alpha$ -amylase inhibitor activity of different Hungarian sour cherry varieties (*Prunus cerasus L.*). *Food Chemistry*, 194: 222–229.
- Huang WY, Zhang HC, Liu WX, Li CY, 2012. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 13 (2): 94–102.
- Iqbal S, Haleem S, Akhtar M, Zia-ul-Haq M, Akbar J, 2008. Efficiency of pomegranate peel extracts in stabilization of sunflower oil under accelerated conditions. *Food Research International*, 41 (2): 194–200.
- Khoo GM, Clausen MR, Pedersen BH, Larsen E, 2011. Bioactivity and total phenolic content of 34 sour cherry cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24: 772–776.
- Khoo HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM, 2017. Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food and Nutrition Research*, 61 (1): 1361779.
- Kim DO, Ho JH, Young JK, Hyun SY, Lee CY, 2005. Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 9921–9927.
- Kopjar M, Orsolich M, Pilizota V, 2014. Anthocyanins, phenols, and antioxidant activity of sour cherry puree extracts and their stability during storage. *International Journal of Food Properties*, 17: 1393–1405.
- Mandave PC, Pawar PK, Ranjekar PK, Mantri N, Kuvalekar AA, 2014. Comprehensive evaluation of in vitro antioxidant activity, total phenols and chemical profiles of two commercially important strawberry varieties. *Scientia Horticulturae*, 172: 124–134.
- Márquez-López A, Ayala-Flores F, Macías-Pureco S, Chávez-Parga MDC, Valencia Flores DC, Maya-Yescas R, González-Hernández JC, 2020. Extract of ellagitannins starting with Strawberries (*Fragaria sp.*) and Blackberries (*Rubus sp.*). *Food Science and Technology*, 40 (2): 430–439.
- Mendes L, De Freitas V, Baptista P, Carvalho M, 2011. Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo L.*) leaf and fruit. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 2285–2291.
- Moldovan B, Filip A, Clichici S, Suharoschi R, Bolfa P, David L, 2016. Antioxidant activity of Cornelian cherry (*Cornus mas L.*) fruits extract and the in vivo evaluation of its anti-inflammatory effects. *Journal of Functional Foods*, 26: 77–87.
- Mullen W, McGinn J, Lean MEJ, MacLean MR, Gardner P, Duthie GG, Yokota T, Crozier A, 2002. Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5191–5196.
- Nacz M, Shahidi F, 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054: 95–111.
- Pantelidis GE, Vasilakakis M, Manganaris GA, Diamantidis G, 2007. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*, 102: 777–783.

- Piccolella S, Fiorentino A, Pacifico S, D'Abrosca B, Uzzo P, Monaco P, 2008. Antioxidant properties of sour cherries (*Prunus cerasus* L): Role of colorless phytochemicals from the methanolic extract of ripe fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 1928–1935.
- Popović BM, Štajner D, Slavko K, Sandra B, 2012. Antioxidant capacity of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) - Comparison between permanganate reducing antioxidant capacity and other antioxidant methods. *Food Chemistry*, 134: 734–741.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM, 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152–178.
- Toydemir G, Capanoglu E, Gomez Roldan MV, De Vos RCH, Boyacioglu D, Hall RD, Beekwilder J, 2013. Industrial processing effects on phenolic compounds in sour cherry (*Prunus cerasus* L.) fruit. *Food Research International*, 53: 218–225.
- Tural S, Koca I, 2008. Physico-chemical and antioxidant properties of cornelian cherry fruits (*Cornus mas* L.) grown in Turkey. *Scientia Horticulturae*, 116: 362–366.
- Wojdyło A, Nowicka P, Laskowski P, Oszmiański J, 2014. Evaluation of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) fruits for their polyphenol content, antioxidant properties, and nutritional components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 12332–12345.
- Yilmaz KU, Ercisli S, Zengin Y, Sengul M, Kafkas EY, 2009. Preliminary characterisation of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) genotypes for their physico-chemical properties. *Food Chemistry*, 114: 408–412.

**Atf İçin:** Alıç B, Olcay N, Demir MK, 2021. Kara Mürverin (*Sambucus nigra* L.) Besinsel İçeriği ve Fonksiyonel Özellikleri. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1140-1153.

**To Cite:** Alıç B, Olcay N, Demir MK, 2021. Nutrient Composition and Functional Properties of Black Elderberry (*Sambucus nigra* L.). Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1140-1153.

## Kara Mürverin (*Sambucus nigra* L.) Besinsel İçeriği ve Fonksiyonel Özellikleri

Betül ALIÇ<sup>1</sup>, Nezahat OLCAY<sup>1\*</sup>, Mustafa Kürşat DEMİR<sup>1</sup>

**ÖZET:** Kara mürver (*Sambucus nigra*) Adoxaceae familyasında, Avrupa, Asya, Kuzey Afrika ve ABD'ye özgü bir bitki türüdür. Kara mürver bitkisi; yuvarlak şekilli, mor-siyah renkli, 3-5 çekirdekli, küçük meyvelere sahiptir. *Sambucus* türlerinin kimyasal yapısını; majör bileşikler, flavonoidler, fenolik asitler, antosiyanidoller, triterpenler, lektinler, siyanojenik heterozitler ve uçucu yağlar oluşturmaktadır. Mürver türleri önemli miktarda lektin içermektedirler. Mürver meyveleri zengin antosiyanin içerikleri ile yüksek antioksidan aktivite göstermektedir. Antioksidan aktivitesi sayesinde insan sağlığında soğuk algınlığı, grip, kanser, diyabet gibi birçok hastalığa karşı terapötik etkiye sahiptir. Antioksidan özelliğinin yanı sıra; antiviral, antidepresan, antiinflamatuvar ve antikarsinojenik gibi çeşitli aktiviteler de göstermektedir. Kara mürver, tüm bu özellikleri ile modern gıda ve tıbbi ürünlerin zenginleştirilmesi ve/veya geliştirilmesinde önemli katkı sağlayabilme potansiyeline sahip bir bitkidir. Bu makale kara mürver meyvesinin besinsel içeriği ve fonksiyonel özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalarını derlemektedir ve gelecekte yapılabilecek çalışmalara ışık tutmayı amaçlamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Kara mürver, *Sambucus nigra*, lektin, antosiyanin, antioksidan

### Nutrient Composition and Functional Properties of Black Elderberry (*Sambucus nigra* L.)

**ABSTRACT:** Black elderberry (*Sambucus nigra*) is a plant species in the Adoxaceae family and native to Europe, Asia, North Africa and the USA. Black elderberry plant has the round-shaped, purple-black colored, 3-5 seeded, small fruits. The chemical structure of *Sambucus* species consists of major compounds, flavonoids, phenolic acids, anthocyanidols, triterpenes, lectins, cyanogenic heterosides and essential oils. Elderberry species contain significant amounts of lectins. Elderberry fruits show high antioxidant activity with rich anthocyanin content. It has therapeutic effects against many diseases like cold, flu, cancer, diabetes in human health, thanks to its antioxidant activity. In addition to its antioxidant properties; It also shows various activities such as antiviral, antidepressant, anti-inflammatory, and anticarcinogenic. Black elderberry, with all those properties, is a plant that has the potential to make an important contribution to the enrichment and/or development of modern food and medicinal products. This article reviews the studies on the nutritional content and functional properties of black elderberry fruit and aims to shed light on future studies.

**Keywords:** Black elderberry, *Sambucus nigra*, lectin, anthocyanin, antioxidant

<sup>1</sup>Betül ALIÇ (Orcid ID: 0000-0003-3085-9986), Nezahat OLCAY (Orcid ID: 0000-0003-3302-8969), Mustafa Kürşat DEMİR (Orcid ID: 0000-0002-4706-4170), Necmettin Erbakan Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Konya, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Nezahat OLCAY, e-mail: olcaynezahat@gmail.com

## GİRİŞ

Kara mürver (*Sambucus nigra* L.), Adoxaceae familyasındaki çalı ve ağaççık formundaki bir bitki türüdür. Önceden Caprifoliaceae familyasında değerlendirilen kara mürver bitkisi, genetik ve morfolojik karşılaştırmalar ile ortaya çıkan genetik akrabalık sonucu Adoxaceae familyasına dahil edilmiştir (Donoghue ve ark., 2003; Dündar, 2009).

Kara mürver; Avrupa, Asya, Kuzey Afrika ve Amerika'nın çoğu bölgesine özgü bir tür olup, Danimarka, Çek Cumhuriyeti, Almanya ve Romanya gibi bazı ülkelerde ticari olarak tarlalarda yetiştirilmektedir (Christensen ve ark., 2008; Charlebois ve ark., 2010). Türkiye'de ise Bolu, Trabzon, Erzincan, Düzce ve İzmit illeri ile Orta Anadolu bölgesinde yetiştiği bilinmektedir (Kayabaşı ve Etikan, 1998).

Kara mürver bitkisinin 9 cinsi tanımlanmıştır: *S. ebulus*, *S. wightiana*, *S. adnata*, *S. gaudichaudiana*, *S. australasica*, *S. javanica*, *S. nigra*, *S. australis* ve *S. racemosa* (Bolli, 1994; Mikulic-Petkovsek ve ark., 2015). Ayrıca kara mürver bitkisi, yeryüzünde dağılım gösteren 40 türe sahiptir (Dündar, 2009). Kara mürverin; vahşi, yarı vahşi veya kültüre alınmış türleri bulunmaktadır (Bolli, 1994; Mikulic-Petkovsek ve ark., 2015).

*Sambucus* türleri, en fazla 10 metreye kadar uzayabilen, yaprak döken, küçük ağaç veya çalı formunda, odunsu bitkilerdir (Ulbricht ve ark., 2014; Gilman ve ark., 2018). Mürver ağaççıkları genellikle silindirik bir gövde ve kahverengi-boz renkte bir kabuk yapısına sahiptirler (Gilman ve ark., 2018). Yaprakları ise; 10-15 cm boyunda, parlak yeşil renkte, tüsü yaprak formunda ve yaprak kenarları düzensiz testere dişli (3 ila 15 serrat) yapıdadır (Bolli, 1994; Ulbricht ve ark., 2014; Mikulic-Petkovsek ve ark., 2015; Gilman ve ark., 2018). Kısa saplı, küçük (1.8-2.5 mm çapında), oval ve krem-beyaz renkteki çiçekleri, hoş bir kokuya sahip olup, salkımlar şeklinde bulunmaktadır (Bolli, 1994; Mikulic-Petkovsek ve ark., 2015; Gilman ve ark., 2018). Kara mürver meyveleri de çiçeklerine benzer şekilde salkımlar şeklinde bulunmakta ve her bir salkım 1.5-2 mm çapında, yuvarlak, 3-5 çekirdekli, mor-siyah renkli, yaklaşık 150-200 adet meyve vermektedir (Vurdu ve ark., 2012; Gilman ve ark., 2018).

Kara mürverin iklim ve toprak isteği; güneşli ve nemli bölgeler ile zengin topraklardır. Genellikle ormanlık alanların kenarlarında ve açık alanlarda yetişen bir bitki türüdür (Kayabaşı ve Etikan, 1998; Dündar, 2009). Suptropik ve ılıman bölgelerde yaygın bir şekilde dağılım gösterirken, bazı türleri tropikal bölgelerde de yetişmektedir (Bolli, 1994; Mikulic-Petkovsek ve ark., 2015).

Kara mürver meyveleri taze olarak nadiren tüketilmekte, genel olarak ise reçel, marmelat, meyve suyu, sirke, şarap ve likör gibi ürünlere işlenmektedir (Netzel ve ark., 2005; Veberic ve ark., 2009; Duymuş, 2010; Arslanoğlu ve ark., 2019). Kara mürver meyve özlerinin; su, glikoz şurubu, sitrik asit ve potasyum sorbat ile hazırlanan ekstraktlar şeklinde de tüketimi mevcuttur (Porter ve Bode, 2017). Ayrıca sirke, çay ve kızarmış elder flower (Hollerküchln) olarak bilinen bir tür atıştırılabilirlik şeklinde de tüketimine rastlanmaktadır (Sole, 1988; Vålles ve ark., 2004).

Kara mürver bitkisi Avrupa'da geleneksel şekilde gıda ve ilaç olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Literatürde kara mürverin antik çağlardan beri Hipokrat, Dioskorides ve Pilinius tarafından ilaç olarak kullanıldığına dair bilgiler yer almaktadır (Ağalar, 2019). Kara mürver ağaçlarının Hipokrat tarafından "ilaç sandığı" olarak tanımlandığı, kara mürver bitkisinin ise doğanın en büyük şifalı bitkisi olarak görüldüğü de literatürde bildirilmiştir (Kilham, 2000).

Nile ve Park (2014) kara mürverin C, A ve B vitaminleri, flavonoidler, karotenoidler, kalsiyum ve demir bakımından zengin bir meyve olduğunu belirttikleri çalışmalarında; kara mürverin DNA'yı serbest radikallerin oluşturduğu hasardan koruduğunu, iltihaba karşı vücutta destekleyici etki gösterdiğini, solunum problemleri ve astıma karşı terapötik etkiye sahip olduğunu, bağıışıklık sistemini

güçlendirdiğini ve sindirim sistemini uyarıcı etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Literatürde, kara mürver bitkisi ve farklı fraksiyonlarının; antioksidan, antiviral, immünomodülatör, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antikonvülsan ve antidepresan etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Ağalar, 2019).

Kara mürver; hipertansiyon, obezite ve diyabete karşı doğal bir ajan olarak da kullanılmaktadır. *S. nigra* meyve ekstraktlarının, antioksidan aktivitesi ile bağlantılı olan antiinflamatuvar aktivitesinden kuersetinin sorumlu olabileceği bildirilmiştir. Kara mürverden hazırlanan ilaçların ayrıca gram negatif bakterilerden *Helikobakter pilori*'ye, *Hemofilus influenza*'ya, *Branhamella catarrhalis*'e ve gram pozitif bakterilerden *Streptococcus*'un C ile G grupları ve *Streptococcus pyogenes*'e karşı antibakteriyel etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Kara mürver meyveleri potansiyel antikarsinojenik aktiviteye de sahiptir. Bahsi geçen tüm aktivitelerin; antosiyaninlerden, kuersetin türevlerinden, proantosiyanidinlerden, monoterpen glikozitlerden, fitosterollerden ve seskiterpenlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (Salvador, 2017).

### Besinsel Özellikleri

Kara mürver meyvelerinin kimyasal bileşimi genel olarak; karbonhidratlar (basit, çözünür, polisakaritler), yağlar, proteinler, organik asitler, vitaminler ve fenolik bileşikler (flavonoidler, fenolik asitler, antosiyaninler) gibi organik maddelerden meydana gelmektedir (Vulic ve ark., 2008; Veberic, 2009; Costica ve ark., 2019). Kara mürver; % 79.8 su, % 18.4 karbonhidrat, % 0.5 yağ, % 0.66 protein ve % 7 lif içeriğine sahip bir meyvedir. 100 gr kara mürver meyvesinde 38 mg kalsiyum, 39 mg fosfor, 6 mg sodyum ve 36 mg C vitamini bulunur (Anonim, 2020). *Sambucus nigra* yaprakları ise; % 0.44 tanen, % 0.23 pektin, % 4.82 yağ ve % 73.90 C vitamini içeriğine sahiptir (Guseinova, 1965). Çizelge 1'de dört farklı kaynağa göre, *Sambucus nigra* meyvesinin, kuru madde üzerinden, kimyasal bileşimi verilmiştir.

Çizelge 1. *Sambucus nigra* meyvesinin besinsel bileşimi

| Kimyasal Bileşikler        | Romero Rodriguez ve ark. (1992) | Schmeda-Hirschmann ve ark. (2005) (g kg <sup>-1</sup> ) | Vulic ve ark. (2008) | Domínguez ve ark. (2020) |
|----------------------------|---------------------------------|---|----------------------|--------------------------|
| Su (%)                     | 81.0–82.2                       | 120   | 79.78                | 78.91                    |
| Protein (%)                | 10.2–11.5                       | 167   |                      | 2.97                     |
| Lipit (g)                  | 0.42–0.53                       | 59  |                      | 0.35                     |
| Karbonhidrat(Glikoz) (g)   | 16.3–22.1                       |   |                      |                          |
| Karbonhidrat (Fruktoz) (g) | 12.7–15.4                       |   |                      |                          |
| Karbonhidrat(Sakkaroz)(g)  | 0.4–1.0                         |   | 0.33                 |                          |
| Kül (%)                    | 4.5–4.9                         | 37  | 0.915                | 1.02                     |
| Sitrik Asit (%)            | 0.26–0.47                       |   |                      |                          |
| Malik Asit (%)             | 0.63–1.17                       |   |                      |                          |
| Lif                        |                                 | 290   |                      |                          |

Kara mürver suyunun; kuru madde içeriği % 21.35, toplam asitliği % 1.21, toplam şeker içeriği % 6.16, indirgen şeker içeriği % 6.12 ve pH değeri 4.15'tir (Galic ve ark., 2009). Kara mürver meyvelerinde fruktoz (43.96 g kg<sup>-1</sup> taze ağırlık) ve glikoz (42.62 g kg<sup>-1</sup> taze ağırlık) içerikleri sakkaroz içeriğinden (1.04 g kg<sup>-1</sup> taze ağırlık) oldukça yüksektir (Veberic, 2009). Kara mürver suyunun da sakkaroz içeriği düşük olup, toplam şeker içeriğinin büyük kısmını indirgen şekerler oluşturmaktadır (Galic ve ark.,

2009). Kara mürver meyve suyu bileşiminde 3.29 g 100 ml<sup>-1</sup> fruktoz ve 3.19 g 100 ml<sup>-1</sup> glikoz bulunmaktadır (Antolak ve ark., 2017).

Kara mürver; şeker, pektin, B ve C vitamini içeriğinin yanı sıra, organik asitler açısından da zengin bir meyve olup, içerdiği organik asitler; malik asit, fumarik asit, sitrik asit, şikimik asit, malonik asit ve valerik asit olarak sıralanabilir (Veberic, 2009; Pliszka, 2017). Kara mürverde en çok bulunan organik asit sitrik asittir (3.50 g kg<sup>-1</sup> taze ağırlık). Sitrik asidi sırasıyla; malik asit (1.10 g kg<sup>-1</sup> taze ağırlık), şikimik asit (0.33 g kg<sup>-1</sup> taze ağırlık) ve fumarik asit (0.17 g kg<sup>-1</sup> taze ağırlık) takip eder (Veberic, 2009).

Costica ve arkadaşları (2019), 5 farklı bölgede yetişen kara mürver meyvelerinin kuru madde içeriklerinin % 16.06 ila % 28.48 arasında, toplam mineral içeriklerinin % 5.93 ila % 9.19 arasında ve organik madde içeriklerinin % 8.76 ila % 21.68 arasında değişim gösterdiğini bildirmiştir. Kara mürver meyvelerinin mineral kompozisyonu; kalsiyum (28.06 mg 100 g<sup>-1</sup>), magnezyum (25.99 mg 100 g<sup>-1</sup>), fosfor (54.0 mg 100 g<sup>-1</sup>), potasyum (391.33 mg 100 g<sup>-1</sup>), sodyum (2.17 mg 100 g<sup>-1</sup>), çinko (0.36 mg 100 g<sup>-1</sup>), demir (1.86 mg 100 g<sup>-1</sup>), mangan (0.27 mg 100 g<sup>-1</sup>) ve bakır (0.14 mg 100 g<sup>-1</sup>) minerallerinden oluşmaktadır (Vulic ve ark., 2008). Çizelge 2’de farklı literatür araştırmalarına göre kara mürver bitkisi ve fraksiyonlarının amino asit bileşimi özetlenmiştir.

**Çizelge 2.** *Sambucus nigra* ve fraksiyonlarının amino asit bileşimi

|                   | Künsch ve<br>Temperli (1978) | Kislichenko ve Vel’ma (2006) |                                   | Vulic ve<br>ark. (2008) |                 |
|-------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-----------------|
|                   | Meyve (mg g <sup>-1</sup> )  | Çiçek<br>(%)                 | Meyve (%)                         | Yaprak (%)              | Ekstrakt<br>(%) |
| Lisin             | 242                          | 1.082                        | 0.091                             | 1.298                   | 1.291           |
| Alanin            |                              | 3.048                        | 0.238                             | 4.290                   | 3.794           |
| Treonin           | 243                          | 1.071                        | 0.071                             | 1.378                   | 1.226           |
| Glisin            |                              | 1.318                        | 0.073                             | 1.794                   | 1.593           |
| Valin             | 321                          | 1.102                        | 0.165                             | 1.522                   | 1.202           |
| Serin             |                              | 1.325                        | 0.174                             | 1.707                   | 1.410           |
| Prolin            |                              | 1.239                        | 0.092                             | 1.993                   | 1.629           |
| İzolösin          | 253                          | 1.188                        | 0.085                             | 1.727                   | 1.540           |
| Lösin             | 626                          | 1.124                        | 0.205                             | 1.294                   | 1.039           |
| Metiyonin         | 126                          | 0.614                        | 0.025                             | 0.803                   | 0.703           |
| Histidin          |                              | 0.624                        | 0.062                             | 0.740                   | 0.694           |
| Fenilalanin       | 412                          | 1.165                        | 0.123                             | 1.254                   | 1.108           |
| Glutamik asit     |                              | 3.594                        | 0.311                             | 4.372                   | 3.914           |
| Aspartik asit     |                              | 2.447                        | 0.303                             | 2.730                   | 2.633           |
| Sistein           | 130                          |                              | 0.008                             |                         |                 |
| Tirozin           | 533                          | 1.028                        | 0.198                             | 0.876                   | 0.799           |
| Toplam<br>protein |                              | 2.458                        | 2.84<br>(g 100 ml <sup>-1</sup> ) | 3.331                   | 2.874           |

Çizelge 3’te ise üç farklı kaynağa göre kara mürver meyvesi ve çekirdeklerinin yağ asidi kompozisyonu verilmiştir.

**Çizelge 3.** *Sambucus nigra* meyve ve çekirdeğinin yağ asidi kompozisyonu

|          | Dulf ve ark.<br>(2013) | Fazio ve ark. (2013)              | Domínguez ve ark.<br>(2020)         |
|----------|------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
|          | Çekirdek (%)           | Çekirdek (g 100 g <sup>-1</sup> ) | Taze meyve (g 100 g <sup>-1</sup> ) |
| C12:0    | 0.01                   |                                   | 0.03                                |
| C14:0    | 0.09                   | 0.04                              | 0.15                                |
| C15:0    | 0.02                   |                                   | 0.03                                |
| C16:0    | 7.93                   | 4.07                              | 6.59                                |
| C16:1n-7 | 0.08                   | 0.05                              | 0.10                                |
| C17:0    | 0.04                   |                                   | 0.08                                |
| C17:1n-7 |                        |                                   | 0.04                                |
| C18:0    | 2.29                   | 0.64                              | 1.96                                |
| C18:1n-9 | 12.84                  |                                   | 11.96                               |
| C18:1n-7 | 0.94                   |                                   | 0.73                                |
| C18:2n-6 | 34.28                  | 11.73                             | 39.47                               |
| C18:3n-3 | 40.76                  | 9.81                              | 38.07                               |
| C20:0    | 0.15                   | 0.03                              | 0.25                                |
| C20:1n-9 | 0.14                   | 0.04                              | 0.14                                |
| C20:2n-6 | 0.07                   |                                   | 0.07                                |
| C20:3n-3 | 0.04                   |                                   | 0.05                                |
| C22:0    | 0.08                   | 0.03                              | 0.15                                |
| C24:0    |                        |                                   | 0.12                                |
| SFA      | 10.64                  | 4.81                              | 9.35                                |
| MUFA     | 14.21                  | 4.21                              | 12.96                               |
| PUFA     | 75.15                  | 21.54                             | 77.69                               |
| n-6      |                        |                                   | 39.54                               |
| n-3      |                        |                                   | 38.12                               |

### Biyoaktif Bileşenler

*Sambucus* türlerinin kimyasal yapısı, majör bileşikler dışında; flavonoidler, fenolik asitler, antosiyanidoller, triterpenler, lektinler, siyanojenik heterozitler ve uçucu yağlardan oluşmaktadır (Dündar, 2009). Kara mürverin sağlığa olumlu etkileri, kimyasal bileşimindeki fenolik asitler, flavonoidler, polifenoller, antosiyaninler ve tanenler gibi biyoaktif bileşenlerin varlığına atfedilmektedir (Veberic, 2009; Tejero ve ark., 2015).

Kara mürver türlerinde genel olarak 54 tane fenolik bileşik tanımlanmıştır. Kara mürverdeki baskın polifenoller antosiyaninlerdir. Kara mürver meyvelerinde antosiyaninler, siyanidin glikozitleri şeklinde bulunmaktadır. Kara mürver meyvelerindeki ana antosiyaninler ise siyanidin-3-sambubiosid, siyanidin-3,5 diglikozit, siyanidin-3-sambubioil-5-glikozit, siyanidin-3-O-glikozit ve siyanidin-3-(E)-p-kumaroil-sambubioside-5-glikozittir (Mikulic-Petkovsek ve ark., 2015). Siyanidin-3-O-glikozit antikanser aktiviteye sahip bir bileşiktir (Marczylo ve ark., 2009). Siyanidin glikozitlerinin yanı sıra kuersetin ve kafeik asit türevleri de kara mürver meyvelerinde tespit edilmiştir. Kara mürver ekstraktları mikrobiyal aktivite üzerinde inhibe edici bir etki göstermekle birlikte, antosiyanin içeriğiyle de antiradikal aktiviteye sahiptir (Pliszka, 2017).

Kara mürver meyvelerinde bulunan bazı hidroksisünamik asit türevleri; 3-, 4- ve 5-kafeoilkinik asit, 3-feruloilkinik asit (3-FQA), p-kumarik ve kafeik asit heksosid, 3- ve 4-p-koumaroilkinik asit ile 2 dikikeoilkinik asit ve fenolik asitler 3-p-kumaroil kinik asit ve 4-p-kumaroil kinik asittir. Hidroksisünamik asit türevleri arasındaki majör bileşik (% 40-60) ise klorojenik asittir. Diğer fenolik bileşikler ise kafeik asit ve p-kumarik asittir (Mikulic-Petkovsek ve ark., 2015).

Kara mürverde bulunan başlıca flavonoidler ise; kuersetin-3-O-rutinosit, kuersetin-3-O-glikozit, kaempferol-3-O-rutinozid, isorhamnetin-3-O-rutinozid, isorhamnetin-3-O-glikozit ve 5-O-caffeoilkinik asittir (Christensen ve ark., 2010). *S. nigra* L. çiçeklerinde bulunan polifenollerden naringenin ve 5-O-caffeoilkinik asit, glikoz alımını arttırarak yağ birikimini azaltmaktadır (Bhattacharya ve ark., 2013). Kara mürver meyveleri yüksek fenolik bileşik içeriği ile beslenmede sağlıklı bir takviye olarak görülmektedir (Mikulic-Petkovsek ve ark., 2015).

### Zararlı Bileşenler

Bitkilerde siyanojenik glikozit toksinleri hidrojen siyanür oluşturarak, zararlılara ve stres koşullarına karşı bir koruma sağlamaktadır. *Sambucus nigra*'da bulunan siyanojenik glikozitler; sambunigrin, zierin, holokalini ve prunasidir. En yaygın bulunan siyanojenik glikozitler ise sambunigrin ve prunasidir (Brimer ve ark., 1998; Dellagrecia ve ark., 2000; Vetter, 2000; Zagrobelny ve ark., 2004).

Kara mürver bitkisi için oldukça önem arz eden diğer bileşikler; lektinler ve ribozom inaktive edici proteinlerdir (Porter ve Bode, 2017). Ribozom inaktive edici proteinler (RIP), ribozom RNA'sında N-glikozidaz enzim aktivitesine sahip olan ve ribozomun protein sentezine girmesini önleyen enzimlerdir (Girbes ve ark., 2004; Stirpe, 2004; Ng ve ark., 2010). RIP'ler zararlı canlıların ribozomlarını inaktive ederek bitkilerin; böceklere, mantarlara, virüslere ve yırtıcı hayvanlara karşı korunmasında rol oynarlar (Barbieri ve ark., 1993; Girbes ve ark., 1996; Corrado ve ark., 2005). RIP'ler tip 1 RIP ve tip 2 RIP olarak sınıflandırılmaktadır. Kara mürverde bulunan RIP'ler, RNA'ya ek olarak DNA ve polinükleotidler üzerinde de etki mekanizmasına sahiptirler (Barbieri ve ark., 1993; Iglesias ve ark., 2010).

Lektinler, şeker bağlama bölgeleri olan ve spesifik şekerler ile geri dönüşümlü şekilde bağlanan glikoproteinlerdir (Van Damme ve ark., 1997). Lektinler de RIP'lere benzer şekilde, kara mürver bitkisinde protein-karbonhidrat etkileşimleriyle, virüsler ve böcekler gibi stres koşullarına karşı bitki savunma sisteminde rol oynamaktadır (Van Damme ve ark., 1998; Sharon, 2007; Karpova ve ark., 2013). Ayrıca *Sambucus nigra*'da bulunan lektinler, ağır metaller ve *Bacillus subtilis*'e karşı da koruyucu bir etki göstermektedir (Karpova ve ark., 2013). Mürver türlerinde kayda değer miktarda toksisitesi düşük olan tip 2 RIP'ler (lektinler) bulunmaktadır (Girbes ve ark., 2004; Stirpe, 2004).

*Sambucus nigra* meyvelerinde tip 1 RIP'lerden nigrin f1 ve nigrin f2, kabuğunda tip 2 RIP'lerden nigrin b ve temel nigrin b (bNgb), tohumlarında nigrin s, ham ve yeşil meyvelerinde nigrin f, yapraklarında ise nigrin 11 ve nigrin 12 bulunmaktadır (Citores ve ark., 1994; Citores ve ark., 1996; De Benito ve ark., 1997; Tejero ve ark., 2015). Lektinler kara mürver bitkisinin; meyvelerinde (SNA-IV), tohumlarında (SNA-III), yapraklarında (SNA-IV1), köklerinde ve kabuğunda (SNA-I ve SNA-II) bulunmaktadır (Van Damme ve ark., 1998; Barbieri ve ark., 2004; Ferreras, ve ark., 2011; Karpova ve ark., 2013). Lektin içeriği nedeniyle *S. nigra* bitkisinin çeşitli kısımları Ukrayna geleneksel halk tıbbında bronşit, romatizma ve grip gibi hastalıklara karşı terapötik olarak kullanılmaktadır (Karpova ve ark., 2013). Tip 2 RIP'lerin yüksek konsantrasyonlarda tüketimi toksik etki göstereceğinden, kara mürver tüketim miktarı önem arz etmektedir. Ayrıca tip 2 RIP'ler memelilerin gastrointestinal sistemindeki hücreler ile etkileşime girerek, bağırsak mukozasında ve canlı fizyolojisinde zararlı etkiler



gösterebilmektedir. Bu nedenle kara mürverin kansere karşı kullanımında, toksik ve zararlı etkileri de göz önünde bulundurulmalıdır (Tejero ve ark., 2015).

### İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

*Sambucus nigra*'nın soğuk algınlığı ve grip ilacı olarak kullanımı eski Roma'ya kadar uzanmaktadır. Kara mürverin terapötik etkinliği Panama ve İsraili araştırmacılar tarafından teyit edilmiş, soğuk algınlığını 3 gün içinde sona erdirdiği ve aynı zamanda antikor üretimini uyardığı bildirilmiştir (Bergner, 1996). Kara mürver (*Sambucus nigra*) bitkisi geleneksel Avrupa tıbbında yüz yıllardır; diş ağrısı, kulak ve göz problemleri, yaralar, cilt yanıkları, dizanteri, romatizma, ateş, epilepsi ve benzeri birçok hastalığa karşı terapötik olarak kullanılmaktadır (Tejero ve ark., 2015). Amerika ve Britanya'da geleneksel olarak mürver çiçeklerinden demlenen çay, boğaz ağrısı ile soğuk algınlığının tedavisinde ve kan temizleyici bir tonik olarak kullanılmaktadır (Bergner, 1996).

Kara mürver bitkisinin çiçekleri öksürük, bronşit, astım, hemoroit hastalıklarına karşı terapötik olarak ve balgam söktürücü olarak, kabuğu yaraların tedavisinde, kurutulmuş meyveleri prostat tedavisinde ve tohumları hemoroitin engellenmesinde kullanılmaktadır (Kültür, 2007). Ayrıca mürver meyveleri ve çiçekleri grip, sinüzit ve uçuk gibi hastalıkların yanı sıra; ateş düşürücü, romatizma, boğaz ağrısı, karın ağrısı, sinüs iltihapları ve ishale karşı da iyileştirici etki göstermektedir (Barak ve ark. 2001; Uncini Manganeli ve ark., 2005; Gorchakova ve ark., 2007; Vurdu ve ark., 2012). Aynı zamanda kara mürver çiçekleri cilt için nemlendirici, beyazlatıcı ve tonik olarak, çiçekleri ve yaprakları antihemoroit olarak, yaprakları hemostatik (kanama durdurucu) olarak ve kabuğu ile genç dalları ellerde ve ayaklardaki şişliklerin iyileştirilmesinde kullanılmaktadır (Pieroni ve ark., 2004). Kara mürver çiçekleri, diyabete karşı da terapötik olarak kullanılabilir (Atkinson, 1979).

Kara mürver meyvelerinin tüketimi ile kanser, kardiyovasküler ve Alzheimer gibi hastalıklar arasında önemli bir ilişki bulunmaktadır (Netzel ve ark., 2005; Zafra-Stone ve ark., 2007; Mikulic-Petkovsek ve ark., 2014; Rodriguez-Mateos ve ark., 2014). Yapılan çalışmalarda; *Sambucus nigra* meyvelerinin özlerinden hazırlanan Sambucol şurubunun, influenza A ve influenza B virüsleri ile HIV'i nötralizasyon yoluyla azalttığı tespit edilmiştir (Sahpira-Nahor ve ark., 1995; Zakay-Rones ve ark., 2004).

### Antioksidan Aktivite

*Sambucus nigra* bitkisi antosiyaninler ve flavonoidler bakımından zengin olup, bu bileşikler önemli antioksidan aktiviteye sahiptir. Kara mürverdeki antosiyaninler, hücreleri oksidatif strese karşı koruyucu etki göstermektedir (Abuja ve ark., 1998; Youdim ve ark., 2000; Mikulic-Petkovsek ve ark., 2014). Yapılan bir çalışmada; düşük oranda ( $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) antosiyanin içeren kara mürver meyvelerinin bile, hem LDL oksidasyonunun inhibisyonuna hem de peroksit radikallerine karşı olan etkisinin,  $\alpha$ -tokoferol ve  $\alpha$ -tokoferoksil radikallerinden daha etkili olduğu görülmüştür. Bu özelliği kara mürveri, serbest radikallerden kaynaklanan rahatsızlıkların (kanser, periferik damar hastalığı, nörodejeneratif, otoimmün, kardiyovasküler hastalıklar ve MS) iyileştirilmesinde kullanılabilir önemli bir ürün hâline getirmektedir (Abuja ve ark., 1998; Thole ve ark., 2006). Başka bir çalışmada ise *Sambucus nigra* meyve, çiçek ve yapraklarının alkolik ekstraktlarının antioksidan aktivitesi ve sıcaklığın antioksidan aktivite üzerindeki etkisi incelenmiştir. En düşük antioksidan aktivite kara mürver yapraklarında bulunurken, en yüksek aktivite kara mürver çiçeklerinde bulunmuştur. Ayrıca sıcaklık artışıyla yapraklardaki antioksidan aktivitenin önemli düzeyde arttığı görülmüştür (Dawidowicz ve ark., 2006).

### Antiviral Aktivite

Kara mürver ekstraktlarının birçok yaralı etkisi bulunmakla birlikte, en önemli özelliği antiviral aktiviteye sahip olmasıdır. *Sambucus nigra* meyvelerinden hazırlanan bir şurup olan Sambucol'un influenza A, influenza B ve HSV-1 virüs suşları ile izolatlarına etkisi hakkında birçok çalışma yapılmıştır (Saphira-Nahor ve ark., 1995; Zakay-Rones ve ark., 1995; Morag ve ark., 1997; Janeway ve ark., 2001). Grip belirtileri gösteren 27 kişiden; yetişkinlere 4 yemek kaşığı, çocuklara ise 2 yemek kaşığı Sambucol ekstraktı 3 gün boyunca günlük olarak verilmiş, hastalar 6 gün boyunca takip edilmiştir. Hastalardan alınan kan örneklerinde, Sambucol şurubu kullanımı ile iyileşme sürecinde influenza A ve influenza B virüslerine karşı antikor oluşturulduğu ve ateş gibi diğer semptomların da iyileştirildiği görülmüştür. Tedavi gören gruptan kontrol grubu 6 günde iyileşirken, mürver ekstraktı kullanan grup 2 ile 3 gün içerisinde iyileşme göstermiştir (Zakay-Rones ve ark., 1995). Barak ve arkadaşları (2001) yaptıkları bir çalışmada, Sambucol ekstraktlarının bağışıklık sistemini güçlendirdiğini ve grip semptomlarını 3 ile 4 gün içinde tedavi ettiğini bildirmiştir. Kara mürver meyvelerinde bulunan flavonoidler, H1N1(Human Influenza A) virionlarına tutunarak virüsün konak hücrelere bağlanmasını engelleyici etki göstermektedir. Dolayısıyla kara mürver flavonoidleri, yüksek antiviral aktivite sergilemektedir (Roschek ve ark., 2009).

### Antibakteriyel Aktivite

Izzo ve ark. (1995) kara mürver ekstraktlarının *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhi, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa*'a karşı antimikrobiyal etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Hearst ve ark. (2010) bir çalışmalarında, kara mürverin yaprak ekstraktlarının *Bacillus cereus* ve *Serratia marcescens*'a karşı orta derecede antibakteriyel etki ve meyvelerinin sulu ekstraktlarının ise *E. coli* 0157 üzerinde dikkate değer bir inhibisyon gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada kara mürver çiçek ekstraktlarının, yaprak ve meyve ekstraktlarından daha fazla antibakteriyel aktivite gösterdiğine dikkat çekilmiştir. Kara mürver çiçek ve meyve ekstraktlarının ise hem *Staphylococcus sp.*, *B. cereus* gibi gram pozitif hem de *Salmonella poona*, *P. aeruginosa* gibi gram negatif patojenleri inhibe ettiği bildirilmiştir.

Kara mürver ekstraktlarındaki ana bileşiklerin; gallik asit türevleri, hidrokisisinamik asit, kafeik asit ve kafeik asitin kinik asit esteri gibi tanenler olduğu bulunmuş ve antimikrobiyal aktivitenin bu bileşiklerden kaynaklandığı öne sürülmüştür. Flavonoidler, triterpenoidler gibi antimikrobiyal bileşenlerin kara mürver çiçeklerinde tespit edildiği, meyve ekstraktlarında ise lupeol, betulin gibi bileşiklerin bulunduğu bildirilmiştir. Diğer aromatik olmayan antimikrobiyal bileşiklerin ise lektinler, oligosakarit fragmanları ve peptitler olduğu tespit edilmiştir (Hearst ve ark., 2010).

Rodino ve ark. (2015) kara mürver meyve ekstraktının *P. fluorescens*'a karşı inhibisyon bölgesinde maksimum 15 mm çapında antibakteriyel aktivite geliştirdiğini, çiçek ekstraktlarının ise 11 mm çapında bir inhibisyon gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca meyve ekstraktlarında minimum hassasiyetin *S. aureus* suşunda elde edildiğini bildirmişlerdir. Meyve ekstraktlarının çiçek ekstraktlarına kıyasla daha iyi antibakteriyel aktivite gösterdiği belirtilirken, alkol ekstraktlarının *E. faecalis*, *E. coli* ve *P. fluorescens*'i inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar doğrultusunda, kara mürverin hidroalkolik ekstraktlarının önemli bir antibakteriyel etkiye sahip olduğu ve halk tıbbında geleneksel kullanımının doğru bir yaklaşım olduğu belirtilmiştir.

Goud ve Prasad (2020) kara mürver meyve ekstraktlarının antimikrobiyal özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında ise en yüksek inhibisyonun *E. coli*'ye karşı gerçekleştiğini, metanol ekstraktının *Pseudomonas putida*'ya karşı daha az bir inhibisyon bölgesi gösterdiğini, *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı ise herhangi bir inhibisyon bölgesinin gözlenmediğini bildirmişlerdir.

### Antidepresan Aktivite

Mahmoudi ve ark. (2014) davranışsal çaresizliği antidepresan aktiviteyi test etmek için model olarak önerdikleri bir çalışmalarında, kara mürver ekstraktlarının antidepresan aktivitesini belirlemek üzere fare deneklerine zorunlu yüzme testi ve kuyruk süspansiyon testi uygulamışlardır. Bu çalışmada kaçınılmaz bir strese maruz bırakılan denekler tarafından sergilenen hareketsizliğin, davranışsal çaresizliği yansıttığı varsayılmış ve bunun insanlardaki depresif bozuklukları yansıtacağı ön görülmüştür. Yapılan testler sonucunda kara mürver ekstraktları, deneklerin hareketsizlik süresini kısaltmış ve aktivitelerini kontrol grubuna kıyasla artırmıştır. Test edilen tüm dozlardaki tüm ekstraktlar, kontrol deneklerine kıyasla hareketsizlik süresinde doza bağlı olarak önemli azalmalara neden olmuştur. Ayrıca 1200 mg kg<sup>-1</sup> dozundaki kara mürver ekstraktının, güçlü ve etkili bir antidepresan ilaç olan imipramine (10 mg kg<sup>-1</sup>) kıyasla deneklerde daha yüksek aktiviteye neden olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda kara mürver ekstraktlarının iyi bir antidepresan aktivite gösterdiği ve doza bağlı olarak farklı etkilere sahip olabileceği bildirilmiştir.

### SONUÇ

Kara mürver, besin değeri ve biyoaktif madde içeriği yüksek bir meyvedir. Geleneksel olarak özellikle Avrupa'da, immün sistemin güçlendirilmesi ve birçok hastalığın iyileştirilmesinde, kara mürverin tüketimi oldukça yaygındır. Kara mürver, kullanılabilen tüm fraksiyonları ile kolay biyoaktif madde erişimi potansiyeli sunan önemli bir bitkidir. Besinsel özellikleri nedeniyle, hem gıda hem de sağlık alanında kara mürver kullanım olanaklarının artırılması ve kara mürver kullanılarak üretilen ürünlerin üretiminin ve tüketiminin yaygınlaştırılması önem arz etmektedir.

### Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

### Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

### KAYNAKLAR

- Abuja P M, Murkovic M, Pfannhauser W, 1998. Antioxidant and Prooxidant Activities of Elderberry (*Sambucus nigra*) Extract in Low-density Lipoprotein Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4091-4096.
- Ağalar HG, 2019. Elderberry (*Sambucus nigra* L.). In *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*. Academic Press, pp. 211-215.
- Anonim, 2020. United States Department of Agriculture USDA Food Composition Databases, <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/171727/nutrients> (Erişim Tarihi: 02.07.2020).
- Antolak H, Czyżowska A, Kręgiel D, 2017. Antibacterial and Antiadhesive Activities of Extracts From Edible Plants Against Soft Drink Spoilage by *Asaia* spp.. *Journal of Food Protection*, 80, 25-34.
- Arslandoğlu Ş F, Sert S, Özdemir M, 2019. Anadolu Coğrafyasında Yayılış Gösteren *Sambucus nigra* ve *Sambucus ebulus*'un tıbbi bitki olarak önemi, *Haziran-Temmuz 2019*, 58-62.
- Atkinson, M, 1979. *Herbs for Your Health*. Dalesman Books, New York.
- Barak V, Halperin T, Kalickman I, 2001. The Effect of Sambucol, A Black Elderberry-Based, Natural Product, on The Production of Human Cytokines, I. Inflammatory Cytokines. *European Cytokine Network*, 12 (2): 290–296.

- Barbieri L, Battelli M G, Stirpe F, 1993. Ribosome-Inactivating Proteins from Plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1154 (3-4): 237-282.
- Barbieri L, Ciani M, Girbes T, Liu W Y, Van Damme E J, Peumans W J, Stirpe F, 2004. Enzymatic Activity of Toxic and Non-Toxic Type 2 Ribosome Inactivating Proteins. *FEBS Letters*, 563: 219-222.
- Bergner P, 1996. Elderberry (*Sambucus nigra, canadensis*). *Medical Herbalism*, Winter 1996-97, Vol. 8, No. 4, s. 1, 11-12.
- Bhattacharya S, Christensen K B, Olsen L C, Christensen L P, Grevsen K, Færgeman N J, Kristiansen K, Young J F, Oksbjerg N, 2013. Bioactive Components From Flowers of *Sambucus nigra* L. Increase Glucose Uptake in Primary Porcine Myotube Cultures and Reduce Fat Accumulation in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (46): 11033-11040.
- Bolli R, 1994. Revision of The Genus *Sambucus*. *Dissertationes Botanicae*, 223: 1–227.
- Brimer L, Cicalina A R, Federici F, Petruccioli M, 1998. Amygdalin Degradation by *Mucor Circinelloides* and *Penicillium Aurantiogriseum*, Mechanisms of Hydrolysis. *Archives of Microbiology*, 169: 106-112.
- Charlebois D, Byers P L, Finn C E, Thomas A L, 2010. Elderberry: Botany, Horticulture, Potential. *Horticultural Reviews*, 37: 213–280.
- Christensen L P, Kaack K, Frette X C, 2008. Selection of Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Genotypes Best Suited for The Preparation of Elderflower Extracts Rich in Flavonoids and Phenolic Acids. *European Food Research and Technology*, 227: 293–305.
- Christensen K B, Petersen R K, Kristiansen K, Christensen L P, 2010. Identification of Bioactive Compounds From Flowers of Black Elder (*Sambucus nigra* L.) That Activate The Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)  $\gamma$ . *Phytotherapy Research*, 24 (2): 129-132.
- Citores L, Iglesias R, Muñoz R, Ferreras J M, Jimenez P, Girbes T, 1994. Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Seed Proteins Inhibit Protein Synthesis and Display Strong Immunore Activity with Rabbit Polyclonal Antibodies Raised Against The Type 2 Ribosome-Inactivating Protein Nigrin b. *Journal of Experimental Botany*, 45: 513–516.
- Citores L, De Benito F M, Iglesias R, Ferreras J M, Jimenez P, Argueso P, Farias G, Mendez E, Girbes T, 1996. Isolation and Characterization of A New Non-Toxic Two-Chain Ribosome-Inactivating Protein From Fruits of Elder (*Sambucus nigra* L.). *Journal of Experimental Botany*, 47: 1577–1585.
- Corrado G, Bovi P D, Ciliento R, Gaudio L, Di Maro A, Aceto S, Lorito M, Rao R, 2005. Inducible Expression of A *Phytolacca Heterotepala* Ribosome-Inactivating Protein Leads to Enhanced Resistance Against Major Fungal Pathogens in Tobacco. *Phytopathology*, 95 (2): 206-215.
- Costica N, Stratu A, Boz I, Gille E, 2019. Characteristics of Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Fruit. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 84 (1): 115-122.
- Dawidowicz AL, Wianowska D, Baraniak B, 2006. The Antioxidant Properties of Alcoholic Extracts From *Sambucus nigra* L. (Antioxidative Properties of Extracts). *Journal of Food Science and Technology*, 39 (3): 308–315.
- De Benito F M, Citores L, Iglesias R, Ferreras J M, Camafeita E, Mendez E, Girbes T, 1997. Isolation and Partial Characterization of A Novel and Uncommon Two-Chain 64-kDa Ribosome-Inactivating Protein From The Bark of Elder (*Sambucus nigra* L.). *FEBS Letters*, 413: 85–91.
- Dellagrecia M, Fiorentino A, Monaco P, Previtera L, Simonet A M, 2000. Cyanogenic Glycosides From *Sambucus nigra*. *Natural Product Letters*, 14: 175–182.

- Domínguez R, Zhang L, Rocchetti G, Lucini L, Pateiro M, Munekata PE, Lorenzo JM, 2020. Elderberry (*Sambucus nigra* L.) as Potential Source of Antioxidants. Characterization, Optimization of Extraction Parameters and Bioactive Properties. *Food Chemistry*, 330: 127266.
- Donoghue M J, Bell C D, Winkworth R C, 2003. The Evolution of Reproductive Characters in Dipsacales. *International Journal of Plant Sciences*, 164: 453-464.
- Dulf FV, Oroian I, Vodnar DC, Socaciu C, Pintea A, 2013. Lipid Classes and Fatty Acid Regiodistribution in Triacylglycerols of Seed Oils of Two *Sambucus* Species (*S. nigra* L. and *S. ebulus* L.). *Molecules*, 18 (10): 11768-11782.
- Duymuş H G, 2010. Türkiye’de Yetişen *Sambucus nigra* Meyveleri Üzerinde Ön Kimyasal Araştırmalar. Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış).
- Dündar S, 2009. *Sambucus* L. Türleri Üzerinde Fitoterapötik Çalışmalar. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış).
- Fazio A, Plastina P, Meijerink J, Witkamp RF, Gabriele B, 2013. Comparative Analyses of Seeds of Wild Fruits of *Rubus* and *Sambucus* Species from Southern Italy: Fatty Acid Composition of the Oil, Total Phenolic Content, Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of the Methanolic Extracts. *Food Chemistry*, 140 (4): 817-824.
- Ferreras J M, Citores L, Iglesias R, Jimenez P, Girbes T, 2011. Use of Ribosome Inactivating Proteins from *Sambucus* for The Construction of Immunotoxins and Conjugates for Cancer Therapy. *Toxins*, 3: 420-441.
- Galić A, Dragović-Uzelac V, Levaj B, Bursać Kovačević D, Pliestic S, Arnautović S, 2009. The Polyphenols Stability, Enzyme Activity and Physico-Chemical Parameters During Producing Wild Elderberry Concentrated Juice. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 74 (3): 181-186.
- Gilman E F, Watson D G, Klein R W, Koeser A K, Hilbert D R, McLean D C, 2018. *Sambucus nigra* ssp. *Canadensis*: Elderberry. UF/IFAS Extension, University of Florida, USA.
- Girbes T, Citores L, De Benito F M, Inglesias R, Ferreras J M, 1996. A Non-Toxic Two-Chain Ribosome-Inactivating Protein Co-Exists with A Structure-Related Monomeric Lectin (SNA III) in Elder (*Sambucus nigra*) Fruits. *Biochemical Journal*, 315: 343.
- Girbes T, Ferreras J M, Arias F J, Stirpe F, 2004. Description, Distribution, Activity and Phylogenetic Relationship of Ribosome-Inactivating Proteins in Plants, Fungi and Bacteria. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 4: 461–476.
- Gorchakova T V, Suprun I V, Sobenin I A, Orekhov A N, 2007. Use of Natural Products in Anticytokine Therapy. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 143 (3): 316-319.
- Goud NS, Prasad G, 2020. Antioxidant, Antimicrobial Activity and Total Phenol and Flavonoids Analysis of *Sambucus nigra* (Elderberry). *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 12: 35-37.
- Guseinova Z N, 1965. The Chemical Composition of The Leaves of Grass and Black Elder of Azerbaidzhan Flora and Laxative Effect of Their Medicinal Forms and Preparations. *Azerbaidzhanskii Meditsinskii Zhurnal*, 42 (6): 29-35.
- Hearst C, McCollum G, Nelson D, Ballard LM, Millar BC, Goldsmith CE, Rooney PJ, Loughrey A, Moore JE, Rao JR, 2010. Antibacterial Activity of Elder (*Sambucus nigra* L.) Flower or Berry Against Hospital Pathogens. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (17): 1805-1809.
- Herrera C M, 1987. Vertebrate-Dispersed Plants of The Iberian Peninsula: A Study of Fruit Characteristics. *Ecological Monographs*, 57: 305–331.

- Iglesias R, Citores L, Ferreras J M, Pérez Y, Jiménez P, Gayoso M J, Olsnes S, Tamburino R, Di Maro A, Parente A, Girbés T, 2010. Sialic Acid-Binding Dwarf Elder Four-Chain Lectin Displays Nucleic Acid N-glycosidase Activity. *Biochimie*, 92 (1): 71-80.
- Izzo AA, Di Carlo G, Biscardi D, De Fusco R, Mascolo N, Borrelli F, Capasso F, Fasulo MP, Autore G, 1995. Biological Screening of Italian Medicinal Plants for Antibacterial Activity. *Phytotherapy Research*, 9 (4): 281-286.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ, 2001. *Immuno Biology, The Immune System in Health and Disease*. pp. 12-130, New York-USA.
- Karpova I S, Lylo V V, Macewicz L L, Kotsarenko K V, Palchykovska L G, Ruban T O, Lukash L L, 2013. Lectins of *Sambucus nigra* as Biologically Active and DNA-Protective Substances. In I International Symposium on Elderberry, June 2013, 1061, pp. 93-102.
- Kayabaşı N, Etikan S, 1998. Mürver (*Sambucus nigra* L.) Bitkisinden Elde Edilen Renkler ve Bu Renklerin Yün Halı İplikleri Üzerindeki Işık ve Sürtünme Haslıkları. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 4 (3): 65-69.
- Kilham C, 2000. Health Benefits Boost Elderberry. *HerbalGram*, American Botanical Council, 50: 55.
- Kislichenko VS, Vel'ma VV, 2006. Amino-Acid Composition of Flowers, Leaves, and Extract of *Sambucus nigra* Flowers. *Chemistry of Natural Compounds*, 42 (1): 125-126.
- Kültür Ş, 2007. Medicinal Plants Used in Kırklareli Province (Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 111 (2): 341-364.
- Künsch U, Temperli A, 1978. Changes in Free and Protein-Bound Amino Acids in Elderberry Fruit (*Sambucus nigra*) During Maturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29 (12): 1037-1040.
- Mahmoudi M, Ebrahimzadeh MA, Dooshan A, Arimi A, Ghasemi N, Fathiazad F, 2014. Antidepressant Activities of *Sambucus ebulus* and *Sambucus nigra*. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 18 (22): 3350-3353.
- Marczylo T H, Cooke D, Brown K, Steward W P, Gescher A J, 2009. Pharmacokinetics and Metabolism of The Putative Cancer Chemopreventive Agent Cyanidin-3-Glucoside in Mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 64 (6): 1261-1268.
- Mikulic-Petkovsek M, Schmitzer V, Slatnar A, Todorovic B, Veberic R, Stampar F, Ivancic A, 2014. Investigation of Anthocyanin Profile of Four Elderberry Species and Interspecific Hybrids. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 62: 5573-80.
- Mikulic-Petkovsek M, Ivancic A, Todorovic B, Veberic R, Stampar F, 2015. Fruit Phenolic Composition of Different Elderberry Species and Hybrids. *Journal of Food Science*, 80: 2180-2190.
- Morag AM, Mumcuoglu M, Baybikov T, 1997. Inhibition of Sensitive and Acyclovir-Resistant HSV-1 Strains by an Elderberry Extract in Vitro. *Z Phytother*, 25: 97-98.
- Netzel M, Strass G, Herbst M, Dietrich H, Bitsch I, Frank T, 2005. The Excretion and Biological Antioxidant Activity of Elderberry Antioxidants in Healthy Humans. *Food Research International*, 38: 905-910.
- Ng T B, Wong J H, Wang H, 2010. Recent Progress in Research on Ribosome Inactivating Proteins. *Current Protein and Peptide Science*, 11: 37-53.
- Nile SH, Park SW, 2014. Edible Berries: Bioactive Components and Their Effect on Human Health. *Nutrition*, 30 (2): 134-144.

- Pieroni A, Quave C L, Villanelli M L, Mangino P, Sabbatini G, Santini L, Boccetti T, Profili M, Ciccio T, Rampa L G, Antonini G, Girolamini C, Cecchi M, Tomasi M, 2004. Ethnopharmacognostic Survey on The Natural Ingredients Used in Folk Cosmetics, Cosmeceuticals and Remedies for Healing Skin Diseases in The Inland Marches, Central-Eastern Italy. *Journal Ethnopharmacol*, 91: 331-344.
- Pliszka B, 2017. Polyphenolic Content, Antiradical Activity, Stability and Microbiological Quality of Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Extracts. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 16 (4): 393-401.
- Porter R S, Bode R F, 2017. A Review of The Antiviral Properties of Black Elder (*Sambucus nigra* L.) Products. *Phytotherapy Research*, 31 (4): 533-554.
- Rodino S, Butu A, Butu M, Cornea PC, 2015. Comparative Studies on Antibacterial Activity of Licorice, Elderberry and Dandelion. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 10 (3): 947-955.
- Rodriguez Mateos A, Heiss C, Borges G, Crozier A, 2014. Berry (Poly)phenols and Cardiovascular Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 3842–51.
- Romero Rodriguez M A, Vazquez Oderiz M L, Lopez Hernandez J, Simal Lozano J, 1992. Studio Della Composizione Chimica, Caratteristiche Fisiche Ed Indici Di Maturazione Del Lauroceraso (*Prunus laurocerasus* L.) e Delle Bacche Di Sambuco (*Sambucus nigra* L.). *Industrie Alimentari*, 31: 911–917.
- Roschek Jr B, Fink RC, McMichael MD, Li D, Alberte RS, 2009. Elderberry Flavonoids Bind to and Prevent H1N1 Infection in Vitro. *Phytochemistry*, 70 (10): 1255–1261.
- Sahpira Nahor O, Zakay Ronen Z, Mumcuoğlu M, 1995. The Effects of Sambucol ® on HIV Infection in Vitro. *Ann Israel Congress Microbiol*, February 6-7.
- Salvador ÂMC, 2017. Chemical Characterization and Biological Evaluation of *Sambucus nigra* L. Berries and Flowers in View of Their Valorization. *Universidade de Aveiro Portekiz, Doktora Tezi (Basılmış)*.
- Schmeda-Hirschmann G, Feresin G, Tapia A, Hilgert N, Theoduloz C, 2005. Proximate Composition and Free Radical Scavenging Activity of Edible Fruits From the Argentinian Yungas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85 (8): 1357-1364.
- Sharon N, 2007. Lectins: Carbohydrate-Specific Reagents and Biological Recognition Molecules. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 2753-2764.
- Sole C, 1988. *Els fruits silvestres*. Laia, Barcelona.
- Sorensen A E, 1981. Interactions Between Birds and Fruit in A Temperate Woodland. *Oecologia*, 50: 242–249.
- Stirpe F, 2004. Ribosome-Inactivating Proteins. *Toxicon*, 44: 371–383.
- Tejero J, Jiménez P, Quinto E J, Cordoba-Diaz D, Garrosa M, Cordoba-Diaz, M., Gayoso M J, Gírbés T, 2015. Elderberries: A Source of Ribosome-Inactivating Proteins With Lectin Activity. *Molecules*, 20 (2): 2364-2387.
- Thole J M, Kraft T F B, Sueiro L A, Kang Y H, Gills J J, Cuendet M, Pezzuto J M, Seigler D S, Lila M A, 2006. A Comparative Evaluation of The Anticancer Properties of European and American Elderberry Fruits. *Journal of Medicinal Food*, 9: 498-504.
- Ulbricht C, Basch E, Cheung L, Goldberg H, Hammerness P, Isaac R, Khalsa K P, Romm A, Rychlik I, Varghese M, Weissner W, Windsor R C, Wortley J, 2014. An Evidence-Based Systematic Review of Elderberry and Elderflower (*Sambucus nigra*) by The Natural Standard Research Collaboration. *Journal of Dietary Supplements*, 11: 80-120.

- Uncini M R, Zaccaro L, Tomei P E, 2005. Antiviral Activity in Vitro of *Urtica Dioica* L., *Parietaria Diffusa* M. et K. and *Sambucus nigra* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 98 (3): 323.
- Válles J, Bonet Á, Agelet A, 2004. Ethnobotany of *Sambucus nigra* L. in Catalonia (*Iberian peninsula*): The Integral Exploitation of A Natural Resource in Mountain Regions. *The Society Economic Botany*, 58 (3): 456-469.
- Van Damme E J, Roy S, Barre A, Rougé P, Van Leuven F, Peumans W J, 1997. The Major Elderberry (*Sambucus nigra*) Fruit Protein is A Lectin Derived From A Truncated Type 2 Ribosome-Inactivating Protein. *The Plant Journal*, 12 (6): 1251-1260.
- Van Damme E J, Peumans W J, Pusztai A, Bardocz S, 1998. *Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications*, John Wiley & Sons.
- Veberic R, Jakopic J, Stampar F, Smitzer F, 2009. European Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Rich in Sugars, Organic acids, Anthocyanins and Selected Polyphenols. *Food Chemistry*, 114: 511-515.
- Vetter J, 2000. Plant Cyanogenic Glycosides. *Toxicon*, 38: 11-36.
- Vulić J J, Vračar L O, Šumić Z O, 2008. Chemical Characteristics of Cultivated Elderberry Fruit. *Acta Periodica Technologica*, 39: 85-90.
- Vurdu H, Olgun Ç, Özkan O E, 2012. Kastamonu' da Yetişen Mürver Türlerinin Botanik ve Kullanım Özellikleri, Kastamonu' nun Doğal Zenginlikleri Sempozyumu, 16-17 Ekim, Kastamonu.
- Youdim K A, Martin A, Joseph JA, 2000. Incorporation of Elderberry Anthocyanins by Endothelial Cells Increases Protection by Oxidative Stress. *Free Radic Biology and Medicine*, 29: 51-60.
- Zafra Stone S, Yasmin T, Bagchi M, Chatterjee A, Vinson J A, Bagchi D, 2007. Berry Anthocyanins as Novel Antioxidants in Human Health and Disease Prevention. *Molecular Nutrition Food Research*, 51: 675-83.
- Zagrobelyny M, Bak S, Rasmussen A N, Jørgensen B, Naumann C M, Møller B L, 2004. Cyanogenic Glycosides and Plant-Insect Interactions. *Phytochemistry*, 65: 293-306.
- Zakay Rones Z, Varsano N, Zlotnik M, 1995. Inhibition of Several Strains of Influenza Virus in Vitro and Reduction of Symptoms by an Elderberry Extract (*Sambucus nigra* L.) During an Outbreak of Influenza B Panama. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 1 (4): 361-369.
- Zakay-Rones Z, Thom E, Wollan T, Wadstein J, 2004. Randomized Study of The Efficacy and Safety of Oral Elderberry Extract in The Treatment of Influenza A and B Virus Infections. *Journal of International Medical Research*, 32 (2): 132-140.



**Atf İçin:** Çevik M, 2021. Gezo Pekmezinin Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1154-1164.

**To Cite:** Çevik M, 2021. Determination of Rheological Properties of Gezo Pekmezi (Molasses). Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1154-1164.

## Gezo Pekmezinin Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Mutlu ÇEVİK<sup>1\*</sup>

**ÖZET:** Bu çalışmada, farklı ölçüm sıcaklığı değerlerinde gezo pekmezi örneklerinin reolojik özelliklerindeki değişim incelenmiş ve farklı reolojik modellere uygunlukları test edilmiştir. Ek olarak, pekmez örneklerinin farklı frekans değerlerinde viskoelastik özelliklerindeki değişim belirlenmiştir. Ölçüm alınan tüm sıcaklık değerlerinde pekmez örneklerinin reolojik davranışını en iyi ifade eden modelin Üssel Model olduğu tespit edilmiştir. K ve n değerlerinin sıcaklık değerlerinin artmasına bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Faz açısı değerlerinin 1'den büyük olması nedeniyle akışkanlık karakterinin elastiklik karakterine kıyasla daha baskın olduğu belirlenmiştir. Başka bir deyişle, pekmez örneklerinin viskoelastik özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma gezo pekmezi örneklerinin reolojik özelliklerindeki değişimlerin belirlenmesi konusunda literatürdeki gerekli bilgi eksikliğini gidereceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Gezo pekmezi, reoloji, model, viskoelastik, frekans

### Determination of Rheological Properties of Gezo Pekmezi (Molasses)

**ABSTRACT:** In this study, the changes in the rheological properties of Gezo pekmez (molasses) samples at different temperature values and their suitability for different rheologic models were investigated. In addition, changes in viscoelastic properties of pekmez (molasses) samples at different frequency values were determined. It was determined that the best model describing the rheological behavior of molasses samples at all temperature values was the Power-Law Model. It was detected that K and n values decreased as the temperature values increased. Since phase angle values were greater than 1, it was determined that the fluidity character was more dominant than elasticity character. In other words, molasses samples were found to have viscoelastic properties. It is thought that the result of present study fulfill the lack of information on determining the changes in the rheological properties of the molasses samples.

**Keywords:** Gezo pekmezi (molasses), rheology, model, viscoelastic, frequency

<sup>1</sup>Mutlu ÇEVİK ([Orcid ID: 0000-0003-4847-4910](https://orcid.org/0000-0003-4847-4910)), Munzur Üniversitesi, Güzel Sanatlar, Tasarım ve Mimarlık Fakültesi, Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü, Tunceli, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mutlu ÇEVİK, e-mail: mutlucevik3538@hotmail.com

## GİRİŞ

Pekmez, Türkiye'nin geleneksel gıda maddelerinden bir tanesidir. Genellikle şeker veya farklı bir katkı maddesi ilave edilmeden şeker içeriği bakımından zengin olan üzüm ve dut gibi meyve sularının %70-80 Suda çözünür kuru maddesi (SÇKM) içeriğine kadar konsantre edilmesi ile üretilen geleneksel bir üründür (Batu, 2005; Sengül et al., 2005; Yoğurtçu and Kamışlı, 2006; Akbulut and Bilgiçli, 2010; Kamışlı and Mohammed, 2019). Karbonhidrat, organik asitler, mineral maddeler ve vitaminler bakımından zengin bir gıda maddesi olan pekmez, aynı zamanda sahip olduğu yüksek miktarda şeker içeriğinden dolayı da zengin karbonhidrat ve enerji kaynağı olarak da bilinmektedir (Sengül et al., 2005; Akbulut and Bilgiçli, 2010; Ekin ve Çelikezen, 2015).

Pekmez üretim yöntemleri, pekmez üretiminde kullanılan meyvelerin cinsine bağlı olarak değişiklikler gösterebilmektedir. Pekmez ülkemizde genellikle kullanılan meyvelerden elde edilen şıranın açık veya vakumlu kazanlarda hedef %SÇKM içeriğine kadar kaynatılarak elde edilen bir üründür (Batu, 1993; Karataş ve Şengül, 2018).

Gezo pekmezi, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde bulunan meşe ağaçlarının yaprakları üzerinde bulunan tatlı, renksiz ve yapışkan bir yapıya sahip şıradan elde edilmektedir. Bu bölgede yaşayan halk tarafından Gezo pekmezinin şifa kaynağı olduğuna inanılmaktadır. Ayrıca yöre halkı tarafından Gezo pekmezi Kudret Helvası olarak da adlandırılmaktadır (Vecel, 2009). Yapılan literatür taramasında Gezo pekmezinin hammaddesi olan gezonun oluşumu konusunda sınırlı sayıda çalışmanın bulunduğu tespit edilmiştir (Tozer, 1881; Vecel, 2009). Bahsi geçen bir çalışmada (Tozer, 1881), Arabistan tarafından gelen rüzgarların sahip olduğu aromatik içeriğin gezonun kaynağı olduğuna yöre halkı tarafından inanıldığı bildirilmektedir. Diğer bir çalışmada (Vecel, 2009) ise, gezonun oluşumuna bu bölgede yaygın bir bitki örtüsüne sahip olan meşe ağaçları yapraklarında bulunan bir yaprak bitinin neden olduğu rapor edilmiştir. Günümüzde ise yöre halkı tarafından 5, 10, 15 veya 20 yılda bir gerçekleşen hava olayları sonucunda oluştuğu, aşırı yağmur ve sıcaklıklar da ise miktarlarının azaldığı bildirilmiştir (Vecel, 2009). Bu sebeple Gezo pekmezi üretimi her yıl düzenli olarak yapılamamakta ve elde edilen pekmezler üretildikten sonra depolanarak uzun süre kullanılmaktadır. Gezo pekmezi diğer pekmez türlerinden ayıran en önemli özellik ise herhangi bir meyve ya da sebzedden üretilmemesidir.

Geleneksel yöntemler kullanılarak üretilen gıda maddelerinin fiziksel özelliklerinin belirlenmesi, endüstriyel boyutta ekipmanların tasarımı ve endüstriyel boyutta ürün üretiminin gerçekleştirilebilmesi için son derece önem arz etmektedir. Kullanılan bu fiziksel özelliklerden bir tanesi de gıda maddelerinin reolojik özelliklerinin tespit edilmesidir. Reoloji, gıda maddelerinin akış ve deformasyon özelliklerinin incelendiği bir bilim dalıdır. Sıvı bir yapıya sahip gıda maddelerinin sınıflandırılmasında kayma hızına karşı elde edilen kayma gerilimi değerlerindeki değişime bağlı olarak Newtonian ve Non-Newtonian tipi akışkan olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar (Steffe, 1996). Ek olarak, belirli bir kayma hızı veya frekans değerinde oluşan deformasyon derecesi ise gıda maddelerinin viskoelastik özellikleri hakkında bilgiler vermektedir. Gıda maddelerinin reolojik özelliklerinin belirlenmesi üretim esnasında uygulanan karıştırma, pompalama ve proses kontrolü gibi parametrelerinin belirlenmesinde son derece önem arz etmektedir (Steffe, 1996; Krokida et al., 2001). Literatürde farklı meyvelerden (üzüm pekmezi, beyaz dut pekmezi, siyah dut pekmezi, kuşburnu pekmezi, harnup pekmezi vb.) üretilen pekmez örneklerinin reolojik özelliklerindeki değişimin incelendiği çalışmalar araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Sengül et al., 2005;2007; Yoğurtçu and Kamışlı, 2006; Akbulut and Bilgiçli, 2010; Kamışlı and Mohammed, 2019). Rapor edilen çalışmalarda pekmez örneklerinin Non-Newtonian tipi akışkan özelliği gösterdiği bildirilmiştir. Pekmez örneklerinin farklı sıcaklık değerlerindeki akış tipinin belirlenebilmesi amacıyla reolojik modeller ile uyumluluğu test edilmiş ve en uygun reolojik modelin Üssel model olduğu

birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Sengül et al., 2005; Yoğurtçu and Kamışlı, 2006; Kamışlı and Mohammed, 2019). Ancak literatürde Gezo pekmezinin farklı ölçüm sıcaklığı değerlerinde reolojik davranışlarının incelendiği herhangi bir çalışmaya araştırmacıların bilgisi dahilinde rastlanılmamıştır.

Bu çalışmanın temel amacı, Gezo pekmezi örneklerinin farklı sabit ölçüm sıcaklığı (10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 °C) değerlerindeki reolojik özelliklerindeki değişimlerinin belirlenmesidir. Ek olarak, pekmez örneklerinin viskoelastik özellikleri salınım (osilasyon) testlerinden olan gerilim ve frekans tarama testleri kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Yapılan bu çalışma ile bu konuda literatürdeki önemli bir eksikliğin doldurulacağı düşünülmektedir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Bu çalışmada kullanılan Gezo pekmezi (%67.8±0.5 SÇKM) yerel bir üreticiden (Midyat, Mardin) temin edilmiştir. Analiz işlemine kadar ağzı kapalı bir şekilde 25 ± 1 °C ortam sıcaklığında bekletilmiştir.

Meşe dallarının yaprakları üzerinde bulunan tatlı, renksiz ve yapışkan şıranın alınabilmesi için, meşe dalları su doldurulmuş büyük kazanlar içerisinde yıkama işlemine tabii tutulmaktadır. Böylelikle su içerisinde bekletilen gezo yıkama suyuna geçmekte ve şerbet halini almaktadır. Daha sonra ise meşe dalları ile suya geçen toprak ve diğer istenmeyen maddelerin çöktürülerek, uzaklaştırılabilmesi için 2-3 saat beklenilmektedir. Çöken kısmın ayrılabilmesi için üst kısım başka bir kazana alınmaktadır. Daha sonra alınan üst kısmın rengi koyulaşmaya kadar kaynatılmaktadır. Bu işlem sırasında kazan sürekli olarak karıştırılmaktadır. Kaynatılarak kıvam alan karışım 2-3 saat daha bekletilmektedir. Bekleme işlemi sonunda akışkan üst kısım başka bir kazana alınarak birkaç saat daha pekmez kıvamını alana kadar kaynatma işlemine devam edilir. Daha sonra soğumaya bırakılır ve soğuma işlemi sonunda ambalajlanarak depolama işlemine alınmaktadır. Gezo pekmezinin geleneksel üretim aşaması boyunca pekmez toprağı da dahil olmak üzere hiçbir koruyucu ve katkı maddesi ilave edilmeden üretimi yapılmaktadır (Ekin, 2015).

### Suda Çözünür Kuru Madde (SÇKM) Tayini

Gezo pekmezi örneklerinin suda çözünür kuru madde içerikleri, sıcaklık düzeltilmesine sahip dijital refraktometre (Hanna, Portekiz) kullanılarak belirlenmiş ve % SÇKM olarak ifade edilmiştir.

### Reolojik Ölçümler

Gezo pekmezinin reolojik özellikleri Anton Paar MCR 301 (Anton Paar GmbH, Graz, Austria) reometre ile konik plaka aparatı (50 mm çapında ve 2° açısında) ve eş merkezli silindirik ölçüm aparatı (iç silindirin çapı 26.663 mm ve dış silindirin çapı 28.910 mm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

$$\tau = \eta * \dot{\gamma} \quad (1)$$

$$\tau = K * \dot{\gamma}^n \quad (2)$$

$$\tau - \tau_0 = K * \dot{\gamma} \quad (3)$$

$$\tau - \tau_0 = K * \dot{\gamma}^n \quad (4)$$

Reolojik ölçümler paslanmaz çelik konik plaka ölçüm aparatı kullanılarak 0.1-100 s<sup>-1</sup> kayma hızı değerleri arasında 10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 °C sabit ölçüm sıcaklığı değerlerinde gerçekleştirilmiştir. Kayma hızı ve kayma gerilimi değerleri ölçülmüş, farklı sıcaklık değerlerindeki akış tipinin belirlenmesi amacıyla farklı reolojik modellerin (Newton, Üssel, Bingham, Herschel-Bulkley) deneysel verilere uygunluğu istatistiksel olarak belirlenmiştir (Eşitlik 1-4) (Cevik et al., 2016).

Burada kullanılan  $\tau$  kayma gerilimi değerini (Pa),  $\tau_0$  değeri başlangıç kayma gerilimini (Pa),  $\dot{\gamma}$  kayma hızı değerini (s<sup>-1</sup>),  $K$  kıvam katsayısı (Pa.s<sup>n</sup>),  $\eta$  viskozite değerini (Pa.s) ve  $n$  ise akış davranış indeksini (birimsiz) ifade etmektedir.

Görünür viskozite değerlerinin sıcaklığa bağlı değişimi sıcaklık tarama (temperature sweep) testi uygulanarak belirlenmiştir. Bu test ağızda kesme hızı olarak kabul edilen 50 s<sup>-1</sup> kayma hızı değerinde gerçekleştirilmiştir (Morell et al., 2014).

Sıcaklık tarama (temperature sweep) testi ise 10 °C'den 70 °C'ye kadar dakikada 1 °C sıcaklık artışı sağlanarak gerçekleştirilmiştir. Pekmez örnekleri reometrenin önceden 10°C sıcaklığa soğutulmuş eş merkezli silindirik ölçüm aparatına (iç silindirin çapı 26.663 mm ve dış silindirin çapı 28.910 mm) yüklenilmiş ve sıcaklık değerinin dengelenmesi amacıyla 5 dak. beklenilmiştir. Sıcaklık artışına bağlı olarak örnek kaybını önlemek için ölçüm aparatının ağız kısmı aparata ait kapak ile kapatılmıştır. Elde edilen veriler, örneklerin sıcaklık ve 50 s<sup>-1</sup> arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla Arrhenius denkleminde yerleştirilmiştir (Cevik et al., 2016; Eşitlik 5).

$$\eta_{50} = A_0 \exp ( E_a / RT ) \quad (5)$$

Burada kullanılan  $A_0$  Arrhenius sabitini (Pa.s<sup>n</sup>),  $E_a$  aktivasyon enerjisini (kJ mol<sup>-1</sup>),  $T$  sıcaklığı (Kelvin, K) and  $R$  universal gaz sabitini (kJ kg<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup>) ifade etmektedir.

Pekmez örneklerinin viskoelastik özellikleri ise paslanmaz çelik konik plaka ölçüm aparatı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dinamik testlerden osilasyon (gerilim ve frekans tarama) testleri konik plaka ve plaka konfigürasyonu (çapı 50 mm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Konik plaka ve plaka arasındaki boşluk 0.212 mm ve konik plaka açısı ise 2°'dir. Osilasyon testlerinde, 0.01-10 Pa aralığında 1 Hz sabit frekans değerinde osilasyon gerilim-tarama (stress-sweep) testleri yapılarak öncelikle lineer viskoelastik bölge (LVR) tespit edilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda tüm işlem koşullarında 1 Pa değeri sabit gerilim değeri olarak seçilmiştir. Ardından belirlenen 1 Pa sabit gerilim değerinde 25°C sabit ölçüm sıcaklığında 0.5-10 Hz frekans aralığında frekans tarama (frequency-sweep) testleri gerçekleştirilmiştir. Artan frekans değerine karşılık deformasyon eğrileri elde edilmiştir. Elastik modülüs ( $G'$ ) (Eşitlik 6), akışkanlık modülüsü ( $G''$ ) (Eşitlik 7), kompleks modülüs ( $G^*$ ) (Eşitlik 8), faz açısı ( $\tan \delta$ ) (Eşitlik 9) ve kompleks viskozite özellikleri cihazın yazılımı kullanılarak elde edilmiştir (Cevik and Icier, 2020).

$$G' = (\sigma_0 / \gamma_0) \times \cos \delta \quad (6)$$

$$G'' = (\sigma_0 / \gamma_0) \times \sin \delta \quad (7)$$

$$G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad (8)$$

$$\tan \delta = G'' / G' \quad (9)$$

### İstatistiksel Değerlendirme

Farklı işlem koşullarında (10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70°C) ölçüm alınan pekmez örneklerinin reolojik özellikleri üzerine etkileri SPSS 14.0 paket programı (IBM, USA) kullanılarak ANOVA ve

DUNCAN testleri ile belirlenmiştir. Güven seviyesi %95 olarak alınmıştır. Deneysel kayma gerilimi değerlerinin farklı reolojik modeller ile uyumluluğu doğrusal olmayan regresyon analizi kullanılarak test edilmiştir. Farklı işlem koşullarında incelenen her bir reolojik model için ilgili eşitlikler (hata kareleri ortalaması karekökü (HKOK), ki-kare ( $\chi^2$ ) ve  $R^2$  değerleri) MATLAB paket programı kullanılarak hesaplanmıştır. Yapılan değerlendirme sonucunda en uygun reolojik modelin değerlendirilmesinde en küçük hata kareleri ortalaması karekökü (HKOK) (Eşitlik 10) ve ki-kare ( $\chi^2$ ) (Eşitlik 11) değerleri ile en yüksek  $R^2$  değerleri (Eşitlik 12) dikkate alınmıştır (Cevik et al., 2016). Tüm denemeler 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

$$HKOK = \left[ \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n (TD_i - DD_i)^2 \right]^{0.5} \quad (10)$$

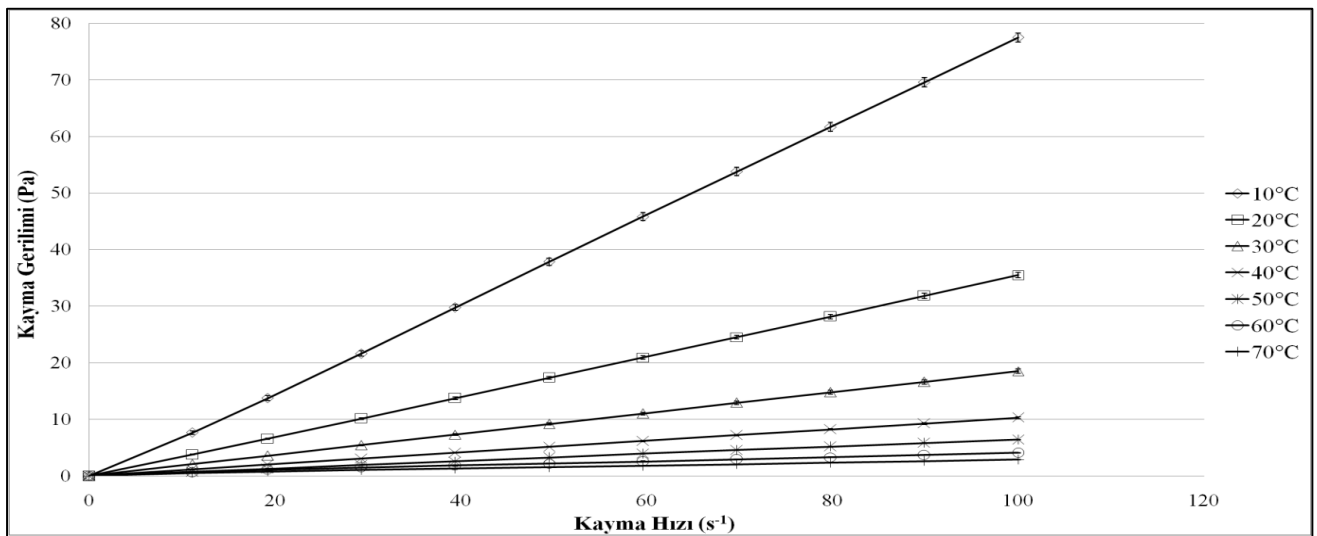
$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (TD_i - DD_i)^2}{N-n} \quad (11)$$

$$R^2 = \frac{N \sum_{i=1}^n TD_i DD_i - \sum_{i=1}^n TD_i \sum_{i=1}^n DD_i}{\sqrt{(N \sum_{i=1}^n TD_i^2 - (\sum_{i=1}^n TD_i)^2)(N \sum_{i=1}^n DD_i^2 - (\sum_{i=1}^n DD_i)^2)}} \quad (12)$$

TD teorik değer verisini, DD deneysel değer verisini, N gözlenen veri sayısını, n modeldeki katsayı sayısını ifade etmektedir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Farklı işlem koşulları kullanılarak reolojik ölçüm uygulanan pekmez örneklerinin deneysel kayma gerilimi-kayma hızı değişimleri Şekil 1’de verilmiştir. Yapılan değerlendirme sonucunda, aynı kayma hızı değerlerinde ölçüm alınan sıcaklık değerinin artmasına bağlı olarak kayma gerilimi değerlerinin azalma eğilimi gösterdiği tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Tüm kayma hızı değerlerinde, en yüksek kayma gerilimi değerlerinin  $10^\circ\text{C}$  sabit ölçüm sıcaklığında elde edildiği ve ölçüm alınan sabit sıcaklık değerinin artmasına bağlı olarak kayma gerilimi değerlerinin tüm kayma hızı değerlerinde azalma eğilimi gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 1). Beklenildiği gibi, ölçüm alınan sabit sıcaklık değerinin artmasına bağlı olarak pekmez örneklerinin viskozite değerlerinin azalma eğilimi gösterdiği ve buna bağlı olarak da kayma gerilimi değerlerinin azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 1. Farklı işlem koşullarında ölçüm alınan gezo pekmezi örneklerinin sıcaklığa bağlı olarak kayma gerilimi-kayma hızı değişimleri

Literatürde farklı pekmez örnekleri için yapılan çalışmalarda ölçüm alınan sıcaklık değerinin artmasına bağlı olarak örneklerinin viskozite değerlerinin azalma eğilimi gösterdiği ve buna bağlı olarak da kayma gerilimi değerlerinin azaldığı birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Sengül et al., 2005; 2007; Yoğurtçu and Kamışlı, 2006; Akbulut and Özcan, 2008). Literatürde rapor edilen çalışmalar incelendiğinde, farklı sıcaklık değerlerinde ölçüm alınan Gezo pekmezi örneklerinin reolojik özelliklerindeki değişimin incelendiği herhangi bir çalışmaya yazarların bilgisi dahilinde rastlanılmamıştır.

Farklı ölçüm sıcaklığı değerlerinin gezo pekmezinin reolojik özellikleri üzerine etkilerinin daha detaylı incelenbilmesi amacıyla farklı reolojik modellerin (Newton, Bingham, Üssel ve Herschel-Bulkley modeli) elde edilen deneysel kayma gerilimi (Pa) ve kayma hızı ( $s^{-1}$ ) değerlerine uyumluluğu doğrusal olmayan regresyon analizi yardımı ile incelenmiştir (Çizelge 1). Yapılan değerlendirme sonucunda, ölçüm alınan tüm sıcaklık değerleri için en yüksek  $R^2$  değerleri ve en küçük hata kareleri ortalaması karekökü (HKOK) ve ki-kare ( $\chi^2$ ) değerlerinin Üssel modelde tespit edildiği ve en uygun reolojik modelin Üssel model olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 1). Benzer şekilde, farklı suda çözünür kuru madde içeriğine sahip sorgum pekmezi örnekleri (%59.4, %66.5, %72.4 ve %75.1 SÇKM) ile yapılan bir çalışmada (Akbulut and Özcan, 2008), farklı sabit kayma hızı (5, 10, 20, 50 ve 100 rpm) değerlerinde ölçüm alınan pekmez örneklerinin reolojik özelliklerini en iyi karakterize eden reolojik modelin Üssel model olduğu bildirilmiştir. Yoğurtçu and Kamışlı (2006) ise farklı SÇKM içeriğine sahip üzüm pekmezi (%71.98, %74.22 ve %75.46 SÇKM) örneklerinin farklı kayma hızı ve farklı sıcaklık değerlerinde pekmez örneklerinin reolojik özelliklerindeki değişimini incelemiştir. Yaptıkları değerlendirme sonucunda ölçüm alınan tüm işlem koşullarında pekmez örneklerinin reolojik özelliklerini en iyi karakterize eden reolojik modelin Üssel model olduğunu rapor etmişlerdir. Sengül et al. (2005) yaptıkları çalışmada, 5 farklı sıcaklık değerinde (30, 40, 50, 60 ve 70 °C) ve 5 farklı kayma hızı değerinde (5, 10, 20, 50 ve 100 rpm) ölçüm aldıkları dut pekmezi örnekleri için en uygun modelin Üssel model olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde kefir, kıymız gibi geleneksel ürünlerimiz ile ilgili yapılan çalışmalarda da en uygun reolojik modelin Üssel model olduğu araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Sabancı et al. 2016; Gürel et al. 2021).

Farklı sıcaklık değerlerinde ölçüm alınan Gezo pekmezinin reolojik özelliklerinin zamandan bağımsız değişimlerini incelemek amacıyla Üssel modelin model sabitleri kullanılmıştır. Yapılan değerlendirme sonucunda Üssel modele ait kıvam katsayısı (K), akış davranış indeksi (n) ve regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerleri Çizelge 2'de verilmiştir. Ölçüm alınan sıcaklık değerinin artmasına bağlı olarak kıvam katsayısı değerlerinin azalma eğilimi gösterdiği tespit edilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde, farklı araştırmacılar tarafından da benzer sonuçların rapor edildiği görülmektedir (Bozkurt and Icier, 2009; Chin et al., 2009; Quek et al., 2013; Cevik et al., 2016). Düşük sıcaklık değerlerinde (10 ve 20°C) ölçüm alınan Gezo pekmezi örneklerinin n değerlerinin 1'in üzerinde olduğu ve Newton-dışı dilatant (kaymayla kalınlaşan) akış özelliği gösterdiği, sıcaklık değerinin (30, 40, 50, 60 ve 70 °C) artmasına bağlı olarak n değerlerinin 1'in altına düşerek Newton-dışı psödoplastik (kaymayla incelen) akış özelliği gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 2). Arrhenius ilişkisi, sıcaklığının gezo pekmezi örneklerinin kıvam katsayısı üzerine etkisini tanımlamak için kullanılmıştır. Yapılan değerlendirme sonucunda, pekmez örneklerinin Arrhenius sabitinin  $1.69 \times 10^{-9}$  Pa.s<sup>n</sup> olduğu, aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) değerinin ise 47.33 kJ mol<sup>-1</sup> olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 2).

**Çizelge 1.** Farklı sıcaklık değerlerinde ölçüm alınan gezo pekmezi örneklerinin deneysel kayma hızı-kayma gerilimi verilerinin reolojik modellere uygunluğunun istatistiksel değerlendirmesi

| Ölçüm sıcaklığı (°C) | İstatistiksel kriter | Modeller      |                |                      |                         |
|----------------------|----------------------|---------------|----------------|----------------------|-------------------------|
|                      |                      | Newton modeli | Bingham modeli | Üssel model          | Herschel-Bulkley modeli |
| 10                   | R <sup>2</sup>       | 0.999±0.001   | ND*            | <b>1.000±0.000</b>   | ND*                     |
|                      | HKOK                 | 0.494±0.109   | ND*            | <b>0.257±0.140</b>   | ND*                     |
|                      | χ <sup>2</sup>       | 0.255±0.111   | ND*            | <b>0.082±0.063</b>   | ND*                     |
| 20                   | R <sup>2</sup>       | 1.000±0.000   | ND*            | <b>1.000±0.000</b>   | 1.000±0.000             |
|                      | HKOK                 | 0.142±0.013   | ND*            | <b>0.056±0.018</b>   | 0.036±0.009             |
|                      | χ <sup>2</sup>       | 0.021±0.004   | ND*            | <b>0.004±0.002</b>   | 0.014±0.001             |
| 30                   | R <sup>2</sup>       | 1.000±0.000   | 1.000±0.000    | <b>1.000±0.000</b>   | 1.000±0.000             |
|                      | HKOK                 | 0.029±0.002   | 0.028±0.002    | <b>0.037±0.011</b>   | 0.024±0.005             |
|                      | χ <sup>2</sup>       | 0.0009±0.0001 | 0.0008±0.0001  | <b>0.0015±0.0009</b> | 0.0007±0.0003           |
| 40                   | R <sup>2</sup>       | 1.000±0.000   | 1.000±0.000    | <b>1.000±0.000</b>   | ND*                     |
|                      | HKOK                 | 0.033±0.004   | 0.023±0.009    | <b>0.014±0.010</b>   | ND*                     |
|                      | χ <sup>2</sup>       | 0.0011±0.0003 | 0.0006±0.0004  | <b>0.0003±0.0004</b> | ND*                     |
| 50                   | R <sup>2</sup>       | 0.999±0.001   | 1.000±0.000    | <b>1.000±0.000</b>   | ND*                     |
|                      | HKOK                 | 0.042±0.006   | 0.038±0.001    | <b>0.036±0.008</b>   | ND*                     |
|                      | χ <sup>2</sup>       | 0.0018±0.0006 | 0.0015±0.0001  | <b>0.0014±0.0006</b> | ND*                     |
| 60                   | R <sup>2</sup>       | 0.978±0.009   | 0.996±0.002    | <b>0.998±0.001</b>   | ND*                     |
|                      | HKOK                 | 0.162±0.033   | 0.074±0.013    | <b>0.049±0.015</b>   | ND*                     |
|                      | χ <sup>2</sup>       | 0.027±0.011   | 0.006±0.002    | <b>0.003±0.0015</b>  | ND*                     |
| 70                   | R <sup>2</sup>       | 0.975±0.010   | 0.997±0.002    | <b>0.997±0.001</b>   | 0.998±0.001             |
|                      | HKOK                 | 0.119±0.022   | 0.042±0.009    | <b>0.045±0.006</b>   | 0.345±0.008             |
|                      | χ <sup>2</sup>       | 0.015±0.005   | 0.0019±0.0008  | <b>0.0022±0.0005</b> | 0.0013±0.0006           |

ND\*: Belirlenmemiştir.

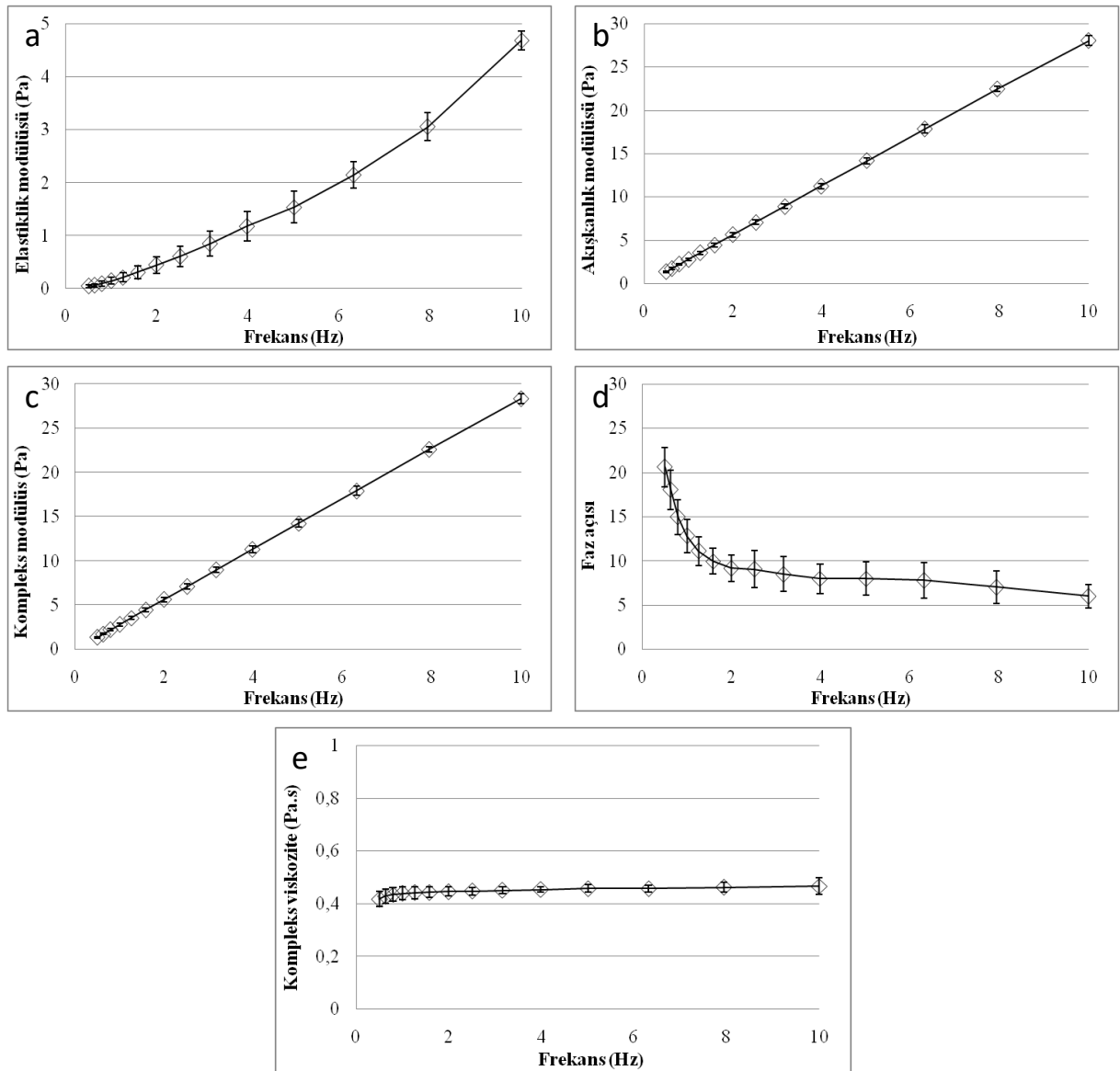
**Çizelge 2.** Farklı sıcaklık değerinde ölçüm alınan gezo pekmezinin Üssel model sabitleri ve kıvam katsayısı değerlerinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi

| Ölçüm sıcaklığı (°C) | K (Pa.s <sup>n</sup> ) | n           | R <sup>2</sup> | A <sub>0</sub> (Pa.s <sup>n</sup> )               | E <sub>a</sub> (kJ mol <sup>-1</sup> ) |
|----------------------|------------------------|-------------|----------------|---|--|
| 10                   | 0.665±0.032            | 1.034±0.009 | 1.000±0.000    | 1.69×10 <sup>-9</sup> ±<br>6.50×10 <sup>-10</sup> | 47.33 ± 0.96                           |
| 20                   | 0.323±0.008            | 1.020±0.002 | 1.000±0.000    |   |  |
| 30                   | 0.189±0.004            | 0.995±0.001 | 1.000±0.000    |   |  |
| 40                   | 0.109±0.002            | 0.988±0.001 | 1.000±0.000    |   |  |
| 50                   | 0.070±0.003            | 0.984±0.009 | 1.000±0.000    |   |  |
| 60                   | 0.082±0.011            | 0.828±0.037 | 0.998±0.001    |   |  |
| 70                   | 0.065±0.009            | 0.821±0.033 | 0.997±0.001    |   |  |

K: Kıvam katsayısı (Pa.s<sup>n</sup>), n: akış davranış indeksi (birimsiz), A<sub>0</sub>: Arrhenius sabiti (Pa.s<sup>n</sup>), E<sub>a</sub>: Aktivasyon enerjisi (kJ mol<sup>-1</sup>)

Modülüs, uygulanan gerilime karşı oluşan deformasyonun veya deformasyon hızının oranıdır. Viskoelastik gıdalar için elastiklik modülüsü katılık karakterini, akışkanlık modülüsü ise akışkanlık karakterini ifade etmektedir (Steffe, 1996; Ehrenstein et al., 2004; Anonim, 2013). Elastiklik modülüsü, malzemenin elastik enerjiyi depolama kabiliyetidir. Akışkanlık modülüsü ise, kaybolan enerjiyi ifade eder ve viskozite ile ilişkilidir. Elastiklik modülüsündeki artış, katılık özelliğindeki artış anlamına gelmektedir. Akışkanlık modülüsündeki artış ise, akışa karşı gösterilen dirençteki artış, başka bir deyişle kıvamın artması anlamına gelmektedir (Steffe, 1996; Anonim, 1997). Tan delta değeri, akışkanlık modülüsünün elastiklik modülüsüne oranıdır ve malzemeye uygulanan enerjinin malzeme içindeki kaybını (depolanamamasını) ifade etmektedir (Ehrenstein et al., 2004; Anonim, 2013). Elastik karakterinin olmadığı, akışkanlık karakterinin oldukça kuvvetli olduğu durumlar için tan delta değeri

1'in üzerinde bir değere sahip olmaktadır. Tan delta değerinin artması akışkanlık karakterinin artması anlamına gelmektedir. Akışkanlık modülüsünün elastikite modülüsüne göre daha yüksek olması durumunda 1'in üstünde, tersi durumunda ise 1'in altında değerler almaktadır. Kompleks modülüs ise hem akışkanlık hem de katılık karakterinin fonksiyonu olan gıdanın genel olarak sertlik/dayanıklılık/rijiditesini ifade eden viskoelastik karakter büyüklüğüdür (Steffe, 1996; Anonim, 1997). Elastikite modülüsü ve/veya akışkanlık modülüsündeki herhangi bir artış kompleks modülüsün de artışına neden olmaktadır. Kompleks viskozite değeri gıdanın akışkanlık modülüsünün etkisi dışında elastikiteinden kaynaklanan direncin etkisini de dikkate alarak akışa karşı gösterdiği direnci ifade etmektedir (Steffe, 1996; Ehrenstein et al., 2004; Anonim, 2013).



**Şekil 2.** Gezo pekmezi örneklerinin frekans değerine bağlı olarak viskoelastik özelliklerindeki değişimleri;

**a)** Elastikite modülüsü; **b)** Akışkanlık modülüsü; **c)** Kompleks modülüsü; **d)** Faz açısı (Tan Delta); **e)** Kompleks viskozite

Gezo pekmezi örneklerinin 1 Pa sabit gerilim değerinde 25°C sabit ölçüm sıcaklığında 0.5-10 Hz frekans aralığında viskoelastik özelliklerindeki (elastikite modülüsü, akışkanlık modülüsü, kompleks modülüs, faz açısı (tan  $\delta$ ) ve kompleks viskozite) değişim Şekil 2'de verilmiştir. Yapılan genel



değerlendirme sonucunda Gezo pekmezi örneklerinin elastiklik modülüsü ve akışkanlık modülüsü değerlerinin 0'dan farklı olduğu ve ölçülebildiği tespit edilmiştir. Başka bir deyişle, pekmez örneklerinin viskoelastik özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen faz açısı ( $\tan \delta$ ) değerleri incelendiğinde, faz açısı değerlerinin 1'den büyük olduğu tespit edilmiştir. Bu durum pekmez örneklerinin akışkanlık karakterinin elastiklik karakterine kıyasla daha baskın olduğunu ortaya koymaktadır.

İncelenen viskoelastik özelliklerin farklı frekanslarda değişebileceği belirtilmekte, bu nedenle de frekans-tarama testi de uygulanarak da frekansa göre değişimlerin incelenmesi önerilmektedir (Ehrenstein et al., 2004; Anonim, 2013). Bu çalışmada da pekmez örneklerinin uygulanan frekans değerine bağlı olarak viskoelastik özelliklerindeki değişim incelenmiştir (Şekil 2). Yapılan değerlendirme sonucunda, uygulanan frekans değerinin artmasına bağlı olarak gezo pekmezi örneklerinin elastiklik modülüsü, akışkanlık modülüsü, kompleks modülüs ve kompleks viskozite değerlerinin artış gösterdiği tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Ancak uygulanan frekans değerinin artmasına bağlı olarak faz açısı değerlerinin azalma eğilimi gösterdiği tespit edilmiştir. Literatürde farklı ürün gruplarında üretilen pekmez örneklerinin viskoelastik özelliklerinin incelendiği herhangi bir çalışmaya araştırmacıların bilgisi dahilinde rastlanılmadığı için elde edilen sonuçlar literatür ile karşılaştırılmamaktadır. Bu sebeple elde edilen verilerin, gezo pekmezi örneklerinin mekanik uygulama koşullarındaki davranışlarını incelemek ve viskoelastik karakterlerinin değişimini belirlemek açısından literatüre değerli katkılar sunacağı düşünülmektedir.

## SONUÇ

Bu çalışmada, Gezo pekmezi örneklerinin farklı sabit ölçüm sıcaklığı değerlerinde reolojik özelliklerindeki değişimin incelenmesi amaçlanmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda farklı sıcaklık (10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 °C) değerlerinde ölçüm alınan pekmez örnekleri için en uygun reolojik modelin Üssel model olduğu tespit edilmiştir. Ölçüm alınan sıcaklık değerinin artmasına bağlı olarak pekmez örneklerinin K değerlerinin azalma eğilimi gösterdiği ve en düşük K değerlerinin 70 °C ölçüm sıcaklığında elde edildiği tespit edilmiştir. Ek olarak, düşük sıcaklık değerlerinde n değerlerinin 1'in üzerinde olduğu ve sıcaklık değerinin artmasına bağlı olarak n değerlerinin azalma eğilimi gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan frekans tarama testleri sonucunda gezo pekmezi örneklerinin akışkanlık modülüsünün elastik modülüsüne kıyasla çok daha yüksek değerlere sahip olduğu, başka bir deyişle viskoelastik özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmanın araştırmacıların bilgisi dahilinde literatürde eksikliği bulunan gezo pekmezi örneklerinin reolojik özelliklerindeki değişimlerin belirlenmesi konusunda gerekli bilgi eksikliğini dolduracağı düşünülmektedir.

## Çıkar Çatışması

Makaleye ait çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve makalenin yazılması aşamalarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederim.

## Yazar Katkısı

Makalenin planlanması, yürütülmesi ve yazılması makale tek yazarı olarak tarafımda yapıldığı beyan ederim.

## KAYNAKLAR

Akbulut M, Özcan MM, 2008. Some physical, chemical, and rheological properties of sweet sorghum (Sorghum Bicolor (L) Moench) Pekmez (Molasses). International Journal of Food Properties, 11(1): 79-91.

- Akbulut M, Bilgicli N, 2010. Effects of different pekmez (fruit molasses) types used as a natural sugar source on the batter rheology and physical properties of cakes. *Journal of Food Process Engineering*, 33(2): 272-286.
- Anonim, 1997. *Dynamic Mechanical Analysis of Polymers Reprinted from American Laboratory*. TA Instruments, TA236.
- Anonim, 2013. *Dynamic Mechanical Analysis, A Beginner's Guide, User Booklet*. PerkinElmer, USA.
- Batu A, 1993. Kuru Üzüm ve Pekmezin İnsan Sağlığı ve Beslenmesi Açısından Önemi. *Gıda*, 18 (5): 303- 307.
- Batu A, 2005. Production of Liquid and White Solid Pekmez in Turkey. *Journal of Food Quality*, 28: 417-427.
- Bozkurt H, İcier F, 2009. Rheological characteristics of quince nectar during ohmic heating. *International Journal of Food Properties*, 12: 844-859.
- Cevik M, Tezcan D, Sabancı S, İcier, F, 2016. Changes in Rheological Properties of Koruk (Unripe Grape) Juice Concentrates During Vacuum Evaporation. *Akademik Gıda*, 14(4): 322-332.
- Cevik M, İcier F, 2020. Characterization of viscoelastic properties of minced beef meat thawed by ohmic and conventional methods. *Food Science and Technology International*, 26(4), 277–290.
- Chin NL, Chan SM, Yusof YA, Chuah TG, Talib RA, 2009. Modelling of rheological behaviour of pummelo juice concentrates using master-curve. *Journal of Food Engineering*, 93(2):134–140.
- Ehrenstein GW, Riedel G, Trawiel P, 2004. *Thermal Analysis of Plastics: theory and practice* München: Carl Hanser: Cincinnati: Hanser Gardner Publications.
- Ekin İ, 2015. Bitlis İlinde Geleneksel Olarak Üretilen Gezo Pekmezinin Bazı Kimyasal Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitlis.
- Ekin İ, Çelikezen FÇ, 2015. Bitlis İlinde Geleneksel Olarak Üretilen Gezo Pekmezinin Bazı Kimyasal Özelliklerinin İncelenmesi. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 4(2); 138-149.
- Gürel DB, İldız M, Sabancı S, Koca N, Çağındı Ö, İçier, F, 2021. İnek ve Keçi Sütleri Kullanımının Kefirin Antioksidan, Reolojik ve Duyusal Özellikleri Üzerine Etkisi. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science Technolog*, 9(1): 7-14.
- Kamışlı F, Mohammed DA, 2019. Determination of Rheological Behavior of Some Molasses-Sesame Blends. *Turkish Journal of Science & Technology*, 14(1), 23-32.
- Karataş N, Şengül M, 2018. Dut Pekmezinin Bazı Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri ile Antioksidan Aktivitesi Üzerine Depolamanın Etkisi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 5(1): 34–43.
- Krokida MK, Maroulis ZB, Saravacos GD, 2001. Rheological properties of fluid fruit and vegetable puree products: Compilation of literature data. *International Journal of Food Properties*, 4(2): 179-200.
- Morell P, Fiszman SM, Varela P, Hernando I, 2014. Hydrocolloids for enhancing satiety: Relating oral digestion to rheology, structure and sensory perception. *Food Hydrocolloids*, 41: 343-353.
- Sabancı S, Çokgezme ÖF, Tezcan D, Çevik M, İçier F. 2016. Effects of Temperature on Time Dependent Rheological Characteristics of Koumiss. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science Technolog*, 4(4): 262-266.
- Sengül M, Ertugay MF, Sengül M, 2005. Rheological, physical and chemical characteristics of mulberry pekmez. *Food Control*, 16(1): 73-76.
- Sengül M, Ertugay FM, Sengül M, Yüksel Y, 2007. Rheological characteristics of carob pekmez. *International Journal of Food Properties*, 10(1): 39-46.
- Steffe JF, 1996. *Rheological Methods in Food Process Engineering*. New York: Freeman Press.

- Quek MC, Chin NL, Yusof YA, 2013. Modelling of rheological behaviour of soursop juice concentrates using shear rate–temperature–concentration superposition. *Journal of Food Engineering*, 118: 380–386.
- Tozer HF, 1881. *Turkish Armenia and Eastern Asia-Minor*, Longmans Grenn and Co., London
- Vecel C, 2009. Kudret Helvası Pekmezi. I. Uluslararası Doğu Anadolu Bölgesi Geleneksel Mutfak Kültürü ve Yemekleri Sempozyumu, 24-26 Haziran, Bitlis.
- Yogurtcu H, Kamisli F, 2006. Determination of rheological properties of some pekmez samples in Turkey. *Journal of Food Engineering*, 77(4): 1064-1068.

**Atf İçin:** Aydar AY, Yılmaz T, Mataracı CE, Sağlam TB, 2021. Gıdaların Kurutulmasında Ultrason Ön İşleminin Kullanımı. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1165-1175.

**To Cite:** Aydar AY, Yılmaz T, Mataracı CE, Sağlam TB, 2021. Utilization of Ultrasound Pretreatment on Drying of Foods, Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1165-1175.

## Gıdaların Kurutulmasında Ultrason Ön İşleminin Kullanımı

Alev Yüksel AYDAR<sup>1\*</sup>, Tuncay YILMAZ<sup>1</sup>, Ceren Evrim MATARACI<sup>1</sup>, Tuba Büşra SAĞLAM<sup>1</sup>

**ÖZET:** Kurutma, gıda endüstrisinde uzun raf ömrüne sahip gıda ürünleri üretmek ve depolamak için yaygın olarak uygulanan bir işlemdir. Ancak, kurutma işlemi son ürünün kalite özelliklerinde istenmeyen sonuçlara sebep olabileceğinden, gıdaların kalite özelliklerini koruyacak veya en az düzeyde azaltacak ultrason gibi ön işlemler kurutma öncesi uygulanmaktadır. Termal olmayan gıda işleme teknolojisi olarak kabul edilen ultrason (sonikasyon), geleneksel ısıl işleme kıyasla düşük enerji kullanımı, gıdalarda tazeliği koruma, yüksek duyusal kabul edilebilirliği ve besin içeriğini iyileştirme gibi özellikleriyle son yıllarda önemli ölçüde dikkat çekmiştir. Bu derlemede ultrasonun zeytin, yer elması, elma, sarımsak, kavun gibi meyve ve sebzelerin kurutulması öncesinde uygulanmasının fiziksel ve kimyasal parametreleri, renk değişimi, reolojik davranışı, biyoaktif bileşikleri ve duyusal özellikleri üzerindeki etkisi özetlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kurutma kinetiği, ultrason, ön işlem, kalite özellikleri

## Utilization of Ultrasound Pretreatment on Drying of Foods

**ABSTRACT:** Drying is a common process in the food industry to produce and store food products with a long shelf life. Since the drying process can cause undesirable results in the quality characteristics of the final product, pretreatments such as ultrasound, which preserve or decrease the quality properties of foods minimally, are applied before drying. Ultrasound (sonication), which is considered as non-thermal food processing technology, has gained considerable attention in recent years with its features such as low energy usage, preserving freshness in foods, high sensory acceptability and improving nutrient content. In this review, the effect of applying ultrasound before drying fruits and vegetables such as olives, Jerusalem artichoke, apples, garlic, melons, on physical and chemical parameters, color change, rheological behavior, bioactive compounds and sensory properties are summarized.

**Keywords:** Drying kinetics, ultrasound, pretreatment, quality parameters

<sup>1</sup> Alev Yüksel AYDAR ([Orcid ID: 0000-0001-9780-0917](https://orcid.org/0000-0001-9780-0917)), Tuncay YILMAZ ([Orcid ID: 0000-0001-8756-2724](https://orcid.org/0000-0001-8756-2724)), Ceren Evrim MATARACI ([Orcid ID: 0000-0003-1117-9643](https://orcid.org/0000-0003-1117-9643)), Tuba Büşra SAĞLAM ([Orcid ID: 0000-0002-3669-5137](https://orcid.org/0000-0002-3669-5137)) Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Manisa, Türkiye

\* Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Alev Yüksel AYDAR, e-mail: alevyuksele.aydar@cbu.edu.tr

## GİRİŞ

Kurutma, gıda endüstrisinde daha uzun raf ömrüne sahip gıda ürünleri üretmek için eski ve yaygın olarak uygulanan bir işlemdir. Bir gıdanın içerdiği suyun önemli olan kısmını, buharlaştırarak uzaklaştırmak için kontrollü ısı uygulama suretiyle yapılan işlem olarak tanımlanan kurutmada temel amaç su aktivitesinin düşürülmesi ve gıdaların raf ömrünün uzatılmasıdır. Su aktivitesinin düşürülmesiyle birlikte mikroorganizma faaliyeti ve enzim aktivitesi de inhibe edilmektedir (Ahmed, 2013).

Gıda maddeleri üretildikleri andan itibaren, tüketime kadar geçen süre içerisinde, birçok enzimatik, mikrobiyolojik ve kimyasal olaylar sonucu hızla bozulma eğilimindedir. Bu oluşumda, yapılarında %98'lere kadar değişen oranlarda bulunan su en önemli rolü oynamaktadır. Kurutulmuş son üründe, hammaddenin ve son ürünün fiziksel özelliklerine, ambalajlama ve depolama şartlarına göre değişmekle birlikte, %3 ile %20 seviyelerinde su bulunabilmektedir. Gıdanın başlangıçta sahip olduğu yüksek miktardaki suyun bu seviyelere kadar azaltılabilmesi için farklı kurutma teknikleri uygulanmaktadır (Tekin, 2015).

Kurutma işleminde gıdadaki su, gıdanın bozulmasına olanak vermeyecek bir düzeye azaltıldığından dolayı kesin bir muhafaza olanağı oluşturmaktadır. Kurutma işlemi uygulanmış olan gıdalar, besin öğeleri açısından yoğunlaştırılmış bir nitelik kazanmaktadırlar. Kurutulmuş gıdanın daha az hacime sahip olması bunların depolanması ve taşınmasında daha az işçilik ve daha az ekipman gerektirmesiyle kurutma en ucuz dayandırma yöntemlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır (Seçkin ve Taşeri, 2015). Gıdalardan suyun uzaklaştırılması mikrobiyal gelişmeyi önlemektedir, aynı zamanda enzimatik ve bazı kimyasal reaksiyonların da inhibe edilmesini sağlamaktadır (Horuz ve ark., 2017). Ancak, kurutma işlemi son ürünün vitamin, mineral, antioksidan madde miktarı ve renk gibi kalite özelliklerinde istenmeyen sonuçlara sebep olabilmektedir. Bu sebeple gıdaların kalite özelliklerini muhafaza edebilen veya en az düzeyde etkileyen mikrodalga, vakum, vurgulu elektrik, ultrason gibi ön işlemler son yıllarda kurutma öncesi uygulanmaktadır (Baysal ve İçier, 2012; Izli ve ark., 2019).

Gıdada mikroskobik kanallar açarak kurutma esnasında iç direnci azaltan ve suyun uzaklaştırılmasını kolaylaştıran ultrason işlemi gıdalarda son yıllarda sıklıkla kullanılan ısı olmayan teknolojilerden biridir (Ricca ve ark., 2016; Sunil ve ark., 2017). Ultrason ön işleminin kurutma öncesi elma, zeytin, havuç, sarımsak, bamyası, kivi ve kavun gibi birçok gıdada ön işlem olarak kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmaların birçoğunda kurutma süresi kısalarak ürün kalite özelliklerinden renk, fenolik madde ve antioksidan maddeler üzerinde ultrasonun önemli iyileştirmelere sebep olduğu bulunmuştur (Planinic ve ark., 2005; Fijalkowska ve ark., 2015; Ricca ve ark., 2016; Sunil ve ark., 2017; Bozkir ve ark., 2018). Bu çalışmanın amacı, son yıllarda gıdaların kurutulması öncesinde sıklıkla uygulanan ultrason teknolojisinin kurutma sürecine etkisinin (kurutma hızı, efektif nem difüzyon hızı ve enerji tüketimi vb.) ve kurutulmuş ürünlerin kalite özelliklerinin belirlendiği çalışmaları detaylı olarak incelemektir.

## Gıdalarda Ultrason Uygulamaları

Ultrason uygulaması gıda teknolojisinde son yıllarda gelişen ve sıklıkla kullanılan ısı olmayan teknolojilerden olup kullanımı ikiye ayrılır. Bunlar; yüksek frekanslı ve düşük enerjili ultrason ve düşük frekanslı ve yüksek enerjili (güçlü ultrason) ultrason teknolojisidir (Baysal ve İçier, 2012). Düşük şiddetli ultrason ve yüksek şiddetli ultrason her ikisinde gıda endüstrisinde kullanım alanı bulmuştur. Genel olarak düşük şiddetli ultrason gıdaların fizikokimyasal özellikleri hakkında bilgi edinmek amacıyla gıda proseslerinin kontrolünde kullanılmakta iken; yüksek şiddetteki ultrason uygulamaları ise fiziksel olarak bir maddenin özelliklerini değiştirmek amacıyla kullanılmaktadır. Yüksek şiddetli

ultrason mikroorganizma ve enzim inaktivasyonu, biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu, emülsifikasyon, ısı ve kütle transferi ve kristalizasyon amacıyla gıda endüstrisinde kullanım alanı bulmaktadır. Ultrason teknolojisinin gelecekte çok daha yaygın uygulama alanı bulacağı düşünülmektedir (Bermúdez-aguirre ve ark., 2011).

Gıda işlemede ekstraksiyon amaçlı ultrason uygulamalarıyla ekstraksiyon verimi ve ekstraksiyon hızında artış sağlanmaktadır. Ayrıca genellikle güvenilir kabul edilen (GRAS) organik çözücülerin ekstraksiyon amacı ile kullanılması ve ekonomik açıdan da uygun olması gibi avantajları mevcuttur ve düşük sıcaklıklarda özellikle ısıya dayanıksız biyoaktif gıda bileşenlerinin ekstraksiyonu amacıyla kullanılabilir. Ekstraksiyon amaçlı ultrason uygulamaları; bitki dokusuna etki ederek vakuol yapılardan fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu, bitkisel tohumlarda lipit ve protein ekstraksiyonu, yağlık tohumlardan ise yağ ekstraksiyonunu kapsamaktadır (Shirzad ve ark., 2017; Yılmaz ve ark., 2017; Aydar, 2018, Aydar, 2020a).

Bitki ya da tohumlardan biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu solvent, ısı ve/veya karıştırma kombinasyonuna dayalı olarak yapılmaktadır. Ultrasonik ekstraksiyon yüksek sıcaklık ve uzun süreye dayalı diğer ekstraksiyonlar kadar etkilidir; en önemli avantajı ise ekstraksiyon süresini önemli ölçüde kısaltmasıdır. Ultrasonik ekstraksiyonun etkinliği sonikasyon sırasındaki eşzamanlı hidrasyon artışı ve parçalanma işlemindeki materyalden solvante olan kütle transferini kolaylaştırması ile açıklanmaktadır (Bermúdez-aguirre ve ark., 2011; Metherel ve ark., 2009). Aydar ve ark., farklı ekstraksiyon parametrelerinin (ultrason zamanı, başlangıç ultrason sıcaklığı ve malaksasyon zamanı) zeytinyağının antioksidan aktivitesi, verimi, besin ve duyuşsal nitelikleri üzerine etkilerini araştırdığı bir çalışmada malaksasyondan önce sonikasyon uygulanmasının sızma zeytinyağı ekstraksiyonu için etkili bir teknik olduğunu ve bu tekniğin faydasının, naturel sızma zeytinyağının kalitesi veya antioksidan aktivitesi üzerinde olumsuz bir etkisi olmadan daha yüksek ekstraksiyon verimi ve daha düşük ekstraksiyon süresine sebep olduğu sonucuna varmışlardır (Aydar ve ark., 2017)

### **Kurutma İşlemi Öncesi Ultrason Kullanımı ve Etkileri**

Kurutma, bir gıda içerisindeki sıvının uzaklaştırılması olarak tanımlanmaktadır. Başka bir ifade ile kurutma, meyve ve sebzelerin bünyesindeki % 80–95 oranındaki suyun % 10–20 oranına düşürülerek mikroorganizmaların gelişmesinin önlenmesi ve raf ömrünün uzamasının sağlama işlemidir (Ahmed, 2013). Kurutma prosesi öncesinde ön ısıtma, ultrason, mikrodalga, ozmotik kurutma, solüsyona daldırma gibi çeşitli ön işlemler enerji maliyetini düşürmek, kurutma hızını ve ürün raf ömrünü artırmak amacıyla son yıllarda gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Jiménez ve ark., 2007).

Ultrasonik ön işlem de su içeriğini azaltmak veya meyvelerin doku ve mikrobiyal yapısını değiştirmek ve kurutma işlemini hızlandırmak için kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir (Tao ve ark., 2016). Bu ön işlemin gıdanın fenolik bileşenlerini muhafaza etmede etkili olduğu kanıtlanmış ve ultrasonun ısı işlemler öncesi uygulandığında gıdanın raf ömrünü uzatarak bozulmasını engellediği bulunmuştur (Kadam ve ark., 2015a). Kavunun kurutulması öncesi 10 dakika ultrason uygulanan bir çalışmada kurutma sonunda L\* değerindeki en büyük artışın ultrason uygulanan örneklerde olduğu tespit edilmiştir (Dias da Silva ve ark., 2016). Elmanın kurutulması öncesi ultrason uygulanmasıyla elma örneklerinin L ve b değerinin arttığı a değerinin ise azaldığı bulunmuştur (Fijalkowska ve ark., 2015). Yer elması üzerinde yapılmış olan bir çalışmada, 60 °C’ de kurutma işlemi öncesinde 5 dakika ultrason uygulanmış yer elmalarının ultrason uygulanmamışlara göre daha açık renkli olduğu gözlenmiştir (Aydar ve ark., 2021).

Ultrason ön işlemi sırasında ultrasonik güç, sonikasyon süresi, frekans ve sonikatör probunun genliği gibi parametreler, gıda malzemelerinin kurutma özelliklerini ve kalitesini önemli ölçüde

etkilemektedir. Elmaların konvektif kurutulmasından önce ultrasonik banyoda 10, 20 ve 30 dakika ultrason ön-işlemi uyguladıklarında kurutma süresi sonikasyon süresi ile önce artmış ve sonra azalmıştır, 20 dakika ultrason ön işleminin ardından kurutulan elmaların kuruma süresinin en uzun olduğu bulunmuştur (Fijalkowska ve ark., 2015). Kurutma öncesi ultrason ön işleminin gıdaların kalite özelliklerine etkisi Çizelge 1’de özetlenmiştir.

**Çizelge 1: Ultrason Ön İşleminin Gıdaların Kalite Özellikleri ve Kuruma Süresi Üzerine Etkileri**

| Gıda         | Frekans (kHz) | Sıcaklık (°C) | Süre (dak.)      | Bulgular   | Kaynak                          |
|--------------|---------------|---------------|------------------|--|---------------------------------|
| Ananas       | 25            | 30            | 10, 20 ve 30     | Sonikasyon süresinin artmasıyla su kaybı artmış ve hücrelerde daha büyük mikrokanallar oluşmuştur.   | (Fernandes ve ark., 2009)       |
| Ananas       | 21.8          | -             | 20-40            | 20 dakikalık ultrason ön işleminin geleneksel kurutma yöntemine göre kurutma süresini 2 saat azalttığı gözlenmiştir.   | (Corrêa ve ark., 2017)          |
| Armut        | 25            | 25            | 5                | Kurutma süresi, ultrasonik genlik artışı ile önemli ölçüde kısalmıştır; Ultrasonik genlikleri artırarak, numunelerin sertliği azalmıştır.  | (Dujmic ve ark., 2013)          |
| Ayva         | 24            | 30            | 15 ve 30         | Ultrason zamanındaki artışla birlikte kuru madde kazanımı artmıştır.   | (Noshad ve Mohebbi, 2012)       |
| Bamya        | 25            | 25            | 5, 10 ve 15      | Ultrason gücü ve sonikasyon süresinin artmasıyla ağırlık kaybı artmıştır. Ultrason ön işleminin renk özelliklerinin iyileştiği, kurutma hızının arttığı, fenolik ve klorofil miktarının arttığı gözlenmiştir.  | (Wang ve ark., 2019a)           |
| Böğürtlen    | 24 kHz        | 15            | 10, 20 ve 30     | Ultrasonik parametrelerindeki (genlik ve sonikasyon süresi) artış, antioksidan tutunumunda azalmaya sebep olmuştur   | (Romero ve Yopez , 2015)        |
| Çilek        | 25 kHz        | 30            | 10, 20, 30 ve 45 | Sonikasyon süresinin artmasıyla renk tonu azalmıştır; Düşük ozmotik gradyanda artan sonikasyon süresi ile hafiflik artmış ve yüksek ozmotik gradyanda artan sonikasyon süresi ile azalmıştır.  | (Garcia-noguera, ve ark., 2012) |
| Çilek        | 40 kHz        | 20,30 ve 40   | 10, 20 ve 30     | Su kaybı sonikasyon süresinin artmasıyla artmıştır; Kısa sonikasyon süresi renk kayıplarını en aza indirmiştir.  | (Amami ve ark., 2017)           |
| Deniz Yosunu | 20 kHz        | -             | 10               | Daha düşük genlikler daha yüksek ağırlık artışlarına yol açmıştır; Deniz yosunundan suya katıların kaybı genlik seviyesi ile artmıştır; Genlik seviyesinin artırılması, kuruma süresinde önemli bir azalmayla sonuçlanmıştır.  | (Kadam ve ark., 2015b)          |
| Domates      | 25 kHz        | 26.4          | 0, 20 ve 40      | Artan ultrason süresi ile L*, a* ve b* değeri artmıştır. En yüksek C vitamini 40 dakika, en yüksek likopen ve toplam fenolik madde miktarı ise 20 dakika ultrason uygulanan örneklerde gözlenmiştir.   | (Horuz ve ark., 2017)           |
| Dut Yaprağı  | 20 kHz        | -             | 5-15             | Ultrason ön işleminin toplam flavonoid miktarını artırırken toplam fenolik maddede değişim gözlenmemiştir.   | (Tao ve ark., 2016)             |
| Elma         | 25 kHz        | -             | 5, 10 ve 15      | Sonikasyon süresi uzadıkça daha fazla çözünür kuru madde tespit edilmiştir; Artan sonikasyon süresi ile birlikte su kaybı artmıştır; Daha kısa sonikasyon süresi (5 dakika) daha düşük su aktivitesi ile sonuçlanmıştır.   | (Mothibe ve ark., 2014)         |
| Elma         | 35 kHz        | 25            | 10, 20 ve 30     | Ultrason süresi azaldıkça ağırlık kaybı artmıştır;Kurutma hızı 30 dakikalık ultrason işleminde en hızlı olup bunu 20 ve 10 dakikalık ultrason uygulamaları takip etmiştir. Ultrason ön işleminin kurutma süresinin %13-17 oranında azaldığı, L ve b değerinin arttığı, a değerinin ise azaldığı bulunmuştur. | (Fijalkowska ve ark., 2015)     |
| Guava        | 20-25 kHz     | -             | 20, 40 ve 60     | Ultrason özellikleri (güç ve genlik) ve sonikasyon süresi, numunelerin su kaybını, kuru madde kazanımı ve toplam renk değişimini önemli ölçüde arttırmıştır. Dolaylı sonikasyon, doğrudan sonikasyona göre kabul edilebilir toplam renk değişimi ile yüksek su kaybına ve katı kazanıma katkıda bulunmuştur. | (Kek ve ark., 2013)             |

## Gıdaların Kurutulmasında Ultrason Ön İşleminin Kullanımı

|                  |               |            |                              |   |   |
|------------------|---------------|------------|------------------------------|---|---|
| Havuç            | 20 kHz        | 25         | 3 ve 10                      | Daha uzun sonikasyon süresi ile poliasetilenlerin daha iyi muhafaza edilmesi sağlanmıştır. Ultrason ön işlemini takiben dondurularak kurutma sonucunda 24,4 µm'lik en düşük ultrason genlik seviyesinde, en yüksek karotenoid miktarı tespit edilmiştir.  | (Rawson ve ark., 2011)                          |
| Havuç            | 25 kHz        | -          | 30 ve 60                     | 60 °C de kurutulan örneklerin rehidrasyon oranlarının 40 °C de kurutulanlardan daha yüksek olduğu bulunmuştur.  | (Ricce ve ark., 2016)                           |
| Havuç            | 21 ve 35 kHz  | 25         | 10, 20 ve 30                 | Daha uzun sonikasyon süresi daha yüksek enerji tüketimine yol açmıştır; Daha düşük frekans ve daha kısa sonikasyon süresi, karotenoidlerin daha iyi tutulmasını sağlamıştır.  | (Nowacka ve Wedzik, 2016)                       |
| Havuç            | 20 kHz        | -          | 30                           | Havuç numunelerinin rengi minimum düzeyde değişmiş olup, aromatik ve uçucu bileşiklerin arttığı görülmüştür.  | (Wang ve ark., 2018)                            |
| Havuç            | 35 kHz        | 10, 20, 30 | 3,5 ve 10                    | 20 °C ve 30 °C de karoten içeriği artan işlem süresi ile önemli ölçüde artmıştır  | (Yılmaz ve ark., 2019)                          |
| Kavun            | 25 kHz        | 30         | 10, 20 ve 30                 | Ultrasona tabi tutulan kavunlarda renk özellikleri, karotenoid miktarının uygulanmayanlardan daha iyi korunduğu bulunmuştur. Kurutma hızının da ultrason uygulanmayan örneklerden yüksek olduğu tespit edilmiştir.  | (Dias da Silva ve ark., 2016)                   |
| Kivi             | 20 kHz        |            | 10-20-30                     | Ultrason süresi arttıkça askorbik asit miktarında ve renk değişiminde azalma tespit edilmiştir.   | (Wang ve ark., 2019b)                           |
| Mantar           | 35 kHz        | 26         | 30                           | Ultrason uygulanan örneklerin renk özellikleri ile fenolik içeriğinin elektroliz uygulananlardan daha iyi olduğu bulunmuştur.   | (Bozkır ve ark., 2016)                          |
| Muz              | 25 kHz        | 30         | 10, 20 ve 30.                | Sonikasyon süresi ile kuruma süresi azalmıştır.   | (Moreira ve ark., 2010)                         |
| Nar              | 25 ve 40 kHz  | 30         | 10, 20, 30, 45, 60 ve 80     | Su kaybı sonikasyon süresi ile artmıştır; 25 kHz'deki numuneler en yüksek çözünmüş madde miktarını göstermiştir; En düşük su aktivitesi 40 kHz'de elde edilmiştir.  | (Allahdad ve ark., 2018)                        |
| Papaya           | 25 kHz        | 30         | 10, 20 ve 30                 | Su kaybı sonikasyon süresi ile artmıştır; Damıtılmış suya batırılmış örnekler pozitif şeker kaybı değerleri göstermiştir, ozmotik çözeltilerde değerler negatiftir ve sonikasyon süresi ile artmıştır.  | (Rodrigues ve ark., 2009)                       |
| Soğan            | 20 kHz        | 70         | 1, 3 ve 5                    | Daha uzun sonikasyon süresi daha fazla şiddetli oksidatif ve termal bozulma; Düşük genlikler daha yüksek antioksidan aktiviteye yol açtı, daha uzun sonikasyon süresi antioksidan aktiviteyi azaltırken; Daha yüksek genlikler ve daha uzun sonikasyon süresi, flavonoidlerin daha fazla süzülmesine neden olmuştur; Sonikasyon süresi ne kadar uzun olursa renk farkı o kadar yüksek olmuştur. | (Ren, Perussello, Zhang, Kerry, & Tiwari, 2018) |
| Tilapia Filetosu | -             | -          | 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 | Ca <sup>2+</sup> -ATPase aktivitesi ve rehidrasyon oranı 400 W'da en yüksek iken sertlik ve çiğneme 400 W'da en düşüktür; 60-70 dakikalık ön işlemde sonra, tilapia filetoları iyi bir doku durumu sergilerken, uzun bir süre daha kötü doku ile sonuçlanmıştır.  | (Li ve ark., 2017)                              |
| Trabzon Hurması  | 35 kHz        | -          | 10-20-30                     | Ultrason ön işlemi ile su kaybının arttığı, ultrason süresi arttıkça fenolik madde miktarının azaldığı gözlenmiştir.  | (Bozkır ve ark., 2019)                          |
| Yaban Mersini    | 35 ve 130 kHz | -          | -                            | Ultrason süresi arttıkça sertlik ve su aktivitesi azalmıştır; Renk farkı yüksek frekansta daha düşük bulunmuştur.   | (Shamaei ve ark., 2011)                         |
| Yer Elması       | 25 kHz        | 25         | 5, 10 ve 15                  | En yüksek toplam fenolik madde 401.01±3.36 mg gallik asit/ 100 g ile 10 dakika ultrason uygulanmış yer elmalarında bulunmuştur.   | (Aydar ve ark., 2021)                           |
| Zeytin           | 32 kHz        | 25         | 5 ve 10                      | En yüksek fenolik madde 5 dakika ultrason uygulanan örneklerde tespit edilmiştir.   | (Aydar, 2020b)                                  |

Çizelge 1 incelendiğinde gıdaların kurutulmasında sonikasyon işleminin çok yaygın olarak araştırıldığı görülmektedir. Sonikasyon süresi su kaybı, kurutma hızı ve gıda kalitesi üzerinde çeşitli



etkiler gösterir. Genel olarak, gıda ürünlerinin kurutulmadan önce ozmotik bir çözeltiliye daldırıldığında ve ultrason ön işleminin uygulandığında daha fazla su kaybettiği bulunmuştur. Rodrigues ve ark. papaya meyvesini ozmotik çözeltiliye batırılmışlar ve su kaybının artan sonikasyon süresiyle arttığını görmüşlerdir (Rodrigues ve ark., 2009). Ananas (Fernandes ve ark., 2009; Corrêa ve ark., 2017), nar (Allahdad ve ark., 2018), kavun (Dias da Silva ve ark., 2016), ve guava meyvesinde (Kek ve ark., 2013) benzer sonuçlar bulunurken, Garcia-Noguera ve ark. çileklerin kurutulması öncesi 25 kHz'de uygulanan sonikasyon süresinin arttırılmasının, su kaybı değerlerini azalttığını ortaya koymuşlardır (Garcia-noguera ve ark., 2012).

Gıdalarda mikro akış ve salınım hızını artıran ultrason, kurutma esnasında yüzeyler arasında bir basınç değişimi yaratmaktadır ve bu durum yüzeyden havaya su aktarımında bir artışa yol açmaktadır. Sonikasyon süresi aynı zamanda kurutma hızını ve gıda kalitesini de etkilemektedir (Azam ve ark., 2020). Moreira ve ark. ultrason ön işleminin muzun kurutma kinetiği üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Sonikasyon süresindeki artışın (10, 20 ve 30 dakika) kurutma oranını arttırdığı görülmüştür (Moreira ve ark., 2010). Ultrason süresi haricinde diğer ultrason parametrelerinin (ultrason gücü, frekans ve genlik) etkilerinin araştırıldığı çalışmalar sınırlıdır. Kadam ve ark. sonikatör probunun genliğinin deniz yosununun kurutma kinetiği üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada genlik ne kadar düşük olursa, hacim artışının o kadar yüksek olduğunu bulmuşlardır (Kadam ve ark., 2015b). Kek ve ark. guava dilimlerini ozmotik çözeltiler içinde ön işleme tabi tuttuklarında su kaybı gözlemlenmişler ve genlik ne kadar büyük olursa, su kaybının o kadar yüksek olduğunu bulmuşlardır (Kek ve ark., 2013). Ayrıca, kuruma süresi ve antioksidan retansiyonu önemli ölçüde azalırken, ultrasonik amplitüdeki artışla birlikte toplam renk değişimi artmıştır. Hacim kaybı ve renk farkı da frekansta azalma ve ultrason gücündeki artış ile artmıştır. Ultrason ön işleminin mekanik titreşim ve kavitasyon ile hücreler arası boşlukları genişleterek gıda dokusunda değişikliklere sebep olmakta ve su kaybını kolaylaştırmaktadır. Ultrason sırasında hücreler arası oluşan mikro boşluklar ürünün tahribatını da engellemektedir (Huang ve ark., 2019).

Ultrason destekli kurutma sırasında, uygulama tipi, ultrason sıcaklığı, frekansı ve ultrason gücü gibi parametreler, gıdaların kurutma özelliklerini ve kalitesini de önemli ölçüde etkilemektedir. Ultrason destekli kurutma koşulları ve ürün özellikleri ile kurutma parametreleri üzerine etkileri Çizelge 2'de özetlenmiştir.

Elmaların ultrason destekli kurutulmasının araştırıldığı bir çalışmada geleneksel kurutma ile kıyaslandığında 100 ve 200 W ultrasonik güçte ön işleme tabi tutulan örneklerin toplam kurutma süresinin 235 dakikadan sırasıyla 185 ve 145 dakikaya düştüğü bulunmuştur (Fijalkowska ve ark., 2015). Kouchakzadeh (2013). antep fıstığının güneşte kurutulmasında ultrason destekli bir kurutma üzerine yeni bir yaklaşım uygulamıştır Ortalama kurutma verimliliği 500 W ve 1000 W ultrasonik güçle % 8.5'ten (güneşte kurutma) sırasıyla % 14.7 ve % 28'e yükselmiştir (Kouchakzadeh, 2013). Garcia-Perez ve ark. akustik basınç seviyesinin havuç kurutması üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmada akustik basıncı artırmanın etkisinin neredeyse fark edilebilir olduğunu bulmuşlardır. İyileştirme etkisi sadece ilk 10 dakikada meydana gelmiş ve sonra azalmıştır. Bununla birlikte, ultrasonik enerji havuç örnekleri ile doğrudan temas halinde uygulandığında, kurutma oranı önemli ölçüde geliştirilmiştir (Garcia-Perez ve ark., 2009). Fernandes ve ark. (2009), ultrasonun su difüzyon direncini azaltan ve kurutma sırasında suyun yayılmasını kolaylaştıran mikro kanalların oluşumuna sebep olarak kurutma hızını artırdığını ve aynı şekilde kurutulmuş ürünlerde rehidrasyon kapasitesini de artırdığını belirtmişlerdir (Fernandes ve ark., 2009).

**Çizelge 2:** Ultrason Destekli Gıda Kurutmasının Kurutma Parametreleri ve Kuruma Hızı Üzerine Etkileri

| Gıda                  | Frekans (kHz) | Güç   | Bulgular   | Kaynak                         |
|-----------------------|---------------|---|--|--------------------------------|
| Ahududu               | -             | 100 ve 200 W                                  | Kurutma süresi artan ultrason gücü ile azalmıştır.   | (Kowalski ve ark., 2016)       |
| Bezelye               | 20            | 15.3, 43.1 ve 68.2 W                          | Ultrasonik gücün artırılması kurutma hızını ve $D_e$ 'yi arttırmıştır.                                 | (Bantle ve Eikevik, 2011)      |
| Çilek                 | 21.8          | 30 ve 60 W                                    | Kurutma hızı, $D_e$ ve $k$ artan ultrasonik güç ile artmıştır.   | (Gamboia-Santos ve ark., 2014) |
| Elma                  | 20            | 75 ve 90 W                                    | Kurutma hızı, artan ultrasonik güç ile artmıştır.  | (Sabarez ve ark., 2012)        |
| Elma                  | 26            | 100 ve 200 W                                  | Kurutma hızı, artan ultrasonik güç ile artmıştır.  | (Kowalski ve Mierzwa, 2015)    |
| Elma                  | 21.8          | -   | Ultrason yoğunluğu arttıkça kuruma süresi önemli ölçüde azalmıştır.                                    | (Rodríguez ve ark., 2014)      |
| Elma                  | 21 ve 35      | -   | Kuru madde kaybı, $D_{eff}$ ve kuruma oranı artan frekans ile artmıştır.                               | (Fijalkowska ve ark., 2015)    |
| Fıstık                | 20            | 500 ve 1000 W                                 | Artan ultrason gücü ile ortalama kurutma verimliliği artmıştır.  | (Kouchakzadeh, 2013)           |
| Havuç                 | 21            | 50, 100, 150 ve 200 W                         | Kurutma hızı, ultrason gücünün artması ve ultrasonik radyasyon mesafesinin azalması ile artmıştır.     | (Denglin ve ark., 2015)        |
| Havuç                 | 35            | 140 W   | En düşük rehidrasyon oranı 10 C de 5 dakika ultrason uygulanan örneklerde gözlenmiştir                 | (Yılmaz ve ark., 2019)         |
| Havuç ve Limon Kabuğu | 21.7          | -   | Daha fazla akustik güç yoğunluğu uygulandığında kurutma kinetiği ve $D_{eff}$ önemli ölçüde artmıştır. | (Garcia-Perez ve ark., 2009)   |
| Manyok ve Elma        | 21.8          | -   | Ne kadar çok ultrason gücü uygulanırsa, kurutma o kadar hızlı olmuştur.                                | (Ozuna ve ark., 2014)          |
| Model gıda            | 20            | 60 ve 120 W                                   | Kurutma hızı, artan ultrason gücü ile artmıştır.   | (Beck ve ark., 2014)           |
| Patates               | 21.8          | 0, 6, 12, 19, 25, 31 and 37 kW/m <sup>3</sup> | Uygulanan güç ne kadar artarsa kurutma hızı o kadar yüksekmiştir.                                      | (Ozuna ve ark., 2014)          |
| Patlıcan              | 20            | 45 ve 90 W                                    | Kurutma hızı ve nem kaybı, artan ultrason güç yoğunluğu ile artmıştır.                                 | (García-pérez ve ark., 2011)   |
| Sarımsak              | 20            | -   | Kuruma süresi azalmıştır ve renk farkı ultrason yoğunluğunun artmasıyla artmıştır.                     | (Tao ve ark., 2018)            |
| Yer Elması            | 25            | 100 W   | Ultrason süresi arttıkça efektif nem difüzyon katsayısı artmıştır                                      | (Aydar ve ark., 2021)          |
| Yeşil Biber           | 20            | 100 ve 200 W                                  | Artan ultrason gücü ile kuruma süresi azalmıştır.  | (Szadzinska ve ark., 2017)     |
| Zeytin                | 25            | 100 W   | Ultrason süresi arttıkça efektif nem difüzyon katsayısı ve kuruma hızı artmıştır.                      | (Aydar, 2021)                  |
| Zeytin                | 32            | 100 W   | Siyah zeytinlerin rehidrasyon yeteneklerinin yeşil zeytinlere oranla daha iyi olduğu bulunmuştur.      | (Aydar, 2020b)                 |

Ultrasonik güç seviyesi renk başta olmak üzere gıda kalitesini önemli düzeyde etkilemektedir. Tao ve ark. sarımsak dilimlerinin geleneksel kurutulmasında direkt ultrason teknolojisini uygulamışlardır. Toplam renk değişimi ultrasonik güç yoğunluğu ile artmasına rağmen, ultrason uygulanan örneklerin ultrason uygulanmadan kurutulan örneklerden daha açık renkli olduğu bulunmuştur. Aynı çalışma sarımsak renginin düşük ultrasonik güç altında daha iyi korunabileceğini göstermiştir (Tao ve ark., 2018). Kurutma esnasında renk değişimini etkileyen enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlar, gıdaların renklerinde etkin karotenoid, klorofil gibi bileşenlerin termal ve/veya oksidatif bozulmalara maruz kalmaları gibi sebepler vardır (Dias da Silva ve ark., 2016). Enzimlerin inaktivasyonu üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, özellikle meyve ve sebzeleri depolama ve kurutma sırasında

kahverengileşme reaksiyonunda rol alan ana enzim olan polifenoloksidazın (PPO) inaktif hale getirilmesinde ultrasonun oldukça etkili bir işlem olmasının meyve sebzelerde istenmeyen kahverengi pigmentlerin oluşumunu azalttığı veya durdurduğu bildirilmiştir (Wang ve ark., 2019b). Ultrasonun mekanik kaviteasyon etkisi enzim inaktivasyonunu sağlamaktadır. Mikro boyutta kabarcıkların oluşması ve çökmesinin neden olduğu kaviteasyon esnasında mikro ölçekte sıcaklığın (5000 °K'ye kadar) ve basıncın (50 MPa' a kadar) artması sonucu büyük miktarda enerji açığa çıkmaktadır. Bu hızlı kabarcık patlaması, enzim inaktivasyonuna neden olabilecek sıcaklık, basınç ve kayma stresi gibi enzim ortamını değiştirmektedir. Armut, elma ve çilek pürelindeki PPO enzim inaktivasyonunda 32 °C de 10 dakika ultrason işleminin yeterli olduğu Sulaiman ve ark. tarafından belirtilmiştir (Sulaiman ve ark., 2015).

Diğer parametrelerin etkilerinin araştırılması çok sınırlı olmakla beraber Denglin ve ark. Ultrason destekli sıcak hava kurutucusu tasarladıkları çalışmada ultrason gücü, ultrasonik radyasyon mesafesi, hava hızı ve hava sıcaklığının havuçların kurutma özellikleri üzerindeki etkisini araştırmışlar ve havuç dilimlerinin kurutma hızının, ultrason gücünün artması ve ultrasonik radyasyon mesafesinin azalmasıyla arttığını bulmuşlardır (Denglin ve ark., 2015). Ultrasonik banyo ile uygulanan ultrason ön işlemlerinde gıdanın ultrasonik banyodaki suya oranı da uygulama etkinliğini etkilemektedir. Son yıllarda ürün/su konsantrasyon etkisinin araştırıldığı çalışmalar da yapılmaktadır. Yapılan çalışmalara bakıldığında ürün:su oranı (ağırlık:ağırlık) kurutulacak gıdaya ve diğer çalışma parametrelerine göre değişmekle beraber 5-10 dakikalık ultrason uygulamalarında 1:4 ve 1:5 oranlarının, daha yüksek sürelerde uygulanan ultrason ön işlemlerinde ( $\geq 15$  dakika) ise bu oranın 1:9 olarak uygulanabileceği belirlenmiştir (Aydar, 2020b; Aydar 2021; Nowacka ve Wedzik, 2016).

## SONUÇ

Kurutma işleminde ultrason ön işleminin etkisi son yıllarda elma, havuç, böğürtlen, yer elması, zeytin, sarımsak, soğan ve patates gibi birçok meyve sebzede çalışılmıştır. Ultrasonun etkinliği gıdanın türü, ultrason frekansı, gücü, ultrason uygulama tipi (direkt ve indirekt) ve uygulama sıcaklığı ve süresi gibi birçok etkene bağlı değişmektedir. Çalışmalar sonucunda kurutma işlemi öncesinde ultrason uygulandığında ultrasonun kaviteasyon etkisiyle gıdalarda oluşan mikrokanalların kurutma hızını artırarak kurutma süresini azalttığı ve rehidrasyon kabiliyetlerini de koruduğu bulunmuştur. Aynı zamanda yapılan çalışmalar incelendiğinde ultrasonun fenolik maddeler, antioksidan aktivite, ve renk özellikleri gibi gıdaların kalite özelliklerini korumada etkili bir ön işlem olduğu sonucuna varılmaktadır.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Ahmed N, 2013. Different Drying Methods : Their Applications and Recent Advances. Internatinoal Journal of Food Nutrition and Recent Advances, 4(1)(April): 34–42.
- Allahdad Z, Nasiri M, Varidi M, Varidi MJ, 2018. Effect of sonication on osmotic dehydration and subsequent air-drying of pomegranate arils. Journal of Food Engineering, 244: 202–211.
- Amami E, Khezami W, Mezrigui S, Badwaik LS, Bejar AK, Perez CT, Kechaou N, 2017. Effect of ultrasound-assisted osmotic dehydration pretreatment on the convective drying of strawberry. Ultrasonics - Sonochemistry, 36: 286–300.
- Aydar AY, Bağdatlıoğlu N, Köseoğlu O, 2017. Effect of ultrasound on olive oil extraction and optimization of ultrasound-assisted extraction of extra virgin olive oil by response surface methodology ( RSM ). Grasas y Aceites. International Journal of Fats and Oils, 68(2): e189.

- Aydar AY, 2018. Physicochemical Characteristics of Extra Virgin Olive Oils Obtained By Ultrasound Assisted Extraction from Different Olive Cultivars. *International Journal of Scientific and Technological Research*, 4(May(3)): 1–10.
- Aydar AY, 2020a. Quality Parameters and Drying Kinetics of Ultrasound Pretreated Fermented Black Table Olives. *Latin American Applied Research*. 50(4):271-276.
- Aydar AY, 2020b. Rehydration and Drying Kinetics of Ultrasound Pretreated Microwave Dried Olive Slices Using Peleg 's Model. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 24(4): 401–408.
- Aydar AY, Yılmaz T, Mataracı CE, Sağlam TB, 2021. Effect of ultrasound pretreatment on Drying Kinetics and Quality Properties of Jerusalem Artichoke. *Latin American Applied Research*, Under review.
- Aydar AY, 2021. Investigation of Ultrasound Pretreatment Time and Microwave Power Level on Drying and Rehydration Kinetics of Green Olives. *Food Science and Technology*, 41(1): 238-244.
- Azam SMR, Ma H, Xu B, Devi S, Bakar A, Stanley SL, Zhu J, 2020. Efficacy of ultrasound treatment in the and removal of pesticide residues from fresh vegetables : A review. *Trends in Food Science & Technology*, 97(301): 417–432.
- Bantle M, Eikevik TM, Bantle M, Eikevik TM, 2011. Parametric Study of High-Intensity Ultrasound in the Atmospheric Freeze Drying of Peas. *Drying Technology*, 29: 37–41.
- Baysal T, İçier F, 2012. *Gıda Mühendisliğinde Isıl Olmayan Teknolojiler*. (İçier Filiz, Ed.). Bornova, İzmir: Nobel yayıncılık.
- Beck SM, Sabarez H, Gaukel V, Knoerzer K, 2014. Ultrasonics Sonochemistry Enhancement of convective drying by application of airborne ultrasound – A response surface approach. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21: 2144–2150.
- Bermúdez-aguirre D, Mobbs T, Barbosa-cánovas GV, 2011. *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*.
- Bozkır H, Ergun AR, Tekgul Y, Baysal T, 2018. Ultrasound as pretreatment for drying garlic slices in microwave and convective dryer. *Food Science and Biotechnology*.
- Bozkır H, Ergün AR, Serdar E, Metin G, Baysal T, 2019. Influence of ultrasound and osmotic dehydration pretreatments on drying and quality properties of persimmon fruit. *Ultrasonics Sonochemistry*, 54(February): 135–141.
- Bozkır H, Ergün AR, Baysal T, 2016. Effects of electrical and sonication pretreatments on the drying rate and quality of mushrooms. *LWT - Food Science and Technology*, 69: 197–202.
- Corrêa JLG, Rasia MC, Mulet A, Cárcel JA, 2017. Influence of ultrasound application on both the osmotic pretreatment and subsequent convective drying of pineapple (*Ananas comosus*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 41(November 2016): 284–291.
- Denglin L, Juan L, Yuhong L, Guangyue R, 2015. Drying characteristics and mathematical model of ultrasound assisted hot-air drying of carrots. *International Journal of Aricultural and Biological Engineering*, 8(4): 124–132.
- Dias da Silva G, Barros ZMP, de Medeiros RAB, de Carvalho CBO, Rupert Brandão SC, Azoubel PM, 2016. Pretreatments for melon drying implementing ultrasound and vacuum. *LWT - Food Science and Technology*, 74: 114–119.
- Dujmic F, Brncic M, Karlovic S, Bosilijkov T, Jezek D, Tripalo B, Mofardin I, 2013. Ultrasound-Assisted Infrared Drying of Pear Slices: Textural Issues. *Journal of Food Process Engineering*, 36: 397–406.
- Fernandes FAN, Izabel M, Rodrigues S, 2009. Effect of osmosis and ultrasound on pineapple cell tissue structure during dehydration, 90: 186–190.
- Fijalkowska A, Nowacka M, Wiktor A, Witrowa-Rajchert D, Sledz M, 2015. Ultrasound as a pretreatment method to improve drying kinetics and sensory properties of dried apple. *Journal of Food Process Engineering*, 1–10.
- Gamboa-Santos J, Montilla A, Andres Carcel J, Villamiel M, Garcia-Perez JV, 2014. Air-borne ultrasound application in the convective drying of strawberry. *Journal of Food Engineering*, 128: 132–139.
- Garcia-noguera J, Oliveira FIP, Weller CL, Rodrigues S, Fernandes FAN, 2012. Effect of ultrasonic and osmotic dehydration pre-treatments on the colour of freeze dried strawberries. *Journal of Food Science and Technology*, 51(9): 2222–2227.
- Garcia-Perez JV, Cárcel JA, Riera E, Mulet A, 2009. Influence of the Applied Acoustic Energy on the Drying of Carrots and Lemon Peel. *Drying Technology*, 27, 37–41. <http://doi.org/10.1080/07373930802606428>
- García-pérez JV, Ozuna C, Ortuño C, Cárcel JA, Mulet A, Garcí V, Mulet A, 2011. Modeling Ultrasonically Assisted Convective Drying of Eggplant. *Drying Technology*, 29: 37–41. <http://doi.org/10.1080/07373937.2011.576321>

- Horuz E, Jaafar HJ, Maskan M, 2017. Ultrasonication as pretreatment for drying of tomato slices in a hot air – microwave hybrid oven. *Drying Technology*, 35(7): 849–859.
- Huang D, Men K, Li D, Wen T, Gong Z, Sundén B, Wu Z, 2019. Application of ultrasound technology in the drying of food products. *Ultrasonics Sonochemistry*, 30: 1–16.
- Izli N, Taskin O, Izli G, 2019. Drying of lime slices by microwave and microwave combined convective methods, *Italian Journal of Food Science*, 31: 487–500.
- Jiménez A, Beltrán G, Uceda M, 2007. High-power ultrasound in olive paste pretreatment. Effect on process yield and virgin olive oil characteristics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(6): 725–731.
- Kadam SU, Tiwari BK, Álvarez C, O'Donnell CP, 2015a. Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1): 60–67.
- Kadam SU, Tiwari BK, Smyth TJ, O'Donnell CP, 2015b. Optimization of ultrasound assisted extraction of bioactive components from brown seaweed *Ascophyllum nodosum* using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 23: 308–316.
- Kek SP, Chin NL, Yusof YA, 2013. Direct and indirect power ultrasound assisted pre-osmotic treatments in convective drying of guava slices. *Food and Bioproducts Processing*, (April): 1–12.
- Kouchakzadeh A, 2013. The effect of acoustic and solar energy on drying process of pistachios. *Energy Conversion and Management*, 67: 351–356.
- Kowalski SJ, Mierzwa D, 2015. Ultrasound-Assisted Convective Drying of Biological Materials. *Drying Technology*, (April): 37–41.
- Kowalski SJ, Pawłowski A, Szadzi J, 2016. High power airborne ultrasound assist in combined drying of raspberries. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 34: 225–234.
- Li M, Pina A, Ferrão P, Fournier J, Lacarrière B, Corre OL, 2017. Impact of ultrasound-assisted osmotic on as and on the quality of heat pump dried tilapia fillets the quality of heat pump dried tilapia fillets. *Energy Procedia*, 123: 243–255.
- Metherel AH, Taha AY, Izadi H, Stark KD, 2009. The application of ultrasound energy to increase lipid extraction throughput of solid matrix samples (flaxseed). *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 81(5–6): 417–423.
- Moreira P, Melo A, Amorim R, Sorelly S, Oliveira B, 2010. Effect of ultrasound on banana cv Pacovan drying kinetics. *Journal of Food Engineering*, 97(2): 194–198.
- Mothibe KJ, Zhang M, Mujumdar AS, Wang YC, Mothibe KJ, Zhang M, Cheng X, 2014. Effects of Ultrasound and Microwave Pretreatments of Apple Before Spouted Bed Drying on Rate of Dehydration and Physical Properties. *Drying Technology*, (October): 37–41.
- Noshad M, Mohebbi M, 2012. Multi-Objective Optimization of Osmotic – Ultrasonic Pretreatments and Hot-Air Drying of Quince Using Response Surface Methodology. *Food and Bioprocess Technology*, 5: 2098–2110.
- Nowacka M, Wedzik M, 2016. Effect of ultrasound treatment on microstructure, colour and carotenoid content in fresh and dried carrot tissue. *Applied Acoustics*, 103: 163–171.
- Ozuna C, Álvarez-arenas TG, Riera E, Cárcel JA, García-perez JV, 2014. Ultrasonics Sonochemistry Influence of material structure on air-borne ultrasonic application in drying. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 21(3): 1235–1243.
- Planinic M, Velic D, Tomas S, Bilic M, Bucic A, 2005. Modelling of drying and rehydration of carrots using Peleg's model. *European Food Research and Technology*, 221: 446–451. <http://doi.org/10.1007/s00217-005-1200-x>
- Rawson A, Tiwari BK, Tuohy MG, O'Donnell CP, Brunton N, 2011. Effect of ultrasound and blanching pretreatments on polyacetylene and carotenoid content of hot air and freeze dried carrot discs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(5): 1172–1179.
- Ren F, Perussello CA, Zhang Z, Kerry JP, Tiwari BK, 2018. Impact of ultrasound and blanching on functional properties of hot-air dried and freeze dried onions. *LWT - Food Science and Technology*, 87: 102–111.
- Ricce C, Lindsay M, Claudio A, Siche R, Esteves P, Augusto D, 2016. Ultrasound pre-treatment enhances the carrot drying and rehydration. *Food Research International*, 89(1): 701–708.
- Rodrigues S, Oliveira FIP, Gallão MI, Fernandes FAN, Rodrigues S, Oliveira FIP, Galla MI, 2009. Effect of Immersion Time in Osmosis and Ultrasound on Papaya Cell Structure during Dehydration. *Drying Technology*, (June 2013): 37–41.
- Rodríguez Ó, Santacatalina JV, Simal S, García-perez JV, Femenia A, Rosselló C, 2014. Influence of power ultrasound application on drying kinetics of apple and its antioxidant and microstructural properties. *Journal of Food Engineering*, 129: 21–29.

- Romero JCA, Yopez V, BD, 2015. Ultrasonics Sonochemistry Ultrasound as pretreatment to convective drying of Andean blackberry ( *Rubus glaucus* Benth ). *Ultrasonics - Sonochemistry*, 22: 205–210.
- Sabarez HT, Gallego-Juarez JA, Riera E, 2012. Ultrasonic-Assisted Convective Drying of Apple Slices. *Drying Technology*, (May): 989–997.
- Seçkin GU, Taşeri L, 2015. Yarı Kurutulmuş Meyve ve Sebzeler. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 21(9): 414–420.
- Shamaei S, Emam-djomeh Z, Moini S, 2011. Ultrasound-Assisted Osmotic Dehydration of Cranberries: Effect of Finish Drying Methods and Ultrasonic Frequency on Textural Properties. *Journal of Texture Studies*, 1–9.
- Shirzad H, Niknam V, Taheri M, Ebrahimzadeh H, 2017. Ultrasound-assisted extraction process of phenolic antioxidants from Olive leaves: a nutraceutical study using RSM and LC–ESI–DAD–MS. *Journal of Food Science and Technology*, 54(8): 2361–2371.
- Sulaiman A, Soo MJ, Farid M, Silva FVM, 2015. Thermosonication for polyphenoloxidase inactivation in fruits : Modeling the ultrasound and thermal kinetics in pear , apple and strawberry purees at different temperatures. *Journal of Food Engineering*, 165: 133–140.
- Sunil CK, Kamalpreetha B, Sharathchandra J, Aravind KS, Rawson A, 2017. Effect of ultrasound pre-treatment on microwave drying of okra. *Journal of Applied Horticulture*, 19(1): 58–62.
- Szadzinska J, Łechtanski J, Kowalski SJ, Stasiak M, 2017. The effect of high power airborne ultrasound and microwaves on convective drying effectiveness and quality of green pepper. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34: 531–539.
- Tao Y, Wang P, Wang Y, Kadam SU, Han Y, Wang J, Zhou J, 2016. Power ultrasound as a pretreatment to convective drying of mulberry (*Morus alba* L.) leaves: Impact on drying kinetics and selected quality properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31: 310–318.
- Tao Y, Zhang J, Jiang S, Xu Y, Show P, Han Y, Ye M, 2018. Contacting ultrasound enhanced hot-air convective drying of garlic slices: Mass transfer modeling and quality evaluation. *Journal of Food Engineering*, 235: 79–88.
- Tekin ZH, 2015. Biberlerin Kurutulmasında Kalite Özelliklerinin İyileştirilmesi Amacıyla Ultrason Destekli Vakum Kurutma Yönteminin Uygulanması. Yıldız Teknik Üniversitesi.
- Wang H, Zhao QS, Wang XD, Hong Z, Zhao B, 2019a. Pretreatment of ultrasound combined vacuum enhances the convective drying efficiency and physicochemical properties of okra (*Abelmoschus esculentus*). *LWT - Food Science and Technology*, 112(May): 108201.
- Wang J, Xiao HW, Ye JH, Wang J, Raghavan V, 2019b. Ultrasound Pretreatment to Enhance Drying Kinetics of Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) Slices: Pros and Cons. *Food and Bioprocess Technology*, 865–876.
- Wang L, Xu B, Wei B, Zeng R, 2018. Low frequency ultrasound pretreatment of carrot slices: Effect on the moisture migration and quality attributes by intermediate-wave infrared radiation drying. *Ultrasonics Sonochemistry*, 40(June 2017): 619–628.
- Yılmaz B, Cakmak H, Tavman S, 2019. Ultrasonic pretreatment of carrot slices : Effects of sonication source on drying kinetics and product quality. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 91(3): 1–14.
- Yılmaz T, Kumcuoglu S, Tavman, 2017. Ultrasound-assisted extraction of lycopene and  $\beta$ -carotene from tomato-processing wastes. *Italian Journal of Food Science*, 29(1): 186–194.

## Some Important Fruit Characteristics of Apricot (cv. Aprikoz) Accessions Grown in Kagizman District in Turkey

Neva KARATAŞ<sup>1\*</sup>

**ABSTRACT:** With their rich nutrients, fantastic flavor and taste, excellent medicinal value and health care functions, apricot has been continuously well received by consumers as important horticultural crop. The fruit has a great market value as fresh and dried food commodity and has the highest market share of agricultural income. Aprikoz an important apricot cultivar in particularly grown in western part of Aras valley located in Eastern Anatolia in Turkey. With long growing period, different types of Aprikoz cultivar has been shown in field in terms of tree and fruit characteristics. This study aimed to determine of some important fruit characteristic of eight accession of Aprikoz cultivar grown in Kagizman district located in western part of Aras valley. The accessions were compared each other in terms of fruit weight, flesh/seed ratio, soluble solid content, titratable acidity, total antioxidant capacity and total phenolic content. The results revealed that accessions statistically highly differed from each other for all of the searched parameters. The accessions exhibited fruit weight, fruit flesh/seed ratio, soluble solid content and titratable acidity between 36.55 - 48.22 g, 8.67 - 13.33, 19.12 - 22.83% and 1.27 - 2.02%, respectively. Total antioxidant capacity varied from 4.17 to 6.37 mmol AA l-1 based on FRAP assay. The total phenolic contents ranged between 255 - 356 mg GAE l-1. The results can be the basis for the selection of suitable accessions for future breeding activities in apricot.

**Keywords:** Apricot, diversity, phytochemicals, breeding

<sup>1</sup> Neva KARATAŞ ([Orcid ID: 0000-0003-4426-3761](https://orcid.org/0000-0003-4426-3761)), Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Health Sciences, Ataturk University, Erzurum, Turkey,

\* Corresponding Author: Neva KARATAŞ, e-mail: ngungor@atauni.edu.tr

## INTRODUCTION

Apricot (*Prunus armeniaca* L.) is among the stone fruits as peach, plum, sweet cherry, sour cherry etc. and was originated in China and the references of their culture go back to 3 000 BC. From origin center, it was spread first to India later to Persia and Anatolia, finally arriving at Europe and North America. It is evident that it spread from Spain to America where it underwent acclimatization to tempered areas, mainly in California and along the river Mississippi (Lingdi and Bartholomew, 2003; Yilmaz and Gurcan, 2012; Gecer et al., 2020).

Currently, the countries that are closer to origin center of China such as Pakistan, Uzbekistan, Iran and Turkey are the main apricot producing countries. Worldwide 3 900 000 tons of apricot are produced per year and Turkey is the largest apricot producer in the world with 800 000 tons production volume per year. Uzbekistan and Iran comes second and third place with 662 000 and 306 000 tons yearly production. The main producer in European continent is Spain, France and Greece but the amount of production per year is getting decreasing. Those countries produce 125 000 tons, 110 000 tons and 79 000 tons apricot per years, respectively (FAO, 2019).

Turkey is accepted second homeland of apricot (*Prunus armeniaca* L.) and the country leading both fresh and dried apricots in the world for a long time. In Turkey, several places are important for apricot production and those including Malatya-Elazig region, Aras Valley, Erzincan Plain, Cappadocia and Mut region (Akin et al., 2008; Ercisli, 2009).

Aras valley (Kars-Igdir region) is one of the important apricot cultivation areas of Turkey. The valley has the oldest apricot growing area in Turkey. This region, which has a suitable microclimate feature for fruit growing in the harsh continental climate area of the Eastern Anatolia Region, stands out in terms of some features, although it meets approximately 7% of the country's apricot production. Apricot trees in the valley has high yield per tree, high table quality, especially its being exported because of its aromatic properties, are its important advantages. Kagizman district provides almost all of the apricot production in Kars province. In the district, Aprikoz, Sekerpare and wild apricots are grown. Aprikoz, a table cultivar, has the highest plantation area and is mostly grown on the flat land, is marketed abroad and generates high income (Ates and Calikoglu, 2017).

The apricot trees have pale yellow or orange fruits with some red shades in the zone where they have been exposed to the sun. The pulp is not very juicy, it has fibre texture and farinaceous consistency when the fruit is mature. It is mainly consumed fresh, although it is also used to make some by-products like stewed fruit, jams, juices and dried apricots. The skin is downy and pulp has a pleasant firm texture (Ruiz et al., 2008).

The apricot fruit is characterized by the presence high carbohydrate and dietary fibre as well as low concentrations of fats (Leccese et al., 2011). Apricot fruits contain important amounts of essential minerals that include potassium, phosphorus, calcium, magnesium, iron and selenium (Munzuroglu et al., 2003; Ali et al., 2011). The vitamins found in apricot fruits are pro-vitamin A, vitamins C, K, E, thiamin (B1), riboflavin (B2), niacin (B3), pyridoxine (B6), folic acid (B9) and pantothenic acid. Apricot fruits contain malic and citric acid as major organic acids (Gurrieri et al., 2001).

Apricot fruits contain also important amounts of bioactive compounds and antioxidants, including vitamins, phenolic acids, carotenoids, and flavonoids. The fruit is a very rich  $\beta$ -carotene source (Hegedus et al., 2010; Sochor et al., 2010).  $\beta$ -carotene, the precursor of vitamin A, is necessary for the functions of epithelial tissue that surrounds the organs, eye health, bone and tooth development and endocrine glands. Vitamin A also plays an important role in growth and reproduction, and resistance of the body against infections (Selamoglu and Erdemli, 2017).



Natural phenolic compounds continue to attract the interest of numerous scientists due to possible relations between their content in diet and lower incidence of cancer or cardiovascular diseases (Sochor et al. 2010). Determination of total antioxidant capacity is one of the ways of expressing the biological and nutritional value of fruits (Gazdik et al. 2008).

The aim of the study was to evaluate and compare the fruit morphological traits, biochemical content and antioxidant potential of eight accessions of cv. Aprikoz and thus to reveal the benefit potential of the accessions to use them for future breeding efforts on apricot.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Material

In this study eight Aprikoz accessions were sampled from Kagizman district in 2017. Fruit weight (g) and flesh/seed ratio of 40 randomly selected fruits of each Aprikoz accessions was measured. Soluble solid content (SSC), expressed as percentage (%), was determined in the juice of each sample using a digital refractometer. Titratable acidity was determined by titrating 10 ml of 1:10 diluted apricot pulp (10 g) with 0.1 M NaOH. Antioxidant capacity was determined using the FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) assay (Benzie and Strain, 1996). Absorbance was measured at 593 nm at 0 and 6 min. Ascorbic acid (AA) was used as control to obtain the standard curve and FRAP value was calculated relevant to the activity of AA and expressed as AA equivalents. Total phenolic content was measured using Folin-Ciocalteu's reagent according to the method of Singleton and Rossi (1965).

### Statistical Analysis

All data were analyzed using SPSS software and procedures. Analysis of variance tables were constructed using the Least Significant Difference (LSD) method at  $p < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

Differences were noted between apricot accessions belongs to Aprikoz cultivar for most of the evaluated physical and biochemical traits (Tables 1 and 2) shows that the elite accessions AP1, AP2, AP4, AP6 and AP7 presented fruits with weight  $>40$  g, and fruits with lower weight were verified in the elite accessions AP3, AP5 and AP8, respectively (Table 1).

Table 1 shows fruit weight and flesh/seed ratio of eight Aprikoz accessions. There were statistically significant differences among accessions in terms of fruit weight and flesh/seed ratio at 0.05 statistical levels. The highest fruit weight was obtained from AP6 accession as 48.22 g and followed by AP2 accession as 45.23 g while the lowest fruit weight values was obtained in AP3 accession as 36.55 g, respectively (Table 1).

**Table 1.** Fruit weight and flesh/seed ratio of eight Aprikoz accessions

| Accessions | Fruit weight (g) | Flesh/seed ratio |
|------------|------------------|------------------|
| AP1        | 40.15c           | 9.35bc           |
| AP2        | 45.23ab          | 11.18b           |
| AP3        | 36.55d           | 8.95c            |
| AP4        | 44.55b           | 13.33a           |
| AP5        | 38.18cd          | 9.78bc           |
| AP6        | 48.22a           | 11.87b           |
| AP7        | 41.40bc          | 12.07ab          |
| AP8        | 37.55cd          | 8.67c            |

There were significant ( $P < 0.05$ ) differences among the different letters in the same lines

The flesh/seed ratio is an important fruit characteristic for apricots. The eight accessions had fruit flesh/seed ratio between 8.67 (AP8) and 13.33 (AP4) (Table 1). The flesh seed ratio of the accessions was in descending order AP4 (13.33) > AP7 (12.07) > AP6 (11.87) > AP2 (11.18) > AP5 (9.78) > AP1 (9.35) > AP3 (8.95) > AP8 (8.67), respectively (Table 1).

Fruit weights were found between 36.55 - 48.22 g among 8 accessions in Aprikoz cultivar. In Turkey, standard national apricot cultivars have relatively small size fruits. Akin et al. (2008) also supported this idea and reported fruit weight between 21.16 - 38.24 g among the most important national apricot cultivars grown in Malatya region in Turkey. Yilmaz et al. (2012) reported that 92-23-02, Kayseri (PA), Hirmanli and Tekeler apricot genotypes in Turkey had very small fruits, 01-K-12, 31-K-03, 31-K-04, Sakit-2, Sakit-4, Dortyol-1, Dortyol-4, 92-58-03, Kadioglu-12, Tevfik Yildirim, Akcadag Gunay, Sivas (PA), Kurukabuk, Proyma had small fruits. Asma and Ozturk (2005) reported that 128 Turkish apricot genotypes placed in the Iran-Caucasian ecogeographical group generally had low fruit weight. The authors reported that the fruit weight of only 7 apricot cultivars was over 50 g, and the others had lower fruit weights. The reason could be all Turkish national apricot cultivars obtained from wild populations by using selection method. Gulcan et al. (2006) reported that apricot cultivars had diverse fruit weight and Agerik had the highest fruit weight and Hacikiz had lowest.

The flesh/seed ratio is an important fruit characteristic for apricots (Ercisli, 2009). The eight accessions had fruit flesh/seed ratio 8.67 (AP8) and 13.33 (AP4) (Table 1). Yilmaz et al. (2012) reported flesh/seed ratio on Levent and Ozal apricot cultivars grown in Malatya between 7.90 - 10.38 and 10.94 - 13.58 according to years. Previously the flesh/seed ratios of the foreign apricot cultivars grown in Turkey varied between 8.9 and 21.8 (Polat and Yilmaz, 1988; Polat et al., 2004).

Table 2 shows SSC, titratable acidity, total antioxidant capacity and total phenolic content of eight Aprikoz accessions. As indicated in Table 2 all searched above parameters revealed statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

**Table 2.** Soluble Solid Content (SSC), Titratable Acidity, Antioxidant Activity (FRAP assay) and Total Phenolic Content (TPC) of eight Aprikoz accessions

| Accessions | SSC (%) | Titratable acidity (%) | Total Antioxidant Capacity (mmol AA l <sup>-1</sup> ) | Total phenolic content (mg GAE100 g <sup>-1</sup> FW) |
|------------|---------|------------------------|---|---|
| AP1        | 20.44bc | 1.27c                  | 5.44bc  | 327ab   |
| AP2        | 21.67ab | 1.87ab                 | 5.07c   | 302b  |
| AP3        | 19.12c  | 1.44bc                 | 6.37a   | 356a  |
| AP4        | 22.14ab | 2.02a                  | 4.87cd  | 293bc   |
| AP5        | 19.56bc | 1.57b                  | 6.06ab  | 310ab   |
| AP6        | 22.83a  | 1.90ab                 | 4.17e   | 255c  |
| AP7        | 21.02b  | 1.63b                  | 5.87b   | 330ab   |
| AP8        | 20.07bc | 1.44bc                 | 4.50d   | 278bc   |

There were significant ( $P < 0.05$ ) differences among the different letters in the same lines

SSC content and titratable acidity of accessions were found in range of 19.12% (AP3) and 22.83% (AP6) and 1.27% (AP1) and 2.02% (AP4), respectively (Table 2). The SSC ratios of the accessions were in descending order AP6 (22.83) > AP4 (22.14) > AP2 (21.67) > AP7 (21.02) > AP1 (20.44) > AP8 (20.07) > AP5 (19.56) > AP3 (19.12), respectively (Table 2).

As showed in Table 2, the accessions were evaluated for both total antioxidant capacity (FRAP values) and total phenolic content (TPC) and they differed each other statistically for both parameters. The total antioxidant capacity determined as FRAP values and the highest value were determined in AP3 genotype as 6.76 mmol AA l<sup>-1</sup> and followed by AP5 as 6.06 mmol AA l<sup>-1</sup>, AP7 as 5.87 mmol AA l<sup>-1</sup>,

respectively. The lowest antioxidant capacity was obtained from AP6 genotype as 4.17 mmol AA l-1 (Table 2). The total phenolic contents (TPC) ranged between 255 mg GAE l-1 (AP6 genotype) to 356 mg GAE l-1 (AP3 genotype), respectively (Table 2). The highest TPC content were found in AP3 as 356 mg GAE l-1 and followed by AP7 (330 mg GAE l-1), AP1 (327 mg GAE l-1), AP5 (310 mg GAE l-1), AP2 (302 mg GAE l-1), AP4 (293 mg GAE l-1), AP8 (278 mg GAE l-1) and AP6 (255 mg GAE l-1), respectively.

SSC content and titratable acidity of accessions were found in range of 19.12% (AP3) and 22.83% (AP6) and 1.27% (AP1) and 2.02% (AP4), respectively (Table 2). Previous studies showed that there was a great diversity among apricot cultivars in terms of SSC and titratable acidity. Akin et al. (2008) reported that the most important Turkish apricot cultivars had SSC and titratable acidity between 10.20 and 23.65% and 0.08 and 1.00%, respectively. Gulcan et al. (2006) reported that Abuzer Gülen had the highest acidity value and Ziraat Okulu had the lowest SSC among national apricot cultivars in Turkey. SSC or sugar content in fruits represents from 10 - 20% of the fruit's fresh weight and increases as fruit matures to produce a less acidic, sweeter fruit. During the ripening process stone fruit acids are degraded, the sugar content increases, and the sugar/acid ratio reaches a higher value. A high level of acidity - common in under - ripe fruit - makes the fruit taste sour. Conversely, over-ripe fruits have very low levels of fruit acid and therefore lack characteristic flavor. It is important that the grower aims to produce an acceptable balance of SSC and fruit acidity. The SSC/acid ratio is a key characteristic determining the taste, texture and feel of fruit segments. It contributes towards giving many fruits their characteristic flavor. It is also an indicator of commercial and sensory ripeness (Kelebek and Selli, 2011; Ronggao et al., 2015). These SSC results of eight Aprikoz accessions are claimed that enough genetic diversity exists in Aprikoz accessions to mitigate the adverse effects of climate warming on fruit quality.

The total antioxidant capacity determined as FRAP values were between 5.87 - 6.76 mmol AA l-1. The total phenolic contents (TPC) ranged between 255 mg GAE-1 (AP6 genotype) to 356 mg GAE l-1 (AP3 genotype), respectively (Table 2). Previously total antioxidant capacity of a wide number of apricot cultivars was found between 0.47 - 14.00 mmol l-1 (Hegedus et al. 2010). Same study also indicated wide differences among TPC (Total phenolic content) among same apricot cultivars between 120-890 mg mg GAE l-1 Results of this study indicating that Aprikoz accessions rich for antioxidant capacity and phenolic contents as well. In fact, apricot fruits have been considered as having enhanced functional properties for a long time and this study is also confirm of this idea.

Previous studies indicated that as with other stone fruits, several factors were shown to influence the fruit antioxidant capacity, including geographic region, maturity stage, and length of the fruit development period (Dragovic-Uzelac et al. 2007; Drogoudi et al. 2008; Serrano et al. 2009). However, genotype proved to be the most important factor influencing the fruits' redox parameters and antioxidant contents (Sass-Kiss et al. 2005; Hegedus et al. 2010).

## CONCLUSION

As a conclusion, we found significant differences between the accessions for most of the tested physical and biochemical characteristics of fruits in this study. Of the 8 accessions, AP1 genotype presented with the highest fruit weight, being the third highest total phenolic content. The study population showed genetic variability, allowing new selection and recombination cycles to gain pulp yield, bioactive content and fruit weight. The accessions AP1 and AP3 accessions were reported to be the most divergent among the other accessions. These 2 elite accessions should; therefore, be considered as parent plants in further studies of general and specific combining ability with other selected breeds for productivity within the apricot-breeding program.

### Conflict of Interest

I declare that there is no conflict of interest during the planning, execution and writing of the article.

### Author's Contributions

I hereby declare that the planning, execution and writing of the article was done by me as the sole author of the article.

### REFERENCES

- Akin EB, Karabulut I, Topcu A, 2008. Some compositional properties of main Malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. Food Chemistry, 107: 939-948.
- Ali S, Masud T, Abbasi KS, 2011. Physico-chemical characteristics of apricot (*Prunus armeniaca* L.) grown in Northern Areas of Pakistan. Scientia Horticulture, 130 (2): 386-392.
- Asma BM, Ozturk K, 2005. Analysis of morphological, pomological and yield characteristics of some apricot germplasm in Turkey. Genetic Resources and Crop Evolution, 52: 305-313.
- Atis E, Celikoglu S, 2017. Apricot producing in Kagizman district and its contribution to the economy of territory. Marmara Geographical Journal, 36: 191-205.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239: 70-76.
- Dragovic-Uzelac, V., Levaj, B., Mrkic, V., Bursac, D., Boras, M., 2007. The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region. Food Chemistry, 102: 966-975.
- Drogoudi, P.D., Vemmos, S., Pantelidis, G., Petri, E., Tzoutzoukou, C., Karayiannis, I., 2008. Physical characters and antioxidant, sugar, and mineral nutrient contents in fruit from 29 apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars and hybrids. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 56: 10754-10760.
- Ercisli S, 2009. Apricot culture in Turkey. 2009. Scientific Research and Essays, 4:715-719.
- FAO (2019). Crop Statistical database.
- Gazdik Z, Reznicek V, Adam V, Zitka O, Jurikova T, Krska B, Matuskovic J, Plsek J, Saloun J, Horna A, Kizek R, 2008. Use of liquid chromatography with electrochemical detection for the determination of antioxidants in less common fruits. Molecules, 13: 2823-2836.
- Gecer MK; Kan T, Gundogdu M, Ercisli S, Ilhan G, Sagbas HI (2020). Physicochemical characteristics of wild and cultivated apricots (*Prunus armeniaca* L.) from Aras valley in Turkey. Genetic Resources and Crop Evolution, 67: 935-945.
- Gulcan R, Mısırlı A, Sağlam H, Yorgancıoğlu U, Erkan S, Gümüş M, Ölmez HA, Derin K, Paydaş S, Eti S, Demir T, (2006) Properties of Turkish apricot landraces. Acta Horticulturae, 701: 191-198.
- Gurrieri F, Audergon JM, Albagnac G, Reich M, 2001. Soluble sugars and carboxylic acids in ripe apricot fruit [SEP]as parameters for distinguishing different cultivars. Euphytica, 117:183-189.
- Hegedus A, Engel R, Abranko L, Balogh E, Blazovics A, Herman R, Halasz J, Ercisli S, Pedryc A, Stefanovits-Banyai E, 2010. Antioxidant and antiradical capacities in apricot (*Prunus armeniaca* L.) fruits: Variation from genotypes, years, and analytical methods. Journal of Food Science, 75 (9):C722–C730.
- Kelebek H, Selli S, 2011. Determination of volatile, phenolic, organic acid and sugar components in a Turkish cv. Dortyol (*Citrus sinensis* L. Osbeck) orange juice. Journal of the Science of Food and Agriculture, 9: 1855-1862.

- Leccese A, Viti R, Bartolini S, 2011. The effect of solvent extraction on antioxidant properties of apricot fruit. *Central European Journal of Biology*, 6(2):199-204. [11]
- Lingdi L, Bartholomew B, 2003. *Armeniaca*. In: *Flora of China* (eds Wu CY, Raven PH), pp. 396–401. Science Press and Missouri Botanical Garden Press, Beijing.
- Munzuroglu O, Karatas F, Geckil H, 2003. The vitamin and selenium contents of apricot fruit of different varieties cultivated in different geographical regions. *Food Chemistry*, 83:205-212. [11]
- Polat AA, Yilmaz M, 1988. Investigations on the adaptations of some native and foreign apricot cultivars to Adana ecological conditions. *Journal of Science and Engineering*, 2: 127-146.
- Polat AA, Durgac C, Kamiloglu O, Caliskan O, 2004. Investigation on the adaptation of some low-chill apricot cultivars to Kirikhan (Turkey) ecological conditions. *Acta Horticulturae*, 636:395-400.
- Ronggao G, Wei Y, Zhihui W, Mingan L, Guolu L, 2015. Study on the sugar-acid ratio and relevant metabolizing enzyme activities in navel orange fruits from different eco-regions. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 37:835-844.
- Ruiz D, Egea J, Tomas-Barberan FA, Gil MI, 2005. Carotenoids from new apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties and their relationship with flesh and skin color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 6368-6374.
- Sass-Kiss A, Kiss J, Milotay P, Kerek MM, Toth-Markus M. 2005. Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food Research International*, 38: 1023-1029.
- Selamoglu Z, Erdemli ME, 2017. The significance of apricot in human health and nutrition. *Biochemistry & Molecular Biology Journal*, 3:2??
- Serrano, M., Diaz-Mula, H.M., Zapata, P.J., Castillo, S., Guillen, F., Martinez-Romero, D., Valverde, J.M., Valero, D., 2009. Maturity stage at harvest determines the fruit quality and antioxidant potential after storage of sweet cherry cultivars. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57: 3240-3246.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal Enology and Viticulture*, 16:144-158.
- Sochor, J., Zitka, O., Skutkova, H., Pavlik, D., Babula, P., Krska, B., Horna, A., Adam, V., Provaznik, I., Kizek, R. (2010). Content of phenolic compounds and antioxidant capacity in fruits of apricot genotypes. *Molecules*, 15(9):6285-6305.
- Yilmaz, K.U., Paydas Kargi, S., Kafkas, S., 2010. Morphological diversity of the Turkish apricot (*Prunus armeniaca* L.) germplasm in the Irano-Caucasian ecogeographical group. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 36:688-694.
- Yilmaz KU, Gurcan K, 2012. Genetic diversity in apricot. In: *Genetic Diversity in Plants* (ed. Caliskan M), pp. 249–270. InTech Europe, Rijeka, Croatia. ISBN: 978-953-51-0185-7. <http://www.intechopen.com/books/geneticdiversity-in-plants/genetic-diversity-in-apricot>.

**To Cite:** Tok H, Ertaş N, 2021. The Effects of Germinated Seeds on Nutritional and Technological Properties of Bread. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1183-1193.

**Atıf için:** Tok H, Ertaş N, 2021. Çimlenmiş Tohumların Ekmeğin Beslenme ve Teknolojik Özellikleri Üzerine Etkileri. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1183-1193.

## The Effects of Germinated Seeds on Nutritional and Technological Properties of Bread

Hatice TOK<sup>1</sup>, Nilgün ERTAŞ<sup>1\*</sup>

**ABSTRACT:** In this study, wheat, rye and green lentil seeds were germinated at different germination period (1, 3 and 5 days), dried and ground into flour. Germinated seed flours were substituted for wheat flour at different ratios (0, 5, 10 and 15%) in bread making; it was carried out in order to increase nutritional and functional properties of bread. As the germination period increased, L\* values of germinated seed flour decreased, a\*, b\* and chroma values increased. The highest protein value was observed in germinated green lentils. Increase germination time resulted in increase in the ash content and minerals (calcium, magnesium and iron) and decrease in phytic acid. Increase in the level of supplementation of germinated flour in bread making, decrease in L\* and hue angle values, increase in a\*, b\* and saturation index values were observed. Soft bread crumb were observed at the 3rd day hardness with using 15% germinated seed flour. The highest phytic acid value among the bread samples was observed with control bread samples. Using all germinated flours in formulation led to a higher total phenolic content than control sample. Among the bread samples, the highest calcium, magnesium and phosphorus values of bread samples were obtained with germinated rye flour addition. The highest iron and potassium values were observed with green lentil flour addition. The 5% substitution rate was defined as an acceptable value in terms of bread volume and specific volume values.

**Keywords:** Germination, bread, phytic acid, phenolic, functional properties

### Çimlenmiş Tohumların Ekmeğin Beslenme ve Teknolojik Özellikleri Üzerine Etkileri

**ÖZET:** Bu çalışmada buğday, çavdar ve yeşil mercimek farklı sürelerde (1, 3 ve 5 gün) çimlendirilmiş, kurutulmuş ve un haline getirilmiştir. Çimlenmiş tohum unları ekmeğin besinsel ve fonksiyonel özelliklerini geliştirmek amacıyla buğday unu yerine farklı oranlarda (% 0, 5, 10 ve 15) yer değiştirilerek kullanılmıştır. Çimlenme süresi arttıkça çimlenmiş tohum unu L \* değerleri azalırken a \*, b \* ve chroma değerleri artmıştır. En yüksek protein değeri çimlendirilmiş yeşil mercimeklerde gözlenmiştir. Artan çimlenme süresi, kül ve mineral değerlerinde (kalsiyum, magnezyum ve demir) artmaya, fitik asit değerinde ise azalmaya sebep olmuştur. Ekmek örneklerinde artan çimlenmiş tohum unları ile parlaklık ve hue angle değerlerinde bir azalma, kırmızılık, sarılık ve saturation index değerlerinde bir artış gözlenmiştir. %15 çimlenmiş tohum unu içeren ekmek örneklerinde daha düşük 3. gün sertlik değeri elde edilmiştir. En yüksek fitik asit değeri kontrol örneğinde belirlenmiştir. Ekmek formülasyonuna çimlenmiş tohum unu ilavesi ile kontrol örnekten daha yüksek toplam fenolik madde içeriği elde edilmiştir. En yüksek kalsiyum, magnezyum ve fosfor değeri çavdar içeren ekmek örneklerinde belirlenirken en yüksek demir ve potasyum değeri yeşil mercimek unu ilavesiyle bulunmuştur. Ekmek hacim ve spesifik hacim değerleri açısından değerlendirildiğinde %5 kullanım oranı kabul edilebilir olarak belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Çimlendirme, ekmek, fitik asit, fenolik, fonksiyonel özellikler

<sup>1</sup> Hatice TOK ([Orcid ID: 0000-0002-8982-6428](https://orcid.org/0000-0002-8982-6428)), Nilgün ERTAŞ ([Orcid ID: 0000-0002-0671-2485](https://orcid.org/0000-0002-0671-2485)), Necmettin Erbakan University, Engineering and Architecture Faculty, Food Engineering Department, Konya, Turkey

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Nilgün ERTAŞ, e-mail: dr.nilgunertas@gmail.com

This study was supported by the Necmettin Erbakan University Research Foundation (Project number: 161319017).

## INTRODUCTION

Germinating is whole of the metabolic activities enabling the breakdown of proteins, the oxidation of lipids and the simplification of carbohydrates to supply some necessary essential components and energy for the development and growth of plants. Germination begins with the intake of water by the dormant dry seed and usually ends with root emergence (Bewley and Black, 1994).

One of the most important reasons for this is that the germination process is not expensive and the other is that it does not require complicated equipment. While germination of seeds, especially wheat and some cereals such as barley and oat is a common practice today, alfalfa, broccoli, soybean, chickpea, clover, pea and some other cereal grains are germinated and consumed as sprouts (Yetim et al., 2010).

Pea, lentil, bean (Kuo et al., 2004), cowpea, chickpea and mung bean (Ghavidel and Prakash, 2007), rye (Katina et al., 2007), rice (Kim et al., 2012), lupine (Ertaş, 2015), were used among the studies on the nutritional changes of the germination.

When germinated seed compared with raw seeds; it seems to have higher vitamin content, higher phenolic substance, higher quality protein, higher amount of aromatic amino acids and more polyunsaturated fatty acids (Öztürk, 2008). Considerable increase in the amount of bioactive compounds such as dietary fiber, magnesium, zinc, potassium, tocotrienols, prolylendopeptidase inhibitor gamma aminobutyric acid,  $\gamma$ -oryzanol and ferulic acid were reported by Kayahara et al. (2000) in germinated brown rice. After germination of seed, the amount of triglycerides and energy in the dry matter decreased; ash, crude fiber, diglycerides, some amino acids and mineral substances increased in comparison to raw seed and the amount of phytic acid decreased by about 25% (Sung et al., 2005). A decrease in trypsin inhibitor activity is resulted by germination including soybeans, bean (Sangronis and Machado, 2007), and peas (Urbano et al., 2005).

It has been found that the amount of anti-nutrients decrease during germination and after germination the compounds that useful for health and phytochemical properties are formed, the increase in amino acids and ascorbic acid contribute to the bioavailability of trace minerals. It is stated that these substances plays important role for preventing many diseases and beneficial effects on blood pressure and central nervous system. Thus, functional foods that produced by germination can be improved for enhance our health (Sangronis and Machado, 2007).

In this research, seeds such as wheat, rye and green lentils were germinated, dried and ground. The germinated flours were used in breadmaking process by application as different ratios to amplify functional and nutritional characteristics of bread.

## MATERIALS AND METHODS

### Material

Wheat, rye and green lentil were purchased from common suppliers in Konya to germinate. All purpose wheat flour, bakers' yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and salt were used for bread making. Amount of water required for bread making was previously determined by a farinograph until the mixing curve reached 500 BU. Germination was done according to the jar method. In the jar method; 100 g seeds were placed in 500 ml of 0.07% sodium hypochlorite (NaClO) for 30 minutes and then washed 10 times with distilled water to neutralize pH and filtered with the excess water. Then the seeds were soaked in 1000 ml distilled water for 5 hours and shaken for 30 minutes so as to draw water. The jars were covered with thin cheesecloth so that the seeds were contacted with air. Then water (kernels: water ratio of 1:2) was added. After several times rinsing, the water was removed from the jar. The seeds were germinated at room temperature in the dark with watering every 12 h. At the

end of 1, 3 and 5 days, germinated seeds were dried in 50 °C (Nuve FN-400) and grounded in a hammer mill. Ungerminated seeds were used as control group.

### Experimental design

The experiment consists of three steps. The first step was to germinate the 3 different seeds (wheat, rye and green lentil) in 4 different germination times (0, 1, 3 and 5 days), to dry and grind, to choose the best germination period according to some physical and sensorial parameters and this step was carried out in duplicate according to the (4 x 3) x 2 trial pattern. In the second step, in the germinated seeds samples, 5-day germination time chosed the best germination period and these germinated seeds were grinded, germinated seed flours were added to wheat flour at 4 different addition level (0, 5, 10 and 15 %), bread experiments were made at these rates, and physical, chemical, nutritional and sensorial quality characteristics of the breads were determined in the second step. Four different addition levels (0, 5, 10 and 15 %) of 3 different germinated cereal and legume flour (wheat, rye and green lentils) were used in bread production and second stage of the study was carried out in duplicate according to the (3 x 4) x 2 trial pattern. Then, nutritional properties were determined in the bread samples with the best technological features, in a single dose (15 %) of 3 different cereal and leguminous flour (wheat, rye and green lentil) bread samples and control bread sample with two replications according to the 4 x 2 trial pattern and samples were compared with each other.

### Assessment of seed germination

At the end of the germination the sprout length was measured using electronic calipers. Germination rate index is calculated using the following formula;

$$GRI = \frac{N1}{G1} + \frac{N2}{G2} + \dots + \frac{Nn}{Gn} \quad (1)$$

GRI = Germination rate index

N1, N2, ..., Nn = number of seeds germinated

G1, G2, ..., Gn = Days of first count and days of last count

The germinated and non-germinated grains were counted and the yield was calculated as % (Maguire, 1962).

### Bread making procedures

Straight dough method for breadmaking (AACCI Approved 10-10.03 with some modifications) was carried out. The formulation based on flour weight, was used: 200 g flour (14% mb), 3% compressed yeast, 1.5% salt, and water up to 500 BU consistency. The dough was mixed with Hobart mixer (Hobart UK, London), divided into two equal parts, manually shaped, placed in tin pans to fermented at 65-70% humidity and 25 ± 1 °C for 30 min. Doughs were folded by passing through a cylinder and then fermented at 65-70% humidity and 25 ± 1 °C for 30 min again. Doughs were folded by passing through a cylinder and by giving a circle shape for proofing 60 min. The doughs were baked in oven (Arçelik ARMD-580, İstanbul, Türkiye) for 15 min at 250 °C. The bread quality features were evaluated after 2 h of cooling at room temperature. Bread quality characteristics included: weight, volume (determined by seed displacement method), specific volume (by dividing bread volume by bread weight), crumb color, crust color and crumb hardness (Pylar, 1988). Breads baked in two different pans were analyzed in duplicate and averaged. After 24 hours, pore structure, symmetry and textural score were evaluated (between 1-5 points).

In breadmaking experiments, the flours of germinated cereal and legume grains (at the end of the 5th day of germination period) were added at the rate of 0, 5, 10 and 15% according to the flour basis.



### Color measurements

A glass pyrex petri dish was placed between the surface of the flour samples (germinated cereal and legume seeds) and five different point of crumb and crust color of bread samples on the basis of CIELAB colour system was carried out using the CR-400 Chroma Meter (Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japan).  $L^*$  measures luminosity, between black and white,  $a^*$  measures the red coloration,  $b^*$  measures the yellow colorant of foods.

### Analytical methods

The proximate composition includes moisture contents (AACC method 44-12), ash contents (AACC Method 08-01.01), protein contents (AACC Method 46-12.01) of the samples were evaluated (AACC, 1990).

### Nutritional analysis

Phytic acid content of the samples were measured as described in Haug and Lantzsch (1983) by colorimetric ferric precipitation method. Minerals as calcium, magnesium potassium phosphorus zinc and iron were determined in samples using a ICP-AES (Varian-Vista, Switzerland) by spectroscopic method as introduced by Skujins (1998). Total phenolic content was measured by the Folin-Ciocalteu colorimetric method as described by Beta et al., (2005).

### Statistical analysis

Commercial software program (JMP, version 5.0) was used to perform statistical analyses. Data were subjected to statistical analysis of variance with two ways ANOVA and multiple comparison test ( $P < 0.05$ ) were performed to comparison of mean values. One way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey HSD test was used to evaluate differences between bread samples for nutritional analysis data at a level of significance  $P < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

Anova results of the seeds and day of germination on the composition of seed and germinated seed flours and addition level on the properties of bread samples are shown in Table 1.

### Germinated seeds properties

Effects of seeds and germination period on the germination parameters are shown in Table 2. While the highest yield value was obtained with rye sample, wheat and green lentil samples gave 55.00 and 51.50% yield values, respectively. After 5 day germination period, all grain seeds were germinated and the yield value was reached to 100%. Also germinated rye seeds showed the highest sprout length and germination rate index compared to germinated wheat and green lentil seeds. Rye seeds showed the best and fastest germination performance among the seeds. The lowest grass size and germination rate index were obtained with green lentil seeds. Increasing germination period increased the yield, grass size and germination rate index.

Germinated wheat flour (GWF) gave the highest lightness values while germinated rye flour (GRF) showed the highest redness values, the highest yellowness, SI and hue angle values were obtained with germinated green lentil flour (GGLF). After 5 day germination period, lightness ( $L^*$ ) values decreased, while the redness ( $a^*$ ), yellowness ( $b^*$ ) and chroma values increased (Table 1). The increase in chroma value could be due to the increase in reducing sugar content during germination. Similar results were observed by Öztürk (2008) that after germination of wheat,  $L^*$  values decreased,  $a^*$  and  $b^*$  values increased.

**Table 1.** Anova results of the seeds and day of germination on the composition of seed and bread samples.

| Composition of seed samples          | F values                    |                        |                                    |
|--------------------------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------------------|
|                                      | Seeds (A)                   | Day of germination (B) | Interaction effect between A and B |
| Yield (%)                            | 57.61**                     | 4170.31**              | 33**                               |
| Grass size (mm)                      | 102.04**                    | 1796.2**               | 85.10**                            |
| Germination rate index               | 384.65**                    | 2501.57**              | 58.82**                            |
| L*                                   | 560.97**                    | 1763.94**              | 478.83**                           |
| a*                                   | 321.69**                    | 55.24**                | 23.70**                            |
| b*                                   | 1232.96**                   | 47.64**                | 146.7**                            |
| SI                                   | 1215.28**                   | 49.73**                | 148.05**                           |
| Hue angle                            | 379.83**                    | 14.09*                 | 15.48**                            |
| Moisture (%)                         | 162.57**                    | 603.54**               | 182.7**                            |
| Ash (%)                              | 1369.02**                   | 36.27**                | 22.51**                            |
| Protein (%)                          | 4518.7**                    | 89.76**                | 93.52**                            |
| TPC (mg GAE kg <sup>-1</sup> )       | 30601.99**                  | 16491.62**             | 209.96**                           |
| Phytic acid (mg 100g <sup>-1</sup> ) | 91.65**                     | 528.83**               | 15.30**                            |
| Calcium                              | 11691410**                  | 4661265**              | 3419314**                          |
| Magnesium                            | 4034923**                   | 9454499**              | 5794465**                          |
| Potassium                            | 4.1672e8**                  | 4240213**              | 4450172**                          |
| Phosphorus                           | 17744049**                  | 1194227**              | 1356357**                          |
| Zinc                                 | 72056.47**                  | 19616.29**             | 10822.75**                         |
| Iron                                 | 617217.9**                  | 10267.98**             | 17228.19**                         |
| Properties of bread samples          | F values                    |                        |                                    |
|                                      | Germinated Seeds Flours (A) | Addition Level (%) (B) | Interaction effect between A and B |
| Crumb color L*                       | 12.11*                      | 67.74**                | 5.10*                              |
| Crumb color a*                       | 24.33**                     | 69.24**                | 4.61 <sup>ns</sup>                 |
| Crumb color b*                       | 287.30**                    | 76.57**                | 75.03**                            |
| Crumb color SI                       | 288.29**                    | 80.35**                | 75.63**                            |
| Crumb color Hue angle                | 16.81*                      | 42.27**                | 2.65 <sup>ns</sup>                 |
| Crust color L*                       | 19.78*                      | 17.67*                 | 4.56 <sup>ns</sup>                 |
| Crust color a*                       | 33.71**                     | 5.63 <sup>ns</sup>     | 4.57 <sup>ns</sup>                 |
| Crust color b*                       | 52.40**                     | 10.78*                 | 7.55*                              |
| Crust color SI                       | 59.53**                     | 11.36*                 | 7.49*                              |
| Crust color Hue angle                | 4.40*                       | 2.21 <sup>ns</sup>     | 3.38*                              |
| Weight (g)                           | 61.83**                     | 223.86**               | 3.41*                              |
| Volume (ml)                          | 0.87 <sup>ns</sup>          | 266.18**               | 4.16*                              |
| Specific volume (g/ml)               | 7.60*                       | 370.06**               | 5.11*                              |
| Pore (1-5)                           | 285.96**                    | 259.59**               | 48.00**                            |
| Symmetry (1-5)                       | 315.53**                    | 267.49**               | 72.23**                            |
| Texture (1-5)                        | 321.91**                    | 292.85**               | 76.62**                            |
| Hardness (24h) (g)                   | 58.88**                     | 80.17**                | 24.73**                            |
| Hardness (72h) (g)                   | 45.23**                     | 485.09**               | 39.61**                            |

ns: no significance. \*Significant at  $p < 0.05$  respectively. \*\*Significant at  $p < 0.01$ , respectively

Chemical and nutritional evaluation of germinated seeds flours are shown in Table 3. According to ANOVA results germinated seeds and germination period factors affected the moisture, ash, protein, phytic acid and total phenolic content ( $p < 0.01$ ) statistically. GRF gave the highest moisture content (10.06%), while GWF and GGLF gave lower and statistically similar ash values. The moisture contents of germinated seeds decreased from 11.03 to 7.10% after 3 day germination, and then increased from 7.10 to 10.47% after 5 day germination. The highest ash content (2.80%) obtained with GGLF and the lowest ash content determined with GWF.

Increasing germination period increased the ash content of germinated seeds and the highest ash content was obtained after 5 day germination period. GGLF showed the highest protein content among the samples. This is due to its high protein content of legumes compared to the cereals. It can be observed that germination increased the protein content. Among the germinated grains, the highest total phenolic content (3377 mgGAE kg<sup>-1</sup>) was identified with GGLF. Also after 5 day germination, the

total phenolic content increased as 57.17%. During germination the highest increase (104.95%) were observed with GGLF. Similar results were reported by Zilic et al. (2014) that the total phenolic content of 5 day germinated wheat sample was increased from 1431 to 1627 mgGAE kg<sup>-1</sup>. Also an increase in total phenolic content in germinated rye sample compared to raw rye sample reported before by Katina et al. (2007). The lowest phytic acid content was determined with GRF, while the highest was GGLF.

**Table 2.** Effect of seeds and period on germination parameters and color properties

|                           | Yield (%)                | Grass size (mm)          | Germination rate Index   | L*                      | a*                      | b*                      | SI                      | Hue angle                |
|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| <b>Seeds</b>              |                          |                          |                          |                         |                         |                         |                         |                          |
| GWF                       | 55.00±47.8 <sup>b</sup>  | 8.90±12.61 <sup>b</sup>  | 28.92±26.78 <sup>b</sup> | 82.73±4.17 <sup>a</sup> | 1.33±1.01 <sup>b</sup>  | 12.33±2.43 <sup>c</sup> | 12.42±2.46 <sup>c</sup> | 83.68±1.98 <sup>b</sup>  |
| GRF                       | 61.50±44.69 <sup>a</sup> | 12.25±17.99 <sup>a</sup> | 43.46±36.29 <sup>a</sup> | 79.32±6.22 <sup>b</sup> | 2.11±0.53 <sup>a</sup>  | 13.65±3.32 <sup>b</sup> | 13.81±3.35 <sup>b</sup> | 81.10±1.29 <sup>c</sup>  |
| GGLF                      | 51.50±47.07 <sup>c</sup> | 6.50±8.33 <sup>c</sup>   | 23.25±22.51 <sup>c</sup> | 79.51±2.35 <sup>b</sup> | -0.75±1.05 <sup>c</sup> | 21.40±2.46 <sup>a</sup> | 21.43±2.44 <sup>a</sup> | 92.06±2.98 <sup>a</sup>  |
| <b>Day of germination</b> |                          |                          |                          |                         |                         |                         |                         |                          |
| 0                         | 0.00±0.00 <sup>d</sup>   | 0.00±0.00 <sup>d</sup>   | 0.00±0.00 <sup>d</sup>   | 83.41±3.97 <sup>a</sup> | 0.14±1.18 <sup>d</sup>  | 14.60±8.32 <sup>c</sup> | 14.66±8.28 <sup>c</sup> | 85.99±5.34 <sup>ab</sup> |
| 1                         | 28.00±14.37 <sup>c</sup> | 1.03±0.08 <sup>c</sup>   | 14.00±7.18 <sup>c</sup>  | 83.12±3.73 <sup>a</sup> | 0.85±1.79 <sup>b</sup>  | 15.61±4.00 <sup>b</sup> | 15.73±3.97 <sup>b</sup> | 85.78±6.44 <sup>b</sup>  |
| 3                         | 96.00±4.06 <sup>b</sup>  | 6.00±1.10 <sup>b</sup>   | 45.50±15.18 <sup>b</sup> | 80.62±0.43 <sup>b</sup> | 0.56±1.74 <sup>c</sup>  | 15.66±3.44 <sup>b</sup> | 15.75±3.42 <sup>b</sup> | 86.85±6.26 <sup>a</sup>  |
| 5                         | 100.00±0.00 <sup>a</sup> | 29.83±9.68 <sup>a</sup>  | 68.00±15.18 <sup>a</sup> | 74.93±3.53 <sup>c</sup> | 1.78±0.88 <sup>a</sup>  | 17.29±2.74 <sup>a</sup> | 17.41±2.69 <sup>a</sup> | 85.83±3.23 <sup>a</sup>  |

For each parameter, means with similar letter in a column do not differ significantly between different germinated seed flours and addition level(p<0.05). GWF: Germinated Wheat Flour, GRF: Germinated Rye Flour, GGLF: Germinated Green Lentil Flour.

**Table 3.** Chemical and nutritional evaluation of germinated seeds flours

| Seeds                     | Moisture (%)            | Ash (%)                | Protein (%)             | TPC (mgGAE kg <sup>-1</sup> ) | Phytic acid (mg 100g <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| GWF                       | 8.45±3.03 <sup>b</sup>  | 1.26±0.34 <sup>c</sup> | 13.46±1.45 <sup>b</sup> | 2056±605 <sup>c</sup>         | 866±411 <sup>b</sup>                 |
| GRF                       | 10.06±2.33 <sup>a</sup> | 1.83±0.09 <sup>b</sup> | 13.00±2.02 <sup>c</sup> | 2665±522 <sup>b</sup>         | 654±305 <sup>c</sup>                 |
| GGLF                      | 8.52±1.54 <sup>b</sup>  | 2.80±0.08 <sup>a</sup> | 22.66±0.36 <sup>a</sup> | 3377±436 <sup>a</sup>         | 963±514 <sup>a</sup>                 |
| <b>Day of germination</b> |                         |                        |                         |                               |                                      |
| 0                         | 11.03±0.73 <sup>a</sup> | 1.75±0.88 <sup>c</sup> | 15.31±5.56 <sup>c</sup> | 2185±678 <sup>d</sup>         | 1251±217 <sup>a</sup>                |
| 1                         | 7.45±0.80 <sup>c</sup>  | 1.99±0.65 <sup>b</sup> | 17.16±4.87 <sup>a</sup> | 2347±594 <sup>c</sup>         | 1136±228 <sup>b</sup>                |
| 3                         | 7.10±2.31 <sup>d</sup>  | 2.05±0.66 <sup>b</sup> | 15.98±5.00 <sup>b</sup> | 2818±638 <sup>b</sup>         | 593±160 <sup>c</sup>                 |
| 5                         | 10.47±2.27 <sup>b</sup> | 2.07±0.63 <sup>a</sup> | 17.05±4.62 <sup>a</sup> | 3434±458 <sup>a</sup>         | 331±25 <sup>d</sup>                  |

For each parameter, means with similar letter in a column do not differ significantly between different germinated seed flours and addition level(p<0.05). GWF: Germinated Wheat Flour, GRF: Germinated Rye Flour, GGLF: Germinated Green Lentil Flour. N × 5.70 for cereal flours; N×6.25 for non-cereal TPC: Total Phenolic Content.

During germination phytic acid decreased, so the lowest phytic acid values were observed after 5 day germination period. This is due to the increasing activity of phytase enzyme in germination. At the end of the germination period of approximately 7-8 days, the complete phytate content disintegrated is reported (Ashton and Williams, 1958). In this study, the loss of phytic acid content of GRF, GWF and GGLF were 65, 74 and 79% after 5 day germination, respectively. The primary task of phytase in germinated grains is to provide inorganic phytate phosphate in the early stages of germination (Frolich et al., 1988). The enzymatic hydrolysis of the phytate in seed has great prospects for phosphorus metabolism during the germination of cereals. Ghavidel and Prakash (2007) reported that the phytic acid content of raw and germinated lentil samples were 0.197 g 100g<sup>-1</sup> and 0.157 g 100g<sup>-1</sup> and decreased during germination. Germination resulted the degradation of phytic acid thus, bioavailability of minerals and proteins increase.

The mineral contents of germinated seed flours are shown in Table 4. According to ANOVA results, the variation of seed and germination period had significant (p<0.01) effect on the mineral content. The highest calcium, potassium, phosphorus, zinc and iron content were observed with germinated green lentil seeds. Germinated rye seeds gave the highest magnesium values. During the germination period calcium, magnesium and iron content increased by increasing germination time.

While potassium, phosphorus and zinc content of the germinated seeds increased until the 3<sup>rd</sup> day of the germination, and then decreased.

**Table 4.** Mineral content of geminated seeds flour (mg 100g<sup>-1</sup>)

| Seeds              | Calcium                  | Magnesium                 | Potassium                  | Phosphorus                 | Zinc                   | Iron                   |
|--------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------|------------------------|
| GWF                | 71.92±12.06 <sup>c</sup> | 132.57±55.20 <sup>c</sup> | 319.49±96.57 <sup>c</sup>  | 264.53±66.88 <sup>c</sup>  | 1.92±0.82 <sup>c</sup> | 2.23±0.64 <sup>c</sup> |
| GRF                | 84.89±15.19 <sup>b</sup> | 160.39±19.54 <sup>a</sup> | 521.17±44.28 <sup>b</sup>  | 358.01±18.31 <sup>b</sup>  | 3.05±0.57 <sup>b</sup> | 3.17±0.50 <sup>b</sup> |
| GGLF               | 93.65±5.20 <sup>a</sup>  | 145.07±6.44 <sup>b</sup>  | 1016.26±51.11 <sup>a</sup> | 432.38±23.08 <sup>a</sup>  | 3.38±0.39 <sup>a</sup> | 6.58±0.80 <sup>a</sup> |
| Day of germination |                          |                           |                            |                            |                        |                        |
| 0                  | 74.39±15.25 <sup>d</sup> | 110.23±51.96 <sup>d</sup> | 562.98±370.47 <sup>d</sup> | 316.62±123.76 <sup>d</sup> | 2.17±0.98 <sup>d</sup> | 3.54±2.15 <sup>d</sup> |
| 1                  | 81.62±9.68 <sup>c</sup>  | 151.06±8.43 <sup>c</sup>  | 611.97±302.22 <sup>c</sup> | 350.58±74.46 <sup>c</sup>  | 3.05±1.26 <sup>b</sup> | 3.94±1.48 <sup>c</sup> |
| 3                  | 84.24±14.44 <sup>b</sup> | 156.79±7.93 <sup>b</sup>  | 656.09±348.24 <sup>a</sup> | 373.24±71.06 <sup>a</sup>  | 3.20±0.21 <sup>a</sup> | 4.20±2.65 <sup>b</sup> |
| 5                  | 93.68±13.55 <sup>a</sup> | 165.95±21.52 <sup>a</sup> | 644.85±273.27 <sup>b</sup> | 366.13±43.80 <sup>b</sup>  | 2.72±0.35 <sup>c</sup> | 4.30±2.08 <sup>a</sup> |

For each parameter, means with similar letter in a column do not differ significantly between different germinated seed flours and addition level(p<0.05). GWF: Germinated Wheat Flour, GRF: Germinated Rye Flour, GGLF: Germinated Green Lentil Flour.

### Quality Properties of Bread

In the breadmaking process, the seeds germinated in 5-day were used. These germinated seeds were grinded to flour and substituted by wheat flour at 4 different addition levels (0, 5, 10 and 15 %). The physical, chemical, nutritional and sensorial quality characteristics of the breads were determined. The highest L\* and hue angle values and the lowest a\*, b\* and SI values of bread crumb were measured with GGLF. GRF addition showed the highest redness while the GWF addition showed the highest yellowness values of bread crumb color. As can be seen in Table 5, increasing level of germinated flour showed the decrease in lightness and hue angle values and more matt appearance was obtained on bread samples, whereas an increase in the values of redness, yellowness and saturation index was detected. Similar result occurred in another study investigated by Herken (2007), when the level of germinated cowpea flour increased in pasta, lightness decreased. This result could be explained with lysine amino acid release as a result of germination. Ribose glucose, maltose and lactose, which is formed as a result of disintegration of starch, is caused by browning (Maillard reaction) as a result of combining, as well as free amino acids and peptides (Goesaert et al., 2005). In another study, the bread made with germinated chickpea flour exhibited the the darkest bread crumb, the a\* value was high in germinated chickpea bread (Quazib et al., 2016).

**Table 5.** Crumb color values of bread samples produced with germinated seed flours

|                  | Crumb color              |                        |                         |                         |                         | Crust color             |                          |                         |                         |                          |
|------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
|                  | L*                       | a*                     | b*                      | SI                      | Hue angle               | L*                      | a*                       | b*                      | SI                      | Hue angle                |
| <b>GSF</b>       |                          |                        |                         |                         |                         |                         |                          |                         |                         |                          |
| GWF              | 65.79±5.86 <sup>ab</sup> | 1.34±0.95 <sup>b</sup> | 21.70±5.58 <sup>a</sup> | 21.75±5.60 <sup>a</sup> | 86.58±2.25 <sup>a</sup> | 47.70±4.72 <sup>b</sup> | 10.80±1.61 <sup>b</sup>  | 15.16±2.85 <sup>b</sup> | 18.63±3.14 <sup>b</sup> | 54.34±3.00 <sup>b</sup>  |
| GRF              | 64.21±4.83 <sup>b</sup>  | 1.99±1.34 <sup>a</sup> | 17.05±1.24 <sup>b</sup> | 17.20±1.36 <sup>b</sup> | 83.58±4.09 <sup>b</sup> | 45.82±5.19 <sup>b</sup> | 10.47±1.06 <sup>b</sup>  | 14.76±3.64 <sup>b</sup> | 18.16±3.39 <sup>b</sup> | 53.80±6.18 <sup>b</sup>  |
| GGLF             | 67.58±2.89 <sup>a</sup>  | 0.96±0.63 <sup>c</sup> | 14.87±0.89 <sup>c</sup> | 14.91±0.87 <sup>c</sup> | 86.23±2.50 <sup>a</sup> | 51.84±2.19 <sup>a</sup> | 13.33±1.00 <sup>a</sup>  | 21.37±2.70 <sup>a</sup> | 25.21±2.70 <sup>a</sup> | 57.90±2.26 <sup>a</sup>  |
| <b>Level (%)</b> |                          |                        |                         |                         |                         |                         |                          |                         |                         |                          |
| 0                | 70.88±0.30 <sup>a</sup>  | 0.21±0.02 <sup>d</sup> | 15.88±0.55 <sup>c</sup> | 15.88±0.55 <sup>c</sup> | 89.25±0.07 <sup>a</sup> | 53.31±0.69 <sup>a</sup> | 12.21±0.28 <sup>a</sup>  | 18.78±0.37 <sup>a</sup> | 22.39±0.4 <sup>a</sup>  | 56.97±0.53 <sup>a</sup>  |
| 5                | 67.76±2.87 <sup>b</sup>  | 1.10±0.43 <sup>c</sup> | 19.18±6.42 <sup>b</sup> | 19.22±6.41 <sup>b</sup> | 86.43±1.72 <sup>b</sup> | 47.26±4.99 <sup>b</sup> | 10.95±1.83 <sup>ab</sup> | 16.11±4.28 <sup>b</sup> | 19.51±4.51 <sup>b</sup> | 55.23±3.49 <sup>ab</sup> |
| 10               | 64.76±2.48 <sup>c</sup>  | 1.88±0.69 <sup>b</sup> | 16.34±1.81 <sup>c</sup> | 16.45±1.84 <sup>c</sup> | 83.48±2.19 <sup>c</sup> | 45.58±4.96 <sup>b</sup> | 10.84±2.58 <sup>b</sup>  | 14.84±5.30 <sup>b</sup> | 18.46±5.56 <sup>b</sup> | 52.84±7.06 <sup>b</sup>  |
| 15               | 60.04±3.22 <sup>d</sup>  | 2.54±0.94 <sup>a</sup> | 20.09±5.04 <sup>a</sup> | 20.27±5.03 <sup>a</sup> | 82.68±2.77 <sup>c</sup> | 47.67±3.91 <sup>b</sup> | 12.13±1.55 <sup>b</sup>  | 18.66±4.90 <sup>a</sup> | 22.30±4.91 <sup>a</sup> | 56.35±3.85 <sup>ab</sup> |

For each parameter, means with similar letter in a column do not differ significantly between different germinated seed flours and addition level(p<0.05). GWF: Germinated Wheat Flour, GRF: Germinated Rye Flour, GGLF: Germinated Green Lentil Flour. GSF: Germinated Seed Flour

In literature, crust color of bread, melanoidin content and antioxidant capacity values were depends on baking time, sugar content and temperature (Shen et al. 2018). The amylase activity in the germination can improve the overall digestion and absorption of products, and also increase reducing sugar content. The addition of GGLF gave the highest lightness, redness, yellowness, saturation index and hue angle values in bread crust color. GWF and GRF showed similar color properties according to

lightness, redness, yellowness, SI and hue angle values. The increment in the addition level of germinated seed flours caused reduction in lightness and redness values. Shen et al. (2018) reported that breads containing sugar had less yellowish and darker crust color. In this study, addition the germinated seed flour up to 10% usage level showed a decrease in yellowness, saturation index and hue angle values, while more than 10% usage level of germinated seed flour caused a slight increase in these color properties.

**Table 6.** Effects of germinated seed flours and addition level on bread properties

|                           | Weight<br>(g)            | Volume<br>(ml)            | Specific<br>volume<br>(g/ml) | Pore<br>(1-5)          | Symmetry<br>(1-5)      | Texture<br>(1-5)       | Hardness<br>(24h) (g) | Hardness<br>(72h) (g) |
|---------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>GSF</b>                |                          |                           |                              |                        |                        |                        |                       |                       |
| GWF                       | 144.25±3.92 <sup>c</sup> | 357.50±36.15 <sup>a</sup> | 2.48±0.26 <sup>a</sup>       | 4.05±0.77 <sup>b</sup> | 3.97±0.80 <sup>b</sup> | 3.81±1.00 <sup>b</sup> | 550±352 <sup>c</sup>  | 1240±804 <sup>b</sup> |
| GRF                       | 145.00±4.31 <sup>b</sup> | 353.75±38.52 <sup>a</sup> | 2.44±0.27 <sup>ab</sup>      | 3.86±0.69 <sup>c</sup> | 3.96±0.88 <sup>b</sup> | 3.67±0.73 <sup>c</sup> | 687±254 <sup>b</sup>  | 1177±825 <sup>b</sup> |
| GGLF                      | 147.75±3.20 <sup>a</sup> | 355.00±35.05 <sup>a</sup> | 2.40±0.25 <sup>b</sup>       | 4.81±0.18 <sup>a</sup> | 4.94±0.09 <sup>a</sup> | 4.73±0.24 <sup>a</sup> | 958±382 <sup>a</sup>  | 1555±662 <sup>a</sup> |
| <b>Addition level (%)</b> |                          |                           |                              |                        |                        |                        |                       |                       |
| 0                         | 150.67±1.03 <sup>a</sup> | 386.67±5.16 <sup>a</sup>  | 2.57±0.04 <sup>b</sup>       | 4.84±0.06 <sup>a</sup> | 4.94±0.07 <sup>a</sup> | 4.73±0.08 <sup>a</sup> | 1101±49 <sup>a</sup>  | 2470±65 <sup>a</sup>  |
| 5                         | 141.17±2.40 <sup>d</sup> | 387.50±5.24 <sup>a</sup>  | 2.75±0.07 <sup>a</sup>       | 4.43±0.45 <sup>b</sup> | 4.65±0.19 <sup>b</sup> | 4.42±0.43 <sup>b</sup> | 432±165 <sup>b</sup>  | 920±203 <sup>bc</sup> |
| 10                        | 144.17±1.47 <sup>c</sup> | 339.17±11.58 <sup>b</sup> | 2.35±0.06 <sup>c</sup>       | 4.17±0.63 <sup>c</sup> | 3.78±0.88 <sup>c</sup> | 3.83±0.92 <sup>c</sup> | 644±269 <sup>a</sup>  | 1023±588 <sup>b</sup> |
| 15                        | 146.67±2.34 <sup>b</sup> | 308.33±8.16 <sup>c</sup>  | 2.10±0.08 <sup>d</sup>       | 3.52±0.80 <sup>d</sup> | 3.78±0.95 <sup>c</sup> | 3.30±0.90 <sup>d</sup> | 751±471 <sup>a</sup>  | 884±318 <sup>c</sup>  |

For each parameter, means with similar letter in a column do not differ significantly between different germinated seed flours and addition level ( $p < 0.05$ ). GWF: Germinated Wheat Flour, GRF: Germinated Rye Flour, GGLF: Germinated Green Lentil Flour. GSF: Germinated Seed Flour

Effect of germinated seeds and germination period on bread properties are shown in Table 6. The lowest weight of bread was observed with GWF added samples. As statistically, similar volume values were observed in bread samples but GWF added bread samples gave higher volume values compared to other germinated seeds flour descriptively ( $p > 0.05$ ). Additionally, the highest specific volume values were observed in GWF added bread samples. The specific volume of 5% germinated seed flour containing sample was higher than control sample. The highest pore symmetry and texture scores were determined with GGLF added bread samples. But GWF and GRF addition in bread formulation gave softer crumb effect compared to GGLF addition.

After 24 hours storage, the addition of GWF showed the lowest hardness values that of the highest in GGLF. 3 days hardness values were ranged between 1177 and 1555 g, and the lowest hardness values were observed with GWF and GRF added bread samples. After 72 hours storage of breads, the reduction in hardness occurred with addition of germinated seeds flour. In fact, during storage, bread containing either 5, 10 or 15%, showed lower firmness than the control sample. This might be due to reducing sugars formed during germination.

Shen et al. (2018) reported that bread prepared with fructose or sucrose had much softer crumb than bread prepared without any sugar, while the highest hardness values were exhibited with bread prepared ribose in the same baking conditions. The increase in sugar levels accompanied by decrease in starch content in cotyledons was directly linked to the activity of total amylases, which is in agreement with reports by Gupta et al. (1993). It is also considered that the fluctuations in the hardness values are caused by differences in moisture contents of bread samples.

In the bread samples with the best technological features was found with 15 % addition level. A single dose (15 %) of 3 different cereal and leguminous flour (wheat, rye and green lentil) and control bread sample analysed and compared with each other for nutritional features.

Nutritional properties of bread samples fortified with 15% germinated seed flours were given in Table 7. Phytic acid content of the samples ranged between 123.90 and 153.40 mg 100g<sup>-1</sup> DW. Measured amount of phytic acid decreased with germinated seed flour addition. So the highest phytic

acid content was found in control sample. That could be the degradation of phytic acid during germination. The germinated seed flour addition was found as a significant way to degrade phytic acid and increase the total phenolic content. Total phenolic content of the bread samples made with germinated seed flours increased from 1754.5 to 2217.0 mgGAE g<sup>-1</sup> dry weight. Enrichment of bread sample with GGLF gave the highest total phenolic content in bread samples. According to measurements of mineral contents, germinated seed flour addition increased the mineral content of bread samples. Especially GGLF substitution to these samples seemed to increase the potassium and iron, GRF substitution increase the calcium, magnesium, phosphorus and zinc content. Increase in nutrients (mineral content, phenolic content, amino acids, vitamins, antioxidant factors) and decrease in anti-nutrients (phytic acid, trypsin inhibitors, galactosides, saponins, tannins) after germination has been related with germination process by some researchers (Frias et al., 2005; Urbano et al., 2005).

**Table 7.** Nutritional properties of bread fortified with germinated seed flours

|                                      | Control                      | GWF                          | GRF                          | GGLF                         |
|--------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Phytic acid (mg 100g <sup>-1</sup> ) | 153.40 ± 3.11 <sup>a</sup>   | 136.50 ± 2.97 <sup>b</sup>   | 132.30 ± 2.97 <sup>b</sup>   | 123.90 ± 2.97 <sup>b</sup>   |
| TPC (mgGAE g <sup>-1</sup> )         | 1754.50 ± 13.44 <sup>d</sup> | 2025.00 ± 42.43 <sup>c</sup> | 2109.00 ± 41.01 <sup>b</sup> | 2217.00 ± 46.67 <sup>a</sup> |
| Calcium (mg 100g <sup>-1</sup> )     | 53.27 ± 0.23 <sup>d</sup>    | 57.27 ± 0.25 <sup>c</sup>    | 69.57 ± 0.18 <sup>a</sup>    | 59.34 ± 0.24 <sup>b</sup>    |
| Magnesium (mg 100g <sup>-1</sup> )   | 47.88 ± 0.20 <sup>d</sup>    | 58.68 ± 0.09 <sup>c</sup>    | 75.67 ± 0.29 <sup>a</sup>    | 59.38 ± 0.18 <sup>b</sup>    |
| Potassium (mg 100g <sup>-1</sup> )   | 235.72 ± 0.97 <sup>d</sup>   | 246.58 ± 1.05 <sup>c</sup>   | 308.89 ± 0.90 <sup>b</sup>   | 348.64 ± 1.03 <sup>a</sup>   |
| Phosphorus (mg 100g <sup>-1</sup> )  | 186.75 ± 0.91 <sup>d</sup>   | 203.81 ± 1.44 <sup>b</sup>   | 215.03 ± 1.24 <sup>a</sup>   | 201.86 ± 1.05 <sup>c</sup>   |
| Zinc (mg 100g <sup>-1</sup> )        | 1.27 ± 0.02 <sup>c</sup>     | 1.65 ± 0.03 <sup>a</sup>     | 1.62 ± 0.04 <sup>ab</sup>    | 1.58 ± 0.01 <sup>b</sup>     |
| Iron (mg 100g <sup>-1</sup> )        | 1.48 ± 0.02 <sup>c</sup>     | 1.40 ± 0.01 <sup>d</sup>     | 1.61 ± 0.01 <sup>b</sup>     | 2.03 ± 0.04 <sup>a</sup>     |

For each parameter, means with similar letter in a row do not differ significantly between different germinated seed flours (p<0.05). GWF: Germinated Wheat Flour, GRF: Germinated Rye Flour, GGLF: Germinated Green Lentil Flour. GSF: Germinated Seed Flour

## CONCLUSION

The objective of this study was to develop functional bread enriched with germinated seed flour, and to determine its physical, chemical, nutritional and sensorial characteristics. The developed breads from wheat flour and germinated seed flour blends had higher ash, protein, TPC, mineral and lower antinutritional factor such as phytic acid compared to the control bread. Germinated rye and green lentil flour increased nutritional properties more compared to germinated wheat flour, significantly. It is quite clear that to enrich the nutritional properties of food, germinated seeds are good source, not to germinate under uncontrolled conditions.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Necmettin Erbakan University Research Foundation (Project number: 161319017).

## Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

## Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

## REFERENCES

- AACC, 1990. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists, 8th edn. AACC International, St. Paul.
- Ashton WM, Williams PC, 1958. The phosphorus compounds of oats. I.- the content of phytate phosphorus. Journal of the Science of Food and Agriculture, 9 (8): 505-511.

- Beta T, Nam S, Dexter JE, Sapirstein HD, 2005. Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal Chemistry*, 82 (4): 390-393.
- Bewley JD, Black M, 1994. Seeds: Physiology of Development and Germination. In *Seeds: Germination, Structure, and Composition*, Plenum Press, pp. 1-2. New York.
- Ertaş N, 2015. Technological and Chemical Characteristics of Breads Made With Lupin Sprouts. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 7 (3): 313-319.
- Frias J, Miranda ML, Doblado R, Vidal-Valverde C, 2005. Effect of germination and fermentation on the antioxidant vitamin content and antioxidant capacity of *Lupinus albus L. var. Multolupa*. *Food Chemistry*, 92 (2): 211-220.
- Frolich W, Wahlgren M, Drakenberg T, 1988. Studies on phytase activity in oats and wheat using p-nmr spectroscopy. *Journal of Cereal Science*, 8 (1): 47-53.
- Ghavidel RA, Prakash J, 2007. The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, in vitro iron and calcium bioavailability and in vitro starch and protein digestibility of some legume seeds. *LWT-Food Science and Technology*, 40 (7): 1292-1299.
- Goesaert H, Brijs K, Veraverbeke WS, Courtin CM, Gebruers K, Delcour JA, 2005. Wheat flour constituents: How they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 16 (1-3): 12-30.
- Gupta AK, Singh J, Kaur N, Singh R, 1993. Effect of polyethylene glycol induced–water stress on germination and reserve carbohydrate metabolism in chickpea cultivars differing in tolerance to water deficit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 31 (3): 369-378.
- Haug W, Lantzsch HJ, 1983. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal product. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34 (12): 1423-1426.
- Herken EN, İbanoğlu Ş, Öner MD, Bilgiçli N, Güzel S, 2007. Effect of storage on the phytic acid content, total antioxidant capacity and organoleptic properties of macaroni enriched with cowpea flour. *Journal of Food Engineering*, 78 (1): 366-372.
- Katina K, Liukkonen KH, Kaukovirta-Norja A, Adlercreutz H, Heinonen SM, Lampi AM, Pihlava, JM, Poutanen K, 2007. Fermentation-induced changes in the nutrition value of native or germinated rye. *Journal of Cereal Science*, 46 (3): 348-355.
- Kayahara H, Tsukahara K, Tatai T, 2000. Flavor, health and nutritional quality of pre-germinated brown rice. In *10th International Flavor Conference, Greece, July 1-7, 2000*, pp: 546-551.
- Kim HY, Hwang IG, Kim TM, Wood SK, Park DS, Kim JH, Kim DJ, Lee J, Lee YR, Jeong HS, 2012. Chemical and functional components in different parts of rough rice (*Oryza sativa L.*) before and after germination. *Food Chemistry*, 134 (1): 288-293.
- Kuo YH, Rozan P, Lambein F, Frias J, Vidal-Valverde C, 2004. Effects of different germination conditions on the contents of free protein and non-protein amino acids of commercial legumes. *Food Chemistry*, 86 (4): 537-545.
- Maguire JD, 1962. Speed of germination: In selection and evaluation for seedling vigor. *Crop Science*, 2: 176-177.
- Öztürk İ, 2008. Determination of chemical properties of germinated wheat and the utilization of sprouts as a natural food additive, Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Master Thesis (Printed).
- Pyler EJ, 1988. Keeping Properties of Bread. In: Pyler EJ (ed) *Baking Science and Technology*, Sosland Publisher, pp. 2, Kansas-USA.
- Quazib M, Garzon R, Zaidi F, Rosell CM, 2016. Germinated, toasted and cooked chickpea as ingredients for breadmaking. *Journal of Food Science and Technology*, 53 (6): 2664-2672.
- Sangronis E, Machado CJ, 2007. Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. *LWT-Food Science and Technology*, 40 (1): 116-120.
- Shen Y, Chen G, Li Y, 2018. Bread characteristics and antioxidant activities of Maillard reaction products of white pan bread containing various sugars. *LWT-Food Science and Technology*, 95, 308-315.

- Skujins S, 1998. Handbook for ICP—AES (Vartian-Vista). A Short Guide to Vista Series ICP—AES Operation. Variant Int. AG. Zug. version 1.0. Switzerland.
- Sung HG, Shin HT, Ha JK, Lai HL, Cheng KJ, Lee JH, 2005. Effect of germination temperature on characteristics of phytase production from barley. *Bioresource Technology*, 96 (11): 1297-1303.
- Urbano G, Aranda P, Vilchez A, Aranda C, Cabrera L, Porres JM, Lopez-Jurano M, 2005. Effects of germination on the composition and nutritive value of proteins in *Pisum sativum* L. *Food Chemistry*, 93 (4): 671-679.
- Yetim H, Öztürk İ, Törnük F, Sağdıç O, Hayta M, 2010. Yenilebilir bitki ve tohum filizlerinin fonksiyonel özellikleri. *Gıda*, 35 (3): 205-210.
- Zilic S, Basic Z, Sukalovic VHT, Maksimovic V, Jankovic M, Filipovic M, 2014. Can the sprouting process applied to wheat improve the contents of vitamins and phenolic compounds and antioxidant capacity of the flour. *International Journal of Food Science & Technology*, 49 (4): 1040-1047.



### Mineral Composition of Various Extracts and Essential Oil of Pickled *Ferula orientalis* L

Elif Feyza TOPDAS<sup>1\*</sup>, Memnune SENGUL<sup>1</sup>

**ABSTRACT:** Edible wild plants are important food sources of the increasing world population and contribute to the healthy functioning of the body. Some of the edible wild plants, which are considered among the favourite flavours and consumed with pleasure in many countries, are rich in trace elements that play an effective role in the fight against various diseases. *Ferula*, a genus of edible wild plants in the Apiaceae family, is also known worldwide for its aromatic composition and medicinal properties. In this study, the essential oil of *F. orientalis* obtained by hydrodistillation and water, ethanol: water, methanol: water, chloroform, and n-hexane extracts prepared by classical and ultrasonic were studied. According to the mineral composition data determined by the Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS), the essential oil was found to contain only sodium, potassium, manganese, and aluminum, among the 18 elements scanned. The most common elements found in the extracts were potassium, sodium, and phosphorus, and their amounts varied between 982.504- 42 282.486 ppm, 3267.141- 39 103.835 ppm, and 1898.652- 9280.814 ppm, respectively. According to the results, the ultrasound process significantly increased the mineral transfer to the extracts ( $p < 0.01$ ).

**Keywords:** Essential oil, Extraction, *Ferula orientalis*, Mineral composition

<sup>1</sup> Elif Feyza TOPDAS ([Orcid ID: 0000-0003-3778-3654](https://orcid.org/0000-0003-3778-3654)), Memnune SENGUL ([Orcid ID: 0000-0003-3909-2523](https://orcid.org/0000-0003-3909-2523)), Ataturk University, Faculty of Agriculture, Department of Food Engineering, Erzurum, Turkey.

\*Corresponding Author: Elif Feyza TOPDAS, e-mail: efeyza.topdas@atauni.edu.tr

This study was produced from Elif Feyza TOPDAS's PhD thesis.

## INTRODUCTION

*Ferula*, a genus of the Apiaceae family, is represented with about 180 species in the world. *Ferula orientalis* L. grows in the East Anatolia Region in Turkey and is found in the Canary Islands, North Africa, and Iran (Downie et al., 2000; Pavlović et al., 2012). In Turkey, it grows on steep rocky slopes at an altitude of 1600-2900 m (TUBIVES, 2020). It is collected in April-May, turned into the pickle and consumed as a salad with meals.

Edible wild plants function as main biochemicals which contribute to the greater part of the human diet, such as carbohydrates, proteins, and lipids, as well as supplementary sources of vitamins and minerals, which are essential needs of the body to maintain its proper physiological homeostasis (Datta et al., 2019). According to Ebert (2014), the nutritional qualities of wild edibles are sometimes superior to the domesticated variety. Many studies have focused on wild edible plants as food sources (Narzary et al., 2015; Abdus Satter et al., 2016; Seal et al., 2017). Mineral studies on edible plants are generally about determining the total content (Dawczynski et al., 2007; Kim et al., 2008; Ródenas et al., 2009; Hu et al., 2010) or about soluble particulate and alterable-unalterable minerals (Versantvoort et al., 2005).

According to Shirin et al. (2010), edible wild, medicinal and aromatic plants are rich in trace elements which play an active role in the fight against various diseases. Determination of the mineral composition of such plants is critical in terms of determining the elements that play an essential role in the functioning of metabolism, such as magnesium, calcium, potassium, zinc, copper, and phosphorus (Kumar et al., 2005), and determining the levels of elements with a potentially adverse effect on health, such as mercury, lead, cadmium, and aluminum (Mamani et al., 2005). Essential elements have a part in many metabolic activities in the human organism, especially as enzyme activators (Fe, Zn, Mn, etc.) (Razic et al., 2005). Low intake of essential minerals may result in nutritional deficiency (Tapiero et al., 2001; Goldhaber, 2003), while excessive intake causes potential toxicity (Barroso et al., 2009). For example, excessive iron intake causes tissue damage, coronary heart disease, and cancer (Morris et al., 1995; Li et al., 2003). Relatively high manganese intake may cause mammalian cell gene mutation, DNA damage, and chromosomal aberration (Gwiazda et al., 2002; Li et al., 2005). Zinc loading can cause neuron death (Chen et al., 2009).

The macro, micro, or toxic minerals found in plants are generally determined by spectrometric techniques such as inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Zhang et al., 2018; Santana et al., 2020), graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF-AAS) (Junior and Dantas, 2016), electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) (Lorenc et al., 2020) and inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-OES) (Marques and Nóbrega, 2017). Acid digestion procedures are generally used in these techniques to transform solid material into a homogeneous aqueous solution (Krug and Rocha 2016). Although ultrasound-assisted extraction has not been used sufficiently yet, it is considered to be an effective procedure because of its low cost and accelerating some processes such as dissolution and leakage of minerals and other functional components from plant tissues (Armenta et al., 2015; Capote and De Castro, 2007; Tiwari, 2015).

In the present study, it is aimed to determine the effect level of the ultrasonic extraction method used in addition to the acid digestion procedure on the mineral transfer from pickled *F.orientalis* to different solvents compared to the classical extraction method. Besides, the mineral composition of the essential oil (EO) has been determined. Thanks to this study, existing scientific gaps may be filled in terms of some toxic minerals related to this plant.

## MATERIAL AND METHOD

### Material

Aerial parts of *F.orientalis* were collected from Erzurum, Turkey (40°29' 20.23 N and 41°21'52.43 E) in April 2017. After the polluted parts of the plant were cleaned and the leaves were separated, the stems were brined using salty water with a Baumé degree of 9. After 10 days, the Baumé degree of the brines was measured as 7 at 20°C and maintained at this value.

### Extracts and EO preparation

*EO*: Fifty grams of the pickled plant was crushed by a blender (Waring, HGB2WTS3, USA) and mixed with 500 ml distilled water. The EO was obtained in approximately 3 h using a Clevenger-type apparatus.

*Classical extraction*: Fifty grams of pickled plant material was lyophilized ( $10^{-3}$  mTorr, -86°C) (Operon FDU- 8612, Korea) and agitated in a shaking water bath (JSR, JSSB-30T, Korea) for 20 h at 40°C and 90 rpm by adding 500 ml of each solvent (water, ethanol: water (1/1,v/v) methanol: water (1/1,v/v), chloroform and n-hexane). The extracts were filtered and centrifuged (4500 rpm, 15 min). The supernatant was evaporated and then lyophilized at 40°C, 150 rpm. Lyophilized extracts were stored in the dark at -20°C until the analyses were made.

*Ultrasonic extraction*: Fifty grams of pickled plant material was lyophilized ( $10^{-3}$  mTorr, -86°C). Extraction was performed according to the procedure adopted by Oniszczyk and Podgórski (2015) by adding 500 ml of each solvent (water, ethanol: water (1/1,v/v) methanol: water (1/1,v/v), chloroform, and n-hexane). For this purpose, the temperature of the ultrasonic bath operating at 35 kHz frequency was kept constant at  $40 \pm 2^\circ\text{C}$ , and 20 min of ultrasound + 20 min of the resting process were applied to the extracts for 4 times. The extracts were filtered and centrifuged (4500 rpm, 15 min). The supernatant was evaporated at 40°C, 150 rpm and then lyophilized. Lyophilized extracts were stored in the dark at -20°C until the analyses were made.

### Determination of mineral substance composition by ICP/MS

8 ml 65% HNO<sub>3</sub> and 2 ml 31% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were added to a sample of 500 mg and it was kept waiting for 15-20 min. Then, it was subjected to wet combustion in the microwave system (Milestone Ethos up SK-15). A standard solution prepared for each element (at concentrations of 0, 2.5, 5, 7.5, and 10 ppb for Hg; 0, 10, 25, 50, 100, 250, and 500 ppb for other elements) was scanned in the ICP/MS (Agilent 7800, UK), and the residual element amounts in the samples were determined by using the calibration curve obtained against the standards (Anonymous, 2007). Detection limits of minerals analyzed with the ICP-MS are shown in Table 1.

**Table 1.** Detection limits of the minerals

| Minerals       | Detection limits (ppb) |
|----------------|------------------------|
| Sodium (Na)    | 4.034                  |
| Magnesium(Mg)  | 0.363                  |
| Aluminum (Al)  | 0.282                  |
| Phosphorus (P) | 2.639                  |
| Potassium(K)   | 2.438                  |
| Calcium (Ca)   | 2.047                  |
| Chromium (Cr)  | 0.049                  |
| Manganese(Mn)  | 0.024                  |
| Iron (Fe)      | 0.200                  |
| Copper (Cu)    | 2.343                  |
| Nickel (Ni)    | 0.381                  |
| Cobalt (Co)    | 0.003                  |
| Zinc (Zn)      | 0.603                  |
| Selenium (Se)  | 0.061                  |
| Silicon (Si)   | 3.771                  |
| Cadmium (Cd)   | 0.002                  |
| Mercury (Hg)   | 0.025                  |
| Lead (Pb)      | 0.054                  |

## Statistical Analysis

All data were subjected to statistical analysis using IBM SPSS Statistics Version 20.0 package software. The Duncan test, one of the One-way ANOVA Multiple Comparison tests, was applied to the significant differences as a result of the variance analysis. Results are given as mean  $\pm$  standard deviation and all  $p < 0.05$  values were considered as statistically significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

The average values of 18 minerals detected in extracts and EO using ICP-MS are shown in Table 2. The Na values of extracts and EO varied between 3184.277 ppm and 39 103.835 ppm. Among the extracts, the highest Na value was found in the ultrasonic water extract (UWE), while the EO had the lowest. The higher amount of Na in water extracts compared to other extracts and the EO is believed to be due to the more dissolution of the groups formed in complex with sodium by water. Also, it was found that the ultrasound process significantly increased the Na transfer to the water extract compared to the classical extraction process. In the mineral matter analysis made by Tunçtürk and Özgökçe (2015) on *Anethum graveolens* L., *Anthriscus* sp., *Chaerophyllum macropodium*, *F. haussknechtii* H. Wolff ex Rech.f., *Ferula rigidula* DC., *Heracleum persicum*, *Hippomarathrum microcarpum*, *Pimpinella aurea* DC, and *Prangos ferulacea* L., which are from the Apiaceae family to which *F. orientalis* L. also belongs, they found that Na contents of plants were between 0.32 and 1.26 g kg<sup>-1</sup>. When these results are compared with the results of this study, the most important point is that the Na amount is very high in all extracts and EO. This is believed to be due to the high salt concentration of the pickled *F. orientalis*. In Turkey, many products with high salt concentration, such as various pickles, vine leaves, or olive brine, are produced and consumed by the people with pleasure. Although such plant products with high salt concentration could be preferred for their good tastes, it is thought that consumption of these products with a lower level of salt content would be more appropriate for public health considering the disadvantages arising from high salt concentration.

Mg contents of extracts varied between 376.504 ppm and 1980.377 ppm (Table 2). The highest Mg value was found in the classically obtained water extract (CWE) and the lowest Mg value was found in the ultrasonic ethanol: water extract (UEWE). The effect of solvent type and process variables and process x solvent type interaction on Mg mineral was found to be statistically very significant at  $p < 0.01$  level. In their study, Arceusz et al. (2010) researched 16 plants in the Apiaceae family and reported that the Mg content of the plants ranged between 1.49-5.91 mg g<sup>-1</sup>. The findings of this study are consistent with the Mg values that the extracts of *F. orientalis* contain. Although its effects have not been proven scientifically, the pickled *F. orientalis* is widely consumed by the people living in the Eastern Anatolia Region thinking that it relieves diabetes patients. This effect is thought to be due to the Mg mineral contained in *F. orientalis*. Because it is reported that Mg, in addition to insulin synthesis and secretion, is also effective on the intracellular activity of insulin and therefore, glucose transport into the cell through insulin (Takaya et al., 2004; Chaudhary et al., 2009). A decrease in intracellular magnesium levels causes a decrease in the insulin effect (Paolisso et al., 1990; Rodriguez-Hernandez et al., 2005).

When Table 2 is evaluated in terms of Ca, the 5<sup>th</sup> most abundant element in our body (Renna et al., 2015), the interaction of process and the solvent type and process x solvent type is significant on Ca mineral at the level of  $p < 0.01$ . Ca amounts of the extracts varied between 233.428 ppm and 751.755 ppm, but no Ca could be detected in EO. The ultrasonic hexane extract (UHE) had the highest Ca amount and the classically obtained ethanol: water extract (CEWE) had the lowest. Table 2 shows that extractions performed by the ultrasonic method are more effective among all other extracts except for water extracts. No study was found about the Ca content of *F. orientalis*. However, in the studies

conducted on raw plants on different *Ferula* species, the Ca contents were found to be between 2.29-26.30 mg g<sup>-1</sup> (Arceusz et al., 2010) and 10.6-14.1 g kg<sup>-1</sup> (Tunçtürk and Özgökçe, 2015).

Phosphorus (P) is the second major element of the human body with important roles in carbohydrate, fat, and protein metabolisms and neural transmission and tooth-bone formation (Kurt, 2007). P contents of the extracts were varied between 1898.652 ppm and 9280.814 ppm. The CEWE extract had the lowest P content, while the ultrasonic chloroform extract (UCE) had the highest. It was also found that EO does not contain P. In a study conducted on *F. rigidula* and *F. haussknechtii*, it was found that the plants contain 3.72 g kg<sup>-1</sup> and 2.51 g kg<sup>-1</sup> of P, respectively (Tunçtürk and Özgökçe, 2015). When we evaluate the findings of this study, it is observed that P contents of the extracts, except for chloroform extracts, are generally consistent with the findings of the study conducted by Tunçtürk and Özgökçe (2015). The higher amount in chloroform extracts compared to other extracts and EO is believed to be due to the more dissolution of the groups formed in complex with P by chloroform.

Considering that it is an essential component of many enzymes and proteins, Cu is an indispensable trace element for all living organisms, including human beings (Renna et al., 2015). The daily intake dose of Cu for male and female adults was calculated as 900 µg (Scientific Committee for Food, 1993). Cu was not detected in the EO. The Cu amounts of extracts ranged between 4.230 ppm (classical n-hexane extract, CHE) and 15.563 ppm (UWE). It was found that the ultrasound process increased the Cu content of extracts at  $p < 0.05$  level. In the literature, there is no study about the Cu element content of the *F. orientalis*. However, in a study conducted on the plants in the Apiacea family, the Cu contents were found to be between 21.2 and 23.7 mg kg<sup>-1</sup> (Tunçtürk and Özgökçe, 2015).

Selenium is an essential microelement required for human and animal nutrition, reduces the risk of cardiovascular diseases and cancer (Thomson, 2004; Rayman, 2008). Foods are the primary ways of selenium intake. Meat and sea products have a high Se content between 0.4 µg g<sup>-1</sup> and 1.5 µg g<sup>-1</sup>. Although not as much as meat and sea products, fruits and vegetables are also rich sources of Se (Rayman, 2008). Recently, many studies have been conducted on Se with various plants (Germ et al. 2009; Bhatia et al. 2013; Thosaikham et al., 2014; Bañuelos et al., 2015; Funes-Collado et al., 2015; Longchamp et al., 2015; Castro Grijalba et al., 2017; Mahn, 2017). However, no study was found in the literature on Se contents of *Ferula* species. When the findings of this study are evaluated, the process and the solvent type variables and process x solvent type interaction has a significant effect on Se at  $p < 0.01$  level. Among the extracts, CEWE had the lowest Se amount with a value of 0.049 ppm and ultrasonic methanol: water extract (UMWE) had the highest value with 0.558 ppm. The higher Se content in the UMWE, may be due to the ultrasound process increasing the number of groups to which Se is bound by breaking down the cell membrane, and the methanol: water solvent dissolving these groups more.

Potassium is predominantly an intracellular cation in the human body and plays a fundamental role in acid-base regulation, fluid balance, muscle contraction, and nerve conduction (Thomas, 2001). It was found that the effects of the process variable, solvent variable, and process x solvent interaction on K amount of extracts and EO were statistically very significant at the level of  $p < 0.01$ . The water extracts obtained both through ultrasonic and classical methods contained a significantly higher concentration of K compared to other extracts. It was observed that EO had the lowest K value (148.521 ppm). The data on K amounts obtained in this study were found to be higher than the findings of Arceusz *et al.* (2010) (2.29-26.3 mg g<sup>-1</sup>) and Tunçtürk and Özgökçe (2015) (13.8-25.6 g kg<sup>-1</sup>) who studied the plants in the same family with *F. orientalis* L. The Institute of Medicine reported that a daily intake of 4.7 g K through foods is sufficient (Anonymous, 2005). Therefore, it is believed that the consumption of about 115 g of pickled *F.orientalis* can meet the daily need for K.

Manganese, as one of the trace elements like Cr, Zn, and Co, has an important role in performing many physiological functions in the human body (Renna et al., 2015). As seen in Table 2, the Mn content of the samples varied between 0.120 and 11.880 ppm. EO had the lowest value, while UHE extract had the highest value. Here the most important point is that the Mn element was found at a higher rate in extracts of chloroform, which is the solvent with the lowest polarity index compared to apolar n-hexane and other polar solvents. This suggests that groups that are complexed with Mn dissolve better in apolar solvents. The effect of solvent type variable and process x solvent type interaction on the Mn content of extracts was found to be very significant at the level of  $p < 0.01$ . The results of this study are very low in Mn values when compared with the findings of the study conducted on *F. rigidula* DC (27.2 mg kg<sup>-1</sup>) and *F. haussknechtii* (48.5 mg kg<sup>-1</sup>) by Tunçtürk and Özgökçe (2015).

Zinc is an important trace element for humans as it involves in the structure of many enzymes and assumes a regulatory and catalytic role. It plays important roles in growth and development, immune response, neurological function, and reproduction. The Scientific Committee for Food (1993) recommends Zn intake of 9.5 mg day<sup>-1</sup> for men and 7.0 mg day<sup>-1</sup> for women. The amount of Zn in extracts varied between 24.247 and 125.195 ppm (Table 2). The UCE had the highest Zn amount and the CEWE had the lowest. It was found that ultrasound increased the Zn level in all extracts by  $p < 0.05$ , except methanol: water extract. Compared with the study conducted by Tunçtürk and Özgökçe (2015) on different *Ferula* species, the Zn amounts found in the extracts were higher.

Since Cd causes kidney and liver dysfunction, and osteoporosis in the long term, it is believed that the intake of this mineral with food will result in a toxic effect (Godt et al., 2006). The UCE had the highest Cd content (0.076 ppm), while ethanol extracts (CEWE and UEWE) were the lowest (0.012 ppm). No Cd was found in EO. The effect of process and solvent type variables and process x solvent type interaction on the Cd content of the extracts was found to be statistically significant at the  $p < 0.01$  level. The Cd values found in this study, were far below the limit (0.20 mg kg<sup>-1</sup> wet weight) set for vegetables and plants in the European Commission Regulation no. 1881/2006.

Lead (Pb) is a heavy metal with no biochemical and physiological function in the human body and has a toxic effect. It is classified as a Class II carcinogenic metal by the World Health Organization (Osma, 2009). It contaminates food mostly by polluted air, water, and soil. This toxic metal was not detected in EO, and it varied between 1.048 ppm (CEWE) and 2.130 ppm (UMWE) in the extracts. The interaction of process and the solvent type and process x solvent type has an effect on Pb amounts of extracts at the level of  $p < 0.01$ . The World Health Organization (WHO) reported that a weekly intake of Pb between 1.5 and 175 mg is tolerable (Anonymous, 1993). Pb levels for the pickle, its extracts, and EO remain below the specified toxic limits. Also, the levels of Fe, Co, Cr, Ni, and Hg heavy metals and Si analyzed in the samples were below the limits of detection.

Due to the increased exposure of people to Al through food packaging, kitchen utensils, medicines, or drinking water (You and Song, 2013) and potential adverse effects of this element on human beings, there has been increasing interest in the determination of trace amounts (Mailloux et al., 2011). Its dissolved form, in particular, is considered to be more important due to its high bioavailability and toxicity (Luoa and Bi, 2003). The effect of solvent type variable and process x solvent type interaction on the Al amounts of extracts was found to be statistically significant ( $p < 0.01$ ). Also, it was found that UCE had the highest Al amount after pickle. The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) reported that the limit that metabolism can tolerate when Al components are taken into the body is 2 mg kg<sup>-1</sup> body weight per week (Anonymous, 2011). Al content of the pickled *F. orientalis* was found to be 59.495 ppm (5.950 mg 100g<sup>-1</sup>), and Al contents of the extracts and EO were found to be between 0.558- 57.210 ppm. Considering that the weekly tolerable Al level for an adult of 60 kg is 120

Mineral Composition of Various Extracts and Essential Oil of Pickled *Ferula orientalis* L.

mg, it is observed that even the pickled *F. orientalis*, in which the highest amount was found, is well below the weekly tolerable level.

**Table 2.** Mineral matter values of extracts and EO (ppm)

|    | PFO                 | CWE                 | UWE                 | CEWE               | UEWE                | CMWE                |
|----|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Na | 41962.520±229.951 f | 38153.847±296.985 d | 39103.835±462.596 e | 29266,101±73.765 c | 29033.938±507.879 c | 25613.509±456.331 b |
| Mg | 2083.080±30.802 j   | 1980.377±49.135 i   | 1800.295±39.689 g   | 1589.261±60.486 e  | 376.504±12.113 a    | 893.101±14.248 d    |
| Ca | 862.830±9.525 h     | 664.060±14.231 f    | 606.930±7.789 e     | 233.428±10.054 a   | 549.323±7.466 d     | 389.654±11.865 c    |
| P  | 9424.843±70.796 j   | 3607.751±31.825 f   | 2796.573±19.715 c   | 1898.652±56.742 a  | 3319.033±71.672 e   | 4487.660±42.609 g   |
| K  | 42418.350±70.852 j  | 38252.764±71.189 i  | 42282.486±90.602 j  | 18655.418±92.437 e | 19648.729±71.672 f  | 21735.882±92.029 g  |
| Zn | 130.487±0.229 i     | 26.241±0.474 b      | 48.235±0.295 d      | 24.247±0.197 a     | 50.920±0.107 e      | 81.564±0.460 f      |
| Mn | 12.355±0.676 j      | 2.290±0.048 c       | 5.224±0.559 e       | 7.209±0.092 f      | 1.863±0.081 b       | 4.899±0.117 d       |
| Se | 0.727±0.002 g       | 0.305±0.011 c       | 0.388±0.013 d       | 0.049±0.004 a      | 0.279±0.006 c       | 0.443±0.021 de      |
| Cu | 15.819±0.072 j      | 12.174±0.083 g      | 15.563±0.076 i      | 5.329±0.069 c      | 6.556±0.084 e       | 4.275±0.109 a       |
| Al | 59.495±0.103 i      | 2.799±0.134 c       | 3.203±0.095 c       | 1.664±0.073 b      | 1.638±0.069 b       | 13.018±0.338 d      |
| Cd | 0.078±0.004 f       | 0.020±0.002 b       | 0.037±0.004 d       | 0.012±0.001 a      | 0.012±0.004 a       | 0.019±0.001 b       |
| Pb | 3.728±0.078 f       | 1.532±0.049 c       | 1.299±0.037 b       | 1.048±0.062 a      | 1.836±0.071 d       | 1.311±0.127 b       |
| Fe | -                   | -                   | -                   | -                  | -                   | -                   |
| Cr | -                   | -                   | -                   | -                  | -                   | -                   |
| Ni | -                   | -                   | -                   | -                  | -                   | -                   |
| Hg | -                   | -                   | -                   | -                  | -                   | -                   |
| Si | -                   | -                   | -                   | -                  | -                   | -                   |
| Co | -                   | -                   | -                   | -                  | -                   | -                   |

\* PFO: pickled *F.orientalis*, CWE: classical water extract, UWE: ultrasonic water extract, CEWE: classical ethanol: water extract, UEWE: ultrasonic ethanol: water extract, CMWE: classical methanol: water extract.

\*\*Statistical analysis for each line was made within itself and the mean values are shown with the same letter were considered the same at  $p<0.05$  significance level.

\*\*\*-: not determined.

**Table 2.** Mineral matter values of extracts and EO (ppm) (continued)

|    | UMWE                | CHE                | UHE                | CCE                | UCE               | EO                 |
|----|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Na | 25858.289±331.718 b | 3378.980±116.142 a | 3413.735±112.840 a | 3267.141±121.325 a | 3301.596±84.146 a | 3184.277±114.660 a |
| Mg | 1892.537±46.216 h   | 1869.229±27.754 gh | 700.317±35.044f    | 496.097±3.005 b    | 794.396±6.724 c   | -                  |
| Ca | 596.144±11.558 e    | 595.179±14.982 e   | 751.755±5.855g     | 278.983±9.103 b    | 531.0185±14.240 d | -                  |
| P  | 3363.598±60.359 e   | 2969.221±46.896 d  | 2228.689±46.137b   | 8710.091±88.555 h  | 9280.814±70.873 i | -                  |
| K  | 31464.541±81.539 h  | 982.504±28.435 b   | 1773.572±59.644c   | 2524.067±38.336 d  | 1789.427±23.163 c | 148.521±0.838 a    |
| Zn | 28.453±0.394 c      | 48.493±0.233 d     | 50.787±0.379e      | 88.606±0.275 g     | 125.195±0.201 h   | -                  |
| Mn | 9.873±0.337 g       | 11.876±0.127 i     | 11.880±0.121 i     | 11.080±0.110 h     | 11.158±0.083 h    | 0.120±0.014 a      |
| Se | 0.558±0.799 f       | 0.390±0.017 d      | 0.315±0.007 c      | 0.143±0.015 b      | 0.483±0.024 e     | -                  |
| Cu | 6.043±0.086 d       | 4.230±0.080 a      | 4.639±0.066 b      | 11.021±0.141 f     | 14.266±0.132 h    | -                  |
| Al | 14.909±0.098 e      | 37.524±0.346 f     | 37.864±0.475 f     | 55.033±0.149 g     | 57.210±0.387 h    | 0.558±0.012 a      |
| Cd | 0.047±0.002 e       | 0.028±0.002 c      | 0.038±0.001d       | 0.018±0.003 b      | 0.076±0.002 f     | -                  |
| Pb | 2.130±0.073 e       | 1.361±0.018 b      | 2.051±0.076 e      | 1.543±0.068 c      | 1.978±0.049 de    | -                  |
| Fe | -                   | -                  | -                  | -                  | -                 | -                  |
| Cr | -                   | -                  | -                  | -                  | -                 | -                  |
| Ni | -                   | -                  | -                  | -                  | -                 | -                  |
| Hg | -                   | -                  | -                  | -                  | -                 | -                  |
| Si | -                   | -                  | -                  | -                  | -                 | -                  |
| Co | -                   | -                  | -                  | -                  | -                 | -                  |

\*UMWE: ultrasonic methanol: water extract, CHE: classical n-hexane extract, UHE: ultrasonic n-hexane extract, CCE: classical chloroform extract, UCE: ultrasonic chloroform extract, EO: essential oil.

\*\*Statistical analysis for each line was made within itself and the mean values are shown with the same letter were considered the same at  $p<0.05$  significance level.

\*\*\*-: not determined.

## CONCLUSION

In this study, the mineral compositions of pickle, EO, and classical and ultrasonic extracts of *F.orientalis* were determined by ICP-MS. A total of 12 minerals were identified in pickle and extracts. The Cr, Co, Fe, Si, Ni, and Hg could not be detected as they were below the measurement limits. When extracts and EO were evaluated for Cd, Ni, Pb, and Al, it was found that they were significantly below

the daily intake limit. Na level was found to be very high in all extracts and EO. This is believed to be due to the high salt concentration of the pickle. According to the WHO, the maximum daily sodium intake in adults is 2 g day<sup>-1</sup> (salt equivalent to 5g day<sup>-1</sup>) (Anonymous, 2012). Due to the high level of salt consumption worldwide, many countries implement salt reduction policy, and this policy is also supported by scientific researches (Andersen et al., 2009; He and MacGregor, 2009; Agarwal et al., 2011; Ahuja et al., 2015). The effect of solvent type and process variables and process x solvent type interaction on Mg mineral was statistically significant at  $p < 0.01$  level. It was found that the ultrasound application generally increased element transition because of the effect of breaking down the cell membrane.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Research Projects Unit of Ataturk University for the laboratory facilities and financial support provided (BAP-Project No: 251/2016) and Meryem Sengul Koseoglu who helped in the identification of the plant (Ataturk University, Faculty of Science, Erzurum, Turkey).

## Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

## Author's Contributions

Elif Feyza Topdas collected and prepared the samples, evaluated the analytical results, and wrote the original draft. Memnune Sengul was project administration and also review and edited the manuscript. Authors read and contributed to the final paper.

## REFERENCES

- Abdus Satter MM, Khan MMRRL, Jabin SA, Abedin N, Islam MF, Shaha B, 2016. Nutritional quality and safety aspects of wild vegetables consume in Bangladesh. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6 (2): 125-131.
- Agarwal S, McCoy D, Graves W, Gerard PD, Clark S, 2011. Sodium content in retail cheddar, mozzarella, and process cheese varies considerably in the United States. *Journal of Dairy Science*, 94:1605–1615.
- Ahuja JKC, Pehrsson PR, Haytowitz DB, Wasswa-Kintu S, Nickle M, Showell B, 2015. Sodium monitoring in commercially processed and restaurant foods. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 101: 622–631.
- Andersen L, Ramussen LB, Larsen EH, Jakobsen J, 2009. Intake of household salt in a Danish population. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63: 598–604.
- Anonymous, 1993. Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO technical report series, No. 837. Available From: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44515/WHO\\_TRS\\_960\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44515/WHO_TRS_960_eng.pdf?sequence=1) Access Date 11.09.14.
- Anonymous, 2005. Dietary Reference Intakes for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/10925>.
- Anonymous, 2007. Trace elements As, Cd, Hg, Pb, and other elements. Determination by ICP-MS after pressure digestion. *Nordic Committee On Food Analysis* No:186, 14.
- Anonymous, 2011. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) 74th Meeting. <http://www.fao.org/publications/card/en/c/2035a484-7af0-5ad0-b144-d347288dd1ab/>.
- Anonymous, 2012. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Food Additives Series 65. [http://Whqlibdoc.Who.Int/Publications/2012/9789241660655\\_Eng.Pdf](http://Whqlibdoc.Who.Int/Publications/2012/9789241660655_Eng.Pdf). WHO, 2012. Guideline: Sodium Intake For Adults And Children. Access Date 03.12.20.
- Arceusz A, Radecka I, Wesolowski M, 2010. Identification of diversity in elements content in medicinal plants belonging to different plant families. *Food Chemistry* 120: 52–58.
- Armenta S, Garrigues S, De la Guardia M, 2015. The role of green extraction techniques in green analytical chemistry. *Trends Analytical Chemistry*, 71:2–8.
- Bañuelos GS, Arroyo I, Pickering IJ, Yang SI, Freeman JI, 2015. Selenium biofortification of broccoli and carrots grown in soil amended with Se-enriched Hyperaccumulator *Stanleya Pinnata*. *Food Chemistry*, 166: 603–608.



- Barroso MF, Silva A, Ramos S, Oliva-Teles MT, Delerue-Matos C, Goreti M, Olivera M, 2009. Flavoured versus natural waters: Macromineral (Ca, Mg, K, Na) and micromineral (Fe, Cu, Zn) contents. *Food Chemistry*, 116: 580–589.
- Bhatia P, Aureli F, D'amato M, Prakash R, Cameotra SS, Nagaraja TP, Cubadda F, 2013. Selenium bioaccessibility and speciation in biofortified pleurotus mushrooms grown on selenium-rich agricultural residues. *Food Chemistry*, 140(1–2): 225-230.
- Capote FP, De Castro MDL, 2007. Ultrasound in analytical chemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387:249–257.
- Castro Grijalba A, Martinis EM, Wuilloud RG, 2017. Inorganic selenium speciation analysis in allium and brassica vegetables by ionic liquid assisted liquid-liquid microextraction with multivariate optimization. *Food Chemistry*, 219: 102-108.
- Chaudhary DP, Sharma R, Bansal D, 2009. Implications of magnesium deficiency in Type 2 diabetes: A review. *Biological Trace Element Research*, 18: 78-82.
- Chen L, Wang DW, Wu J, Yu BY, Zhu DN. 2009. Identification of multiple constituents in the traditional Chinese medicine formula GuiZhiFuLing-Wan by HPLC–DAD–MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49:267–275.
- Datta S, Sinha BK, Bhattacharjee S, Seal T, 2019. Nutritional composition, mineral content, antioxidant activity and quantitative estimation of water soluble vitamins and phenolics by RPHPLC in some lesser used wild edible plants. *Heliyon*, 5: e01431.
- Dawczynski C, Schäfer U, Leiterer M, Jahreis G, 2007. Nutritional and toxicological importance of macro, trace, and ultra-trace elements in algae food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 10470–10475.
- Downie SR, Watson MF, Spalik K, Katz-Downie DS, 2000. Molecular systematics of old world Apiioideae (Apiaceae): relationships among some members of Tribe peucedaneae Sensus Lato, the placement of several island-endemic species, and resolution within the Apioid Superclade. *Canadian Journal of Botany* 78: 506-52.
- Ebert AZ, 2014. Potential of underutilized traditional vegetables and legume crops to contribute to food and nutritional security, income and more sustainable production systems. *Sustainability*, 6 (1): 319-335.
- European Commission, 2006. Commission regulation (Ce) No 1881/2006 Of 19 December 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Available From: <http://Eur-Lex.Europa.Eu/Lexuriserv/Lexuriserv.Do?Uri=Oj:L:2006:364:0005:0024:En:Pdf>.
- Funes-Collado V, Rubio R, López-Sánchez JF, 2015. Does boiling affect the bioaccessibility of selenium from cabbage?. *Food Chemistry*, 181:304-309.
- Germ M, Stibilj V, Kreft S, Gaberščik A, Pajk A, Kreft I, 2009. Selenium concentration in St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) herb after foliar spraying of young plants under different Uv-B radiation levels. *Food Chemistry*, 117(2): 204-206.
- Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, Groneberg DA, 2006. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 1(22): 1–6.
- Goldhaber SB, 2003. Trace element risk assessment: Essentiality vs. toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 38: 232–242.
- Gwiazda R, Lee HD, Sheridan J, Smith DR, 2002. Low cumulative manganese exposure affects striatal GABA but not dopamine. *Neurotoxicology*, 23: 69–76.
- He FJ, Macgregor GA, 2009. A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programmes. *Journal of Human Hypertension*, 23: 363–384.
- Hu G, Huang S, Chen H, Wang F. 2010. Binding of four heavy minerals to hemicelluloses from rice bran. *Food Research International*, 43: 203–206.
- Junior JBP, Dantas KGF, 2016. Evaluation of inorganic elements in cat's claw teas using ICP OES and GF AAS. *Food Chemistry*, 196: 331-337.
- Kim KC, Park YB, Lee MJ, Kim JB, Huh JW, Kim DH, Kim JC, 2008. Levels of heavy minerals in candy packages and candies likely to be consumed by small children. *Food Research International*, 41:411–418.
- Kumar A, Nair AGC, Reddy AVR, Garg AN, 2005. Availability of essential elements in indian and us tea brands. *Food Chemistry*, 89(3): 441-448.
- Kurt C, 2007. Sağlıklı Gönüllülerde Dipiridamolün Serum ve İdrar Kalsiyum – Fosfor Düzeylerine Etkileri. Uzmanlık Tezi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Nefroloji Bilim Dalı. Adana.

- Krug FJ, Rocha FRP, 2016. Métodos de preparo de amostras. Fundamentos sobre o preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. Editora, EditSBQ, São Paulo.
- Li SX, Deng NS, Zheng FY, 2003. Speciation analysis of iron in traditional Chinese medicine by flame atomic absorption spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32: 51–57.
- Li SX, Zheng FY, Liu XL, Cai WL, 2005. Speciation analysis and bioavailability assessment of manganese in phytomedicine by extraction with octanol and determination by flame atomic absorption spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 16: 405–410.
- Longchamp M, Castrec-Rouelle M, Biron P, Bariac T, 2015. Variations in the accumulation, localization and rate of metabolization of selenium in mature zea mays plants supplied with selenite or selenate original research article. *Food Chemistry*, 182: 128-135.
- Lorenc W, Kruszka D, Kachlicki P, Kozłowska J, Barańkiewicz D, 2020. Arsenic species and their transformation pathways in marine plants. Usefulness of advanced hyphenated techniques HPLC/ICP-MS and UPLC/ESI-MS/MS in arsenic species analysis. *Talanta*, 220:121384.
- Luo M, Bi S, 2003. Solid phase extraction–spectrophotometric determination of dissolved aluminum in soil extracts and ground waters. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 97: 173–178.
- Mahn A, 2017. Modelling of the effect of selenium fertilization on the content of bioactive compounds in broccoli heads. *Food Chemistry*, 233: 492-499.
- Mailloux RJ, Lemire J, Appanna VD, 2011. Hepatic response to aluminum toxicity: dyslipidemia and liver diseases. *Experimental Cell Research*, 317(16): 2231–2238.
- Mamani MCV, Aleixo LA, Abreu MF, Rath S, 2005. Simultaneous determination of cadmium and lead in medicinal plants by anodic stripping voltammetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37(4): 709-713.
- Marques TL, Nóbrega JA, 2017. Fast and simple flow-batch extraction procedure for screening of macro and micronutrients in dried plant leaves by ICP OES. *Microchemical Journal*, 134: 27–34.
- Morris CJ, Earl JR, Trenam CW, Blake DR, 1995. Reactive oxygen species and iron: a dangerous partnership in inflammation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 27:109–122.
- Narzary H, Swargiary A, Basumatary S, 2015. Proximate and vitamin C analysis of wild edible plants consumed by Bodos of Assam, India. *Journal of Molecular Pathophysiology*, 4 (4): 128-133.
- Oniszcuk A, Wo'jtowicz A, Oniszcuk T, Olech M, Nowak R, Wojtunik K, Klimek M, Krawczyk W, Hajnos M, 2015. Extruded corn gruels containing linden flowers: Quantitation of phenolic compounds and selected quality characteristics. *Open Chemistry*, 13: 1209–1217.
- Osma E, 2009. İstanbul'da Yetißen Bazı Sebzelelerde Ağır Metal Birikiminin Tespiti. Doktora Tezi. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Paolisso G, Scheen A, D'Onofrio F, Lefebvre R, 1990. Magnesium and glucose homeostasis. *Diabetologia*, 33: 511-514.
- Pavlović I, Petrović S, Radenković M, Milenković M, Couladis M, Branković S, Pavlović Drobac M, Niketić M, 2012. Composition, antimicrobial, antiradical and spasmolytic activity of *Ferula heuffelii* Griseb. Ex Heuffel (Apiaceae) essential oil. *Food Chemistry*, 130(2): 310-315.
- Rayman MP, 2008. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *British Journal of Nutrition*, 100: 254–268.
- Razic S, Onjia A, Dogo S, Slavkovic L, Popovic A, 2005. Determination of metal content in some herbal drugs—empirical and chemometric approach. *Talanta* 67: 233-239.
- Renna M, Cocozza C, Gonnella M, Abdelrahman H, Santamaria P, 2015. Elemental characterization of wild edible plants from countryside and urban areas. *Food Chemistry*, 177: 29–36.
- Ródenas de la Rocha S, Sánchez-Muniz FJ, Gómez-Juaristi M, Larrea Marín MT, 2009. Trace elements determination in edible seaweeds by an optimized and validated ICP-MS method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 480–486.
- Rodriguez-Hernandez H, Gonzalez JL, Rodriguez-Moran M, Guerrero-Romero, F, 2005. Hypomagnesemia, insulin resistance, and non-alcoholic steatohepatitis in obese subjects. *Arch Med Res*, 36: 362-366.
- Santanaa, APR, Andradeb DF, Guimaraes TGS, Amaral CDB, Oliveirac A, Gonzalez MH, 2020. Synthesis of natural deep eutectic solvents using a mixture design for extraction of animal and plant samples prior to ICP-MS analysis. *Talanta*, 216:120956.
- Seal T, Chaudhuri K, Pillai B, 2017. Nutraceutical and antioxidant properties of *Cucumis hardwickii* Royle: a potent wild edible fruit collected from Uttarakhand, India. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6 (6): 1837-1847.

- Shirin K, Imad S, Shafiq S, Fatima, K, 2010. Determination of major and trace elements in the indigenous medicinal plant *Withania somnifera* and their possible correlation with therapeutic activity. *Journal of Saudi Chemical Society*, 14: 97-100.
- Takaya J, Higashino H, Kobayashi Y, 2004. Intracellular magnesium and insulin resistance. *Magnesium Research*, 17: 126-136.
- Tapiero H, Gate L, Tew KD, 2001. Iron: Deficiencies and requirements. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 55: 324-332.
- The Scientific Committee For Food, 1993. Reports of the scientific committee for food of the European community (Thirty-First Series). Nutrient and Energy Intakes for the European Community. Luxembourg: Commission Of The European Communities.
- Thomas B, 2001. *Manual of dietetic Practice* (3rd Ed.). Oxford: Blackwell Publishing.
- Thomson C, 2004. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58: 391-402.
- Thosaikham W, Jitmanee K, Sittipout R, Maneetong S, Chantiratikul A, Chantiratikul P, 2014. Evaluation of selenium species in selenium-enriched pakchoi (*Brassica Chinensis* Jusl var *parachinensis* (Bailey) Tsen & Lee) using mixed ion-pair reversed phase HPLC-ICP-MS. *Food Chemistry*, 145: 736-742.
- Tiwari BK, 2015. Ultrasound: a clean, green extraction technology. *Trends in Analytical Chemistry*, 71:100-109.
- TUBIVES, 2020. <http://www.tubives.com/>. Accessed: December 2020.
- Tunçtürk M, Özgökçe F, 2015. Chemical composition of some apiaceae plants commonly used in herby cheese in eastern Anatolia. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 39: 55-62.
- Versantvoort CH, Oomen AG, Vande EK, Rompelberg CJM, Sips AJAM, 2005. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, 43:31-40.
- You J, Song Z, 2013. Determination of picomole concentrations of aluminum (III) in human saliva and urine by a luminol-carboxymethyl chitosan chemiluminescence system. *Instrumentation Science and Technology*, 41: 524-534.
- Zhang N, Shen K, Yang X, Li Z, Zhou T, Zhang Y, Shenge Q, Zheng J, 2018. Simultaneous determination of arsenic, cadmium and lead in plant foods by ICP-MS combined with automated focused infrared ashing and cold trap. *Food Chemistry*, 26: 462-470.

**Atf İçin:** Acun S, Gül H, 2021. Mikroenkapsüle Çam Propolisinin Top Kek Üretiminde Kullanılması. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1205-1217.

**To Cite:** Acun S, Gül H, 2021. Usage of Microencapsulated Pine Propolis in Cupcake Production. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1205-1217.

### **Mikroenkapsüle Çam Propolisinin Top Kek Üretiminde Kullanılması**

Sultan ACUN<sup>1\*</sup>, Hülya GÜL<sup>2</sup>

**ÖZET:** Bu çalışmada; keskin kokusu ve tadı nedeniyle tüketimi sınırlı olan ve sağlığa faydası tespit edilen çam propolis ekstraktının mikroenkapsüle edilerek top kek üretiminde kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Sadece çam ağaçlarının bulunduğu Muğla bölgesinden temin edilen propolisin ultrasonik ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstrakt, maltodekstrin/arap zamkı kombinasyonu ile mikroenkapsüle edilmiştir. Mikroenkapsüle çam propolisi (MÇP) 4 farklı oranda (%0 [kontrol], %6, %9, %15) un ile yer değiştirme prensibine göre kek formülasyonuna ilave edilmiştir. MÇP ilave edilerek üretilen top keklerin toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite değerlerinin yanı sıra bazı kimyasal, tekstürel, fiziksel ve duyuşal özellikleri incelenmiştir. MÇP ilave edilme oranının artmasıyla kek örneklerinin toplam fenolik madde, antioksidan aktivite değeri, nem, protein, yağ ve kül içerikleri artmış, kabuk ve iç L\* değeri azalmış, a\* ve b\* değerinde artış meydana gelmiştir. MÇP ilavesi keklerin tekstürel özelliklerine önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) etki etmiş ve ilave edilme oranının artmasıyla sertlik değerinde azalma meydana gelmiştir. Duyusal özelliklerde ise MÇP'nin %6 oranında kullanılması top keklerde olumsuz bir etki yaratmamış ancak daha yüksek oranlarda kullanılması beğeni değerini olumsuz etkilemiştir. Çalışma sonucunda farklı yaş grupları ve gelir düzeyine sahip kişiler tarafından sevilerek tüketilen top keklerin fonksiyonel bir ürün haline getirilebilmesi için %6 seviyesine kadar MÇP'nin duyuşal özelliklerde bir olumsuzluğa yol açmadan top kek üretiminde kullanılabileceği tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Propolis, mikroenkapsül, top kek, toplam fenolik madde

### **Usage of Microencapsulated Pine Propolis in Cupcake Production**

**ABSTRACT:** In this study; It was aimed to research the use of pine propolis extract, whose consumption is limited due to its pungent smell and taste and which has been found to have health benefits, by microencapsulation in the production of cake. The extract obtained as a result of ultrasonic extraction of propolis only from the region of pine trees was microencapsulated with maltodextrin/gum arabic combination. Microencapsulated pine propolis (MÇP) was used in cake production according to the principle of replacing with flour in 4 different ratios (0% [control], 6%, 9%, 15%). In addition to the total phenolic substance and antioxidant activity of the cupcakes produced by adding MÇP, some chemical, textural, physical and sensory properties were determined. As the MÇP ratio increased, the total amount of phenolic matter, antioxidant activity, moisture, protein, oil and ash ratio increased. As the MÇP ratio increased, the crust and crumb L\* values of the cakes decreased, and a\* and b\* values increased. The addition of MÇP had a significant effect ( $P<0.05$ ) on the textural properties of the cakes and a decrease in the firmness value occurred as the addition ratio increased. In terms of sensory properties, when the MÇP was used at a rate of 6%, no negative effect was found in the cakes, but the use of higher rates caused the taste value to be negatively affected. As a result of the study, it was determined that cakes consumed by people of different age and income groups can be turned into a functional product by using MÇP. It has been determined that up to 6% MÇP can be used in the production of cupcakes without causing any difference in sensory properties.

**Keywords:** Propolis, microcapsule, cupcake, total phenolic content

<sup>1</sup> Sultan ACUN ([Orcid ID: 0000-0003-1954-6102](https://orcid.org/0000-0003-1954-6102)), Amasya Üniversitesi, Suluova Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Amasya, Türkiye

<sup>2</sup> Hülya GÜL ([Orcid ID: 0000-0002-6791-817X](https://orcid.org/0000-0002-6791-817X)), Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta, Türkiye

**\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Sultan ACUN, e-mail: sultan.acun@amasya.edu.tr

Bu çalışma Sultan Acun'un Doktora Tezinden üretilmiştir.

## GİRİŞ

Propolis bal arıları tarafından (*Apis mellifera*) çam, okaliptüs, kavak vb. bitkilerin yaprak, gövde, tomurcuk gibi kısımlarından toplanan salgıların balmumu, polen ve arıların çeşitli salgı ve enzimleri ile karıştırılması sonucu elde edilen zamksı bir maddedir (Bayram, 2015; Chen ve ark., 2018; Olegario ve ark., 2019). Yunanca “pro” (cephe, savunma) ve “polis” (şehir) kelimelerin birleşiminden oluşan propolis kelimesi arıların kovanlarını savunması anlamına gelmekte olup arılar tarafından kovadaki boşlukları kapatmak için kullanılmaktadır (Bogdanov, 2017).

Propolisin bileşiminde %40-70 reçine, %25-30 mum, %3-5 uçucu yağ, %2-5 mineral madde bulunmaktadır. Propolis Ca, Mg, Fe, K, Na gibi mineraller ile; B1, B2, PP, C ve E gibi vitaminleri içermektedir (Mehmetoğlu, 2017; Yang ve ark., 2017; Escriche ve Juan-Borras, 2018). Yapısında bulunan bileşenler nedeniyle propolisin; antifungal (Moreno ve ark., 2020), antialerjik (Naz ve ark., 2019), antikanserojen (Catchpole ve ark., 2018, Vukovic ve ark., 2018), antitümoral (Silva-Frozza ve ark., 2017), antiviral (Hochheim ve ark. 2019), yara iyileştirici ve hücre yenileyici (Doğan ve Hayoğlu, 2012) özellikleri bulunmaktadır. Günümüzde yapılan birçok çalışma ile propolisin biyoaktif bileşenlerinin meme, kolon, mide ve pankreas kanserine olumlu yönde katkı sağladığı belirlenmiştir (Patel, 2016; Catchpole ve ark., 2018; Vukovic ve ark., 2018). Tüm bu etkilerinin yanı sıra antiseptik, antiinflamatuvar (Walgrave ve ark., 2005); ağız ve diş sağlığını koruyucu (Gargouri ve ark., 2020) ve nöroprotektif (El-Seedi ve ark., 2020) gibi faydaları da bulunmaktadır. Son günlerde ön plana çıkan SARS ve Cov-2 virüsü üzerine yapılan çalışmalarda da propolisin önleyici ve iyileştirici etkileri belirlenmiştir (Kumar ve ark., 2020, Acun ve Gül, 2020; Berretta ve ark., 2020; Sahlan ve ark., 2020).

Kek, kraker ve bisküvi gibi yumuşak buğday ürünlerinden biri olup, besin değeri yüksek ve toplumun birçok kesimi tarafından sevilen bir gıda maddesidir. Üretiminde kullanılan farklı yöntemler ve farklı formülasyonlar nedeniyle kekin tam tanımı yapılamamakla birlikte TSE 13375 kek standardına göre “Buğday unu veya tahıl unları ve/veya karışımları, beyaz şeker, yemeklik bitkisel yağ, yumurta, tuz, kabarmayı sağlayan maddeler, çeşni maddeleri, dolgu maddeleri ve diğer katkı maddelerinin, TS 266’ya uygun su eklenerek karıştırıldıktan sonra, tekniğine uygun biçimde işlenerek şekil verilmesi ve pişirilmesi suretiyle hazırlanan, ambalajlı olarak tüketime sunulan mamül” şeklinde tanımlanmıştır (Anonim, 2008). Kentleşme ve modern yaşam koşulları, toplumu besin değeri yüksek, görsel çekiciliği olan ve farklı tatlardaki tüketime hazır yiyeceklere yöneltmiştir. Kahvaltıda veya gün içerisinde pratik ve besleyici olmasından dolayı açlığı bastırmak için kolayca tüketilebilen dilim veya top kekler, farklı yaş grupları, eğitim ve gelir düzeyine sahip kişiler tarafından tercih edilmektedir (Baltacıoğlu ve Uyar, 2017; Najafi ve ark., 2017).

Literatüre bakıldığında propolis ve ekstraktlarının gıdanın raf ömrünü arttırmak ve fonksiyonel özellikler kazandırmak için et, süt, meyve-sebze ürünleri gibi alanlarda kullanımı yaygındır. Ancak propolisin kendine has tadı ve kokusu bu gıdalarda kullanılabilirliğini sınırlandırmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada mikroenkapsüle edilerek propolisin olumsuz özellikleri maskelenmiş ve top kek üretiminde kullanılma potansiyeli araştırılmıştır. Propolis, çeşitli bitkilerden arılar tarafından toplandığı için farklı botanik kökenlere sahiptir. Bu çalışmada diğer çalışmalardan farklı olarak tek bir orijine sahip propolis ekstraktı mikroenkapsüle edilerek top kek üretiminde kullanılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Özel amaçlı buğday unu (Anonim, 2013) Hediye Un Fabrikasından (Isparta, Türkiye) sağlanmıştır. Kek üretiminde kullanılan diğer malzemeler yağsız süt tozu (Anonim, 2007), şeker (Anonim, 2017),

pastörize yumurta (Anonim, 2009), margarin (Anonim, 2014), tuz (Anonim, 2003), kabartma tozu (Anonim, 2019) Isparta’da yerel piyasadan satın alınmıştır.

Propolis 2018 Ekim’inde kovanlarını çam ağaçlarının olduğu bölgede (Muğla) sabit tutan arıcılardan tuzaktan toplama metodu ile toplatılarak temin edilmiştir. Temin edilen propolis laboratuvara getirildikten sonra kolay öğütebilmek amacıyla dondurulmuş ve ekstraksiyon işlemi için toz haline getirilmiştir.

Analizlerde kullanılan kimyasallar; gallik asit, sodyum karbonat, folin – ciocalteau reaktifi, asetik asit, hidroklorik asit ve sülfürik asit Sigma – Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) temin edilmiş olup hepsi analitik saflıktadır.

## Metot

### Çam propolisinde yapılan analizler

Çam propolisinin özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla pH, mum, kuru madde, kül, oksidasyon (Engür, 2007) analizleri yapılmıştır.

### Mikroenkapsüle çam propolisinin (MÇP) hazırlanması

Propolislerin fenolik madde ekstraksiyonu ultrasonik ekstraksiyon yöntemiyle yapılmıştır. Bu amaçla 10 g öğütülmüş propolis örneğine 100 ml %60 etanol ilave edilmiş ve ultrasonik su banyosunda (Say Ultrasonik, İstanbul, Türkiye) 75°C’de 40 dak süreyle ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Elde edilen ekstrakt 20 dak 6000x g santrifüjde (Hermle Z206A, Wehingen, Almanya) santrifüjlenmiş ve Whatman No 1 filtre kağıdından süzülmüştür. Ekstrakta kalan alkol rotary evaporatörde (Buchi R100, Türkiye) vakum altında buharlaştırılmıştır.

Ultrasonik ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstraktlar liyofilizasyon metoduyla mikroenkapsüle edilmiştir. Mikroenkapsülasyon işlemi için kaplama materyali olarak maltodekstrin ve arap zıncı kullanılmıştır. Kaplama materyalinin oranının belirlenmesi için ön denemeler yapılmış ve en ideal sonucu veren %95 maltodekstrin ve %5 arap zıncı oranı asıl mikroenkapsülasyon işleminde kullanılmıştır. Yine ön denemelerde uygunluğu belirlenen 1:4 çekirdek kaplama oranı kullanılmıştır. Hazırlanan kaplama / çekirdek solüsyonu bir gece dondurucuda (Binder UF V 500, ABD) bekletilmiş ve tamamen dondurulmuştur. Daha sonra -85°C’de 0.021 mBar basınçta 40 saat liyofilizatörde (Labconco, Kansas, ABD) kurutma sonucunda propolisin mikrokapsülleme işlemi tamamlanmıştır. MÇP, kek üretiminde kullanılabilecek kadar oda sıcaklığında desikatörde bekletilmiştir.

### Top keklerin hazırlanması

Top kekler, Giritlioğlu (2017)’nin formülasyonu ve Goswami ve ark. (2015)’nin yönteminde modifikasyonlar yapılarak hazırlanmıştır. Top kek üretimi için Çizelge 1’de verilen formülasyon kullanılmıştır. Top keklerin üretimi için öncelikle el mikserinde (Tefal Smart, Türkiye) 1. devirde 2 dak süreyle pastörize yumurtalar çırpılmış daha sonra 35 ml su eklenerek 1 dak 1. devirde çırpılmaya devam edilmiştir. Şeker ilave edildikten sonra 1. devirde 1 dak daha çırpılmış ve margarin ilave edildikten sonra 1. devirde 1.5 dak daha çırpma işlemi uygulanmıştır. Sıvı karışıma kuru bileşenler ilave edildikten sonra önce 1. devirde 1 dak, sonra 2. devirde 1 dak daha çırpma işlemi yapılarak hamur hazırlanmıştır. Hazırlanan hamurdan top kek pişirme kağıtlarına 35 g hamur tartılmış ve top kek üretiminde kullanılan 12’li kalıplara yerleştirilmiştir. 210°C’de 20 dak süreyle üç katlı Siemens marka set üstü fırının orta katında pişirilmiştir. Pişirme işlemi biten kekler 20 dak süreyle kalıpta, sonra 40 dak süreyle kalıp dışında soğutulmuş ve daha sonra analizleri yapılmıştır. Mikroenkapsüle çam propolisi ilave edilen keklerin üretimi ise un yerine 3 farklı oranda (%6, 9 ve 15) MÇP ilave edilerek gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 1.** Top kek üretiminde kullanılan formülasyon

| Bileşenler      | Miktar (g) |
|-----------------|------------|
| Un              | 100        |
| Şeker           | 80         |
| Yumurta         | 60         |
| Margarin        | 60         |
| Su              | 35         |
| Yağsız süt tozu | 7.5        |
| Kabartma tozu   | 3          |
| Tuz             | 0.5        |

**Özel amaçlı buğday unu ve top kek örneklerinde yapılan bazı kimyasal analizler**

Özel amaçlı buğday ununda ve top keklerde nem (Anonymous, 2000a), yağ (Anonymous, 1990), kül (Anonymous, 2000a), protein (Anonymous, 2000b); özel amaçlı buğday ununda yaş ve kuru öz (Anonymous, 2000a), Zeleny sedimantasyon (Anonymous, 2000a) ve düşme sayısı (Anonymous, 2000a) analizleri yapılmıştır.

**Özel amaçlı buğday unu, propolis ve top kek örneklerinde renk analizi**

Özel amaçlı buğday un, propolis ve top kek örneklerinde renk özellikleri (iç ve dış L\*, a\* ve b\* değerleri) üç farklı noktadan Minolta CR-410 (Minolta Co Ltd., Tokyo, Japonya) cihazı ile ölçülerek belirlenmiştir. Renk ölçümünde kullanılan L\* değeri [(0) Siyah – (100) Beyaz], a\* değeri [(+) kırmızı, (-) yeşil] ve b\* değeri [(+) sarı, (-) mavi] şeklinde ifade edilmektedir (Ulutürk, 2018).

**Propolis ve top keklerin toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite analizi**

Top kek örneklerinden fenolik bileşenlerin ekstrakte edilebilmesi için 10 g numune alınmış ve 20 ml etanol: asetik asit: su (50: 8: 42) karışımı eklenmiştir. Top kekler cam bagetle ezildikten sonra 10.000 rpm'de 2 dak Ultra-Turrax (Cat x120, Almanya) ile parçalanmıştır. Parçalanan kekler daha sonra aynı koşullarda santrifüjlenmiş (Hermle Z 206 A, Almanya) ve süpernatant katı kısımdan süzülerek ayrılmıştır. Elde edilen süzüntüden top kek içerisindeki toplam fenolik madde ve antioksidan güç analizleri yapılmıştır (Tatar, 2017).

Ekstrakte edilen propolis ve top keklerin toplam fenolik madde miktarı Singleton ve Rossi (1965)'ye, % DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal indirgeme aktivitesi ise Dorman ve ark. (2003)'na göre belirlenmiştir. Propolisin antioksidan aktivite değeri IC<sub>50</sub> olarak ifade edilmiştir.

**Top kek örneklerinin tekstürel özellikleri**

Top kek kalitesinin belirlenmesinde önemli bir parametre olan sertlik ve esneklik değeri TA-XT PLUS cihazı (TA- XT Plus, İngiltere) ile ölçülmüştür. Analiz için 36 mm'lik silindirik prob (P/36) kullanılmıştır. Top keklerin tekstürel özelliklerinin belirlenebilmesi için keklerin üst bombeli kısımları elektrikli bıçak ile kesilmiş ve tabandan 4 cm yüksekliğinde kekler hazırlanmıştır. Test parametreleri olarak ön test hızı 2 mm s<sup>-1</sup>, test hızı 1 mm s<sup>-1</sup>, son test hızı 10 mm s<sup>-1</sup>, sıkıştırma mesafesi ürünün%25'i olarak uygulanmış ve ürün 30 s sıkıştırılmıştır. Sertlik, keklerin önceden ayarlanmış %25'lik bir mesafe kadar sıkıştırmak için gereken bir kuvvet olarak tanımlanırken, esneklik ise 30 s sonra kaydedilen bu kuvvetin maksimum kuvvete bölünmesi ve ardından 100 ile çarpılmasıyla bulunmaktadır (Gao ve ark., 2016).

### Top kek örneklerinin duyuusal analizi

Top kekler yaşları 20-32 arasında değişen 15 kişilik panelist grubu tarafından değerlendirilmiştir. Panel öncesi değerlendirme koşulları ile ilgili bilgilendirilen panelistlere rasgele numaralandırılan top kekler ayrı ayrı verilmiş ve her top kek örneğinin değerlendirilmesinden sonra tat karışımının engellenmesi için soğuk su ikram edilmiştir. Top keklerin değerlendirilmesinde 5 puanlık bir skala kullanılmış ve “5 puan: çok iyi, 4 puan: iyi, 3 puan: kabul edilebilir, 2 puan: yeterli değil, 1 puan: kötü” olarak ifade edilmiştir. Top kekler duyuusal olarak dış ve iç renk, gözenek yapısı, yapısal/tekstürel özellikler, ağızda dağılma, aroma, tat/lezzet, çiğnenebilirlik, kumlu/kuru olma, koku ve genel beğeni özellikleri açısından değerlendirilmiştir (Ulutürk, 2018).

### İstatistiksel Analizler

Top kek örneklerinin belirlenen özelliklerinden elde edilen veriler “SPSS” paket programı (SPSS, version 24.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, ABD) kullanılarak tek yönlü varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuş ve önemli bulunan değerlere Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanarak istatistiksel farklılıkları ( $P<0.05$ ) belirlenmiştir.

### BULGULAR VE TARTIŞMA

#### Çam Propolisinin Özellikleri

Çam propolisinin kül içeriği %1.65, %80 etanolde özütlenerek ölçülen pH değeri 5.38, mum içeriği %24.07, kuru madde içeriği ise %96.28, olarak belirlenmiştir. Propoliste oksidasyon belirlenmemiştir. Bu durum propolislerin tazeliğinin göstergesidir.

Propolisin renk değeri toplandığı bitki türüne ve arıların cinsine göre değişkenlik göstermektedir. Çam propolisinin L\* değeri 30.50, a\* değeri 7.51 ve b\* değeri 12.54 olarak belirlenmiştir.

Ekstrakte edilen çam propolisinde toplam fenolik madde miktarı 388.73 g GAE/kg, antioksidan aktivitesini gösteren IC<sub>50</sub> değeri ise 103.15 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Altı farklı Brezilya propolisini inceleyen Cunha ve ark. (2004), tarafından propolis örneklerinin kül içeriğinin %2.55-4.59, kuru madde içeriğinin ise %90.6-95.4 arasında değiştiği rapor edilmiştir. Benzer bir çalışmayı Kayseri propolisleri üzerinde yapan Engür (2007) ise 15 farklı propolisin kül içeriğinin %1.59-3.96, mum içeriğinin ise %3.01-30.14 arasında değiştiğini bildirmiştir.

Ökalyptüs, kestane ve kavak propolislerinin özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla Silici (2008) tarafından yapılan çalışmada, toplam fenolik madde miktarları sırasıyla 87.62, 125.30 ve 127.39 mg GAE/g propolis olarak rapor edilmiştir. Aliyazıcıoğlu ve ark. (2013) tarafından 10 farklı propolis örneğinde yapılan çalışmada ise, toplam fenolik madde miktarlarının 115.49-210.33 mg GAE/g arasında değiştiği bildirilmiştir.

#### Özel Amaçlı Buğday Ununun Özellikleri

Özel amaçlı buğday ununun nem, kül, protein ve yağ oranı sırasıyla %12.49, %0.48, %8.5 ve %0.02 olarak belirlenmiştir. Yaş öz, kuru öz, Zeleny sedimantasyon ve düşme sayısı değeri ise sırasıyla %30.08, %9.95, 46 ml ve 478 s olarak belirlenmiştir.

Top kek üretiminde kullanılan unun L\* değeri 85.72, a\* değeri -2.34 ve b\* değeri 9.7 olarak belirlenmiştir. Top kek ile ilgili çalışmalar yapan farklı araştırmacılar da kullandıkları unun nem değerlerinin %11.93-12.45, yağ değerlerinin %0.01-1.25, kül değerlerinin %0.47-0.65 ve protein değerlerinin %9.80-11.93 arasında değiştiğini bildirmişlerdir (Şeker ve ark., 2006; İpek, 2017, Topkaya ve Işık, 2018, Ashoori ve ark., 2020).



### Top Kek Örneklerinin Bazı Kimyasal Özellikleri

Değişik düzeylerde MÇP ilave edilerek üretilen top keklerin kimyasal kompozisyonuna ait veriler Çizelge 2’de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.** MÇP\* ilave edilerek üretilen top keklerin kimyasal özellikleri

| MÇP** Düzeyi (%) | Nem (%)                  | Kül (%)                | Protein (%)              | Yağ (%)                 |
|------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 0                | 19.84±0.05 <sup>c</sup>  | 1.22±0.00 <sup>d</sup> | 9.76±0.06 <sup>c</sup>   | 29.70±0.08 <sup>d</sup> |
| 6                | 20.38±0.37 <sup>b</sup>  | 1.63±0.05 <sup>c</sup> | 12.25±0.02 <sup>b</sup>  | 32.78±0.07 <sup>c</sup> |
| 9                | 20.69±0.07 <sup>ab</sup> | 1.67±0.02 <sup>b</sup> | 12.81±0.08 <sup>ab</sup> | 34.59±0.09 <sup>b</sup> |
| 15               | 20.99±0.03 <sup>a</sup>  | 1.69±0.00 <sup>a</sup> | 12.84±1.30 <sup>a</sup>  | 37.43±0.04 <sup>a</sup> |

\*Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark vardır ( $P<0.05$ ) \*\*MÇP: Mikroenkapsüle çam propolis ekstraktı

MÇP ilave edilme oranı arttıkça kek örneklerinin toplam protein, kül, yağ ve nem oranı artmıştır. Kontrol grubu keklerin nem içeriği %19.84 olup, %15 oranında MÇP ilavesiyle bu oran yaklaşık %21’e yükselmiştir. MÇP ilavesiyle su tutma kapasitesi artmış ve bu durum keklerin nem oranının artmasına neden olmuştur.

MÇP ilave edilerek üretilen keklerin kül değeri %1.22-1.69 arasında değişmiştir. İlave edilen mikroenkapsül oranının artmasına paralel olarak keklerin kül değerinde artış meydana gelmiştir. Mikroenkapsüllerin elde edilmesinde kullanılan arap zankı mineral madde bakımından yüksek değere sahiptir. Bu nedenle keklerde mikroenkapsül oranının artması kül değerinin artmasına neden olmuştur.

En yüksek protein değeri %15 MÇP ilaveli örnekte %12.84 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre %15 oranında MÇP ilave edilen top keklerin protein içeriği yaklaşık 1/3 oranında artmıştır. Protein oranında olduğu gibi mikroenkapsül ilavesi arttıkça top keklerin yağ oranları artış göstermiş ve yağ oranı %29.70-37.43 arasında değişmiştir.

Keçiyoynuzu ununun (Gerçekaslan ve Boz, 2018), farklı formlardaki yer fıstığı ürünlerinin (İpek ve Dizlek, 2018), bal tozunun (Demir ve Kılınç, 2019), kırık leblebi ununun (Ataman ve Gül, 2020) kek üretiminde kullanıldığı çalışmalarda araştırmacılar tarafından, kullanılan maddelerin ilave edilme oranının artmasıyla nem, kül ve yağ değerinde artış meydana geldiği rapor edilmiştir.

### Top Keklerin Toplam Fenolik Madde ve Antioksidan Aktivite Özellikleri

Çizelge 3’te farklı oranlarda MÇP ilave edilen top keklerin toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivite değerleri verilmiştir. Çizelge 3’te görüleceği gibi MÇP ilave edilme oranı arttıkça toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivite değerinde artış görülmüştür. En yüksek toplam fenolik madde ( $1341.55 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ ) ve antioksidan aktivite (% 93.32) değerleri %15 MÇP ilaveli kek örneğinde saptanmıştır. Toplam fenolik madde miktarı %15 MÇP ilave edilerek üretilen keklerde kontrol kekine göre yaklaşık 5.5 kat daha fazla bulunmuştur. Antioksidan aktivite değeri %1.62-93.32 arasında değişim göstermiştir.

**Çizelge 3.** Mikroenkapsüle çam propolisi ilave edilerek üretilen top keklerin toplam fenolik ve antioksidan aktivitesi\*

| MÇP Düzeyi (%)** | Toplam Fenolik Madde (mg GAE $100\text{g}^{-1}$ ) | Antioksidan Aktivite (%) |
|------------------|---|--------------------------|
| 0                | 253.99±1.15 <sup>d</sup>                          | 1.62±0.01 <sup>c</sup>   |
| 6                | 609.95±1.14 <sup>c</sup>                          | 76.95±0.56 <sup>b</sup>  |
| 9                | 787.08±0.56 <sup>b</sup>                          | 77.06±0.06 <sup>b</sup>  |
| 15               | 1341.55±1.05 <sup>a</sup>                         | 93.32±0.28 <sup>a</sup>  |

\*Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark vardır ( $P<0.05$ ) \*\*MÇP: Mikroenkapsüle çam propolis ekstraktı

Fırın ürünlerinde pişirme sırasında meydana gelen maillard reaksiyonu ürünleri antioksidan aktivite göstermektedir. Kontrol grubu keklerde belirlenen antioksidan aktivitenin bu reaksiyon ürünlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Kontrol grubunda %1.62 olarak bulunan antioksidan aktivite değeri MÇP ilaveli örneklerde belirgin düzeyde ( $p<0.05$ ) artış göstermiştir. En yüksek antioksidan aktivite değeri %15 MÇP ilaveli kek örneğinde tespit edilmiştir.

İki farklı elma kabuğunun kek üretiminde kullanımının ürün kalitesine etkisini inceleyen araştırmacılar (Rupasinghe ve ark., 2008), elma kabuğu ilavesinin keklerde toplam fenolik madde miktarını ve antioksidan aktivite değerini arttırdığını belirlemiştir. Benzer şekilde nar kabuğunun muffin kimyasal özelliklerine etkisini inceleyen araştırmacılar da ilave edilme oranının artmasıyla toplam fenolik madde miktarının arttığını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar %15 oranında nar kabuğu ilave edilen keklerin toplam fenolik madde miktarının  $777.06 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$  olduğunu bulmuşlardır (Topkaya ve Işık, 2018).

### Top Keklerin Renk Özellikleri

Top keklerin renk değerine ait veriler Çizelge 4'te, üst ve kesit görüntüleri ise Şekil 1' de verilmiştir. Farklı oranlarda MÇP ilave edilen top keklerin kabuk L değerinde istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ( $p<0.05$ ). Kabuk a ve b değerinde ise MÇP ilave edilen kekler arasında bir fark belirlenmezken kontrol gurubuna göre MÇP ilave edilen top kekler daha yüksek a ve b değerlerine sahip olmuştur.

**Çizelge 4.** Mikroenkapsüle çam propolisi ilave edilerek üretilen top keklerin kabuk ve iç renk değerleri\*

| MÇP Düzeyi (%)** | Kabuk                   |                         |                         | İç                      |                         |                         |
|------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                  | L                       | a                       | b                       | L                       | a                       | b                       |
| 0                | 57.92±4.53 <sup>a</sup> | 12.88±1.99 <sup>b</sup> | 26.65±1.29 <sup>b</sup> | 72.87±1.73 <sup>a</sup> | 0.16±0.15 <sup>d</sup>  | 22.60±0.71 <sup>b</sup> |
| 6                | 56.15±2.48 <sup>a</sup> | 16.67±1.38 <sup>a</sup> | 31.51±1.03 <sup>a</sup> | 60.96±2.05 <sup>b</sup> | 8.79±0.35 <sup>c</sup>  | 22.28±0.83 <sup>b</sup> |
| 9                | 54.85±2.21 <sup>a</sup> | 16.33±1.45 <sup>a</sup> | 31.76±1.47 <sup>a</sup> | 59.65±0.98 <sup>b</sup> | 9.81±0.36 <sup>b</sup>  | 23.29±0.37 <sup>b</sup> |
| 15               | 50.79±5.24 <sup>a</sup> | 16.34±2.04 <sup>a</sup> | 27.31±1.55 <sup>b</sup> | 53.74±2.96 <sup>c</sup> | 11.29±0.85 <sup>a</sup> | 24.89±0.41 <sup>a</sup> |

\*Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark vardır ( $P<0.05$ ) \*\*MÇP: Mikroenkapsüle çam propolis ekstraktı

İç L, a ve b değerinde ise MÇP ilavesi istatistiksel olarak önemli bir fark meydana getirmiştir ( $p<0.05$ ). Kontrol grubunda L değeri 72.87 olarak belirlenirken, %6, %9 ve %15 oranında MÇP ilave edilen top keklerde sırasıyla 60.96, 59.65 ve 53.74 olarak tespit edilmiştir. MÇP ilave edilme oranının artması L değerinin azalmasına, kırmızılık (a değeri) ve sarılık (b değeri) değerlerinin artmasına neden olmuştur. Kırmızılık değerinin göstergesi olan a değeri kontrol grubu keklerde 0.16 olarak belirlenirken %6 MÇP ilave edildiğinde 8.79, %9 MÇP ilave edildiğinde 9.81 ve %15 MÇP ilave edildiğinde 11.29 olarak belirlenmiştir. Sarılık değerinin göstergesi olan b değeri 22.60-24.89 arasında değişmiş olup en yüksek b değeri %15 MÇP ilave edilerek üretilen top keklerde belirlenmiştir. MÇP ilave edilme oranına göre top keklerin renklerinde meydana gelen değişim Şekil 1'de görülmektedir.

Mikroenkapsülasyon işleminde kullanılan ve maltodekstrine göre nispeten koyu renkli olan arap zıncı oranının keklerdeki miktarı mikroenkapsüllerin ilave edilme oranına paralel olarak artmış ve keklerde daha koyu bir renk oluşmasına neden olmuştur. Aynı zamanda fırın ürünlerinde pişirme sırasında meydana gelen maillard reaksiyonu sonucu oluşan esmer renkli melanoidin bileşenleri aroma ve rengin oluşumundan sorumludur. Esmer renkli bu bileşenler ve şekerlerin karamelizasyonu sonucunda MÇP artışına koşut olarak top keklerin kabuk ve iç renginin daha yüksek değerlere sahip olduğu düşünülmektedir (Chahdoura ve ark., 2018, Ataman ve Gül, 2020).



**Şekil 1.** Farklı oranlarda (Soldan sağa %0, %6, %9 ve %15) mikroenkapsüle çam propolisi ilave edilerek üretilen top keklerin üst ve kesit görüntüleri

Badem ve soya unu (Andersson, 2016), pekan cevizi (Marchetti ve ark., 2018), kırık leblebi unu (Ataman ve Gül, 2020) ilave edilerek üretilen keklerde araştırmacılar kullanılan maddelerin ilave edilme oranının artmasıyla daha koyu renkte kekler elde edildiğini bildirmişlerdir. Bu açıdan çalışmamız literatür ile benzerlik göstermiştir. Elde edilen bu verilere göre MÇP ilave edilmesinin kek rengi üzerine olumsuz yönde etkisinin bulunmadığı ve ticari olarak üretimde kullanılabileceği düşünülmektedir.

### Top Keklerin Tekstürel Özellikleri

MÇP ilave edilen top keklerin sertlik ve esneklik değerlerinde meydana gelen değişim Çizelge 5'te görülmektedir. Top keklerin sertlik değeri 454.56-922.70 g arasında değişmiştir. MÇP ilave edilme oranının arttıkça sertlik değerleri azalmıştır. Kontrol grubunun esneklik değeri %42.93, %15 MÇP ilaveli kek örneğinin ise esneklik değeri %46.20 olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 5.** Top keklerin tekstürel özellikleri\*

| MÇP Düzeyi (%)** | Sertlik (g)               | Esneklik (%)            |
|------------------|---------------------------|-------------------------|
| 0                | 922.70±1.77 <sup>a</sup>  | 42.93±2.03 <sup>c</sup> |
| 6                | 559.26±50.68 <sup>b</sup> | 50.22±0.39 <sup>a</sup> |
| 9                | 553.44±45.22 <sup>b</sup> | 49.39±0.47 <sup>a</sup> |
| 15               | 454.56±4.06 <sup>c</sup>  | 46.20±0.65 <sup>b</sup> |

\*Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark vardır (P<0.05) \*\*MÇP: Mikroenkapsüle çam propolis ekstraktı

Sertlik, örneklerin sıkıştırılması için gerekli kuvvet olup kuvvet zaman eğrisinde tepe noktasının ölçülmesiyle belirlenir (Abdul Manaf ve ark., 2017). Kontrol grubu kekler daha yüksek sertlik değerine sahip olmasına rağmen MÇP ilave edilme oranı arttıkça sertlik değeri azalmıştır (Çizelge 5). MÇP ilave edildikçe üç boyutlu protein ağlarında hidrojen bağlarının gücünün azalması sertlik ve esneklik değerinin azalmasına neden olmuş olabilir. Benzer bir sonuç Zahn ve ark. (2010) tarafından yağ ikame maddesi olarak inülin kullanılan top keklerde belirlenmiştir. Aynı zamanda şekerin jelatinizasyonu geciktirmesi top kek yapısının dokusunda bir yumuşama meydana getirmiştir. Akewan (2009) tarafından yağ ikamesi olarak eritritol-sükrolaz kullanılan keklerde benzer bir sonuç rapor edilmiştir. Şeker oranının azalmasıyla sertlik ve esneklik değerinde artış belirlendiğini rapor eden çalışma ise Gao ve ark. (2016) tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar şeker ikamesi olarak inülin ve stevya kullandıkları keklerde ikame oranının artmasına paralel olarak keklerin sertlik ve esneklik değerinin arttığını bildirmişlerdir.

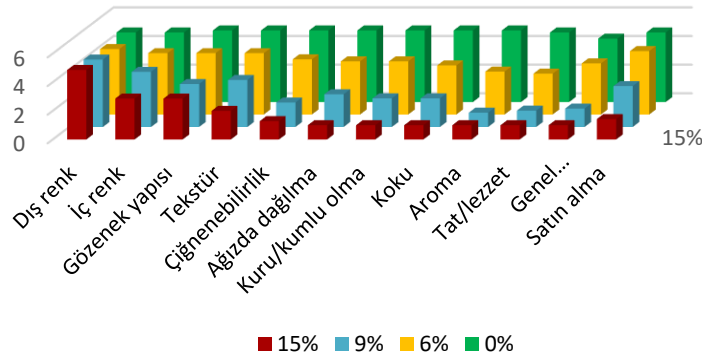
Esneklik değeri keklerin taze, iyi havalandırılmış ve elastik tekstürü ile ilişkilendirilmiş olup yüksek esneklik değeri keklerin daha kaliteli olduğunu ifade etmektedir (Shevkani ve ark., 2015; Grasso ve ark., 2020). MÇP ilave edilerek üretilen keklerde en yüksek esneklik değerine %50.22 ile %6 MÇP ilave edilerek üretilen kekler sahip olmuştur. İlave edilen madde oranının artmasıyla esneklik değerinde azalma Grasso ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmada da rapor edilmiştir. Araştırmacılar yağı alınmış ayçiçeği tohumu tozuyla zenginleştirdikleri top keklerin esneklik değerinin ilave edilme oranı arttıkça azaldığını bildirmişlerdir.

MÇP ilave edilerek üretilen keklerin tekstürel özellikleri genel olarak incelendiğinde MÇP ilave oranının artması keklerin tekstürel özelliklerini kısmen olumsuz etkilemiştir. %15 oranında MÇP ilavesi keklerin sertlik değerini kontrol grubuna göre yaklaşık %50 azaltmıştır. En iyi esneklik değeri ise %6 ve %9 oranında MÇP ilave edilerek üretilen keklerde belirlenmiştir.

### Top Keklerin Duyusal Özellikleri

Top keklerin duyusal analizine ait ölçüm sonuçları Şekil 2’de gösterilmiştir. Top keklerde MÇP ilave edilme oranı arttıkça dış rengin kabulünü olumsuz etkileyen bir fark belirlenmemiştir. İç renkte ise MÇP ilavesinin artması keklerin tüketici beğenisinin azalmasına neden olmuştur. %6 oranında MÇP ilave edilerek üretilen kekler gözenek yapısı bakımından kontrol grubuna en yakın puana sahip olan kekler olmuştur.

### Duyusal Analiz



Şekil 2. Top keklerin duyusal analiz grafiği

Tekstür, çiğnenebilirlik, ağızda dağılma, koku, aroma, tat/lezzet ve genel kabul edilebilirlik puanları MÇP ilave edilme oranının artmasıyla azalmıştır. En yüksek beğeniye kontrol grubundan sonra %6 oranında MÇP ilave edilen kekler sahipken en düşük beğeniye %15 oranında MÇP ilave edilen kekler sahip olmuştur. Propolisin keskin tat ve kokusu mikroenkapsülasyon ile maskelenmeye çalışılmıştır ancak uçucu bileşenler mikroenkapsülasyon işlemi ile kapsül içerisinde daha yoğun hale gelmiştir. Ağızdaki sindirim enzimlerinin etkisiyle de aroma bileşenleri kısmen açığa çıkarak tüketicilerin beğenisinin azalmasına neden olmuştur. Aynı şekilde panelistler %15 oranında MÇP ilave edilerek üretilen kekleri en düşük satın alınabilir kek olarak belirlemiştir.

Duyusal özellikler bir bütün olarak ele alındığında çam propolisinin maltodekstrin/arap zamkı ile mikroenkapsülasyonu sonucu istenmeyen koku aroma bileşenlerinin maskelenerek kek üretiminde kullanılabilmesi, %6 oranına kadar MÇP ilave edilerek üretilen fonksiyonel özellikteki keklerin duyusal özelliklerde önemli bir farklılık oluşturmadığı sonucuna varılmıştır.

Işık ve ark. (2017), %24 oranında yaban mersini ilave edilen keklerin beğenildiğini rapor ederken, İpek ve Dizlek (2018) tarafından en yüksek beğeniye %7.5 oranında yer fıstığı ilave edilerek üretilen keklerin sahip olduğunu bildirmişlerdir.

## SONUÇ

Propolis yüksek fenolik madde içeriği nedeniyle günümüzde çeşitli amaçlarla kullanılabilen bir arı ürünüdür. Ancak keskin kokusu ve aroması tüketimini sınırlandırmaktadır. Mikroenkapsülasyon yöntemi ile fenolik madde içeriği korunup kötü koku ve aromasının maskelenmesi sonucunda gıda sanayinde kullanımı daha yaygın hale getirilebilir. Özellikle günlük beslenmemizde önemli bir yere sahip olan fırın ürünlerinde kullanılabileceği ve besin değerinde iyileşmeler sağladığı görülmektedir. Tansiyon, kalp, şeker, kanser gibi çeşitli hastalıklarda hastaların beslenmesinde antioksidan içeriği yüksek gıdaların tüketilmesi tavsiye edilmektedir. Bu amaçla farklı yaş grupları tarafından da sevilerek tüketilen top keklerin antioksidan maddelerce zenginleştirilmesi hastaların günlük diyetlerinde sağlıklı ve lezzetli bir alternatif ürün elde edilmesini sağlamıştır.

Sonuç olarak top kek üretiminde mikroenkapsüle çam propolisinin kullanılmasıyla antioksidan aktivite, toplam fenolik madde, yağ, protein ve kül değerinde artış meydana gelmiş ve besin değeri yüksek fonksiyonel bir kek üretilmiştir. Maltodekstrin/arap zıncı kullanılarak propolisin istenmeyen koku ve aroması maskelenmiş ve %6 oranına kadar MÇP'nin kekin duyusal özelliklerinde bir değişiklik meydana getirmeden kullanılabildiği belirlenmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (SDÜ-BAP) Koordinasyon Birimi tarafından FDK-2019-6924 nolu proje ile desteklenmiştir.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Abdul Manaf M, Othman NA, Harith S, Wan Ishak WR, 2017. Thermal Properties of Batter and Crumb Structure of Muffin Incorporated with Persea Americana Puree. *Journal of Culinary Science and Technology*, 15(3), 259-271.
- Acun S, Gül H, 2020. Fonksiyonel Bir ürün Olan Propolisin Sağlık Üzerine Etkisi. *Uludag Bee Journal*, 20(2), 189-208.
- Akesowan A, 2009. Quality of reduced-Fat Chiffon Cakes Prepared with Erythritol-Sucralose as Replacement for Sugar. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(9), 1383-1386.
- Aliyazıcıoğlu R, Sahin H, Erturk O, Ulusoy E, Kolayli S, 2013. Properties of Phenolic Composition and Biological Activity of Propolis From Turkey. *International Journal of Food Properties*, 16(2), 277-287.
- Andersson, M, 2016. Protein Enriched Foods and Healthy Ageing: Effects of Almond Flour, Soy Flour and Whey Protein Fortification on Muffin Characteristics, *Science partner*, 1-23.
- Anonim, 2003. Yemeklik tuz standardı. TS 933 Ankara Türkiye. TSE. 2007b. Süt Tozu Standardı. TS 1329 Ankara Türkiye.
- Anonim, 2007. Süt tozu Standardı. TS 1329 Ankara Türkiye.
- Anonim, 2008. Hazır Kekler- Sade Çeşnili ve Dolgulu Standardı. TS 13375 Ankara Türkiye.
- Anonim, 2009. Pastörize Sıvı Tavuk Yumurtası Standardı. TSE K 63 Ankara Türkiye.
- Anonim, 2013. Türk Gıda Kodeksi, Buğday Unu Tebliği. (Tebliğ No:28606), <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2013/04/20130402-7.htm> (Erişim Tarihi: 22.02.2021)

- Anonim, 2014. Yemeklik Margarin Standardı. TS 2812 Ankara Türkiye.
- Anonim, 2017. Beyaz Şeker Sakaroz Standardı. TS 861 Ankara Türkiye.
- Anonim, 2019. Kabartma Tozu-Hamur İçin Standardı. TS 9053 Ankara Türkiye.
- Anonymous, 1990. Fat in Foods - Chloroform-Methanol Extraction Method (983.23) Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, 15th edition, Washington DC, 1990.
- Anonymous, 2000a. American Association of Cereal Chemists Approved Methods of Cereal Chemists. 11th Edition The Association, St, Paul, MN, USA.
- Anonymous, 2000b. Total Kjeldahl Nitrogen (950.36) Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, 15th edition, Washington DC, 2000.
- Ashoori, MH, Movahed, S, Eyvazzadeh, O, 2020. Effect of Date Sap and Glucose Syrup as Replacement of Sucrose on Qualitative Properties of Muffin Cake. *Food Science and Technology*, 16(97), 51-61.
- Ataman Ç, Gül H, 2020. Leblebi Üretiminde Yan Ürün Olarak Açığa Çıkan Kırık Leblebi Ununun Mufin Kalitesi Üzerine Etkisi. *Black Sea Journal of Agriculture*, 11-12.
- Baltacıoğlu C, Uyar M, 2017. Kabak (Cucubita pepo L.) Tozunun Kek Üretiminde Potansiyel Kullanımı ve Kek Kalite Parametrelerine Etkisi. *Akademik Gıda*, 15(3), 274-290. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.345267>
- Bayram NE, 2015. Hakkâri Bölgesi Propolislerinin Botanik Orijininin ve Kimyasal İçeriğinin Saptanması, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 222 s., İstanbul.
- Berretta AA, Silveira MAD, Capcha, JMC, De Jong D, 2020. Propolis and Its Potential Against SARS-CoV-2 Infection Mechanisms and COVID-19 Disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 110622.
- Bogdanov S, 2017. Propolis. Composition, Health, Medicine. A Review. *Bee Product Science*. Chapter 1.
- Catchpole O, Mitchell K, Bloor S, Davis P, Suddes A, 2018. Anti-gastrointestinal Cancer Activity of Cyclodextrin-Encapsulated Propolis. *Journal of Functional Foods*, 41,1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.023>
- Chahdoura H, Chaouch MA, Chouché W, Chahed A, Achour S, Adouni K, Mosbaha H, Majdoub H, Flaminid G, Achour L, 2018. Incorporation of Opuntia Macrorhiza Engelm in Cake-Making: Physical And Sensory Characteristics. *LWT - Food Science And Technology*, 90: 15-21.
- Chen YW, Ye SR, Ting C, Yu YH, 2018. Antibacterial Activity of Propolis from Taiwanese Green Propolis. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(2), 761-768.
- Cunha I, Sawaya AC, Caetano FM, Shimizu MT, Marcucci M.C., Drezza FT, Carvalho PDO, 2004. Factors That Influence The Yield And Composition Of Brazilian Propolis Extracts. *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, 15(6), 964-970.
- Demir MK, Kılınç M, 2019. Bal tozu İkamesinin Kek Kalitesi Üzerine Etkisi. *Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 1(1), 53-58.
- Doğan N, Hayoğlu İ, 2012. Propolis ve Kullanım Alanları. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 16(3), 39-48.
- Dorman HJD, Peltoketo A, Hiltunen R, Tikkanen MJ, 2003. Characterisation of the Antioxidant Properties of De-Odourised Aqueous Extracts From Selected Lamiaceae Herbs. *Food Chemistry* 83: 255-62.
- El-Seedi HR, Khalifa SAM, El-Wahed AA, Gao R, Guo Z, Abbas G, 2020. Honeybee Products: An Updated Review of Neurological Actions. *Trends in Food Science and Technology*, 101,17-27. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.026>
- Engür T., 2007. Kayseri Propolisinin Kimyasal Yapısı ve Standardizasyonu. *Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 47s, Kayseri.
- Escriche I, Juan-Borrás M, 2018. Standardizing the Analysis of Phenolic Profile in Propolis. *Food Research International*, 106, 834-841.
- Gao J, Brennan MA, Mason SL, Brennan CS, 2016. Effect of Sugar Replacement with Stevianna and Inulin on the Texture and Predictive Glycaemic Response of Muffins. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 1979-1987.
- Gargouri W, Kammiun R, Elleuche M, Tlili M, Kechaou N, Ghoul-Mazgar S, 2020. Effect of Xylitol Chewing Gum Enriched With Propolis on Dentin Remineralization in Vitro. *Archives of Oral Biology*, 112.

- Gerçekaslan K, Boz H, 2018. Keçiboynuzu Unu İlavesinin Kakaolu Kekin Fiziksel Duyusal Ve Tekstürel Özelliklerine Etkisi. *Journal Institue Sciene Technology*, 8: 95-101.
- Giritlioğlu E, 2017. Kinoa (*Chenopodium quinoa willd.*) ve Şeker otu (*Stevia rebaudiana bertonii*) Kullanılarak Yeni Bisküvi ve Kek Formülleri Geliştirme Üzerine Bir Araştırma, *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 97s, Osmaniye.
- Goswami D, Gupta RK, Mriula D, Sharma M, Syagi SK, 2015. Barnyard Millet Based Muffins: Physical, Textural and Sensory Properties. *Food Science and Tehnology*, 64:374-380.
- Grasso S, Liu S, Methven L, 2020. Quality of Muffins Enriched With Upcycled Defatted Sunflower Seed Flour. *LWT-Food Science and Technology*, 119, 108893.
- Hochheim S, Guedes A, Faccin-Galhardi L, Rechenchoski DZ, Nozowa C, Linhares RE, Cordova CMM, 2019. Determination of Phenolic Profile by HPLC-ESI-MS/MS, Antioxidant Activity, in Vitro Cytotoxicity and Anti-Herpetic Activity of Propolis From The Brazilian Native Bee *Melipona quadrifasciata*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy, Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29,339-350. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.12.010>
- Işık F, Urgancı Ü, Turan F, 2017. Yaban Mersini İlaveli Muffin Keklerin Bazı Kimyasal, Fiziksel ve Duyusal Özellikleri. *Akademik Gıda*.15(2), 130-138. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.333664>
- İpek T, 2017. Farklı Form ve oranlarda Yerfıstığı Ürünleri Kullanılarak Ev ve Sanayi Tipi Kek Üretiminin Optimizasyonu, *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 73s, Osmaniye.
- İpek T, Dizlek H, 2018. Farklı Form ve Oranlarda Yerfıstığı Ürünleri Kullanılmasının Top Kek Kalitesine Etkisi. *Gıda Dergisi*, 43(4): 591-604.
- Kumar V, Dhanjal JK, Kaul SC, Wadhwa R, Sundar D, 2020. Withanone and Caffeic Acid phenethyl Ester Are Predicted To İnteract With Main Protease (Mpro) of SARS-CoV-2 and Inhibit Its Activity. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, (just-accepted), 1-17. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1772108>
- Marchetti L, Califano AN, Andrés SC, 2018. Partial replacement of Wheat Flour by Pecan Nut Expeller Meal on Bakery Products. Effect on Muffins Quality. *LWT*, 95, 85-91.
- Mehmetoğlu S, Tarakçı Z, Demirkol M, Çakıcı N, Güney F, 2017. Gıda Katkı Maddesi Olarak Propolis. *Arıcılık Araştırma Dergisi*, 9(1), 32-39.
- Moreno MA, Vallejo AM, Ballester AR, Zampini C, Isla MI, López-Rubio A, Fabra MJ, 2020. Antifungal Edible Coatings Containing Argentinian Propolis Extract and Their Application in Raspberries. *Food Hydrocolloids*, 105973. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105973>
- Najafi Z, Movahhed S, Ahmedi Chenarbon H, 2017. Effect of Citrus Fiber Replacement To Oil and Egg on Some Physicochemical and Organoleptic Properties of Muffin. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 13(4). 458-468.
- Naz S, Imran M, Rauf A, Orhan IE, Shariati MA, Ul-Haq I, Heydari M, 2019. Chrysin: Pharmacological and Therapeutic Properties. *Life Sciences*, 235, 116797.
- Olegario LS, Andrade JKS, Andrade GRS, Denadal M, Cavalcanti RL, Silva MAA, Narain N, 2019. Chemical Characterization of Four Brazilian Brown Propolis: An Insight in Tracking of Its Geographical Location of Production and Quality Control. *Food Research International*, 123, 481-502. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.004>
- Patel S, 2016. Emerging Adjuvant Therapy For Cancer: Propolis and Its Constituents. *Journal of Dietary Supplements*, 13(3), 245-268.
- Rupasinghe HPV, Wang L, Huber GM, Pitts NL, 2008. Effect of Baking on Dietary Fibre And Phenolics of Muffins Incorporated With Apple Skin Power. *Food Chemistry*. 107,1217-1224.
- Sahlan M, Irdiani R, Flamandita D, Aditama R, Alfarraj S, Ansari MJ, Lischer K, 2020. Molecular Interaction Analysis of Sulawesi Propolis Compounds with SARS-CoV-2 Main Protease as Preliminary Study for COVID-19 Drug Discovery. *Journal of King Saud University-Science*, 101234.

- Shevkani K, Kaur A, Kumar S, Singh N, 2015. Cowpea Protein Isolates: Functional Properties and Application in Gluten-Free Rice Muffins. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), 927-933.
- Silici, S., 2008. Farklı Botanik Orijine Sahip Propolis Örneklerinde Biyolojik Olarak Aktif Bileşenlerin Belirlenmesi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 24 (1-2), 102-128.
- Silva Frozza CO, Santos DA, Rufatto LC, Minetto L, Scariot FJ, Echeverrigaray S, Pich CT, Henriques JAP, 2017. Antitumor Activity of Brazilian Red Propolis Fractions Hep-2 Cancer Cell Line. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 91, 951-963.
- Singleton VL, Rossi JA, 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal Of Enology And Viticulture*, 16(3): 144-158.
- Şeker İT, Gökbulut İ, Öztürk S, Özbaş ÖÖ, 2006. Kayısı Lifinin Kek Üretiminde Kullanımı. In *Proceedings of the Turkey 9th Food Congress*.
- Tatar F, 2017. Ultrasonik Nozulun Maviyemiş(*vaccinium corymbosum* l.) Tozu ve Mikrokapsülü Üretiminde Kullanımı, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 105s, Samsun.
- Topkaya C, Işık F, 2018. Effects of Pomegranate Peel Supplementation on Chemical, Physical, and Nutritional Properties of Muffin Cakes. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(6), e13868.
- Ulutürk Ş, 2018. İncir Çekirdeği Unu Kullanılarak Glutenli ve Gluteniz Bisküvi Üretimi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 113s, Isparta.
- Vukovic NL, Obradovic AD, Vukic MD, Jovanovic D, 2018. Cytotoxic Proapoptotic and Antioxidative Potential of Flavonoids Isolated From Propolis Against Colon (HTC-116) and breast (MDA-MB-231) cancer cell lines. *Food Research International*. 106, 71-80. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.056>
- Walgrave SE, Warshaw EM, Glesne LA, 2005. Allergic Contact Dermatitis From Propolis. *Dermatitis*, 16 (4), 209-215.
- Yang W, Wu Z, Huang ZY, Miao X, 2017. Preservation of Orange Juice Using Propolis. *Journal of Food Science and Technology*, 54(11), 3375-3383.
- Zahn S, Pepke F, Rohm H, 2010. Effect of Inulin as a Fat Replacer on Texture and Sensory Properties of Muffins. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(12), 2531-2537.



**Atf İçin:** Arslan KY, Çelik İD, Öztürk Y, Efe ME, 2021. Betonarme Soğutma Kulesi Tipi Yapıların Rüzgâr ve Sıcaklık Yükleri Etkisi Altındaki Davranışı. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1218-1229.

**To Cite:** Arslan KY, Çelik İD, Öztürk Y, Efe ME, 2021. Behavior of Reinforced Concrete Cooling Tower Type Structures Under Wind and Thermal Loads. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1218-1229.

## **Betonarme Soğutma Kulesi Tipi Yapıların Rüzgâr ve Sıcaklık Yükleri Etkisi Altındaki Davranışı**

Kılıç Yasin ARSLAN<sup>1\*</sup>, İlyas Devran ÇELİK<sup>1</sup>, Yusuf ÖZTÜRK<sup>1,2</sup>, Mehmet Erkan EFE<sup>1</sup>

**ÖZET:** Soğutma kuleleri, başta doğalgaz işletme tesisleri, nükleer enerji ve elektrik santralleri, petrol rafinerileri olmak üzere endüstriyel tesislere soğutma suyu sağlamak amacıyla tasarlanan yapılardır. Ülkemizin ekonomik ve siyasi durumu dikkate alındığında endüstriyel tesislere duyulan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Çok yüksek ve büyük çapa sahip yapılar oldukları için rüzgâr kuvvetine maruz kalan büyük bir yüzey alanına sahiptir. Farklı iklim koşulları ve soğutma kulesinin içinde dolaşan sıcak su dikkate alındığında termal etki de soğutma kulelerinde etkin bir rol oynar. Bu bağlamda yapılan bu çalışmada soğutma kulesi model parametresi olarak 120, 160, 200 m yüksekliğe sahip beton kabuğa 18 m olarak seçilen çelik kolonlar 37.5 m s-1 rüzgâr hızıyla birlikte tüm kabuğa +20 °C, +40 °C, -40 °C ve hava akışına bağlı olarak 30-60 °C arasında değişen sıcaklıklar kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuç olarak rüzgâr yükü ile kombine edilen sıcaklık yüklerinin kule kabuğunda kayda değer bir etkiye sahip olduğu görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Soğutma kulesi, rüzgâr yükü, sıcaklık yükü, eksenel simetrik yapılar.

### **Behavior of Reinforced Concrete Cooling Tower Type Structures Under Wind and Thermal Loads**

**ABSTRACT:** Cooling towers are structures mainly used in industrial zones such as natural gas facilities, nuclear energy plants, power plants and petrol refineries for supplying cooling water and designed accordingly. The need for industrial facilities in our country has been increasing every passing day. Cooling towers are quite tall and have a big diameter which is why they are exposed to wind loads due to their wide surface area. Considering different seasonal conditions and the hot water circulation, it can be said that thermal effects also have an impact for the cooling towers. In this study that is within this context, as model parameters; 120 m, 160 m, 200 m of heights for concrete shell, 18 m steel columns, 37.5 m s-1 wind speed and temperatures of +20 °C, +40 °C, -40 °C, 30-60 °C are chosen for analyses. Analysis results are evaluated for the chosen parameters. As a result, it was observed that the temperature loads combined with the wind load had a significant effect on the tower shell.

**Keywords:** Cooling tower, wind loading, thermal loading, axisymmetric structures.

<sup>1</sup> Kılıç Yasin ARSLAN ([Orcid ID: 0000-0002-4433-9204](https://orcid.org/0000-0002-4433-9204)), İlyas Devran ÇELİK ([Orcid ID: 0000-0001-9011-4041](https://orcid.org/0000-0001-9011-4041)), Yusuf ÖZTÜRK ([Orcid ID: 0000-0002-8450-1253](https://orcid.org/0000-0002-8450-1253)), Mehmet Erkan EFE ([Orcid ID: 0000-0001-8198-9997](https://orcid.org/0000-0001-8198-9997)), Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, İnşaat Mühendisliği Bölümü, Isparta, Türkiye

<sup>2</sup> Yusuf ÖZTÜRK ([Orcid ID: 0000-0002-8450-1253](https://orcid.org/0000-0002-8450-1253)), Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Senirkent Meslek Yüksekokulu, İnşaat Teknolojisi Bölümü, Isparta, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Kılıç Yasin ARSLAN, e-mail: kyarslan92@gmail.com

## GİRİŞ

Endüstriyel tesislerin soğutma ihtiyacının karşılanması için yüksek miktarlarda suyun sisteme verilip, sistemde ısınan suyun tekrar soğutulması gerekmektedir. Soğutma kuleleri, tesislerdeki soğutma işlemini gerçekleştirmek için sistemde dolaştırılan suyun doğal hava akışıyla soğutulmasını sağlamaktadır. Bu sayede sistemde ısınan su göl ve nehirlerle tekrar verilip ekolojiye zarar vermemekle birlikte daha az miktarda su kullanılarak soğutma işlemi gerçekleştirilmektedir.

Soğutma kuleleri tasarımsal olarak ayak ve kabuk olarak iki bölümden oluşmaktadır. Kabuk olarak tasarlanan bölüm betonarme veya çelik konstrüksiyon olarak inşa edilebilmektedir (Zhang ve ark., 2017; Ma ve ark., 2019). Soğutma işleminin gerçekleşmesi için hava akımının sağlandığı ayak bölümü ise betonarme olarak tasarlanabileceği gibi çelik konstrüksiyon olarak da tasarlanabilmektedir (Wang ve ark., 2019). Ayak bölümünün yüksekliği, soğutma kulesinin bulunduğu bölgedeki hava akışı dikkate alınarak 6-30 m aralığında değişebilmektedir (Abedi-Nik ve Sabouri-Ghomi, 2008; Sabouri-Ghomi ve ark., 2006). Soğutma kulesinin kabuk bölümü ise sıcak su ve görelî soğuk havanın yardımıyla ısı transferi sağlamaktadır. Kabuk bölümü hem hava geçişinin hızlandırılması hem de yapısal sistemin yüksekliği boyunca rijitlik kazanıp ağırlık merkezinin zemine daha yakın olması için hiperbolik bir tasarımdadır (Ge ve ark., 2019; Ye, 2015). Soğutma kulelerinin hizmet verdiği amaç doğrultusunda maruz kaldığı sıcaklık iç kabukta 30-70 °C aralığında değişmektedir. Dış kabukta ise iklim koşullarına bağlı olarak göreceli olarak 80 °C farklar oluşabilmektedir (Jahangiri ve ark., 2019; Li ve ark., 2015).

Rüzgâr, deprem yükleri ve sıcaklık etkisi Soğutma kulelerinin tasarımına etki eden belirleyici yüklerdir (Lin ve ark., 2013). Literatürde yapılan çalışmalarda sarsma tablası deneyleri ve bilgisayar destekli analizler sonucunda sismik yüklerin, soğutma kulesinin geometrik özelliklerinden dolayı simetrik, hafif ve rijit bir dizayna sahip olmasından dolayı genellikle yapı kapasitesi bakımından belirleyici olmadığı sonucuna varılmıştır (Yu ve ark., 2016). Günümüzde gelişen teknolojilerin getirdiği artan ihtiyaçlar dolayısıyla daha yüksek soğutma kulesi ihtiyaçları doğmuştur (Lin ve ark., 2014). Soğutma kulesi yüksekliklerinin artışından kaynaklı olarak rüzgârla etkileşimde olan yüzey alanı çok fazla olduğu için rüzgâr yükü bu tip yapılarda genellikle etkin yük durumunu oluşturmaktadır (Noh, 2006; Liu ve ark., 2018). Rüzgâr kuvvetinin yapıya nasıl etki ettiğini bulmak için rüzgâr tüneli testleri tekil ve yan yana grup şeklinde hizmet veren soğutma kuleleri için uygulanmış bu test sonuçları sayısal modellerle doğrulanarak dizayn prosedürleri oluşturulmuştur (Zhang ve ark., 2017).

Literatürde soğutma kulesi tipindeki yapılarda Eurocode 1991-1-4, etkin olarak karşılık bulmaktadır (Eurocode 1991-1-4, 2005). Ülkemizde aynı yönetmeliğin uyarlaması olarak TS EN 1991-1-4 olarak yürürlüğe girmiştir ve hesaplamalar bu kapsamda yapılmaktadır (TS EN 1991-1-4, 2007). Soğutma kulelerinin boyutsal etkileri dikkate alındığında, etkin rüzgâr yükü TS EN IEC 61400-1 (2019)'de ortalama olarak 37.5-50 m s<sup>-1</sup> hızlar tasarımsal yaklaşımlar için dikkate alınmıştır.

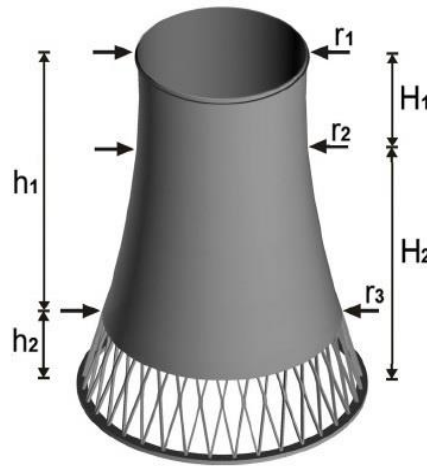
Yapılan bu çalışmada; 120, 160 ve 200 m kabuk yüksekliğine ve 18 m ayak yüksekliğine sahip 3 adet sayısal model oluşturulmuştur. Sayısal modellerin tamamında kullanılan rüzgâr hızı 37.5 m s<sup>-1</sup> seçilmiştir.

İşletme durumu göz önüne alındığında kabuğun içindeki hava akışına bağlı olarak 30-60 °C arasında değişen sıcaklık oluşmaktadır (Jahangiri ve ark., 2019). İşletme durumunda olmayan soğutma kulesi için sırasıyla +20, +40, -40 °C değerleri seçilmiştir. Bu sıcaklık değerleri 37.5 m s<sup>-1</sup> rüzgâr ile kombine edilmiştir. Çalışmada, Sap2000 sonlu elemanlar programı kullanılmış olup elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

## MATERYAL VE YÖNTEM

İşletme koşullarındaki soğutma kulesi tipi yapıların farklı kabuk ısıları altında rüzgâr yükü ile olan etkileşimin incelendiği bu çalışmada; kabuk yüksekliği, rüzgâr hızı ve kabuk sıcaklıkları üç ayrı parametre olarak kullanılmıştır.

Soğutma kulelerinin boyutsal parametrelerindeki değişkenlerin rüzgâr yükü ve sıcaklık ile olan ilişkisini ortaya koyabilmek için hiperbolik eğri ve kalınlıklar tüm modellerde sabit tutulmuştur. Beton kabuk yüksekliği ve buna bağlı olarak taban çapı üst çap ve boğaz çapları değişkendir. Şekil 1'de modellere ait boyutsal parametreler gösterilmiştir.



Şekil 1. Soğutma kulesi boyutsal değişkenleri (Sabouri-Ghomi ve ark., 2006).

Şekil 1'de ifade edildiği üzere  $h_1$ : beton kabuk yüksekliğini,  $h_2$ : ayak yüksekliğini temsil etmektedir. Analizlerde beton kabuk yüksekliği 120 m, 160 m ve 200 m olarak üç yükseklik için ele alınmıştır. Ayak yüksekliği olarak ise 18 m yükseklik durumlarına sahip kolonlar ile kombinasyonu yapılmıştır. Çizelge 1'de analizlerde dikkate alınan modellerin boyutsal değişkenleri detaylı olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 1. Modellere ait boyutsal parametreler

| Model       | SM1*  | SM2*   | SM3*   |
|-------------|-------|--------|--------|
| $h_1$       | 120   | 160    | 200    |
| $h_2$       | 18    | 18     | 18     |
| $H_1$       | 27,69 | 34,06  | 49,15  |
| $H_2$       | 92,31 | 125,94 | 153,85 |
| $r_1$ (çap) | 58,43 | 79,72  | 97,38  |
| $r_2$ (çap) | 57,36 | 78,26  | 95,6   |
| $r_3$ (çap) | 98,72 | 134,69 | 164,53 |

\* SM: Sayısal Model

Çalışmada kullanılan sayısal modellerde kabuk kalınlıkları için tanımlanan boyutsal parametreler tüm modellerde sabit tutulmuştur. Bu kapsamda  $r_3$  çap tanımlı bölüm yani ayak üst kotunda 1.4 m alınmıştır.  $r_2$  noktasına kadar azalarak  $r_2$  noktasında 0.27 m,  $r_1$  noktasına kadar artarak kabuk tepe noktasında yani  $r_1$  noktasında 0.4 m alınmıştır. Ayak bölümü kolon elemanları çelik konstrüksiyon olarak modellenmiş olup tüm modellerde çapı 1300 mm olan dairesel kesitli profilde 50 mm cidar

kalınlığı kullanılmıştır. Çizelge 2 ve Çizelge 3' te analizlerde kullanılan yapı elemanlarının malzeme özellikleri tanımlanmıştır.

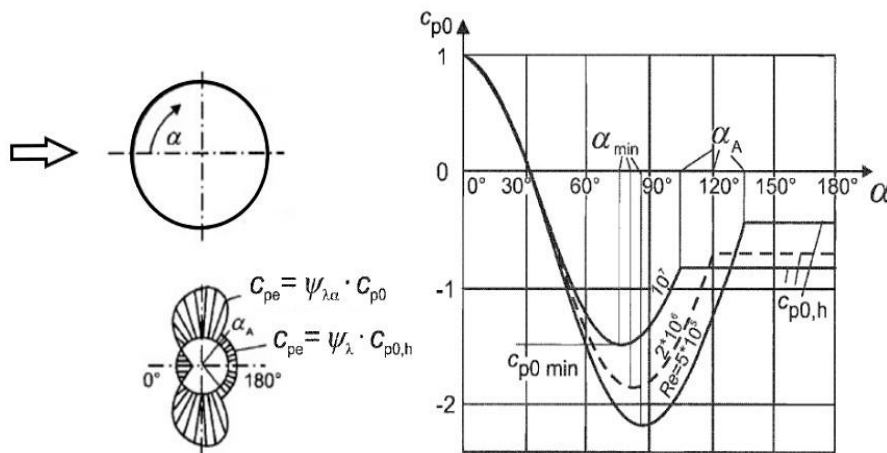
**Çizelge 2.** Kabuk betonu malzeme özellikleri

| Beton Sınıfı | Silindirik Numune Basınç Dayanımı, $f_{ck}$ (Mpa) | Eşdeğer Küp Basınç Dayanımı, $f_{ck}$ (Mpa) | Eksenel Çekme Dayanımı, $f_{ctk}$ (Mpa) | 28 Günlük Elastisite Modülü $E_c$ |
|--------------|---|---|---|-----------------------------------|
| C40          | 40  | 50  | 2,2                                     | 34000                             |

**Çizelge 3.** Çelik konstrüksiyonun malzeme özellikleri

| Çelik Sınıfı | Min. Akma Muk. $f_y$ (Mpa) | Min. Çekme Mukavemeti $f_u$ (Mpa) | Min. Çekme dayanımı/Akma dayanımı Oranı | DeneySEL Akma dayanımı/Karakteristik Akma Dayanımı oranı |
|--------------|----------------------------|-----------------------------------|---|--|
| S355         | 355                        | 490                               | 1,15                                    | 1,3  |

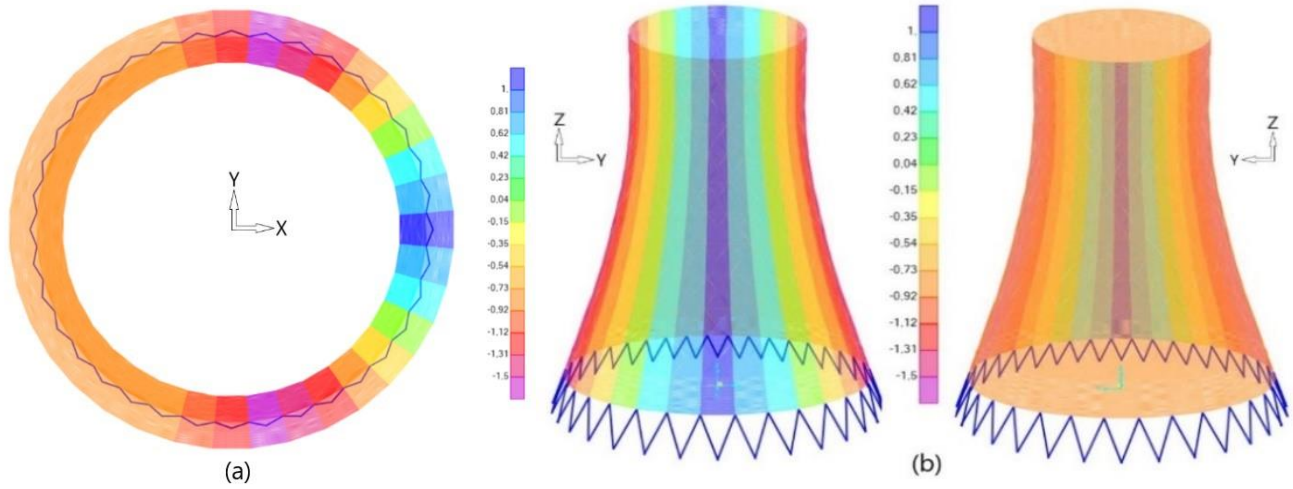
Değişen boyutsal parametrelere göre rüzgâr yükünün yapısal davranışa etkisinin incelendiği bu çalışmada, rüzgâr yükü TS EN 1991-1-4 yönetmeliği kapsamında tanımlanmıştır. İlgili yönetmelikte Arazi Kategorisi II olarak seçilmiştir. Bu kategori az seviyede bitki örtüsü bulduran veya rüzgâra engel olacak yapı yüksekliğinin en az 20 kat uzaklığa sahip olduğu durumlar için kullanılacak kategoridir. Bu durum için engebelilik uzunluğu ( $z_0$ ) değeri 0.05 ve en düşük yükseklik ( $z_{min}$ ) değeri 2 olarak seçilmiştir. Orografi faktörü  $C_0(z)$ , rüzgâr etkin yönündeki arazinin eğim ortalamasının 3 dereceden az olduğu durumlarda dikkate alınmadığı için bu değer 1 olarak seçilmiştir. Türbülans faktörü ( $K_1$ ) değeri 1 alınmıştır. Dairesel kesitli yapılarda, rüzgâr kuvveti basınç dağılımı dairesel geometri açısal değişime göre değişen katsayılar için tanımlanmıştır. Şekil 2'de tanımlanan grafikte en etkin basınç kuvveti katsayıları ( $c_{p0}$ ) açısal olarak elde edilmiştir. Rüzgârın etkidiği yönde rüzgârı dik olarak karşılayan kısma  $0^\circ$  ve tam karşısına ise  $180^\circ$  açı değerleridir. Burada ara değerler enterpolasyon yöntemi yardımıyla hesaplanmaktadır. Soldaki görselde ise basınç katsayılarının dağılımları verilmiştir. Rüzgâr hızı ise TS EN IEC 61400-1 (2019)'de rüzgâr türbin sınıflarına göre referans rüzgâr hızları Türbin Rüzgâr Sınıfı III. için  $37.5 \text{ m s}^{-1}$  olarak verilen değer seçilmiştir.



**Şekil 2.** Rüzgâr basınç katsayıları (TS EN 1991-1-4, 2007)

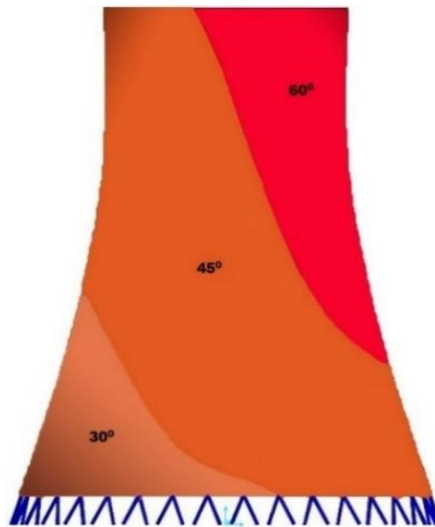
TS EN 1991-1-4'de tanımlanan katsayı değişkeni kullanılarak hesaplanan rüzgâr yükü, sayısal modellere basınç kuvveti olarak etkiltilmiştir. Şekil 3'te modellere etkileyen gerilme dağılımları  $\text{kN m}^{-1}$  olarak verilmiştir. Dağılımların verildiği görsellerde kullanılan renk skalasında pozitif değerler basınç,

negatif değerlerde çekme (emme) etkilerini temsil etmektedir Şekil 3a'da sisteme etkiyen basınç dağılımının plan görünümü verilmiştir. Şekil 3b'de kesit görünümü verilen dağılımlarda sol taraftaki görselde rüzgârın etkiye doğrultusu boyunca basınç bölgesini temsil ederken sağ taraftaki görselde emme yönü dağılımı verilmiştir.



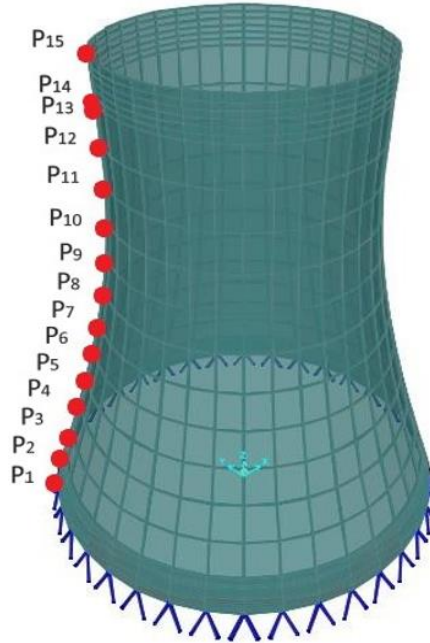
**Şekil 3.** Rüzgâr yükü basınç dağılımı. (a) Rüzgâr yükü basınç dağılımı plan görünümü (b) Rüzgâr yükü basınç dağılımı kesit görünümü

(Jahangiri ve ark., 2019), Soğutma kulelerinin kabuk sıcaklığının, kule içindeki hava sirkülasyonundan dolayı 30-60 °C aralığında değerler aldığı ifade etmiştir. Çalışmada çapraz sıcaklık olarak ifade edilen bu 30-60 °C aralığında sıcaklık değerleri alan kulenin sıcaklık dağılımı Şekil 4'te verilmiştir. Kulenin bulunduğu konum dikkate alındığında kabuk iç yüzeyi ile dış yüzeyi arasındaki sıcaklık farkı göreceli olarak 0-80 °C aralığında olabilmektedir. Sıcaklık etkisinin yapı malzemesi, genişleme faktörü ile ilişkisi göz önünde bulundurulduğunda, bu durumda analizlere bir değişken olarak dahil edilmiştir. Bu kapsamda sıcaklık etkisi tüm kabuk sisteminde +20 °C, +40 °C, -40 °C ve Şekil 4'te tanımlandığı üzere rüzgâr yönü etkisi altında kabuk yüzeyindeki sıcaklık farkları dikkate alınarak analizler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.



**Şekil 4.** Rüzgâr etkisinde kabuktaki sıcaklık dağılımları

Tüm modellerde yer değiştirme ölçüm noktaları  $P_{14}$  hariç eşit aralıklarla seçilmiştir.  $P_1$ - $P_2$  ve  $P_{13}$ - $P_{15}$  aralığında kalınlık değişimleri gerçekleştiğinden dolayı daha doğru çözüm yapabilmek adına daha fazla parçaya bölünmüştür. Şekil 5'te yer değiştirmelerin okunduğu referans noktalar gösterilmektedir.

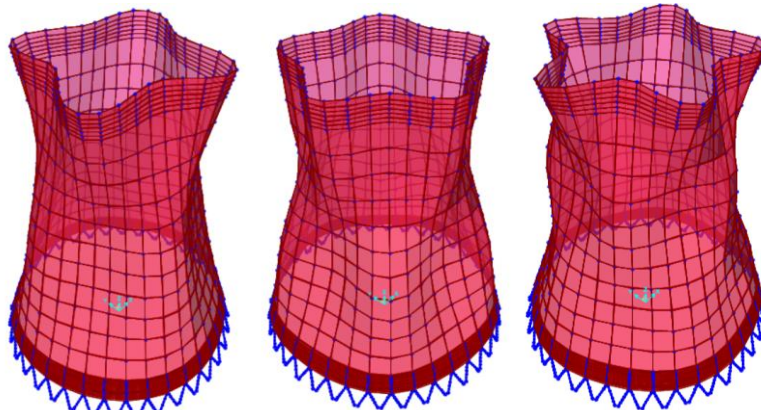


Şekil 5. Yer değiştirmelerin ölçüldüğü noktalar

## BULGULAR VE TARTIŞMA

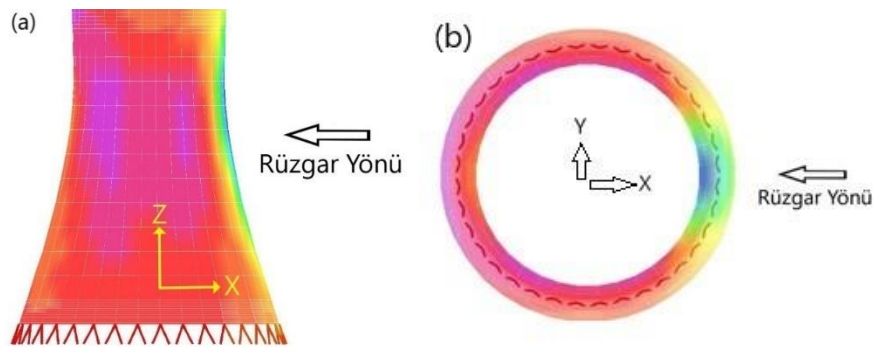
Soğutma kulesi tipi yapıların işletme koşullarındaki oluşabilecek farklı kabuk ısıları dikkate alınarak rüzgâr yükü ile olan etkileşimin incelendiği bu çalışmada; kabuk yüksekliği, rüzgâr hızı ve kabuk sıcaklıkları üç ayrı parametre olarak kullanılmıştır.

Kabuk üzerinde dairesel kesitte rüzgâr yönüne göre itme ve emme kuvvetlerinin en etkin olduğu konum  $80^\circ$  açıdaki konumdur (TS EN 1991-1-4, 2007). Şekil 2'de basınç dağılımı bir katsayı üzerinden detaylandırılmıştır. Buna göre  $0^\circ$  ve  $180^\circ$  açı rüzgârın yapıyla ilk buluştuğu ve terk ettiği bölüm olmakta ve yük değeri direk olarak etkililmekte, bir katsayı artırımı uygulanmamaktadır. Açı değeri  $80^\circ$ 'de katsayı Şekil 2'de tanımlandığı üzere maksimum değer olan 2.1 olarak alınmıştır. Bu konumların okuma noktaları olarak seçilmesinde en belirleyici durum silindir tipi yapıların "M" tipi deformasyonuna yol açmaktadır (Ke ve ark., 2018). Şekil 6'da silindir bir geometride meydana gelen "M" tipi deformasyon hali gösterilmiştir.



Şekil 6. Rüzgâr etkisinde kabuktaki sıcaklık dağılımları

Tanımlanan deformasyon durumları incelendiğinde, silindir geometrideki kabuk sisteminin birbiri ile ters yönde içe-dışa doğru yer değiştirme sergilediği görülmektedir. Kule yüksekliği boyunca değişen yer değiştirme değerlerinin verildiği grafiklerde; soğutma kulesi sayısal modellerinin koordinat takımına yerleşim şekline bağlı olarak X ve Y değerleri pozitif ve negatif yönde dağılım göstermektedir. Buna göre rüzgâr etkime yönü dikkate alındığında X yönü verilerinin pozitif olduğu durumlar rüzgâr etki yönüne ters yönde hareketi, negative veriler rüzgâr yönündeki hareketi temsil etmektedir. Y yönü yer değiştirme değerleri negatif olduğu durumlar kule kabuğunun içe doğru, pozitif veriler dışa doğru yer değiştirme olduğunu ifade etmektedir. Şekil 7’de soğutma kulesinin koordinat takımına yerleşim şekli gösterilmiştir.



Şekil 7. Soğutma kulesinin eksen takımına yerleşim şekli görünümü (a) X-Z eksenli plan görünümü (b) X-Y eksenli plan görünümü

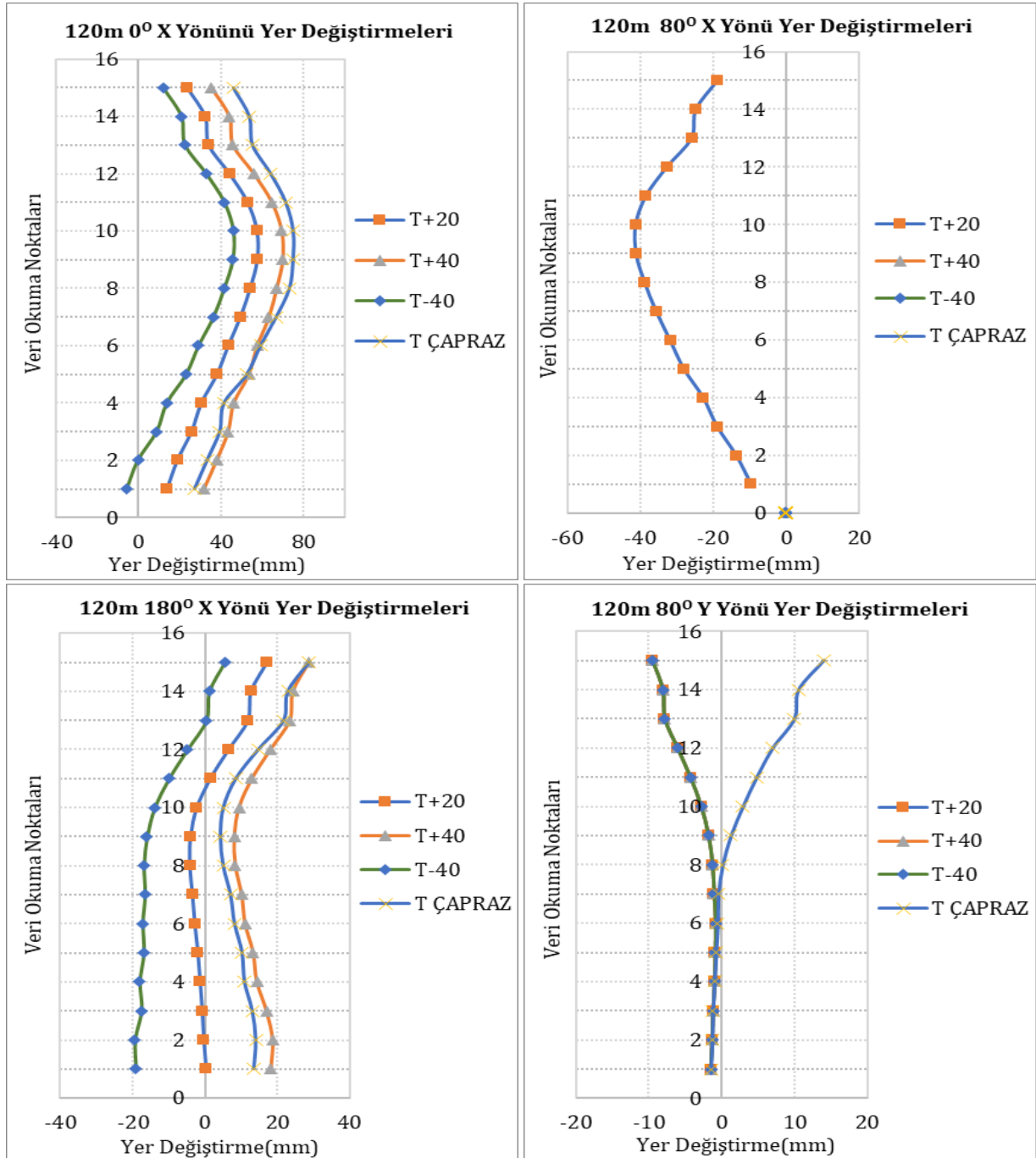
Çalışma kapsamında kulenin bulunduğu durumlara ait ortam sıcaklıklarının da yapısal davranış üzerindeki etkisini göz önünde bulundurabilmek için 120 m’lik kabuk yüksekliğine ve 18 m’lik ayaklara sahip kulelere +20 °C, +40 °C, -40 °C ve Şekil 4’te görselde dağılımı verilen çapraz sıcaklık  $37.5 \text{ m s}^{-1}$  rüzgâr yükü etkisi ile kombinasyonundan X ve Y eksenleri için elde edilmiş yer değiştirme değerleri Şekil 8’de verilmiştir.

X yönü yer değiştirmeleri incelendiğinde yer değiştirme olarak en büyük değerlerin 0° açıdaki okuma noktasında çapraz duruma ait olduğu, en az yer değiştirme değerlerinin yani yer değiştirmeye en az rijit kalan durumunda -40 °C durumuna ait olduğu görülmüştür. 80° ve 180°’lik açılarda tam tersi istikamette yer değiştirmeler meydana gelmiştir. Buralardaki rüzgâr etkisi altında meydana gelen yer değiştirme miktarları -40 °C sıcaklık durumu için belirgin hal almıştır. Y yönü yer değiştirmelerini incelediğimizde çapraz sıcaklık durumuna ait olan yer değiştirmelerin bütüncül olduğu -40, +40, ve +20 °C’den belirgin bir şekilde ayrıştığı görülmektedir. (Jahangiri ve ark., 2019), Rüzgârın sıcaklık dağılımına etkisini inceledikleri çalışması incelendiğinde sıcaklık dağılımı benzer sonuçlar vermiştir. (Cheng ve ark., 2013), Çalışmalarında yaptıkları rüzgâr tüneli testinden elde ettikleri yer değiştirme ve deformasyon değerleri çalışmadaki +20°C ile rüzgâr kombinasyonu ile örtüşen sonuçlar vermiştir.

Kabuk yüksekliği 160 m, ayak boyu 18 m olan modelde +20 °C, +40 °C, -40 °C ve Şekil 4’te gösterildiği gibi uygulanan çapraz sıcaklık için elde edilmiş yer değiştirme değerleri  $37.5 \text{ m s}^{-1}$  rüzgâr yükü etkisi altında X ve Y eksenleri için Şekil 9’da verilmiştir.

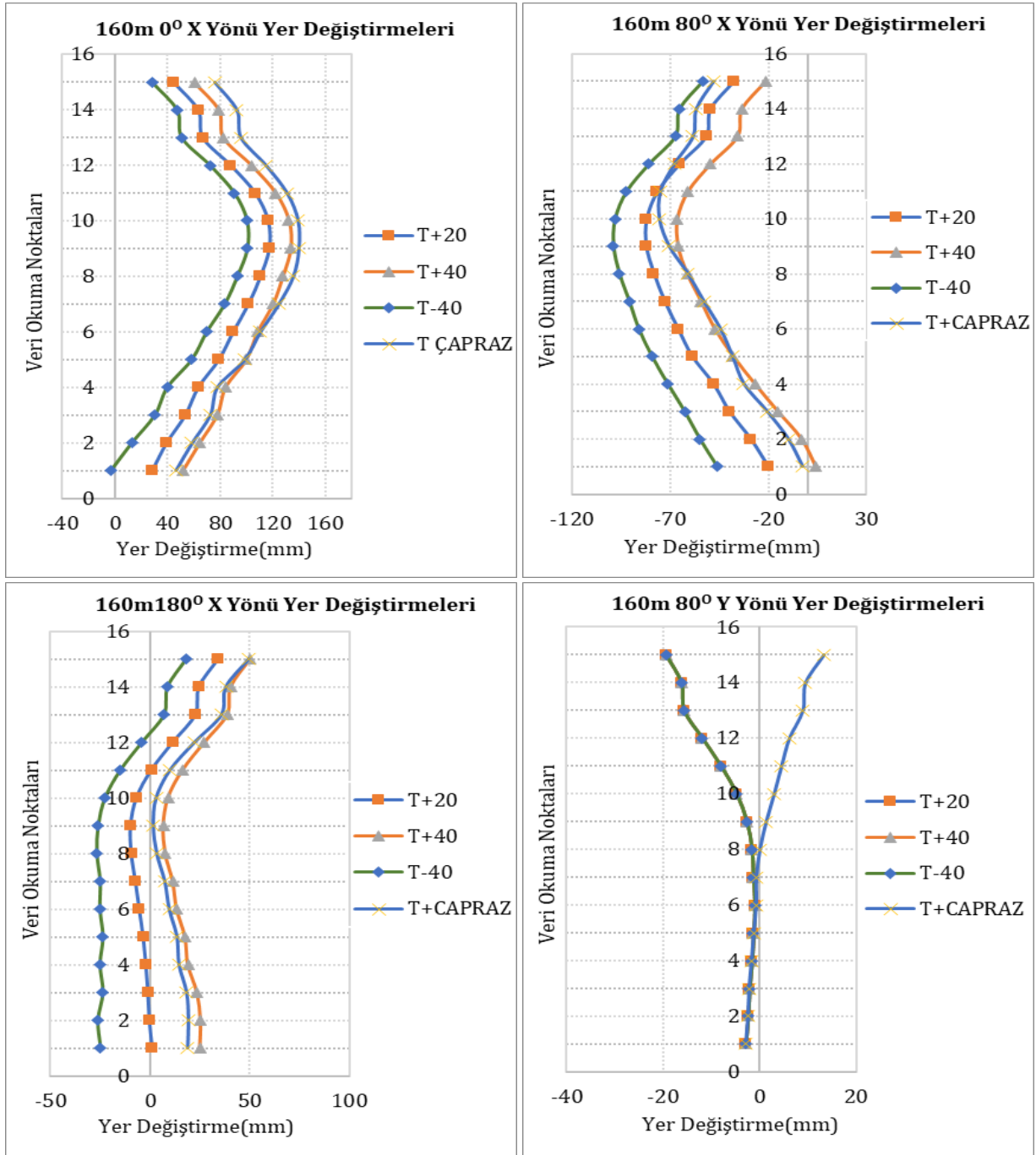
160 m’lik kule için elde edilen grafikler incelendiğinde, 120 m’lik kule ile benzer doğrultuda sonuçlar görülmektedir. Burada da -40 °C’lik deformasyon durumları özellikle 80° açıdaki okuma alanı X yönündeki yer değiştirmelerde tasarımcı açısından dikkat edilmesi gereken sonuçları vardır. Ayrıca Y yönünde 80°’lik açıdaki yer değiştirme incelendiğinde ise çapraz sıcaklık etkisi altında daha belirgin bir ayrışma görülmektedir.

200 m'lik kabuk yüksekliğine sahip olan kulenin +20 °C, +40 °C, -40 °C ve Şekil 4'te gösterildiği gibi uygulanan çapraz sıcaklıkla birlikte  $37.5 \text{ m s}^{-1}$  rüzgâr yükü etkisi altında elde edilmiş yer değiştirme değerleri X ve Y eksenleri için Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 8. 120 m kabuk yüksekliğinde  $37.5 \text{ m s}^{-1}$  rüzgâr ile 20 °C, 40 °C, -40 °C ve çapraz sıcaklık etkisi altındaki soğutma kulelerinin X ve Y yönü yer değiştirmeleri

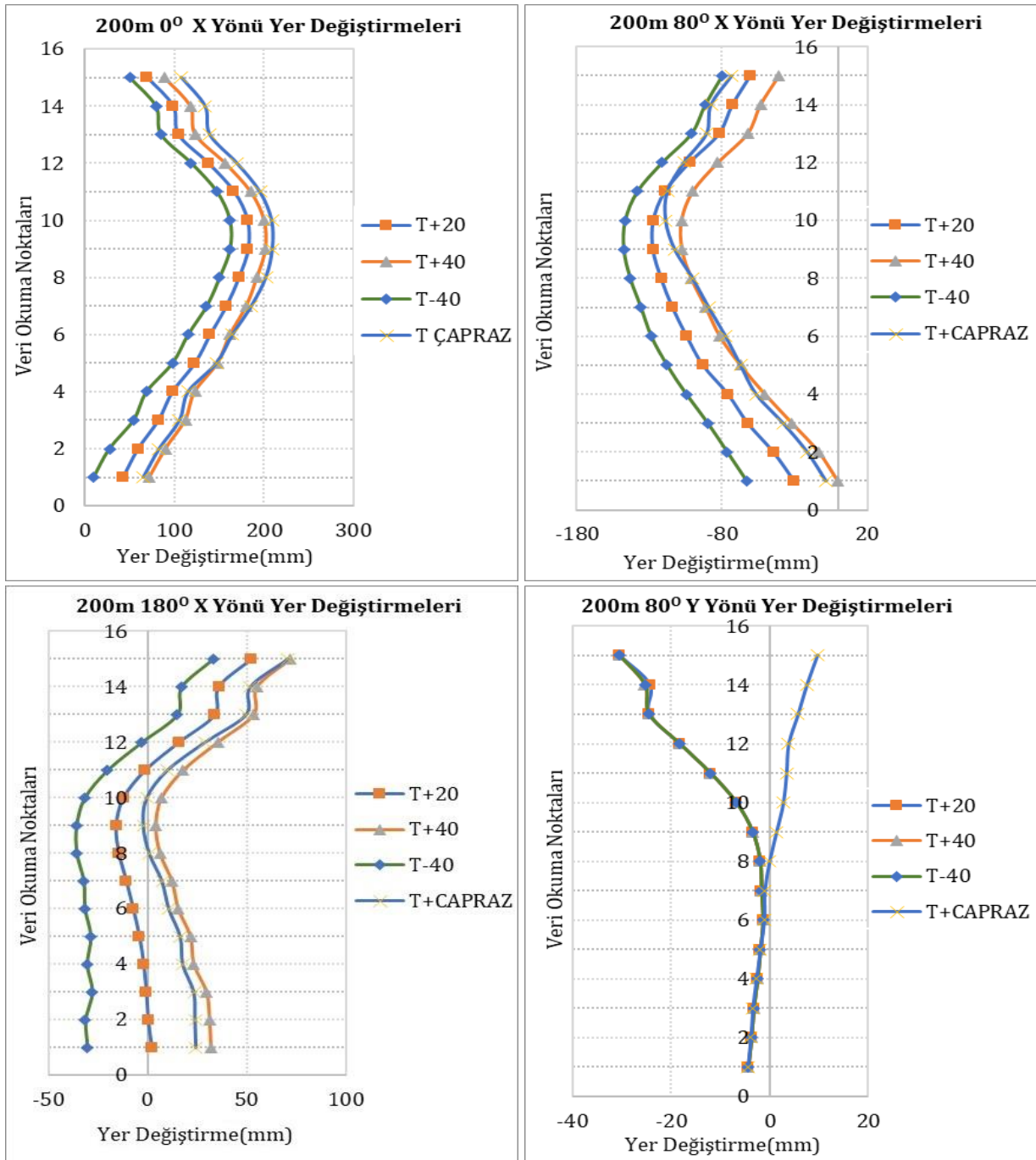




Şekil 9. 160 m kabuk yüksekliğinde  $37.5 \text{ m s}^{-1}$  rüzgârla  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $-40 \text{ }^\circ\text{C}$  ve çapraz sıcaklık etkisi altındaki soğutma kulelerinin X ve Y yönü yer değiştirmeleri

Elde edilen yer değiştirme grafikleri incelendiğinde diğer kule yüksekliğine bağlı olarak deformasyon miktarları artmıştır. Negatif sıcaklıklarda büzüşme durumu meydana gelmiştir. Özellikle  $80^\circ$ 'lik açıdaki okuma alanında yani maksimum rüzgâr yükünün bulunduğu kısımda kule içe doğru yer değiştirmiştir. Kulenin  $-40 \text{ }^\circ\text{C}$  sıcaklık etkisi altında büzüşmeye meyil ettiği durum, rüzgâr etkisi altındaki emme kuvvetiyle birlikte düşünüldüğünde kuvvetler toplamı oluşmakta ve kule kabuğunda içe doğru hareket meydana bu hareket,  $0^\circ$  açıda kule eksen dışına doğru yer değiştirmesini daha da arttırmaktadır. Basınç etkisi altındaki bir kulede içe doğru baskının beton tarafından karşılanması mümkündür ancak kule kabuğunda içe doğru kuvvetin reaksiyonu olan  $0^\circ$  açıdaki dışa doğru yer değiştirme kabukta çekme kuvveti oluşturacaktır. Bu açıdan değerlendirildiğinde tasarımcıların soğuk

iklim koşullarında hizmet verecek bir kulede özellikle rüzgâr yönüne göre  $0^\circ$  açıda konumlanan dış cidarda çekme gerilmelerinde bu etkiyi göz önünde bulundurmaları gerekmektedir.



Şekil 10. 200 m kabuk yüksekliğinde  $37.5 \text{ m s}^{-1}$  rüzgârla  $20^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$ ,  $-40^\circ\text{C}$  ve çapraz sıcaklık etkisi altındaki soğutma kulelerinin X ve Y yönü yer değiştirmeleri

Ayrıca tüm modellerde X yönü yer değiştirmeleri incelendiğinde;  $0^\circ$  açıda 9 nolu okuma noktasına kadar rüzgâr yönüne zıt bir yer değiştirme artan şekilde devam etmekte 10 nolu okuma noktasından itibaren kule tepe noktasına kadar bu yer değiştirme azalmıştır.  $80^\circ$  açıda 9 nolu okuma noktasına kadar kule merkezine doğru bir yer değiştirme artan şekilde devam etmekte olup, 10 nolu okuma noktasından itibaren kule tepe noktasına kadar bu yer değiştirme azalmıştır.  $180^\circ$  açıda ait grafikler incelendiğinde -  $40^\circ\text{C}$  sıcaklığa ait yer değiştirme grafiğinde 10 nolu okuma noktasına kadar negatif tarafta kalma yani rüzgâr yönünde hareket eğilimindeyken kule tepe noktasında rüzgâr yönünde yer değiştirme

gerçekleştirmiştir. Y yönüne ait yer değiştirme grafikleri incelendiğinde çapraz sıcaklık grafiği kule tepe noktasına doğru pozitif değer olarak yani kule merkezinde dışa doğru yer değiştirme yaparak diğer sıcaklık değerlerinden ayrılmıştır. Diğer sıcaklık gruplarının da kule üst noktasındaki yer değiştirme değerleri negatif değerler almıştır. Yani kule merkezine doğru yer değiştirme gerçekleştirmiştir.

## SONUÇ

Enerji sektöründe büyük önemi olan soğutma kulelerinin farklı rüzgâr yükleri altında değişen kabuk sıcaklığı, kabuk yüksekliği ve ayak yüksekliğinin yapısal davranışa olan etkisinin incelendiği bu çalışmada 120 m, 160 m ve 200 m kule yüksekliğine sahip soğutma kuleleri 18 m ayak yüksekliği için modellenmiştir. Modellerde, iklim ve çalışma koşullarını altındaki kabuk sıcaklığının yapısal davranışla olan etkileşimini inceleyebilmek için -40 °C, +40 °C, 20 °C ve 30-45-60 °C’de değişen kabuk sıcaklığı için 4 farklı sıcaklık şartı için analiz edilmiştir. Analizlerde rüzgâr yükü  $37.5 \text{ m s}^{-1}$  alınmıştır. Rüzgâr yükü altında boyutsal ve sıcaklık durumlarına göre çeşitlendirilen sayısal modellerin yükseklik boyunca elde edilen yatay yer değiştirme değerleri karşılaştırılmalı olarak sunulmuştur.

Bu kapsamda elde edilen veriler incelendiğinde kule yapısının sahip olduğu geometrinin rüzgâr aerodinamiği ile birleştiğinde, yapı kabuğu üzerindeki rüzgâr kuvveti basınç dağılımının yapı davranışı üzerinde etkin olduğu görülmüştür. Çalışmada okuma noktası olarak seçilen 0°, 80° ve 180° açıdaki etkileşim alanları yatay yer değiştirmeleri maksimum şekil değiştirmede, kabuk yan yüzeylerindeki maksimum rüzgâr basınç dağılımı belirleyici olmuştur. Grafik yer değiştirme değerleri incelendiğinde rüzgârın yapıyla ilk bulunduğu 0° açı konumunda beklenen aksine rüzgâra ters istikamette deformasyon gerçekleşmiştir. 80° açıda maksimum rüzgâr basıncı olmasından dolayı buradaki emme 0° açıda dışa doğru itme oluşturur bu da rüzgâra zıt yönde bir yer değiştirme meydana getirmiştir. Bu durum bu tipteki yapılarda beklenen “M” tipi davranışı meydana getirmektedir. Bu sebeple tasarımcı tarafından dikkate alınmalıdır.

Yapı kabuk sıcaklığının yapısal davranışa etkisi için yapılan karşılaştırmalar incelendiğinde -40 °C’ye kadar düşen sıcaklığın yapı kabuğunda meydana gelen kısılma etkisinin özellikle 80° açıdaki rüzgâr basıncı ile birleştiğinde 0° açıda dışa doğru deformasyonu daha da ön plana çıkarmıştır. Bu sebeple 80° açıda iç kabuk için ve 0° açıda dış kabuk için çekme gerilmeleri için dikkat edilmesi gereken bir durum oluşturmuştur.

Yapılan bu çalışmada, sıcaklık ve kabuk yüksekliği birer parametre olarak kullanılmıştır. Kabul edilen kombinasyonlar için en belirgin durum düşük sıcaklık koşullarındaki rüzgâr ile olan etkileşimdir. Elde edilen veriler betonarme yapı malzemesinin kullanıldığı bu çalışmada tasarımcıların bu durumda “M” tipi deformasyon için kabuk çekme bölgelerinde dikkat etmeleri gerektiğidir. Yapılan bu çalışmada zemin rijit kabul edilmiştir. Rüzgâr gibi tekrar periyodu yüksek olan bir dinamik yük durumu için zemin koşullarında, üst yapı ile birlikte modellenip değerlendirilmesi, yapı kabuğundaki şekil değiştirmelerin yapı güvenliği için yorumlanması noktasında daha çok katkılar sağlayacağı düşünülmektedir. Isı iletimi daha fazla olduğundan dolayı çelik konstrüksiyon olarak tasarlanacak soğutma kulelerinde termal etkinin bu yapılardaki öneminden dolayı kaplanması gerekebilir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda, zemin durumu da bir parametre olarak analizlere dahil edilebilir.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

**KAYNAKLAR**

- Abedi-Nik F, Sabouri-Ghomi S, 2008. The damaging effects of earthquake excitation on concrete cooling towers. AIP Konferansı, Reggio Calabria.
- Cheng X X, Zhao L, Ge Y J, 2013. Multiple loading effects on wind-induced static performance of super-large cooling towers. *International Journal of Structural Stability and Dynamics*, 13 (8): 1-21.
- Ge W, Jun L, Chuan X, Li W G, Zhao Y, 2019. Critical impact factors on the cooling performance design of natural draft dry cooling tower and relevant optimization strategies. *Applied Thermal Engineering*, 154: 614-627.
- Jahangiri A, Borzooee A, Armoudli E, 2019. Thermal performance improvement of the three aligned natural draft dry cooling towers by wind breaking walls and flue gas injection under different crosswind conditions. *International Journal of Thermal Sciences*, 137: 288-298.
- Ke S, Yu W, Zhu, P, Ge Y, Hou X, 2018. Full-scale measurements and damping ratio properties of cooling towers with typical heights and configurations. *Thin-Walled Structures*, 124: 437-448.
- Li X, Gurgenci H, Guan Z, Wang X, Xia L, 2015. A review of the crosswind effect on the natural draft cooling towers. *Applied Thermal Engineering*, 150: 250-270.
- Lin F, Li Y, Gu X, Zhao X, Tang D, 2013. Prediction of ground vibration due to the collapse of a 235 m high cooling tower under accidental loads. *Nuclear Engineering and Design*, 258: 89-101.
- Lin F, Ji H, Li Y, Zuo Z, Gu X, Li Y, 2014. Prediction of ground motion due to the collapse of a large-scale cooling tower under strong earthquakes. *Soil Dynamics and Earthquake Engineering*, 65: 43-54.
- Liu, Z, Zhang C, Ishihara T, 2018. Numerical study of the wind loads on a cooling tower by a stationary tornado-like vortex through LES. *Journal of Fluids and Structures*, 81: 656-672.
- Ma H, Li Z, Fan F, 2019. Static performance analysis of single-layer steel cooling tower. *Structures*, 19: 322-332.
- Noh C, 2006. Nonlinear behavior and ultimate load bearing capacity of reinforced concrete natural draught cooling tower shell. *Engineering Structures*, 28(3): 399-410.
- Sabouri-Ghomi S, Abedi-Nik F, Roufegarinejad A, Bradford M A, 2006. Numerical study of the nonlinear dynamic behaviour of reinforced concrete cooling towers under earthquake excitation. *Advances in Structural Engineering*, 9(3): 433-442.
- TS EN 1991-1-4, 2007. Yapılar Üzerindeki Etkiler Bölüm 1-4: Genel Etkiler-Rüzgâr Etkileri Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.
- TS EN IEC 61400-1, 2019. Rüzgâr Enerjisi jeneratör sistemleri- Bölüm 1: Tasarım kuralları Ankara: Türk Standartları Enstitüsü.
- Wang H, Ke S T, Ge Y J, 2019. Research on non-stationary wind-induced effects and the working mechanism of full scale super-large cooling tower based on field measurement. *Journal of Wind Engineering and Industrial Aerodynamics*, 184: 61-76.
- Ye F, 2015. Local buckling analysis of thin-wall shell structures. Hollanda: Delft University of Technology, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış)
- Yu Q-Q, Gu X-L, Li Y, Lin F, 2016. Collapse-resistant performance of super-large cooling towers subjected to seismic actions. *Engineering Structures*, 108: 77-89.
- Zhang J.-F, Ge Y.-J, Zhao L, Zhu B, 2017. Wind induced dynamic responses on hyperbolic cooling tower shells and the equivalent static wind load. *Journal of Wind Engineering and Industrial Aerodynamics*, 169: 280-289.

**Atf İçin:** Çelik F, Doğan O, 2021. Güçlendirme Ankrajlarının Kesme Performansının Mevcut Yığma Duvarlar Üzerinde Belirlenmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1230-1242.

**To Cite:** Çelik F, Doğan O, 2021. Determining The Shear Performance of Strengthening Anchorage on an Existing Clay Block Masonry Wall. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1230-1242.

## Güçlendirme Ankrajlarının Kesme Performansının Mevcut Yığma Duvarlar Üzerinde Belirlenmesi

Fatih ÇELİK<sup>1\*</sup>, Orhan DOĞAN<sup>2</sup>

**ÖZET:** Türkiye nüfusunun büyük bir kesimi deprem riski yüksek bölgelerde yaşamaktadır. Bu bölgelerde bulunan binaların, yapıldıkları yıllardaki mühendislik hizmetlerindeki eksiklik, kalitesiz malzeme kullanımı ve işçilik hatalar nedeniyle mevcut binaların yaklaşık 2/3'ünün güçlendirilmesi gerektirmektedir. Mevcut bir yığma duvarı yatay yüklere karşı güçlendirmek için duvarın bir ya da iki yüzeyine eklenecek çelik veya betonarme levhaların mevcut duvarla kısmi veya tam bir bağla birlikte hareket edebilmesi için konektörlere ihtiyaç vardır. Mevcut duvarın ve eklenecek güçlendirme elemanının yatay deprem kuvvetlerine karşı rijitlikleri farklı olacağından, aralarında oluşacak kesme ve çekme kuvvetlerine karşı, bu konektörlerin yeterli esneklik, aralık, çap ve derinlikte olması gerekmektedir. Bu çalışmada konektör olarak, esnek ve kolay temin edilebilir olması bakımından betonarme çelik çubuk parçaları tercih edilmiştir. Yığma duvar yüzeyine ankre edilecek bu konektörlerin sayılarını belirleyebilmek için çap ve derinliklerine bağlı kesme performanslarının belirlenmesi büyük önem arz etmektedir. Bu çalışma kapsamında, mevcut bir binanın duvarlarına ankrajlanan farklı çaplarda ve derinliklerde güçlendirme çelik çubuklarının kesme performanslarını belirleyebilmek için özel tasarlanmış, pratik ve kullanışlı çelik levhalı deney düzeneği kullanılmış ve 3 farklı binada toplam 21 adet kesme deneyi yapılmıştır. Ankraj kesme performansı üzerinde ankraj derinliğinin donatı çapına oranla çok fazla etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca ankraj çubuğunun çapına ve derinliğine bağlı olarak kesme kuvvetini veren parabolik bir denklem elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kil Blok Tuğlalı Duvar, Yığma Bina, Yığma Binalarda Depreme Karşı Güçlendirme, Ankraj Donatılarının Kesme Performansı, Ankraj Kesme Plakası.

### Determining The Shear Performance of Strengthening Anchorage on an Existing Clay Block Masonry Wall

**ABSTRACT:** A large proportion of Turkey's population live in high-risk earthquake zone. During the years when the buildings were built, approximately 2/3 of the existing buildings in the earthquake zone need to be strengthened, due to the lack of engineering services, poor quality materials and workmanship errors. In order to strengthen an existing masonry wall against horizontal loads and resist horizontal loads partially or fully with the existing wall, connectors are needed for the steel or reinforced concrete shear wall attachments on one or both surfaces of the wall. Since the rigidities of the existing wall and attached reinforcement elements are different against horizontal earthquake forces, these connectors must have sufficient flexibility, spacing, diameter and depth against the shear and pull-out forces that will occur between these two blocks. In this study, anchoring steel bars are preferred as connectors for being flexible and easily attainable. In order to determine the number of the connectors to be anchored to a masonry wall surface, determination of the shear performances depending on the diameter and the depth of the connectors is of great importance. Within the scope of this study, a new practical shear test plate is designed to determine the shear performance of reinforcement anchors with different diameters anchored on an existing building walls. 21 shear tests were performed on three different existing masonry buildings using the specially designed shear test plate. Although the effect of diameter of the steel rods on the shear capacity of the rods showed negligible effect, anchorage depth of the rods showed a significant effect as the most effective parameter. In addition, a parabolic equation is obtained that gives shear performance of the anchorage depending on its diameter and depth.

**Keywords:** Clay Block Brick Wall, Masonry Building, Earthquake Reinforcement in Masonry Buildings, Cutting Performance of Anchoring Reinforcement, Anchoring Shear Plate.

<sup>1</sup> Fatih ÇELİK ([Orcid ID: 0000-0002-1676-1846](https://orcid.org/0000-0002-1676-1846)), Ankara Büyükşehir Belediye Başkanlığı, Yapı Kontrol Dairesi Başkanlığı, Proje ve Birim Fiyat İnceleme Şube Müdürlüğü, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup> Orhan DOĞAN ([Orcid ID: 0000-0002-4942-1725](https://orcid.org/0000-0002-4942-1725)), Kırıkkale Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, İnşaat Mühendisliği, Kırıkkale, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Fatih ÇELİK, e-mail: fatihcelik666@hotmail.com

Bu çalışma Fatih Çelik'in Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

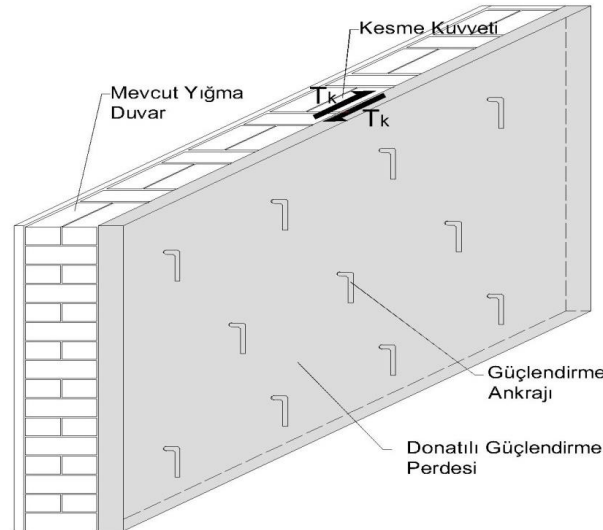
## GİRİŞ

Yığma bina, örgü ve sıva harcı ile taş, tuğla, kerpiç bims-blok vb. malzemelerin bir araya gelmesiyle oluşan, taşıyıcısı duvarlar olan bir yapı türüdür (Bayülke, 1992; Akgül ve Doğan, 2020). Betonarme yapıların inşasının hız kazandığı yüzyıl olarak nitelendirilebilecek 2000'li yıllar; yeni yığma yapıların inşasını yavaşlatmış olsa da mevcut yığma yapılar üzerinde çok sayıda hasar tespiti ve güçlendirme çalışmalarını da barındırmaktadır (Akgül ve Doğan, 2019). 6306 sayılı kanunla kentsel dönüşüm kapsamında imar eksikliği olan ve depremsel açıdan aşırı risk taşıyan binaların yıkılarak yenilenmesi, riskli binalar açısından büyük bir dönüşüm getirmiştir. Ancak imar eksikliği olmayan ve yıkılarak yeniden yapılması ekonomik olmayan binaların, geleneksel mantolama veya perde ekleme yöntemleriyle güçlendirilmesi bina kullanıcıları tarafından rahatsız edici ve maliyetli bulunması nedeniyle tercih edilmemektedir (Doğan ve ark., 2020; Akgül ve Doğan, 2020).

Mevcut binaların iç mekân kullanımını engellemeden, dış cephelerinden ankrajlarla bağlı kesme duvarları ve çelik çaprazlar eklemek suretiyle güçlendirilmesi, maliyet, uygulama kolaylığı ve bina sakinlerince tercih edilir bir yöntem olması bakımından, kentsel dönüşümün akabinde bu tıkanıklığın giderilmesi noktasında büyük önem arz etmektedir.

Mevcut yığma binaların deprem risk analizinde, duvarların kesme performansına ilişkin farklı çalışmalar mevcuttur (Doğan ve ark., 2020; Odacıoğlu, 2018; Çalışkan, 2010; Çalışkan ve ark., 2011; Çelik, 2018; Silveri ve ark., 2016; Doğan ve Odacıoğlu, 2019; Öztürk, 1997). Ancak eklenecek güçlendirme elemanları ile mevcut duvarlar arasında oluşacak kesme kuvvetlerini karşılayacak bağlayıcı konektörlerin kesme performansının yerinde tespitine ilişkin bir deneysel çalışma bulunamamıştır.

Bu çalışma kapsamında, mevcut yığma duvarların güçlendirilmesi için Şekil 1.'de görüldüğü üzere duvar yüzeyine ankrajlanan donatıların çap ve ankraj derinliklerine bağlı olarak kesme performansını belirleyebilmek için kolay taşınabilir ve pratik bir deney plakası tasarlanarak, bir grup deney yapılmıştır.



Şekil 1. Mevcut Yığma Duvarda Güçlendirme Perdesi ve Ankrajları.

## MATERYAL VE METOT

### Deney Düzenegi

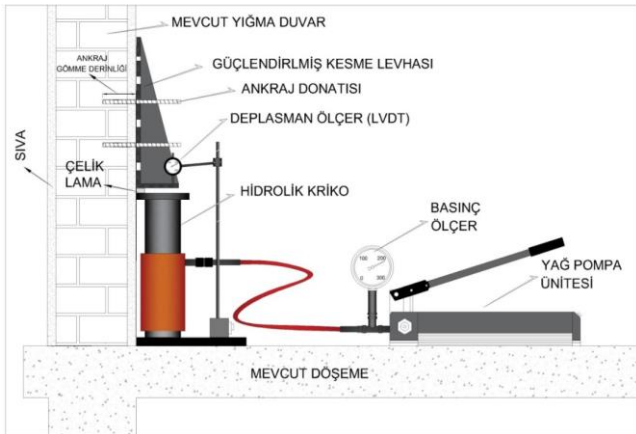
Duvar yüzeyine ekilen Ø6-16 çapında ankraj donatılarının kesme performanslarının araştırılması için hazırlanan deney düzenegi; hidrolik pompa, hidrolik basınçölçer, hidrolik krika, çelik lama,

çelik yükleme levhası, ankraj çubukları, komparatör ve diğer destek levhaları belirli bir sıra ile bir araya getirilmiştir (Şekil 2).

Deneyde kullanılan donanım elemanları olarak; özel kesme levhası (St 37), hidrolik kriko, hidrolik yağ pompası, analog deplasman ölçer, N-Schmidt test çekici, çelik destek plakaları (St 37), çelik lama (St 37) ve deney numunesi olarak farklı çaplarda ankraj donatı çubukları (BÇIII nervürlü) kullanılmıştır. (Şekil 3).

Hidrolik kriko yardımıyla duvar yüzeyine paralel uygulanan kesme kuvveti altında, duvar yüzeyine ankre edilmiş donatı çubuklarının kesme performanslarını araştırmak amacıyla, yırtılma, ezilme ve burkulma olmayacak şekilde güçlendirilerek özel bir çelik levha tasarlanmıştır.

Deneyde donanım elemanı olarak; alt ortasından 10 ton kapasiteli, tek tesirli (itme özellikli), strok boyu 15 cm, kriko başlık çapı 8 cm, başlık etki alanı  $50.27 \text{ cm}^2$  olan hidrolik kriko ve 0-300 bar hidrolik basınç ölçerli, 10 bar hassasiyetli, patlama basıncı 1800 bar, çalışma basıncı 445 bar, 1.5 m boyunda alüminyum gövdeli hidrolik el pompası, manyetik ayaklı sabitlenebilen, 0.01 mm hassasiyetli ve 1.5 cm uzama boyunda bir salgı komparatör kullanılmıştır. Yüklerin uygulanmasında hidrolik kriko altlarında destek ve yükseklik farkını azaltmak ve komparatörü sabitleyebilmek için 2.5 cm kalınlığında ve 20\*30 cm boyutlarında destek plakaları ve ayrıca kriko yükünü plakaya doğrudan kesme yükü olarak aktarabilmek için duvar yüzeyine paralel yerleştirilmek üzere 1.0\*1.0 cm kare kesitli 10 cm boyunda bir çelik çubuk kullanılmıştır. Deney numunesi olarak 25 cm boyunda ve Ø10, Ø12 ve Ø16'lık nervürlü ankraj çubukları hazırlanmıştır.



Şekil 2. Duvar Yüzeyine Ankrajlanan Donatıların Kesme Deney Düzeneği



Şekil 3. Ankraj Donatısı Kesme Performansı Deney Düzeneği

Ayrıca örgü malzemelerinin mekanik özellikleri ile ankrajların kesme performansı arasındaki bağıntıyı görebilmek adına tuğlanın, örgü ve sıva harcının ayrı ayrı basınç dayanımlarını test etmek için tahribatsız deney aleti olan N-Schmidt çekici kullanılmış olup, çekicinin sekme aralığı (R) 10-100, ölçüm aralığı  $10-70 \text{ Nmm}^{-2}$  ve darbe enerjisi  $2.207 \text{ Nm}$ 'dir (TS EN 12504-2, 2014).

### Deneyin Yapılışı

Kesme deneylerine konu olan 3 bina; GMK Bulvarı No:125, Bişkek Caddesi No:44 ve Bahriye Üçok Caddesi No:11'dir ve binalar için çalışma kapsamında sırasıyla B1, B2, B3 kısaltmaları kullanılmıştır.

Kesme levhası duvar yüzeyine yerden yaklaşık 40 cm yükseklikte tutularak, aynı çapta ve yükleme aksına simetrik olan 4 adet levha deliğinden duvar yüzeyine ankraj delik yerleri işaretlenmiştir. İşaretli yerlere açılan deliklere aynı çapta 4 adet ankraj çubuğu eşit derinlikte çakılmış ve kesme levhası duvar

yüzeyine ankraj çubuklarına geçirilerek yerleştirilmiştir. Hidrolik kriko, zemin ile birbirine paralel olan kesme levhasının alt yüzeyini ortalayacak şekilde, alt kısmından çelik plaka ile desteklenerek yerleştirilmiştir. Deney düzeneği hazırlandıktan sonra hidrolik kriko yardımıyla kuvvet verilmeye başlanmıştır. Uygulanan kuvvetle birlikte yukarı yönlü hareket eden kesme levhasının ötelenme boyu, zeminde bulunan çelik levhaya sabitlenen komperatör ile yukarı doğru meydana gelecek deplasmanlar ölçülmüştür. Deney işlemi maksimum kesme kuvvetine ulaştıktan sonra, etki yükü maksimum yükün 2/3'üne düşüncüye kadar devam etmiştir. Yükleme başladıktan deney durduruluncaya kadar yaklaşık her 1.00 mm deplasman için hidrolik basınç ölçer okuması kaydedilmiştir ve yük-deplasman grafikleri çizilmiştir. Elde edilen maksimum kesme kuvveti 4'e bölünerek her bir ankrajın kesme kapasitesi, elastik ve duvarda kalıcı ezilmeler nedeniyle elasto-plastik davranışı elde edilmiştir.

B1 binası üzerinde 3 farklı çaplı (10, 12 ve 16 mm) ankraj çubukları için kesme deneyleri yapılmış, sonuç olarak çapın ankraj kesme kapasitesi üzerinde etkisinin az olduğu, çok yakın değerler verdiği görülmüş buna istinaden B2 ve B3 binalarında sadece 10 ve 16 mm için kesme deneyleri yapılmıştır. Ankraj donatısı başlangıçta sadece kesmeye zorlanmış olsa da duvar yüzeyinde yükün artması ile meydana gelen ezilmeler sonucunda donatıların eğilerek çekme aldığı gözlenmişse de bu çekme etkisi ile duvardan sıyrılarak çekme göçmesi görülmemiştir. Bu yüzden ankrajların kesme performansı test edilirken epoksi kullanımına ihtiyaç duyulmamıştır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Üç farklı binada yapılan ankraj kesme deneylerinde 3 farklı çap ve 3 farklı derinlikte ankraj donatıları kullanılmıştır. Bu deneyler sonucunda, göçmenin beklendiği üzere, ankraj donatılarının duvar içerisinde kalan kısmında parabolik bir şekil alarak, itme doğrultusunda donatı ankrajının basınç uyguladığı delik yüzeylerinde ezilmeler meydana gelmiş, donatı eğilmiş yani en çok zorlanan ankrajlar göçmek yerine, yükünü daha az zorlanan ankrajlara aktararak, yükün yeniden dağılımını mümkün kılmış ve donatıda doğrudan kesilerek ani göçme önlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Ankraj çubuklarının duvar içerisinde göçme şekli

Aynı deneyin, yığma duvara nispeten daha yüksek mukavemetli beton duvarlarda yapılması durumunda, duvar mukavemetinin artması ile ezilme daha sınırlı olacak, dolayısıyla ankraj donatılarındaki eğilmeler de azalacaktır. Böylece en çok zorlanan ankraj donatıları taşıma kapasitesinin fazlasını diğer ankrajlara aktaramadığı, yani yükün yeniden dağılımı mümkün olmayacağı için maksimum taşıma kapasitesine ulaşan ankraj donatılar, daha fazla veya doğrudan kesme ile zorlanacak ve daha erken kesme göçmeleri meydana gelecektir. Binaların inşası aşamasında kullanılan yapı



malzemelerinin (Tuğla, sıva, örgü harcı gibi) farklı ocaklarda imal edildiği ve farklı ustalarca örülerek sıvandığı için malzemelerin mekanik özelliklerindeki bu farklılık, malzemelerin basınç mukavemeti hakkında bilgi veren tahribatsız deney yöntemlerinden biri olan N-Schmidt test çekiciyle ortaya konmuştur (Çizelge 1).

**Çizelge 1.** Tuğla, sıva ve örgü harcı için N-Schmidt test çekici okumalarının ortalama değerleri

| Yerleşke |              | N-Schmidt Test Çekici R Okumaları |
|----------|--------------|-----------------------------------|
| B1       | <b>Tuğla</b> | <b>26.5</b>                       |
|          | Sıva         | 19.5                              |
|          | Örgü Harcı   | 12.0                              |
| B2       | <b>Tuğla</b> | <b>23.5</b>                       |
|          | Sıva         | 10.0                              |
|          | Örgü Harcı   | 8.0                               |
| B3       | <b>Tuğla</b> | <b>20.0</b>                       |
|          | Sıva         | 11.0                              |
|          | Örgü Harcı   | 12.0                              |

Farklı üç binada kullanılan tuğla basınç dayanımlarında %75'e varan, örgü harcı dayanımlarında %56'ya varan ve sıva harcı dayanımlarında %67'ye varan farklılığın olduğu ve burada tuğla hacimsel olarak en büyük örgü malzemesi olduğu kadar basınç mukavemeti olarak da en yüksek değere sahip olduğu görülmüştür.

**Çizelge 2.** Ø10'luk 4 ankrajda oluşan maksimum kesme kuvveti ( $T_k$ ) ve maksimum deplasman

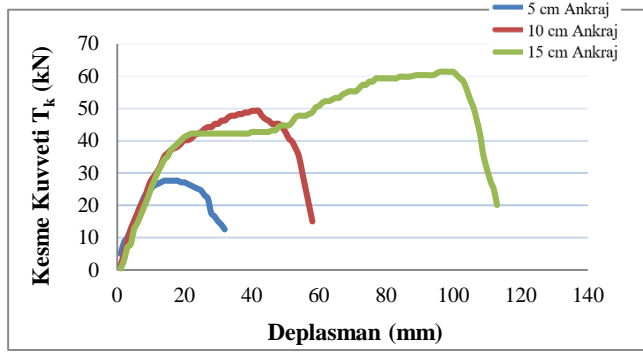
| Yerleşke | Ankraj Donatı Derinliği (cm) | Maksimum Kesme Kuvveti $T_k$ (kN) | Deplasman (mm) |
|----------|------------------------------|-----------------------------------|----------------|
| B1       | 5                            | 27.65                             | 18             |
|          | 10                           | 49.27                             | 42             |
|          | 15                           | 61.23                             | 100            |
| B2       | 5                            | 27.65                             | 34             |
|          | 10                           | 42.73                             | 52             |
|          | 15                           | 54.29                             | 112            |
| B3       | 5                            | 31.14                             | 18             |
|          | 10                           | 49.78                             | 41             |
|          | 15                           | 58.30                             | 84             |

Çizelge 1 ve Çizelge 2'deki veriler ışığında, duvar içerisinde en büyük hacme ve en yüksek mukavemete sahip olması nedeniyle tuğlanın, ankraj donatılarının performansı üzerinde en etkili parametre olduğu görülmektedir. Dolayısı ile Eşitlik 1'de görüldüğü üzere, en yüksek kesme mukavemeti veren 15 cm ve üzeri ankraj derinlikleri için, Ø10'luk bir ankraj donatısının kesme mukavemeti ( $T_k$ ) ile tuğla mukavemetinin göstergesi olan R okuma değerleri arasında, 0.9247R-korelasyonla doğrusal bir bağıntı vardır.

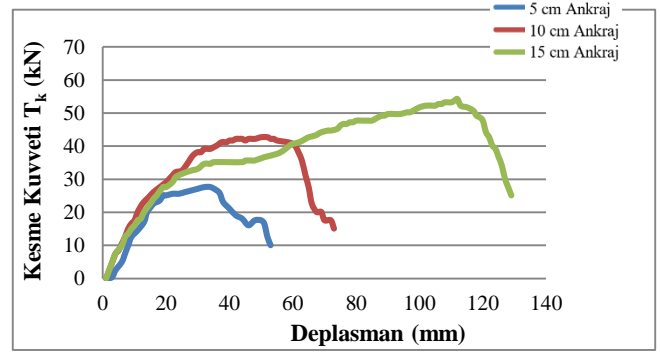
$$T_k = 1.2828 \cdot R - 17.947$$

(1)

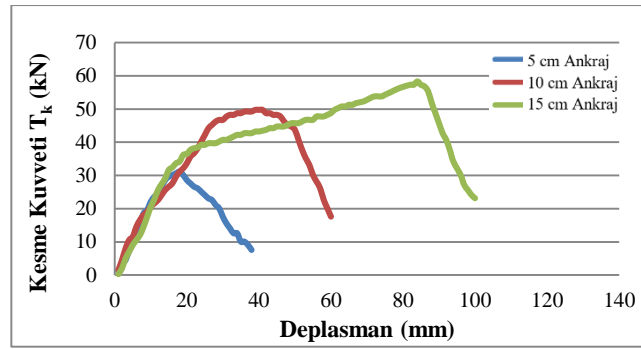
3 farklı bina üzerinde, Ø10'luk ankraj donatısının farklı ankraj derinliklerindeki yapılan kesme deneyi sonuçları Çizelge 2'de ve grafiksel olarak Şekil 5, 6 ve 7.'de verilmiştir.



Şekil 5. B1 için Ø10'luk ankraj donatısı için  $T_k$  ve deplasman grafiği



Şekil 6. B2 için Ø10'luk ankraj donatısı için  $T_k$  ve deplasman grafiği



Şekil 7. B3 için Ø10'luk ankraj donatısı için  $T_k$  ve deplasman grafiği

Çizelge 3. Ø12'lik ankrajlarda oluşan maksimum kesme kuvveti ( $T_k$ ) ve maksimum deplasman

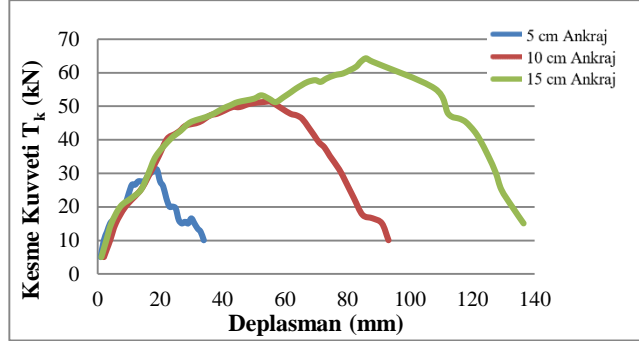
| Yerleşke | Ankraj Donatı Derinliği (cm) | Maksimum Kesme Kuvveti $T_k$ (kN) | Deplasman (mm) |
|----------|------------------------------|-----------------------------------|----------------|
| B1       | 5                            | 31.16                             | 19             |
|          | 10                           | 51.28                             | 56             |
|          | 15                           | 64.32                             | 86             |

Çizelge 4. Ø16'lık ankrajlarda oluşan maksimum kesme kuvveti ( $T_k$ ) ve maksimum deplasman

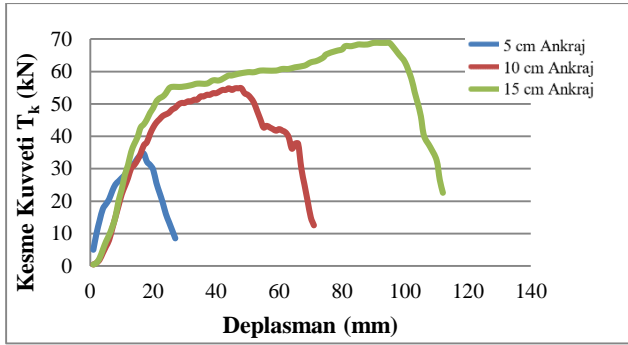
| Yerleşke | Ankraj Donatı Derinliği (cm) | Maksimum Kesme Kuvveti $T_k$ (kN) | Deplasman (mm) |
|----------|------------------------------|-----------------------------------|----------------|
| B1       | 5                            | 34.64                             | 11             |
|          | 10                           | 54.81                             | 48             |
|          | 15                           | 68.71                             | 95             |
| B2       | 5                            | 27.14                             | 16             |
|          | 10                           | 45.24                             | 50             |
|          | 15                           | 56.30                             | 85             |
| B3       | 5                            | 32.67                             | 18             |
|          | 10                           | 55.29                             | 44             |
|          | 15                           | 63.84                             | 77             |

Şekil 5, 6 ve 7'de görüldüğü üzere, ankraj derinliğinin artması ile ankraj kesme performansının da azalan bir eğilimle parabolik olarak arttığı ve deplasman miktarı ile birlikte potansiyel enerji yutma kapasitesinin de arttığı görülmektedir. Gömme derinliği fazla olan ankrajların maksimum kesme

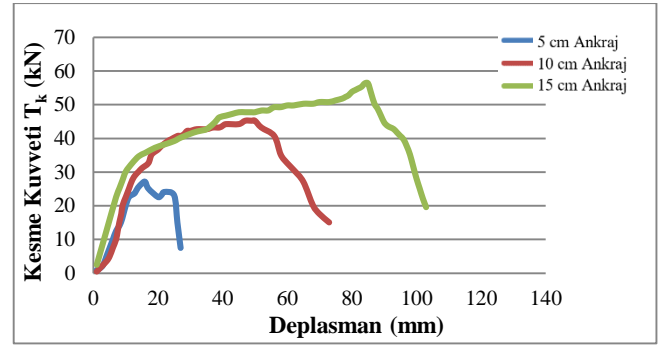
kuvvetine daha yüksek deplasmanlarda ulaştığı ancak maksimum yüke ulaştıktan sonra hızlı bir yük kaybı ile ani denebilecek göçmenin gerçekleştiği görülmektedir. B1’de farklı ankraj derinliklerindeki Ø12’lik ankraj donatısı için yapılan kesme deneyi verileri Çizelge 3 ve Şekil 8’de verilmiştir.



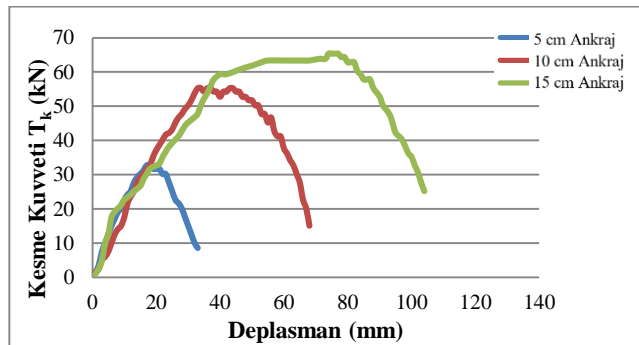
Şekil 8. B1 için Ø12’lik ankraj donatısı için  $T_k$  ve deplasman grafiği



Şekil 9. B1 için Ø16’lık ankraj donatısı için  $T_k$  ve deplasman grafiği



Şekil 10. B2 için Ø16’lık ankraj donatısı için  $T_k$  ve deplasman grafiği

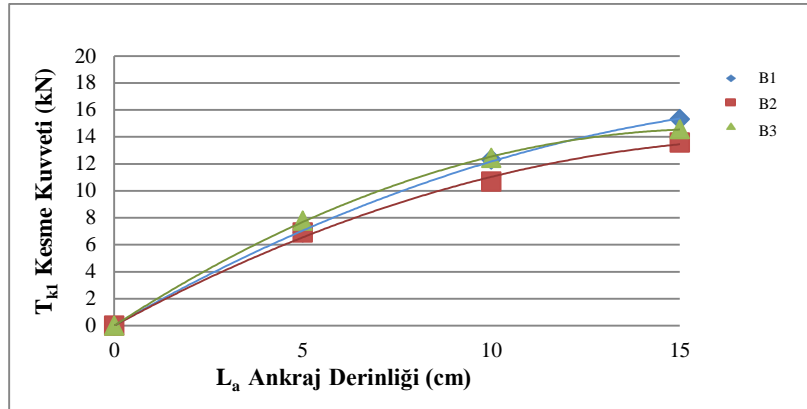


Şekil 11. B3 için Ø16’lık ankraj donatısı için  $T_k$  ve deplasman grafiği

3 farklı binada farklı ankraj derinliklerindeki Ø16’lık ankraj donatısı için yapılan kesme deneyi sonuçlarına ilişkin kesme ve deplasman değerleri Çizelge 4’te ve grafiksel değerlendirmesi Şekil 9, 10 ve 11’de verilmiştir. Binaların duvar malzemelerinin kalitesine bağlı olarak, farklı gömme derinlikleri için maksimum kesme kuvvetleri değişirken maksimum deplasmanlar birbirlerine çok yakın gerçekleşmiştir.

Şekil 5-11’de görüldüğü üzere Ø16’lık ankraj donatısı deneyinde ankraj donatı çapının artmasıyla birlikte Ø10’luk ve Ø12’lik çaplara göre maksimum taşıma kapasitesinin çap artışına oranla daha az artmıştır. Ancak maksimum yüke karşılık gelen deplasman miktarlarının azaldığı görülmüştür.

Maksimum kesme kuvvetleri ve buna karşılık deplasman miktarlarının, ankraj çapı ve derinliğine bağlı olarak değiştiği görülmüştür.

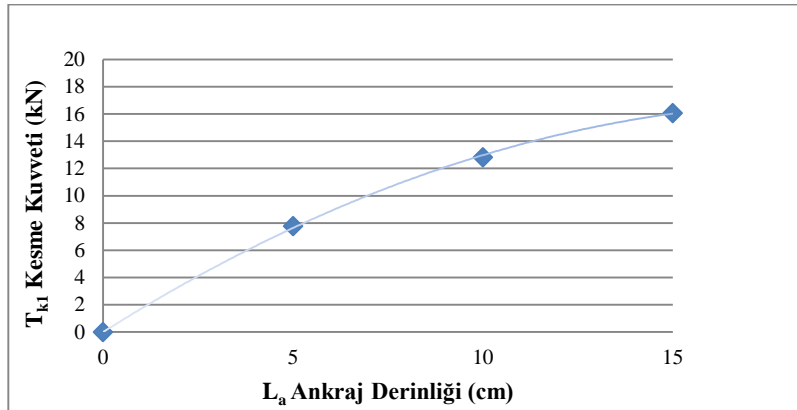


Şekil 12. B1, B2, B3 için Ø10'luk ankrajlarda ankraj derinliği ile kesme kuvveti bağıntısı

$$B1 \text{ (GMK Bulvarı No:125)} \quad (R_{tuğla}=26.5) \quad T_{k1} = -0.0387L_a^2 + 1.6047L_a \quad (2)$$

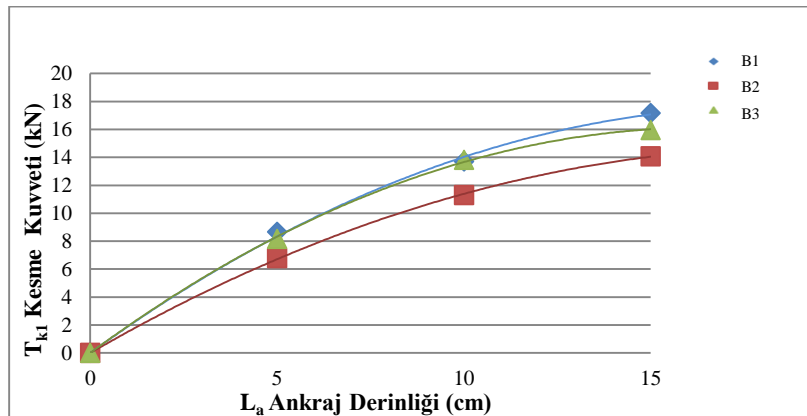
$$B2 \text{ (Bişkek Cad. No:44)} \quad (R_{tuğla}=23.5) \quad T_{k1} = -0.0414L_a^2 + 1.5179L_a \quad (3)$$

$$B3 \text{ (Bahriye Üçok Cad. No:11)} \quad (R_{tuğla}=20.0) \quad T_{k1} = -0.0569L_a^2 + 1.8225L_a \quad (4)$$



Şekil 13. B1 için Ø12'lik ankrajlarda ankraj derinliği ile kesme kuvveti bağıntısı

$$B1 \text{ (GMK Bulvarı No:125)} \quad (R_{tuğla}=26.5) \quad T_{k1} = -0.0458 L_a^2 + 1.756 L_a \quad (5)$$



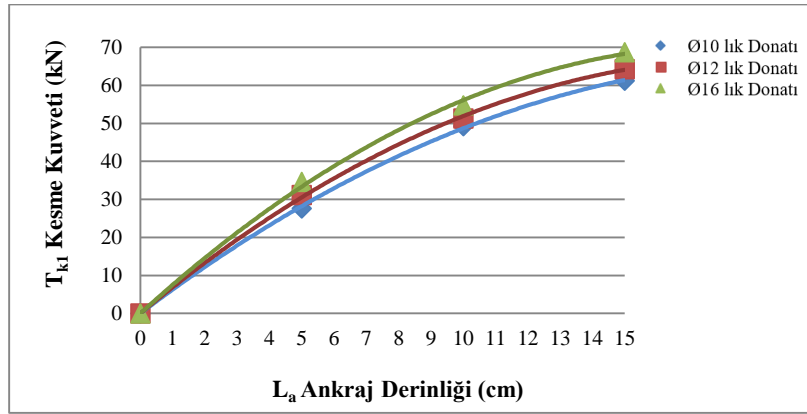
Şekil 14. B1, B2, B3 için Ø16'luk ankrajlarda ankraj derinliği ile kesme kuvveti bağıntısı

$$B1 \text{ (GMK Bulvarı No:125)} \quad (R_{tuğla} = 26.5) \quad T_{k1} = -0.0529L_a^2 + 1.9319L_a \quad (6)$$

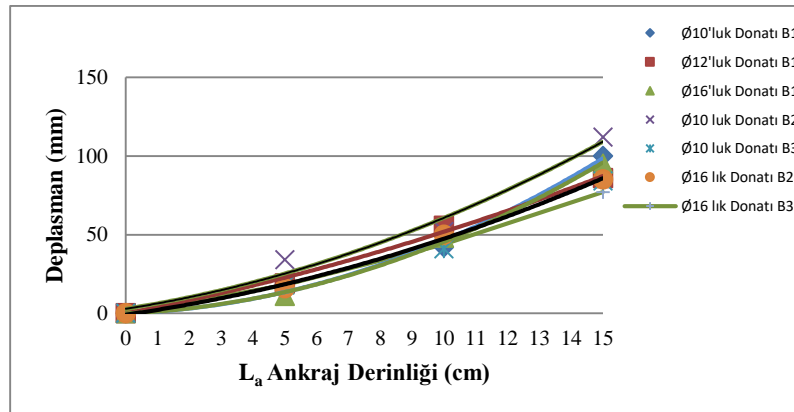
$$B2 \text{ (Bişkek Cad. No:44)} \quad (R_{tuğla} = 23.5) \quad T_{k1} = -0.0405L_a^2 + 1.5437L_a \quad (7)$$

$$B3 \text{ (Bahriye Üçok Cad. No:11)} \quad (R_{tuğla} = 20.0) \quad T_{k1} = -0.0598L_a^2 + 1.9643L_a \quad (8)$$

Söz konusu üç binaya ait Ø10, Ø12 ve Ø16'lık ankaraj donatılarının kesme kuvveti  $T_{k1}$  ile ankaraj derinliği  $L_a$  arasında  $R^2=0.99$  regrasyonla çok uyumlu denklemler elde edilmiştir. Bu denklemler arasındaki farklılığın, binaların duvar örgü malzemelerinin mekanik özelliklerine, özellikle de tuğlanın mukavemetinin göstergesi olan çekiç okumalarına ( $R_{tuğla}$ ) bağlı olduğu görülmektedir (Şekil 12, 13, 14). Ø10'luk, Ø12'lik ve Ø16'lık ankaraj çapları için 5 cm, 10 cm ve 15 cm gömme derinliğine bağlı olarak elde edilen ankaraj kesme kuvvetlerinin, azalan bir eğilim çizgisiyle parabolik olarak arttığı görülmüştür. Bir adet Ø10'luk ankaraj için ankaraj derinliği 5 cm'den 3 katı olan 15 cm'ye çıktığında binaların tuğla, sıva ve örgü harcı dayanımlarına bağlı olarak bir adet ankarajın kesme kuvvetinin ( $T_{k1}$ ) her üç bina için ortalama iki katı (%100) arttığı görülmüştür (Şekil 12, 13, 14).



Şekil 15. B1 için Ø10'luk, Ø12'lik ve Ø16'lık Ankarajlarda  $T_k$  Kesme Kuvveti (kN) ile  $L_a$  Ankaraj Derinliği (mm) Grafiği

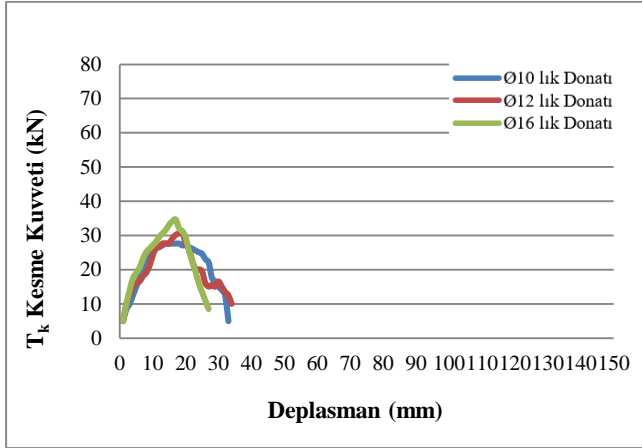


Şekil 16. Ø10'luk, Ø12'lik ve Ø16'lık Ankarajlar için Deplasman-Ankaraj Derinliği Grafiği

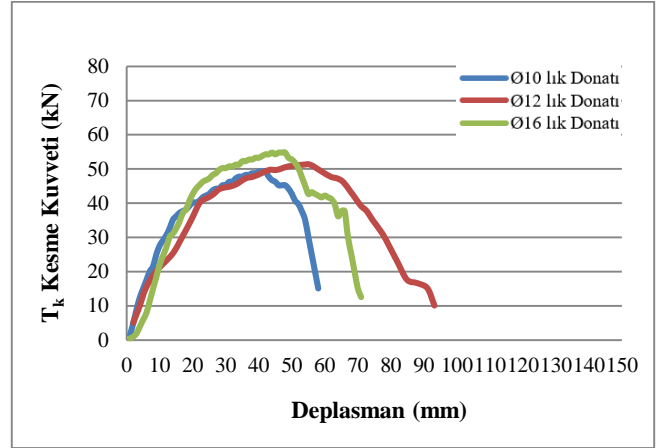
Şekil 14'de B1 için ankaraj çapının ankaraj kesme performansına etkisine bakılmış ve Ø10'luk, Ø12'lik ve Ø16'lık ankarajların derinliğinin artması ile uyumlu bir şekilde kesme performansının da parabolik olarak arttığı görülmüştür. Ankaraj derinliği 5 cm için kesme kapasitesi 30 kN, derinliğinin 5 cm'den 10 cm'ye çıkması ile kesme kapasitesindeki artışın yaklaşık 20 kN, 10 cm'den 15 cm'ye çıkması ile de bu artışın yaklaşık 10 kN kadar arttığı görülmektedir. Artan ankaraj derinliği için kesme performansının aynı oranda değil azalan bir eğilimle arttığı görülmektedir. Dolayısıyla ankaraj derinliğini 15 cm'den 20 cm'ye çıkmasıyla bu artışın yaklaşık 5 kN olacağı düşünülürse, ankaraj derinliğinin 20

cm'den daha fazla yapılmasının ekonomik maliyeti artırmanın dışında pek katkısı olmayacağı kanaatine varılmıştır. Aynı gömme derinliği için 3 farklı ankraj çapının kesme değerlerinin birbirine yakın olduğu, görülmüştür. Ankraj çapındaki %50 artışa karşılık kesme performansının yaklaşık %10 arttığı görülmektedir. Dolayısıyla Ø10'luk ankrajın diğerlerine oranla tercih edilmesinin daha ekonomik ve kolay olacağı kanaatine varılmıştır (Şekil 15).

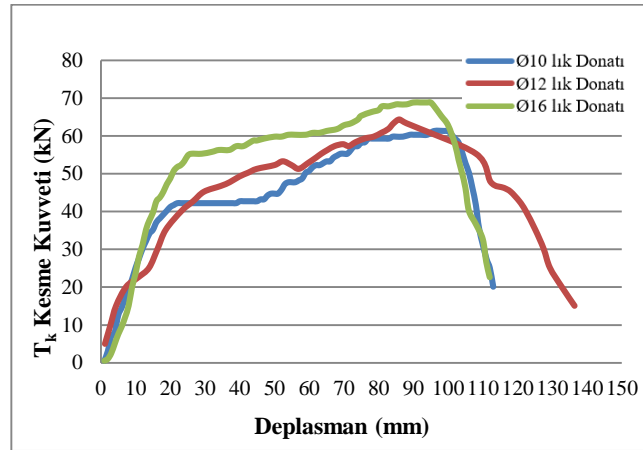
Ankraj derinliğinin artması ile ankraj kesme kapasitesindeki artış trendi düşerken, deplasmanındaki parabolik artışın daha yüksek olduğu, dolayısıyla daha elastik ve sünek davrandığı görülmektedir (Şekil 16).



Şekil 17. 5 cm ankraj derinliği için farklı ankraj çaplarının kesme yükü ve deplasman grafiği



Şekil 18. 10 cm ankraj derinliği için farklı ankraj çaplarının kesme yükü ve deplasman grafiği



Şekil 19. 15 cm ankraj derinliği için farklı ankraj çaplarının kesme yükü ve deplasman grafiği

Şekil 17-18-19'da görüldüğü gibi Ø10'luk çaptan Ø16'luk çapa geçişte deplasman artışının daha düşük ve ankrajın daha rijit olduğu görülmüştür. Yığma yapılarda kesme kuvvetlerinin hesaplandığı duvar yüzeyleri betonarme gibi homojen ve güçlü bir yapıya sahip değildir. Bu nedenle yığma yapılarda ankraj çapı arttıkça uygulanan  $T_k$  kuvvetiyle birlikte duvar yüzeyinde görülen deformasyon miktarı da artmaktadır. Bu durumda ankraj çapı arttıkça deplasman miktarında çap artışıyla azalış görülmüştür.

B2'de Ø10'luk ankrajın 15 cm gömme derinliği için deplasman miktarı 112 mm olmasına rağmen, Ø16'luk ankrajın 15 cm gömme derinliğinde deplasman miktarı 85 mm olarak ölçülmüştür. Benzer durumla B3'de Ø10'luk ankrajın 15 cm gömme derinliğinde deplasman miktarı 84 mm olmasına rağmen Ø16'luk ankraj 15 cm gömme derinliğinde deplasman miktarı 77 mm ve B1'de ise Ø10'luk ankrajın 15

cm gömme derinliğinde deplasman miktarı 100 mm, Ø16 çapında 15 cm gömme derinliğinde deplasman miktarı 95 mm olarak ölçülmüştür.

Ø10, Ø12 ve Ø16 çaplarındaki ankraj donatıları üzerinde yapılan deneylerde, ankraj çaplarının değişmesinin, ankraj donatısının maksimum kesme kuvveti ve enerji yutma kapasitesi bakımından etkisinin ihmal edilecek derecede az olduğu görülmektedir. Ankraj donatı çapı arttıkça, ne kesme yükünde beklenen düzeyde artış, ne de ankrajlardaki artan eğilme rijitliği nedeniyle beklenen ani kesme göçmeleri gözlenmemiş hem maksimum kesme kuvvetinde hem de göçme deplasmanlarındaki artış ihmal edilecek kadar az olmuştur.

Ancak, 5 cm'den 10 cm'ye çıkması ile yani 2 katına çıkması ile daha süneklik davranarak, şekil değiştirme kapasitesine paralel olarak, enerji yutma kapasitesinin de yaklaşık 4 katı arttığı, 3 katına çıkması ile de enerji yutma kapasitesinin yaklaşık 8 katı arttığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, ankraj donatısının gömme derinliğinin artması ile hem kesme yükü kapasitelerinin hem de göçme şekil değiştirme ve enerji yutma kapasitelerinin arttığı gözlenmiştir. Ankraj kesme performansını birinci dereceden etkileyen parametrenin duvar tuğlası dayanımının, örgü harcı dayanımının ve ankraj derinliğinin olduğu da görülmüştür. Ancak bu artışın eğilim çizgisinin gömme derinliği ile aynı oranda yani lineer olarak artmadığı, parabolik olarak azaldığı da göz önüne alındığında, ankraj derinliğinin 15 cm'den sonra çok azalacağı, 20 cm'den sonra da ihmal edilecek kadar az olacağı görülmüştür.

Sonuç olarak, küçük çaplı ankrajların uygulama kolaylığı ve maliyetinin de düşük olacağı göz önüne alındığında, duvar güçlendirmelerinde küçük çaplı ankrajlar tercih edilmelidir. Ayrıca duvar mukavemetinin artması ile bu ankraj derinliğinin kesme performansı üzerindeki etkisi azalacağından, etkili gömme derinliğinin de daha az olacağı anlaşılmaktadır.

## SONUÇ

Yığma veya betonarme binalar, ek bir çelik veya betonarme panel ile güçlendirilirken, mevcut elemanların yüklerini güçlendirme elemanlarına tam aktarabilmesi güçlü ara bağlantı elemanları ile mümkün olacaktır. Ara bağlantı elemanlarının hangi çap ve derinlikte, kaç adet ve ne kadar aralıklarla duvara ankre edileceğini belirlemek için, güçlendirme analizleri öncesinde kesme performansının yerinde tespit edilmesi, analizlerin güvenilirliği bakımından çok önemlidir.

Bu çalışma ile üç farklı yığma binanın duvarlarında, özel tasarlanmış kesme levhası kullanılarak, farklı çaplarda ankraj donatıları duvarlara yine farklı derinliklerde ankrajlanarak, kesme performansını belirlemek amacıyla kesme deneyleri yapılmıştır. Elde edilen deney sonuçları değerlendirildiğinde;

- Farklı üç binada kullanılan tuğla basınç dayanımlarında %33'e varan, örgü harcı dayanımlarında %50'ye varan ve sıva harcı dayanımlarında %95'e varan farklılığın olduğu görülmüş ve burada tuğla hacimsel olarak en büyük örgü malzemesi olduğu kadar basınç mukavemeti olarak da en yüksek değere sahip olduğu, dolayısı ile yığma bina performans ve güçlendirmelerinde analizlerinde, binaların sadece tuğla cinsine ve boşluk oranına bağlı olarak, mekanik özelliklerinin sabit değerlerle tanımlanamayacağı görülmüştür.
- Bu deneyler sonucunda, binanın ankraj kesme kapasitesinin en kolay ve en az maliyetle elde edilmesi ve en iyi performansı vermesi bakımından, Ø10'luk bir ankrajın kesme mukavemeti ( $T_k$ ) ile tuğla duvarın çekiç okuma R değerleri arasında,  $R^2=0.9247$  regresyonla doğrusal bir bağıntı elde edilmiştir.
- Ø16'luk ankraj donatısı deneyinde ankraj donatı çapının artmasıyla birlikte Ø10'luk ve Ø12'lik çaplara göre maksimum taşıma kapasitesinin çap artışına oranla az arttığı ancak maksimum yüke karşılık gelen deplasman miktarlarının azaldığı, dolayısı ile maksimum kesme kuvvetlerinin ankraj çapından ziyade ankraj derinliğine bağlı olarak değiştiği görülmüştür.

- Bu deneyler sonucunda, benzer örgü tuğlalı binaların performans ve güçlendirme analizlerinde kullanılabilir Ø10, Ø12 ve Ø16'lık ankaraj donatılarının kesme kuvveti  $T_{kl}$  ile ankraj derinliği  $L_a$  arasında  $R^2=0.99$  regrasyonla çok uyumlu denklemler elde edilmiştir. Bu denklemler arasındaki farklılığın, binaların duvar örgü malzemelerinin mekanik özelliklerine, özellikle de tuğlanın mukavemetinin göstergesi olan çekiç okumalarına ( $R_{tuğla}$ ) bağlı olduğu görülmüştür.
- Ankraj kesme performansında, birinci dereceden ankraj derinliğinin etkili olduğu, bir adet Ø10'luk ankraj için ankraj derinliği 5 cm'den 3 katı olan 15 cm'ye çıktığında binaların tuğla, sıva ve örgü harcı dayanımlarına bağlı olarak bir adet ankrajın kesme kuvvetinin ( $T_{kl}$ ) her üç bina için ortalama iki katı arttığı görülmüştür. Dolayısıyla ankraj derinliğini 15 cm'den 20 cm'ye çıkmasıyla bu artışın yaklaşık 5 kN olacağı düşünülürse, ankraj derinliğinin 20 cm'den daha fazla yapılmasının ekonomik maliyeti artırmanın dışında pek katkısı olmayacağı kanaatine varılmıştır.
- Aynı gömme derinliği için 3 farklı ankraj çapının kesme değerlerinin birbirine yakın olduğu, görülmüştür. %50 ankraj çapındaki artışa karşılık kesme performansının yaklaşık %10 arttığı, dolayısıyla Ø10'luk ankrajın diğerlerine oranla tercih edilmesinin daha ekonomik ve kolay olacağı kanaatine varılmıştır.
- Ankraj derinliğinin 5 cm'den 10 cm'ye çıkması ile yani 2 katına çıkması ile daha sünek davranarak, şekil değiştirme kapasitesine paralel olarak, enerji yutma kapasitesinin de yaklaşık 4 katı arttığı, 3 katına çıkması ile de enerji yutma kapasitesinin yaklaşık 8 katı arttığı, ankraj kesme kapasitesindeki artış trendi düşerken, deplasmanındaki parabolik artışın daha yüksek olduğu, hem kesme yükü kapasitelerinin hem de göçme şekil değiştirme ve enerji yutma kapasitelerinin arttığı, dolayısıyla daha elastik ve sünek davrandığı görülmüştür.
- Ankraj donatı çapı arttıkça, ankraj donatısının maksimum enerji yutma kapasitesi bakımından etkisinin ihmal edilecek derecede az olduğu, ne kesme yükünde beklenen düzeyde artış, ne de ankrajlardaki artan eğilme rijitliği nedeniyle beklenen ani kesme göçmeleri gözlenmemiş, hem maksimum kesme kuvvetinde hem de göçme deplasmanlarındaki artış ihmal edilecek kadar az olmuştur
- Bu çalışmalar ile, küçük çaplı ankrajların uygulama kolaylığı ve maliyetinde düşük olacağı göz önüne alındığında, duvar güçlendirmelerinde Ø8 ve Ø10 gibi küçük çaplı ankraj donatılarının tercih edilmesi gerektiği, ayrıca duvar mukavemetinin artması ile bu ankraj derinliğinin kesme performansı üzerindeki etkisi azalacağından, etkili gömme derinliğinin de sıva kalınlığı hariç 20 cm ile sınırlı tutulması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmalara ek olarak, deneylerde kullanmış olduğumuz özel tasarlanmış, pratik ve kullanışlı çelik levhalı deney düzeneğiyle;

- Daha farklı binalar üzerinde Ø8 ve Ø10'luk ankaraj donatıları kullanılarak, daha büyük ankraj derinlikleri için bu kesme deneyleri yapılarak, gömme derinliğine ve ankraj donatısının kesme performansının tuğla mukavemetinin göstergesi olan N-Schmidt okumalarına bağlı daha sağlıklı bir denklem elde edilebileceği,
- Farklı duvar örgü tuğlaları için benzer deneyler yapılarak benzer denklemler ortaya konabileceği,
- Duvar mukavemetinin artması ile bu ankraj derinliğinin kesme performansı üzerindeki etkisi azalacağı, etkili gömme derinliğinin de daha az olacağından, mukavemeti daha yüksek beton perde elemanlar için benzer deneyler yapılarak benzer denklemler ortaya konabileceği önerimizdir.

### Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.



## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Akgül M, Doğan O, 2019. Yığma Yapılarda Güçlendirme Yöntemleri ve TBDY-2018'de Yığma Yapılar. Munzur 1. Uluslararası Uygulamalı Bilimler Kongresi, 24-26 Mayıs 2019, Tunceli, Türkiye.
- Akgül M, Doğan O, 2020. 4 Nisan 2019 Elâzığ-Sivrice Depreminin Yığma Yapılara Etkisinin Değerlendirilmesi. International Journal of Engineering Research and Development, 12 (1): 265-277. doi.org/10.29137/umagd.621701
- Akgül M, Doğan O, 2020. Altındağ/Ankara Özelinde Tipik Yığma Binaların Deprem Risklerinin 2018 Türkiye Bina Deprem Yönetmeliğine Göre İncelenmesi. Engineering Sciences (NWSAENS), 15(1):1-14. doi: 10.12739/NWSA.2020.15.1.1A0446
- Bayülke N, 1992, Yığma Yapılar (Genişletilmiş 2. Baskı), Bayındırlık ve İskân Bakanlığı Deprem Araştırma Dairesi Başkanlığı, Ankara.
- Çalışkan Ö, 2010. Mevcut Betonarme Binaların Dış Perde Duvar ile Güçlendirilmesinde Ankraj Uygulamalarının Deneysel Olarak Araştırılması, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, (Basılmış)
- Çalışkan Ö, Yılmaz S, Kaplan H, 2011. Güçlendirme Ankrajlarının Kesme Dayanımının ACI318 ve TS500'e Göre Belirlenmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 14(3), 19-27.
- Çelik F, 2018. Mevcut Yığma Binalarda Depremsel Güçlendirme Ankrajlarının Çap ve Ankraj Derinliğine Bağlı Çekme ve Kesme Performanslarının Deneysel Olarak İncelenmesi, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış)
- Doğan O, Odacıoğlu O, 2019. An Experimental Study To Determine Sliding Shear Strength And Internal Friction Coefficient Of ClayBrick Wall In A Masonry Building. International Journal of Engineering Research and Development, 11 (2): 670-676. doi.org/10.29137/umagd.545396
- Doğan O, Çelik F, Erkmen K.C, Bande B, Akgül M, 2020. Mevcut Yığma Duvarlara Yapılan Kimyasal Ankrajların Çekme Performansının Tam ve Kısmi Sıyrılmalı Yöntemlerle Deneysel Olarak Belirlenmesi. Construction Materials Engineering and Architecture Congress, 12-14 June, Ankara, Türkiye.
- Odacıoğlu O.G, 2018. Yığma Binalarda Yatay Yük Hesabına Esas Kesme Performansının Deneysel Olarak Belirlenmesi, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış)
- Öztürk B, 1997. Analysis and Design of Prestressed Concrete Sheet Pile Walls, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış)
- Silveri F, Riva P, Profeta G, Poverello E, Algeri C, 2016. Experimental Study on Injected Anchors for the Seismic Retrofit of Historical Masonry Buildings. International Journal of Architectural Heritage, 10(2-3): 182-203.
- TS EN 12504-2. 2014. Yapılarda beton deneyleri - Bölüm 2: Tahribatsız muayene - Geri sıçrama sayısının belirlenmesi. Ankara : Türk Standartları Enstitüsü.

**Atf İçin:** Yılmaz M, Tosunoğlu F, Demirel MC, 2021. Taşkın Frekans Analizinde Klasik Yöntemler ve Alternatif Bir Parametre Tahmin Yönteminin Karşılaştırılması. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1243-1254.

**To Cite:** Yılmaz M, Tosunoğlu F, Demirel MC, 2021. Comparison of Classical Methods and an Alternative Parameter Estimation Method in Flood Frequency Analysis. . Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1243-1254.

### **Taşkın Frekans Analizinde Klasik Yöntemler ve Alternatif Bir Parametre Tahmin Yönteminin Karşılaştırılması**

Muhammet YILMAZ<sup>1\*</sup>, Fatih TOSUNOĞLU<sup>1</sup>, Mehmed Cüneyd DEMİREL<sup>2</sup>

**ÖZET:** Taşkın frekans analizi su yapılarının tasarımı, taşkın kontrolünün planlanması ve projelendirilmesinde oldukça önemlidir. Taşkın frekans analizinin önemli adımlarından biri veriler için uygun bir dağılım modelinin ve parametrelerinin tahmin edilmesidir. Bu çalışmada, olasılık dağılım fonksiyonlarının parametrelerini tahmin etmek için optimizasyon tabanlı DEoptim algoritması önerilmiş ve geleneksel maksimum olabilirlik yöntemi (MLM) ve momentler yöntemi (MOM) ile karşılaştırılmıştır. Doğu Karadeniz Havzası üzerinde bulunan 2 adet istasyona ait yıllık maksimum akım verileri kullanılmıştır. Taşkın tekerrür debilerinin tahmini için Gamma, Weibull, Log-Normal, Logistic ve Normal olasılık dağılımları kullanılmıştır. En uygun olasılık dağılımını belirlemek için Kolmogorov-Smirnov (KS) testi, ortalama hata karesi (OHK), Kling-Gupta etkinlik katsayısı (KGE), ortalama mutlak hata (OMH), Nash-Sutcliffe etkinlik katsayısı (NSE) ve Akaike bilgi kriteri (AIC) testleri kullanılmıştır. Sonuçlara göre, DEoptim yönteminin MLM ve MOM yöntemine kıyasla olasılık dağılım fonksiyonu parametrelerini tahmin etmede daha etkili bir yöntem olduğu görülmüştür. Son olarak, en uygun olasılık modelleri kullanılarak farklı tekerrür periyotlarında (5, 10, 20, 50, 100, 200 ve 500) meydana gelebilecek taşkın tahminleri hesaplanmış ve sonuçlar tartışılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Doğu Karadeniz Havzası, maksimum olabilirlik metodu, DEoptim, olasılık dağılımları, momentler yöntemi

#### **Comparison of Classical Methods and an Alternative Parameter Estimation Method in Flood Frequency Analysis**

**ABSTRACT:** Flood frequency analysis is very important in the design of water structures, planning and projecting of flood control. One of the important steps of flood frequency analysis is to estimate a suitable distribution model and its parameters for the data. In this study, optimization based DEoptim algorithm is proposed to estimate the parameters of probability distribution functions and is compared with the traditional maximum likelihood method (MLM) and Method of moments (MOM). Annual maximum flow data of 2 stations on the Eastern Black Sea Basin are used. Gamma, Weibull, Log-Normal, Logistic and Normal probability distributions were used to determine flood recurrences flows. To determine the most appropriate probability distribution, Kolmogorov-Smirnov (KS) test, mean square error (RMSE), Kling-Gupta efficiency coefficient (KGE), mean absolute error (MAE), Nash-Sutcliffe efficiency coefficient (NSE) and Akaike information criterion (AIC) tests were used. According to the results, it was seen that the DEoptim method is a more effective method in estimating the probability distribution function parameters compared to the MLM and MOM methods. Finally, using the most appropriate probability models, flood estimates that may occur in different recurrence periods (5, 10, 20, 50, 100, 200 and 500) were calculated and the results were discussed.

**Keywords:** Eastern Black Sea Basin, Maximum likelihood method, DEoptim, probability distributions, Method of moments

<sup>1</sup> Muhammet YILMAZ ([Orcid ID: 0000-0002-9844-6654](https://orcid.org/0000-0002-9844-6654)), Fatih TOSUNOĞLU ([Orcid ID: 0000-0002-8423-1089](https://orcid.org/0000-0002-8423-1089))  
Erzurum Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, İnşaat Mühendisliği Bölümü, Erzurum, Türkiye

<sup>2</sup> Mehmed Cüneyd DEMİREL ([Orcid ID: 0000-0003-4402-906X](https://orcid.org/0000-0003-4402-906X)), İstanbul Teknik Üniversitesi, İnşaat Mühendisliği, Bölümü, İstanbul, Türkiye

**\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Muhammet YILMAZ, muhammet.yilmaz@erzurum.edu.tr

## GİRİŞ

Taşkın olayı, dünya çapında mal ve can kaybına neden olan en tehlikeli doğal afetlerden biridir. Taşkın oluşumu ve değişkenliği birçok faktöre bağlı olduğu için karmaşık ve dinamik bir süreçtir. Son yıllarda, küresel ısınmadan kaynaklı olarak yağış yoğunluğu, sıklığı ve türü değişmiştir. Bununla birlikte şehirleşmenin beraberinde getirdiği geçirimsiz alanlardaki artış ve bitki örtüsündeki azalış taşkın olaylarını artırmaktadır. Bu iki ana faktörün sonucu olarak iklim değişikliği ve insan faaliyetlerinin birleşimi, dünyanın birçok bölgesinde taşkın olaylarında önemli değişikliklere neden olmuştur (Bai ve ark., 2016; Baykal ve Terzi, 2017).

Taşkın olayı nedeniyle meydana gelen ekonomik kayıplar, çevresel zararlar ve sosyal kırılganlık riskini tahmin etmek ve azaltmak için, taşkın debileri ile buna karşılık gelen gerçekleşme olasılığı arasındaki ilişkiyi anlamak temel bir adımdır. Taşkın koruma yapıları ve diğer su yapılarının projelendirilmesi aşamasında taşkın büyüklüğünün, zamanlamasının ve sıklığının güvenilir bir şekilde tahmin edilmesi oldukça önemlidir (Seçkin ve Topçu, 2016).

Literatürde, taşkın debilerini tahmin etmek için kullanılan en yaygın iki yöntem noktasal ve bölgesel taşkın frekans analizi teknikleridir. Noktasal taşkın frekans analizi, bir noktaya ait ölçülmüş veriler için uygun bir olasılık dağılım fonksiyonu (ODF) belirlenmesi işlemidir ve belirli bir alanın tasarım taşkın tahmininde en doğrudan yöntemdir (Rahman ve ark., 2013; Hassan ve ark., 2019). Taşkın frekans analizinin ilk adımı uygun bir ODF seçim işlemidir. Tasarım taşkın debisinin fazla tahmin edilmesi, tasarlanan yapının maliyetinde artışlara neden olabilir, az tahmin edilmesi ise yüksek sel hasarı maliyetlerine neden olabilir (Seçkin ve ark., 2011). Bununla birlikte, her taşkın frekans analizi için ortak bir ODF bulunmadığı için, en iyi dağılımın seçimi hidrologlar için hala bir problemdir (Can ve Tosunoğlu, 2013). Dünya çapında maksimum akımların olasılık modellemesini ele alan birçok çalışma vardır (Wallis ve Wood, 1985; Stedinger ve Griffis, 2008; Haddad ve Rahman, 2011; Mlynski ve ark., 2019). Ülkemizde de taşkın debilerinin tahminleri ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur. Haktanır ve ark., (1990), Türkiye akarsu havzalarında bulunan 112 adet akım gözlem istasyonuna ait en büyük debi değerlerine uyan dağılım modellerini (Gumbel, 2 ve 3 parametrelili Log-Normal, 3 parametrelili Gamma, Log-pearson tip III ve Log-Lojistik) incelemişlerdir. Bu dağılımların uygunluklarını Ki-kare ve Kolmogorov-Smirnov testleri ile kontrol etmişlerdir. Sonuç olarak incelenen istasyonlar için tek bir dağılımın önerilemeyeceğini fakat Gumbel dağılımın, Log-Pearson Tip III ve Log-Lojistik gibi dağılımlar kadar güvenilir tahminler vermediği sonucuna varmışlardır. Aşık ve ark., (2004) tarafından yapılan çalışmada Gediz havzası akarsularındaki 11 istasyonda taşkın frekans analizi için Normal, Log-Normal II, Log-Normal III, Gamma II, Log-Pearson Tip III ve Gumbel dağılımları kullanılarak modeller geliştirilmiş ve modellerin uygunlukları Kolmogorov-Smirnov uygunluk testi ile sınanmıştır. Sonuçlara göre bu istasyon verilerine Log-Pearson Tip III dağılımının en iyi uyumu gösterdiği tespit edilmiştir. Saka ve ark., (2013), çalışmada Doğu Karadeniz Havzası akarsularında bulunan 23 istasyona ait maksimum akımların frekans modellemesi için Log-Normal, Gumbel ve Log-Pearson Tip III dağılımlarını kullanmış ve bu dağılımların uygunluğunu Ki-Kare ve Kolmogorov-Smirnov testleri ile kontrol etmişlerdir. Uygunluk test sonuçlarına göre veriler için en uygun dağılımın Log-Normal olduğu sonucuna varmışlardır.

Uygun bir ODF seçildikten sonra dağılımın parametrelerinin tahmin edilmesi gerekmektedir. Uygun bir parametre tahmin yöntemi bulmak frekans analizinde önemli bir adımdır. ODF' lerin parametrelerini tahmin etmenin geleneksel yöntemleri şunlardır; 1) momentler yöntemi (MOM), 2) maksimum olasılık yöntemi (MLM), 3) minimum mesafe yöntemi (MMY) ve 4) olasılık ağırlıklı momentler (OAM). Farklı araştırmacılar, ODF' lerin parametrelerini tahmin etmek için bu yöntemlerden

birini veya kombinasyonunu uygulamıştır (Strupczewski ve ark., (2002); Opere ve ark., 2006; Heidarpour ve ark., 2017). Bir parametre tahmin yönteminin seçilmesi kullanıcıya bağlıdır. Her tahmin yönteminin kendi artıları ve eksileri vardır. Geleneksel yöntemler, kullanılan olasılık dağılım modelin fonksiyonları hakkında birkaç yaklaşım, basitleştirme veya türev bilgisi gerektirebilir ve sonuçlar yerel optimum çözümlere yakınsayabilir. Böylece, bir taşkın frekans analizi problemlerine en uygun çözümleri elde etmek için yeni optimizasyon yöntemlerini keşfetmeye ve uygulamaya daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır.

DEoptim algoritması, karmaşık matematiksel işlemlerden kaçınmak ve ayrıca mühendislik ve finans modellerine doğru çözümler sunmak için ilk olarak Storn ve Price (1997) tarafından geliştirilmiştir. DEoptim algoritması R programında mevcuttur (Mullen ve ark., 2011) ve bir çok farklı optimizasyon problemde uygulanmıştır (Borner ve ark., 2007; Cao ve ark., 2009; Mullen ve ark., 2011). Yapılan çalışmalara bakıldığı zaman, ODF' lerin parametrelerini tahmin etmek için DEoptim yönteminin uygulanmasıyla ilgili literatürde yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır. ODF' lerin parametre tahmini için klasik yöntemleri kullanmayan çok az çalışma yapılmıştır. Örneğin, Kasiviswanathan ve ark., (2017) çalışmasında dağılım parametrelerini belirlemek için genetik algoritmayı kullanmışlardır. Xu ve ark., (2018), Çin'in Hanjiang Nehrinde taşkın frekansı analizi için iki parametrelili Log-Normal dağılımını kullanmış ve dağılımın parametrelerini tahmin etmek için Metropolis-Hastings optimizasyonu (AM-HO) algoritması ile Bayesian yaklaşımını kullanmışlardır.

Bu çalışmanın amacı, taşkın frekans analizinde kullanılan ODF' lerin parametrelerinin tahmini için DEoptim ile klasik MLM ve MOM yöntemlerini karşılaştırmaktır. 'Çalışma ayrıca bootstrap metodunu kullanarak belirli bir dağılım için taşkın miktarlarındaki güven aralıklarını tahmin etmeyi amaçlamaktadır. Bunun için Doğu Karadeniz Havzası' da bulunan 2 adet akım gözlem istasyonuna ait yıllık maksimum akım verileri kullanılmıştır ve bu verilere Gamma, Weibull, Log-Normal, Logistic ve Normal uygulayarak en uygun dağılım fonksiyonu belirlenmeye çalışılmıştır. Kullanılan ODF' lerin parametrelerinin tahmini için DEoptim, MLM ve MOM yöntemi kullanılmıştır. Kolmogorov-Smirnov (KS) testi, ortalama hata karesi (OHK), Kling-Gupta etkinlik katsayısı (KGE), ortalama mutlak hata (OMH), Nash-Sutcliffe etkinlik katsayısı (NSE) ve Akaike bilgi kriteri (AIC) gibi uygunluk testleri en uygun modeli seçmek ve dağılım parametrelerinin tahmininde DEoptim, MLM ve MOM yöntemlerini karşılaştırmak için kullanılmıştır. En uygun olasılık modelleri seçildikten sonra farklı tekerrür periyotlarında (5, 10, 20, 50, 100, 200 ve 500) meydana gelebilecek taşkın debilerini hesaplanmıştır. Son olarak, geri dönüş periyotlarındaki taşkın miktarının % 95 güven aralıkları bootstrap yöntemi ile hesaplanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Parametre Tahmin Yöntemleri

ODF' nin parametrelerinin tahmini işlemi, frekans analizi ile tasarım taşkın değerinin belirlenmesinde en etkili faktörlerden biridir. Olasılık dağılımının parametrelerini tahmin etmek için bir dizi yöntem kullanılabilir. Bu çalışmada, önceki çalışmalarda en çok benimsenen yöntemlerden MLM ve MOM adlı klasik tahmin yöntemleri kullanılmıştır. Daha sonra, DEoptim yöntemi tanıtılmış ve dağılım parametrelerini tahmin etmek için kullanılmıştır.

MLM, özellikle büyük örnekli veriler için frekans analizinde kullanılan en etkili parametre tahmin yöntemlerinden biridir. Bu metot, elde bulunan gözlenmiş serinin gerçekleşmesi durumunda olabilirliği en yüksek seri değerleri elde edilmesi prensibine dayanmaktadır. Gözlenmiş her bir değer için ODF ler yazılır ve hepsi birbiriyle çarpılırsa sonuçta bu serinin olabilme ihtimali elde edilmiş olur. Birbirinden bağımsız örnek serilerden olabilme fonksiyonunu maksimum yapan parametre değerleri bu

dağılımda orjinal seriye en uygun parametreler olmaktadır. Belirli bir örneğin olabilirlik fonksiyonun maksimum yapan değerler ile logaritması alınmış olabilirlik fonksiyonun maksimum değerleri birbirinin aynısıdır. Bundan dolayı çarpımın türevini almak yerine aşağıdaki denklemde verilen toplamlar fonksiyonu olan  $Log (ODF)$ ' nin türevini almak daha uygun olur.

$$Log (ODF) = \sum_{i=1}^N f(\varepsilon_i, x_1, x_2, \dots \dots \dots x_m) \quad (1)$$

Burada,  $m$  parametresi bilinmemektedir. Eşitliğin kısmi türevi alınır ve elde edilen denklemlerin hepsi sıfıra eşitlenir. Denklemleri sıfır yapan  $m$  parametre değerleri MLM yöntemine göre aranan tahminler olur (Seçkin, 2009).

Momentler yöntemi kolay bir yöntem olduğu için hidrolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu metot da,  $Y_1 \dots \dots Y_N$  den oluşan bir örnek düşünelim bir  $a$  noktasında  $N$ . Örneğin momentini aşağıdaki gibi ifade edilebilir;

$$M_n = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (Y_i - a)^n \quad (2)$$

Denklemde  $N$  örnek sayısını gösterir. Merkezi moment dikkate alınır,  $a$  örneğin ortalama değeri ile değiştirilir. Herhangi bir dağılım (veya model) aşağıdaki gibi ifade edilen örneğe uydurulur;

$$Y_i = f(Y_{i-1}, Y_{i-2}, \dots \dots, \alpha_1, \alpha_2, \dots \dots \alpha_m) + \varepsilon_t \quad (3)$$

Burada,  $\varepsilon$  modelin hatasını gösterir,  $\alpha_1, \alpha_2, \dots \dots \alpha_m$  ise modelin parametreleridir. Model parametreleri aşağıdaki denklem ile bulunur.

$$M_n = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (Y_i - a)^n = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (f(Y_{i-1}, Y_{i-2}, \dots \dots, \alpha_1, \alpha_2, \dots \dots \alpha_m) - a)^n \quad (4)$$

$m$ , parametre sayısını ifade eder (fatih hoca makale).

Differential Evolution (DEoptim) Storn ve Price (1997) tarafından sunulan bir sezgisel arama algoritmasıdır. Karmaşık optimizasyon problemlerine güvenilir çözümler sağlamak için global bir optimizasyon algoritması olarak geliştirilmiştir (Storn ve Price, 1997). DEoptim minimizasyon problemlerinin çözümünde güçlü bir araca sahip olduğu için farklı alanlarda araştırmacılar tarafından uygulanmıştır (Borner ve ark., (2007); Cao ve ark., (2009); Jiang ve Ma (2018)). DEoptim, R istatistik yazılımında DEoptim paketi olarak mevcuttur. Bu çalışmada, DEoptim fonksiyonu her olasılık dağılım fonksiyonunun teorik ve ampirik kümülatif dağılım fonksiyonları (CDF) arasındaki hataları en aza indirmek için kullanılmıştır. Bu işlem için amaç fonksiyonu olarak NSE etkinlik kriteri kullanılmıştır. Bilindiği gibi NSE' nin değeri 1'e ne kadar yakınsa modelin doğruluğu da o kadar yüksek olur. Fakat DEoptim algoritması ise NSE değerini 0 yaklaşmasında iyi bir model elde edileceğini gösterir. Bu yüzden NSE fonksiyonunu aşağıdaki denklemdeki gibi revize edilmiştir.

$$NSE_{mutlak} = \frac{\left| \sum_{i=1}^n (q_s - q_g)^2 \right|}{\left| \sum_{i=1}^n (q_g - \bar{q}_g)^2 \right|} \quad (5)$$

Burada,  $q_g$  ve  $q_s$  olasılık dağılım fonksiyonlarının teorik ve ampirik CDF ' sini temsil eder. Sezgisel arama algoritması, amaç işlevinin en iyi değerini belirlemek için her modelde 3000 kez çalıştırılmıştır.

### Olasılık Dağılım Fonksiyonları ve Uygunluk Testleri

Bu çalışmada frekans analizinde yaygın olarak kullanılan Gamma, Weibull, Log-Normal, Logistic ve Normal dağılımları kullanılmıştır. Bu dağılımlar için CDF ler Çizelge 1 de (Tosunoğlu ve Kahya, 2020) verilmiştir. En uygun dağılımı belirlemek amacıyla Kolmogorov–Smirnov (KS) testi, ortalama hata karesi (OHK), Kling–Gupta etkinlik katsayısı (KGE), ortalama mutlak hata (OMH), Nash–Sutcliffe etkinlik katsayısı (NSE) ve Akaike bilgi kriteri (AIC) gibi uyum iyiliği kriterleri uygulanmıştır. Bu kriterler aşağıdaki denklemlerde verildiği gibi hesaplanmıştır.

$$KS = \max |Fx_i - Fx_i^*| \quad (6)$$

Burada  $Fx_i$  belirlenen olasılık dağılımına göre elde edilen CDF' yi temsil eder.  $Fx_i^*$  ise ampirik CDF dir.

$$OHK = \sqrt{OKH} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (q_g - q_s)^2} \quad (7)$$

$$OMH = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |q_g - q_s| \quad (8)$$

$$NSE = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (q_s - q_g)^2}{\sum_{i=1}^n (q_g - \bar{q}_g)^2} \quad (9)$$

$$AIC = n \log(OKH) + 2p \quad (10)$$

Burada, n veri serisinin uzunluğudur.  $q_g$  orijinal zaman serisi ve  $q_s$  ise tahmin değerleridir.  $p$  kullanılan dağılımdaki parametre sayısıdır.

$$KGE = 1 - \sqrt{(r - 1)^2 + \left(\frac{\sigma_s}{\sigma_g} - 1\right)^2 + \left(\frac{\mu_s}{\mu_g} - 1\right)^2} \quad (11)$$

Bu denklemde,  $r$  gözlem ve tahmin değerleri arasındaki lineer korelasyon değeridir.  $\sigma_g$  ve  $\sigma_s$  sırasıyla gözlem ve tahminlerin standart sapma değeridir.  $\mu_g$  ve  $\mu_s$  sırasıyla gözlem ve tahminlerin ortalama değeridir.

Olasılık dağılım fonksiyonlarının tümü için bu değerler hesaplandıktan sonra en düşük OHK, OMH, KS ve AIC değerlerine ve en yüksek NSE ve KGE değerlerine sahip model en uygun modeldir.

### Çeşitli Dönüş Periyotları İçin Yapılan Akım Tahminleri ve Bootstrap Yöntemi Kullanılarak Güven Aralıklarının Belirlenmesi

Taşkın frekans analizinin amaçlarından biri de taşkın miktarını ve belirli bir geri dönüş dönemi için belirsizliğini tahmin etmektir. Uygun dağılım seçildikten sonra, farklı geri dönüş dönemlerine ( $T$ ) karşılık gelen taşkın debi değerleri tahmin edilebilir. Belirli bir geri dönüş süresi için debi değeri, aşağıdaki denklemle basitçe elde edilebilir.

$$F = F(y_T) = 1 - \frac{1}{T} \quad (12)$$

Dağılım fonksiyonun ( $F(y_T)$ ) tersi alınarak  $y_T=y(F)$ ,  $y_T$  doğrudan elde edilebilir.

Taşkın debilerinin hesaplanmasından sonra tahminlerin güven aralıkları da değerlendirilir. Farklı görülme sıklıklarına ait taşkın debi değerlerinin güven aralığını tahmin etmek için bootstrap yöntemini kullanıldı (Davison v.d., 1986). Bootstrap yöntemi, güven aralığı hesaplama gibi parametrik olmayan tahmin problemlerinde kullanılan güvenilir ve basit bir yöntemdir.

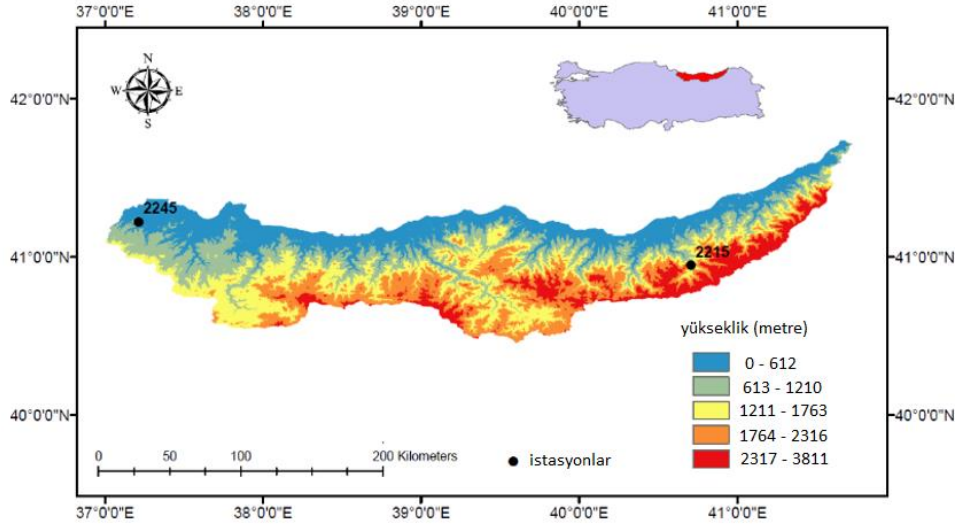
**Çizelge 1.** Kullanılan olasılık dağılım fonksiyonlarının genel tanımı (Can ve Tosunoğlu, 2013)

| Dağılım Tipi                     | Olasılık Yoğunluk Fonksiyonu  | Parametreler   |
|----------------------------------|---|--|
| Weibull (WBL)                    | $f(x) = \frac{k}{\alpha} \left(\frac{x}{\alpha}\right)^{k-1} \exp\left[-\left(\frac{x}{\alpha}\right)^k\right]$             | k = şekil parametresi (k>0)<br>α = ölçek parametresi (α>0)   |
| II Parametrelili Lognormal (LN2) | $f(x) = \frac{1}{x\sigma_y\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{1}{2\sigma_y^2}(\log x - \mu_y)^2\right]$                           | μ <sub>y</sub> = ortalama log. (μ <sub>y</sub> >0)<br>σ <sub>y</sub> = standart sapma log. (σ <sub>y</sub> >0) |
| Gamma (GAM)                      | $f(x) = \frac{x^{k-1}}{\alpha^k\Gamma(k)} \exp\left[-\frac{x}{\alpha}\right]$   | k = şekil parametresi (k>0)<br>α = ölçek parametresi (α>0)<br>Γ = gamma fonksiyonu                             |
| Normal (NORM)                    | $f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right)^2\right]$                       | μ = ortalama (konum parametresi)<br>σ = standart sapma(ölçek parametresi)<br>(σ>0)                             |
| Logistic (LOGIS)                 | $f(x) = \frac{1}{\alpha} \exp\left(\frac{x-\xi}{\alpha}\right) \left[1 + \exp\left(\frac{x-\xi}{\alpha}\right)\right]^{-2}$ | ξ = konum parametresi<br>α = ölçek parametresi (α>0)   |

## Çalışma Alanı ve Veriler

Doğu Karadeniz Havzası; Türkiye'nin kuzey doğu kıyısında bulunmaktadır. Havza güneyde Doğu Karadeniz Dağları ve kuzeyde Karadeniz ile çevrilidir. Havza alanı Gürcistan sınırından başlayıp Samsun şehrinin doğusunda Terme çayı ile son bulmaktadır. Toplam havza alanı yaklaşık olarak 24077 km<sup>2</sup>'yi kapsamaktadır (Bayazıt ve Avcı, 1997). Havza alanı bol miktarda yağış almaktadır ve Türkiye'nin dört mevsim yağış alan tek bölgesidir. Bu bölgenin çalışma alanı olarak seçilmesinin nedenleri; havzanın toprak yapısından dolayı yoğun ve ani yağışlardan sonra hızlı bir şekilde sel olayının meydana gelmesi ve havzanın keskin vadilere ve önemli su potansiyeline sahip olması nedeniyle orta ve küçük hidroelektrik potansiyeli açısından büyük avantajlara sahip olmasıdır. Havzada meydana gelen ani sel ve bunun yol açtığı enkaz can kaybı, yaralanma ve maddi zararlara neden olmaktadır. Fakat aynı zamanda havza, hidroelektrik enerji ihtiyacını sağlaması bakımından Türkiye için oldukça önemlidir. 2018 yılında Türkiye'nin hidroelektrik kurulu gücünün yaklaşık% 10'unu sağlamıştır. Son zamanlarda HES vb. birçok hidrolik yapının inşasının tamamlanmasından sonra, bölge Türkiye'nin ekonomik olarak uygulanabilir hidroelektrik enerji potansiyelinin % 18,8'ini karşılayabilecektir (Kangal ve Akçay, 2019).

Bu çalışmada Devlet Su İşleri'nin işletmiş olduğu 2 adet akım gözlem istasyonuna (AGİ) ait yıllık maksimum akım değerleri kullanılmıştır. Bölgede bu istasyonların seçilmelerinin nedeni, uzun gözlem sürelerine sahip oldukları için istatistiki açıdan inceleme yapılmasına imkan sağlamalarıdır. Çalışmada kullanılan AGİ'lerin yerleri ve çalışma alanı Şekil 1 de verilmiştir. Bu AGİ'lere ait bilgiler ise Çizelge 2'de verilmiştir.



Şekil 1. Çalışma alanı ve kullanılan istasyonlar

Çizelge 2. Çalışmada kullanılan istasyonlara ait bilgiler

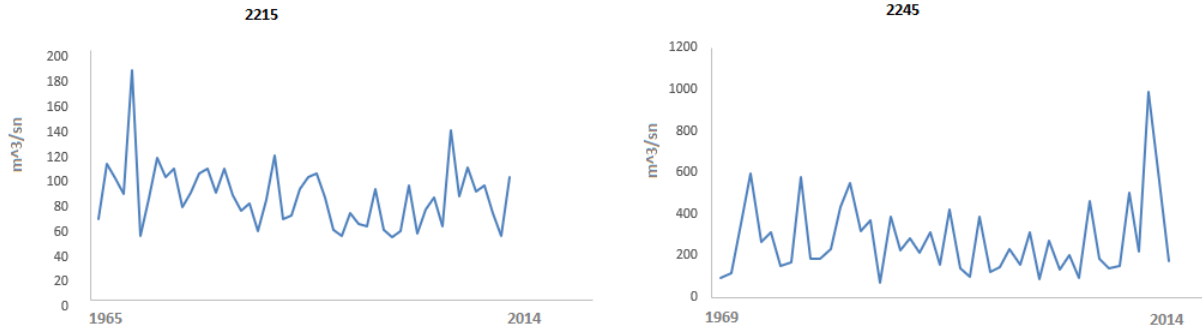
| İstasyon Adı | No   | Gözlem Aralığı (Yıl) | Yağış Alanı (km <sup>2</sup> ) | Kot (m) |
|--------------|------|----------------------|--------------------------------|---------|
| Dereköy      | 2215 | 1965-2014            | 445.2                          | 942     |
| Gökçeli      | 2245 | 1969-2014            | 232.80                         | 66.00   |

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Kullanılan istasyonların maksimum akımlarına seçilen olasılık dağılımlarını uygulamadan önce verilerin durağanlığı araştırılmalıdır. Bu amaçla verilere parametrik olmayan Mann-Kendall test uygulanmıştır ve sonuçlar Çizelge 3 de verilmiştir. Sonuçlara göre hesaplanan z değerinin mutlak değeri %5 anlam seviyesindeki kritik değer olan 1.96 dan küçük olduğundan dolayı verilerde istatistiki açıdan pozitif veya negatif trend gözlenmediği için veriler durağan kabul edilmiştir. Ayrıca veriler için çizilen zaman serileri ve korelogramlar Şekil 2 ve 3 de verilmiştir. Şekil 3 de görüldüğü gibi otokorelasyon sayıları %95 güven sınırları içinde kalmaktadır. Verilerin bağımsızlığı ve durağanlığı kanıtlandıktan sonra, zaman serilerine GAM, WBL, LN2, LOGIS ve NORM dağılımları uygulanmıştır. Dağılımın parametrelerini tahmin etmek için MLM, MOM ve DEoptim yöntemleri kullanılmıştır. Dağılımların performanslarını ve tahmin yöntemlerini karşılaştırmak için KS, OHK, KGE, OMH, NSE ve AIC testleri dikkate alınmıştır. Verilere en iyi uyan dağılımlar ve onların parametreleri ve en uygun parametre yöntemi Çizelge 4 de verilmiştir. Sonuçlara göre 2215 istasyonu için WBL dağılımı, 2245 istasyonu için LN2 dağılımı en uygun dağılımlardır. Uyum iyiliği test sonuçlarına göre, DEoptim yöntemi her iki istasyon için de olasılık dağılım fonksiyonları parametrelerini tahmin etmede MLM ve MOM yöntemlerinden daha iyi performans göstermektedir. Kullanılan 5 dağılımın her biri için hesaplanan uyum iyiliği test sonuçları Çizelge 5 de verilmiştir. Test sonuçlarına göre, GAM dağılımı 2215 istasyonu için MLM ve MOM yöntemlerine göre en iyi dağılımdır. Fakat DEoptim yöntemine göre ise WBL dağılımı en iyi dağılım olarak gözükmektedir. DEoptim yöntem MLM ve MOM yöntemlerine göre daha iyi test değerleri ile üstün sonuçlar sağladığından dolayı bu istasyon için en iyi dağılım WBL dağılımı seçilmiştir. 2245 istasyonunda ise her üç tahmin yöntemine göre de en iyi dağılım LN2 seçilmiştir. Fakat, Çizelge 5 de görüleceği üzere DEoptim yöntemi daha iyi test değerleri göstermiştir. Parametre tahmin yöntemlerinin performansının görsel olarak değerlendirilmesi için teorik kümülatif dağılım fonksiyonlarının ampirik olanlarla karşılaştırılmasını gösteren Olasılık-Olasılık (P-P) grafikleri



kullanılmıştır (Şekil 4). DEoptim yöntemi tahminlerinin, MLM ve MOM yöntemlerinden daha iyi bir uyum sağladığı görülmektedir.



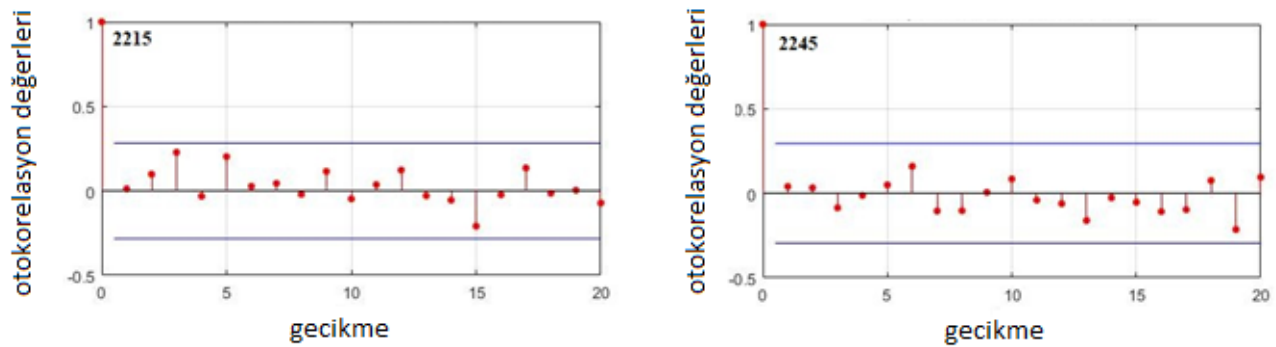
Şekil 2 Kullanılan istasyonlar için zaman serileri

Çizelge 3. Çalışmada kullanılan veriler için Mann Kendall test sonuçları

| No   | MK Test İstatistiği | Z değeri | Trend |
|------|---------------------|----------|-------|
| 2215 | -216                | -1.80    | –     |
| 2245 | -36                 | -0.33    | –     |

Çizelge 4 Verilere uyan en iyi dağılımlar ve tahmin yöntemi

| No   | En iyi dağılım                                | En iyi tahmin yöntemi |
|------|---|-----------------------|
| 2215 | WBL<br>$\alpha = 89.73079$ $k = 3.915$        | DEoptim               |
| 2245 | LN2<br>$\mu_y = 4.38353$ $\sigma_y = 0.30439$ | DEoptim               |



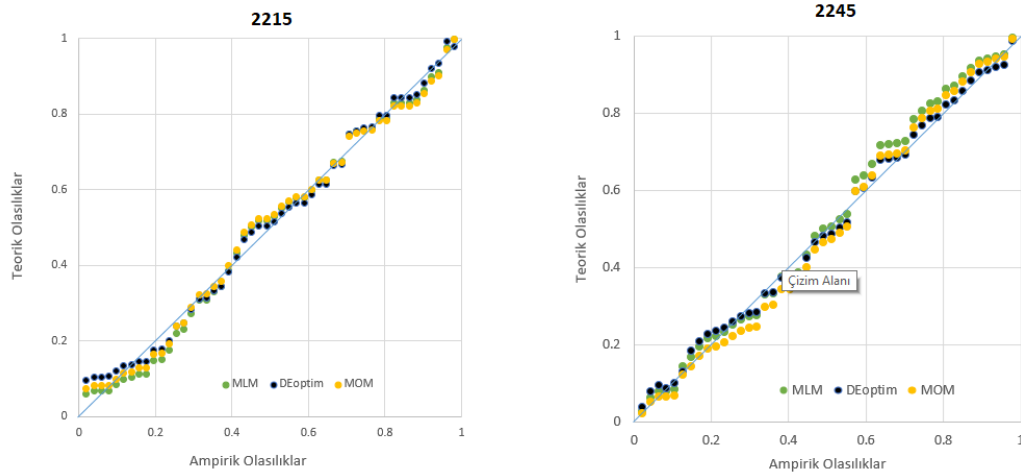
Şekil 3. İstasyonlara ait otokorelasyon değerleri

En iyi olasılık dağılımının seçilmesinden sonra, taşkın frekansı analizinin ana amaçlarından biri, hidrolojik uygulamada çeşitli tekerrür aralıkları için taşkın miktarlarını tahmin etmektir. Bu çalışmada, sırasıyla 0,2, 0,1, 0,05, 0,02, 0,01, 0,005 ve 0,002 olasılık düzeyine eşit olan 5, 10, 20, 50, 100, 200 ve 500 yıllık geri dönüş dönemleri için taşkın debileri hesaplanmış ve Çizelge 6' da verilmiştir. Özellikle daha yüksek geri dönüş dönemleri için, taşkın miktarının güven aralığı, yapıların yönetimi, planlaması ve tasarımında önemli bilgiler sağlayabilir. Çalışma da güven aralıklarını elde etmek için bootstrap yöntemi kullanılmıştır. Her bir geri dönüş periyodu için hesaplanan güven aralıkları Çizelge 6 'da

sunulmuştur. DEoptim yaklaşımı geleneksel MLM ve MOM dan daha üstün performans gösterdiğinden, taşkın miktarları ve güven aralıkları, yalnızca DEoptim tarafından belirlenen dağılımlar için hesaplanmıştır. Örneğin tasarımcılar veya mühendisler, 2215 istasyonu için 100 yıllık geri dönüş süresine karşılık gelen taşkın miktarı ile ilgilenebilirler. Bu miktar WBL dağılımı kullanılarak 132.54 m<sup>3</sup>/s olarak tahmin edilmiştir. Bootstrap yöntemine göre ise %95 güven aralıkları 120.79 – 144.66 olarak hesaplanmıştır.

**Çizelge 5.** Kullanılan istasyonlar için model seçim kriter sonuçları

| <b>MLM</b>     |      |          |          |          |          |          |
|----------------|------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <b>2215</b>    |      | GAM      | WBL      | LN2      | LOGIS    | NORM     |
|                | KS   | 0.066    | 0.104    | 0.072    | 0.065    | 0.072    |
|                | RMSE | 0.031    | 0.043    | 0.036    | 0.031    | 0.035    |
|                | KGE  | 0.975    | 0.887    | 0.961    | 0.968    | 0.950    |
|                | MAE  | 0.026    | 0.034    | 0.030    | 0.026    | 0.031    |
|                | NSE  | 0.988    | 0.977    | 0.984    | 0.988    | 0.985    |
|                | AIC  | -147.243 | -132.318 | -140.373 | -146.250 | -141.471 |
| <b>MOM</b>     |      |          |          |          |          |          |
| <b>2215</b>    |      | GAM      | WBL      | LN2      | LOGIS    | NORM     |
|                | KS   | 0.057    | 0.288    | 0.071    | 0.069    | 0.072    |
|                | RMSE | 0.029    | 0.167    | 0.034    | 0.037    | 0.035    |
|                | KGE  | 0.988    | 0.562    | 0.981    | 0.958    | 0.950    |
|                | MAE  | 0.024    | 0.150    | 0.028    | 0.031    | 0.031    |
|                | NSE  | 0.989    | 0.650    | 0.985    | 0.983    | 0.985    |
|                | AIC  | -149.504 | -73.629  | -142.524 | -139.622 | -141.471 |
| <b>DEoptim</b> |      |          |          |          |          |          |
| <b>2215</b>    |      | GAM      | WBL      | LN2      | LOGIS    | NORM     |
|                | KS   | 0.056    | 0.077    | 0.063    | 0.081    | 0.073    |
|                | RMSE | 0.029    | 0.026    | 0.033    | 0.028    | 0.027    |
|                | KGE  | 0.989    | 0.991    | 0.987    | 0.987    | 0.990    |
|                | MAE  | 0.024    | 0.021    | 0.026    | 0.023    | 0.022    |
|                | NSE  | 0.989    | 0.991    | 0.987    | 0.990    | 0.991    |
|                | AIC  | -149.531 | -154.001 | -144.523 | -150.810 | -153.644 |
| <b>MLM</b>     |      |          |          |          |          |          |
| <b>2245</b>    |      | GAM      | WBL      | LN2      | LOGIS    | NORM     |
|                | KS   | 0.120    | 0.096    | 0.077    | 0.161    | 0.148    |
|                | RMSE | 0.058    | 0.045    | 0.034    | 0.080    | 0.076    |
|                | KGE  | 0.914    | 0.960    | 0.935    | 0.914    | 0.918    |
|                | MAE  | 0.045    | 0.038    | 0.028    | 0.066    | 0.065    |
|                | NSE  | 0.957    | 0.974    | 0.986    | 0.919    | 0.927    |
|                | AIC  | -109.550 | -119.481 | -131.417 | -96.840  | -98.916  |
| <b>MOM</b>     |      |          |          |          |          |          |
| <b>2245</b>    |      | GAM      | WBL      | LN2      | LOGIS    | NORM     |
|                | KS   | 0.112    | 0.094    | 0.074    | 0.161    | 0.148    |
|                | RMSE | 0.055    | 0.045    | 0.035    | 0.080    | 0.076    |
|                | KGE  | 0.919    | 0.955    | 0.930    | 0.914    | 0.918    |
|                | MAE  | 0.046    | 0.038    | 0.029    | 0.066    | 0.065    |
|                | NSE  | 0.962    | 0.974    | 0.985    | 0.919    | 0.927    |
|                | AIC  | -111.754 | -119.763 | -130.026 | -96.840  | -98.916  |
| <b>DEoptim</b> |      |          |          |          |          |          |
| <b>2245</b>    |      | GAM      | WBL      | LN2      | LOGIS    | NORM     |
|                | KS   | 0.062    | 0.080    | 0.045    | 0.117    | 0.113    |
|                | RMSE | 0.031    | 0.038    | 0.023    | 0.056    | 0.057    |
|                | KGE  | 0.984    | 0.974    | 0.988    | 0.966    | 0.966    |
|                | MAE  | 0.027    | 0.033    | 0.019    | 0.049    | 0.050    |
|                | NSE  | 0.988    | 0.982    | 0.994    | 0.961    | 0.960    |
|                | AIC  | -134.351 | -126.575 | -147.441 | -111.186 | -110.646 |



Şekil 4. 2215 ve 2245 istasyonları için Olasılık-Olasılık (P-P) grafikleri

Çizelge 6. En iyi parametrelili dağılımlar için taşkın tahmin miktarları ve %95 güven aralıkları

| No   | Dağılım | İstatistik | Dönüş Periyodu (Yıl) |               |               |               |                |                |                |
|------|---------|------------|----------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
|      |         |            | 5                    | 10            | 20            | 50            | 100            | 200            | 500            |
| 2215 | WBL     | Alt        | 94.50                | 102.99        | 109.71        | 116.56        | 120.79         | 124.51         | 129.08         |
|      |         | Fit        | <b>101.33</b>        | <b>111.04</b> | <b>118.76</b> | <b>127.13</b> | <b>132.54</b>  | <b>137.37</b>  | <b>143.09</b>  |
|      |         | Üst        | 108.14               | 118.86        | 128.14        | 138.05        | 144.66         | 150.60         | 157.84         |
| 2245 | LN2     | Alt        | 318.45               | 414.59        | 508.90        | 638.25        | 742.67         | 848.06         | 1002.68        |
|      |         | Fit        | <b>400.85</b>        | <b>538.31</b> | <b>686.72</b> | <b>903.24</b> | <b>1084.30</b> | <b>1281.64</b> | <b>1569.53</b> |
|      |         | Üst        | 498.09               | 687.07        | 901.40        | 1233.26       | 1505.49        | 1843.87        | 2322.04        |

## SONUÇ

Bu çalışma, Doğu Karadeniz Havzası'ndaki iki akım gözlem istasyonuna ait yıllık maksimum akım değerlerini kullanarak taşkın frekansı analizi için uygun bir olasılık dağılımı ve parametre tahmin yönteminin seçimini sunmaktadır. En uygun olasılık dağılım modelini ve parametre tahmin prosedürünü belirlemek için yaygın olarak kullanılan altı model seçim kriteri (KS, OHK, KGE, OMH, NSE ve AIC) kullanılmıştır. Çalışmada taşkın frekans analizi GAM, WBL, LN2, LOGIS ve NORM, dağılımları kullanılarak yapılmıştır. DEoptim yöntemi kullanılan dağılımların parametrelerini tahmin etmek için kullanılmış ve klasik MLM ve MOM yöntemleri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca taşkın miktarlarının güven aralıklarının belirlenmesi için DEoptim yöntemi ile belirlenen en iyi dağılımlar kullanılmıştır. Çeşitli uyum iyiliği kriterleri değerlendirildikten sonra sonuçlar, DEoptim yönteminin klasik MLM ve MOM'dan daha iyi performansa sahip olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, önerilen yaklaşımla daha doğru taşkın frekans modelleri ve taşkın tahminleri elde edilebilir. Ek olarak, 2215 istasyonu için en iyi dağılımının WBL, 2245 istasyonu için ise en iyi dağılımın LN2 olduğu sonucuna varılabilir. Bu çalışmanın taşkın frekans analizinde kullanılacak yeni bir parametre tahmin yöntemi ve gelecekteki çalışmalar için bazı önemli çıkarımlar sağladığı düşünülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Çalışmada kullanılan akış verilerini sağlayan Devlet Su İşleri Genel Müdürlüğü'ne içtenlikle teşekkür ederiz. DEoptim kodu <https://cran.r-project.org/web/packages/DEoptim/> adresinde mevcuttur.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Aşık Ş, Akkuzu, E, Karataş BS, 2004. Gediz Havzası Akarsuları Yıllık Toplam Akımlarına En Uygun Olasılık Dağılım Modelinin Belirlenmesi. Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg, 41 (3):177-184.
- Bai P, Liu X, Liang K, Liu C, 2016. Investigation of changes in the annual maximum flood in the Yellow River basin, China. Quaternary International, 392: 168-177
- Bayazit M, Avcı I. 1997. Water Resources of Turkey: Potential, Planning, Development and Management. Water Resources Development, 13(4): 443-452.
- Baykal T, Terzi Ö, 2017. Küçük Aksu Çayı Taşkın Frekans Analizi. Cumhuriyet Sci. J, 38(4): 639-646
- Börner J, Higgins SI, Kantelhardt J, Scheiter S, 2007. Rainfall or price variability: What determines rangeland management decisions? A simulation-optimization approach to South African savannas. Agricultural Economics, 37(2-3): 189-200.
- Can I, Tosunoğlu F, 2013. Estimating T-year flood confidence intervals of rivers in Coruh basin, Turkey. Journal of Flood Risk Management, 6(3): 186-196.
- Cao R, Vilar JM, Devia A, 2009. Modelling consumer credit risk via survival analysis. Sort-Statistics and Operations Research Transactions, 33(1): 3-30.
- Davison AC, Hinkley DV, Schechtman E, 1986. Efficient Bootstrap Simulation. Biometrika, 73(3), 555-566.
- Rahman AS, Rahman A, Zaman MA, Haddad K, Ahsan A, Imteaz M, 2013. A study on selection of probability distributions for at-site flood frequency analysis in Australia. Natural Hazards, 69(3): 1803-1813.
- Haktanir T, Özcan Z, Çapar ÖF, 1990. Türkiye akarsularının taşkın pikleri frekans analizi . Su Mühendisliği Problemleri Kongresi, 1-4 Ocak 1990, Antalya.
- Hassan MU, Hayat O, Noreen Z, 2019. Selecting the best probability distribution for at-site flood frequency analysis; a study of Torne River. Sn Applied Sciences, 1(12).
- Heidarpour B, Saghafian B, Yazdi J, Azamathulla HM, 2017. Effect of Extraordinary Large Floods on at-site Flood Frequency. Water Resources Management, 31(13): 4187-4205.
- Hu L, Nikolopoulos EI, Marra F, Anagnostou EN, 2020. Sensitivity of flood frequency analysis to data record, statistical model, and parameter estimation methods: An evaluation over the contiguous United States. Journal of Flood Risk Management, 13(1).
- Jiang ZH, MA WC, 2018. Integrating Differential Evolution Optimization to Cognitive Diagnostic Model Estimation. Frontiers in Psychology, 9.
- Kankal M, Akçay F, 2019. Doğu Karadeniz Havzasi Hidroelektrik Enerji Durumunun İncelenmesi. Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 8(2): 892-901.
- Kasiviswanathan KS, HE, JX, TAY JH, 2017. Flood frequency analysis using multi-objective optimization based interval estimation approach. Journal of Hydrology, 545: 251-262.
- Mlynski D, Walega A, Stachura T, Kaczor G, 2019. A New Empirical Approach to Calculating Flood Frequency in Ungauged Catchments: A Case Study of the Upper Vistula Basin, Poland. Water, 11(3).
- Mullen KM, Ardia D, Gil DL, Windover D, Cline J, 2011. DEoptim: An R Package for Global Optimization by Differential Evolution. Journal of Statistical Software, 40(6): 1-26.
- Opere AO, Mkhanda S, Willems P, 2006. At site flood frequency analysis for the Nile Equatorial basins. Physics and Chemistry of the Earth, 31(15-16): 919-927.

- Haddad K, Rahman A, 2011. Selection of the best fit flood frequency distribution and parameter estimation procedure: a case study for Tasmania in Australia. *Stochastic Environmental Research and Risk Assessment*, 25(3): 415-428.
- Saka F, Yüksek Ö, Yıldırım MS, Baş K, Anılan T, Kaplan H, 2013. Yıllık Maksimum Akımların Bazı Olasılık Dağılımlarına Uygunluğunun Ki-Kare Ve Kolmogorov-Smirnov Testleriyle Belirlenmesi. *Taşkın ve Heyelan Kongresi*, 24-26 Ekim 2013, Trabzon.
- Seçkin N, 2009. L-Momentlere Dayalı Gösterge-Sel Metodu ile Bölgesel Taşkın Frekans Analizi. *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi (Basılmış)*.
- Seckin N, Haktanır T, and Yurtal R, 2011. Flood frequency analysis of Turkey using L-moments method. *Hydrological Processes*, 25(22): 3499-3505.
- Seckin N, Topçu E, 2016. Adana ve çevre illerde gözlenen yıllık maksimum yağışların bölgesel frekans analizi. *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University* 31(4): 1049-1062
- Stedinger JR, Griffis, VW, 2008. Flood frequency analysis in the United States: Time to update. *Journal of Hydrologic Engineering*, 13(4): 199-204.
- Storn R, Price K, 1997. Differential evolution - A simple and efficient heuristic for global optimization over continuous spaces. *Journal of Global Optimization*, 11(4): 341-359.
- Strupczewski WG, Singh VP, Weglarczyk S, 2002. Asymptotic bias of estimation methods caused by the assumption of false probability distribution. *Journal of Hydrology*, 258(1-4): 122-148.
- Tosunoğlu F, Kahya E, 2020. Definition of the best probability distribution functions for annual minimum flows in the rivers of the Upper Euphrates River Basin, Turkey. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*.
- Wallis JR, Wood EF, 1985. Relative Accuracy of Log Pearson-Iii Procedures. *Journal of Hydraulic Engineering-Asce*, 111(7): 1043-1056.
- Xu WT, Jiang C, Yan L, Li L, Liu S, 2018. An Adaptive Metropolis-Hastings Optimization Algorithm of Bayesian Estimation in Non-Stationary Flood Frequency Analysis. *Water Resources Management*, 32(4): 1343-1366.

**To Cite:** Karaaslan C, Yener E, 2021. The Effect of Alkaline Activator Components on the Properties of Fly Ash Added Pumice Based Geopolymer. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1255-1269.

## **The Effect of Alkaline Activator Components on the Properties of Fly Ash Added Pumice Based Geopolymer**

Cemal KARAASLAN<sup>1, 2\*</sup>, Engin YENER<sup>3</sup>

**ABSTRACT:** The effect of sodium hydroxide (SH) concentration and sodium silicate (SS) content in alkali activator on mechanical properties and wet-dry resistance of fly ash added pumice based geopolymer paste were investigated. In the study, the concentration of SH was used as 8, 10, 12 and 14 molar, while the weight ratio of SS to SH was used as 0, 1, 2 and 3. While the density of geopolymer paste samples increased significantly with the increase of SH molarity in mixtures with low SS content, it was less affected by SH molarity in mixtures with high SS content. For all SH molarity values, the compressive strength of the geopolymer paste samples increased with the increase of the SS/SH ratio, while a slight decrease was observed with the SS/SH ratio increasing from 2 to 3. However, with the increase of the SH molarity, the compressive strength of the samples was less affected by the SS content. As large cracks or splits occur in paste samples activated only with SH under the effect of wet-dry, their compressive strength could not be measured. The wet-dry performance of the paste samples activated with SS + SH was not affected much by the SH molarity and the SS/SH ratio and were close to each other. When looking at the microstructure studies, FTIR analyzes show that SS content provides a better geopolymerization, and SEM images show that micro-cracks relatively decrease with SS content.

**Keywords:** Geopolymer materials, durability, pumice, natural pozzolan, green concrete

<sup>1</sup> Cemal KARAASLAN ([Orcid ID: 0000-0002-8993-7566](https://orcid.org/0000-0002-8993-7566)), İğdir University, Vocational School of Technical Sciences, İğdir, Turkey,

<sup>2</sup> Dicle University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Diyarbakır, Turkey

<sup>3</sup> Engin YENER ([Orcid ID: 0000-0002-0286-2435](https://orcid.org/0000-0002-0286-2435)), İğdir University, Faculty of Engineering, Department of Civil Engineering İğdir, Turkey

**\*Corresponding Author:** Cemal KARAASLAN, e-mail: cemal.karaaslan@igdir.edu.tr

This study was produced from Cemal KARAASLAN's PhD thesis.

## INTRODUCTION

The search for alternative binders has arisen due to the consumption of a lot of energy in the production of Portland cement (PC), which is one of the main components of concrete used as a building material, and excessive CO<sub>2</sub> emission to the nature as a result of these processes (Singh et al., 2015). Geopolymers (GP), one of the important alternatives to Portland cement, are obtained by activating powder binders with high Si and Al content with alkali hydroxide and alkaline silicate solutions (Atiş et al., 2015). Aluminosilicate sources such as fly ash, slag and metakaolin are generally used as powder binders (Duxson et al., 2007). Geopolymers produced with the specified powder binders and hot cured have excellent properties such as early high strength, low shrinkage, high freeze-thaw resistance and sulphate resistance (Davidovits, 1994).

Recently, the use of natural pozzolan (NP) as a powder binder in geopolymer production has increased significantly (Bondar et al., 2011c; Yadollahi et al., 2015; Haddad and Alshbuol, 2016; Vafaei and Allahverdi, 2016; Djobo et al., 2017; Kantarcı et al., 2019). While these studies show that natural pozzolan can be used as aluminosilicate sources in geopolymers, they also show that new studies should be done. It is emphasized that although the mechanical properties of NP based geopolymers have been investigated, their durability has not been studied much (Duxson et al., 2007; Djobo et al., 2016b, 2017; Firdous et al., 2018). In addition, decarbonization, which aims to reduce coal burning processes, limits the production of fly ash obtained by burning coal, increasing the importance of using NP that do not require any additional treatment (Firdous et al., 2018). The use of pumice, which is one of the NP, as a source material in geopolymer production is being investigated (Allahverdi et al., 2008; Kani et al., 2012; Yadollahi et al., 2014; Yadollahi et al., 2015; Safari et al., 2020).

In addition to all these, since NP has low reactivity, the mechanical properties and durability of natural pozzolan based GP binders are not as good as artificial pozzolan based GP binders (Djobo et al., 2017). Different methods are tried to increase the reactivity of NP based geopolymer binders. Aluminosilicate source calcining in NaOH environment, calcination at 700-900 °C and mechanical activation methods performed by extending the grinding time are some of these (Bondar et al., 2011b; Tchakoute et al., 2013; Djobo et al., 2016a). One of the effective methods that improves the strength and durability of NP based geopolymer binders by increasing their reactivity is the method of substituting another powder binder with high reactivity to NP (Bondar et al., 2011a; Kouamo et al., 2012; Risdanareni et al., 2016; Vafaei and Allahverdi, 2016). Within the scope of this study, fly ash added pumice based geopolymer (FAPGP) binder were produced by replacing fly ash with 25% pumice.

One of the most important parameters affecting GP binder properties is alkali activator type and content (Palomo et al., 1999). The alkaline activator is usually obtained from a combination of NaOH or KOH and Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> or K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> solutions (Palomo et al., 1999; Hardjito and Rangan, 2005). In order to investigate the effect of alkali activator on FAPGP binder properties, the activator was prepared by mixing NaOH solution with different molarities with Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> solution in different proportions. FAPGP paste samples were produced with these alkaline activators and their physical properties, compressive strength and wet-dry performance were determined. In addition, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Scanning Electron Microscopy (SEM) analyzes were carried out to learn about the microstructure of the binder.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

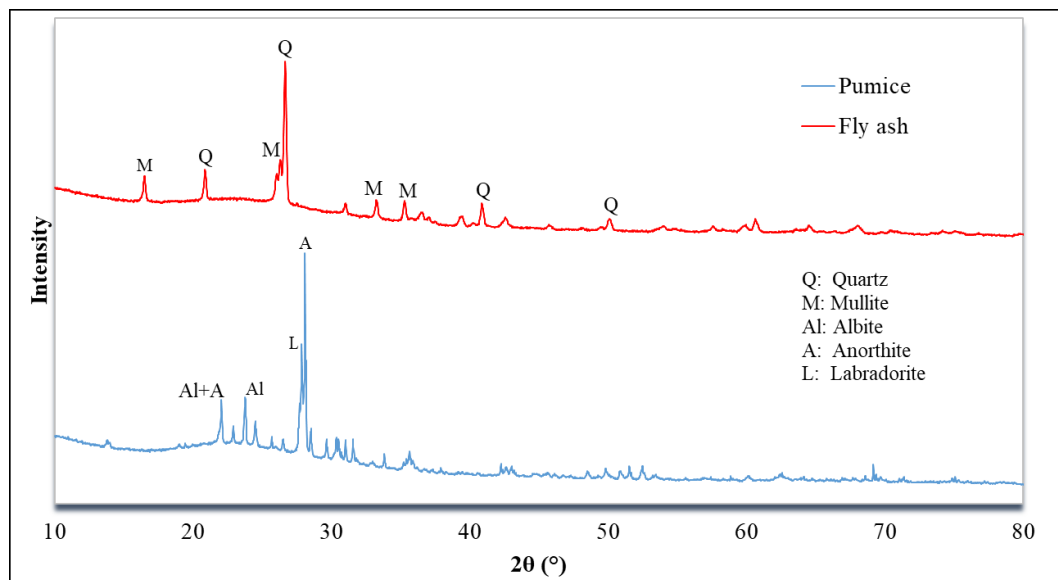
Pumice used as a powder binder was obtained from Ağrı Mountain, Turkey. This pumice is used by local companies in the production of pumice briquettes. Coarse-grained pumice obtained from the

quarry was ground in a ball mill in order to increase its reactivity. Fly ash substituted for pumice was obtained from Çatalağzı Thermal Power Plant in Zonguldak, Turkey. When class C fly ash with high calcium (Ca) content, are used as the aluminosilicate source in GP binders, Ca can interfere with the geopolymerization process and disrupt the microstructure, so class F fly ash with low Ca content was used (Temuujin et al., 2009). The chemical contents of pumice and fly ash obtained by X-Ray Fluorescence (XRF) method are given in Table 1.

**Table 1.** Chemical composition of aluminosilicate sources

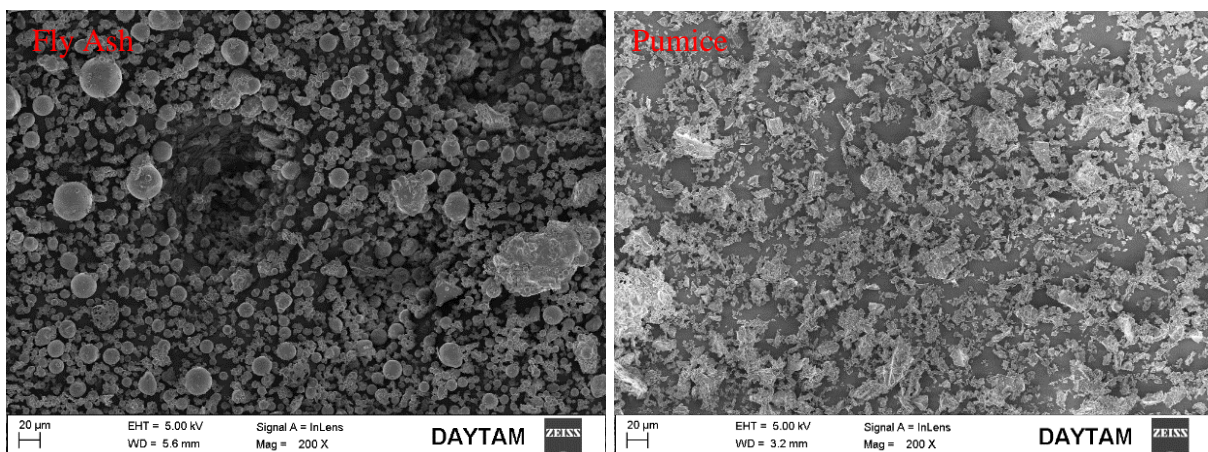
|         | CaO  | SiO <sub>2</sub> | Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | MgO  | Na <sub>2</sub> O | K <sub>2</sub> O | SO <sub>3</sub> | LOSS |
|---------|------|------------------|--------------------------------|--------------------------------|------|-------------------|------------------|-----------------|------|
| Pumice  | 3.56 | 67.49            | 13.07                          | 3.98                           | 0.69 | 2.63              | 2.36             | 0.18            | 3.69 |
| Fly Ash | 2.46 | 55.51            | 23.09                          | 6.64                           | 1.58 | 0.14              | 3.56             | 0.24            | 1.63 |

In Figure 1, X-Ray Diffraction (XRD) method analyzes of pumice and fly ash used in this study are given.



**Figure 1.** XRD analysis of pumice and fly ash

SEM images of powder binders used in this study show that fly ash has a spherical shape and the ground pumice has an irregular shape and angular structure (Figure 2). This suggests that in GP binders produced with pumice, the amount of alkaline activator required to wet the surface area of the powder binder will be higher.



**Figure 2.** SEM images of powder binders



In the production of the geopolymer binder, NaOH (Sodium Hydroxide: SH) and Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> (Sodium Silicate: SS) were used as alkali activators. Some physical and chemical properties of alkali activators are given in Table 2. Distilled water was used in the preparation of SH solution to eliminate possible side effects of impurities. (Hardjito et al., 2004).

**Table 2.** Some physical and chemical properties of alkaline activators

|                              | SH (solid) | SS (liquid)                         |
|------------------------------|------------|-------------------------------------|
| Molecular formula            | NaOH       | Na <sub>2</sub> O.2SiO <sub>2</sub> |
| Molecular mass (g/mol)       | 40.01      | 182.15                              |
| Color                        | White      | Gel (Colorless)                     |
| Density (g/cm <sup>3</sup> ) | 2.13       | 1.39                                |
| Na <sub>2</sub> O (%)        | -          | 12.00                               |
| SiO <sub>2</sub> (%)         | -          | 24.50                               |
| H <sub>2</sub> O (%)         | -          | 63.50                               |

## Methods

### Preparation of the ingredients for the mixture

The fly ash and the ground pumice were kept in the oven at 105 °C for 24 hours before mixing the GP paste. Solid SH particles in flake form were gradually added to distilled water to prevent overheating of the prepared solution. The values presented by Hardjito and Rangan (2005) were used in the preparation of SH solutions with different concentration values (Hardjito and Rangan, 2005). Accordingly, 262 grams of solid NaOH particles were used in the preparation of 1 kg of 8 M SH solution. And in the preparation of 1 kg of 10 M, 12 M and 14 M SH solutions, 314, 361 and 404 grams of solid NaOH particles were used, respectively. The SH solution, which was prepared by completing the mixing process, was mixed with the SS solution after waiting for 24 hours. SS-SH mixture was used after waiting for 24 hours in order for the two solutions to be completely dissolved in each other (Davidovits, 2002; Hardjito and Rangan, 2005).

### Mixture proportions

In the study with 16 mixtures, four different molarity values (8 M, 10 M, 12 M and 14 M) were used for the SH solution. The ratio by weight of the SS solution to the SH solution (SS/SH) was determined as four different values (0, 1, 2 and 3). Fly ash has been replaced by 25% of pumice by weight. The ratio by weight of alkali activator to the total powder binder consisting of P and FA was determined as 0.45. The table showing the amount of use of all the ingredients in the mixture and the naming accordingly is given below (Table 3). The first digit used in naming the mixtures shown in Table 3 indicates the molarity of the SH solution, and the second digit indicates the weight ratio of the SS solution to the SH solution.

### Mixing, placing and curing

The mixing process was started by mixing FA and P solids. Powder binders were mixed in the mixer for 5 minutes to ensure their homogeneous distribution. At the end of this period, the previously prepared SS + SH solution mixture was slowly added to the powder binder mixture and the mixing process was continued for another 5 minutes by mixing manually.

The prepared fresh GP paste mixtures were cast into 20x20x20 mm plastic cube molds. The samples placed in the mold were dropped 240 times on the jolting table to remove the entrapped air.

During curing, the molds are wrapped with stretch film to prevent evaporation of the alkaline activator in the mixture (Hardjito et al., 2004).

The prepared samples were left in the oven at 65 ° C without waiting. The samples were stored in the oven for 48 hours. At the end of this period, the samples were taken out of the oven, removed from the mold and kept in laboratory conditions until the testing day.

**Table 3.** Mixture proportions of samples

| Mix name | SH (g) | SS (g) | FA (g) | Pumice (g) |
|----------|--------|--------|--------|------------|
| 8-0      | 54     | 0      |        |            |
| 8-1      | 27     | 27     |        |            |
| 8-2      | 18     | 36     | 30     | 90         |
| 8-3      | 13.5   | 40.5   |        |            |
| 10-0     | 54     | 0      |        |            |
| 10-1     | 27     | 27     |        |            |
| 10-2     | 18     | 36     | 30     | 90         |
| 10-3     | 13.5   | 40.5   |        |            |
| 12-0     | 54     | 0      |        |            |
| 12-1     | 27     | 27     |        |            |
| 12-2     | 18     | 36     | 30     | 90         |
| 12-3     | 13.5   | 40.5   |        |            |
| 14-0     | 54     | 0      |        |            |
| 14-1     | 27     | 27     |        |            |
| 14-2     | 18     | 36     | 30     | 90         |
| 14-3     | 13.5   | 40.5   |        |            |

### Testing methods

In order to determine the water absorption and density of the geopolymer paste samples, on the 28th day, the weight of three cubic samples from each mixture was measured as A. The samples were then soaked in water for 24 hours and weighed in water as B. Finally, the saturated surface dry weight was measured in air as C. Water content values, as percentages, were calculated by Equation 1. Density values are calculated by Equation 2.

$$\text{Water absorption} = ((C-A) A^{-1}) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Density} = (A (C-B)^{-1}). \quad (2)$$

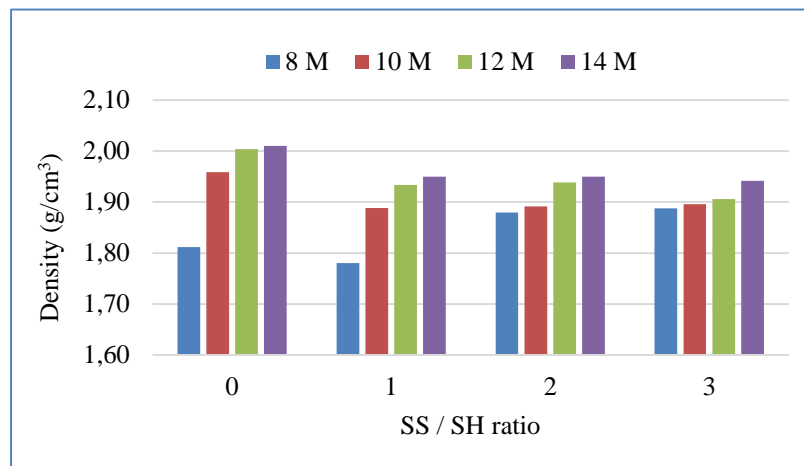
The 28-day compressive strength of the geopolymer paste samples was determined according to TS EN 12390-3 (EN). 28-day samples were used to determine the wet-dry performance. After the samples were left in tap water for 24 hours, they were removed from the water and allowed to dry in 48 hours under laboratory conditions. This 72-hour period was considered as 1 cycle. At the end of the 5th cycle, the compressive strength of the samples was determined. While the effect of wet-dry was investigated in some studies, samples were allowed to dry by keeping them in the oven at different temperatures after 24 hours of water soaking. (Slavik et al., 2008; Lemougna et al., 2014; Djobo et al., 2016b; Firdous et al., 2018). However, since it was thought that the temperature would create a new curing effect on the samples and thus, the GP binder would not show the real wet-dry behavior, it was preferred to allow it to dry for 48 hours at room temperature. The percentage loss in compressive strength after wet-dry cycles indicates its wet-dry performance. The average of 3 samples for each test was taken into account.

FTIR tests were carried out, in order to examine the effect of alkali activator to the structural changes and reaction products of FAPGP paste samples. Agilent Cary 630 model spectrometer device (650-4000  $\text{cm}^{-1}$ ) was used for FTIR analysis. The morphology and phase composition of FAPGP paste samples were scanned by SEM-EDS (Zeiss Sigma 300).

## RESULTS AND DISCUSSION

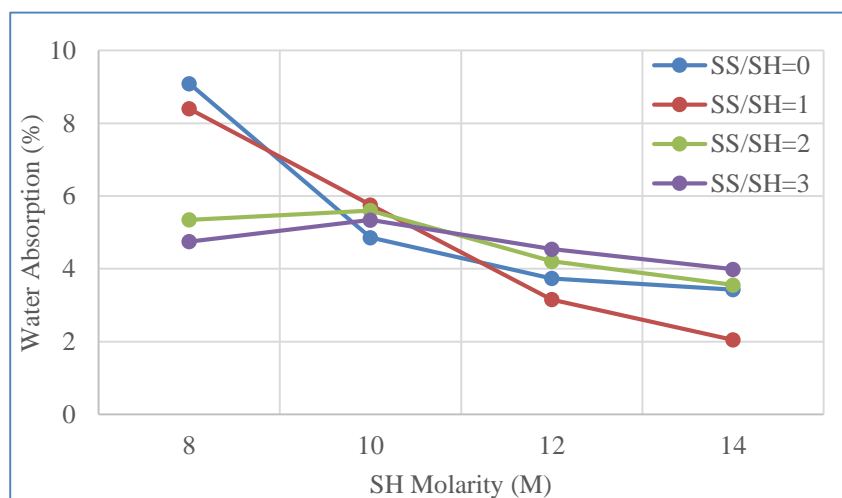
### Physical Properties of FAPGP Samples

Experimental results show that the density of FAPGP paste samples varies between 1.78-2.01  $\text{g}/\text{cm}^3$ . The change in density depending on the SS/SH ratio and the SH molarity is given in Figure 3.



**Figure 3.** Density of the samples prepared with different concentrations of SH depending on the SS/SH ratio.

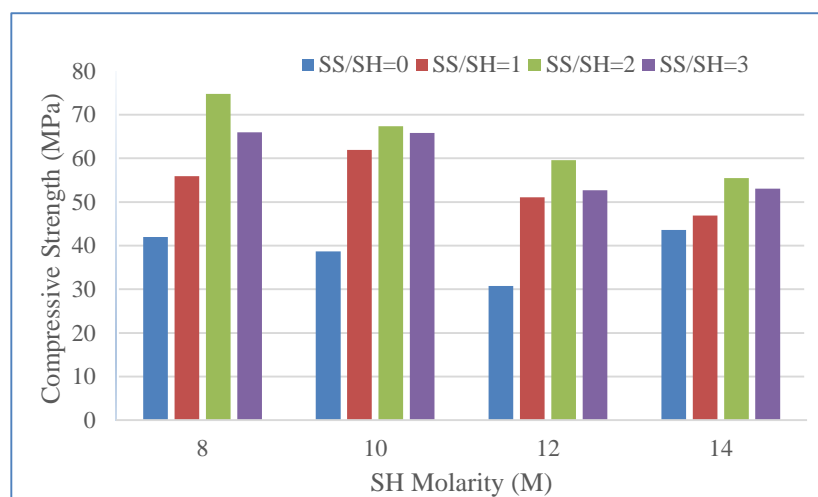
As can be easily seen from the Figure 3, the sample density increased with the increase of SH molarity for each SS/SH ratio. However, as the SS/SH ratio increases, the effect of SH molarity on density decreases. The probable reason for this is that the SH content in the alkali activator decreases with the increase in the SS/SH ratio, and thus the effect of the SH concentration is limited. Considering the water absorption of FAPGP paste samples, it is seen that the water absorption generally decreases with increasing molarity for a fixed SS/SH value (Figure 4). However, as can be seen in Figure 4, the water absorption of mixtures with low SS content (SS/SH = 1 and 2) is highly affected by molarity, while the water absorption of mixtures with high SS content is less affected by molarity.



**Figure 4.** Water absorption of the samples prepared with different concentrations depending on the SS/SH

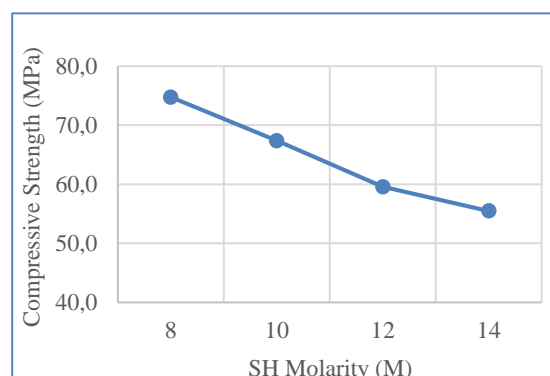
### Compressive Strength of FAPGP Samples

Compressive strength tests were carried out in order to have information about the mechanical properties of the binder obtained in the study. Experiments have shown that the compressive strength of FAPGP paste samples is higher than the compressive strength of natural pozzolan (without additives) based geopolymers performed in other studies (Ndjock et al., 2017; Kantarcı et al., 2019). The change of compressive strength depending on the SH concentration of the samples with different SS/SH ratio is given in Figure 5. As can be seen from Figure 5, in all SH molarity values, while the compressive strength increases with the increase of SS/SH ratio up to 2, a slight decrease was experienced after this value. For the SH molarity values in this study, it can be said that the optimum SS/SH ratio is 2. The highest compressive strength was obtained with 74.8 MPa from the 8-2 sample. Only SH-activated samples had lower compressive strength values than SS-SH-activated samples. In order to obtain a good GP binder, it is recommended by other studies to use SS as an activator in addition to SH (Palomo et al., 1999; Xu and Van Deventer, 2000; Hardjito et al., 2004; Görhan and Kürklü, 2014; Nematollahi and Sanjayan, 2014). This situation is explained by the use of sodium silicate together with sodium hydroxide, which increases the amount of reaction product Si and consequently its strength increases (Criado et al., 2005).



**Figure 5.** Change of compressive strength depending on SH molarity

As can be seen from Figure 5, when samples without sodium silicate were excluded, the compressive strengths of the samples prepared with 8 M and 10 M sodium hydroxide were higher than those prepared with 12 M and 14 M sodium hydroxide. Another remarkable point is that the compressive strength of the samples prepared with 14 M SH solution is relatively less affected by the SS content. This was also observed in a study conducted by Hardjito and Rangan (Hardjito and Rangan, 2005).



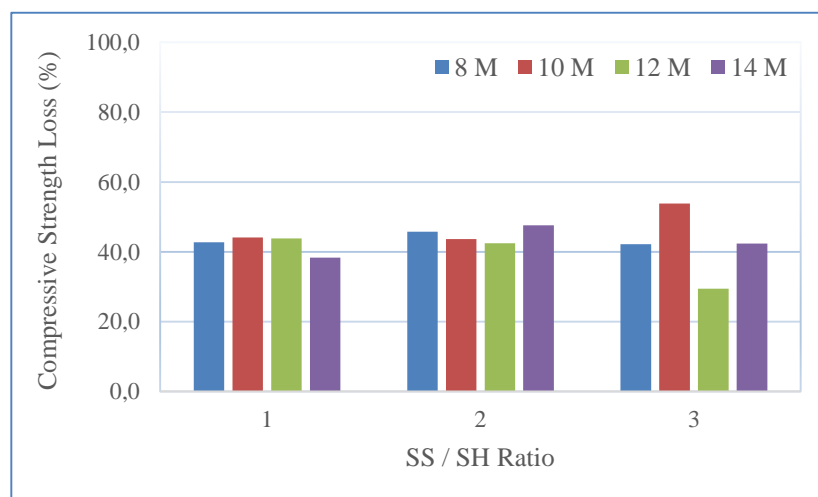
**Figure 6.** The change in the compressive strength of the samples with SS/SH ratio of 2

The compressive strength of mixtures using both solutions generally tended to decrease with increasing SH molarity (Figure 5). This trend is more clearly observed in mixtures with an SS/SH ratio of 2 (Figure 6). As can be clearly seen from Figure 6, the compressive strength has continuously decreased with the increase of the SH molarity. However, the compressive strength of mixtures with an SS/SH ratio of 1 increased a little when the SH molarity increased from 8 M to 10 M and started to decrease in the subsequent increases in the molarity value.

### Wet-Dry Performance of FAPGP Samples

Large cracks were formed at the end of the first wet-dry cycle in samples activated with SH without using sodium silicate solution (SS). At the end of the second cycle, the cracks in the 12-0 and 14-0 samples expanded and caused the sample to split. Therefore, the compressive strength of these samples could not be measured. Although the 8-0 and 10-0 samples were not completely split, wide cracks occurred in the samples. This makes it necessary to use SS and SH solutions together as activators in order to obtain a more durable structure in pumice based GP binders.

The change in the wet-dry performance of the samples in which SS and SH solutions are used together, depending on the SS/SH ratio is given in Figure 7. As can be seen from the Figure 7, it can be said that the SS/SH ratio and SH molarity are not very effective on the wet-dry performance in the mixtures where SS solution is also used. Especially for mixtures with SS/SH ratio 1 and 2, the strength loss after wetting-drying is very close to each other around 42%.



**Figure 7.** The change in the wet-dry performance of FAPGP pastes depending on the SS/SH ratio

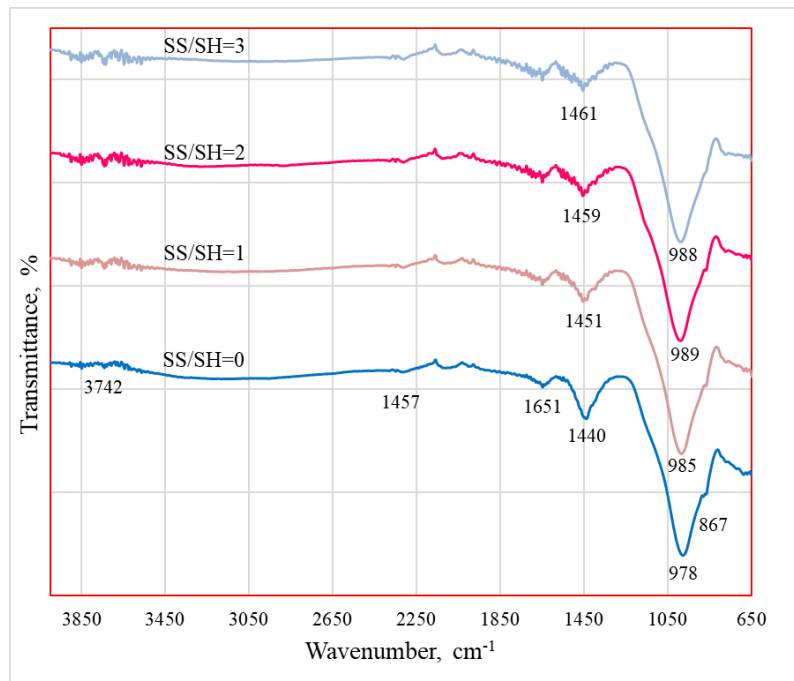
The specified wet-dry performance (around 42%) can be considered a good value for natural pozzolan-based geopolymers such as pumice and tuff. In some studies, it is seen that the samples kept in water for 24 hours in natural pozzolan based geopolymers experience a loss of strength up to 89% (Lemougna et al., 2014; Djobo et al., 2017).

The mixture with the highest wet-dry performance for FAPGP paste samples was 12-3 with 29.5% strength loss. Although the compressive strength of the samples activated only with SH solution is at a reasonable level, their wet-dry performance is insufficient. For the values used in this study, it is seen that FAPGP binders produced with activators without sodium silicate will not be durable if exposed to water effects.

### Results of FTIR Analysis

The results of FTIR tests conducted to examine the effect of alkali activator content on the geopolymerization process and reaction products of the prepared paste samples are evaluated below. For

molecular bond characterization, the absorption data of the test samples in the spectrum range of 650-4000  $\text{cm}^{-1}$  were obtained using the Agilent Cary 630 model spectrometer device. Using these data, "Transmittance (%) - Wave number ( $\text{cm}^{-1}$ )" graphics of the samples were drawn. Figure 8 shows FTIR spectrum graphs of samples produced in four different SS/SH (SS/SH: 0, 1, 2, 3) ratios using 10 M SH solution and 2 module SS solution.

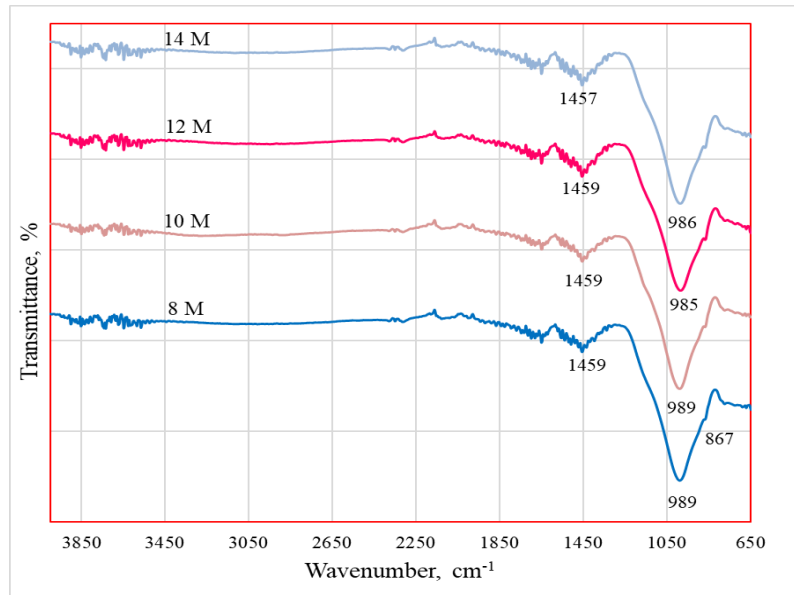


**Figure 8.** FTIR spectra showing the effect of SS/SH ratio on the molecular structure of geopolymers

The FTIR spectra of the SS/SH=0 sample, in which only 10 M SH solution was used as an activator, shows a wide but weak pit in the 2650-3450  $\text{cm}^{-1}$  band. The presence of this wide pit becomes a straight line as the SS/SH ratio increases and disappears almost completely. This band indicates the presence of -OH (hydroxyl) groups in compounds that have not fully reacted in the geopolymer matrix (North and Swaddle, 2000; Zhang et al., 2012; Jansson et al., 2015). This indicates that the sodium silicate added to the starting alkali activator contributes to the advancement of geopolymerization. Spectrum peak in the range of 1440-1461  $\text{cm}^{-1}$  are attributed to the asymmetric elongation vibration of the O-C-O functional groups (Bernal, 2016). Therefore, it is understood that the unbalanced alkali cations ( $\text{Na}^+$ ) in the hardened geopolymer structure react with  $\text{CO}_2$  in the air and form sodium carbonates ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Bernal, 2016; Yener and Karaaslan, 2020). When only SH solution is used, it is seen in Figure 8 that the spectrum peak at the position of 1440  $\text{cm}^{-1}$  shifts towards 1461  $\text{cm}^{-1}$  and its amplitude decreases as the SS/SH ratio increases. It indicates that as the SS/SH ratio increases, the carbonation decreases. This decrease in carbonation level can be explained by the balancing of  $\text{Na}^+$  cations by negatively charged  $\text{AlO}_4^-$  groups in the more coordinated geopolymer structure (Zhang et al., 2012; Bernal, 2016; Davidovits, 2017).

It is an important fingerprint of wide and deep spectrum geopolymer materials in the range of 900-1300  $\text{cm}^{-1}$  and shows the asymmetric stress functional group of Si-O-T (T: Si, Al Tetrahedral) (Erdogan, 2015; Król et al., 2016; Petrus et al., 2019). The position of the peak value in this location has shifted from 978  $\text{cm}^{-1}$  to 988  $\text{cm}^{-1}$  with the increase in SS/SH ratio. This shows that geopolymerization progresses and the level of coordination in the  $\text{SiO}^n$  structure is increased by using SS in alkaline solution (Davidovits, 2008; Criado et al., 2012; Erdogan, 2015). The shoulder located in the 867  $\text{cm}^{-1}$  band shows the Al-O structure, and the loss of clarity of the shoulder in this region and the decrease in the amplitude

of the peak indicate that  $\text{AlO}_4^-$  units take place more in the geopolymer network. As a result, SS used in alkaline solution contributes to the increase of the  $\text{SiO}^n$  coordination level, the inclusion of  $\text{AlO}_4^-$  structures in the geopolymer network, the balancing of  $\text{Na}^+$  cations, the decreasing carbonation level and the development of a more durable geopolymer structure.



**Figure 9.** FTIR spectra showing the effect of SH molarity on the molecular structure of geopolymers

In Figure 9, FTIR spectra of the mixtures prepared at different molarity values at SS/SH=2 ratio are given. Figure 9 shows that the molecular structures are highly similar. When the peak around  $1459\text{ cm}^{-1}$  is examined, it is seen that the amplitude of the peak decreases in case the sodium hydroxide solution molarity decreases, thus the carbonation level decreases a little. This may be related to the decrease in the amount of  $\text{Na}_2\text{O}$  in the starting solution in parallel with the decrease in NaOH molarity. When the spectrum peak in the wavelength range of  $900\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$  is examined, as increasing the SH molarity the wavenumber located of the spectrum peak is lowered. This situation can be attributed to the decrease in geopolymer quality due to the shortening of the dissolution time, which is the first stage of the geopolymer formation process. Because the increase in alkaline solution concentration causes shortening of the induction time required for dissolution from alumina-silica raw materials (Rees et al., 2007). When the shoulder band at  $867\text{ cm}^{-1}$  wavelength is examined, it is seen that the increased molarity does not make a noticeable change in the studied range.

### Microstructure of FAPGP Pastes

The SEM images show that the geopolymer paste has a heterogeneous structure consisting of unreacted or partially reacted powder binder particles, micro-cracks, voids and GP binder rather than a homogeneous material. Partly or completely unreacted powder binder particles were found in the GP matrix of all samples whose microstructures were examined (Figure 10 and 11). When the samples are viewed on a large scale, it is seen that the 10-2 sample has a denser structure than the others (Figure 10). Because of this dense structure, the compressive strength value of these samples was higher (Figure 5). Considering the chemical contents of the materials in the mixture, there are slight differences from the results obtained from the EDS analysis (Table 4). This is due to the differences in the regions where the image was taken (Tho-In et al., 2018). The heterogeneous nature of the samples mentioned earlier confirms this.

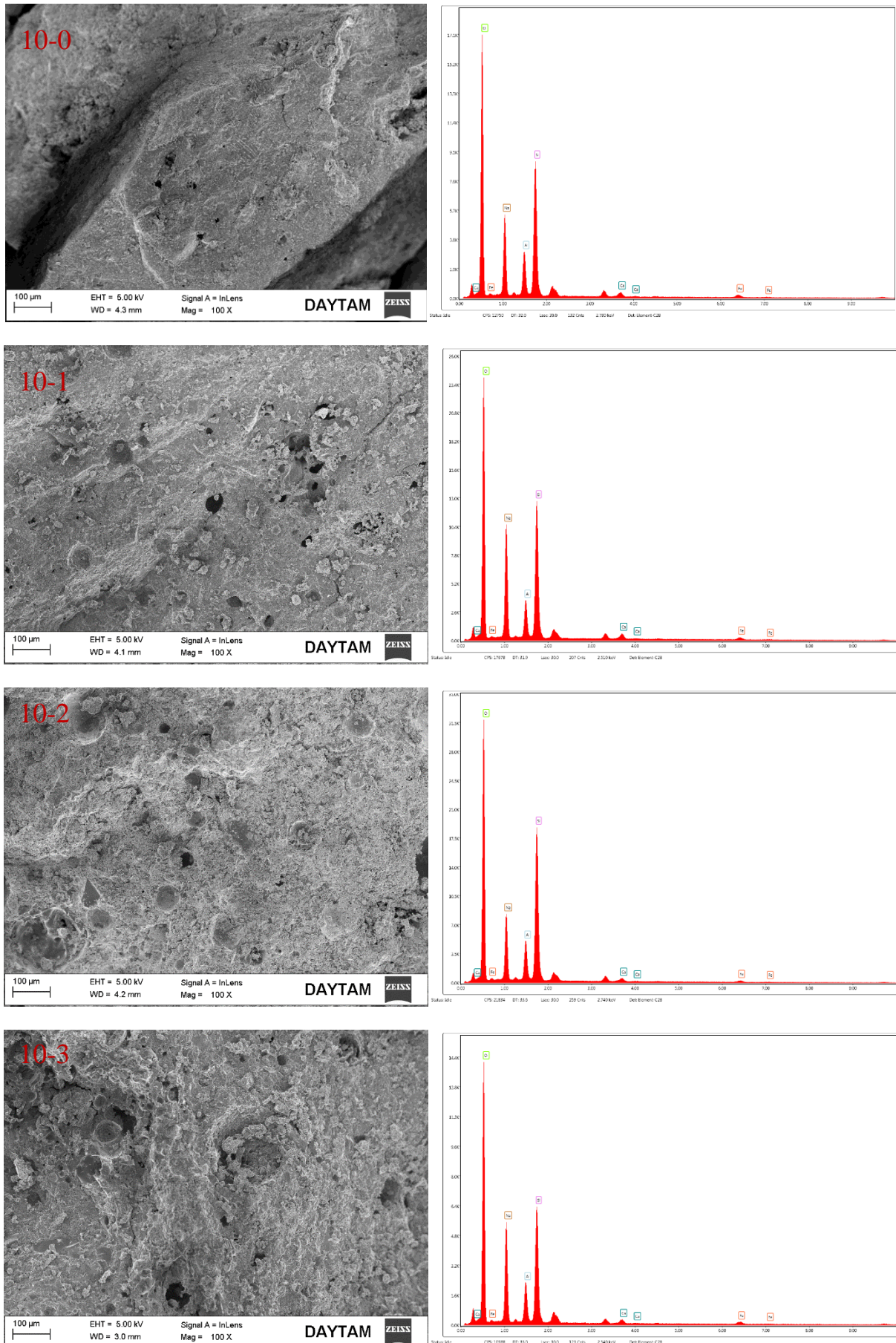
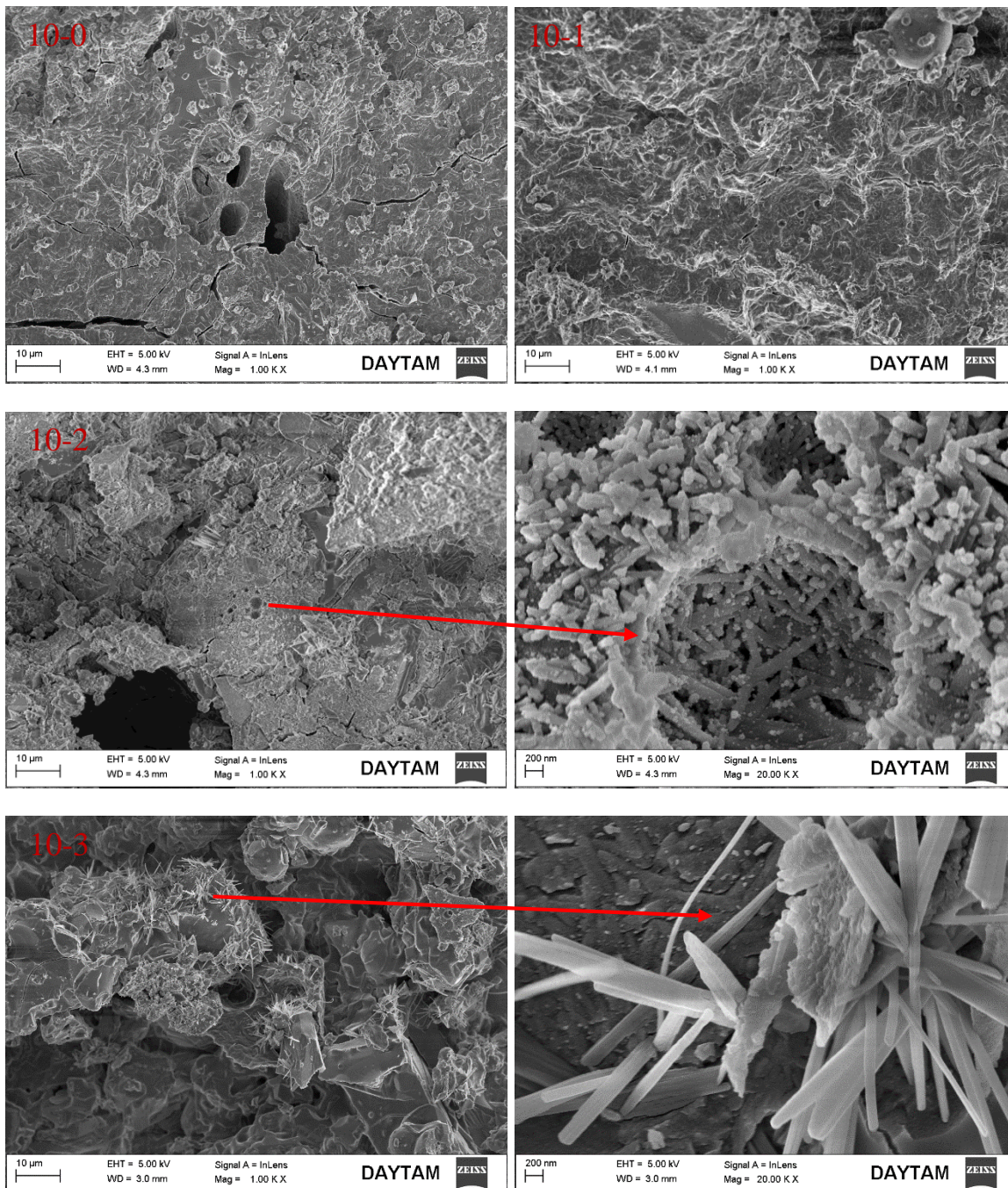


Figure 10. Selected-area and EDS analysis of FAPGP pastes with different SS/SH ratios.



**Table 4.** Percentages of elements obtained from EDS analysis

| Element   | 10-0 (%) |        | 10-1 (%) |        | 10-2 (%) |        | 10-3 (%) |        |
|-----------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|
|           | weight   | atomic | weight   | atomic | weight   | atomic | weight   | atomic |
| <b>O</b>  | 45.74    | 58.87  | 42.96    | 55.53  | 47.26    | 60.21  | 45.01    | 57.63  |
| <b>Na</b> | 17.57    | 15.74  | 23.27    | 20.94  | 15.01    | 13.31  | 22.03    | 19.63  |
| <b>Al</b> | 7.47     | 5.70   | 5.73     | 4.40   | 6.68     | 5.04   | 6.54     | 4.97   |
| <b>Si</b> | 23.71    | 17.38  | 23.07    | 16.98  | 27.39    | 19.87  | 21.64    | 15.78  |
| <b>Ca</b> | 1.98     | 1.02   | 2.16     | 1.11   | 1.55     | 0,79   | 1.62     | 0.83   |
| <b>Fe</b> | 3.52     | 1.30   | 2.81     | 1.04   | 2.11     | 0.77   | 3.17     | 1.16   |



**Figure 11.** Micrographs of FAPGP paste samples prepared with 10 M SH solution

SEM images show that the GP binder products in which only SH solution is used as an activator is more homogeneous and that the products in the needle shaped crystalline structure increase with the increase of SS content (Figure 11). The 10-3 sample, in which needle-like structures were seen mostly, had a relatively more porous structure. In the sample 10-2, the inter-surface phase of fly ash and GP binder matrix is encountered in two regions of hemispherical surfaces (Jiang et al., 2020). Another case that needs to be stated is that although the reaction products of the sample activated only with SH are more homogeneous, it has larger micro-cracks than the samples activated with SS + SH.

## CONCLUSIONS

The powder binder consisting of pumice and fly ash was activated with alkaline activators obtained by mixing SH with different molarities (8 M, 10 M, 12 M and 14 M) with SS solution in different proportions (SS/SH = 0, 1, 2 and 3). The effects of SH molarity and SS content on physical properties, compressive strength and wet-dry performance of the FAPGP binder were investigated. The following conclusions were drawn from the experimental investigation:

- The density of FAPGP pastes increased with increasing SH molarity. The amount of this increase decreased in mixtures with high SS content.
- Compressive strength increased with the SS/SH ratio increasing up to 2 for all SH molarity values in this study, and experienced a slight decrease with this ratio increasing to 3.
- The highest compressive strength value was obtained from the 8-2 mixture with 74.8 MPa. Solution mixtures in which the ratio of SS to 8 M or 10 M SH is 2 was evaluated as the optimum alkali activator.
- In order for FAPGP binders to be resistant to water effects, SS should be used in addition to SH in alkaline activator.
- With the presence of SS solution in the alkaline activator, geopolymerization improves and micro-cracks in the GP matrix decrease.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank ARKOZ Mining - Ağrı Cement Factory for enabling us to benefit from laboratory facilities.

## Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

## Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

## REFERENCES

- Allahverdi A, Mehrpour K, Kani EN, 2008. Investigating the Possibility of Utilizing Pumice-Type Natural Pozzonal in Production of Geopolymer Cement. *Ceramics Silikat*, 52(1): 16.
- Atış C, Görür E, Karahan O, Bilim C, İlkentapar S, Luga E, 2015. Very High Strength (120 MPa) Class F Fly Ash Geopolymer Mortar Activated at Different NaOH Amount, Heat Curing Temperature and Heat Curing Duration. *Construction and Building Materials*, 96673-678.
- Bernal SA, 2016. Microstructural Changes Induced by CO<sub>2</sub> Exposure in Alkali-Activated Slag/Metakaolin Pastes. *Frontiers in Materials*, 343.
- Bondar D, Lynsdale C, Milestone N, Hassani N, Ramezani-pour A, 2011a. Effect of Adding Mineral Additives to Alkali-Activated Natural Pozzolan Paste. *Construction and Building Materials*, 25(6): 2906-2910.

- Bondar D, Lynsdale C, Milestone N, Hassani N, Ramezaniapour A, 2011b. Effect of Heat Treatment on Reactivity-Strength of Alkali-Activated Natural Pozzolans. *Construction and Building Materials*, 25(10): 4065-4071.
- Bondar D, Lynsdale C, Milestone NB, Hassani N, Ramezaniapour AA, 2011c. Effect of Type, Form, and Dosage of Activators on Strength of Alkali-Activated Natural Pozzolans. *Cement and Concrete Composites*, 33(2): 251-260.
- Criado M, Jiménez AF, Sobrados I, Palomo A, Sanz J, 2012. Effect of Relative Humidity on the Reaction Products of Alkali Activated Fly Ash. *Journal of the European Ceramic Society*, 32(11): 2799-2807.
- Criado M, Palomo A, Fernández-Jiménez A, 2005. Alkali Activation of Fly Ashes. Part 1: Effect of Curing Conditions on the Carbonation of the Reaction Products. *Fuel*, 84(16): 2048-2054.
- Davidovits J 1994. "Properties of Geopolymer Cements." In First international conference on alkaline cements and concretes, 131-149. Kiev State Technical University, Ukraine: Scientific Research Institute on ....
- Davidovits J, 2002. Personal Communication on the Process of Making of Geopolymer Concrete.
- Davidovits J, 2008. *Geopolymer Chemistry and Applications*. 2008. Saint Quentin: Geopolymer Institute.
- Davidovits J, 2017. *Geopolymers: Ceramic-Like Inorganic Polymers*. *J. Ceram. Sci. Technol*, 8(3): 335-350.
- Djobo JNY, Elimbi A, Tchakouté HK, Kumar S, 2016a. Mechanical Activation of Volcanic Ash for Geopolymer Synthesis: Effect on Reaction Kinetics, Gel Characteristics, Physical and Mechanical Properties. *RSC advances*, 6(45): 39106-39117.
- Djobo JNY, Elimbi A, Tchakouté HK, Kumar S, 2016b. Mechanical Properties and Durability of Volcanic Ash Based Geopolymer Mortars. *Construction and Building Materials*, 124606-614.
- Djobo JNY, Elimbi A, Tchakouté HK, Kumar S, 2017. Volcanic Ash-Based Geopolymer Cements/Concretes: The Current State of the Art and Perspectives. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(5): 4433-4446.
- Duxson P, Fernández-Jiménez A, Provis JL, Lukey GC, Palomo A, van Deventer JS, 2007. Geopolymer Technology: The Current State of the Art. *Journal of Materials Science*, 42(9): 2917-2933.
- EN T, 12390-3 (2010) Testing Hardened Concrete-Part 3: Compressive Strength of Test Specimens. Turkish Standards Institute, Ankara, Turkey.
- Erdogan S, 2015. Properties of Ground Perlite Geopolymer Mortars. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 27(7): 04014210.
- Firdous R, Stephan D, Djobo JNY, 2018. Natural Pozzolan Based Geopolymers: A Review on Mechanical, Microstructural and Durability Characteristics. *Construction and Building Materials*, 1901251-1263.
- Görhan G, Kürklü G, 2014. The Influence of the NaOH Solution on the Properties of the Fly Ash-Based Geopolymer Mortar Cured at Different Temperatures. *Composites Part B: Engineering*, 58371-377.
- Haddad RH, Alshbuol O, 2016. Production of Geopolymer Concrete Using Natural Pozzolan: A Parametric Study. *Construction and Building Materials*, 114699-707.
- Hardjito D, Rangan BV, 2005. Development and Properties of Low-Calcium Fly Ash-Based Geopolymer Concrete.
- Hardjito D, Wallah SE, Sumajouw DM, Rangan BV, 2004. On the Development of Fly Ash-Based Geopolymer Concrete. *Materials Journal*, 101(6): 467-472.
- Jansson H, Bernin D, Ramser K, 2015. Silicate Species of Water Glass and Insights for Alkali-Activated Green Cement. *Aip Advances*, 5(6): 067167.
- Jiang X, Xiao R, Zhang M, Hu W, Bai Y, Huang B, 2020. A Laboratory Investigation of Steel to Fly Ash-Based Geopolymer Paste Bonding Behavior after Exposure to Elevated Temperatures. *Construction and Building Materials*, 254119267.
- Kani EN, Allahverdi A, Provis JL, 2012. Efflorescence Control in Geopolymer Binders Based on Natural Pozzolan. *Cement and Concrete Composites*, 34(1): 25-33.
- Kantarcı F, Türkmen İ, Ekinci E, 2019. Optimization of Production Parameters of Geopolymer Mortar and Concrete: A Comprehensive Experimental Study. *Construction and Building Materials*, 228116770.
- Kouamo HT, Elimbi A, Mbey J, Sabouang CN, Njopwouo D, 2012. The Effect of Adding Alumina-Oxide to Metakaolin and Volcanic Ash on Geopolymer Products: A Comparative Study. *Construction and Building Materials*, 35960-969.
- Król M, Minkiewicz J, Mozgawa W, 2016. IR Spectroscopy Studies of Zeolites in Geopolymeric Materials Derived from Kaolinite. *Journal of Molecular Structure*, 1126200-206.
- Lemougna PN, Melo UC, Delplancke M-P, Rahier H, 2014. Influence of the Chemical and Mineralogical Composition on the Reactivity of Volcanic Ashes During Alkali Activation. *Ceramics International*, 40(1): 811-820.

- Ndjock BDL, Elimbi A, Cyr M, 2017. Rational Utilization of Volcanic Ashes Based on Factors Affecting Their Alkaline Activation. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 46331-39.
- Nematollahi B, Sanjayan J, 2014. Effect of Different Superplasticizers and Activator Combinations on Workability and Strength of Fly Ash Based Geopolymer. *Materials & Design*, 57667-672.
- North MR, Swaddle TW, 2000. Kinetics of Silicate Exchange in Alkaline Aluminosilicate Solutions. *Inorganic Chemistry*, 39(12): 2661-2665.
- Palomo A, Grutzeck M, Blanco M, 1999. Alkali-Activated Fly Ashes: A Cement for the Future. *Cement and Concrete Research*, 29(8): 1323-1329.
- Petrus HTBM, Adelizar AS, Widiyatmoko A, Olvianas M, Suprpta W, Perdana I, Prasetya A, Astuti W 2019. "Kinetics of Fly Ash Geopolymerization Using Semi Quantitative Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR); Corr Data." In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 012001. IOP Publishing.
- Rees CA, Provis JL, Lukey GC, Van Deventer JS, 2007. In Situ ATR-FTIR Study of the Early Stages of Fly Ash Geopolymer Gel Formation. *Langmuir*, 23(17): 9076-9082.
- Risdanareni P, Karjanto A, Ekaputri JJ, Puspitarsari P, Khakim F 2016. "Mechanical Properties of Volcanic Ash Based Geopolymer Concrete." In *Materials Science Forum*, 377-381. Trans Tech Publ.
- Safari Z, Kurda R, Al-Hadad B, Mahmood F, Tapan M, 2020. Mechanical Characteristics of Pumice-Based Geopolymer Paste. *Resources, Conservation and Recycling*, 162105055.
- Singh B, Ishwarya G, Gupta M, Bhattacharyya S, 2015. Geopolymer Concrete: A Review of Some Recent Developments. *Construction and Building Materials*, 8578-90.
- Slavik R, Bednarik V, Vondruska M, Nemecek A, 2008. Preparation of Geopolymer from Fluidized Bed Combustion Bottom Ash. *Journal of Materials Processing Technology*, 200(1-3): 265-270.
- Tchakoute HK, Elimbi A, Kenne BD, Mbey J, Njopwouo D, 2013. Synthesis of Geopolymers from Volcanic Ash Via the Alkaline Fusion Method: Effect of  $Al_2O_3/Na_2O$  Molar Ratio of Soda-Volcanic Ash. *Ceramics International*, 39(1): 269-276.
- Temuujin Jv, Van Riessen A, Williams R, 2009. Influence of Calcium Compounds on the Mechanical Properties of Fly Ash Geopolymer Pastes. *Journal of Hazardous Materials*, 167(1-3): 82-88.
- Tho-In T, Sata V, Boonserm K, Chindapasirt P, 2018. Compressive Strength and Microstructure Analysis of Geopolymer Paste Using Waste Glass Powder and Fly Ash. *Journal of Cleaner Production*, 1722892-2898.
- Vafaei M, Allahverdi A, 2016. Influence of Calcium Aluminate Cement on Geopolymerization of Natural Pozzolan. *Construction and Building Materials*, 114290-296.
- Xu H, Van Deventer J, 2000. The Geopolymerisation of Alumino-Silicate Minerals. *International Journal of Mineral Processing*, 59(3): 247-266.
- Yadollahi MM, Benli A, Demirboğa R, 2015. The Effects of Silica Modulus and Aging on Compressive Strength of Pumice-Based Geopolymer Composites. *Construction and Building Materials*, 94767-774.
- Yadollahi MM, Demirboğa R, Polat R, 2014. Effect of Heat Treatment Temperature on Ground Pumice Activation in Geopolymer Composites. *Science and Engineering of Composite Materials*, 21(3): 377-382.
- Yener E, Karaaslan C, 2020. Curing Time and Temperature Effect on the Resistance to Wet-Dry Cycles of Fly Ash Added Pumice Based Geopolymer. *Cement Based Composites*, 1(2): 19-25.
- Zhang Z, Wang H, Provis JL, 2012. Quantitative Study of the Reactivity of Fly Ash in Geopolymerization by FTIR. *Journal of Sustainable Cement-Based Materials*, 1(4): 154-166.

## Investigation of Changes Against Time in the Artificial Gastric Liquid Medium of Pesticide Active Substances

Ayhan ELMASTAS<sup>1</sup>, Adil UMAZ<sup>2\*</sup>, Fırat AYDIN<sup>3</sup>

## Investigation of Changes Against Time in the Artificial Gastric Liquid Medium of Pesticide Active Substances

**ABSTRACT:** In this study, grown tomato samples were examined changes of pesticide active substances by two different methods in the artificial gastric liquid (AGL) medium prepared. In the first method, Trifloxystrobin and Imidacloprid pesticide active substances were sprayed on the tomato samples before the harvest period. Time-dependent change of the active substance of Trifloxystrobin; although initially 83.17 ng g<sup>-1</sup>, it was determined as 24.71 ng g<sup>-1</sup> in 240 min. The concentration of this active substance was determined that decreased with time and the % change was 70.29. While Imidacloprid active substance initially was 10.20 ng g<sup>-1</sup>, it was determined as 10.32 ng g<sup>-1</sup> at 240 min. It was determined that this active substance did not change between the first and the last concentration depending on the time. In the second method, 75 pesticide active substances were spiked to the tomato sample and the time-dependent change in the AGL medium was examined. The concentration of 10 active substances that above 70% of the change rate was determined that there was a statistical decrease depending on the time % changes in the range between 0-240 min. The concentration of 30 active substances in below 70% of the change rate was determined that did not a statistical decrease as depending on time. however, % changes were observed that there was a certain thought at different rates between the first and the last concentration after 240 min. The last 15 active substances 240 min concentrations were determined that increased of % changes compared to 0 min.

**Keywords:** Pesticide, tomato, LC-MS/MS, GC-MS/MS, AGL medium

<sup>1</sup> Ayhan ELMASTAS ([Orcid ID: 0000-0002-9208-9852](https://orcid.org/0000-0002-9208-9852)), Ministry of Agriculture and Forestry, Diyarbakir Food Control Laboratory, Diyarbakir, Turkey

<sup>2</sup> Adil UMAZ ([Orcid ID: 0000-0003-2438-5454](https://orcid.org/0000-0003-2438-5454)), Mardin Artuklu University, Vocational School of Health Services, Medical Laboratory Department, Mardin, Turkey,

<sup>3</sup> Fırat AYDIN ([Orcid ID: 0000-0002-0868-2769](https://orcid.org/0000-0002-0868-2769)), Dicle University, Science Faculty, Chemistry Department, Diyarbakir, Turkey,

\*Corresponding Author: Adil UMAZ, e-mail: adilumaz@gmail.com

This study was produced from Ayhan ELMASTAS's PhD thesis.

## INTRODUCTION

Fruits and vegetables create an important part of our daily diet. In order for the fruits and vegetables consumed to be useful, they should not contain any pesticide residues or are below the specified limits (Elmastas, 2018). Pesticides are known as agrochemicals used to, prevent, spray, or destroy harmful organisms and substances, growth, and development of the plant (Wu et al., 2019). Pesticides according to their chemical structures and functional groups are classified into various forms including organochlorine, organophosphorus, and carbamate. The most well-known among organochlorinated pesticides are Chlordane, Heptachlor and, Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT). The most known organophosphated pesticides are Chlorpyrifos, Diazinon, Malathion, and, Parathion. The most commonly known carbamate pesticides are Aldicarb, Carbaryl, Carbofuran. Also, some pesticides used as insecticides are Acetamiprid, Chlorpyrifos, Dieldrin, Heptenophos, Imidacloprid, Malathion, and Pirimicarb. Some pesticides used as protective fungicides are Azoxystrobin, Boscalid, Difenconazole, Trifloxystrobin, and Tebuconazole (Elmastas, 2018).

The history of pesticides known that used sulfur dust for insect controls by people in ancient Mesopotamia around 2500 BC. Although the use of pesticides can improve the quality and quantity of crops, pesticide residues in crops are generally harmful to humans. For this reason, many international organizations have regulated the maximum residue limits (MRL) in crops (Wu et al., 2019). These organizations are WHO, EC 2005, USDA, CODEX, CAC, HSE, and EFSA (Elmastas, 2018; Algharibeh and AlFararjeh, 2019; Jara and Winter, 2019). In our country, MRL is determined by the Ministry of Food, Agriculture, and Livestock (Elmastas, 2018). MRL value of pesticides commonly used in the European Union (EU) agricultural products is determined as 0.01 mg kg<sup>-1</sup> (Wu et al., 2019).

Despite benefits in agricultural areas of pesticides, it is known that it has had dangerous effects recently (Wei et al., 2018). In the release to nature of pesticides and consumption of food products contaminated with pesticides various health problems such as headaches, flu, skin rash, blurred vision, especially neurological and behavioral disorders in children, serious poisoning, blindness, genetic mutations, various types of cancer, birth defects, reproductive disorders, genotoxicity, carcinogenesis, cardiovascular diseases, endocrinological disorders in humans and animals, and even causes death (Arias et al., 2013; Hou et al., 2018; Calvo et al., 2019; Ersoy et al., 2019; Farajzadeh et al., 2019). Pesticides are not only toxic to the environment and human health. They are also known phytotoxic because of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, protein damage, and cause oxidative stress through DNA breaks (Hou et al., 2018). One of the most important negative effects of pesticides gives the long-term potential damage to the health of practitioners and other staff exposed to pesticides, as well as varying acute-grade injury. Studies estimate that 2-3 people are poisoned by pesticides every minute, and about 20.000 agricultural workers die from pesticide poisoning every year (An et al., 2018).

Various analysis techniques are used to identify pesticide residues (Song et al., 2019). Some of those are gas chromatography (GC), liquid chromatography (LC) (Farajzadeh et al., 2019), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), liquid chromatography-mass (LC-MS) (Song et al., 2019), liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (Algharibeh and AlFararjeh, 2019), GC-MS/MS (Lehotay, 2019), ultraviolet (UV) and fluorescent (FLD) detectors equipped with LC (Kapsi et al., 2019).

In this study, the time-dependent change of pesticide active substances in two different medium conditions in the AGL medium prepared grown tomato samples was examined. In the first medium, Trifloxystrobin and Imidacloprid active substances were sprayed on tomato samples before harvest. The time-dependent changes in the prepared AGL medium of these two active substances in the tomato

samples were examined. In the 2nd medium, some pesticide active substances were spiked to the tomato sample. The behaviors against time in the AGL of pesticide active substance spiked on tomato samples were investigated. In the literature, there is no information about monitoring the behavior of pesticide active substances in AGL. Thanks to this study, the knowledge of how the pesticide active substances change in the AGL medium will offer to contribute to the literature. Again, thanks to this study, it will be a guide in terms of working and evaluation in different artificial medium liquids.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Herbal Material**

Tomato sample was grown in the Research and Application field of Dicle University Faculty of Agriculture, Department of Horticulture. Tomato samples grown before harvesting time were done spraying process with Trifloxystrobin and Imidacloprid active substance and used in experimental studies.

### **Chemicals and Reagents**

Pesticide standards (Dr. Ehrenstorfer GmbH), Pepsin, and Hydrochloric acid (Sigma Aldrich, Germany) were provided commercially. Preparation of AGL; 6 g Pepsin 1% serum physiological solution taken and 4 M 2.5% HCl solution added on it. Then the final volume of the mixture was completed to 1000 ml. The pH of the AGL medium was adjusted to 1.2 (Galia et al., 1998).

### **Extraction of Samples**

The extraction of the samples was done according to the AOAC 2007.01 (International Official Methods of Analysis) method. Extraction procedures were carried out as follows.

15 g of tomato sample was weighed and homogenized with the help of a homogenizer. The obtained 15 g of the homogeneous mixture was taken into a 50 mL centrifuge tube and 15 mL of acetonitrile solution containing 1% acetic acid on it was added. Later the mix 1 min mixed with the vortex. Then, the salt mixture prepared from a mixture of 6 g magnesium sulfate and 1.5 g sodium acetate was added to the tube and the mixture was shaken for 1 min with the vortex. The mixture was then centrifuged at 4000 rpm for 5 min. Then, 8 mL of the upper phase was taken and placed in the centrifuge tube, and the salt mixture prepared from a mixture of 0.4 g primer amine and 1.2 g magnesium sulfate was added to the tube. The mixture was shaken by the vortex for 1 min and centrifuged at 4000 rpm for 5 min. Then, the upper phase was taken and filtered through a 0.45 µm filter and taken into the vial.

### **Pesticide Active Substances in Tomato Sample**

A total of 75 pesticide active substances were spiked into the tomato sample. 60 of these active substances were analyzed by LC-MS/MS and 15 by GC-MS/MS device.

### **Experimental Design**

AGL designed two different media studies. The tomato sample which is found Trifloxystrobin and Imidacloprid pesticide active substances in the 1st the designed medium was left in the AGL medium. It was then shaken continuously at 37 °C in a shaking water bath. At the time of release, it was accepted as 0 min, and samples were taken from the medium and analyzed. The same procedures repeated every half hour and 240 min analyzes continued to be made. In the second medium, some pesticide active substances were spiked to the tomato sample. They were spiked to the tomato sample with a final concentration of 100 ppb and the AGL was added and their behavior towards time was examined.

## Pesticide Residue Analysis in Samples

The pesticide active substances in the tomato sample were analyzed with Shimadzu GC-MS-TQ8040 and Agilent LC-MS/MS-6460 brand devices. Optimization studies were carried out on both the devices using the main stock standards prepared from 222 pesticide standards. The optimum conditions of both devices are given in Tables 1. analyzes were performed on both devices with 3 replicates of the samples in the vial under the optimum operating conditions and pesticide residues in the samples were determined using the data and library in the device.

**Table 1.** LC-MS/MS and GC-MS/MS device operating conditions

| LC-MS/MS operating conditions |  |                 |                 |                  | GC-MS/MS operating conditions     |                                       |                  |                     |
|-------------------------------|--|-----------------|-----------------|------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------|---------------------|
| LC-MS/MS                      |  | Agilent 6460    |                 |                  | GC-MS/MS                          |                                       | Shimadzu TQ 8040 |                     |
| Mobile Phase A                | 5 mM Ammonium format + % 0,1 Formic acid + 1000 mL Water |                 |                 |                  | Column                            | Rxi-5SilMS (15 m x 0.25 mm x 0.25 um) |                  |                     |
| Mobile Phase B                | Pure methanol  |                 |                 |                  | Injection Volume                  | 2 µl                                  |                  |                     |
| Column                        | Poroshell 120 SB-C18, (3.0 x 100 mm 2 microns)           |                 |                 |                  | Pressure                          | 63 kpa                                |                  |                     |
| Injection Volume              | 2 µl   |                 |                 |                  | Flow rate                         | 1.85 mL min <sup>-1</sup>             |                  |                     |
| Flow                          | 0.5 mL min <sup>-1</sup>                                 |                 |                 |                  | Carrier gas                       | Helium                                |                  |                     |
| Run Time                      | 12 min.  |                 |                 |                  | Run Time                          | 18.81 min.                            |                  |                     |
| <b>Pump Gradient Program</b>  |  |                 |                 |                  | The Column Oven                   | 90 °C                                 |                  |                     |
| No value                      | Time (min.)  | %Mobile Phase A | %Mobile Phase B | Flow rate ml/min | Injection temperature             | 250 °C                                |                  |                     |
| No value                      | 00:00  | 80              | 20              | 0.5              | <b>Column temperature Program</b> |                                       |                  |                     |
| No value                      | 00:20  | 80              | 20              | 0.5              | Start                             | Increase speed (C/min.)               | Temperature      | Standby time (min.) |
| No value                      | 1:50   | 30              | 70              | 0.5              | 1                                 | 0                                     | 90               | 1                   |
| No value                      | 6:00   | 5               | 95              | 0.5              | 2                                 | 30                                    | 150              | 0                   |
| No value                      | 7:50   | 5               | 95              | 0.5              | 3                                 | 7                                     | 200              | 0                   |
| No value                      | 7:60   | 80              | 20              | 0.5              | 4                                 | 15                                    | 300              | 2                   |
| No value                      | 11:00  | 80              | 20              | 0.5              |                                   |                                       |                  |                     |
| No value                      | 12:00  | 80              | 20              | 0.5              |                                   |                                       |                  |                     |

## RESULTS AND DISCUSSION

The properties of Trifloxystrobin and Imidacloprid active substance found in tomato samples are given in table 2.

**Table 2.** Properties of Imidacloprid and Trifloxystrobin active substances

| No | Active Substances | Chemical Class | Molecular Formula  |
|----|-------------------|----------------|--|
| 1  | Trifloxystrobin   | Strobilurin    | C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> |
| 2  | Imidacloprid      | Neonicotinoid  | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>               |

Türköz et al. in a study did in (2014); Between 2010 and 2012, they made pesticide active substance analysis using 1423 fresh fruit (Apple, grapes, apricot, banana, carrot, cherry, kiwi, lemon, orange, peach, pear, plum, pomegranate, strawberry and tangerine), and vegetable samples (Tomato, eggplant, pepper, cucumber, beans, cabbage, cauliflower, leek, lettuce, mushroom, onion, potato, purslane, arugula, and pumpkin). The most common active substances, they stated that Acetamiprid, Chlorpyrifos, Azoxystrobin, Boscalid, Carbendazim, Imidacloprid, Pyridaben, and Triadimenol (Türköz et al., 2014).

Diop et al. in (2016), in the study of determining pesticide residues in a total of 175 vegetable samples (31 cabbage, 88 lettuce, 57 tomatoes) in four different periods in the Niayes region of Senegal indicated that 65% of tomato samples 71% of lettuce samples and 93% of cabbage samples contained



one or more pesticide residues. The detected DDT, Dicofol, Chlorpyrifos, Dimethoate and  $\lambda$ -cyhalothrin pesticide active substances reported that each sample group was dominant at least 35% (Diop et al., 2016).

Zengin and Karaca, in a study made in (2017); between 2015 and 2016, Turkey's Usak province the pesticide active substance analysis in the 60 piece tomato samples collected in the greenhouse areas was done using LC/MS/MS and GC/MS devices. In the calculation of pesticide residue amount in 25 piece tomato samples collected in 2015; Imidacloprid and Acetamiprid were determined to be between 0.021-0.099 and 0.022-0.078 mg kg<sup>-1</sup>, respectively. According to the analysis results of 35 piece tomato samples collected in 2016, the active substances of Trifloxystrobin, Imidacloprid, and Azoxystrobin were determined to be between 0.011, 0.015-0.336 and 0.045-0.061 mg kg<sup>-1</sup>, respectively (Zengin and Karaca, 2017).

In the 1st medium designed, the results of the AGL medium of pesticide active substances in the tomato sample are given in table 3.

**Table 3.** Time-dependent change of pesticide active substance in the tomato sample in AGL.

| Time (min.) | Trifloxystrobin (ng g <sup>-1</sup> ) | Imidacloprid (ng g <sup>-1</sup> ) |
|-------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| 0           | 83.17                                 | 10.20                              |
| 30          | 75.16                                 | 10.02                              |
| 60          | 57.99                                 | 10.03                              |
| 90          | 54.16                                 | 10.15                              |
| 120         | 43.65                                 | 10.18                              |
| 150         | 37.67                                 | 10.01                              |
| 180         | 32.93                                 | 10.02                              |
| 210         | 32.24                                 | 10.25                              |
| 240         | 24.71                                 | 10.32                              |
| %Change     | <b>70.29</b>                          | <b>-1.18</b>                       |

When the active substances are evaluated according to the above results and chemical properties; While the active substance of trifloxystrobin was 83.18 ng g<sup>-1</sup> in 0 min. It decreased in the following times and was determined as 24.71 ng g<sup>-1</sup> in 240 min. Change in concentration depending on time was observed as 70.29%. It is possible to talk mention a decrease regularly. These results show that the active substance disappears in time in the AGL medium and turns into another product.

While it was 10.20 ng g<sup>-1</sup> at 0 min for Imidacloprid active substance, it was determined as 10.32 ng g<sup>-1</sup> at 240 min later. It was determined that there was no change between the first concentration and the last concentration depending on the time. These results show that the active substance is not affected by the AGL medium.

The time-dependent change in the AGL medium of 75 pesticide active ingredients spiked to the tomato sample is given in Table 4.

Table 4. Time-dependent change of spiked pesticide active substances in the AGL medium (ng g<sup>-1</sup>)

| Active Substances<br>(ng g <sup>-1</sup> ) | 0<br>(min.) | 30<br>(min.) | 60<br>(min.) | 90<br>(min.) | 120<br>(min.) | 150<br>(min.) | 180<br>(min.) | 210<br>(min.) | 240<br>(min.) | %<br>Change |
|--|-------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------------|
| Spiroxamine                                | 77.58       | 46.43        | 29.44        | 17.17        | 11.71         | 7.78          | 5.35          | 2.95          | 2.42          | 96.88       |
| Diazinon                                   | 66.65       | 50.20        | 26.49        | 19.10        | 14.16         | 9.87          | 7.62          | 3.43          | 3.30          | 95.05       |
| Thiodicarb                                 | 2.04        | 60.63        | 41.94        | 30.78        | 23.84         | 16.15         | 13.3          | 7.99          | 6.65          | 91.90       |
| Chlorsulfuron                              | 94.13       | 62.14        | 44.21        | 30.41        | 28.6          | 18.55         | 13.84         | 9.42          | 7.97          | 91.54       |
| Thiencarbonyl                              | 69.79       | 51.02        | 42.12        | 29.64        | 26.39         | 21.27         | 16.24         | 10.14         | 10.38         | 85.12       |
| Sethoxydim                                 | 84.01       | 57.92        | 34.29        | 26.56        | 22.55         | 24.86         | 21.23         | 14.37         | 14.64         | 82.57       |
| Fenazaquin                                 | 85.82       | 74.87        | 48.92        | 36.90        | 38.54         | 31.61         | 25.48         | 16.97         | 15.39         | 82.07       |
| Furathiocarb                               | 85.40       | 75.66        | 47.60        | 35.29        | 38.89         | 39.69         | 29.15         | 19.51         | 17.11         | 79.97       |
| Triasulfuron                               | 76.60       | 62.50        | 50.18        | 41.45        | 34.87         | 29.37         | 24.64         | 16.58         | 17.13         | 77.64       |
| Triallate                                  | 118.92      | 84.72        | 68.55        | 51.39        | 30.02         | 59.5          | 49.18         | 33.98         | 32.30         | 72.84       |
| Aldicarb                                   | 99.51       | 87.80        | 66.33        | 58.52        | 53.47         | 38.92         | 38.38         | 33.00         | 30.93         | 68.92       |
| Ethofumesate                               | 76.63       | 90.10        | 60.02        | 55.66        | 49.94         | 37.89         | 32.55         | 28.01         | 26.14         | 65.89       |
| Butocarboxim                               | 108.37      | 102.4        | 72.29        | 69.05        | 58.02         | 48.03         | 46.93         | 40.26         | 39.99         | 63.10       |
| Quizalofop-p-ethyl                         | 114.67      | 107.20       | 71.44        | 54.63        | 44.56         | 72.12         | 57.9          | 43.21         | 42.89         | 62.60       |
| Ethion                                     | 117.15      | 112.02       | 72.64        | 64.36        | 49.14         | 79.71         | 65.84         | 49.27         | 45.76         | 60.94       |
| Tebufenpyrad                               | 100.56      | 101.51       | 65.04        | 56.46        | 48.64         | 75.1          | 59.02         | 45.72         | 41.84         | 58.40       |
| Methamidophos                              | 65.52       | 60.80        | 52.34        | 46.34        | 41.21         | 37.56         | 34.44         | 29.54         | 27.36         | 58.24       |
| Tecnazene                                  | 82.27       | 90.23        | 73.66        | 45.08        | 73.44         | 72.34         | 51.95         | 42.53         | 39.08         | 52.50       |
| Quintozene                                 | 80.95       | 95.34        | 68.67        | 50.00        | 70.24         | 71.76         | 56.75         | 45.16         | 39.95         | 50.65       |
| Dicofol                                    | 84.73       | 108.68       | 77.61        | 54.78        | 71.25         | 68.56         | 59.19         | 50.11         | 44.61         | 47.35       |
| Fonofos                                    | 62.72       | 71.38        | 52.00        | 41.27        | 47.95         | 58.65         | 42.76         | 33.75         | 34.43         | 45.11       |
| $\beta$ -endosulfan                        | 81.65       | 107.22       | 66.77        | 60.73        | 70.69         | 63.06         | 61.31         | 59.07         | 45.46         | 44.32       |
| Hexachlorobenzene                          | 71.95       | 86.42        | 64.43        | 51.52        | 70.37         | 65.35         | 54.11         | 44.69         | 40.37         | 43.89       |
| Pyridate                                   | 59.77       | 38.62        | 33.56        | 45.99        | 44.54         | 54.15         | 46.63         | 38.4          | 34.70         | 41.94       |
| Chlorpyrifos                               | 82.31       | 105.15       | 72.94        | 61.02        | 78.72         | 75.59         | 65.47         | 56.08         | 47.99         | 41.70       |
| Quinalphos                                 | 91.24       | 96.68        | 76.67        | 61.05        | 63.49         | 78.67         | 61.99         | 52.29         | 53.49         | 41.37       |
| $\alpha$ -endosulfan                       | 78.07       | 102.30       | 67.12        | 57.73        | 72.81         | 68.07         | 61.00         | 54.71         | 45.91         | 41.19       |
| Clodinafop-propargyl ester                 | 92.6        | 102.00       | 82.17        | 62.32        | 73.32         | 86.72         | 63.48         | 55.75         | 55.95         | 39.58       |
| Tebufenozide                               | 109.72      | 123.48       | 103.32       | 80.51        | 88.93         | 95.00         | 77.76         | 74.36         | 70.63         | 35.62       |
| Fludioxonil                                | 88.43       | 106.37       | 91.24        | 62.08        | 96.34         | 93.61         | 71.75         | 68.74         | 58.87         | 33.43       |
| Difenoconazole                             | 84.53       | 87.94        | 57.48        | 61.20        | 74.52         | 75.39         | 66.80         | 55.42         | 56.35         | 33.34       |
| Triazophos                                 | 100.1       | 100.50       | 91.05        | 77.94        | 91.89         | 87.36         | 72.75         | 72.10         | 68.20         | 31.87       |
| Etofenprox                                 | 104.81      | 47.93        | 45.41        | 86.37        | 75.72         | 95.46         | 91.56         | 75.27         | 72.00         | 31.31       |
| Carboxin                                   | 102.18      | 102.29       | 74.92        | 64.29        | 69.91         | 65.94         | 68.24         | 67.18         | 70.43         | 31.07       |
| 2,4-DDD                                    | 80.27       | 108.38       | 71.07        | 76.35        | 84.07         | 75.13         | 80.04         | 73.68         | 58.04         | 27.69       |
| 4,4-DDD                                    | 79.26       | 106.73       | 69.61        | 74.87        | 82.34         | 74.79         | 79.46         | 72.06         | 57.37         | 27.62       |
| 2,4-DDT                                    | 73.77       | 107.30       | 65.03        | 69.53        | 75.95         | 65.09         | 73.78         | 67.43         | 54.12         | 26.64       |
| Boscalid                                   | 77.86       | 82.72        | 74.74        | 66.97        | 71.98         | 79.44         | 66.73         | 64.48         | 62.94         | 19.15       |
| Penconazole                                | 83.47       | 88.82        | 72.42        | 74.84        | 72.02         | 78.42         | 72.35         | 69.13         | 72.93         | 12.64       |
| Malathion                                  | 86.12       | 85.28        | 80.46        | 77.16        | 77.96         | 76.07         | 75.19         | 74.93         | 75.67         | 12.13       |
| Hexaconazole                               | 75.86       | 78.03        | 63.69        | 69.67        | 64.49         | 69.86         | 68.34         | 62.28         | 68.24         | 10.05       |
| Triticonazole                              | 85.15       | 89.16        | 70.87        | 81.12        | 82.91         | 81.81         | 78.27         | 78.77         | 77.06         | 9.51        |
| Myclobutanil                               | 69.89       | 72.90        | 63.38        | 63.59        | 65.39         | 69.96         | 65.71         | 64.48         | 63.40         | 9.28        |
| Tetraconazole                              | 81.77       | 86.04        | 74.33        | 71.54        | 76.45         | 80.97         | 77.71         | 75.26         | 74.20         | 9.26        |
| Molinate                                   | 77.69       | 76.91        | 72.19        | 71.05        | 73.18         | 69.12         | 64.82         | 68.73         | 71.12         | 8.46        |
| Methiocarb                                 | 82.74       | 86.49        | 83.2         | 73.09        | 77.96         | 81.49         | 76.93         | 75.60         | 76.22         | 7.87        |
| Propazine                                  | 95.29       | 97.95        | 89.64        | 90.98        | 87.14         | 89.59         | 88.00         | 86.02         | 89.58         | 5.99        |
| Azoxystrobin                               | 88.16       | 88.37        | 86.71        | 83.77        | 83.54         | 83.28         | 82.95         | 84.07         | 83.26         | 5.56        |
| Atrazine                                   | 90.61       | 95.02        | 87.55        | 90.21        | 85.07         | 84.21         | 86.69         | 84.27         | 85.73         | 5.39        |
| Triadimenol                                | 92.36       | 95.84        | 80.55        | 88.88        | 87.65         | 86.09         | 82.52         | 84.62         | 87.46         | 5.30        |
| Triethylenetriamine                        | 85.5        | 86.98        | 78.99        | 82.92        | 78.04         | 79.52         | 77.61         | 76.06         | 81.55         | 4.63        |
| Benalaxyl                                  | 76.64       | 104.76       | 71.58        | 73.64        | 77.13         | 64.91         | 73.31         | 82.77         | 74.38         | 2.95        |
| Ethoprophos                                | 74.74       | 84.98        | 3.62         | 71.12        | 78.44         | 72.88         | 65.31         | 72.17         | 73.09         | 2.21        |
| Parathion ethyl                            | 50.71       | 77.65        | 66.6         | 29.12        | 60.22         | 56.87         | 57.35         | 40.83         | 49.61         | 2.17        |
| Alachlor                                   | 89.56       | 87.92        | 80.13        | 91.06        | 85.48         | 87.38         | 82.52         | 82.73         | 88.14         | 1.59        |
| Esfenvalerate                              | 37.97       | 50.90        | 45.25        | 43.39        | 46.95         | 38.42         | 44.43         | 44.64         | 37.38         | 1.55        |
| Fenvalerate                                | 59.93       | 89.68        | 65.31        | 64.65        | 67.31         | 50.62         | 65.11         | 78.90         | 59.16         | 1.28        |
| Diphenamid                                 | 87.59       | 87.89        | 82.89        | 83.62        | 81.78         | 86.86         | 80.32         | 86.82         | 86.62         | 1.11        |
| Metolachlor                                | 44.23       | 48.33        | 42.33        | 43.83        | 43.98         | 44.01         | 42.75         | 41.92         | 44.16         | 0.16        |
| Prochloraz                                 | 91.69       | 97.12        | 71.62        | 88.03        | 79.80         | 86.15         | 86.86         | 80.78         | 91.55         | 0.16        |
| Lenacil                                    | 56.37       | 57.03        | 55.38        | 55.38        | 52.47         | 55.90         | 51.45         | 54.77         | 56.59         | -0.41       |
| Diethofencarb                              | 82.33       | 88.19        | 80.21        | 75.38        | 80.30         | 82.74         | 77.42         | 78.58         | 82.77         | -0.54       |
| Monolinuron                                | 84.71       | 83.37        | 80.71        | 77.82        | 78.83         | 79.64         | 77.98         | 82.50         | 85.47         | -0.90       |
| Bupirimate                                 | 79.93       | 84.55        | 75.54        | 80.29        | 74.32         | 76.57         | 76.88         | 79.22         | 80.69         | -0.96       |
| Acetamidoprid                              | 94.43       | 104.34       | 86.07        | 92.76        | 86.01         | 79.59         | 84.94         | 91.01         | 95.63         | -1.27       |
| Heptanaphos                                | 64.5        | 64.11        | 63.84        | 64.89        | 60.98         | 62.86         | 63.79         | 64.88         | 65.53         | -1.59       |
| Imazalil                                   | 81.77       | 85.04        | 79.86        | 86.14        | 82.43         | 81.69         | 83.03         | 83.11         | 83.08         | -1.60       |
| Dimethoate                                 | 97.52       | 101.19       | 88.78        | 94.61        | 89.73         | 84.01         | 89.26         | 92.87         | 99.10         | -1.63       |
| Omethoate                                  | 89.72       | 94.88        | 81.02        | 90.51        | 90.20         | 77.11         | 85.82         | 77.57         | 91.23         | -1.68       |
| Cymoxanil                                  | 93.38       | 101.74       | 79.94        | 88.40        | 81.42         | 75.66         | 84.26         | 87.43         | 95.02         | -1.76       |
| Prometryn                                  | 91.91       | 93.38        | 88.65        | 95.67        | 89.31         | 90.10         | 90.81         | 96.81         | 94.68         | -3.02       |
| Metalaxyl-M                                | 78.4        | 76.18        | 78.09        | 79.01        | 76.26         | 74.20         | 78.37         | 85.84         | 81.40         | -3.83       |
| Trichlorfon                                | 84.93       | 90.82        | 79.56        | 85.51        | 83.22         | 76.75         | 82.27         | 83.81         | 88.28         | -3.94       |
| Paraoxon ethyl                             | 92.37       | 95.54        | 92.59        | 94.70        | 89.91         | 89.12         | 88.20         | 93.00         | 96.50         | -4.48       |
| Acephate                                   | 68.00       | 69.75        | 73.97        | 70.86        | 69.87         | 72.47         | 71.75         | 70.22         | 71.07         | -4.52       |

When evaluated according to the above results and chemical properties of 75 pesticides active substance in the AGL medium, for active substances (1-10 units) with a change rate of over 70% (96.88-72.84%), it was determined that there was a statistically decrease in their concentration in time intervals between 0-240 min. When we look at the active substances (11-30 units) which show a change rate below 70% (68.92-12.13%); it was observed that there was no statistical decrease time-dependent, but there was a certain thought at different rates between the initial concentration and the final concentration after 240 min. According to the results in the table, 20 (41-60 units) active substance was determined to be almost little of time-dependent change (10.05-0.16%) between the first and the last concentrations. It was determined that AGL does not affect these active substances. A negative shot (-0,41-4,52) according to 0 min compared 240 min concentrations of 15 (61-75 units) active substances was observed. The AGL was determined to have a positive effect on these active substances.

**Table 5.** pKa values of pesticide active substances

| Active Substances    | Chemical Class          | pKa   |
|----------------------|-------------------------|-------|
| Diazinon             | Organophosphorus        | 2.60  |
| Chlorsulfuron        | Sulfonylurea            | 3.40  |
| Thifensulfuronmethyl | Triazinylsulfonylurea   | 4.00  |
| Sethoxydim           | Cyclohexanedionedioxime | 4.40  |
| Triasulfuron         | Triazinylsulfonylurea   | 4.64  |
| Penconazole          | Triazole                | 1.51  |
| Tetraconazole        | Triazole                | 0.80  |
| Propazine            | Triazine                | 1.70  |
| Atrazine             | Triazine                | 1.60  |
| Terbuthylazine       | Triazine                | 2.00  |
| Prochloraz           | Midazole                | 3.80  |
| Lenacil              | Uracil                  | 10.70 |
| Bupirimate           | Pyrimidinol             | 5.00  |
| Acetamiprid          | Eonicotinoid            | 0.70  |
| Imazalil             | Imidazole               | 6.49  |
| Cymoxanil            | -                       | 9.70  |
| Prometryn            | Triazine                | 4.10  |
| Acephate             | Organophosphorus        | 8.35  |

It was observed that organophosphorus pesticides reacted differently from the high rate of change to a low rate of change in the time-dependent AGL medium. Although active substances are in the same chemical class and behave differently; they were determined that the pKa values of the active substances differ solubilities in water, the type and number of atoms it contains, of the molecular formula, of the bond structure between atoms, whether it contains a ring structure.

In the AGL medium of carbamate pesticide groups generally highly was dissolved and turned into other products and was determined that carbamate pesticides bound to N-phenyl and N-methyl were not affected by the AGL medium.

Organochlorinated pesticides were determined to vary between 50-25% in the AGL medium. It was determined that pesticides with Trizalo and Triazine groups were generally not affected by the AGL medium. When looking at other groups (Imidazole, Uracil, Pyrethroid, Strobilurin) pesticides, the change rates chemical structure, water-solubility, pKa values, bond structure, etc., it was observed that it changed depending on the reasons.

Zawiyah et al. in a study did in (2007); they had been examined Organochlorine and Pyrethroid group pesticide residues in fruit and vegetable samples collected from the markets in Malaysia. It determined the active substance of Cypermethrin as an average of 0.47 mg kg<sup>-1</sup> in 38 of 302 vegetable

samples. They stated that the active substance found was between 0.16-1.48 mg kg<sup>-1</sup> in tomato, paprika, bean, bell pepper, and local products (Zawiyah et al., 2007).

When evaluated according to pKa values, it was determined that the active substances with small pKa values dissolved more and turned into another structure, and the active substances with large pKa values were not affected by the medium.

According to the above all evaluations, it was determined that the active substances in different classes behave differently, carbamate pesticides dissolve better in the AGL medium, organochlorinated pesticides dissolve less than according to carbamate pesticides, organophosphorus pesticides give react differently, and the triazolo and triazine group pesticides are not affected by the medium. In general, the effect of AGL on pesticides was determined that the chemical structure of the active substance, its water solubility, pKa values, open formula structure, whether it was the ring structure and, have changed as time-dependent.

## CONCLUSION

In the study carried out in AGL medium, in the analysis made for a total of 240 min every half hour of tomato sample containing pesticide active substance was observed that the active substance of Trifloxystrobin changed against time. The change in Imidacloprid active substance could not be observed. It was determined that the effect of the AGL is different for each active substance. According to the results of the study carried out with 75 active substances spiked to the tomato sample in the AGL medium; depending on time, change in the concentration of a large part of active substances was observed. It was determined that the concentrations of some pesticide active substance were not affected at all. The water solubility, polarity, pKa values, closed and open formulas of the pesticide class were determined to be effective in this medium. It is thought that detailed studies should be done about what the active substances turn into.

## Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

## Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

## REFERENCES

- Algharibeh GR, AlFararjeh MS, 2019. Pesticide residues in fruits and vegetables in Jordan using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 12: 65–73. <https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1548505>
- An X, Wu S, Guan W, Lv L, Liu X, Zhang W, Cai L, 2018. Effects of different protective clothing for reducing body exposure to chlorothalonil during application in cucumber greenhouses. *Human and Ecological Risk Assessment*, 24: 14–25. <https://doi.org/10.1080/10807039.2017.1349540>
- Arias N, Arazuri S, Jarén C, 2013. Ability of NIRS technology to determine pesticides in liquid samples at maximum residue levels. *Pest Management Science*, 69: 471–477. <https://doi.org/10.1002/ps.3392>
- Calvo H, Redondo D, Remón S, Venturini ME, Arias E, 2019. Efficacy of electrolyzed water, chlorine dioxide and photocatalysis for disinfection and removal of pesticide residues from stone fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 148: 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.10.009>
- Diop A, Diop YM, Thiaré DD, Cazierec F, Sarra OS, Kasprowiake A, Landy D, Delattre F, 2016. Monitoring survey of the use patterns and pesticide residues on vegetables in the Niayezzone, Senegal. *Chemosphere*, 144: 1715–1721.

- Elmastas A, 2018. Yaş meyve sebze ürünlerinin çeşitli koşullarda pestisit kalıntılarının LC-MS/MS ve GC-MS/MS ile analizlerinin kantitatif tayini, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi (Basılmış).
- Farajzadeh MA, Sohrabi H, Mohebbi A, 2019. Combination of modified QuEChERS extraction method and dispersive liquid-liquid microextraction as an efficient sample preparation approach for extraction and preconcentration of pesticides from fruit and vegetable samples. *Food Analytical Methods*, 12: 534–543. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1384-x>
- Farajzadeh, MA, Sohrabi H, Mohebbi A, Mogaddam MRA, 2019. Combination of a modified quick, easy, cheap, efficient, rugged, and safe extraction method with a deep eutectic solvent based microwave-assisted dispersive liquid-liquid microextraction: Application in extraction and preconcentration of multiclass pestic. *Journal of Separation Science*, 42: 1273–1280. <https://doi.org/10.1002/jssc.201801107>
- Galia E, Nicolaidis E, Hörter D, Löbenberg R, Reppas C, Dressman JB, 1998. Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs. *Pharmaceutical Research*, 15: 698-705.
- Hou J, Zhang Q, Zhou Y, Ahammed GJ, Zhou Y, Yu J, Xia X, 2018. Glutaredoxin GRXS16 mediates brassinosteroid-induced apoplastic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production to promote pesticide metabolism in tomato. *Environmental Pollution*, 240: 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.120>
- Jara EA, Winter CK, 2019. Safety levels for organophosphate pesticide residues on fruits, vegetables, and nuts. *International Journal of Food Contamination*, 6: 2–8. <https://doi.org/10.1186/s40550-019-0076-7>
- Kapsi M, Tsoutsis C, Paschalidou A, Albanis T, 2019. Environmental monitoring and risk assessment of pesticide residues in surface waters of the Louros River (N.W. Greece). *Science of the Total Environment*, 650: 2188–2198. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.185>
- Lehotay SJ, 2019. Possibilities and limitations of isocratic fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Chromatographia*, 82: 235–250. <https://doi.org/10.1007/s10337-018-3595-0>
- Ersoy N, Tekinarslan O, Akcay E, Ulas O, 2019. Determination of pesticide residues in apricot (*Prunus armeniaca L.*) grown determination of pesticide residues in apricot (*Prunus armeniaca L.*) grown at good agricultural practices (GAPs) by LC-MS/MS and GC-MS. *Erwerbs-Obstbau*, 60: 49–358. <https://doi.org/10.1007/s10341-018-0383-9>
- Song NE, Lee JY, Mansur AR, Jang HW, Lim MC, Lee Y, Nam TG, 2019. Determination of 60 pesticides in hen eggs using the QuEChERS procedure followed by LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Food Chemistry*, 298: 125050. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125050>
- Türkoz Bakırcı G, Yaman Acay DB, Bakırcı F, Ötleş S 2014. Pesticide residues in fruits and vegetables from the aegean region. *Turkey Food Chemistry*, 160: 379–392.
- Wei J, Chen Y, Tiemur A, Wang J, Wu B, 2018. Degradation of pesticide residues by gaseous chlorine dioxide on table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 137: 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.12.001>
- Wu ML, Wu YC, Chen YC, 2019. Detection of pesticide residues on intact tomatoes by carbon fiber ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411: 1095–1105. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1539-z>
- Zawiyah S, Che Man YB, Nazimah SAH, Chin CK, Tsukamoto I, Hamanyza AH, Norhaizan I, 2007. Determination of organo chlorine and pyrethroid pesticides in fruitand vegetables using SAX/PSA clean-upcolumn. *Food Chemistry*, 102: 98–103.
- Zengin E, Karaca İ, 2017. Uşak ilinde örtü altı üretimi yapılan domateslerdeki pestisit kalıntılarının belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 21: 554-559.

**Atıf İçin:** Erdem K, Bilgi Kamaç M, 2021. Kanser Biyobelirteci Alfa-Fetoprotein'in Elektrokimyasal Tayini İçin Tek Kullanımlık Etiketsiz Yeni AFP İmmünoşansörünün Geliştirilmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1279-1292.

**To Cite:** Erdem K, Bilgi Kamaç M, 2021. Development of a New Disposable Label-free AFP Immunosensor for Electrochemical Detection of Cancer Biomarker Alpha-Fetoprotein. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1279-1292.

**Kanser Biyobelirteci Alfa-Fetoprotein'in Elektrokimyasal Tayini İçin Tek Kullanımlık Etiketsiz Yeni AFP İmmünoşansörünün Geliştirilmesi**

Kadir ERDEM<sup>1</sup>, Melike BİLGİ KAMAÇ<sup>1\*</sup>

**ÖZET:** Bu çalışmada, bir kanser biyobelirteci olan alfa-fetoprotein'in (AFP) elektrokimyasal tayini için tek kullanımlık yeni etiketsiz immünoşansör geliştirilmiş ve insan kan serumu numunelerinde uygulaması gerçekleştirilmiştir. Çalışmada yüzey baskılı karbon elektrotlar (SPCE) ilk olarak indirgenmiş grafen oksit (RGO) ile modifiye edilmiş ardından elektropolimerizasyon tekniği uygulanarak elektrot yüzeyi polinötral kırmızı (PNR) ile kaplanmış, son olarak elektrodepozisyon metodu ile altın nanoparçacıklar (AuNP) yüzeyde oluşturulmuştur. SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun elektrokimyasal karakterizasyonu dönüşümlü voltametri (CV), diferansiyel puls voltametri (DPV) ve kare dalga voltametri (SWV) metotları kullanılarak yapılmıştır. SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrotların yüzeyine Anti-AFP'nin immobilizasyonu 3-merkaptopropiyonik asit (3-MPA) ve 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) karbodiimid/N-hidroksisüksinimid (EDC/NHS) kullanılarak kovalent bağlama yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan AFP immünoşansörünün optimum çalışma parametreleri DPV ve SWV metotları ile belirlenmiştir. DPV ve SWV metotları ile belirlenen doğrusal tayin aralıkları 1-500 ng mL<sup>-1</sup>, tespit limitleri ise sırasıyla 0.79 ng mL<sup>-1</sup> ve 0.86 ng mL<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. AFP immünoşansörünün tekrarlanabilirliği 50 ng mL<sup>-1</sup> AFP konsantrasyonu için test edilmiş ve bağıl standart sapma (R.S.D.) değerleri DPV ve SWV metotları için sırasıyla %4.06 (n=10) ve %3.68 (n=10) olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen AFP immünoşansörünün uygulama kararlılığı 60 gün boyunca, depolama kararlılığı ise 12 hafta depolama süresince voltametrik metotlarla incelenmiştir. Hazırlanan AFP immünoşansörleri insan serumu örneklerine bilinen miktarda ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki AFP'nin analizi için kullanılmış ve %95'in üstünde geri kazanımlar elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Elektrokimyasal AFP immünoşansörü, kanser biyobelirteci, indirgenmiş grafen oksit, polinötral kırmızı, altın nanopartikül, yüzey baskılı karbon elektrotlar

**Development of a New Disposable Label-free AFP Immunosensor for Electrochemical Detection of Cancer Biomarker Alpha-Fetoprotein**

**ABSTRACT:** In this study, a new disposable label-free immunosensor was developed for the electrochemical determination of alpha-fetoprotein (AFP) that is a cancer biomarker and its application was performed on human blood serum samples. In the work, firstly the screen printed carbon electrodes (SPCE) were modified with reduced graphene oxide (RGO), then the electrode surface was coated with polynuclear red (PNR) by applying the electropolymerization technique and finally, gold nanoparticles (AuNP) were created by electrodeposition method on the surface. Electrochemical characterizations of the SPCE/RGO/PNR/AuNP electrode were performed using cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV), and square wave voltammetry (SWV) methods. Immobilization of Anti-AFP to the surface of SPCE/RGO/PNR/AuNP electrodes was carried out by a covalent binding method using 3-mercaptopropionic acid (3-MPA) and 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS). The optimum working parameters of the prepared AFP immunosensor were determined by DPV and SWV methods. It was calculated that the linear range was 1-500 ng mL<sup>-1</sup>, the limit of detections was 0.79 ng mL<sup>-1</sup>, and 0.86 ng mL<sup>-1</sup>, respectively. The reproducibility of the AFP immunosensor was tested for 50 ng mL<sup>-1</sup> AFP concentration and relative standard deviation (R.S.D.) values were calculated as 4.06% (n = 10) and 3.68% (n = 10) for DPV and SWV methods, respectively. The operation stability of the developed AFP immunosensor was examined by voltammetric methods for 60 days, and the storage stability for 12 weeks. The prepared AFP immunosensors were used for the analysis of different concentrations of AFP added to the human serum samples in a known amount and over 95% recoveries were obtained.

**Keywords:** Electrochemical AFP immunosensor, cancer biomarker, reduced graphene oxide, polynuclear red, gold nanoparticle, screen-printed carbon electrodes

<sup>1</sup> Kadir ERDEM ([Orcid ID: 0000-0002-9146-0226](https://orcid.org/0000-0002-9146-0226)), Melike BİLGİ KAMAÇ ([Orcid ID: 0000-0002-3381-7522](https://orcid.org/0000-0002-3381-7522)), Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Çankırı, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Melike BİLGİ KAMAÇ, e-mail: melikebilgikamac@gmail.com

Bu çalışma Kadir ERDEM'in Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir. Makalede yer alan çalışmaların bir kısmı 8-11 Temmuz 2019 tarihlerinde Çanakkale'de düzenlenen "4th International Congress on Biosensor" de poster olarak sunulmuştur.

## GİRİŞ

Molekül ağırlığı yaklaşık 70 kDa olan alfa-feto protein (AFP), 590 çeşit aminoasit içeren ve yaklaşık %3.4 karbonhidrattan oluşan bir onkofetal glukoproteindir (Zhou ve ark., 2018). Karaciğer, testis ve heptosellular kanserinde (HCC), vitellus kesesi ve diğer kötü huylu tümörlerde bulunur. HCC hastalarının kanında %75-80 oranında AFP bulunduğu bilinmektedir. AFP; endoderm kanser, teratoma, yumurtalık kanseri ve mide kanserinden karaciğer kanserine geçiş aşamalarında da görülür (Tang ve Ma, 2017). Gebelik döneminde düşük ve down sendromu gibi yaşanan olumsuz vakalarda da AFP miktarının artış gösterdiği tespit edilmiştir (Yuan ve ark., 2019). Karaciğer kanserinin teşhisi ve tedavisi için AFP her zaman hayati ve çok özel bir biyobelirteç olarak kabul edilir. Sağlıklı insan serumunda, AFP konsantrasyonu genellikle  $20 \text{ ng mL}^{-1}$ 'den düşükken, karaciğer kanseri hastalarında bu değer  $20 \text{ ng mL}^{-1}$ 'den önemli ölçüde fazladır (Wu ve ark., 2019). Bu nedenle, kan serumundaki AFP seviyesinin tespiti büyük önem taşımaktadır. AFP'nin hassas ve seçici tayini için güvenilir metotların geliştirilmesi gerekmektedir. Çeşitli tayin metotları arasında, AFP'nin kantitatif tespiti için floresans spektroskopisi (Fang ve ark., 2018), kemilüminesans (Fan ve ark., 2014), elektrokemilüminesans (Liang ve ark., 2018), enzim-bağlı immunosorbent assay (ELISA) (Preechakasedkit ve ark., 2018), yüzey plazmon rezonansı (Wangkam ve ark., 2016), elektrokimyasal immünoensing (Yang ve ark., 2018; Li ve ark., 2018) ve fotoelektrokimyasal algılama (Zhou ve ark. 2018) gibi bir dizi yöntem önerilmiştir. Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında, elektrokimyasal immünoensörlerin ekonomik, hassas, taşınabilir ve kolay kullanım gibi birçok avantajı vardır ve yaygın olarak kullanılmaktadır (Bahadır ve Sezgintürk, 2015). Etiketli immünoensörler, uygulanan etiketin analitik özellikleri nedeniyle son derece hassas olmasına karşın zaman alıcı ve maliyetinin yüksek olması gibi dezavantajlara sahiptir. Etiketsiz immünoensörler, immünokompleks oluşumu sırasında fiziksel değişiklikleri algılayabilir, daha hassas ve çok yönlü tespitlere izin verir. Etiketsiz immünoensörler, potansiyel basitliği ve ekonomikliği ile immüno analiz sistemlerinde daha çok tercih edilir (Diaconu ve ark., 2013). Canlı serumunda AFP tayini için birçok etiketsiz elektrokimyasal immünoensör geliştirilmiştir (Wu ve ark., 2019; Liu ve ark., 2019; Lan ve ark., 2020; Jothi ve ark., 2020).

Grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksitin (RGO), kolay sentezlenebilmesi, suda iyi çözünebilmesi, biyoyuumluluğu ve yüksek yüzey alanı gibi özellikleri nedeniyle biyosensör üretimi, hücre sel görüntüleme ve ilaç salınımı alanlarında potansiyel uygulamaları vardır (Zhou ve ark., 2019). Grafen, GO ve RGO sensör ve biyosensörlerde elektronik iletkenliği artırmak ve biyomateryalin immobilizasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır (Li ve ark., 2018; Yang ve ark., 2018). Nötral kırmızı (NR), virüsler gibi biyolojik materyalleri incelemek için bir renklendirici, biyokimyasal sistemlerde pH indikatörü, optik veya elektrokimyasal metotlar kullanarak DNA'nın incelenmesi gibi çeşitli amaçlarla kullanılan bir fenazin boyasıdır (Pauliukaite ve Brett, 2008). Son zamanlarda polinötral kırmızı (PNR), sensor ve biyosensörlerde hem iletken polimer hem de redoks medyatörü olarak kullanılan bir polimerdir (Attar ve ark., 2014; Sahin ve Ayrancı, 2015; Bilgi ve Ayrancı, 2016). Altın nanopartiküller (AuNP), yüksek yüzey/hacim oranına sahip olması, yüksek anodik potansiyellerde çalışma ihtiyacını ortadan kaldırması ve biyoyuumluluk gibi özellikleri nedeniyle elektrokimyasal sensör ve biyosensörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Putzbach ve Ronkainen, 2013; Bilgi ve Ayrancı, 2018). Yüzey baskılı elektrotlar (SPE), çeşitli inert substratlar üzerine farklı iletken veya yalıtkan mürekkep katmanlarının ardışık olarak yerleştirilmesini temel alır. SPE'lerin çok yönlü modifikasyona uygun olması, doğrudan yerinde ölçüm yapabilme imkanı sunması, tek kullanımlık olması, hızlı ve basit olması, düşük maliyet gerektirmesi ve hasta başı testlere uygun olması gibi birçok avantajı vardır (Fanjul-Bolado ve ark., 2007; Tudorche ve Bala, 2007).

Elektrokimyasal AFP immünoensörleri ile ilgili çok sayıda araştırma bulunmasına rağmen, RGO, PNR ve AuNP ile modifiye edilmiş tek kullanımlık SPCE elektrotları ile hazırlanan düşük maliyetli, pratik, hazırlanması kolay ve etiketsiz elektrokimyasal AFP immünoensörü literatürde yer almamaktadır. Bu çalışmada geliştirilen AFP immünoensörünün analitiksel performansı DPV ve SWV metotları ile incelenmiş, seçicilik testleri yapılmış, uygulama ve depolama kararlılıkları incelenmiştir. AFP immünoensörünün uygulanabilirliği insan kan serumu numunelerinde denenmiştir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Anti-AFP ve AFP Novus Biologicals USA firmasından, indirgenmiş grafen oksit (RGO), H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> (kloroaurik asit), sığır serum albümin (BSA), EDC (1-Etil,3-[3-dimetilaminopropil] karbodiimid), NHS (N-hidroksisüksinimid), insan serumu (erkek AB pıhtılaşmış tam kandan, H6914), potasyum heksosiyanoferrat (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) potasyum heksosiyanoferrit (K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>), sodyum hidroksit (NaOH) Sigma-Aldrich firmasından, 3-merkaptopropiyonik asit (3-MPA), nötral kırmızı (NR), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (potasyum dihidrojen fosfat), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (dipotasyum hidrojen fosfat), KCl (potasyum klorür), dimetil formamid (DMF), hidroklorik asit (%37'lik) ve etanol Merck firmasından tedarik edilmiştir. Kullanılan tüm kimyasallar yüksek analitik saflıktadır. Deneylerde Millipore Milli-Q Direct Q-3 ultra saf su cihazından elde edilen su kullanılmıştır. İstenilen pH'da tampon çözelti hazırlamak için, standart tampon çözeltilerle kalibre edilmiş Mettler Toledo pH-metre kullanılmıştır. Tüm çözeltiler 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmıştır.

### Elektrokimyasal ölçümler

Tek kullanımlık yüzey baskılı karbon elektrotlar (SPCE) DropSens (Oveido, İspanya) firmasından temin edilmiştir. SPCE'lerin çalışma elektrodu (4 mm) ve karşıt elektrodu karbondan, referans elektrodu ise Ag/AgCl'den (0.1 M KCl) oluşmaktadır. Elektrotların potansiyostata (DropSens µStat 400 Bipotantiostat/Galvanostat, Oveido, İspanya) bağlantısı DropSens'ten temin edilmiş konnektörler ile sağlanmıştır. Tüm elektrokimyasal ölçümler, cihazın sinyalleri DropView 8400 yazılımı ile değerlendirilen bilgisayar kontrollü DropSens µStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat ile gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal ölçümler ve deneyler en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

### SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrotlarının hazırlanması

0.5 mg RGO ve 1.0 mL DMF:H<sub>2</sub>O (1:1) karışımına 3 saatlik sonikatör uygulamasıyla kararlı ve homojen bir süspansiyon hazırlanmıştır. Disperse edilmiş RGO'dan SPCE'lerin çalışma elektrodunun yüzeyine 2 µL damlatılmış ve karanlıkta kapalı ortamda oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır (SPCE/RGO) (Altun ve ark., 2020; Bilgi Kamaç ve ark., 2020a; 2020b). Daha sonra SPCE/RGO'ların üzerinde PNR oluşumu için, 0.025 M pH 5.5 fosfat tamponu (0.1 M KNO<sub>3</sub>) içerisinde hazırlanan 1.0 mM monomer nötral kırmızı çözeltisine 50 mV s<sup>-1</sup> tarama hızında -1.0 V ile +0.9 V potansiyel aralığında 15 döngü dönüşümlü voltametri uygulanmıştır (Attar ve ark., 2014; Altun ve ark., 2020). Son olarak, SPCE/RGO/PNR'lerin üzerinde AuNP'nin hazırlanması için 4 mM H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> (50 mM pH 7.0 fosfat tamponu, 0.1 M KCl) çözeltisine 50 mV s<sup>-1</sup> tarama hızında -1.3 V ile -0.2 V potansiyel aralığında 10 döngü dönüşümlü voltametri uygulanmıştır (Sonuç Karaboğa ve Sezgintürk, 2019). Her bir modifikasyon basamağından sonra, elektrotların yüzeyi ultra saf su ile yıkanmış ve yüksek saflıktaki Ar gazı ile kurutulmuştur. Hazırlanan SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrotlarının elektrokimyasal karakterizasyonları için 5 mM [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> (1 M KCl) çözeltisinde CV, DPV ve SWV ölçümleri yapılmıştır.



### AFP immünoensörünün hazırlanması

AFP immünoensörünün hazırlanmasında, Anti-AFP'nin yüzeye immobilizasyonu için kovalent bağlama yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, SPCE/RGO/PNR/AuNP'lerin çalışma elektrotlarının yüzeyine 50 mM 3-MPA (etanolde) çözeltisinden 3 µL damlatılmış ve karanlıkta, oda sıcaklığında 1 gece bekletilmiştir (Sezgintürk, 2011). 3-MPA ile modifiye edilmiş SPCE/RGO/PNR/AuNP'lerin çalışma elektrotlarının yüzeyine 0.6 mM EDC/0.1 mM NHS çözeltisinden (pH 7.0 fosfat tamponunda) 2 µL damlatılmış ve oda sıcaklığında sabit nem ortamında 60 dk bekletilmiştir (Demirbakan ve Sezgintürk, 2020). 3-MPA ve EDC/NHS ile aktive edilmiş çalışma elektrotlarının yüzeyine 2 µL Anti-AFP çözeltisinden damlatılmış ve oda sıcaklığında sabit nem ortamında 60 dk bekletilmiştir. Anti-AFP'nin immobilizasyonundan sonra, elektrotların yüzeyine bloke edici ajan olan BSA (%1'lik, pH 7.0 fosfat tamponunda) çözeltisinden 2 µL damlatılmış ve oda sıcaklığında sabit nem ortamında 30 dk bekletilmiştir. Hazırlanan immünoensörlerin AFP analizinde kullanabilmesi için, bilinen konsantrasyondaki AFP çözeltisinden 2 µL damlatılmış ve oda sıcaklığında sabit nem ortamında 15 dk bekletilmiştir. AFP immünoensörlerinin her bir hazırlanma basamağından sonra, elektrotların yüzeyi ultra saf su ile yıkanmış ve yüksek saflıktaki Ar gazı ile kurutulmuştur. Hazırlanan AFP immünoensörünün elektrokimyasal karakterizasyonları için, 50 µg mL<sup>-1</sup> AFP konsantrasyonunda hazırlanan immünoensörler ile 5 mM [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4</sup> (1 M KCl) çözeltisinde CV, DPV ve SWV ölçümleri yapılmıştır. AFP immünoensörünün optimum çalışma parametrelerinin belirlenmesi için antikor konsantrasyon optimizasyonu, antikor ve antijen inkübasyon süre optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

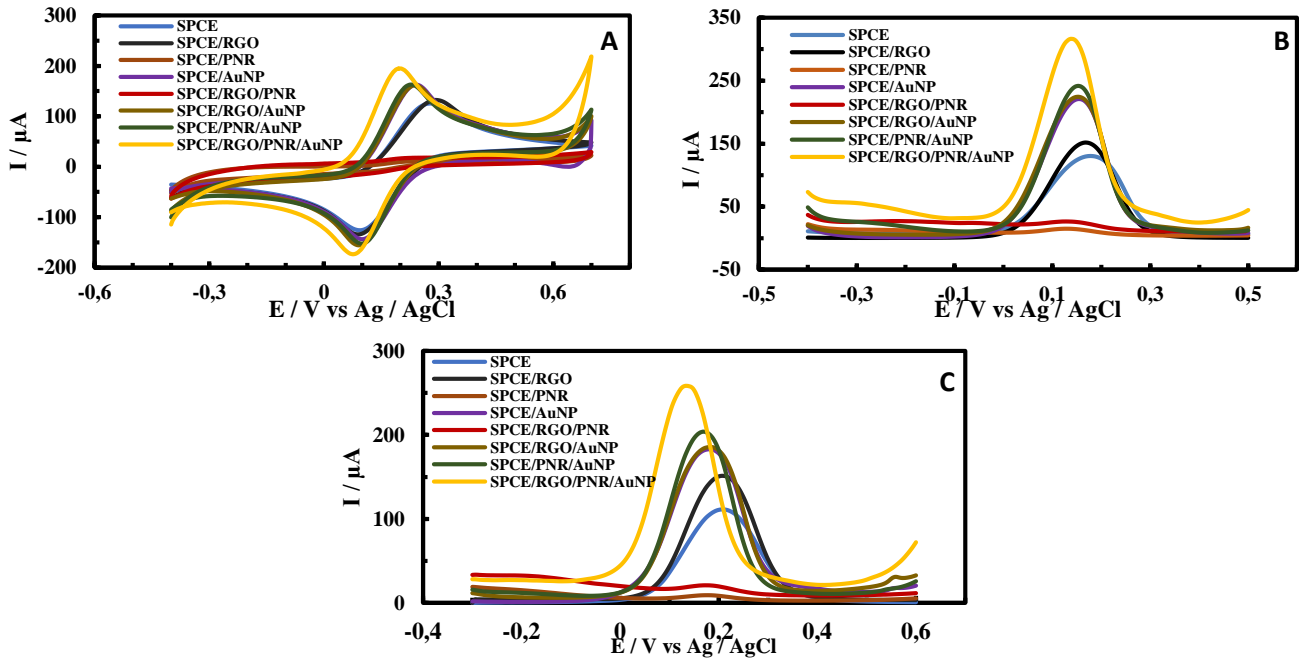
### BULGULAR VE TARTIŞMA

#### SPCE/RGO/PNR/AuNP Elektrodunun Elektrokimyasal Karakterizasyonu

SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun formülasyonunda yer alan nanomateryallerin ve iletken redoks polimerinin etkisini incelemek için SPCE, SPCE/RGO, SPCE/PNR, SPCE/AuNP, SPCE/RGO/PNR, SPCE/RGO/AuNP, SPCE/PNR/AuNP ve SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrotları ile 5 mM [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4</sup> (1 M KCl) çözeltisinde CV, DPV ve SWV ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen voltamogramlar Şekil 1A, 1B ve 1C'de, voltamogramlardan elde edilen pik akım değerleri ise Çizelge 1'de verilmiştir. SPCE üzerine RGO'nun modifikasyonu ile yalın SPCE elektroduna göre her üç metotta da elektronik iletkenliğin artışıyla birlikte pik akım değerlerinin arttığı görülmektedir (CV, DPV ve SWV için pik akım yükseklikleri farkı (ΔI) değerleri sırasıyla 3.2 µA, 35.8 µA ve 37.7 µA). RGO, elektronik iletkenliği artırıcı yönde etki etmiştir. SPCE yüzeyine sadece NR'nin elektropolimerizasyonu sonrasında elde edilen SPCE/PNR elektrodunda tüm metotlarda pik akım değerlerinin belirgin derecede azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar PNR'nin elektrot yüzeyine kaplandığını ve polimerin film kalınlığa bağlı olarak difüzyonu azaltıcı etki yaptığını göstermektedir. SPCE üzerine AuNP'nin modifikasyonu ile oluşan SPCE/AuNP elektrodunda elde edilen pik akım değerlerinin (CV, DPV ve SWV için ΔI değerleri sırasıyla 148.1 µA, 215.1 µA ve 175.0 µA) yalın SPCE, SPCE/RGO ve SPCE/PNR elektrotlarına göre önemli ölçüde arttığı görülmüştür. Yalın SPCE'ye göre CV, DPV ve SWV için ΔI değerleri sırasıyla 22.3 µA, 28.2 µA ve 27.2 µA'dır. Bu sonuçlara göre AuNP, RGO'ya göre elektronik iletkenliği daha fazla arttırmıştır. SPCE/PNR'ye göre CV, DPV ve SWV için ΔI değerleri ise sırasıyla 143.2 µA, 206.8 µA ve 170 µA'dır. SPCE/RGO/PNR elektrodunda elde edilen pik akım değerleri, SPCE/PNR elektrodunda elde edilen pik akım değerlerine yakın, SPCE/RGO elektrodunda elde edilen değerlerden oldukça düşüktür (Çizelge 1). RGO elektronik iletkenliği SPCE'ye göre belirgin derecede artırırken, aynı etki SPCE/RGO/PNR'de gözlenememiştir. Bu sonuçlara göre SPCE/RGO/PNR elektrodunda da

**Kanser Biyobelirteci Alfa-Fetoprotein'in Elektrokimyasal Tayini İçin Tek Kullanımlık Etiketsiz Yeni AFP İmmünoensörünün Geliştirilmesi**

yüzeyde oluşan polimer film tabakası nedeniyle PNR difüzyonu azaltıcı yönde etki etmiştir. PNR'nin yer aldığı diğer elektrot olan SPCE/PNR/AuNP elektrodunda ise, pik akım değerlerinin hem SPCE/PNR (CV, DPV ve SWV için  $\Delta I$  değerleri sırasıyla 149.2  $\mu\text{A}$ , 223.4  $\mu\text{A}$  ve 189.4  $\mu\text{A}$ ) hem de SPCE/AuNP'ye (CV, DPV ve SWV için  $\Delta I$  değerleri sırasıyla 6.0  $\mu\text{A}$ , 16.6  $\mu\text{A}$  ve 19.4  $\mu\text{A}$ ) göre arttığı Şekil 1A, 1B ve 1C'deki voltamogramlardan ve Çizelge 1'den anlaşılmaktadır. PNR ve AuNP birlikte sinerjik bir etki göstermiş ve elektronik iletkenliği artırmıştır. SPCE/RGO/AuNP elektrodunun pik akım değerleri ise, SPCE/RGO (CV, DPV ve SWV için  $\Delta I$  değerleri sırasıyla 27.5  $\mu\text{A}$ , 29.5  $\mu\text{A}$  ve 46.6  $\mu\text{A}$ ) ve SPCE/AuNP'ye (CV, DPV ve SWV için  $\Delta I$  değerleri sırasıyla 5.2  $\mu\text{A}$ , 1.3  $\mu\text{A}$  ve 19.4  $\mu\text{A}$ ) göre daha fazladır. Bu durum RGO ve AuNP'nin birlikte sinerjik bir etki yaparak elektronik iletkenliği artırdığını göstermektedir. SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunda ise tüm metodlarda elde edilen pik akım değerleri incelendiğinde, en yüksek değerlere ulaşıldığı anlaşılmaktadır. RGO, PNR ve AuNP materyallerinin hepsinin elektrot formülasyonunda yer alması sinerjik bir etki yaratarak elektronik iletkenliği oldukça fazla artırmıştır (Şahin ve Ayrancı, 2015; Bilgi Kamaç ve ark., 2020a; 2020b).



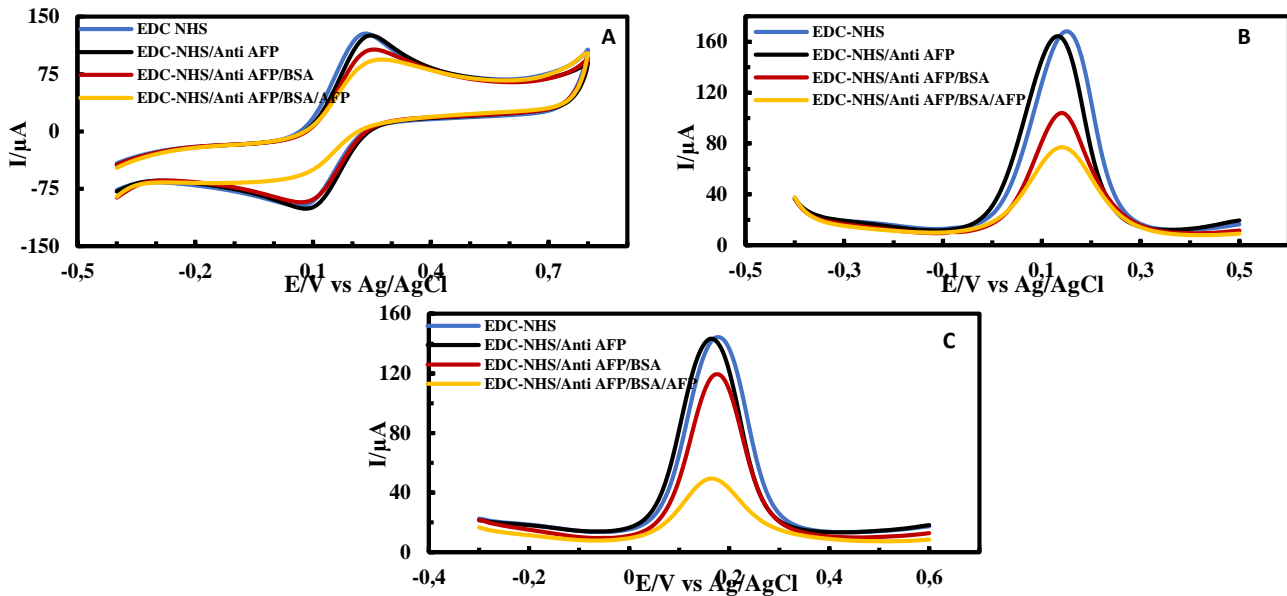
**Şekil 1.** (A) SPCE, SPCE/RGO, SPCE/PNR, SPCE/AuNP, SPCE/RGO/PNR, SPCE/RGO/AuNP, SPCE/PNR/AuNP ve SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrotlarının 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$  (1 M KCl) çözeltisinde -0.4 V ile +0.7 V potansiyel aralığında elde edilen dönüşümlü voltamogramları (srate: 50  $\text{mV s}^{-1}$ ), (B) -0.4 V ile +0.5 V potansiyel aralığında elde edilen diferansiyel puls voltamogramları ( $E_{\text{puls}}$ : 70 mV,  $t_{\text{puls}}$ : 0.1 s,  $E_{\text{step}}$ : 5 mV, srate: 10  $\text{mV s}^{-1}$ ), (C) -0.3 V ile +0.6 V potansiyel aralığında elde edilen kare dalga voltamogramları ( $E_{\text{step}}$ : 5 mV,  $E_{\text{amp}}$ : 25 mV, Freq: 5 Hz)

**Çizelge 1.** SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun hazırlanma basamaklarında CV, DPV ve SWV'lerden elde edilen pik akımı yükseklikleri

| Elektrot türü     | CV ( $\mu\text{A}$ ) | DPV ( $\mu\text{A}$ ) | SWV ( $\mu\text{A}$ ) |
|-------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| SPCE              | 122.6±0.26           | 151.1±0.23            | 110.1±0.24            |
| SPCE/RGO          | 125.8±0.41           | 186.9±0.34            | 147.8±0.37            |
| SPCE/PNR          | 4.9±0.07             | 8.3±0.06              | 5.0±0.09              |
| SPCE/AuNP         | 148.1±0.14           | 215.1±0.17            | 175.0±0.12            |
| SPCE/RGO/PNR      | 5.1±0.13             | 9.0±0.11              | 7.3±0.08              |
| SPCE/RGO/AuNP     | 153.3±0.56           | 216.4±0.49            | 175.3 ±0.51           |
| SPCE/PNR/AuNP     | 154.1±0.43           | 231.7±0.39            | 194.4±0.41            |
| SPCE/RGO/PNR/AuNP | 170.0±0.71           | 288.2±0.68            | 234.0±0.66            |

### AFP İmmünoensörünün Elektrokimyasal Karakterizasyonu

AFP immünoensörünün elektrokimyasal karakterizasyonu için  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  AFP konsantrasyonunda hazırlanan immünoensörler ile  $5 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$  ( $1 \text{ M KCl}$ ) çözeltisinde CV, DPV ve SWV ölçümleri yapılmıştır. AFP immünoensörünün hazırlanma basamaklarına ait CV, DPV ve SWV'ler sırasıyla Şekil 2A, 2B ve 2C'de, voltamogramlardan elde edilen pik akım değerleri ise Çizelge 2'de verilmiştir. Anti-AFP'nin elektrot yüzeyine tutuklanması sonrasında EDC-NHS/Anti-AFP elektrodunun pik akım değerleri üç metotta da azalmıştır. Bu azalışın nedeni, antikorun elektrodun yüzeyini EDC-NHS basamağına göre daha yalıtkan hale getirmesi ve sonrasında elektronların elektrot yüzeyine difüzyonunu azaltmasıdır. Bu sonuç, anti-AFP'nin elektrot yüzeyine başarılı bir şekilde kovalent bağlandığını göstermektedir. BSA bloklama ajanının modifikasyonu sonrasında ise her üç metottan elde edilen değerlere göre EDC-NHS/Anti-AFP/BSA immünoensörünün yüzeyinde, EDC-NHS/Anti-AFP elektroduna göre daha yalıtkan bir tabaka oluşmuş ve bunun sonucu olarak da elektronların elektrot yüzeyine difüzyonu azalmıştır. Elektron difüzyonunun azalması ile pik akım değerleri de azalmıştır. Son basamakta ise AFP'nin immünoensör yüzeyine immobilizasyonu ile AFP immünoensörünün yalıtkanlığı daha da artmış, iletkenliği azalmış ve pik akım değerleri de azalma göstermiştir (Aydın ve Sezgintürk, 2017; Demirbakan ve Sezgintürk, 2020). Bu sonuçlar AFP immünoensörünün başarılı bir şekilde hazırlandığını göstermektedir.



Şekil 2. AFP immünoensörünün hazırlanma basamaklarının  $5 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$  ( $1 \text{ M KCl}$ ) çözeltisinde (A)  $-0.4 \text{ V}$  ile  $+0.8 \text{ V}$  potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (strate:  $50 \text{ mV s}^{-1}$ ), (B)  $-0.4 \text{ V}$  ile  $+0.5 \text{ V}$  potansiyel aralığında elde edilen diferansiyel puls voltamogramları ( $E_{\text{puls}}: 70 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{puls}}: 0.1 \text{ s}$ ,  $E_{\text{step}}: 5 \text{ mV}$ , strate:  $10 \text{ mV s}^{-1}$ ), (C)  $-0.3 \text{ V}$  ile  $+0.6 \text{ V}$  potansiyel aralığında elde edilen kare dalga voltamogramları ( $E_{\text{step}}: 5 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{amp}}: 25 \text{ mV}$ , Freq:  $5 \text{ Hz}$ )

Çizelge 2. AFP immünoensörünün hazırlanma basamaklarında CV, DPV ve SWV'lerden elde edilen pik akımı yükseklikleri

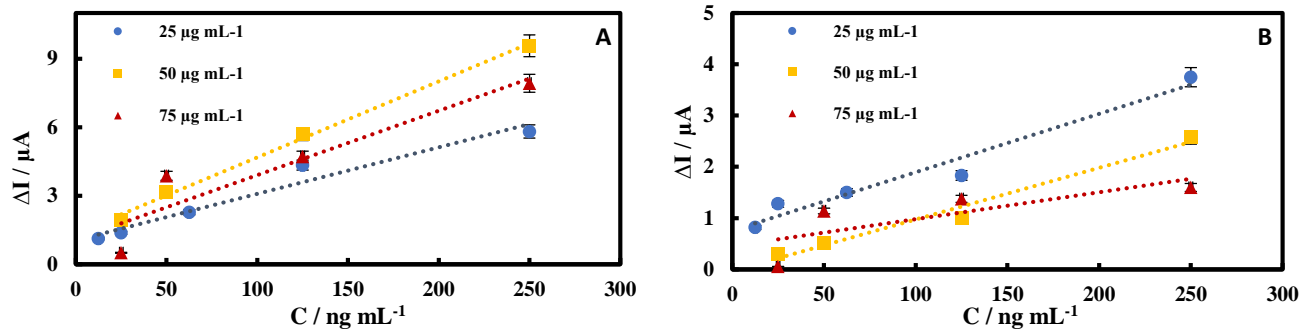
| Elektrot türü            | CV ( $\mu\text{A}$ ) | DPV ( $\mu\text{A}$ ) | SWV ( $\mu\text{A}$ ) |
|--------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| EDC-NHS                  | $110.4 \pm 0.30$     | $155.6 \pm 0.27$      | $130.8 \pm 0.23$      |
| EDC-NHS/Anti-AFP         | $108.4 \pm 0.39$     | $152.4 \pm 0.32$      | $129.7 \pm 0.33$      |
| EDC-NHS/Anti-AFP/BSA     | $90.1 \pm 0.24$      | $94.2 \pm 0.22$       | $109.4 \pm 0.21$      |
| EDC-NHS/Anti-AFP/BSA/AFP | $72.6 \pm 0.18$      | $68.1 \pm 0.16$       | $41.7 \pm 0.13$       |

### AFP İmmünoensörünün Optimum Çalışma Parametrelerinin Belirlenmesi

Anti-AFP antikor konsantrasyonunun optimizasyonu için üç farklı anti-AFP konsantrasyonuna ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  ve  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) sahip AFP immünoensörleri hazırlanmıştır. Hazırlanan AFP

**Kanser Biyobelirteci Alfa-Fetoproteinin Elektrokimyasal Tayini İçin Tek Kullanımlık Etiketsiz Yeni AFP İmmünoensörünün Geliştirilmesi**

immünoensörleri farklı konsantrasyonlardaki AFP'nin analizi için kullanılmıştır. Bu amaçla farklı AFP immünoensörlerinin 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$  (1 M KCl) çözeltisinde DPV ve SWV metotları ile farklı konsantrasyonlardaki AFP antijenine karşı ölçümleri alınmıştır. DPV ve SWV ölçümlerinden elde edilen akım farkı değerlerinin farklı AFP konsantrasyon değerlerine karşı çizilen grafikleri sırasıyla Şekil 3A ve 3B'de, grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri ise Çizelge 3'te verilmiştir. En yüksek duyarlık değeri DPV metodu ile  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , SWV metodu ile  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  anti-AFP konsantrasyonunda elde edilmiş ve her iki duyarlık değerlerinin birbirine yakın olduğu görülmüştür.  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  anti-AFP konsantrasyonu için her iki metotta elde edilen korelasyon katsayısı değerleri en yüksektir. Duyarlık ve korelasyon katsayısı değerlerinin her ikisi de göz önünde bulundurulduğunda optimum anti-AFP konsantrasyonu  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Çalışmanın bundan sonraki kısımlarında AFP immünoensörleri  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  anti-AFP konsantrasyonunda hazırlanmıştır.



Şekil 3. Farklı konsantrasyonlardaki anti-AFP ile hazırlanan SPCE/RGO/PNR/AuNP/ Anti-AFP/BSA immünoensörlerinin farklı konsantrasyonlardaki AFP antijenine karşı 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$  (1 M KCl) çözeltisinde (A) DPV cevabına etkileri, (B) SWV cevabına etkileri

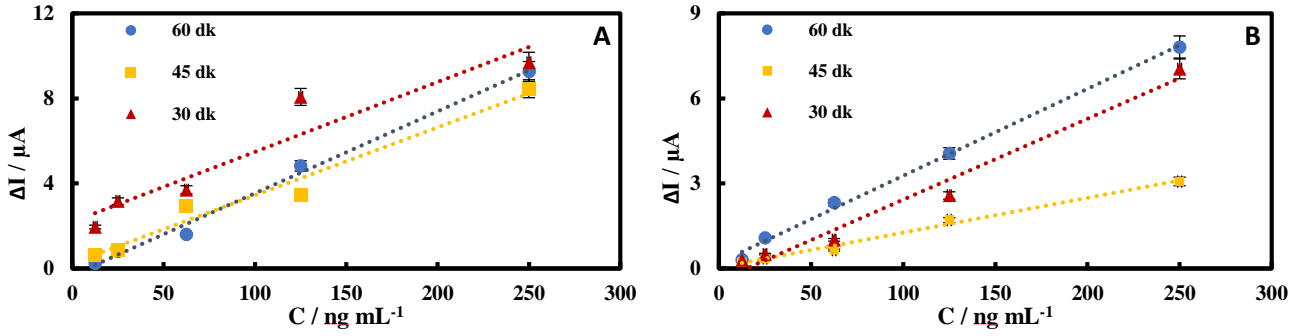
Çizelge 3. Şekil 3A ve 3B'de verilen grafiklerinden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri

| Metot | Anti-AFP konsantrasyonu ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Duyarlık ( $\mu\text{A mL ng}^{-1}$ ) | Korelasyon katsayısı (r) |
|-------|---|---------------------------------------|--------------------------|
| DPV   | 25  | $0.0204 \pm 0.0003$                   | 0.9774                   |
|       | 50  | $0.0333 \pm 0.0007$                   | 0.9981                   |
|       | 75  | $0.028 \pm 0.0005$                    | 0.9330                   |
| SWV   | 25  | $0.0114 \pm 0.0001$                   | 0.9796                   |
|       | 50  | $0.0101 \pm 0.0003$                   | 0.9898                   |
|       | 75  | $0.0053 \pm 0.0001$                   | 0.7755                   |

Optimum anti-AFP konsantrasyonunu belirledikten sonra, anti-AFP inkübasyon süresinin optimizasyonu basamağına geçilmiştir. Burada amaç, anti-AFP'nin hangi inkübasyon süresinde en verimli şekilde yüzeye bağlanabileceğini tespit etmektir. Anti-AFP inkübasyon süresinin optimizasyonu için farklı anti-AFP ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) inkübasyon sürelerinde (30, 45 ve 60 dk) AFP immünoensörleri hazırlanmıştır. Hazırlanan AFP immünoensörleri, farklı konsantrasyonlardaki AFP'nin analizi için kullanılmıştır. Farklı AFP immünoensörlerinin 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$  (1 M KCl) çözeltisinde DPV ve SWV metotları ile farklı konsantrasyonlardaki AFP antijenine karşı ölçümleri alınmıştır. DPV ve SWV ölçümlerinden elde edilen akım farkı değerlerinin farklı AFP konsantrasyon değerlerine karşı çizilen grafikleri sırasıyla Şekil 4A ve 4B'de, grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri ise Çizelge 4'te verilmiştir. DPV metodunda 30 dk ve 45 dk inkübasyon sürelerinde elde edilen duyarlık değerlerinin birbirine yakın olmasına karşın, 45 dk inkübasyon süresinde korelasyon çok daha fazladır. SWV metodunda ise 30 dk inkübasyon süresinde elde edilen duyarlık değeri 45 dk'da elde edilen değerden daha fazla olmasına karşın, korelasyon katsayısı değerleri 45 dk'da daha fazladır. Korelasyon katsayıları göz önüne alındığında 30 dk inkübasyon süresinin anti-AFP'nin immobilizasyonu için

**Kanser Biyobelirteci Alfa-Fetoprotein'in Elektrokimyasal Tayini İçin Tek Kullanımlık Etiketsiz Yeni AFP İmmünoensörünün Geliştirilmesi**

yeterince iyi olmadığını göstermektedir. 60 dk inkübasyon süresinde ise her iki metotta da en yüksek duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre optimum anti-AFP inkübasyon süresi 60 dk olarak belirlenmiştir. Literatürde de antikorların yüzeye immobilizasyonu genellikle 30 ile 60 dk arasındadır. Bulduğumuz sonuçlar literatür ile de uyumludur (Aydın ve Sezgintürk, 2017; Aydın ve ark., 2017). Çalışmanın bundan sonraki kısmında, 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  konsantrasyonundaki anti-AFP'ler 60 dk inkübe edilerek AFP immünoensörleri hazırlanmıştır.



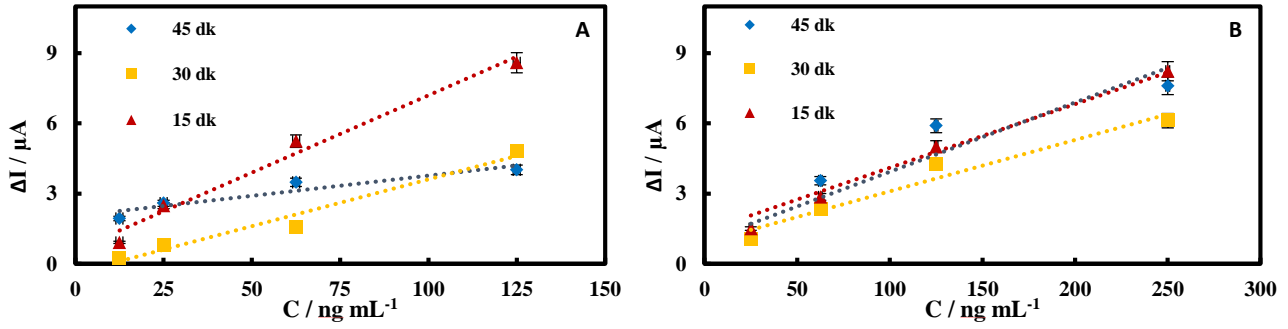
**Şekil 4.** Farklı anti-AFP inkübasyon sürelerinde hazırlanan SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünoensörlerinin farklı konsantrasyonlardaki AFP antijenine karşı 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  (1 M KCl) çözeltisinde (A) DPV cevabına etkileri (B) SWV cevabına etkileri

**Çizelge 4.** Şekil 4A ve 4B’de verilen grafiklerinden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri

| Metot | Anti-AFP inkübasyon süresi (dk) | Duyarlık ( $\mu\text{A mL ng}^{-1}$ ) | Korelasyon katsayısı (r) |
|-------|---------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| DPV   | 30                              | 0.0329±0.0006                         | 0.950                    |
|       | 45                              | 0.0320±0.0003                         | 0.986                    |
|       | 60                              | 0.0386±0.0002                         | 0.997                    |
| SWV   | 30                              | 0.0285±0.0003                         | 0.988                    |
|       | 45                              | 0.0123±0.0006                         | 0.996                    |
|       | 60                              | 0.0307±0.0001                         | 0.998                    |

Çalışmanın bu aşamasında, elektrot yüzeyine AFP antijeninin maksimum verimde bağlanabileceği inkübasyon süresi belirlenmiştir. Bu amaçla optimum şartlarda farklı AFP inkübasyon sürelerinde (15, 30 ve 45 dk) AFP immünoensörleri hazırlanmış ve farklı konsantrasyonlardaki AFP'nin analizi için kullanılmıştır. Farklı AFP immünoensörlerinin 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  (1 M KCl) çözeltisinde DPV ve SWV metotları ile farklı konsantrasyonlardaki AFP antijenine karşı ölçümleri alınmıştır. DPV ve SWV ölçümlerinden elde edilen akım farkı değerlerinin farklı AFP konsantrasyon değerlerine karşı çizilen grafikleri sırasıyla Şekil 5A ve 5B’de, grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri ise Çizelge 5’te verilmiştir. Her iki metotta da en yüksek duyarlık değeri 15 dk AFP inkübasyon süresinde elde edilmiştir. 15 dakika AFP inkübasyon süresinde DPV metodu ile elde edilen korelasyon katsayısının düşük olmasına karşın, SWV metodunda en yüksek değerdedir. DPV ve SWV metotları ile elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri göz önüne alındığında, AFP'nin tespiti için 15 dk AFP inkübasyon süresinde, immünoensörden çok daha yüksek performans elde edileceği sonucuna varılmıştır ve optimum AFP inkübasyon süresi 15 dk olarak belirlenmiştir (Aydın ve Sezgintürk, 2017; Aydın ve ark., 2017).

**Kanser Biyobelirteci Alfa-Fetoprotein'in Elektrokimyasal Tayini İçin Tek Kullanımlık Etiketsiz Yeni AFP İmmünoSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ**



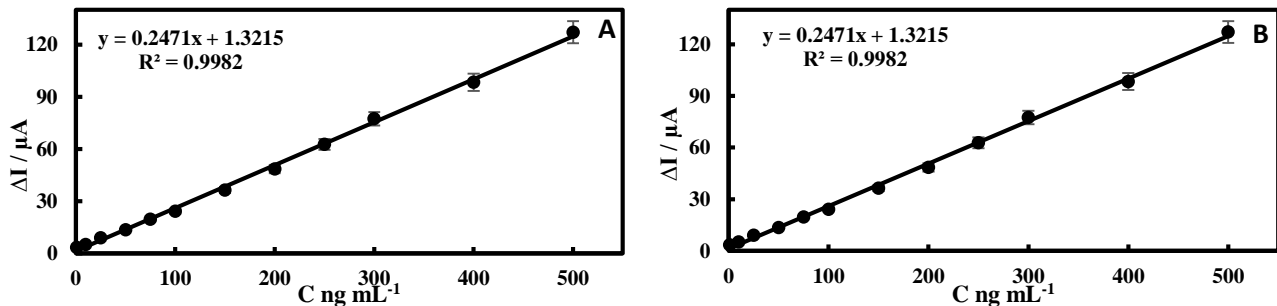
Şekil 5. AFP'nin inkübasyon sürelerinin SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünoSENSÖRÜNÜN farklı AFP antiJenine karşı 5 mM [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> (1 M KCl) çözeltisinde (A) DPV cevabına etkileri, (B) SWV cevabına etkileri

Çizelge 5. Şekil 5A ve 5B'de verilen grafiklerinden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri

| Metot | AFP'nin inkübasyon süresi (dk) | Duyarlık (μA mL ng <sup>-1</sup> ) | Korelasyon katsayısı (r) |
|-------|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| DPV   | 15                             | 0.0660±0.0006                      | 0.803                    |
|       | 30                             | 0.0400±0.0005                      | 0.996                    |
|       | 45                             | 0.0173±0.0004                      | 0.936                    |
| SWV   | 15                             | 0.0296±0.0005                      | 0.997                    |
|       | 30                             | 0.0220±0.0002                      | 0.980                    |
|       | 45                             | 0.0271±0.0005                      | 0.941                    |

### Analitiksel Karakterizasyon

Sağlıklı insan serumunda AFP seviyesi 25 ng mL<sup>-1</sup>'den daha düşük bir konsantrasyondadır. Ancak yaklaşık %75 HCC hastasında 500 ng mL<sup>-1</sup>'ye yükselir (Li ve ark., 2018; Wu ve ark., 2019). Çalışmamızda optimum şartlarda hazırlanan AFP immünoSENSÖRlerinin analitiksel performanslarının tespiti için 1-500 ng mL<sup>-1</sup> konsantrasyon aralığında artan AFP konsantrasyonuna karşı 5 mM [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> (1 M KCl) çözeltisinde DPV ve SWV metotları ile ölçüm alınarak analitiksel karakterizasyonları yapılmıştır. Artan AFP konsantrasyonuna karşı DPV ve SWV'den elde edilen pik akım değeri grafikleri sırasıyla Şekil 6A ve 6B'de verilmiştir. AFP derişimi artışı ile pik akım değeri de doğru orantılı olarak arttığı verilen grafiklerden anlaşılmaktadır. AFP'nin voltametik tayininde kullanılan SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünoSENSÖRlerinin analitiksel karakterizasyonu için duyarlık, tayin ve tespit sınırı parametreleri belirlenmiş ve Çizelge 6'da verilmiştir. Her iki metotta da yüksek duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri elde edilmiştir. AFP immünoSENSÖRÜNÜN tekrarlanabilirliği 50 ng mL<sup>-1</sup>AFP derişiminde DPV ve SWV metotları ile test edilmiş ve bağıl standart sapma (RSD) değerleri sırasıyla %4.06 (n=10) ve %3.68 (n=10) olarak hesaplanmıştır. Her iki metot verilerine göre tekrarlanabilirlik için hesaplanan RSD değerleri, 10 tekrara kadar AFP tayininin iyi olduğunu göstermektedir.



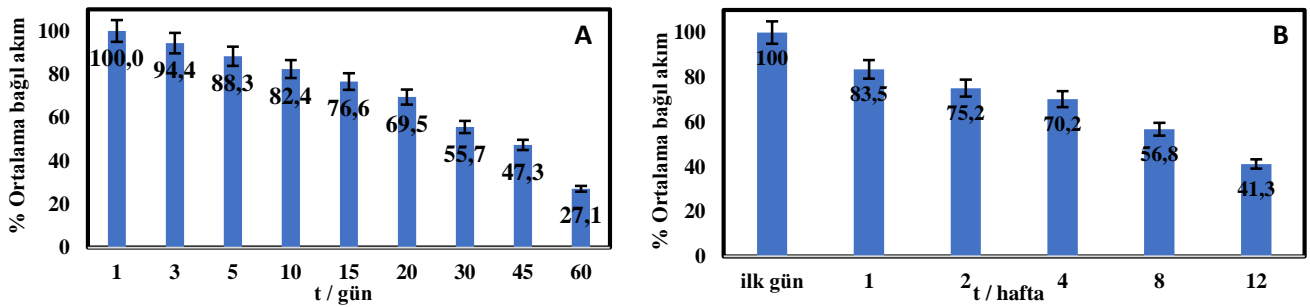
Şekil 6. AFP immünoSENSÖRÜ ile 1-500 ng mL<sup>-1</sup> konsantrasyon aralığında artan AFP derişimine karşı (A) DPV (B) SWV'den elde edilen pik akım değeri grafikleri

**Kanser Biyobelirteci Alfa-Fetoprotein'in Elektrokimyasal Tayini İçin Tek Kullanımlık Etiketsiz Yeni AFP İmmünoensörünün Geliştirilmesi**

**Çizelge 6.** AFP'nin tayini için SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünoensörleri ile elde edilen analitiksel parametreler

| Metot | Tayin aralığı               | Duyarlık                     | Tespit Limiti            | Tayin Sınırı             | Korelasyon katsayısı (r) |
|-------|-----------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| DPV   | 1 – 500 ng mL <sup>-1</sup> | 0.247 µA mL ng <sup>-1</sup> | 0.79 ng mL <sup>-1</sup> | 2.61 ng mL <sup>-1</sup> | 0.9991                   |
| SWV   | 1 – 500 ng mL <sup>-1</sup> | 0.183 µA mL ng <sup>-1</sup> | 0.86 ng mL <sup>-1</sup> | 2.84 ng mL <sup>-1</sup> | 0.9980                   |

SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünoensörünün uygulama kararlılığının tespiti için, 50 ng mL<sup>-1</sup> sabit AFP konsantrasyonunda AFP immünoensörleri hazırlanmış ve 5 mM [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> (1 M KCl) çözeltisinde 60 gün boyunca belirli aralıklarla DPV ve SWV metotları ile ölçümler yapılmıştır. AFP immünoensörleri 60 gün boyunca +4 °C'de inkübatörde bekletilmiştir. DPV ve SWV metotları ile yapılan ölçümlerden elde edilen AFP'ye karşı immünoensör cevabının ilk günlük akım ortalamasına göre yüzde bağıl akım değerleri hesaplanmış ve zamana karşı grafiği çizilmiştir (Şekil 7A). AFP immünoensörünün % ortalama bağıl akım değeri 3. günün sonunda %5.6, 10. günün sonunda %17.64, 30. günün sonunda %44.31, 60. günün sonunda %72.91 oranında azalmıştır. SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünoensörünün uygulama kararlılığı ilk kullanımdan sonra azalmış olsa da 60. güne kadar AFP için yanıt vermiştir. Tek kullanımlık olarak hazırlanan bir immünoensör için 60 gün boyunca uygulama kararlılığının iyi olduğu ve immünoensör formülasyonunda bulunan RGO, PNR ve AuNP'nin uygulama kararlılığını arttırdığı sonucuna varılabilir. SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünoensörünün depolama kararlılığını belirlemek için, optimum şartlarda 50 ng mL<sup>-1</sup> sabit AFP konsantrasyonunda hazırlanan immünoensörler -20 °C'de bekletilmiştir. AFP immünoensörlerin 5 mM [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> (1 M KCl) çözeltisinde DPV ve SWV metotları ile 12 hafta boyunca belirli aralıklarla ölçümleri yapılmıştır. Voltametik tayinler sonucu elde edilen %ortalama bağıl akım-hafta sayısı grafiği Şekil 7B'de verilmiştir. AFP immünoensörünün % ortalama bağıl akım değeri 1. haftanın sonunda ilk güne göre %16.5, 2. haftanın sonunda %24.8, 8. haftanın sonunda %43.2 ve 12. haftanın sonunda ise %58.7 azalma göstermiştir. Bu veriler, ilk güne göre bağıl akımda azalma olmasına karşın SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünoensörünün 12. haftaya kadar AFP'ye karşı yanıt verdiğini göstermektedir.



**Şekil 7.** SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünoensörünün 50 ng mL<sup>-1</sup> AFP konsantrasyonuna karşı elde edilen % ortalama bağıl akım değerlerine karşı (A) gün sayısı grafiği (B) hafta sayısı grafiği

Son yıllarda literatürde çeşitli materyallerle modifiye edilerek AFP'nin tayini için hazırlanmış olan etiketsiz immünoensörler ile bu çalışmada geliştirilmiş olan etiketsiz SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA/AFP immünoensörünün analitiksel performanslarının karşılaştırılması Çizelge 7'de verilmiştir. Çalışmamızda geliştirdiğimiz AFP immünoensörünün en uzun uygulama kararlılığına sahip olduğu görülmektedir. AFP inkübasyon süresinin ise genel olarak kısa olduğu anlaşılmaktadır. SPCE'lerin pratik, düşük maliyetli ve taşınabilir olması çalışmamızda geliştirdiğimiz etiketsiz AFP

## Kanser Biyobelirteci Alfa-Fetoprotein'in Elektrokimyasal Tayini İçin Tek Kullanımlık Etiketsiz Yeni AFP İmmünoensörünün Geliştirilmesi

immünoensörünün, hasta başı testlerde AFP tayininde kullanılmasına imkân sağlayabilir. Sağlıklı insan serumunda, AFP konsantrasyonu genellikle  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'den düşükken, karaciğer kanseri hastalarında bu değer  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'den önemli ölçüde fazladır (Wu ve ark., 2019). Literatürde yer alan bu bilgiler ışığında, bu çalışmada geliştirdiğimiz AFP immünoensörünün tayin limit aralığının ve diğer analitiksel parametrelerinin klinik açıdan AFP tespit uygulamalarında yeterli olduğu söylenebilir.

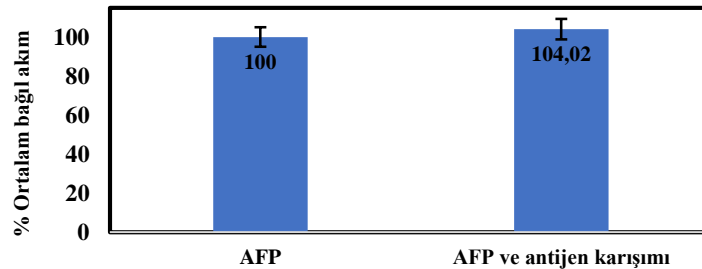
**Çizelge 7.** Son yıllarda çeşitli materyallerle modifiye edilerek AFP'nin tayini için hazırlanmış olan etiketsiz immünoensörler ile bu çalışmada geliştirilmiş olan etiketsiz AFP immünoensörünün analitiksel performanslarının karşılaştırılması

| İmmünoensör                                    | Tayin aralığı (ng mL <sup>-1</sup> ) | Tespit limiti             | Metot | Stabilite (gün) | AFP inkübasyon süresi (dk) | Referans            |
|--|--------------------------------------|---------------------------|-------|-----------------|----------------------------|---------------------|
| GCE/CNP/Anti-AFP/BSA/AFP                       | 0.005 – 1000                         | 1.9 pg mL <sup>-1</sup>   | SWV   | -               | 40                         | Idris ve ark., 2018 |
| GCE/PHEMA/RGO/AuNP/Anti-AFP/BSA/AFP            | 0.0025 – 25                          | 0.40 pg mL <sup>-1</sup>  | SWV   | 15              | 30                         | Liang ve ark., 2019 |
| SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA/AFP             | 1 - 500                              | 0.89 ng mL <sup>-1</sup>  | SWV   | 60              | 15                         | Bu çalışma          |
| SPCE/AuNP/RGO/THI/Anti-AFP/BSA/AFP             | 100 - 100000                         | 50 ng mL <sup>-1</sup>    | DPV   | -               | 60                         | Li ve ark., 2018    |
| GCE/AuNP-Dex-RGO/Anti-AFP/BSA/AFP              | 0.01 - 20                            | 0.05 pg mL <sup>-1</sup>  | DPV   | 28              | 30                         | Zhou ve ark., 2019  |
| GCE/Cu <sub>3</sub> Pt NF-RGO/Anti-AFP/BSA/AFP | 0.0001 - 10                          | 0.033 pg mL <sup>-1</sup> | DPV   | 5               | -                          | Wang ve ark., 2019  |
| SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA/AFP             | 1 - 500                              | 0.79 ng mL <sup>-1</sup>  | DPV   | 60              | 15                         | Bu çalışma          |

SPCE: yüzey baskılı karbon elektrot, GCE: camısı karbon elektrot, RGO: indirgenmiş grafen oksit, AuNP: altın nanopartikül, PNR: polinötral kırmızı, THI: tiyonin, CNP: karbon nanopartikül, Dex: dekstran, PHEMA: 2-hidroksietil metakrilat, Cu<sub>3</sub>Pt NF: Cu<sub>3</sub>Pt nano çerçeveler

### Seçicilik Testi

Optimum çalışma şartlarında geliştirilen etiketsiz SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünoensörünün seçiciliğini belirlemek için her biri  $20 \text{ ng mL}^{-1}$  konsantrasyonuna sahip olan on farklı antijen karışımı kullanılarak AFP immünoensörleri hazırlanmıştır. Karışımda yer alan antijenler HE4, CA125, AFP, MAGE1, Haptoglobin, HSP70, PAK2, SOX2, Leptin ve TRAP1'dir. Hazırlanan immünoensörler ile  $5 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$  ( $1 \text{ M KCl}$ ) çözeltilisinde DPV ve SWV ölçümleri yapılmıştır. Voltamogramlardan elde edilen % ortalama bağıl akım değerlerine karşı AFP ve antijen karışımı grafiği Şekil 8'de verilmiştir. Antijen karışımı varlığında elde edilen % ortalama bağıl akım değeri sadece AFP varlığında elde edilen değere göre %4.02 artmıştır. Antijen karışımı varlığında % ortalama bağıl akım değerindeki bu artışın %5'in altında olması, SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünoensörünün seçiciliğinin antijen karışımı varlığında iyi olduğunu göstermektedir.



Şekil 8. SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünoensörünün AFP ve farklı antijenlerin karışımına karşı elde edilen % ortalama bağıl akım grafiği

### Gerçek Numune Analizi

Geliştirdiğimiz AFP immünoensörleri gerçek numune analizinde kullanılmıştır. Sigma-Aldrich firmasından satın alınan insan serumu numunesi 1:100 oranında pH 7.4 fosfat tampon çözeltilisi ile seyreltilmiştir. İnsan serumu numunesine bilinen konsantrasyonlarda AFP ilave edilerek, AFP içeren insan serumu numuneleri hazırlanmıştır. Bilinen miktarda AFP içeren insan serumu numunelerindeki AFP'nin elektrokimyasal tayini SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA/AFP immünoensörleri kullanılarak yapılmıştır. İnsan serumu numunelerinde yapılan elektrokimyasal AFP analizinin



## Kanser Biyobelirteci Alfa-Fetoprotein'in Elektrokimyasal Tayini İçin Tek Kullanımlık Etiketsiz Yeni AFP İmmünoensörünün Geliştirilmesi

sonuçlarından elde edilen veriler Çizelge 8’de verilmiştir. Her iki metotta da yüzde hatanın %5’ten az olduğu ve geri kazanımların %95’in üstünde olduğu çizelgedeki verilerden görülmektedir. Bu sonuçlara göre, çalışmamızda geliştirdiğimiz etiketsiz AFP immünoensörleri ile insan serumu örneklerinde AFP’nin elektrokimyasal analizi, yüksek % geri kazanım ve düşük % hata değerleri ile başarılı bir şekilde yapılmıştır.

**Çizelge 8.** İnsan serumu numunelerinde AFP analizi

| Metot | Eklene AFP (ng mL <sup>-1</sup> ) | Hesaplanan AFP (ng mL <sup>-1</sup> ) | % Geri Kazanım | % Hata |
|-------|-----------------------------------|---------------------------------------|----------------|--------|
| DPV   | 5.0                               | 4.86±0.32                             | 97.2           | 2.8    |
|       | 25.0                              | 24.15±0.22                            | 96.6           | 3.4    |
|       | 250.0                             | 245.18±0.18                           | 98.1           | 1.9    |
| SWV   | 5.0                               | 4.79±0.34                             | 95.8           | 4.2    |
|       | 25.0                              | 24.32±0.26                            | 97.3           | 2.7    |
|       | 250.0                             | 244.31±0.16                           | 97.7           | 2.3    |

## SONUÇ

Karaciğer, testis ve hepetosellular kanseri (HCC) hastalarında AFP seviyelerinin takibi çok önemlidir. Bu nedenle, bu önemli biyobelirtecin analizini gerçekleştirmek için literatürde birçok biyosensör bulunmaktadır. Bu çalışmada RGO, PNR ve AuNP ile modifiye edilmiş SPCE’ler kullanılarak düşük maliyetli, pratik, tek kullanımlık ve etiketsiz elektrokimyasal AFP immünoensörü geliştirilmiştir. Geliştirilen elektrokimyasal AFP immünoensörü, 1-500 ng mL<sup>-1</sup> konsantrasyon aralığında DPV ve SWV metotları ile sırasıyla 0.79 ng mL<sup>-1</sup> ve 0.86 ng mL<sup>-1</sup> tespit limitlerinde, iyi tekrarlanabilirlik, yüksek uygulama ve depolama kararlılığı göstermiştir. İnsan serumu numunelerinde geliştirilen AFP immünoensörleri kullanılarak, AFP analizleri yapılmış ve yüksek geri kazanımlar elde edilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen pratik, tek kullanımlık, düşük maliyetli ve etiketsiz AFP immünoensörü AFP’nin klinik analizi için diğer tayin metotlarına göre iyi bir alternatif olabilir ve AFP seviyelerinin takibi için hasta başı testlerde kullanılabilir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından “FF61218209” kodlu proje ile desteklenmiştir.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması veya ortak çıkar beyan edilmemiştir.

## Yazar Katkısı

Bu çalışma Kadir ERDEM’in yüksek lisans tezidir. Araştırma fikri danışman Melike BİLGİ KAMAÇ ve yüksek lisans öğrencisi Kadir Erdem'e aittir. Melike BİLGİ KAMAÇ’ın çalışmaya destek sağlamada, etiketsiz AFP immünoensörünün hazırlanmasında ve geliştirilmesinde, deneylerin yürütülmesinde, bulguların yorumlanmasında büyük katkıları olmuştur. Kadir ERDEM deneysel çalışmalarda ve yüksek lisans tezinin yazılmasında katkıda bulunmuştur.

## KAYNAKLAR

Altun M, Bilgi Kamaç M, Bilgi A, Yılmaz M, 2020. Dopamine biosensor based on screen-printed electrode modified with reduced graphene oxide, polyneutral red and gold nanoparticle. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 100(4): 451-467.

- Attar A, Ghica ME, Amine A, Brett CM, 2014. Poly (neutral red) based hydrogen peroxide biosensor for chromium determination by inhibition measurements. *Journal of hazardous materials*, 279: 348-355.
- Aydın EB, Sezgintürk MK, 2017. A sensitive and disposable electrochemical immunosensor for detection of SOX2, a biomarker of cancer, *Talanta* 172: 162-170.
- Aydın M, Aydın EB, Sezgintürk MK, 2017. A highly sensitive immunosensor based on ITO thin films covered by a new semi-conductive conjugated polymer for the determination of TNF $\alpha$  in human saliva and serum samples, *Biosensors and Bioelectronic* 97:169-176.
- Bahadır EB, Sezgintürk, MK, 2015. Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics, *Talanta*, 132: 162-174.
- Bilgi Kamac M, Kiyamaz Onat E, Yilmaz M, 2020a. A novel non-enzymatic amperometric H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensor based on screen-printed electrode modified with reduced graphene oxide, polyneutralred and gold nanoparticles, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 100(4): 408-418.
- Bilgi Kamac M, Kiyamaz Onat E, Yilmaz M, 2020b. A new disposable amperometric NADH sensor based on screen-printed electrode modified with reduced graphene oxide/polyneutral red/gold nanoparticle, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 100(4): 419-431.
- Bilgi M, Ayrancı E, 2018. Development of amperometric biosensors using screen-printed carbon electrodes modified with conducting polymer and nanomaterials for the analysis of ethanol, methanol and their mixtures, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 823: 588-592.
- Bilgi M, Ayrancı E, 2016. Biosensor application of screen-printed carbon electrodes modified with nanomaterials and a conducting polymer: Ethanol biosensors based on alcohol dehydrogenase, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 237: 849-855.
- Demirbakan B, Sezgintürk MK, 2020. A novel ultrasensitive immunosensor based on disposable graphite paper electrodes for troponin T detection in cardiovascular disease, *Talanta*, 213: 120779.
- Diaconu I, Cristea C, Harceaga V, Marrazza G, Berindan-Neagoe I, Sandulescu R, 2013. Electrochemical immunosensors in breast and ovarian cancer, *Clinica Chimica Acta*, 425: 128-138.
- Fan F, Shen HY, Zhang GJ, Jiang XY, Kang XX, 2014. Chemiluminescence immunoassay based on microfluidic chips for  $\alpha$ -fetoprotein, *Clinica Chimica Acta*, 431: 113-117.
- Fang X, Li XQ, Wang H, Wu XM, Wang GL, 2018. Tuning surface states to achieve the modulated fluorescence of carbon dots for probing the activity of alkaline phosphatase and immunoassay of alpha-fetoprotein, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 257: 620-628.
- Fanjul-Bolado P, Queipo P, Lamas-Ardisana PJ, Costa-Garcia A, 2007. Manufacture and evaluation of carbon nanotube modified screen-printed electrodes as electrochemical tools, *Talanta*, 74: 427-433.
- Idris OA, Mabuba N, Arotiba OA, 2018. An alpha-fetoprotein electrochemical immunosensor based on a carbon/gold bi-nanoparticle platform, *Analytical Methods*, 10: 5649-5658.
- Jothi L, Jaganathan SK, Nageswaran G, 2020, An electrodeposited Au nanoparticle/porous graphene nanoribbon composite for electrochemical detection of alpha-fetoprotein, *Materials Chemistry and Physics*, 242: 122514.
- Lan Q, Shen H, Li J, Ren C, Hu X, Yang Z, 2020. Facile synthesis of novel reduced graphene oxide@ polystyrene nanospheres for sensitive label-free electrochemical immunoassay, *Chemical Communications*, 56(5): 699-702.
- Li G, Li S, Wang Z, Xue Y, Dong C, Zeng J, Huang Y, Liang J, Zhou Z, 2018. Label-free electrochemical aptasensor for detection of alpha-fetoprotein based on AFP-aptamer and thionin/reduced graphene oxide/gold nanoparticles, *Analytical Biochemistry*, 547: 37-44.
- Liang XL, Bao N, Luo XL, Ding SN, 2018. CdZnTeS quantum dots based electrochemiluminescent image immunoanalysis, *Biosensors and Bioelectronics*, 117:145-152.
- Liang Y, Zhao X, Wang N, Wang J, Chen H, Bai L, Wang W, 2019. A label-free immunosensor based on PHEMA/graphene oxide nanocomposite for simultaneous electrochemical determination of alpha fetoprotein, *RSC Advances*, 9(30): 17187-17193.

- Liu Q, Yang T, Ye Y, Chen P, Ren X, Rao A, Wan Y, Wang B, Luo Z, 2019. A highly sensitive label-free electrochemical immunosensor based on an aligned GaN nanowires array/polydopamine heterointerface modified with Au nanoparticles, *Journal of Materials Chemistry B*, 7(9): 1442-1449.
- Pauliukaite R, Brett CM, 2008. Poly (neutral red): Electrosynthesis, characterization, and application as a redox mediator. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 20(12): 1275-1285.
- Preechasedkit P, Siangproh W, Khongchareonporn N, Ngamrojanavanich N, Chailapakul O, 2018. Development of an automated wax-printed paper-based lateral flow device for alpha-fetoprotein enzyme-linked immunosorbent assay, *Biosensors and Bioelectronics*, 102:27–32.
- Putzbach W, Ronkainen, NJ, 2013. Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review, *Sensors* 13: 4811-4840.
- Sezgintürk MK, 2011. A new impedimetric biosensor utilizing vegf receptor-1 (flt-1): Early diagnosis of vascular endothelial growth factor in breast cancer, *Biosensors and Bioelectronics*, 26:10, 4032-4039.
- Sonuç Karaboğa MN, Sezgintürk MK, 2019. Cerebrospinal fluid levels of alpha-synuclein measured using a poly-glutamic acid-modified gold nanoparticle-doped disposable neurobiosensor system, *Analyst* 144: 611-621.
- Şahin M, Ayrancı E, 2015. Electrooxidation of NADH on modified screen-printed electrodes: effects of conducting polymer and nanomaterials, *Electrochimica Acta*, 166: 261-270.
- Tang Z, Ma Z, 2017. Multiple functional strategies for amplifying sensitivity of amperometric immunoassay for tumor markers: A review, *Biosensors and Bioelectronics*, 98: 100-12.
- Tudorache M, Bala C, 2007. Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388: 565-578.
- Wang AJ, Zhu XY, Chen Y, Yuan PX, Luo X, Feng JJ, 2019. A label-free electrochemical immunosensor based on rhombic dodecahedral Cu<sub>3</sub>Pt nanoframes with advanced oxygen reduction performance for highly sensitive alpha-fetoprotein detection, *Sensors and Actuators: B. Chemical* 288: 721–727.
- Wangkam T, Boonperm K, Khomkrachang P, Sriksirin T, Praphanphoj V, Sutapan B, Somboonkaew A, Amarit R, 2016. Hepatocellular carcinoma biomarker detection by surface plasmon resonance sensor, *In Advanced Materials Research*, 1131: 84–87.
- Wu Y, Wang Y, Wang X, Wang C, Li C, Wang Z, 2019. Electrochemical Sensing of  $\alpha$ -Fetoprotein Based on Molecularly Imprinted Polymerized Ionic Liquid Film on a Gold Nanoparticle Modified Electrode Surface, *Sensors*, 19(14): 3218.
- Yang SH, Zhang FF, Wang ZH, Liang QL, 2018. A graphene oxide-based label-free electrochemical aptasensor for the detection of alpha-fetoprotein, *Biosensors and Bioelectronics*, 112:186–192.
- Yuan X, Longa W, Liu J, Zhang B, Zhou W, Jiang J, Yu B, Wang H, 2019. Associations of serum markers screening for Down's syndrome with pregnancy outcomes: A Chinese retrospective cohort study, *Clinica Chimica Acta*, 489:130–135.
- Zhou J, Zhang C, Chen Y, Wang Z, Lan L, Wang Y, Han B, Pan M, Jiao J, Chen Q, 2019. A simple immunosensor for alpha-fetoprotein determination based on gold nanoparticles-dextran-reduced graphene oxide, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 833: 126-132.
- Zhou Q, Xue H, Zhang Y, Lv Y, Li H, Liu S, Shen Y, Zhang Y, 2018. Metal-free all-carbon nanohybrid for ultrasensitive photoelectrochemical immunosensing of alpha-fetoprotein, *ACS Sensors*, 3(7):1385–1391.

**To Cite:** Sunkur M, Tiğiz Z, Barış Cebe D, Aral T, 2021. Synthesis and Enantiomeric Recognition Studies of Novel C<sub>2</sub>-Symmetrical Chiral Tetra-Amide Compounds. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1293-1301,

## Synthesis and Enantiomeric Recognition Studies of Novel C<sub>2</sub>-Symmetrical Chiral Tetra-Amide Compounds

Murat SUNKUR<sup>1\*</sup>, Züleyha TİĞİZ<sup>2</sup>, Deniz BARIŞ CEBE<sup>1</sup>, Tarık ARAL<sup>1</sup>

**ABSTRACT:** Two novel C<sub>2</sub>-symmetrical chiral tetraamide compounds derived from (S)-isoleucine were synthesised and their enantiomeric recognition abilities towards enantiomers of some amino acid esters and 1-arylethylamins were examined by UV-titration method. These receptor compounds exhibited strong complexation (with K<sub>a</sub> up to 5787.23 M<sup>-1</sup>) and very good enantioselectivity (up to K<sub>a</sub><sup>S</sup>/K<sub>a</sub><sup>R</sup>= 13.98).

**Keywords:** Enantiomeric recognition, chiral amide, C<sub>2</sub>-symmetrical amino acid esters, 1-arylethylamines, molecular recognition.

<sup>1</sup> Murat SUNKUR ([Orcid ID: 0000-0002-8513-7860](https://orcid.org/0000-0002-8513-7860)), Deniz BARIŞ CEBE ([Orcid ID: 0000-0001-5860-2133](https://orcid.org/0000-0001-5860-2133)), Tarık ARAL ([Orcid ID: 0000-0002-6612-2751](https://orcid.org/0000-0002-6612-2751)), Batman Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Batman, Türkiye  
<sup>2</sup> Züleyha TİĞİZ ([Orcid ID: 0000-0002-5884-392X](https://orcid.org/0000-0002-5884-392X)), Batman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya ABD, Batman, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Murat SUNKUR, e-mail: murat.sunkur@batman.edu.tr

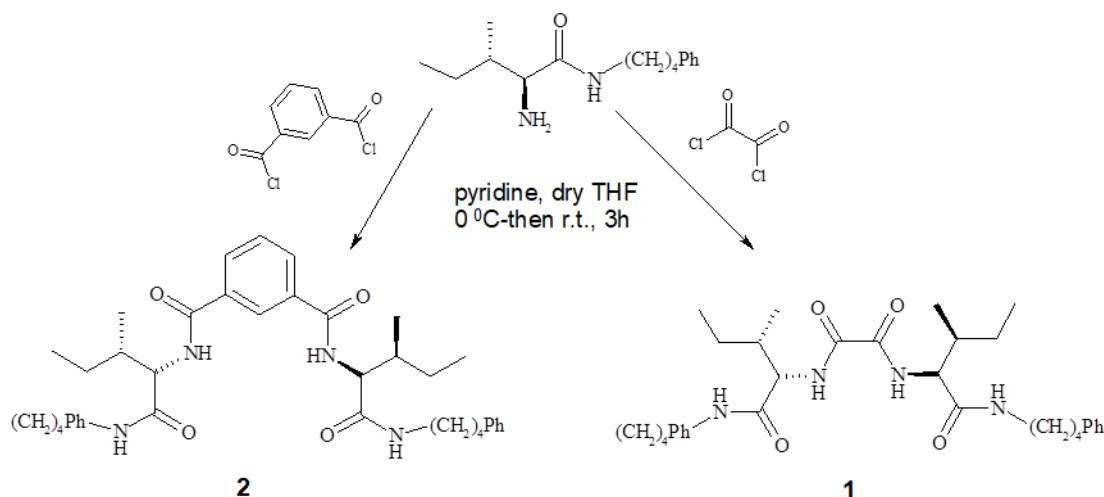
Bu çalışma Züleyha TİĞİZ'in Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

## INTRODUCTION

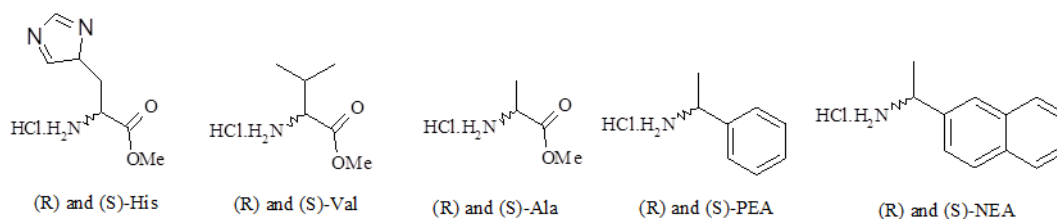
Enantiomeric recognition is a special type of molecular recognition and is based on the principle that the molecular receptor form complexes with enantiomers of a chiral molecule with different ability (Marchi-Artzner et al., 1998; Bohanon et al., 1999; Pu, 2004; Hembury et al., 2008). Enantiomeric recognition study of new model systems is essential in our understanding the selectivity of complex biological processes. Therefore, the design and synthesis of new chiral systems for small chiral molecules could contribute to offer new perspectives for the development of pharmaceuticals, enantioselective sensors, catalysts and other molecular devices (Izatt et al., 1994; Horvath et al., 2000; Tang et al., 2006; Qing et al., 2009; Demirtas et al., 2009; Su et al., 2009).

Chiral amines, protonated amines, and amino acids are the basic building blocks of a wide variety of biological processes. And also, these chiral compounds play an important role in the design and synthesis of pharmaceuticals and other chiral molecules. Therefore the enantiomeric recognition study of these compounds is of very important. The design of receptors with a chiral recognition ability for chiral amino acids and amines is still receiving considerable attention, although much work on enantiomeric recognition of amino compounds by chiral macrocyclic ligands has been reported (Chadwick et al., 1984; Diederich, 1988; Fitzmaurice et al., 2002; Karakaplan and Aral, 2005; Aydın et al., 2009; Köylü et al., 2011). Especially C<sub>2</sub>-symmetric ligands have been widely used in chiral recognition (Kizirian et al., 2003; Turgut et al., 2009). Amide units are often used as binding sites of these receptor molecules because of their high affinity towards both anions and cations due to the bearing both hydrogen bonding donor and acceptor atoms (Zhang et al., 2014).

Since the pioneering research on the application of chiral recognition reported by Cram and co-workers, great number of chiral macrocyclic and complex structured ligands have been synthesized and studied for enantiomeric recognition of racemic compounds (Nakashima et al., 2000; Lu et al., 2010; Lee et al., 2010; Deniz et al., 2011; Park et al., 2012; Sipos et al., 2012; Bako et al., 2012; Howard et al., 2013; Yi et al., 2013; Tsioupi et al., 2013; Paik et al., 2013; Guo et al., 2013; Liu et al., 2014; Şeker et al., 2014) However, in recent years non-cyclic ligands have begun to be used in enantiomeric recognition studies (Peri et al., 1998; Liu et al., 2001; Wang et al., 2007; Ballistreri et al., 2010; Aral et al., 2013; Kormos et al., 2013; Ulatowski and Jurczak, 2014; Pal et al., 2015; Forte et al., 2015; Pal et al., 2016). Still there are limited papers have been reported on the using non-cyclic ligands as chiral receptor for enantiomeric recognition of the racemic compounds.



**Figure 1.** Synthesis of C<sub>2</sub>-symmetrical chiral tetraamides.



**Figure 2.** Chiral compounds used as guests for enantiomeric recognition of receptor **1** and **2**.

We report herein a practical synthesis of two novel C<sub>2</sub>-symmetrical chiral tetra-amide ligands (**1** and **2**) starting from (*S*)-isoleucine (Figure 1) and evaluation of enantiomeric recognition properties of these ligands toward amino acid esters and 1-arylethylamines (Figure 2) by UV-Vis titration method.

## MATERIALS AND METHODS

### General

All chemicals were reagent grade unless otherwise specified. *R/S* 1-phenylethylamine and 1-(1-naphthyl)ethylamine, *R/S*-amino acid methyl ester hydrochlorides, oxalyl chloride and isophthaloyl chloride were purchased from the Sigma-Aldrich or Merck chemical company. Silica gel / TLC-cards (F<sub>254</sub>) used for thin layer chromatography (TLC) were purchased from the Merck chemical company. Melting points were determined by a Gallenkamp Model apparatus with open capillaries. Infrared Spectra were recorded on a Mattson 1000 FTIR model spectrometer. Optical rotations were taken on a Perkin Elmer 341 model polarimeter. <sup>1</sup>H (400 MHz) and <sup>13</sup>C (100 MHz) NMR spectra were recorded on a Bruker DPX-400 High Performance Digital FT-NMR Spectrometer. The chemical shifts (δ) and coupling constants (J) are expressed in parts per million and hertz.

### Syntheses

#### Receptor **1** (N<sup>1</sup>,N<sup>2</sup>-bis((1*S*,2*S*)-1-(4-phenylbutylcarbamoyl)-2-methylbutyl)oxalamide)

The oxalyl chloride solution (0.98 g, 7.75 mmol) in dry THF was added drop wise to the solution of amine (2 g, 15.5 mmol) in dry THF at 0 °C under argon atmosphere. Then, the reaction was continued to be stirred for three hours at room temperature. After the completion of reaction the mixture was extracted with 1 N HCl (2×100 mL), 10% NaHCO<sub>3</sub> (2×100 mL) and distilled water (2×100 mL). Organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and THF was evaporated by rotary evaporator under reduced pressure to obtain white solids as a pure product. Mp: 212-214 °C decomposed. [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -38.5 (c= 0.7, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 0.82-0.95 (m, 6H), 1.55-1.73 (m, 12H), 2.09-2.18 (m, 2H), 2.58-2.63 (m, 4H), 2.99-3.11 (m, 2H), 3.31-3.40 (m, 2H), 4.28 (t, J=12 Hz, 2H), 6.91 (bs, 2H, amide HN-), 7.10-7.35 (m, 10H), 8.60 (bs, 2H, amide HN-). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 10.99, 15.47, 25.06, 28.31, 28.61, 35.45, 36.18, 39.41, 58.66, 125.80, 128.38, 141.99, 159.54, 170.18. ; IR (cm<sup>-1</sup>): 3308, 3257, 3082, 2960, 2934, 2858, 1663, 1644, 1218, 1171. CHN Anal. calcd. for C<sub>34</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (%): C, 70.56%; H, 8.71%; N, 9.68%. Found: C, 70.62%; H, 8.82%; N, 9.65%.

#### Receptor **2** (N<sup>1</sup>,N<sup>2</sup>-bis((1*S*,2*S*)-1-(4-phenylbutylcarbamoyl)-2-methylbutyl)phthalamide)

The isophthaloyl chloride solution (1.57 g, 7.75 mmol) in dry THF was added drop wise to the solution of amine (2 g, 15.5 mmol) in dry THF at 0 °C under argon atmosphere. Then, the reaction was continued to be stirred for three hours at room temperature. After the completion of reaction the mixture was extracted with 1 N HCl (2×100 mL), 10% NaHCO<sub>3</sub> (2×100 mL) and distilled water (2×100 mL) respectively. Organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and THF was evaporated by rotary evaporator under reduced pressure to obtain white solids as a pure product. Mp: 228-234 °C decomposed.

$[\alpha]_D^{25} = -14.9$  ( $c=0.8$ ,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 0.88-0.98 (m, 12H), 1.54-1.67 (m, 12H), 1.82-2.14 (m, 2H), 2.57-2.61 (m, 4H), 3.10-3.40 (m, 2H+2H), 4.34 (4,  $J=12$ , 2H), 6.53 (bs, 2H, amide HN-), 7.11-7.38 (m, 13H), 7.86 (d, 2H, amide HN), 8.18 (s, 1H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 11.14, 15.50, 25.26, 28.68, 29.04, 35.43, 37.32, 39.38, 58.64, 125.81, 126.24, 128.33, 128.35, 130.14, 134.51, 142.00, 166.68, 171.26. IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3285, 1267, 3074, 2954, 2927, 2853, 1651, 1636, 1252. CHN Anal. calcd. for  $\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_4$ : C, 73.36%; H, 8.31%; N, 8.56%; O, 9.77%. Found: C, 73.45%; H, 8.41%; N, 8.51%.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Synthesis

In the first stage of this study, two novel C<sub>2</sub>-symmetrical chiral tetra-amide ligands (**1**, **2**) having four stereogenic centers were synthesized starting from (*S*)-isoleucine (Figure 1). Starting amine compound was re-synthesized according to the procedure described in the related reference (Aral et al., 2017). This compound bearing amide group was reacted with oxalyldichloride and isophthaloyl chloride to give the C<sub>2</sub>-symmetrical chiral tetra-amide compounds **1** and **2** respectively with quantitative yields. The synthesis procedure is quite simple and no further purification is performed except for the work-up process. Pure products were obtained after the extraction process. The structure proposed for these chiral tetraamides (**1**, **2**) were confirmed by  $^1\text{H NMR}$ ,  $^{13}\text{C NMR}$  and FTIR spectroscopic analyses.

### Enantiomeric Recognition Studies By UV-Vis Titration Method

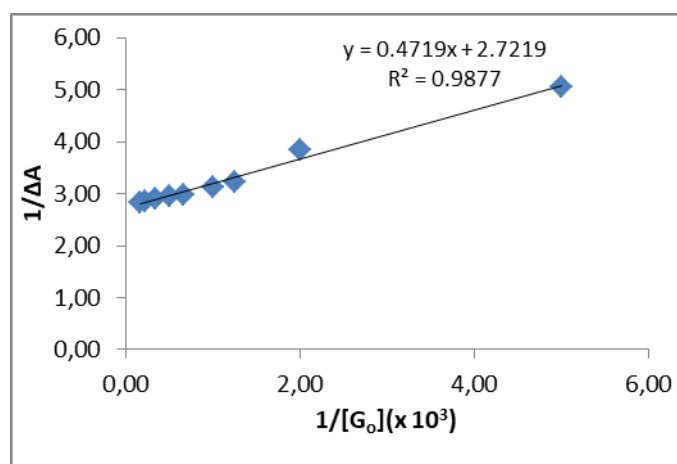
UV-Vis spectroscopy is a commonly used method for calculating binding constants. Standard UV-Vis titration experiments were applied for calculating association constant ( $K_a$ ) of complex formed between receptor and guest molecules (Figure 2) according to Benesi–Hildebrand equation basis of UV-Vis spectrum of complexes in  $\text{CHCl}_3$  at 25 °C (Benesi and Hildebrand, 1949). Examples of experimental data for UV titration of (*S*)- and (*R*)-Histidine-OMe hydrochloride ((*S*)-His and (*R*)-His) with receptor **1** and **2** are shown in Table 1.

**Table 1.** Experimental data for UV titration of L- and D-Histidine with receptor **1** and **2**.

| Receptor Conc.<br>[H] <sub>0</sub> ( $\times 10^{-3}$ ) M | Guests Conc.<br>[G] <sub>0</sub> ( $\times 10^{-3}$ ) M | Receptor 1            |            |                       |            | Receptor 2            |            |                       |            |
|---|---|-----------------------|------------|-----------------------|------------|-----------------------|------------|-----------------------|------------|
|   |   | <i>(S)</i> -Histidine |            | <i>(R)</i> -Histidine |            | <i>(S)</i> -Histidine |            | <i>(R)</i> -Histidine |            |
|   |   | A                     | $\Delta A$ | A                     | $\Delta A$ | A                     | $\Delta A$ | A                     | $\Delta A$ |
| <b>1.00</b>   | 0   | 0.401                 |            | 0.401                 |            | 0.420                 |            | 0.420                 |            |
| <b>1.00</b>   | 0.20  | 0.602                 | 0.202      | 0.488                 | 0.088      | 0.618                 | 0.198      | 0.469                 | 0.049      |
| <b>1.00</b>   | 0.50  | 0.693                 | 0.293      | 0.568                 | 0.168      | 0.680                 | 0.260      | 0.512                 | 0.092      |
| <b>1.00</b>   | 0.80  | 0.726                 | 0.326      | 0.645                 | 0.245      | 0.730                 | 0.310      | 0.586                 | 0.166      |
| <b>1.00</b>   | 1.00  | 0.737                 | 0.337      | 0.695                 | 0.295      | 0.741                 | 0.321      | 0.610                 | 0.190      |
| <b>1.00</b>   | 1.50  | 0.750                 | 0.350      | 0.725                 | 0.325      | 0.755                 | 0.335      | 0.701                 | 0.281      |
| <b>1.00</b>   | 2.00  | 0.759                 | 0.359      | 0.759                 | 0.359      | 0.759                 | 0.339      | 0.759                 | 0.339      |
| <b>1.00</b>   | 3.00  | 0.764                 | 0.364      | 0.772                 | 0.372      | 0.764                 | 0.344      | 0.784                 | 0.364      |
| <b>1.00</b>   | 4.50  | 0.777                 | 0.377      | 0.788                 | 0.388      | 0.771                 | 0.351      | 0.790                 | 0.370      |
| <b>1.00</b>   | 6.00  | 0.784                 | 0.384      | 0.790                 | 0.390      | 0.774                 | 0.354      | 0.800                 | 0.380      |

[H]<sub>0</sub>: Concentration of the host, [G]<sub>0</sub>: Concentration of the guest in each UV tube, A: UV absorbance at  $\lambda_{\text{max}}$

Plots of calculated  $1/\Delta A$  values as a function of  $1/\Delta G_0$  values gave excellent linear relationships for all guest molecules examined, supporting 1:1 complexation between receptor molecules and guests. To confirm 1:1 stoichiometry, Job plots for the complexes were studied. The typical UV spectral changes upon addition of (*S*)-His to receptor **2** are shown in Figure 3.



**Figure 3.** Typical plot of  $1/\Delta A$  versus  $1/[G_0]$  for host-guest complexation of receptor **2** with (*S*)-His.

**Table 2.** Association constants ( $K_a$ ) and enantioselectivities  $K_S/K_R$  (or  $K_R/K_S$ ) for the complexation of L-/D-guests with the receptor **1** and **2** in  $CDCl_3$  at 25 °C

| Receptor | Guest            | $K_a (M^{-1})$ | $-\Delta G_0 (kJ.mol^{-1})^a$ | $\Delta\Delta G_0 (kJ.mol^{-1})^b$ | $K_a^R/K_a^S$ |
|----------|------------------|----------------|-------------------------------|------------------------------------|---------------|
| <b>1</b> | ( <i>S</i> )-Val | 412.40         | 14.9                          | <b>5.10</b>                        | <b>7.85</b>   |
|          | ( <i>R</i> )-Val | 3236.75        | 20.00                         |                                    |               |
|          | ( <i>S</i> )-Ala | 710.70         | 16.29                         | 2.56                               | 2.84          |
|          | ( <i>R</i> )-Ala | 2015.83        | 18.85                         |                                    |               |
|          | ( <i>S</i> )-His | 1048.13        | 17.23                         | 4.00                               | 5.03          |
|          | ( <i>R</i> )-His | <b>5270.83</b> | <b>21.23</b>                  |                                    |               |
|          | ( <i>S</i> )-PEA | 157.94         | 12.54                         | 2.34                               | 2.57          |
|          | ( <i>R</i> )-PEA | 406.45         | 14.88                         |                                    |               |
|          | ( <i>S</i> )-NEA | 96.68          | 11.32                         | 4.64                               | 6.49          |
|          | ( <i>R</i> )-NEA | 627.57         | 15.96                         |                                    |               |
| Receptor | Guest            | $K_a (M^{-1})$ | $-\Delta G_0 (kJ.mol^{-1})^a$ | $\Delta\Delta G_0 (kJ.mol^{-1})^c$ | $K_a^S/K_a^R$ |
| <b>2</b> | ( <i>S</i> )-Val | 780.37         | 16.50                         | 4.39                               | 5.88          |
|          | ( <i>R</i> )-Val | 132.83         | 12.11                         |                                    |               |
|          | ( <i>S</i> )-Ala | 509.98         | 15.44                         | 3.82                               | 4.54          |
|          | ( <i>R</i> )-Ala | 111.93         | 11.68                         |                                    |               |
|          | ( <i>S</i> )-His | <b>5787.23</b> | <b>21.46</b>                  | <b>6.53</b>                        | <b>13.98</b>  |
|          | ( <i>R</i> )-His | 414.06         | 14.93                         |                                    |               |
|          | ( <i>S</i> )-PEA | 1225.35        | 17.62                         | 4.85                               | 7.06          |
|          | ( <i>R</i> )-PEA | 173.49         | 12.77                         |                                    |               |
|          | ( <i>S</i> )-NEA | 1896.10        | 18.70                         | 5.55                               | 9.37          |
|          | ( <i>R</i> )-NEA | 202.32         | 13.15                         |                                    |               |

<sup>a</sup>  $\Delta G^0 = -2.303RT \log K$

<sup>b</sup>  $\Delta\Delta G^0 = -(\Delta G^0_R - \Delta G^0_S)$

<sup>c</sup>  $\Delta\Delta G^0 = -(\Delta G^0_S - \Delta G^0_R)$

It has been shown that receptor **1** and **2** show weak, strong and very strong complexations with guest enantiomers. The weakest complexation occurred between receptor **1** and (*R*)-NEA ( $K_a = 202.32 M^{-1}$ ), while the strongest complexation occurred between receptor **2** and (*S*)-His ( $K_a = 5787.23 M^{-1}$ ). In general, the receptor **1** forms a stronger complexation with Val and Ala enantiomers which are bearing aliphatic alkyl groups, while the receptor **2** forms a stronger complexation with the PEA and NEA enantiomers which are containing aromatic rings. Presumably, while phenyl ring of PEA and NEA enantiomers provide strong interaction with receptor **2** containing phenyl ring attached to the carbonyl groups, leads to steric repulsion with receptor **1** that does not contain any atoms between carbonyl groups. Therefore, receptor **1** exhibited stronger complexation with valine and alanine than PEA, NEA enantiomers. However, His is show strong complexation with both of receptor **1** and **2**. It may be due to



the nitrogen atom of imidazole ring of His. These hetero atoms provide stronger hydrogen bonding and ion-dipole interaction with amide groups of receptor molecules. The binding constant ( $K_a$ ), free energy change ( $-\Delta G_0$  and  $-\Delta\Delta G_0$ ) and enantioselectivity ( $K_a^R/K_a^S$ ) for complexes formed between receptors (**1**, **2**) and guest enantiomers are given in Table 2.

It was found that receptor **1** recognise (*R*)- enantiomers of all guest while receptor **2** recognise (*S*)- enantiomers of all guests. Receptor **1** forms strongest complexation with (*R*)-His, but highest enantioselectivity with Val ( $K_a^R/K_a^S = 7.85$ ,  $\Delta\Delta G_0 = 5.10$  kJ.mol<sup>-1</sup>). Receptor **1** provides the weakest complexation with the NEA enantiomers, while exhibiting a very high enantioselectivity ( $K_a^R/K_a^S = 6.49$ ,  $\Delta\Delta G_0 = 4.64$  kJ.mol<sup>-1</sup>). Compared with NEA, PEA showed lower enantioselectivity due to lower steric repulsion of phenyl ring towards receptor **1** ( $K_a^R/K_a^S = 2.57$ ,  $\Delta\Delta G_0 = 2.34$  kJ.mol<sup>-1</sup>), and receptor **2** ( $K_a^R/K_a^S = 7.06$ ,  $\Delta\Delta G_0 = 4.85$  kJ.mol<sup>-1</sup>). Similarly, valine with a more bulky alkyl group provided higher selectivity than alanine towards both receptor **1** and **2**.

Receptor **2** shows stronger complexation and higher enantioselectivity with NEA, PEA and His guests containing aromatic ring, than Val and Ala. The strongest complexation and highest enantioselectivity were occurred between receptor **2** and (*S*)-His ( $K_a^S = 5787.23$  M<sup>-1</sup>,  $K_a^S/K_a^R = 13.98$ ,  $\Delta\Delta G_0 = 21.46$  kJ.mol<sup>-1</sup>), while lowest complexation and enantioselectivity occurred between Ala ( $K_a^S/K_a^R = 4.54$ ,  $\Delta\Delta G_0 = 3.82$  kJ.mol<sup>-1</sup>).

## CONCLUSION

Two new C<sub>2</sub>-symmetrical chiral tetraamide compounds as potential enantioselective receptors have been synthesized, and their enantiomeric recognition ability towards three amino acid methyl ester hydrochloride and two 1-arylethylamines were studied. Both Receptor **1** and **2** show strongest complexation with His, while receptor **1** shows highest enantioselectivity toward Val, and receptor **2** shows highest enantioselectivity toward His. These results show that hydrogen bonding, ion-dipole interaction,  $\pi$ -  $\pi$  interaction and van der Waals interactions play a role in complexation. Bulky groups on the guest molecule lead to weaker complexation, higher enantioselectivity. Extra heteroatoms in the guest molecules give stronger hydrogen bonding and ion dipole interaction and leading to stronger complexation. As a result, two synthesized receptors (**1**, **2**) showed high or very high enantioselectivity towards the all guest molecules used.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to acknowledge the Batman University Scientific Research Projects Coordination Unit for the financial support provided by BTUBAP-2018-FED-2.

## Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

## Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

## REFERENCES

Aral H, Aral T, Çolak M, Ziyadanoğulları B, Ziyadanoğulları R, 2013. C<sub>2</sub>-Symmetric chiral diamine ligands for enantiomeric recognition of amino acid esters and mandelic acid by proton NMR titration method. Turkish Journal of Chemistry, 37:374-382. doi: 10.3906/kim-1207-58

- Aral H, Çelik KS, Altındağ R, Aral T, 2017. Synthesis, characterization, and application of a novel multifunctional stationary phase for hydrophilic interaction/reversed phase mixed-mode chromatography. *Talanta*, 174:703-714. doi: 10.1016/j.talanta.2017.07.014
- Aydın I, Aral T, Karakaplan M, Hoşgören H, 2009. Chiral lariat ethers as membrane carriers for chiral amino acids and their sodium and potassium salts. *Tetrahedron: Asymmetry*, 20(2):179-183. doi: 10.1016/j.tetasy.2009.01.005
- Bako P, Keglevich G, Rapi Z, Toke L, 2012. The enantiomeric differentiation ability of chiral crown ethers based on carbohydrates. *Current Organic Chemistry*, 16:297-304. doi: 10.2174/138527212799499877
- Ballistreri FP, Pappalardo A, Tomaselli GA, Toscano RM, Sfrassetto GT, 2010. Heteroditopic chiral uranyl–salen receptor for molecular recognition of amino acid ammonium salts. *European Journal of Organic Chemistry*, 3806-3810. doi: 10.1002/ejoc.201000566
- Bennesi HA, Hildebrand JH, 1949. A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society*, 71(8):2703-2707. doi: 10.1021/ja01176a030
- Bohanon TM, Caruso PL, Denzinger S, Fink R, Mobius D, et al., 1999. Molecular recognition-induced function and competitive replacement by hydrogen-bonding interactions: Amphiphilic barbituric acid derivatives, 2,4,6-triaminopyrimidine, and related structures at the air–water interface. *Langmuir*, 15(1):174-184. doi: 10.1021/la980348w
- Chadwick DJ, Cliffe IA, Sutherland IO, Newton RF, 1984. The formation of complexes between aza derivatives of crown ethers and primary alkylammonium salts. Part 7. Chiral derivatives of aza crown ethers. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1707-1717. doi: 10.1039/P19840001707
- Demirtas HN, Bozkurt S, Durmaz M, Yilmaz M, Sirit A, 2009. Chiral calix[4]azacrowns for enantiomeric recognition of amino acid derivatives. *Tetrahedron*, 65(15):3014-3018. doi: 10.1016/j.tet.2009.01.087
- Deniz P, Turgut Y, Toğrul M, Hoşgören H, 2011. Pyridine containing chiral macrocycles: synthesis and their enantiomeric recognition for amino acid derivatives. *Tetrahedron*, 67(34):6227-6232. doi: 10.1016/j.tet.2011.06.064
- Diederich F, 1988. Complexation of neutral molecules by cyclophane hosts. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 27(3):362-386. doi: 10.1002/anie.198803621
- Fitzmaurice RJ, Kyne GM, Douheret D, Kilburn JD, 2002. Synthetic receptors for carboxylic acids and carboxylates. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 7:841-864. doi: 10.1039/B009041G
- Forte G, D'Urso A, Ballistreri FP, Tuscano RM, Tomaselli GA, et al., 2015. Enantiomeric recognition of  $\alpha$ -amino acid derivatives by chiral uranyl–salen receptors. *Tetrahedron Letters*, 56(22):2922-2926. doi: 10.1016/j.tetlet.2015.04.092
- Guo S, Wang G, Ai L, 2013. Synthesis of macrocycles and their application as chiral solvating agents in the enantiomeric recognition of carboxylic acids and  $\alpha$ -amino acid derivatives. *Tetrahedron: Asymmetry*, 24(8):480-491. doi: 10.1016/j.tetasy.2013.03.005
- Hembury GA, Borovkov VV, Inoue Y, 2008. Chirality-sensing supramolecular systems. *Chemical Reviews*, 108(1):1-73. doi: 10.1021/cr050005k
- Horvath G, Hutszthy P, Szarvas S, Szokan G, Redd JT, et al., 2000. Preparation of a new chiral pyridino-crown ether-based stationary phase for enantioseparation of racemic primary organic ammonium salts. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 39(10):3576–3581. doi: 10.1021/ie000272a

- Howard JA, Nonn M, Fulop F, Wenzel TJ, 2013. Enantiomeric discrimination of isoxazoline fused  $\beta$ -amino acid derivatives using (18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid as a chiral NMR solvating agent. *Chirality*, 25(1):48-53. doi: 10.1002/chir.22114
- Izatt RM, Wang T, Hathaway JK, Zhang XX, Curtis JC, et al., 1994. Factors influencing enantiomeric recognition of primary alkylammonium salts by pyridino-18-crown-6 type ligands. *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry*, 17(2):157-175. doi: 10.1007/BF00711856
- Karakaplan M, Aral T, 2005. Synthesis of new chiral crown ethers containing a (p-methoxyphenoxy)methyl moiety and their chiral recognition ability towards amino acid esters. *Tetrahedron: Asymmetry*, 16(12):2119-2124. doi: 10.1016/j.tetasy.2005.05.019
- Kizirian JC, Caille JC, Alexakis A, 2003. Conceptually new chiral tertiary C<sub>2</sub> symmetric diamines in asymmetric synthesis. *Tetrahedron Letters*, 44(49):8893-8895. doi: 10.1016/j.tetlet.2003.09.171
- Kormos A, Moczar I, Baranyai P, Kupai J, Toth K, et al., 2013. Synthesis and enantiomeric recognition studies of a novel 5,5-dioxophenothiazine-1,9 bis(thiourea) containing glucopyranosyl groups. *Tetrahedron: Asymmetry* 24(1):62-65. doi: 10.1016/j.tetasy.2012.11.020
- Köylü MZ, Aral T, Karakaplan M, Kocakaya ŞÖ, Hoşgören H, 2011. Enantioselective complexation of chiral lariat crown ethers and chiral primary alkylammonium perchlorates. *Turkish Journal of Chemistry*, 35(2):171-179. doi: 10.3906/kim-1008-844
- Lee T, Lee W, Hyun MH, Park JH, 2010. Enantioseparation of  $\alpha$ -amino acids on an 18-crown-6-tetracarboxylic acid-bonded silica by capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 1217(8):1425-1428. doi: 10.1016/j.chroma.2009.12.064
- Liu TJ, Chen YY, Zhang KS, Wang D, Guo DW, et al., 2001. Enantiomeric recognition of chiral 3,3-bridged-1,1'-binaphthol dimer toward  $\alpha$ -phenylethylamine and  $\alpha$ -amino acid ester. *Chirality*, 13:595-600. doi: 10.1002/chir.1183
- Liu L, He C, Yang L, Huang Y, Wu Q, et al., 2014. Novel C<sub>1</sub>-symmetric chiral crown ethers bearing rosin acids groups: synthesis and enantiomeric recognition for ammonium salts. *Tetrahedron*, 70(50):9545-9553. doi: 10.1016/j.tet.2014.10.050
- Lu JT, Wu LZ, Jiang JZ, Zhang XM, 2010. Helical nanostructures of an optically active metal-free porphyrin with four optically active binaphthyl moieties: Effect of metal-ligand coordination on the morphology. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 25:4000-4008. doi: 10.1002/ejic.201000358
- Marchi-Artzner V, Artzner F, Karthaus O, Shimomura M, Ariga K, et al., 1998. Molecular recognition between 2,4,6-triaminopyrimidine lipid monolayers and complementary barbituric molecules at the air/water interface: effects of hydrophilic spacer, ionic strength, and pH. *Langmuir*, 14(18):5164-5171. doi: 10.1021/la971192n
- Nakashima K, Iguchi R, Shinkai S, 2000. Diaza-18-crown-6-based saccharide receptor bearing two boronic acids. Possible communication between bound saccharides and metal cations. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 39(10):3479-3483. doi: 10.1021/ie000225i
- Paik MJ, Kang JS, Huang BY, Carey JR, Lee W, 2013. Development and application of chiral crown ethers as selectors for chiral separation in high-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Chromatography A*, 1274:1-5. doi: 10.1016/j.chroma.2012.11.086
- Pal D, Moczar I, Kormos A, Baranyai P, Ovari L, et al., 2015. Synthesis and enantiomeric recognition studies of optically active acridone bis(urea) and bis(thiourea) derivatives. *Tetrahedron: Asymmetry*, 26 (23):1335-1340. doi: 10.1016/j.tetasy.2015.10.004

- Pal D, Moczar I, Kormos A, Baranyai P, Huszthy P, 2016. Synthesis and enantiomeric recognition studies of optically active 5,5-dioxophenothiazine bis(urea) and bis(thiourea) derivatives. *Tetrahedron: Asymmetry*, 27(19):918-922. doi: 10.1016/j.tetasy.2016.08.002
- Park JY, Jin KB, Hyun MH, 2012. Liquid chromatographic resolution of 3-amino-1,4-benzodiazepin-2-ones on crown ether-based chiral stationary phases. *Chirality*, 24:427-431. doi: 10.1002/chir.22041
- Peri F, Maggi R, Palla G, Bigi F, Corradini R, et al., 1998. Discrimination properties of tetraamidic branched selectors. *Journal of Chromatography A*, 802(2):315-324. doi: 10.1016/S0021-9673(97)01190-4
- Pu L, 2004. Fluorescence of organic molecules in chiral recognition. *Chemical Reviews*, 104(3):1687-1716. doi: 10.1021/cr030052h
- Qing G, Sun T, Chen Z, Yang X, Wu X, et al., 2009. 'Naked-eye' enantioselective chemosensors for N-protected amino acid anions bearing thiourea units. *Chirality*, 21(3):363-373. doi: 10.1002/chir.20593
- Sipos L, Ilisz I, Aranyi A, Gecse Z, Nonn M, et al., 2012. High-performance liquid chromatographic enantioseparation of unusual isoxazoline-fused 2-aminocyclopentanecarboxylic acids on (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid-based chiral stationary phases. *Chirality*, 24(10):817-824. doi: 10.1002/chir.22077
- Su X, Luo K, Xiang Q, Lan J, Xie R, 2009. Enantioselective recognitions of chiral molecular tweezers containing imidazoliums for amino acids. *Chirality*, 21(5):539-546. doi: 10.1002/chir.20635
- Şeker S, Barış D, Arslan N, Turgut Y, Pirinççioğlu N, et al., 2014. Synthesis of rigid and C<sub>2</sub>-symmetric pyridino-15-crown-5 type macrocycles bearing diamide–diester functions: Enantiomeric recognition for chiral primary organoammonium perchlorate salts. *Tetrahedron: Asymmetry* 25(5):411-417. doi: 10.1016/j.tetasy.2014.01.009
- Tang Z, Cun LF, Cui X, Mi AQ, Jiang JZ, et al., 2006. Design of highly enantioselective organocatalysts based on molecular recognition. *Organic Letters*, 8(7):1263-1266. doi: 10.1021/ol0529391
- Tsioupi DA, Stefan-van Staden RI, Kapnissi-Christodoulou CP, 2013. Chiral selectors in CE: Recent developments and applications. *Electrophoresis*, 34:178-204. doi: 10.1002/elps.201200239
- Turgut Y, Aral T, Hoşgören H, 2009. Synthesis of novel C<sub>2</sub>-symmetric chiral crown ethers and investigation of their enantiomeric recognition properties. *Tetrahedron: Asymmetry*, 20(19):2293-2298. doi: 10.1016/j.tetasy.2009.09.010
- Ulatowski F, Jurczak J, 2014. Enantiomeric recognition of carboxylic anions by a library of neutral receptors derived from  $\alpha$ -amino acids and o-phenylenediamine. *Tetrahedron: Asymmetry*, 25(13):962-968. doi: 10.1016/j.tetasy.2014.06.004
- Wang Z, Wei S, Wang C, Sun J, . Enantioselective hydrosilylation of ketimines catalyzed by Lewis basic C<sub>2</sub>-symmetric chiral tetraamide. *Tetrahedron: Asymmetry*, 18(6):705-709. doi: 10.1016/j.tetasy.2007.03.008
- Yi YR, Kim KS, Helal A, Kim HS, 2013. Molecular recognition of  $\omega$ -amino acids by thiazolobenzocrown receptors: a GABA-selective ionophore. *Supramolecular Chemistry*, 25:16-23. doi: 10.1080/10610278.2012.726731
- Zhang X, Yin J, Yoon J, 2014. Recent advances in development of chiral fluorescent and colorimetric sensors. *Chemical Reviews*, 114:4918–4959. doi: 10.1021/cr400568b

**Atf İçin:** Karaçelik AA, Efe D, Çakır V, Bıyıklıoğlu Z, 2021. Aksiyal Disüstitüe Silisyum Ftalosiyanınların Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1302-1310.

**To Cite:** Karaçelik AA, Efe D, Çakır V, Bıyıklıoğlu Z, 2021. Determination of Biological Activities of Axially Disubstituted Silicon Phthalocyanines. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1302-1310.

### **Aksiyal Disüstitüe Silisyum Ftalosiyanınların Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi**

Ayça Aktaş KARAÇELİK<sup>1\*</sup>, Derya EFE<sup>2</sup>, Volkan ÇAKIR<sup>3</sup>, Zekeriya BIYIKLIOĞLU<sup>4</sup>

**ÖZET:** Bu çalışmada daha önce sentezlenen aksiyal ([3-(dimetilamino) fenoksi] propanooksı) ve ([3-(dietilamino) fenoksi] propanooksı) ikameli silisyum ftalosiyanınların (DM-C3-Si ve DE-C3-Si) biyolojik aktivitelerinin [sığır karbonik anhidraz (bCA) inhibisyonu, antioksidan ve antibakteriyel] değerlendirilmesi amaçlandı. CA inhibisyon aktivitesi, esteraaz aktivitesi ile belirlendi. Antioksidan aktivite, iki yaygın yöntem olan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•) radikal temizleme ve demir iyon (III) indirgeme / antioksidan güç (FRAP) metodları ile belirlendi. Antibakteriyel aktivite, üç Gram-negatif ve üç Gram-pozitif bakteriye karşı disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Sonuçlara göre, DE-C3-Si silisyum ftalosiyanın, standart CA inhibitörü sülfanilamide kıyasla 2333 nM IC<sub>50</sub> değeriyle yaklaşık iki kat daha yüksek CA inhibitör aktivitesi gösterdi. Antioksidan sonuçlarına göre, silisyum ftalosiyanınlar standart C vitamininden daha yüksek antioksidan aktivite gösterdi (DPPH• radikal temizleme SC<sub>50</sub> değerleri: DM-C3-Si: 0.0199 mg mL<sup>-1</sup> ve DE-C3-Si: 0.0232 mg mL<sup>-1</sup>, FRAP TEAC değerleri: DM-C3-Si: 232 µM ve DE-C3-Si: 73 µM). Bu bileşiklerin antibakteriyel aktivitesinin Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere karşı çok az olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak, silisyum ftalosiyanınlar, biyolojik aktiviteleri nedeniyle yeni CA inhibitörlerinin keşfinde ve gıdalarda büyük kullanım potansiyeline sahiptir.

**Anahtar Kelimeler:** Sığır karbonik anhidraz, inhibitör, biyolojik aktivite, silisyum ftalosiyanınlar

### **Determination of Biological Activities of Axially Disubstituted Silicon Phthalocyanines**

**ABSTRACT:** In this study, previously synthesized axially ([3-(dimethylamino)phenoxy]propanoxy) and ([3-(diethylamino)phenoxy]propanoxy) substituted silicon phthalocyanines (DM-C3-Si and DE-C3-Si) were aimed to evaluate biological activities [bovine carbonic anhydrase (bCA) inhibition, antioxidant, and antibacterial]. CA inhibition activity was determined by esterase activity. The antioxidant activity was determined by two common methods, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) radical scavenging and ferric ion (III) reducing / antioxidant power (FRAP) assay. The antibacterial activity was determined by the disk diffusion method against three Gram-negative and three Gram-positive bacteria. According to the results, DE-C3-Si silicon phthalocyanin showed approximately twice as high CA inhibitory activity with IC<sub>50</sub> value of 2333 nM compared with the standard CA inhibitor sulfanilamide. According to the antioxidant studies, the silicon phthalocyanines showed higher antioxidant activity than the standard vitamin C (SC<sub>50</sub> values of DPPH• scavenging activity: 0.0199 mg mL<sup>-1</sup> for DM-C3-Si and 0.0232 mg mL<sup>-1</sup> for DE-C3-Si, TEAC values of FRAP: 232 µM for DM-C3-Si and 73 µM for DE-C3-Si). It was observed that antibacterial activity of these compounds were excellent slight against Gram-negative and Gram-positive bacteria. As a result, silicon phthalocyanines have great potential of use in the discovery of new CA inhibitors and in food due to their biological activities.

**Keywords:** Bovine carbonic anhydrase, inhibitor, biological activity, silicon phthalocyanines

<sup>1</sup> Ayça Aktaş KARAÇELİK ([Orcid ID: 0000-0001-5381-2924](https://orcid.org/0000-0001-5381-2924)), Giresun Üniversitesi, Espiye Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Giresun, Türkiye

<sup>2</sup> Derya EFE ([Orcid ID: 0000-0003-3554-1790](https://orcid.org/0000-0003-3554-1790)), Giresun Üniversitesi, Espiye Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Giresun, Türkiye

<sup>3</sup> Volkan ÇAKIR ([Orcid ID: 0000-0002-5817-0817](https://orcid.org/0000-0002-5817-0817)), Giresun Üniversitesi, Espiye Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Giresun, Türkiye

<sup>4</sup> Zekeriya BIYIKLIOĞLU ([Orcid ID: 0000-0001-5138-214X](https://orcid.org/0000-0001-5138-214X)), Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Trabzon, Türkiye

**\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Ayça Aktaş KARAÇELİK, e-mail: ayca.aktas@giresun.edu.tr

## GİRİŞ

Metalsiz ve metalli ftalosiyanınlar günümüzde boyar madde (Yongde ve Zhenguo, 2006), katalizör (Dini ve ark, 2003), fotodinamik terapi (PDT) (Kluson ve ark, 2008), elektrokimyasal ve optik gaz sensörleri (Sarkı ve ark, 2019), CD-ROM ve DVD-ROM teknolojilerinde (Bekaroğlu, 1996) kullanım olanağı bulmuştur. Fakat ftalosiyanınların yukarıda bahsedilen ve daha birçok uygulama alanında kullanımını kısıtlayan veya düşük etkinlik çıkmasına neden olan dezavantajları vardır. Bunlar yaygın organik çözücüler içerisinde düşük çözünürlük ve agregasyon (istiflenme) olarak bilinmektedir (Ünlü ve ark, 2008). Bu iki önemli dezavantaj merkez atomun aksiyal pozisyonlarda ligand bulundurmasıyla aşılabilir. Bu durumda çözelti içerisinde ftalosiyanın moleküllerinin birbirine yaklaşması engellenerek hem çözünürlük arttırılır hem de agregasyon önlenir. Aksiyal pozisyonlarda ligand ihtiva eden ftalosiyanınların en iyi örneği substitüe silisyum ftalosiyanınlardır. Yüksek çözünürlük, düşük agregasyon ve bu ikisine bağlı olarak yüksek etkinlik alabilmek adına bu çalışmada aksiyal disubstitüe silisyum ftalosiyanınlar tercih edilmiştir.

Karbonik anhidraz (CA), temel olarak karbondioksitin ( $CO_2$ ) bikarbonata ( $HCO_3^-$ ) tersinir dönüşümünden sorumlu olan ve eritrositleri de içine alan pek çok hücre tipinde bulunan çinko metaloenzimlerdir. Omurgalılarda, farklı hücresel lokalizasyonlar ve doku dağılımları temelinde 16 farklı ( $CA_{I-XIV}$ ) izoenzimi tanımlanmıştır (Supuran, 2010). Bu izoenzimler pH regülasyonu,  $CO_2$  homeostazı, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve diğer birçok metabolik süreç dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlerde yer alır (Pastarekova ve ark, 2004). Bazı CA izoenzimlerin aşırı ekspresyonu sonucu glokom, ateroskleroz, tümör oluşumu ve obezite gibi fizyolojik bozukluklar ortaya çıkabilir (Supuran ve Scozzafava, 2007). Aynı zamanda CA enziminin aktivitesindeki eksiklik alzheimer hastalığına neden olabilir (Alterio ve ark, 2012). Klinikte halen kullanılan sülfonamid/sülfamat türevi inhibitörleri olan asetazolamid ve etokszolamid gibi çok sayıda CA inhibitörü vardır. Son zamanlarda da birçok araştırma grubu tarafından CA'nın inhibitörleri ve aktivatörlerini tanımlamak için yeni moleküller araştırılmaktadır (McKenna ve Supuran, 2014). Ftalosiyanın türevleri, bazı enzim inhibitörlerinin gelişimi için potansiyel öncü bileşikler olarak gösterilmiştir (Zhang ve ark, 2008; Karaçelik ve ark, 2021).

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri (ROS) ve antioksidan savunmalar arasındaki dengesizliğin bir sonucudur. Bu oksidatif stres bir dizi hücre fonksiyonu üzerinde hücre ölümüyle sonuçlanan çeşitli bozukluklarına neden olabilir. Dolayısıyla, antioksidanlar oksidatif hasara karşı önemli inhibitörlerdir. Bir veya daha fazla reaktif türle katalitik veya sitokiyometrik olarak reaksiyona girebilen sentetik ve doğal bileşikler geliştirilmiştir. Bu konuda biyolojik özelliklere sahip farklı fonksiyonel grupları olan yeni ftalosiyanın bileşiklerinin sentezi ve karakterizasyonu araştırılmaktadır (Yıldırım ve ark, 2017). Ayrıca ftalosiyanın moleküllerinin merkezinde bulunan metal iyonu ve ikame edilmiş gruplara göre farklı antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri sergilediği bulunmuştur (Farajzadeh ve ark, 2019; Yıldırım ve ark, 2017; Demirkapi ve ark, 2014).

Antibiyotikler başta olmak üzere antibakteriyel bileşikler son zamanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, kullanılan bu bileşikler antibakteriyellere karşı dirençli mikroorganizmaların açığa çıkmasına neden olmaktadır. Bu bileşiklerin doğal döngüde görevli olan mikroorganizmaları öldürmesi veya sayılarını azaltması da bir diğer yan etkisidir (Efe, 2020). Son zamanlarda, birçok araştırmacı yan etkisi olmayan yeni antibakteriyel ajanlar bulmak üzerine yoğunlaşmıştır. Bu bağlamda, yeni sentezlenen silisyum ftalosiyanınlar bu ihtiyacı karşılayabilecek umut verici bileşiklerdir (Basappa ve ark, 2015).

Bu bilgiler ışığında mevcut çalışmada, daha önce elektropolimerizasyon ve agregasyon özelliklerinin incelenmesi amacıyla sentezlenmiş olan DM-C3-Si ve DE-C3-Si silisyum ftalosiyanın bileşiklerinin (Bıyıklıoğlu ve Alp, 2016) ilk defa biyolojik aktivitelerinin (bCA inhibisyon, antioksidan ve antibakteriyel) değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Kimyasal Sentez

([3-(dimetilamino)fenoksi]propanoksi) ve ([3-(dietilamino)fenoksi]propanoksi) silisyum ftalosiyanınlar (DM-C3-Si ve DE-C3-Si) Bıyıklıoğlu ve ark. (Bıyıklıoğlu ve Alp, 2016) literatürüne göre sentezlendi. Tüm çözücüler Merck firmasından satın alındı ve kullanılmadan önce destillendi. Reaktantlar yüksek saflıkta ve çeşitli ticari şirketlerden satın alındı. Reaksiyonlar susuz ortamda azot gazı atmosferi altında gerçekleştirildi.

### Bis ([3-(dimetilamino)fenoksi]propanoksi) ftalosiyano silisyum (IV) Sentezi (DM-C3-Si)

Silisyum ftalosiyanın diklorid (150 mg, 0.24 mmol), 3-[3-(dimetilamino)fenoksi]propan-1-ol (94 mg, 0.48 mmol) 15 mL kuru toluen içerisine eklendi. Karışım 10 dakika azot gazı atmosferinde karıştırıldı ve üzerine sodyum hidrid (11.52 mg, 0.48 mmol) ilave edildi. Bu karışım 24 saat boyunca reflaks edildi. Süre sonunda karışım oda sıcaklığına soğutuldu ve çözücü düşük basınç altında buharlaştırıldı. Elde edilen katı ham ürün sabit faz olarak alüminyum oksit hareketli faz olarak CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH (100:2) çözücü sistemi kullanılan kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırıldı. Reaksiyona ait sentez şeması Şekil 1’de verilmiştir (Bıyıklıoğlu ve Alp, 2016).

### Bis ([3-(dietilamino)fenoksi]propanoksi) ftalosiyano silisyum (IV) Sentezi (DE-C3-Si)

Bileşik (DE-C3-Si), 3-[3-(dimetilamino)fenoksi]propan-1-ol yerine 3-[3-(dietilamino)fenoksi]propan-1-ol kullanılarak (DM-C3-Si) bileşiği ile aynı kimyasal yöntem kullanılarak sentezlendi ve saflaştırıldı. Reaksiyona ait sentez şeması Şekil 1’de verilmiştir (Bıyıklıoğlu ve Alp, 2016).

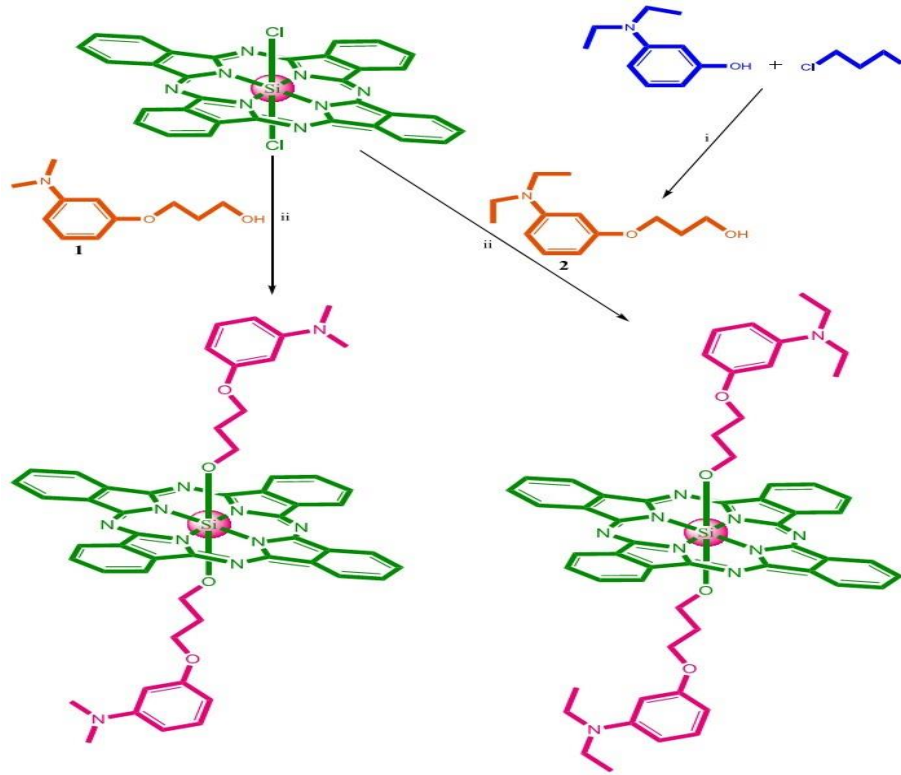
### DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi

Numunelerin antioksidan aktivitesi, Cuendet ve arkadaşları (Cuendet ve ark, 1997) tarafından geliştirilen DPPH• radikal temizleme yöntemi kullanılarak test edilmiştir. Öncelikle 0.1 mM DPPH çözültisi metanol içinde taze ve günlük olarak hazırlandı. Numunelerin çalışma konsantrasyonları, yaklaşık %50 temizleme sağlayan konsantrasyonlarla sonuç gösterecek şekilde ayarlandı. Kısaca yöntemde, 0.75 mL numunelerin çeşitli konsantrasyonları, 0.75 mL 0.1 mM metanolik DPPH çözültisi ile karıştırıldı. Oda sıcaklığında 50 dakikalık inkübasyon süresinden sonra, absorbans 517 nm’de saf suya karşı okundu. DPPH• radikal temizleme aktivitesi, DPPH• radikalının %50 temizlenmesine neden olan numune konsantrasyonu (SC<sub>50</sub>) olarak ifade edildi. Düşük SC<sub>50</sub> değerleri daha yüksek radikal temizleme potansiyelini gösterir. Sonuçlar standart antioksidanlar BHT, Troloks ve C vitamini ile karşılaştırıldı. Reaksiyon karışımının daha yüksek emilimi, daha düşük DPPH• radikal temizleme aktivitesini gösterir.

### Demir İndirgeme / Antioksidan Güç (FRAP) Yöntemi

FRAP, orijinal olarak Oyaizu (1986) tarafından geliştirilmiş olup toplam indirgeme potansiyelinin dolaylı olarak belirlendiği bir yöntemdir (Oyaizu, 1986). Yöntem, Fe<sup>+3</sup>’ün Fe<sup>+2</sup>’ye indirgenmesi ile elde edilen renk değişikliğinin 595 nm’de ölçülmesine esasına dayanır. Öncelikle deneyde kullanılan numunelerin konsantrasyonu 0.04 mg mL<sup>-1</sup>’ye (DM-C3-Si için 43.0 µM ve DE-C3-Si 40.5 µM) seyreltildi. Ardından FRAP reaktifi, pH 3.6’ da 300 mM asetat tamponu, 10 mM [2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ)]’nin 40 mM HCl’deki çözültisi ve 20 mM Fe<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O çözültileri sırasıyla 10:1:1

oranında karıştırılarak taze hazırlandı. Daha sonra 50  $\mu\text{L}$  numune, 1.5 mL FRAP reaktifi ile karıştırıldı. Oda sıcaklığında 20 dakikalık inkübasyonun ardından absorbans 595 nm' de okundu. Yöntemde standart olarak kullanılan Troloks'un 62.5-1000  $\mu\text{M}$  aralığındaki konsantrasyonları kullanılarak absorbans ölçümlerine dayalı kalibrasyon grafiği çizildi. Numunelerin aktivitesi, bu grafik kullanılarak antioksidan aktivite Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC,  $\mu\text{M}$ ) olarak ifade edildi.



**Şekil 1:** Aksiyal disübstitüe silisyum ftalosiyeninlerin (DM-C3-Si ve DE-C3-Si) sentez şeması. (i) NaOH, EtOH, 80 °C. (ii) Toluene, NaH, 120 °C (Bıyıklıoğlu ve Alp, 2016).

### Sığır Karbonik Anhidraz (bCA) İnhibisyon Aktivitesinin Belirlenmesi

Yöntem karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Buna göre enzim aktivitesi, 348 nm'de *p*-nitrofenole veya *p*-nitrofenolata hidrolize olan *p*-nitrofenil asetatın spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlenmektedir (Armstrong ve ark, 1966). Standart bCA enzimi saf suda 0.1 mg mL<sup>-1</sup> konsantrasyonda hazırlandı. Yöntemde kısaca, 550  $\mu\text{L}$  0.05 M Tris-SO<sub>4</sub> tamponu (pH: 7.4), 150  $\mu\text{L}$  enzim çözelti, 50  $\mu\text{L}$  numune çözeltilerini içeren karışıma 750  $\mu\text{L}$  *p*-nitrofenil asetat (3 mM) eklenip vortekslendi. Sonra karışımın 348 nm'deki absorbansı 30 dakika boyunca kaydedildi. Sonuçlar numune içermeyen kontrol ve enzim içermeyen kör testlerle karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Her bir numunenin beş farklı konsantrasyonunda esteraz aktivite ölçümü yapıldı. Sığır karbonik anhidraz (bCA) enzimi üzerine inhibisyon etkisine sahip olan her bir numune için Aktivite(%)-İnhibitör konsantrasyonu [I] grafikleri çizilerek %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyon (IC<sub>50</sub>) değerleri hesaplandı.

### Antibakteriyel Test

DM-C3-Si ve DE-C3-Si numuneleri 0.01 mg mL<sup>-1</sup>, 0.02 mg mL<sup>-1</sup>, 0.03 mg mL<sup>-1</sup> ve 0.04 mg mL<sup>-1</sup> olacak şekilde %100'lük DMSO kullanılarak hazırlandı. Çalışmamızda üç tane Gram-negatif (*Acinetobacter baumannii* ATCC BAA-747, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Citrobacter freundii* ATCC 43864) ve üç tane Gram-pozitif (*Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Bacillus subtilis*



ATCC 6633, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228) bakteri kullanıldı. Antibakteriyel aktivite disk difüzyon yöntemi ile değerlendirildi. Steril bir eküvyon çubuğu ile  $10^6$  kob  $\text{mL}^{-1}$  içeren her bir bakteri solüsyonundan ayrı ayrı petri kaplarında Müller Hinton Agar (MHA) medium üzerine yayma yapıldı. 6mm'lik standart disklerle test edilen bileşiklerin her bir konsantrasyonu ayrı ayrı 10  $\mu\text{L}$  emdirilerek ve bakterileri ile inokule edilmiş agar üzerine yerleştirildi. Negatif kontrol olarak numunelerin dilüsyonunda kullanılan %100'lük DMSO kullanıldı. Pozitif kontrol olarak sulbaktam (SCF) (30  $\mu\text{g}/\text{disk}$ ) diskleri kullanıldı. Hazırlanan deney düzenekleri 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Belirtilen süre sonunda bileşiklerin emdirildiği standart disklerin ve antibiyotik diskinin çevresinde oluşan şeffaf inhibisyon zon çapları ölçülerek kaydedildi. Her bir deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi (Efe, 2019).

## BULGULAR VE TARTIŞMA

3-dimetilaminofenoksipropanoksi ve 3-dietilaminofenoksi silisyum ftalosiyeninler (DM-C3-Si ve DE-C3-Si) Bıyıklıoğlu ve ark. (Bıyıklıoğlu ve Alp, 2016) litaretürüne göre sentezlenmiştir. DM-C3-Si ve DE-C3-Si bileşiklerinin antioksidan aktivitesi FRAP ve DPPH• radikal temizleme yöntemleri kullanılarak test edilmiştir (Çizelge 1). Çizelge 1'e göre  $\text{SC}_{50}$  değeri düşük olan DM-C3-Si kodlu bileşik ( $0.0199 \text{ mg mL}^{-1}$ ) en yüksek DPPH• radikal temizleme aktivitesine sahip iken  $\text{SC}_{50}$  değeri büyük olan DE-C3-Si kodlu bileşik ( $0.0232 \text{ mg mL}^{-1}$ ) ise en düşük antioksidan aktiviteye sahiptir. Numunelerin standartlarla karşılaştırılmasında, Numuneler Troloks ve BHT'den daha düşük aktiviteye sahip olup C vitamininden ise daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. FRAP test sonuçları DPPH• radikal temizleme aktivite sonuçları ile paralellik göstermektedir. Buna göre DM-C3-Si kodlu ftalosiyenin bileşiği FRAP değeri 232  $\mu\text{M}$  TEAC değeri ile DE-C3-Si'den daha yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Çalışılan konsantrasyonlardaki silisyum ftalosiyeninlerin TEAC değerleri Troloks'tan 1.78 ila 5.39 kat daha yüksek bulundu. Literatürde ftalosiyeninlerin antioksidan aktivitesi hakkında çok sayıda araştırma yapılmış olsa da, silisyum ftalosiyeninlerin antioksidan aktivitesi hakkında çok az araştırma bulunmaktadır. Bu yüzden sonuçlar ftalosiyeninler ile karşılaştırıldığında, silisyum ftalosiyeninlerin bazı ftalosiyeninlerden daha iyi antioksidan aktiviteye sahip olduğu görüldü (Ağırtaş ve ark, 2018; Günsel ve ark, 2019; Günsel ve ark, 2020; Unluer ve ark, 2019). Bu bağlamda, bu çalışmanın yeni antioksidan bileşiklerin keşfinde yararlı olacağı düşünülmüştür.

Bu çalışmada aynı zamanda daha önceden sentezlenen silisyum ftalosiyeninlerin bCA enzimi üzerindeki inhibitör etkileri değerlendirilip sonuçlar Çizelge 1'de  $\text{IC}_{50}$  değerleri olarak verilmiştir. Düşük  $\text{IC}_{50}$  değeri yüksek bCA inhibisyonunu göstermektedir. Silisyum ftalosiyeninlerin ilgili fonksiyonel grupları (metil ve etil) bCA enzim inhibisyonu üzerinde farklı etkiler göstermiştir. Enzim inhibisyon sonuçlarına göre incelenen silisyum ftalosiyeninlerden DM-C3-Si kodlu bileşiğin bCA aktivitesi üzerine herhangi bir etkisi olmayıp inaktif bulunmuştur. DE-C3-Si 2333  $\text{nM}$ 'lık  $\text{IC}_{50}$  değeri ile CA'nın en güçlü inhibitörleri arasında olan sülfanilamidden yaklaşık 2 kat daha yüksek inhibisyon etkisi göstermiştir. Bu değer ile DE-C3-Si bileşiği yeni potansiyel CA inhibitörleri sınıfları bulmak için kritik önem taşıdığını görülmektedir. Literatürde ftalosiyeninlerin farklı enzimler üzerine inhibisyon etkisi ile ilgili birçok çalışma vardır (Arslan ve ark, 2019; Demirbaş ve ark, 2019; Barut ve ark, 2017; Kantar ve ark, 2016). Fakat silisyum ftalosiyeninlerin CA enzimi üzerine inhibitör etkisi çalışmaları yeni yeni yapılmaktadır. Silisyum ftalosiyeninlerin karbonik anhidraz inhibitörleri olarak potansiyele sahip olduğunu ilk kez Arslan ve ark. (2018) tespit etmiştir (Arslan ve ark, 2018).

**Çizelge 1.** Silisyum ftalosiyanın bileşiklerinin ve standartların bCA enzim inhibisyonu ve antioksidan aktivite sonuçları

| Numune kodu  | Sığır karbonik anhidraz inhibisyon |  | Antioksidan aktivite                                      |                  |
|--------------|------------------------------------|--|---|------------------|
|              | IC <sub>50</sub> (nM)              |  | DPPH• temizleme (SC <sub>50</sub> , mg mL <sup>-1</sup> ) | FRAP* (TEAC, µM) |
| DM-C3-Si     | -                                  |  | 0.0199  | 232              |
| DE-C3-Si     | 2333                               |  | 0.0232  | 73               |
| Troloks      | T.E.                               |  | 0.0035  | T.E.             |
| BHT          | T.E.                               |  | 0.0081  | T.E.             |
| C Vitamini   | T.E.                               |  | 0.0295  | T.E.             |
| Sülfanilamid | 5000                               |  | T.E.  | T.E.             |

\* FRAP, DM-C3-Si için 43.0 µM ve DE-C3-Si 40.5 µM'a karşılık gelen 0.04 mg mL<sup>-1</sup>'de test edildi, T.E.: test edilmedi.

Her yıl antibiyotik dirençli bakteriler nedeniyle tüm dünyada en az 700.000 ölüm gerçekleşmektedir. Eğer bu sorunun çözülmesi gecikirse, gelecekte tüm insanlığın kontrol edilemeyen antibiyotik direnci nedeniyle çok ağır bedeller ödeyeceği aşikardır (United, 2019). Son zamanlarda sentezlenen ftalosiyanınların antimikrobiyal aktivite göstermesi her geçen gün büyüyen bu sorunun çözümü için umut verici olmuştur (Nyamu ve ark, 2018). Bu çalışmada kullanılan DE-C3-Si ve DM-C3-Si kodlu silisyum ftalosiyanınların disk difüzyon metodu ile antibakteriyel aktivite açısından üç Gram-negatif ve üç Gram-pozitif bakteriye karşı test edilmiştir. Elde edilen test sonuçlarına göre, her iki bileşikte oldukça düşük antibakteriyel aktivite göstermiştir (Çizelge 2). Her iki bileşikte 0,01 mg mL<sup>-1</sup>'de aktivite göstermemekle birlikte, diğer dozlarda gösterdikleri antibakteriyel etki de birbirine çok yakındır. Ayrıca Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere karşı gözlenen antibakteriyel aktiviteler arasında da dikkate değer bir farklılık yoktur. Tespit edilen antibakteriyel aktivitenin çok düşük olması, test edilen silisyum ftalosiyanınların çok büyük molekül yapısına sahip olmasına ve hücre membranından geçememiş olmasına bağlı olacağı düşünülmektedir (Nyamu ve ark, 2018). Ayrıca çalışılan bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarda çökerek çözünmemesi, bu bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarda çalışılabilmesini önlemiştir.

**Çizelge 2.** Çalışmada kullanılan silisyum ftalosiyanınların antibakteriyel aktivitesi

| Bakteriler           | Konsantrasyon (mg µL <sup>-1</sup> ) |     |     |     | MİK | Konsantrasyon (mg µL <sup>-1</sup> ) |     |     |     | MİK | N.K | P.K. |
|----------------------|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|
|                      | DE-C3-Si                             |     |     |     |     | DM-C3-Si                             |     |     |     |     |     |      |
|                      | 0.1                                  | 0.2 | 0.3 | 0.4 |     | 0.1                                  | 0.2 | 0.3 | 0.4 |     |     |      |
| <i>A. baumannii</i>  | -                                    | 9   | 9   | 7   | 0.2 | -                                    | 7   | 8   | 8   | 0.2 | -   | 18   |
| <i>K. pneumoniae</i> | -                                    | 8   | 9   | 8   | 0.3 | -                                    | 7   | 9   | 8   | 0.2 | -   | 18   |
| <i>C. freundii</i>   | -                                    | 8   | 9   | -   | 0.2 | -                                    | 8   | 9   | 8   | 0.2 | -   | 21   |
| <i>S. aureus</i>     | -                                    | 7   | 9   | 7   | 0.2 | -                                    | 8   | 9   | 7   | 0.2 | -   | 17   |
| <i>B. subtilis</i>   | -                                    | 7   | 8   | 8   | 0.2 | -                                    | 8   | 8   | -   | 0.2 | -   | 22   |
| <i>S. epidermis</i>  | -                                    | -   | 8   | -   | 0.3 | -                                    | -   | 7   | 7   | 0.3 | -   | 17   |

\*N.K: negatif kontrol (DMSO %90)

\*\*P.K: pozitif kontrol: SCF (30 µg/disk)

\*\*\*MİK: minimum inhibisyon konsantrasyonu (mg µL<sup>-1</sup>)

## SONUÇ

Bu çalışmada elde edilen veriler silisyum ftalosiyanın bileşiklerinin önemini ortaya koymuştur. Öncelikli olarak ilaç potansiyeli olan yeni karbonik anhidraz inhibitörlerinin üretilmesinde yeni çalışmaların yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Bu anlamda özellikle bileşikler arasında enzim inhibisyonu standart inhibitöre yakın olan DE-C3-Si bileşiği iyi bir başlangıç noktası olabilir. Ayrıca standart antioksidan olan C vitaminine kıyasla daha yüksek aktiviteleri nedeniyle de antioksidan ajanlar

olabilme potansiyeline sahip oldukları gözlemlenmiştir. Ancak, bu bileşiklerin antibakteriyel aktivitelerinin göz ardı edilebilecek kadar düşük olduğu tespit edilmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın test ve analizlerinin Espiye Meslek Yüksekokulundaki araştırma laboratuvarlarında yapılmasına imkan sağlayan Giresun Üniversitesi'ne teşekkür ederiz.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Agirtaş MS, Cabir B, Gümüş S, Özdemir S, Dündar A, 2018. Synthesis and Antioxidant, Aggregation, and Electronic Properties of 6-tert-butyl-1,4-benzodioxine Substituted Phthalocyanines. Turkish Journal of Chemistry. 42(1): 100-111.
- Alterio V, DiFiore A, D'Ambrosio K, Supuran CT, De Simone, G, 2012. Multiple Binding Modes of Inhibitors to Carbonic Anhydrases: How to Design Specific Drugs Targeting 15 Different Isoforms?. Chemical Reviews. 112(8), 4421-4468.
- Armstrong JM, Myers DV, Verpoorte JA, Edsall JT, 1966. Purification and Properties of Human Erythrocyte Carbonic Anhydrase. The Journal of Biological Chemistry. 241(21): 5137-5149.
- Arslan T, Biyiklioglu Z, Şentürk M, 2018. The Synthesis of Axially Disubstituted Silicon Phthalocyanines, Their Quaternized Derivatives and First Inhibitory Effect on Human Cytosolic Carbonic Anhydrase Isozymes hCA I and II. RSC Advances. 8: 10172-10178.
- Arslan T, Çakır N, Keleş T, Biyiklioglu Z, Senturk M, 2019. Triazole Substituted Metal-Free, Metallo-Phthalocyanines and Their Water Soluble Derivatives as Potential Cholinesterases Inhibitors: Design, Synthesis and in Vitro Inhibition Study. Bioorganic Chemistry. 90: 103100.
- Barut B, Demirbaş Ü, Özel A, Kantekin H, 2017. Novel Water Soluble Morpholine Substituted Zn(II) Phthalocyanine: Synthesis, Characterization, DNA/BSA Binding, DNA Photocleavage and Topoisomerase I Inhibition. International Journal of Biological Macromolecules. 105(1): 499-508.
- Basappa C, Reddy VKR, Kotresh HMN, Musturappa PK, Devendrachi MC, Ganesh SD, 2015. Synthesis, Characterization, Novel Interaction of DNA, Antioxidant and Antimicrobial Studies of New Water Soluble Metallophthalocyanines Posture Eight Hydroxyphenyl Moiety via 1,3,4-oxadiazole Bridge. Journal of Heterocyclic Chemistry. 52(6): 1782-1791.
- Bekaroğlu Ö, 1996. Phthalocyanines Containing Macrocycles. Applied Organometallic Chemistry. 10(8): 605-622.
- Bıyıklıoğlu Z, Alp H, 2016. Synthesis, Characterization, Electropolymerization and Aggregation Properties of Axially Diethyl-dimethylaminophenoxypropanoxy Substituted Silicon Phthalocyanines and Their Water Soluble Derivatives. Dyes and Pigments. 132, 213-222.
- Çelebi M, Ağırtaş MS, Dündar A, 2015. Different Peripheral Substituted Phthalocyanines: Synthesis, Characterization, Aggregation Behavior, Antioxidant and Antibacterial Activity. Journal of Structural Chemistry. 56(8): 1638-1645.
- Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O, Dyatmiko W, 1997. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagrae ablumei*. Helvetica Chimica Acta. 80(4): 1144-1152.

- Demirbaş Ü, Barut B, Yalçın İ, Değirmencioğlu İ, Yıldırım S, Özel A, 2019. Synthesis, Characterization, and Investigation of Cholinesterase Inhibitory Properties of Novel Phthalocyanines. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 56(5): 1553-1559.
- Demirkapi D, Şirin A, Turanlı-Yıldız B, Çakar ZP, Sesalan BŞ, 2014. The Synthesis of New Silicon Phthalocyanines and Analysis of Their Photochemical and Biological Properties. *Synthetic Metals*. 187: 152-159.
- Dini D, Barthel M, Schneider T, Ottmar M, Verma S, Hanack M, 2003. Phthalocyanines and Related Compounds as Switchable Materials Upon Strong Irradiation: the Molecular Engineering behind the Optical Limiting Effect. *Solid State Ionics*. 165: 289–303.
- Efe D, 2019. The Evaluation of the Antibacterial Activity of *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash Grown in Giresun. *Alinteri Journal of Agriculture Science*. 34(1): 3-4.
- Efe D, 2020. Carbonic Anhydrase Enzyme Inhibition and Biological Activities of *Satureja hortensis* L. Essential Oil. *Industrial Crops and Products*. 156: 112849.
- Farajzadeh N, Karaoglu HP, Akin M, Saki N, Koçak MB, 2019. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Novel Octa-substituted Phthalocyanines Bearing (trifluoromethoxy) Phenoxy Groups on Peripheral Positions. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. 23: 91-102.
- Günsel A, Alici EH, Bilgiçli AT, Arabacı G, Yaraşır MN, 2019. Antioxidant Properties of Water-Soluble Phthalocyanines Containing Quinoline 5-sulfonic acid Groups. *Turkish Journal of Chemistry*. 43: 1030-1039.
- Günsel A, Bilgiçli AT, Kandemir C, Sancak R, Arabacı G, Yaraşır MN, 2020. Comparison of Novel Tetra-Substituted Phthalocyanines with Their Quaternized Derivatives: Antioxidant and Antibacterial Properties. *Synthetic Metals*. 260: 116288.
- Kantar C, Mavi V, Baltaş N, Islamoğlu F, Şaşmaz S, 2016. Novel zinc(II) Phthalocyanines Bearing Azo-containing Schiff Base: Determination of pKa Values, Absorption, Emission, Enzyme Inhibition and Photochemical Properties. *Journal of Molecular Structure*. 1122: 88-99.
- Karaçelik AA, Küçük M, Efe D, Çakır V, Bıyıklıoğlu Z, 2021. Carbonic Anhydrase Inhibition Potential and Some Bioactivities of the Peripherally Tetrasubstituted Cobalt(II), Titanium(IV), Manganese(III) Phthalocyanines. *Letters in Drug Design & Discovery*. 18: E-pub Ahead of Print.
- Kluson P, Drobek M, Kalaji A, Zarubova S, Krysa J, Rakusan J, 2008. Singlet Oxygen Photogeneration Efficiencies of a Series of Phthalocyanines in Well-defined Spectral Regions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 199(2): 267-273.
- McKenna R, Supuran CT, 2014. Carbonic Anhydrase Inhibitors Drug Design. *Sub-cellular Biochemistry*. 75: 291-323.
- Nyamu SN, Ombaka L, Masika E, Ng'ang'a M, 2018. Antimicrobial Photodynamic Activity of Phthalocyanine Derivatives. *Advances in Chemistry*. 2018: 1-8.
- Oyaizu M, 1986. Studies on Products of Browning Reactions: Antioxidative Activities of Product of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. *Japan Journal of Nutrition*. 44(6): 307-315.
- Pastarekova S, Parkkila S, Pastorek J, Supuran CT, 2004. Carbonic Anhydrases: Current State of the Art, Therapeutic Applications and Future Prospects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 19(3): 199-229.
- Sarkı G, Kantekin H, Yalazan H, Kahrıman N, Biyıklıoğlu Z, Serdaroğlu V, 2019. Synthesis, Characterization and Electrochemical Studies of Metal-free and Metallophthalocyanines Containing Two Different Chalcone Units Substituted on Peripherally Positions. *Journal of Molecular Structure*. 1196: 592-603.

- Supuran CT, 2010. Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 20(12): 3467–74.
- Supuran CT, Scozzafava A, 2007. Carbonic Anhydrases as Targets for Medicinal Chemistry, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 15: 4336-4350.
- Unluer D, Kamiloglu AA, Direkel S, Bektas E, Kantekin H, Sancak K, 2019. Synthesis and Characterization of Metallophthalocyanine with Morpholine Containing Schiff base and Determination of Their Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Journal of Organometallic Chemistry*. 900: 120936.
- United I, 2019. No Time to Wait–Securing the Future from Drug-resistant Infections, Report to the Secretary General of the Nations. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/final-report/en/> (Erişim Tarihi: 02.10.2020).
- Ünlü S, Yaraşır MN, Kandaz M, Koca A, Salih B, 2008. Synthesis, Spectroscopy and Electrochemical Properties of Highly Soluble Fluoro Containing Phthalocyanines. *Polyhedron*. 27: 2805-2810.
- Yıldırım N, Bilgiçli AT, Alici EH., Arabacı G, Yarasir MN, 2017. Formation, Characterization, Aggregation, Fluorescence and Antioxidant Properties of Novel Tetrasubstituted Metal-free and Metallophthalocyanines Bearing (4-(methylthio)phenoxy) Moieties. *Journal of Molecular Structure*. 1144: 66-79.
- Yongde Y, Zhenguo J, 2006. Improved Photoreceptor Decay Characteristics of Vanadyl-phthalocyanine Films Annealed Under Magnetic Field. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 179: 348-350.
- Zhang L, Huang J, Ren L, Bai M, Wu L, Zhai B, Zhou X, 2008. Synthesis and Evaluation of Cationic Phthalocyanine Derivatives as Potential Inhibitors of Telomerase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 16(1): 303-312.

## ***Citrus Limon L. Peel Powder Incorporated Polyvinyl Alcohol/Corn Starch Antioxidant Active Films***

Pınar TERZİOĞLU<sup>1\*</sup>, Yusuf SICAK<sup>2</sup>

**ABSTRACT:** Active food packaging films has gain more significance over conventional packaging. In this study, novel active composite films were prepared by incorporating lemon peel to a polyvinyl alcohol-starch matrix. The morphological, thermal and antioxidant activity evaluation of polyvinyl alcohol-starch-lemon peel composite films were discussed to determine whether the presence and content of lemon peel influenced the film's characteristics. The results indicated that tested properties of composite films depended on the content of lemon peel. It was found that the thermal stability and antioxidant activity of films considerably improved upon the incorporation of peel. The prepared films with enhanced antioxidant activity may be used for preservation of oxidation-sensitive food products. The results showed that lemon by-product has great potential to be evaluated into added-value products for functional packaging applications. The developed packaging films will be new alternatives for food preservation materials.

**Keywords:** Active Packaging, Agro-waste, Biodegradable Polymer, Lemon Rind, Radical Scavenging

<sup>1</sup> Pınar TERZİOĞLU ([Orcid ID: 0000-0003-4114-7044](https://orcid.org/0000-0003-4114-7044)), Bursa Technical University, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Department of Polymer Materials Engineering, Bursa, Turkey

<sup>2</sup> Yusuf SICAK ([Orcid ID: 0000-0003-2339-5837](https://orcid.org/0000-0003-2339-5837)), Muğla Sıtkı Koçman University, Köyceğiz Vocational School, Department of Medicinal and Aromatic Plants, Muğla, Turkey

\*Corresponding Author: Pınar TERZİOĞLU, e-mail: pinar.terzioglu@btu.edu.tr

## INTRODUCTION

Food packaging sector is representing more than half of all packaging applications that has a significant role in the modern economy (Nemes et al., 2020; Ludwicka et al., 2020). The most extensively used food packages are fabricated from petroleum-derived polymers, although they are known to have negative effect on the environment due to being resistant to degradation. Hence, the environmental concerns and growing consumption bring along sustainable packaging requirements (Crizel et al., 2018). Moreover, there has been rising demand from consumers for high quality and minimally processed foods which result in the development of novel packaging concepts (Yu et al., 2019; Apicella et al., 2019). Among the innovative packages (aseptic, microwaveable, modified atmosphere, smart etc.) that emerged in the global market, active packaging systems are gaining a particular interest due to surpassing the traditional food packaging materials with additional functions (Hanani et al., 2019; Belan et al., 2019). In this dynamic technology, it is aimed to maintain food quality generally by the release of bioactive agents from the packaging. Especially, antioxidant including films could be used to prevent oxidative damage in fatty foods (Moreno et al., 2015). In this context, the development of biodegradable packages containing bioactive compounds obtained from waste materials is among the top sustainable active packaging trends.

Polyvinyl alcohol (PVA)-starch composite films were widely investigated green alternatives to produce eco-products for packaging applications. The main advantages of combining these two polymers can be concluded as overcoming the low processability and poor mechanical strength of starch while maintaining the biodegradability and low price of the composites (Popescu et al., 2018; Chen et al., 2020). Various studies have been reported for the preparation of PVA-starch films with improved properties (Junlapong et al., 2019; Chen et al., 2020; Kong et al., 2020). Although PVA-starch composites are having reasonably good features, researches are ongoing to append additional properties including bioactivity. This can be achieved by incorporating organic or inorganic fillers. Recently, the addition of agricultural wastes such as pomegranate peel (Hanani et al., 2019), apple peel (Riaz et al., 2020) and papaya peel (de Moraes Crizel et al., 2018) opened a new path to gain bioactivity to polymer composites for active packaging applications. All studies presented an important enhancement in the antioxidant activity of films demonstrating the films can be evaluated as active packaging materials.

Lemon (*Citrus limon* L.) peel is such a residue eventuated from fruit juice processing (Tomar and Akarca, 2019). The peels compose approximately more than half of the fresh lemon weight (Jagannath et al., 2019; Simeone et al., 2020). A little quantity of lemon peel has been used in the fragrance, food and pharmaceutical industry (El-ghfar et al., 2016; Saleem and Saeed, 2020). However, the rest of the peels generates considerable pollution problems. Since the management of citrus waste is costly, the proper evaluation of them is necessary (Anticona et al., 2020). Lemon peel contains many bioactive compounds as essential oils, phenolic acids, flavonoids (flavanones, flavonols, and flavones), vitamins and minerals as well as carbohydrates, pectin, crude fiber (Papoutsis et al., 2016). These functional ingredients have been linked to diverse biological activities including antioxidant and antimicrobial activities. The use of lemon husk in active packaging appears as an interesting inexpensive alternative.

There is no research on the development of antioxidant active films containing lemon peel. The principal goal of this work was the evaluation of the antioxidant capacity of PVA-starch based active packaging materials containing waste lemon husks. The active composite films were examined by thermogravimetric analysis (TGA) and scanning electron microscopy (SEM). Antioxidant activities of the composite films were also evaluated by using ABTS cation radical scavenging, DPPH radical scavenging,  $\beta$ -carotene-linoleic acid and cupric reducing antioxidant capacity assays.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Poly(vinyl alcohol) (87.16% hydrolysis degree, 95.4% purity) was obtained from Zag Kimya (TURKEY). Corn starch and citric acid was purchased from Güneş Company and Aksu Company (TURKEY), respectively. Copper (II) chloride, glycerol, sodium hydroxide and sodium chloride were purchased from Merck (Darmstadt, GERMANY). Butylated hydroxytoluene (BHT),  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), linoleic acid and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) were purchased from Sigma Chemical Co. (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GERMANY). Lemon peel was purchased from Naturelka (Aydın, TURKEY). The lemon peel sieved using a steel mesh sieve (<200  $\mu$ m). All other chemicals and solvents were of analytical grade.

### Experimental procedure

#### Preparation of active films

The five different active films were prepared by casting method (Table 1) according to the method of Terzioglu and Parin (2020) with slight modifications. The PVA film solution (8% w v<sup>-1</sup>) was prepared in distilled water under magnetic stirring (700 rpm) at 90°C. Starch (2% w v<sup>-1</sup>) was gelatinized (95°C, 15 minutes). Subsequently, gelatinized corn starch mixed with the PVA solution under continuous stirring (70°C, 60 minutes). The homogenous solution was cooled to 50°C. Then citric acid (10%, w w<sup>-1</sup> of total polymer weight) was added and stirred for 10 minutes. Then, glycerol (20%, w w<sup>-1</sup> of total polymer weight) as a plasticizer and Tween 80 (50  $\mu$ L) as an emulsifier was added to the mixture under constant stirring for 10 minutes, respectively. Finally, the lemon peel powder at concentrations of 1, 2, 4 and 8% w/w based on total polymer weight was added to the PVA-starch film solution. The film solution (15 mL) was cast onto the Exoglass tart mould (10 cm diameter) and allowed to be dry at 40 °C for 24 hours. PVA-Corn starch without lemon peel was also produced as a control film.

**Table 1.** The composite films formulation

| Sample Code | PVA (w v <sup>-1</sup> %) | Starch (wv <sup>-1</sup> %) | Lemon peel (wt % of total polymer) | Glycerol (wt % of total polymer) | Citric acid (wt % of total polymer) |
|-------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| L0          | 8                         | 2                           | 0                                  | 20                               | 10                                  |
| L1          | 8                         | 2                           | 1                                  | 20                               | 10                                  |
| L2          | 8                         | 2                           | 2                                  | 20                               | 10                                  |
| L3          | 8                         | 2                           | 4                                  | 20                               | 10                                  |
| L4          | 8                         | 2                           | 8                                  | 20                               | 10                                  |

### Characterization of active films

#### Thickness of films

The film thickness was measured by a digital caliper (ABS ASİMETO, Turkey). Measurements were randomly taken at three locations on each specimen. The results were expressed as the mean of measurements.

#### Surface morphology of films

The surface of the films was recorded using a scanning electron microscope (SEM JEOL JSM-7600 F, JAPAN). The films were coated with gold (Emitech K550, ENGLAND) before SEM analysis.



## Thermal properties

Thermogravimetric analyses (TGA) of the films were conducted on a TGA STA 6000 analyzer (Perkin Elmer™ Instruments, USA) as described by Parin et al. (2020).

## Determination of antioxidant activity

DPPH free radical scavenging and ABTS cation radical scavenging assays were conducted as described by Ferreira et al. (2014). The procedure defined by Başaran et al. (2019) was used to determine the  $\beta$ -Carotene-linoleic acid and cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) of films with some adjustments. Solutions of films were prepared at 50, 25, 12.5 and 6.25 ppm concentrations. The used reference compounds were BHT and  $\alpha$ -tocopherol. The antioxidant activity results of  $\beta$ -carotene-linoleic acid, DPPH<sup>•</sup> scavenging, and ABTS<sup>•+</sup> scavenging activity assays are presented as 50% inhibition concentration (IC<sub>50</sub>), while CUPRAC capacity activity assay results were given as absorbance (A<sub>0.50</sub>). The antioxidant activity assays results were performed on a 96-well microplate reader, SpectraMax 340PC384, Molecular Devices (USA).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Film thickness

Film thickness is a key factor that influences the various properties of films including barrier, optical and mechanical (Marvdashti et al., 2017). The thickness of films varied from 0.22 to 0.26 mm (Table 2). Generally, the films with 4 wt% and 8 wt% lemon peel powder were slightly thicker than the other films. The rise of film thickness with the addition of lemon peel could be related to the increase of solid content in the film forming solution. Our results are in agreement with the studies reported by Moghadam et al. (2020) and Hanani et al. (2019) who examined the effects of pomegranate peel powder addition on the thickness of mung bean protein and fish gelatin films, respectively.

**Table 2.** Thickness of PVA-Corn starch-Lemon peel composite films

| Sample | Thickness (mm) |
|--------|----------------|
| L0     | 0.22±0.01      |
| L1     | 0.22±0.01      |
| L2     | 0.22±0.01      |
| L3     | 0.23±0.01      |
| L4     | 0.26±0.02      |

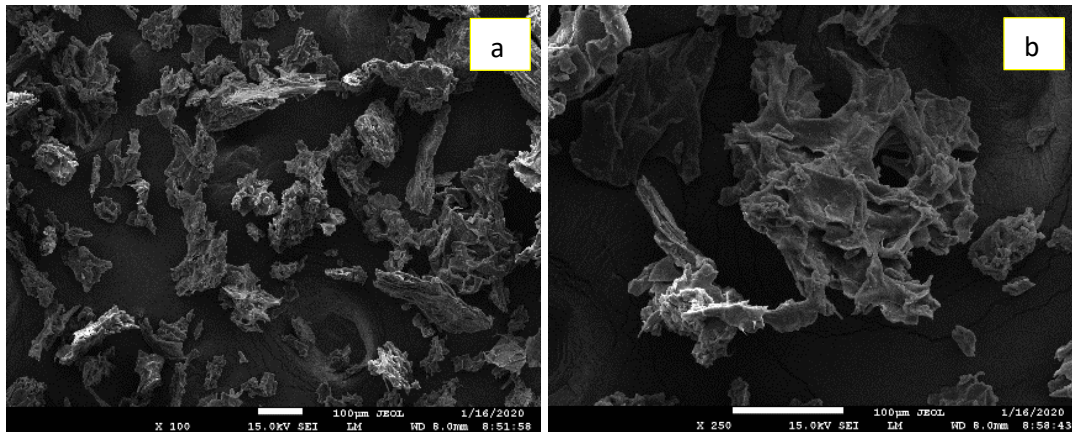
The selection of the suitable antioxidant additive to be incorporated in the packaging material has great importance. The antioxidant additive and the packaging material should be compatible to obtain a homogeneous distribution (Gomez-Estaca et al., 2014). The thicknesses of the prepared PVA-Corn starch-Lemon peel composite films were homogeneous indicating the good compatibility of the selected matrix materials.

### Microstructures of the lemon peel and films

Scanning electron microscopy micrographs of the lemon peel powders are presented in Figure 1. It is clear that the lemon peel particles have heterogeneous size and irregular shape with rough texture.

Scanning electron micrographs of neat PVA-Corn starch (L0) and PVA-Corn starch-Lemon peel composite films (L1-L4) are shown in Figure 2. The embedded granules of starch in a continuous PVA matrix was observed from the SEM image of neat PVA-Corn starch film. Similar morphology was reported by Das et al. (2010) for glycerol and epichlorohydrin cross-linked starch-PVA films. The incorporation of lemon peel increased the homogeneity of the film surface which could be related to

hydrogen bonding between the -OH groups of lemon peel, PVA and starch (Boonsuk et al., 2020). Additionally, this showed the better adhesion and compatibility between peel and matrix (Singha et al., 2015). The surface of lemon peel incorporated composite films were relatively smooth that have a continuous matrix with no pores and good structural integrity. Very sparsely distributed small particles were observed on the surface of the films. Moghadam et al. (2020) also observed that when pomegranate peel was incorporated into mug-bean protein films, white spots occurred in the SEM micrographs base on the availability of insoluble fibers in the peel. Cross-sections of films were also examined with SEM. The composite films exhibited a rough cross-section. Especially, the cross section of L4 sample showed increased heterogeneity with pores and cracks.



**Figure 1.** SEM micrographs of lemon peel powder a. x 100 b. x 250 magnification.

### Thermal analysis of the films

It is very significant to determine the thermal properties and stability of the packaging films because there are large temperature variations according to application such as frozen storage and heat processes during the preparation or processing of foods (Rešček et al., 2018; Picchio et al. 2018).

Thermal decomposition curves, thermal stability and degradation temperatures of the composite films incorporated with lemon peel at different concentrations were presented in Figure 3 and Table 3. All films exhibited similar degradation pattern. The TGA curves imply that the incorporation of lemon peel increased the thermal stability. Especially the film with the highest amount (8 wt %, L4) of lemon peel showed higher resistance against early degradation when compared to the neat film. It was also clear from the 90 wt % loss of L4 and control (L0) sample since the 90 wt % loss temperature of the film was extended from 455 to 474°C with lemon peel incorporation. The presence of lemon peel enhanced the thermal stability due to providing physical bonding and good crosslinking between the components of composite film (Sharmin et al. 2020).

The thermal degradation of composite films occurred in five different stages. The initial stage occurred between 50-160°C is related to the loss of water, residual acetic acid and other volatile contents (e.g. glycerol) in composite films (Hiremani et al., 2020). The second stage 220-280°C associated with the degradation of molecules of polymers by dehydration of the hydroxyl group. This stage was followed by the complete volatilization of the polymer products at 390-440°C (Wu et al., 2019). Through the last of the fourth stage (460-600°C) carbonization of residual organic matter (Sin et al., 2011). The last stage was associated with the burning of the carbonaceous residues which was formed under nitrogen

condition. After 650°C, the curve tended to be smooth. The prepared composite films can be safely used up to 210°C as also reported by Sharmin et al. (2020).

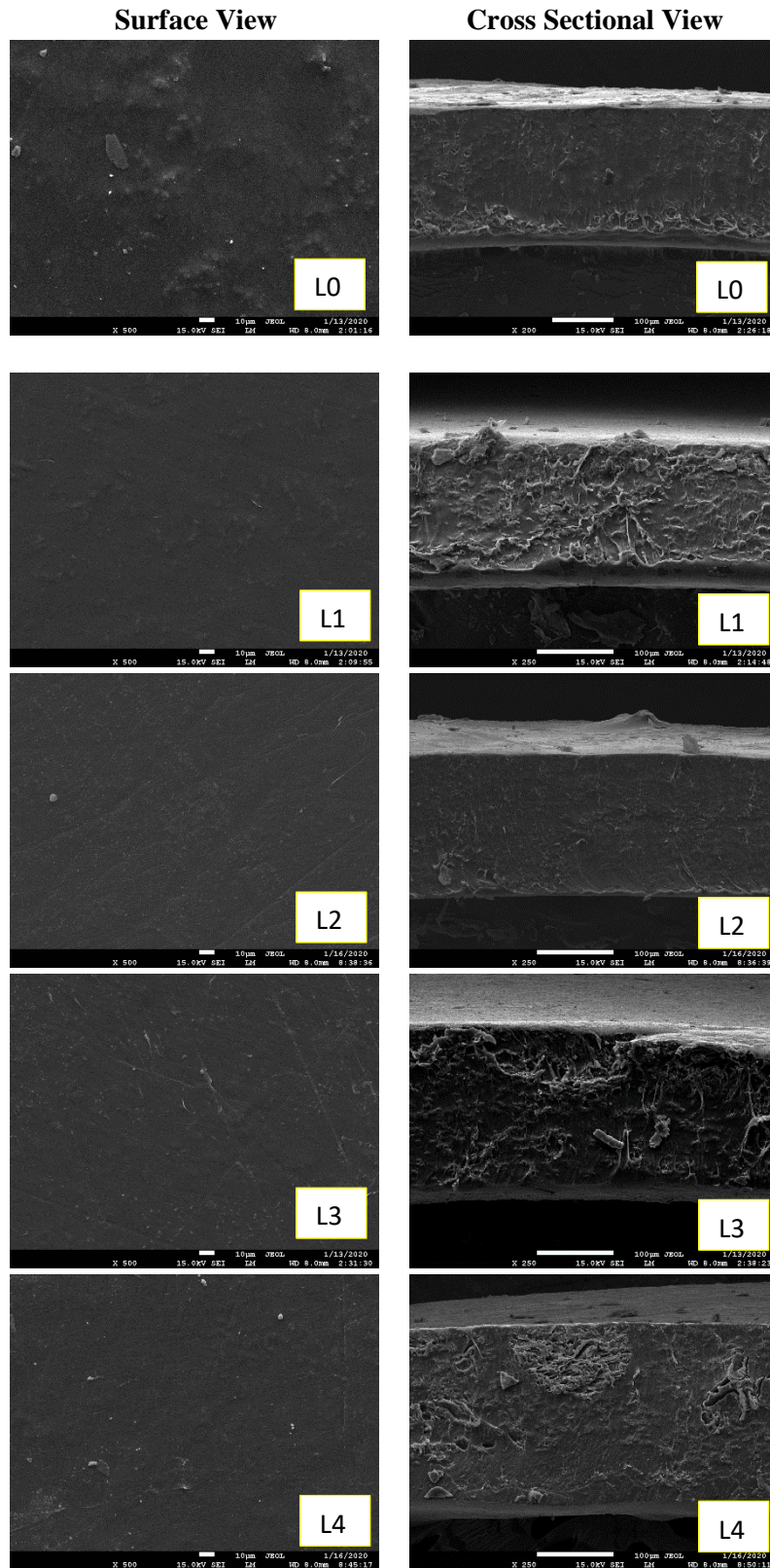
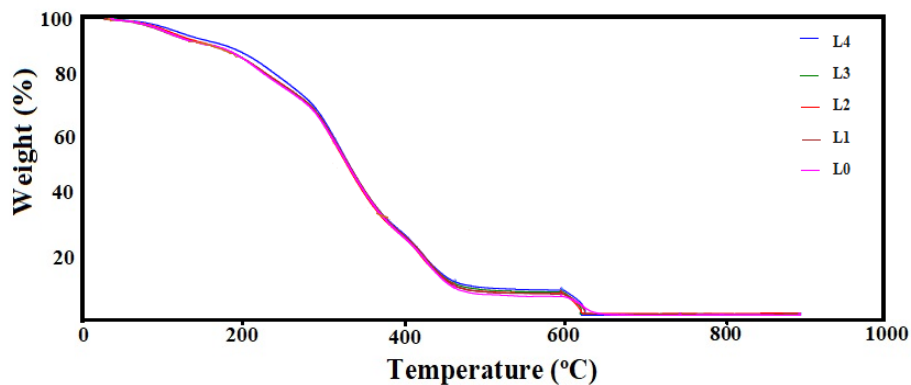


Figure 2. SEM micrographs of lemon peel incorporated PVA-starch composite films

**Table 3.** Degradation temperature of films at residual weight 90 % ( $T_{d90}$ ), 50 % ( $T_{d50}$ ), and 10 % ( $T_{d10}$ ) and the residue at 600°C

| Sample | $T_{d10}$ (°C) | $T_{d50}$ (°C) | $T_{d90}$ (°C) | Residual weight (%) at 600 °C |
|--------|----------------|----------------|----------------|-------------------------------|
| L0     | 455.40         | 330.23         | 173.52         | 5.86                          |
| L1     | 460.76         | 331.45         | 171.89         | 6.60                          |
| L2     | 459.61         | 328.88         | 172.17         | 6.59                          |
| L3     | 465.09         | 329.90         | 171.39         | 7.07                          |
| L4     | 474.92         | 331.76         | 185.46         | 7.87                          |

**Figure 3.** Thermogravimetric curves of lemon peel incorporated PVA-starch composite films.

### Antioxidant activity of films

Oxidation is the primary non-microbial reason of quality deterioration in terms of shelf life, nutritional value and sensory qualities (appearance of rancidity, off-odors & flavors, color, texture etc.) in various foods (Wrona et al., 2021; Choulitoudi et al., 2020). Therefore, the antioxidant activity of films is a significant active function in the food packaging context due to having a pivotal role in food quality as well as preservation against oxidation (Moreirinha et al., 2020).

The effect of lemon peel on the bioactivity of PVA-starch composite films was evaluated through four different antioxidant activity assays (Table 4). Films showed lower antioxidant activity than lemon peel powder. The results demonstrated that the antioxidant activity of the PVA-starch film was significantly increased with the increase of lemon peel content. The PVA-starch film with 8% lemon peel had the highest radical scavenging capacity. Lemon peel is a well-known rich source of bioactive compounds that are potent natural antioxidants such as essential oil, flavonoids, phenolic compounds and vitamins (Zhang et al., 2018; Wang et al., 2020; Elkhatim et al., 2018). The use of lemon peel containing films might be advantageous for the packaging of foods that have high sensitivity to oxidation.

Similar results were reported in the study of Gaikwad et al. (2016) on the antioxidant potential of apple pomace incorporated PVA active food packaging films. The findings of the study indicated that the incorporation of apple pomace to PVA films enhanced the DPPH scavenging activity of the biocomposite films. It was stated that the antioxidant activities of composite films were lower than the apple pomace as well as the antioxidant potential of the films were increased with the increment of a-pomace amount. Our results were also in agreement with those of Zhang et al. (2019) who reported significant enhancements in the antioxidant ability of composite films composed of chitosan and mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) rind powder. Moreover, Hanani et al. (2019) reported that the addition of an antioxidant biowaste, pomegranate peel powder, to fish gelatin films improved the antioxidant properties of the films in both DPPH and ABTS radical-scavenging activity assays.

**Table 4.** Antioxidant potential of PVA-starch films containing different amounts of lemon peel powder

| Sample                     | Antioxidant Activity <sup>a</sup>                       |   |   |   |
|----------------------------|---|---|---|---|
|                            | DPPH scavenging (IC <sub>50</sub> µg mL <sup>-1</sup> ) | ABTS scavenging (IC <sub>50</sub> µg mL <sup>-1</sup> ) | $\beta$ -carotene/linoleic acid assay (IC <sub>50</sub> µg mL <sup>-1</sup> ) | CUPRAC capacity (A <sub>0.5</sub> µg mL <sup>-1</sup> ) |
| LO                         | 31.16±0.24  | 40.18±0.34  | 43.54±0.72  | 36.27±0.01  |
| L1                         | 28.71±0.46  | 32.02±0.86  | 38.10±0.25  | 30.15±0.00  |
| L2                         | 26.09±0.33  | 25.35±0.69  | 32.26±0.68  | 29.36±0.02  |
| L3                         | 24.24±0.50  | 22.52±0.37  | 28.61±0.53  | 24.18±0.00  |
| L4                         | 22.07±0.13  | 20.01±0.73  | 26.82±0.41  | 23.75±0.01  |
| Lemon peel                 | 10.06±0.19  | 19.73±0.08  | 13.20±0.11  | 10.03±0.03  |
| $\alpha$ -TOC <sup>b</sup> | 12.26±0.07  | 4.87±0.45   | 4.50±0.09   | 40.55±0.04  |
| BHT <sup>b</sup>           | 54.97±0.99  | 2.91±0.55   | 2.34±0.09   | 4.00±0.04   |

<sup>a</sup> Values expressed are means  $\pm$  SD of three parallel measurements.  $p < .05$ , significantly different with student's t-test.

<sup>b</sup> Reference compounds.

## CONCLUSION

In this study, a new approach was developed to add value to lemon husk by a cost-effective way to obtain functional packaging materials. Active composite films composed of PVA, starch and lemon peel powder were successfully prepared by solvent casting technique. The morphological analysis showed that the addition of lemon peel increased the homogeneity of the film surface. The thermal stability and bioactivity of films enhanced with the incorporation of lemon peel. The films are potential low-cost antioxidant active packaging candidates with the purpose to broaden the shelf-life foodstuffs.

## Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

## Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

## REFERENCES

- Apicella A, Adiletta G, Di Matteo M, Incarnato L, 2019. Valorization of Olive Industry Waste Products for Development of New Eco-sustainable, Multilayer Antioxidant Packaging for Food Preservation. *Chemical Engineering Transactions* 75:85-90.
- Anticono M, Blesa J, Frigola A, Esteve MJ, 2020. High Biological Value Compounds Extraction from Citrus Waste with Non-Conventional Methods. *Foods* 9:811.
- Başaran E, Sıcak Y, Sogukomerogullari HG, Karaküçük-Iyidoğan A, Oruç-Emre EE, Sönmez M, Öztürk M, 2019. Synthesis of novel chiral metal complexes derived from chiral thiosemicarbazide ligands as potential antioxidant agents. *Chirality* 31: 434-444.
- Belan DL, Mopera LE, Flores FP, 2019. Development and characterisation of active antioxidant packaging films. *International Food Research Journal* 26(2): 411-420.
- Boonsuk P, Sukolrat A, Kaewtatip K, Chantarak S, Kelarakis A, Chaibundit C, 2020. Modified cassava starch/poly(vinyl alcohol) blend films plasticized by glycerol: Structure and properties. *Journal of Applied Polymer Science* 137 (26):48848.
- Chen Z, Zong L, Chen C, Xie J, 2020. Development and characterization of PVA-Starch active films incorporated with  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex embedding lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil. *Food Packaging and Shelf Life* 26:100565.
- Choulitoudi E, Velliopoulou A, Tsimogiannis D, Oreopoulou V, 2020. Effect of active packaging with *Satureja thymbra* extracts on the oxidative stability of fried potato chips. *Food Packaging and Shelf Life* 23:100455.
- Crizel TM, Rios AO, Alves VD, Bandarra N, Moldao-Martins M, Flores SH, 2018. Active food packaging prepared with chitosan and olive pomace. *Food Hydrocolloids* 74:139-150.

- Das K, Ray D, Bandyopadhyay NR, Gupta A, Sengupta S, Sahoo S, Mohanty A, Misra M, 2010. Preparation and Characterization of Cross-Linked Starch/Poly(vinyl alcohol) Green Films with Low Moisture Absorption. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 49: 2176-2185.
- De Moraes Crizel T, de Oliveira Rios A, Alves DV, Bandarra N, Moldão-Martins M, Flôres SH, 2018. Biodegradable Films Based on Gelatin and Papaya Peel Microparticles with Antioxidant Properties. *Food and Bioprocess Technology* 11:536-550.
- El-ghfar MHAA, Ibrahim HM, Hassan IM, Fattah AAA, Mahmoud MH, 2016. Peels of Lemon and Orange as Value-Added Ingredients: Chemical and Antioxidant Properties. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 5(12): 777-794.
- Elkhatim KAS, Elagib RAA, Hassan AB, 2018. Content of phenolic compounds and vitamin C and antioxidant activity in wasted parts of Sudanese citrus fruits. *Food Science and Nutrition* 6:1214-1219.
- Ferreira AS, Nunes C, Castro A, Ferreira P, Coimbra MA, 2014. Influence of grape pomace extract incorporation on chitosan films properties. *Carbohydrate Polymers* 113:490-499.
- Gaikwad KK, Lee JY, Lee YS, 2016. Development of polyvinyl alcohol and apple pomace bio-composite film with antioxidant properties for active food packaging application. *Journal of Food Science and Technology* 53(3): 1608-1619.
- Gómez-Estaca J, López-de-Dicastillo C, Hernández-Muñoz P, Catalá R, Gavara R, 2014. Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology* 35(1):42-51.
- Jagannath A, Biradar R, 2019. Comparative Evaluation of Soxhlet and Ultrasonics on the Structural Morphology and Extraction of Bioactive Compounds of Lemon (*Citrus limon L.*) Peel. *Journal of Food Chemistry and Nanotechnology* 5(3): 56-64.
- Junlapong K, Boonsuk P, Chaibundit C, Chantarak S, 2019. Highly water resistant cassava starch/poly(vinyl alcohol) films. *International Journal of Biological Macromolecules* 137:521-527.
- Hanani ZAN, Yee FC, Nor-Khaizura MAR, 2019. Effect of pomegranate (*Punica granatum L.*) peel powder on the antioxidant and antimicrobial properties of fish gelatin films as active packaging. *Food Hydrocolloids* 89: 253-259.
- Hiremani VD, Gasti T, Sataraddi S, Vanjeri VN, Goudar N, Masti SP, Chougale RB, 2020. Characterization of Mechanical and Thermal Properties of Glycerol Mixed Oxidized Maize Starch/Polyvinyl alcohol Blend Films. *Chemical Data Collections* 28:100416.
- Kong R, Wang J, Cheng M, Lu W, Chen M, Zhang R, Wang X, 2020. Development and characterization of corn starch/PVA active films incorporated with carvacrol nanoemulsions. *International Journal of Biological Macromolecules* 164:1631-1639.
- Ludwicka K, Kaczmarek M, Białkowska A, 2020. Bacterial Nanocellulose—A Biobased Polymer for Active and Intelligent Food Packaging Applications: Recent Advances and Developments. *Polymers* 12(10):2209.
- Marvdashti LM, Koocheki A, Yavarmanesh M, 2017. Alyssum homolocarpum seed gum-polyvinyl alcohol biodegradable composite film: Physicochemical, mechanical, thermal and barrier properties. *Carbohydrate Polymers* 155: 280-293.
- Moghadam M, Salami M, Mohammadian M, Khodadadi M, Emam-Djomeh Z, 2020. Development of antioxidant edible films based on mung bean protein enriched with pomegranate peel. *Food Hydrocolloids* 104:105735.
- Moreirinha C, Vilela C, Silva NHCS, Pinto RJB, Almeida A, Rocha MAM, Coelho E, Coimbra MA, Silvestre AJD, Freire CSR, 2020. Antioxidant and antimicrobial films based on brewers spent grain arabinoxylans, nanocellulose and feruloylated compounds for active packaging. *Food Hydrocolloids* 108:105836.
- Moreno O, Atares L, Chiralt A, 2015. Effect of the incorporation of antimicrobial/antioxidant proteins on the properties of potato starch films. *Carbohydrate Polymers* 133:353-364.
- Nemes SA, Szabo K, Vodnar DC, 2020. Applicability of Agro-Industrial By-Products in Intelligent Food Packaging. *Coatings* 10(6):550.
- Papoutsis K, Pristijono P, Golding JB, Stathopoulos CE, Scarlett CJ, Bowyer MC, Vuong QV, 2016. Impact of different solvents on the recovery of bioactive compounds and antioxidant properties from lemon (*Citrus limon L.*) pomace waste. *Food Science and Biotechnology* 25(4): 971-977.

- Parın FN, Yıldırım K, Terzioğlu P, 2020. Biochar loaded chitosan/gelatin/poly(ethylene glycol) biocomposite beads: Morphological, thermal and swelling properties. *Journal of Innovative Science and Engineering* 4(2): 56-68.
- Picchio ML, Ronco LI, Passeggi MCG, Minari RJ, Gugliotta LM, 2018. Poly(n-butyl acrylate)–Casein Nanocomposites as Promising Candidates for Packaging Films. *Journal of Polymers and the Environment* 26:2579-2587.
- Popescu MC, Dogaru BI, Goanta M, Timpu D, 2018. Structural and morphological evaluation of CNC reinforced PVA/Starch biodegradable films. *International Journal of Biological Macromolecules* 116:385-393.
- Rešček A, Katančić Z, Krehula LK, Ščetar M, Hrnjak-Murgić Z, Galić K, 2018. Development of Double-Layered PE/PCL Films for Food Packaging Modified with Zeolite and Magnetite Nanoparticles. *Advances in Polymer Technology* 37(3):837-842.
- Riaz A, Lagnika C, Abdin M, Hashim MM, Ahmed W, 2020. Preparation and Characterization of Chitosan/Gelatin-Based Active Food Packaging Films Containing Apple Peel Nanoparticles. *Journal of Polymers and Environment* 28:411–420.
- Saleem M, Saeed MT, 2020. Potential application of waste fruit peels (orange, yellow lemon and banana) as wide range natural antimicrobial agent. *Journal of King Saud University- Science* 32(1): 805-810.
- Sharmin E, Kafyah MT, Alzaydi AA, Fatani AA, Hazazzi FA, Babgi SK, Alqarhi NM, Sindi AAH, Akram D, Alam M, Alam J, Al-Madboly LA, Shoeib NA, Alqahtani AM, Mojally M, 2020. Synthesis and characterization of polyvinyl alcohol/corn starch/linseed polyol-based hydrogel loaded with biosynthesized silver nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules* 163:2236-2247.
- Simeone GDR, Di Matteo A, Rao MA, Di Vaio C, 2020. Variations of peel essential oils during fruit ripening in four lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. F.) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100:193-200.
- Singha AS, Priya B, Pathania D, 2015. Cornstarch/Poly(vinyl alcohol) Biocomposite Blend Films: Mechanical Properties, Thermal Behavior, Fire Retardancy, and Antibacterial Activity. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization* 20(4): 357-366.
- Sin LT, Rahman WA, Rahmat AR, Mokhtar M, 2011. Determination of thermal stability and activation energy of polyvinyl alcohol–cassava starch blends. *Carbohydrate Polymers* 83:303–305.
- Terzioğlu P, Parın FN, 2020. Polyvinyl Alcohol-Corn Starch-Lemon Peel Biocomposite Films as Potential Food Packaging. *Celal Bayar University Journal of Science* 16(4):373-378.
- Tomar O, Akarca G, 2019. Effects of Ice Cream Produced with Lemon, Mandarin, and Orange Peel Essential Oils on Some Physicochemical, Microbiological and Sensorial Properties. *Kocatepe Veterinary Journal* 12(1):62-70.
- Wang J, Bian Y, Cheng Y, Sun R, Li G, 2020. Effect of lemon peel flavonoids on UVB-induced skin damage in mice. *RSC Advances* 10:31470-31478.
- Wrona M, Silva F, Salafranca J, Nerin C, Alfonso MJ, Caballero MA, 2021. Design of new natural antioxidant active packaging: Screening flowsheet from pure essential oils and vegetable oils to ex vivo testing in meat samples. *Food Control* 120:107536.
- Wu Z, Huang Y, Xiao L, Lin D, Yang Y, Wang H, Yang Y, Wu D, Chen H, Zhang Q, Qin W, Pu S, 2019. Physical properties and structural characterization of starch/polyvinyl alcohol/graphene oxide composite films. *International Journal of Biological Macromolecules* 123:569–575.
- Yu Z, Wang W, Kong F, Lin M, Mustapha A, 2019. Cellulose nanofibril/silver nanoparticle composite as an active food packaging system and its toxicity to human colon cells. *International Journal of Biological Macromolecules* 129:887-894.
- Zhang LL, Lv S, Xu JG, Zhang LF, 2018. Influence of drying methods on chemical compositions, antioxidant and antibacterial activity of essential oil from lemon peel. *Natural Product Research* 32(10) :1184-1188.
- Zhang X, Liu J, Yong H, Qin Y, Liu J, Jin C. 2020. Development of antioxidant and antimicrobial packaging films based on chitosan and mangosteen (*Garciniamangostana* L.) rind powder. *International Journal of Biological Macromolecules* 145:1129-1139.

**To Cite:** Dincer Ö, Celebioglu HU, Hamid A, Aftab MN, Karadağ A, 2021. Saccharification of Hazelnut and Rhododendron Biomasses Using  $\beta$ -xylanase from *Thermotoga naphthophila*. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1321-1328.

### Saccharification of Hazelnut and Rhododendron Biomasses Using $\beta$ -xylanase from *Thermotoga naphthophila*

Özgenur DİNÇER<sup>1</sup>, Hasan Ufuk CELEBIOGLU<sup>2\*</sup>, Attia HAMID<sup>3</sup>, Muhammad Nauman AFTAB<sup>4</sup>, Ahmet KARADAĞ<sup>5</sup>

**ABSTRACT:** Enzymes can be used in various biotechnological applications due to the easy and cheap production. Since xylanase enzymes are preferred in various industries, research on this enzyme is extensively being carried out. In this study, the  $\beta$ -xylanase gene was cloned from *Thermotoga naphthophila*, a thermophilic organism. The expression vector pET21a(+) was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). As a result of the studies, the pH, temperature and IPTG concentration of the enzyme were optimized to obtain highest expression. Dinitrosalicylic acid (DNS) was used to determine sugar content of the enzyme. The molecular mass of the purified  $\beta$ -xylanase enzyme was determined using sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular mass of the enzyme was calculated to be 38 kDa. Enzymatic hydrolysis of hazelnut shell, rhododendron branch and rhododendron leaves was performed. Released reducing sugar contents from the enzymatic hydrolysis were calculated as 0.8461 mg mL<sup>-1</sup>, 0.6976 mg mL<sup>-1</sup> and 0.3605 mg mL<sup>-1</sup> for hazelnut shell, rhododendron branch, and rhododendron leaf respectively. In conclusion,  $\beta$ -xylanase enzyme can be an effective source for enzymatic hydrolysis to produce fermentable sugars from such biomasses.

**Keywords:** bioethanol, cloning, expression, saccharification,  $\beta$ -xylanase

<sup>1</sup> Özgenur DİNÇER ([Orcid ID: 0000-0002-2598-4865](https://orcid.org/0000-0002-2598-4865)), Bartın University, Department of Molecular Biology and Genetics, Bartın, Turkey

<sup>2</sup> Hasan Ufuk CELEBIOGLU ([Orcid ID: 0000-0001-7207-2730](https://orcid.org/0000-0001-7207-2730)), Bartın University, Department of Biotechnology, Bartın, Turkey

<sup>3</sup> Attia HAMID ([Orcid ID: 0000-0001-8296-4791](https://orcid.org/0000-0001-8296-4791)), Government College University Lahore, Department of Industrial Biotechnology, Lahore, Paksitan

<sup>4</sup> Muhammad Nauman AFTAB ([Orcid ID: 0000-0002-6224-8496](https://orcid.org/0000-0002-6224-8496)), Government College University Lahore, Department of Industrial Biotechnology, Lahore, Paksitan

<sup>5</sup> Ahmet KARADAĞ ([Orcid ID: 0000-0003-4676-683X](https://orcid.org/0000-0003-4676-683X)), Yozgat Bozok University, Department of Chemistry, Yozgat, Turkey.

\***Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Hasan Ufuk CELEBIOGLU, e-mail: ufukcelebioglu@gmail.com

This study was produced from MSc thesis of Özgenur DİNÇER.



## INTRODUCTION

Enzymes are biological catalysts that have important roles in shaping the life. They are also important for industrial processes. They are being used in paper, leather, textile, cleaning, food, feed, medicine, cosmetics, and biofuel industries (Jegannathan and Nielsen, 2013). It is advantageous to use enzymes of microbial origin, as opposed to enzymes obtained from animal and plant sources. Animal and plant tissues are limited but enzymes obtained from microbial sources are very diverse (Topal, 1985).

Lignocelluloses are mainly composed of cellulose, hemicellulose, and lignin. Specifically, lignin forms a physical barrier, limiting enzymes' accessibility to cellulose. Thus, removal of lignin from the structure is necessary to release fermentable sugars; thus, a pre-treatment process is required. The enzymatic hydrolysis processes are preferred to break down cellulose into simple sugars (Phitsuwan et al., 2016). According to Sun and Cheng (2002), the pretreatment method should increase the formation of fermentable sugar, without causing carbohydrate degradation, prevent the formation of by-products that will cause inhibition of hydrolysis and fermentation stages, and should be affordable. Xylan is used as a major biopolymer in practical applications, and by the degradation of xylan, many important products are obtained in varying amounts (Zafar et al., 2016). Xylanase are enzymes that carry out the hydrolysis of xylan, which is present together with the cellulose and lignin structure in the plant cell wall. For this reason, wood shavings, corn cobs, hazelnut shells, wheat and other plant waste sources are being used as substrates in bacterial enzyme production methods. Xylan is an important structural polymer of a plant. Xylanases and some microorganisms are being used for ethanol production by hydrolyzing xylan (Rani and Nand, 1996). It contains plenty of hemicellulose in its xylan structure. Therefore, it is of great importance to ensure the separation of xylan into sugars by bacteria that produce ethanol and efficient use of plant biomass for biofuel production (Dodd and Cann, 2009).

*Thermotoga naphthophila* is an anaerobic, hyperthermophilic gram-negative bacterium that can be obtained from underground reserves in Japan. The suitable temperature for the growth of bacteria ranges between 48-86°C. The optimum pH for the growth is in the range of 5.4-9.0. However, it shows the best activity at pH 7.0 (Hamid and Aftab, 2019). Lignocellulosic biomass such as wood, plant, and agricultural industry is a renewable resource that is abundant in the world and less agricultural work is required for the production of these biomasses (Hoşgün et al., 2017). Secondly, generation of biomass is made with raw materials that have no effect on the food chain, namely woody biomass. Therefore, second generation bioethanol production has a very high potential. Hazelnut, whose cultivation dates back to ancient times in our country, has found the most suitable growing environment in the Black Sea region. Hazelnut shells consist of 43.1% lignin, 27.5% hemicellulose, 24.7% cellulose, 3.4% alcohol-benzene extracts and 1.4% ash (Arslan and Saraçoğlu, 2010). On the other hand, rhododendron is included in the Rhododendron genus, and has many different flower and leaf structures that grow from the west to the east of the Black Sea forests. Some of the types of rhododendrons having a fairly wide spread in the world, especially east of the Black Sea in Turkey is common (Özbucak et al., 2009). Hazelnut shell, rhododendron branch and rhododendron leaves can be used as renewable, low-cost, high-yield raw materials for producing fermentable sugars as lignocellulosic biomass. In addition, converting agricultural wastes into energy increases the value of waste materials and prevents air pollution.

Thus, the present study aimed to use hazelnut shell, rhododendron branch and rhododendron leaves as lignocellulosic biomass and investigate the saccharification potential of  $\beta$ -xylanase from *Thermotoga naphthophila* on these biomasses.

## MATERIALS AND METHODS

### Cloning and Expression of the Recombinant $\beta$ -xylanase

Cloning and expression of recombinant  $\beta$ -xylanase enzyme was re-performed as described previously (Hamid and Aftab, 2019). Briefly, genomic DNA of *Thermotoga naphthophila* was used as template to amplify  $\beta$ -xylanase gene by PCR. and purified by Thermo Scientific GeneJET gel extraction kit.  $\beta$ -xylanase gene was then ligated into pET21a(+) vector using restriction site of *HindIII*.

For cloning, *E. coli* BL21 was used after making the competent cells. Transformation of cloned  $\beta$ -xylanase gene was performed in the competent cells. The transformation was performed at 42°C by applying heat shock for 90 seconds. For confirmation of transformation, colony PCR was performed.

### Pretreatment of Biomasses with Acid-Alkaline Method

The pre-treatment of biomass was carried out to remove the undesired structures in biomass. The pretreatment was applied to three different biomasses (hazelnut shell, rhododendron branch and rhododendron leaves). For the Acid-Alkaline method; 100 mL double distilled water was added in 2 g NaOH and dissolved. A 2 g of each biomass was weighed and taken into 50 ml falcon tubes. NaOH solution was added in the tubes and shaken to make the contents uniform. The bottles were closed and autoclaved at 121 ° C for 15 minutes. In a separate bottle, 100 mL distilled water was added to 6.27 mL 37% HCl. The sterilized plant biomass was filtered through a Whatman filter paper. The supernatant was discarded and the solid contents were washed several times with distilled water. The HCl solution prepared to neutralize the NaOH mixture was taken into 20 mL shake flask and washed with double distilled water and shaken and kept for 30 minutes. The plant-HCl mixtures were washed with distilled water and filtered biomass was allowed to dry at room conditions for two days. Dried biomasses were crushed in pestle and placed in a 50°C oven for 15 minutes (Hoşgün et al., 2017).

### Saccharification of Pre-Treated Biomasses

The amount of sugar released by the hydrolysis of the pretreated biomasses with the  $\beta$ -xylanase enzyme was analyzed. For saccharification of pre-treated biomasses, 0.1 g pre-treated biomass and 20 mL  $\beta$ -xylanase enzyme were added into three beakers for each biomass. A 9  $\mu$ l chloramphenicol (0.1 mg mL<sup>-1</sup>) antibiotic was added in beakers to prevent microbial growth. The beakers were kept in a shaking incubator at 60°C at 80 rpm for 72 hours. Then biomasses were centrifuged at 3200 rpm for 15 minutes. Supernatants were transferred to falcon tubes.

DNS was used to stop the enzyme's activity and to determine amount of sugar (Miller, 1959). In each flask, 1 g DNS was dissolved in 1.6 g NaOH. In another flask, 37.66 g of sodium potassium tartrate (Rochella salt) was dissolved in 50 mL distilled water. The content of the two flasks were mixed together, then heated and shaken until it became homogeneous.

1 mL supernatants were added to empty falcon tubes and 1 mL prepared DNS was added. The tubes were kept in a water bath at 100°C for 5 minutes. The content was then allowed to cool at room temperature and later 8 mL distilled water was added in the tubes. Measurements were noted at 540 nm using a spectrophotometer. The calibration plot was made by measuring absorbances of different concentrations of glucose to adjust the sugar content of the unknown sample.

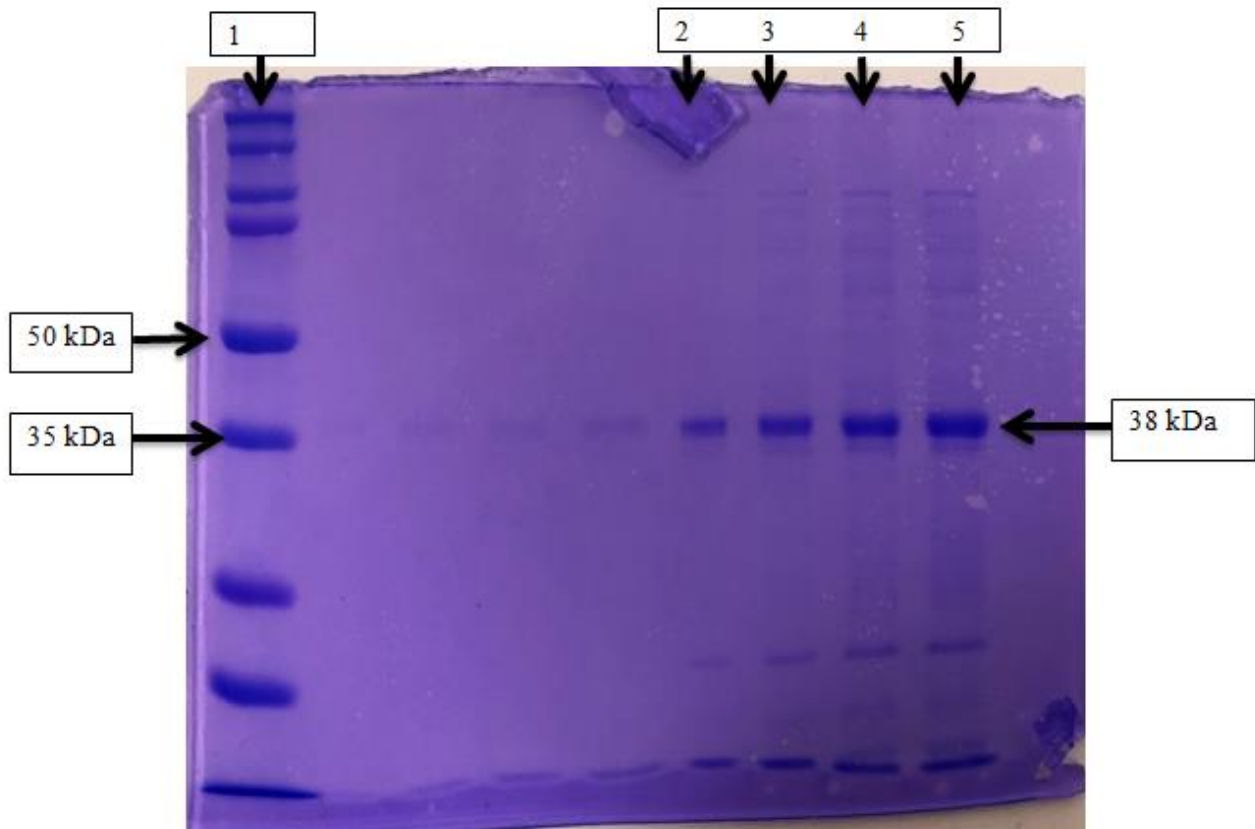
## RESULTS AND DISCUSSION

### Recombinant Production of $\beta$ -xylanase

The recombinant colony was cultured in LB medium containing ampicillin, then sonicated and centrifuged. Since the recombinant  $\beta$ -xylanase enzyme was intracellular, cells were sonicated to release

the intracellular enzyme. The partial purification of  $\beta$ -xylanase enzyme was carried out using the thermal method that also denatured host proteins.

Molecular mass determination of the purified  $\beta$ -xylanase enzyme was performed using SDS-PAGE. Precision Plus Ladder (10-250 kDa) was used as a protein marker. As shown in Fig. 1, the molecular mass of  $\beta$ -xylanase samples with different amounts was examined. Protein samples were observed after staining with the gel staining solution containing Brilliant Blue dye. As a result of SDS-PAGE, it was observed that the mass of  $\beta$ -xylanase was 38 kDa.

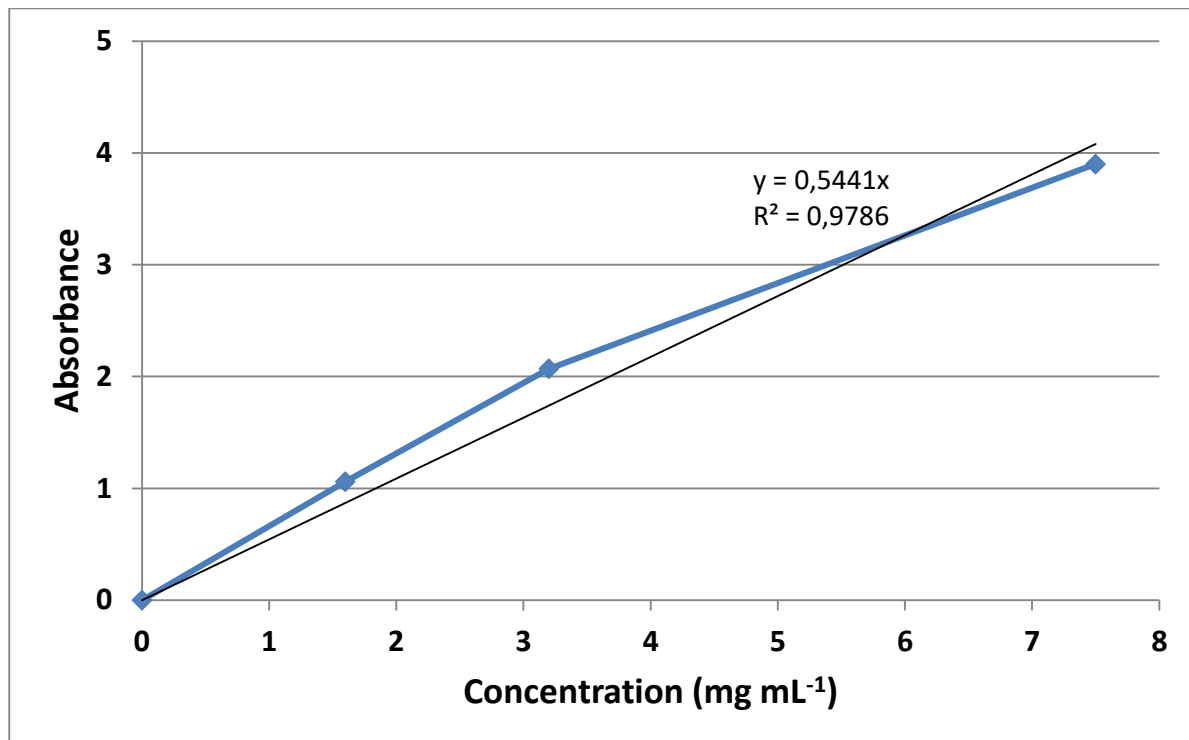


**Figure 1.** SDS-PAGE of partially purified  $\beta$ -xylanase. 1) protein marker 2) 5  $\mu$ l  $\beta$ -xylanase 3) 10  $\mu$ l  $\beta$ -xylanase 4) 15  $\mu$ l  $\beta$ -xylanase 5) 20  $\mu$ l  $\beta$ -xylanase

### Saccharification potential of $\beta$ -xylanase over Biomasses

DNS was used to measure the amount of sugar released after treatment of different biomass (nut cob, rhododendron branch, rhododendron leaves) with  $\beta$ -xylanase enzyme. The optical densities of hazelnut shell, rhododendron branch and rhododendron leaf biomasses measured at 540 nm in the spectrophotometer were 0.4604, 0.3796 and 0.1962 respectively. The sugar content of the biomass was determined as a result of the calibration graph drawn with different concentrations of glucose (Fig. 2).

Sugar content of biomass according to the calibration curve is given in Table 1. The highest reducing sugar amount was obtained for hazelnut shell (0.8461 mg mL<sup>-1</sup>), followed by rhododendron branch (0.6976 mg mL<sup>-1</sup>) and Rhododendron leaf (0.3605 mg mL<sup>-1</sup>).



**Figure 2.** Calibration curve using glucose as standard reducing sugar.

**Table 1.** Sugar amounts of hazelnut shell, rhododendron branch and rhododendron leaf biomass after enzymatic saccharification by  $\beta$ -xylanase

|                            | Absorbance (OD <sub>540</sub> ) | Concentration (mg mL <sup>-1</sup> ) |
|----------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Hazelnut shell</b>      | 0.4604                          | 0.8461                               |
| <b>Rhododendron branch</b> | 0.3796                          | 0.6976                               |
| <b>Rhododendron leaf</b>   | 0.1962                          | 0.3605                               |

The hydrolysis of hemicelluloses was carried out by enzymatic process is a very complex process. Among the enzymes that carry out hydrolysis, the enzyme  $\beta$ -xylanase plays an important role. The  $\beta$ -xylanase enzyme is a thermophilic enzyme and utilized in many biotechnological applications due to their ability to withstand high temperatures (Frock et al., 2010).

In the previous study, it was reported that the  $\beta$ -xylanase enzyme of *Thermotoga naphthophila* showed maximum activity at pH 7.0 and 37°C (Hamid and Aftab, 2019). Shi et al. (2013) found that the  $\beta$ -xylanase enzyme cloned from *Thermotoga thermarum* was expressed by *Escherichia coli* BL21 recombinant strain was active at 95°C and pH 7.0, and by adding 5 mM Ca<sup>2+</sup> but active at temperatures 55-90°C and pH ranges from 4.0-8.5.

Zverlov et al. (1996) obtained the xylanase A gene from *Thermotoga neapolitana* and expressed in *Escherichia coli*. They reported that xylanase enzyme acts as endo-1,4/3-xylanase and this enzyme showed the highest activity at pH 5.5 at 102°C. Furthermore, xylanase was also stable at 90°C but 50% reduction in enzyme activity was observed when incubated at 100°C for 2 hours.

Simpson et al. (1991) isolated the endo-1,4-beta-xylanase enzyme from *Thermotoga* sp. The best activity for the purified xylanase was reported in the range of pH 5.0-5.5 at 80°C. They observed that substances such as sorbitol and xylan increase the thermal stability of the enzyme.

The molecular mass of  $\beta$ -xylanase obtained using SDS-PAGE was calculated to be 38 kDa. The mass analysis of the enzyme was appeared similar to the results observed in other studies. Zhou et al.

(2011) had reported the molecular mass determination of the endo-1,4  $\beta$ -xylanase enzyme obtained from the organism *Streptomyces* sp., was 34 kDa. At the same time, they had found that the best activity of this enzyme was observed at 50°C and pH 7.0. Similarly, Shi et al. (2014) found the molecular mass of the endo-1,4- $\beta$ -xylanase enzyme cloned from *Thermotoga thermarum* and expressed in *Escherichia coli* as 40 kDa. It has also been reported that the temperature and pH values were 80°C and 6.0 respectively.

The most important feature of the  $\beta$ -xylanase enzyme was its stability at high temperatures. Due to its stable structure, xylanases are being used in many industries and protein engineering. Studies have shown that  $\beta$ -xylanase enzymes cloned from various organisms have activities at high temperatures.

After  $\beta$ -xylanase enzyme was cloned from *Thermotoga naphthophila* and expressed in *E. coli* BL21, the biomasses were pre-treated before being treated with the enzyme. Biomass can prevent sugar production due to their structure. Lignin, which is present in the structure of the biomass, limits sugar production. So biomasses like lignin were pre-treated to remove undesired structures. In our study, acid-alkaline method was used for the pretreatment stage.

Singh et al. (2015) compared the acid-alkali pre-treatment method with other existing pre-treatment processes. It has been emphasized that the alkaline pretreatment is very effective in removing the lignin structure present in biomass and at the same time increases the digestibility of cellulose. Luo et al. (2014) investigated many pre-treatment methods. When these studies were examined, the most effective pre-treatment method was selected in our study.

In the present study, after the optical densities of the hazelnut shell, rhododendron branch and rhododendron leaf biomass to be saccharified after the pretreatment stage, the amount of sugar produced was calculated. Different amounts of concentrations of glucose were used as standard. Biomasses of rice straw, wheat straw, sawdust, and *Saccharum munja* were treated with  $\beta$ -xylanase enzyme by Hamid and Aftab (2019) and then saccharified to examine concentration of sugar obtained from the biomasses. The amounts of sugar released were reported as 1.52 mg mL<sup>-1</sup>, 3.2 mg mL<sup>-1</sup>, 1.92 mg mL<sup>-1</sup>, 2.96 mg mL<sup>-1</sup> and 1.16 mg mL<sup>-1</sup> respectively. The difference from our study is that they use xylose as a standard.

In our study, amount of sugar released was calculated as 0.8461 mg mL<sup>-1</sup> in hazelnut cob, 0.6976 mg mL<sup>-1</sup> rhododendron branch and 0.3605 mg mL<sup>-1</sup> rhododendron leaf. Similar to our study, Zafar et al. (2016) treated the xylanase enzyme obtained from *Bacillus licheniformis* with straw, rice straw, and sugarcane substrates. It was reported that the amount of sugar released was wheat straw 1.95 mg mL<sup>-1</sup> rice straw 1.92 mg mL<sup>-1</sup> sugarcane bagasse 2.20 mg mL<sup>-1</sup>. The method they used to determine the sugar produced in the confectionery process was the same as we used in our study.

Haq et al. (2012) obtained xylanase enzyme by cloning endo-1,4- $\beta$ -xylanase gene from *Thermotoga petrophila* organism. Birchwood was used as a substrate for the xylanase enzyme. The activity of the enzyme on the substrate was measured as 3.5 mg mL<sup>-1</sup>.

Pinar et al. (2017) have studied the effect on the enzymatic hydrolysis of the nut shell, one of the most abundant woody cellulosic agricultural residues produced in Turkey. The enzyme used was not produced from any organism and was purchased commercially. Cellulase enzyme activity on the hazelnut shell has been reported to be 1.32  $\pm$  0.11 g L<sup>-1</sup>.

There is no significant difference in the amount of sugar obtained in our study compared to different biomass or the same biomass. The reason why it differs from other results is due to the difference in methods that utilized total amount of enzymes and substrates.

Hosgun et al. (2017) reported that the cellulase enzyme is active against the pretreated nutshell substrate. The researchers also mentioned that the sugar released from the nut shell is very efficient for producing bioethanol. In order to carry out the hydrolysis phase of various biomass, they need enzymes that hydrolyze these biomasses. This step will be a cost-cutting step for biofuel production.

## CONCLUSION

The most preferred feature in the industrial enzyme production stage is thermotolerance of the enzymes. The reason for this preference is that enzymes are generally used in processes with high temperatures. Among the various thermophilic enzymes, xylanase enzymes are of great importance in various industries and there are many studies for production and purification of these enzymes.

In the present study, cloning of  $\beta$ -xylanase was re-produced in *Esherichia coli* and lignocellulosic biomasses of hazelnut shell, rhododendron branch, and rhododendron leaf were used as substrates for this recombinant  $\beta$ -xylanase enzyme. We showed that  $\beta$ -xylanase enzyme can be an effective source for enzymatic hydrolysis to produce fermentable sugars from such biomasses.

Hazelnut shells and rhododendron are renewable, low-cost, high-yield raw materials for producing fermentable sugars as lignocellulosic biomass. When the results of the study are evaluated, as the-  $\beta$ -xylanase enzyme has thermophilic property and the substrates we use produce a certain sugar release, it can be recommended to use the  $\beta$ -xylanase enzyme in various industrial processes and biofuel industry.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The present study was supported by the Pak-Turk Researchers Mobility Grant Program (MEV.2017-361) in Turkey by the Council of Higher Education (YÖK) and in Pakistan by the Higher Education Commission (HEC).

## Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

## Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

## REFERENCES

- Arslan Y, Saraçoğlu NE, 2010. Effects of pretreatment methods for hazelnut shell hydrolysate fermentation with *Pichia Stipitis* to ethanol. *Bioresource Technology*, 101: 8664-8670.
- Dodd D, Cann, IKO, 2009. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *GCB Bioenergy*, 1(1): 2-17.
- Frock AD, Notey JS, Kelly RM, 2010. The genus *Thermotoga*: recent developments. *Environmental Technology*, 31(10): 1169-1181.
- Hamid A, Aftab MN, 2019. Cloning, purification, and caharacterization of recombinant thermostable  $\beta$ -xylanase Tnap\_0700 from *Thermotoga naphthophila*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 189(4): 1274-1290.
- Haq I, Hussain Z, Khan MA, Muneer B, Afzal S, Majeed S, Akram F, 2012. Kinetic and thermodynamic study of cloned thermostable endo-1, 4- $\beta$ -xylanase from *Thermotoga petrophila* in mesophilic host. *Molecular biology reports*, 39(7): 7251-7261.
- Hoşgün EZ, Berikten D, Kıvanç M, Bozan B, 2017. Ethanol production from hazelnut shells through enzymatic saccharification and fermantion by low-temperature alkali pretreatment. *Fuel*, 196: 280-278.
- Jegannathan KR, Nielsen PH, 2013. Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. *Journal of Cleaner Production*, 42: 228-240.
- López, L, Rivas S, Moure A, Vila C, Parajó JC, 2020. Development of pretreatment strategies for the fractionation of hazelnut shells in the scope of biorefinery. *Agronomy*, 10(10): 1568.
- Luo J, Fang Z, Smith Jr RL, 2014. Ultrasound-enhanced conversion of biomass to biofuels. *Progress in Energy and Combustion Science*, 41: 56-93.
- Miller GL, 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426-428.

- Özbucak TB, Türkiş S, Çakmak A, 2009. Ordu çevresinde yayılış gösteren bazı *rhododendron* türleri üzerine ekolojik bir çalışma. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 2(2): 71-77.
- Phitsuwan P, Sakka K, Ratanakhanokchai K, 2016. Structural changes and enzymatic response of Napier grass (*Pennisetum purpureum*) stem induced by alkaline pretreatment. *Bioresource Technology*, 218: 247-256.
- Pinar O, Karaosmanoğlu K, Sayar NA, Kula C, Kazan D, Sayar AA, 2017. Assessment of hazelnut husk as a lignocellulosic feedstock for the production of fermentable sugars and lignocellulolytic enzymes. *3 Biotech*, 7(6): 367.
- Rani S, Nand K, 1996. Development of cellulase-free xylanase-producing anaerobic consortia for use the use of lignocellulosic wastes. *Enzyme and Microbial Technology* 18(1): 23-28.
- Shi H, Zhang Y, Li X, Huang Y, Wang L, Wang, Y, Wang F, 2013. A novel highly thermostable xylanase stimulated by  $Ca^{2+}$  from *Thermotoga thermarum*: cloning, expression and characterization. *Biotechnology for biofuels*, 6(1): 26.
- Shi H, Zhang, Y, Zhong H, Huang Y, Li X, Wang F, 2014. Cloning over-expression and characterization of a thermo-tolerant xylanase from *Thermotoga thermarum*. *Biotechnology Letters*, 36(3): 587-593.
- Simpson HD, Haufler UR, Daniel RM, 1991. An extremely thermostable xylanase from the thermophilic eubacterium *Thermotoga*. *Biochemical Journal*, 277(2): 413-417.
- Singh J, Suhag M, Dhaka A, 2015. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: a review. *Carbohydrate polymers*, 117: 624-631.
- Sun Y, Cheng J, 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1): 1-11.
- Topal Ş, 1985. Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Renni'nin Yeri. *Tubitak Marmara Araştırma Enstitüsü, Gebze/Kocaeli*, 26 s.
- Zafar A, Aftab MN, ud Din Z, Aftab S, Iqbal I, Shahid A, ul Haq I, 2016. Cloning, expression and purification of xylanase gene from *Bacillus licheniformis* for use in saccharification of plant biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178(2): 294-311.
- Zhou J, Shi P, Zhang R, Huang H, Meng K, Yang P, Yao B, 2011. Symbiotic *Streptomyces sp.* TN119 GH 11 xylanase: a new pH-stable, protease-and SDS-resistant xylanase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(4): 523-530
- Zverlov V, Piotukh K, Dakhova O, Velikodvorskaya G, Borriss R, 1996. The multidomain xylanase A of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga neapolitana* is extremely thermoresistant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(1-2): 245-247.

**To Cite:** Meyvacı E, Öztürk T, Savaş B. 2021. Syntheses and characterizations of poly( $\epsilon$ -caprolactone-b-ethylene glycol methyl ether) block copolymers via ring-opening polymerization and "click" chemistry. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1329-1340.

### Syntheses And Characterizations Of Poly( $\epsilon$ -Caprolactone-b-Ethylene Glycol Methyl Ether) Block Copolymers Via Ring-Opening Polymerization And "Click" Chemistry

Ergül MEYVACI<sup>1</sup>, Temel ÖZTÜRK<sup>1\*</sup>, Bedrettin SAVAŞ<sup>2</sup>

**ABSTRACT:** Poly( $\epsilon$ -caprolactone-block-ethylene glycol methyl ether) [poly(RCL-b-mEG)] block copolymers were synthesized by "click" chemistry of polyethylene glycol methyl ether propargyl (mPEG-propargyl) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) azido (RPCL-N<sub>3</sub>). Thus, mPEG-propargyl was acquired through the reaction of polyethylene glycol methyl ether with propargyl bromine. 2-[2-(2-Azidoethoxy)ethoxy]ethanol (N<sub>3</sub>ol) was synthesized by using 2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethanol and sodium azide. Synthesis of RPCL-N<sub>3</sub> was acquired using ROP of  $\epsilon$ -caprolactone and N<sub>3</sub>ol. By using mPEG-propargyl and RPCL-N<sub>3</sub>, poly(RCL-b-mEG) block copolymers were obtained via "click" chemistry. The monofunctional homopolymers in the study were utilized for the syntheses of poly(RCL-b-mEG) block copolymers. The outputs were identified by scanning electron microscopy, <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance spectroscopy, differential scanning calorimetry, thermogravimetric analysis, Fourier-transform infrared spectroscopy, gel permeation chromatography, and dynamic light scattering instruments. The spectroscopic and thermal analysis of the block copolymers monitor that the copolymers were built through combination of ROP and "click" chemistry.

**Keywords:** Block copolymer, "click" chemistry, polyethylene glycol methyl ether propargyl, poly( $\epsilon$ -caprolactone) azido, ring-opening polymerization, 2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethanol.

<sup>1</sup> Ergül MEYVACI ([Orcid ID: 0000-0003-3530-1316](https://orcid.org/0000-0003-3530-1316)), Temel ÖZTÜRK ([Orcid ID: 0000-0002-7856-9809](https://orcid.org/0000-0002-7856-9809)), Giresun University, Department of Chemistry, Giresun, Turkey

<sup>2</sup> Bedrettin SAVAŞ ([Orcid ID: 0000-0002-6620-5493](https://orcid.org/0000-0002-6620-5493)), Kafkas University, Kars Vocational School, Kars, Turkey

\*Corresponding Author: Temel ÖZTÜRK. E-mail: temel.ozturk@giresun.edu.tr



## INTRODUCTION

Polyethylene glycol (PEG) which is one of the most used hydrophilic segment (Adams, et al., 2003) is preferred in block copolymers possibly because it has got unique biocompatible properties (Çatıker, et al., 2020). PEG-based polymers are desirable materials of biomedical, industrial, and chemicals applications thanks to PEG's unique features (Erciyes et al., 1992; Adams, et al., 2003; Riess, 2003; Gacal, et al., 2006; Öztürk and Hazer, 2010; Çatıker, et al., 2020). Syntheses of block or graft copolymers were fulfilled because of their unique properties (Ruzette and Leibler, 2005; Öztürk, et al., 2011; Altıntaş et al., 2011; Bolton and Rzayev, 2012; Öztürk, Kaygın, et al., 2016; Öztürk, Cakmak et al., 2019; Çatıker, et al., 2019; Bağlan et al., 2018; Öztürk, Savaş, et al., 2020). The capability of amphiphilic block copolymers is owing to their chemical composition, which is described by a hydrophilic block chemically related to a hydrophobic block (Çatıker, et al., 2020). The ring-opening polymerization (ROP) technique was firstly carried out by Carothers et al. for lactones, cyclic anhydrides and carbonates (Hizal, et al., 2005; Coulembier, et al., 2006; Çatıker, et al., 2020;). ROP technique was widely used in the syntheses of new types of copolymers (Coulembier, et al., 2006; Göktaş et al., 2014; Öztürk, Yavuz, et al., 2016; Öztürk, et al., 2018). The applications in "click" chemistry have been examined (Moses and Moorhouse, 2007; Xu et al., 2007; Altıntaş and Tunca, 2011; Tunca, 2013; Xi et al., 2014; Zhu et al., 2015; Öztürk and Meyvacı 2017; Öztürk, et al., 2019) since "click" chemistry was presented by Sharpless et al. (Kolb et al., 2001) in 2001. Recently, "click" chemistry technique has been developed in the synthesis of polymers by increasing its place in science (Binder and Sachsenhofer, 2007; Barner-Kowollik et al., 2011; Şanal et al., 2017; Öztürk and Cavicchi, 2018; Tunca, 2018; Öztürk and Yörümez, 2020).

This paper demonstrates syntheses of poly( $\epsilon$ -caprolactone-block-ethylene glycol methyl ether) [poly(RCL-b-mEG)] block copolymers through ROP and "click" chemistry methods. Firstly, synthesis of polyethylene glycol methyl ether propargyl (mPEG-propargyl) obtained by reaction of polyethylene glycol methyl ether with 5,000 Da (mPEG-5000) and propargyl bromine was presented. Then, 2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethanol (N<sub>3</sub>ol) was synthesized by reaction of 2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethanol and NaN<sub>3</sub> as ref. (Baker et al., 2013). After that, poly( $\epsilon$ -caprolactone) azido (RPCL-N<sub>3</sub>) was acquired using  $\epsilon$ -caprolactone (CL) and N<sub>3</sub>ol by ROP technic. Lastly, RPCL-N<sub>3</sub> and mPEG-propargyl were utilized by "click" chemistry to obtain poly(RCL-b-mEG) block copolymers. Furthermore, the product characterization was provided in detail.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Sigma-Aldrich supplied tin(II) 2-ethylhexanoate [Sn(Oct)<sub>2</sub>], 2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethanol, NaN<sub>3</sub>, mPEG-5000, propargyl bromine, chloroform, *N,N,N',N',N''*-pentamethyldiethylenetriamine (PMDETA),  $\epsilon$ -caprolactone (CL), CuBr. Triethylamine (TEA), methanol, diethyl ether were obtained from Merck, Kimetsan, and Carlo Erba Reagent, respectively.

### Instrumentation

Records of <sup>1</sup>H-NMR spectra were obtained by ultra-long hold time 400 NMR spectrometers called as Bruker Ultra Shield Plus. FT-IR were obtained by Jasco FT/IR 6600 FT-IR spectrometer. Molecular weight and dispersity were studied by HPLC/GPC-Shimadzu RID-10A GPC instrument with THF at 40 °C through Refractive Index Detector. A calibration curve was generated with polystyrene standards of low dispersity (M<sub>w</sub> = 1490, 2500, 5480, 9500, 20800 and 53500 Da). SEM displays were taken by using a Hitachi SU 1510 electron microscope. DSC measurement was obtained by Hitachi DSC 7000 series

thermal analysis system under N<sub>2</sub> gas. Dynamic light scattering (DLS) instrument was Malvern Zetasizer Nano Series Nano-ZS with Insmark IR120 model refractometer (solvent: DMF; concentration: 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, and 0.25 mg/mL; temperature: 20 °C;  $\lambda = 633$  nm). TGA were obtained by a Seiko II Exstar 6000 model instrument.

### Synthesis of polyethylene glycol methyl ether propargyl (mPEG-propargyl)

Typically, 4.087 g (0.81 mmol) of mPEG-5000 and 0.110 g (1.08 mmol) of TEA in 10 mL of CHCl<sub>3</sub> was poured into a 250 mL clear flask with a N<sub>2</sub> input and cooled off to below 0 °C. 0.126 g (1.05 mmol) of propargyl bromine in 3 mL of CHCl<sub>3</sub> was put into this solution by a dropping funnel during 20 minutes. The solution was blended for 30 minutes below 0 °C. Next, the content slowly reached to ambient temperature. 24 hours later, CHCl<sub>3</sub> was to some extent vaporized. The residue was precipitated in cold excess diethyl ether. Following decantation, mPEG-propargyl was made dry at 40 °C in vacuum oven during 4 days. mPEG-propargyl output was obtained gravimetrically. The gravimetric yield was 98.79 wt% (4.162 g).

### Synthesis of 2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethanol (N<sub>3</sub>ol)

N<sub>3</sub>ol was synthesized as ref. (Baker et al., 2013). For instance, 2.227 g (0.01 mmol) of 2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethanol, 4.039 g (0.06 mmol) of NaN<sub>3</sub>, 60 mL of distilled water were poured into a 250 mL clear flask. Flask was dip in oil bath which was fixed at 70 °C on hot plate for reflux. After 22 hours, the reaction mixture was put into extraction process with diethyl ether (80 mL x 3). The organic layer was made dry on MgSO<sub>4</sub> and was vaporized until its drying to obtain N<sub>3</sub>ol as a clear oil. Product yield was defined gravimetrically (0.475 g, 24.33 wt%).

### Synthesis of poly( $\epsilon$ -caprolactone) azido (RPCL-N<sub>3</sub>) through ROP

Poly( $\epsilon$ -caprolactone) azido which was presented RPCL-N<sub>3</sub> was achieved by ROP as procedures below: 4.100 g (0.041 mol) of CL, 0.475 g (0.002 mol) of N<sub>3</sub>ol, Sn(Oct)<sub>2</sub> (1-2 drops) were placed separately in glass tube, then, N<sub>2</sub> gas was injected into tube for 5 min. Tube was covered with rubber septum, put into oil bath at 120 °C during 24 hours. After 24 hours, the content of the tube was mixed into cold excess diethyl ether for separation of RPCL-N<sub>3</sub>. The product was placed in a fridge during a night. Following decantation, the polymer was made dry at 40 °C under vacuum during 4 days. Yield of RPCL-N<sub>3</sub> was 85.51 wt% (3.867 g).

**Table 1.** Syntheses of poly(RCL-b-mEG) copolymers by "click" chemistry.

| Code | mPEG-propargyl (g) | RPCL-N <sub>3</sub> (g) | Yield (g) | Yield (wt%) | Mw (g.mol <sup>-1</sup> ) | Decomposition |     |
|------|--------------------|-------------------------|-----------|-------------|---------------------------|---------------|-----|
|      |                    |                         |           |             |                           | Td1           | Td2 |
| E-1  | 0.243              | 0.144                   | 0.303     | 78.15       | 9,160                     | 306           | 411 |
| E-2  | 0.242              | 0.244                   | 0.455     | 93.72       | 6,510                     | 340           | 399 |
| E-3  | 0.247              | 0.344                   | 0.445     | 75.25       | 10,400                    | 334           | 399 |
| E-4  | 0.245              | 0.417                   | 0.550     | 83.12       | 8,620                     | 343           | 394 |

Temperature: 35 °C, time: 48 hours, chloroform: 3 mL, copper(I) bromide: 0.003 g, PMDETA: 0.008 g.

### Synthesis of poly( $\epsilon$ -caprolactone-block-ethylene glycol methyl ether) [poly(RCL-b-mEG)] by "click" chemistry

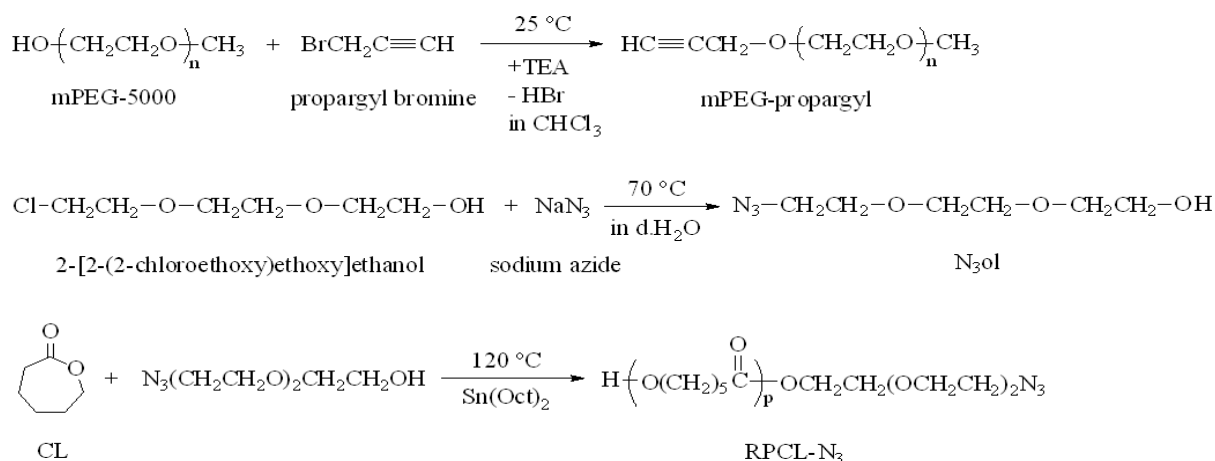
The amounts of the materials which were utilized in block copolymerization were presented in Table 1. mPEG-propargyl, RPCL-N<sub>3</sub>, PMDETA, CuBr, chloroform was placed into glass tubes and then N<sub>2</sub> was injected into tube for 5 min. Tubes were placed in oil bath at 35 °C on a magnetic stirrer. 48 hours later, the contents of the tubes were strained out. CuBr left was removed with small alumina

columns from the block copolymers. The mixtures were poured into excess methanol for separation of precipitated poly(RCL-b-mEG) copolymers. The copolymers were dried in vacuum oven at ambient temperature during 4 days. Products were determined gravimetrically as shown in Table 1.

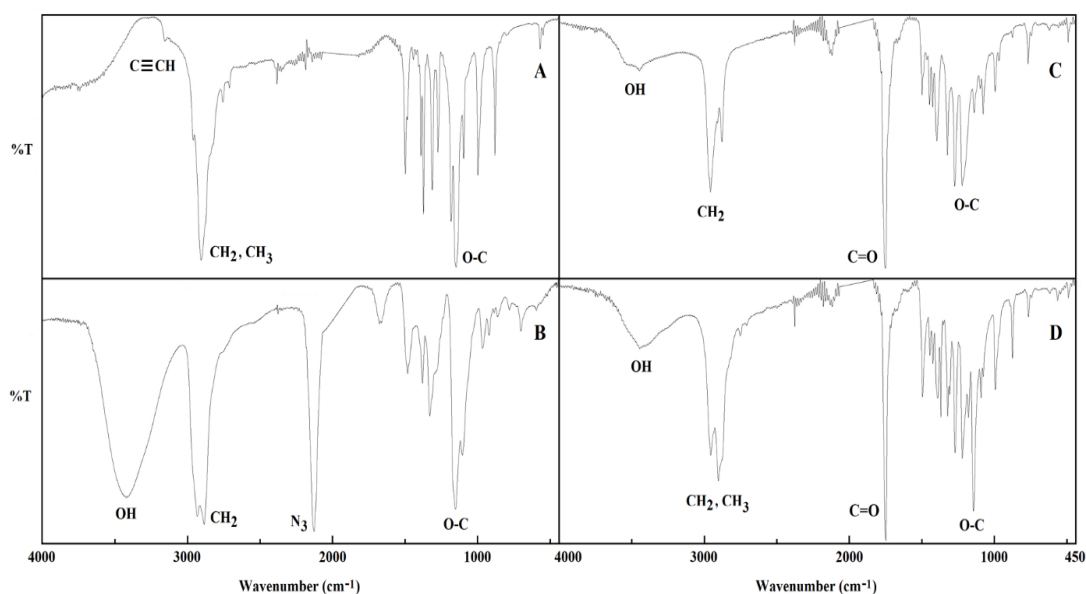
## RESULTS AND DISCUSSION

### Synthesis of mPEG-propargyl

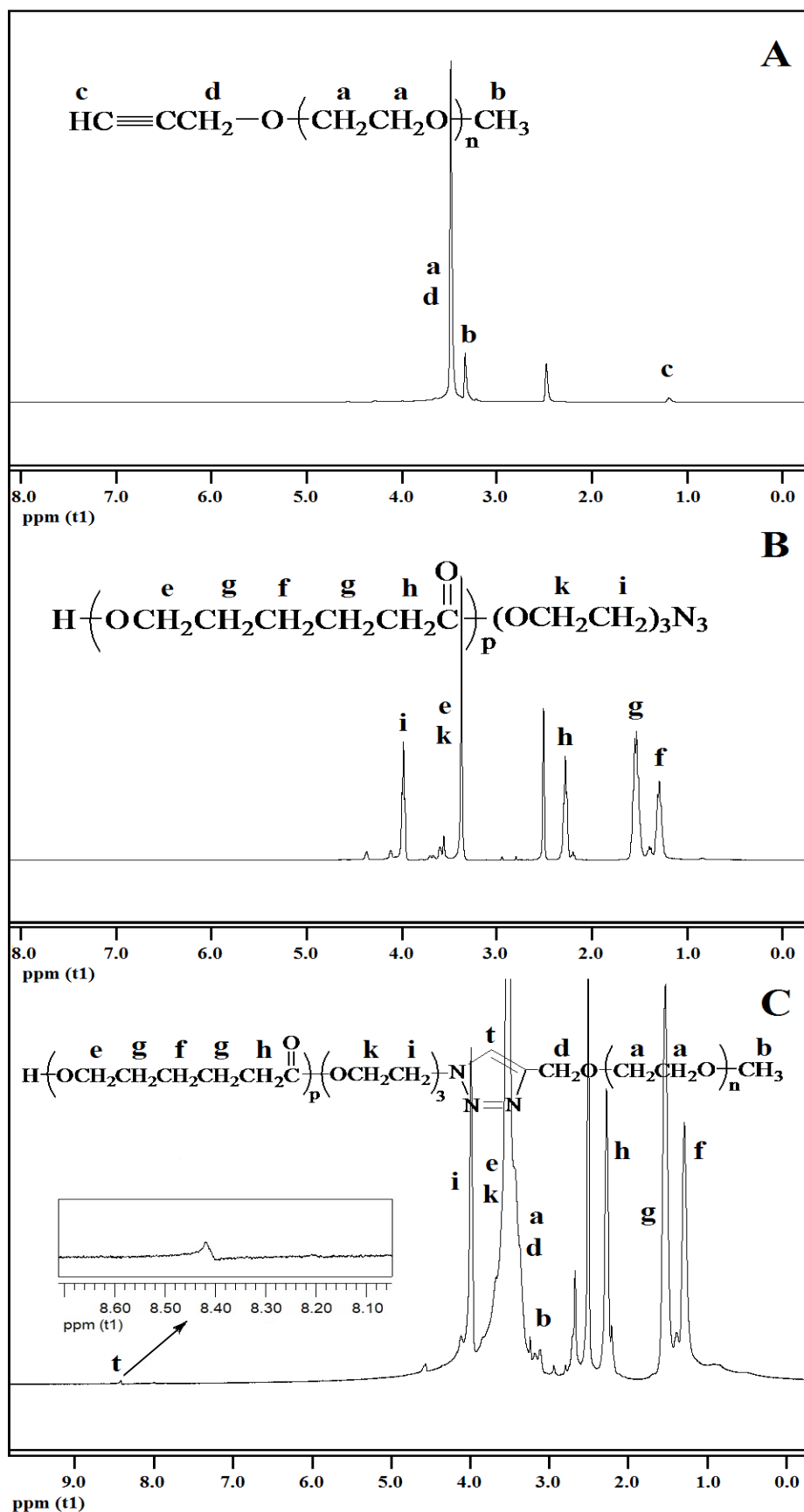
mPEG-propargyl was acquired as white solid by mPEG-5000 ( $^1\text{H-NMR}$  for mPEG-5000: 3.5 ppm for  $-\text{OCH}_2$ , 2.5 ppm for  $-\text{OH}$ ). Reaction pathway is included on the first line of Scheme 1 for the synthesis of mPEG-propargyl. Figure 1.A shows FT-IR spectrum of mPEG-propargyl. The successful propargylation of mPEG-5000 is provided with the creation of acetylenic band at about  $3150\text{ cm}^{-1}$ .  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of mPEG-propargyl in Figure 2A displayed peaks at 3.5 ppm for  $-\text{OCH}_2$  of mPEG-5000, 3.4 ppm for  $-\text{OCH}_2$  of propargyl group linked mPEG-5000 unit, 1.2 ppm for  $-\text{C}\equiv\text{CH}$ . Peak at 1.2 ppm for  $-\text{C}\equiv\text{CH}$  in  $^1\text{H-NMR}$  proved which mPEG-propargyl was successfully acquired.



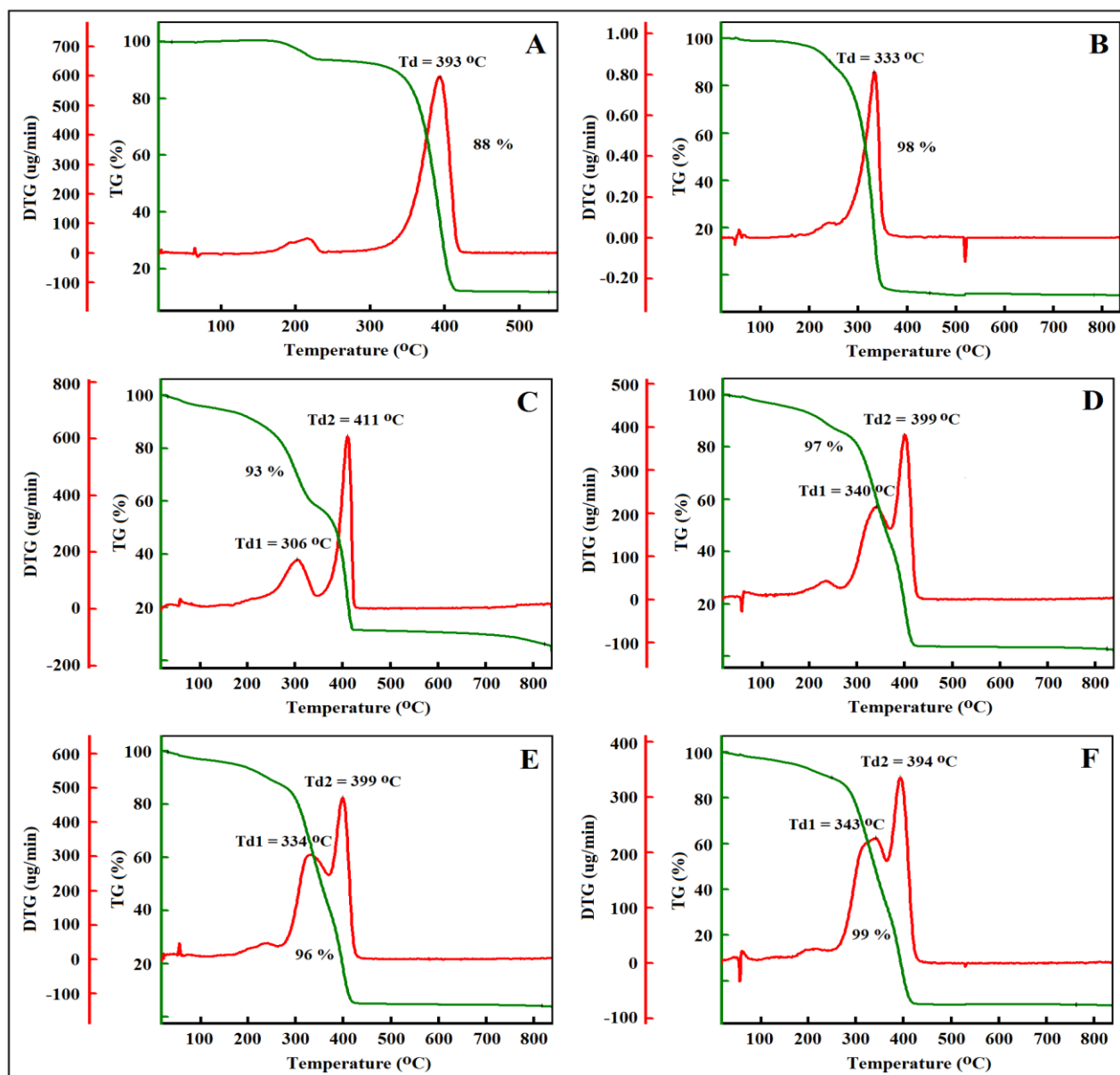
**Scheme 1.** Reaction schemes for syntheses of mPEG-propargyl, N<sub>3</sub>ol, and RPCL-N<sub>3</sub>



**Figure 1.** FT-IR spectra of mPEG-propargyl (A), N<sub>3</sub>ol (B), RPCL-N<sub>3</sub> (C), and poly(RCL-b-mEG) block copolymer (D) (E-3 in Table 1).



**Figure 2.**  $^1\text{H-NMR}$  of mPEG-propargyl (A), RPCL- $\text{N}_3$  (B), poly(RCL-b-mEG) block copolymer (E-2 in Table 1) (C) (solvent: dimethyl sulfoxide- $\text{d}_6$ ).



**Figure 3.** TGA curves of mPEG-propargyl (A), RPCL-N<sub>3</sub> (B), poly(RCL-b-mEG) block copolymer (E-1 in Table 1) (C), poly(RCL-b-mEG) block copolymer (E-2 in Table 1) (D), poly(RCL-b-mEG) block copolymer (E-3 in Table 1) (E), and poly(RCL-b-mEG) block copolymer (E-4 in Table 1) (F).

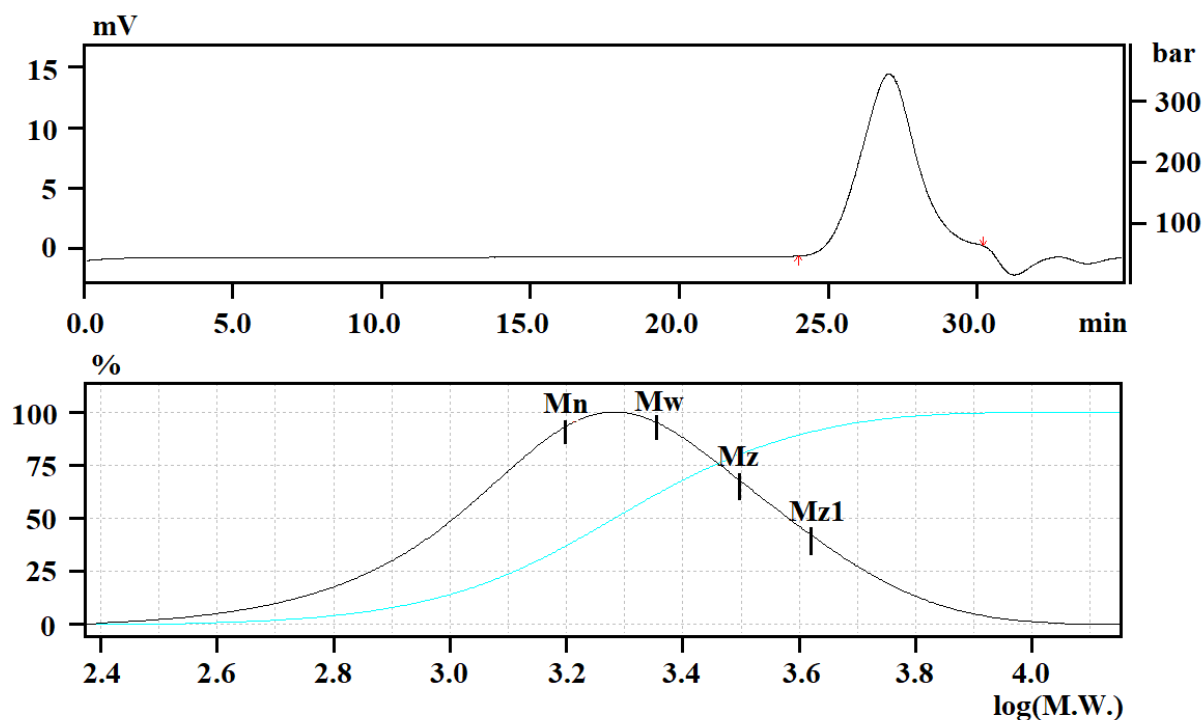
### Synthesis of N<sub>3</sub>ol

N<sub>3</sub>ol as a colorless liquid was synthesized through reaction of 2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethanol and NaN<sub>3</sub> (Baker et al., 2013). The reaction outline for N<sub>3</sub>ol is shown in Scheme 1 (second line). FT-IR of N<sub>3</sub>ol in Figure 1.B presented distinctive signals at 3414 cm<sup>-1</sup> for -OH, 2872 cm<sup>-1</sup> for aliphatic -CH<sub>2</sub>, 2106 cm<sup>-1</sup> for -N<sub>3</sub>, 1122 cm<sup>-1</sup> for -OC. Creation of specific -N<sub>3</sub> stretching band at about 2100 cm<sup>-1</sup> shows effective azidation of 2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethanol.

### Synthesis of RPCL-N<sub>3</sub> by ROP

RPCL-N<sub>3</sub> was synthesized by starting from N<sub>3</sub>ol by ROP technique. The reaction pathway is included in Scheme 1 (third line) for RPCL-N<sub>3</sub>. FT-IR of RPCL-N<sub>3</sub> as shown in Figure 1.C presented distinctive signals at 3440 cm<sup>-1</sup> for -OH, 2945 cm<sup>-1</sup> for aliphatic -CH<sub>2</sub>, 1726 cm<sup>-1</sup> for -C=O. Figure 1.C shows small band feature at about 2099 cm<sup>-1</sup> specific for stretching vibration of azide. <sup>1</sup>H-NMR of

RPCL-N<sub>3</sub> (Figure 2.B) displayed peaks at 4.0 ppm for -NCH<sub>2</sub>, 3.4 ppm for -OCH<sub>2</sub>, 1.5 and 1.3 ppm for aliphatic -CH<sub>2</sub>. Td value of RPCL-N<sub>3</sub> obtained from TGA was 333 °C as shown Figure 3.B. GPC curves of RPCL-N<sub>3</sub> were shown in Figure 4. Mw value of RPCL-N<sub>3</sub> was 2,264 Da. Dispersity index of RPCL-N<sub>3</sub> was 1.43. The value was relatively narrow.



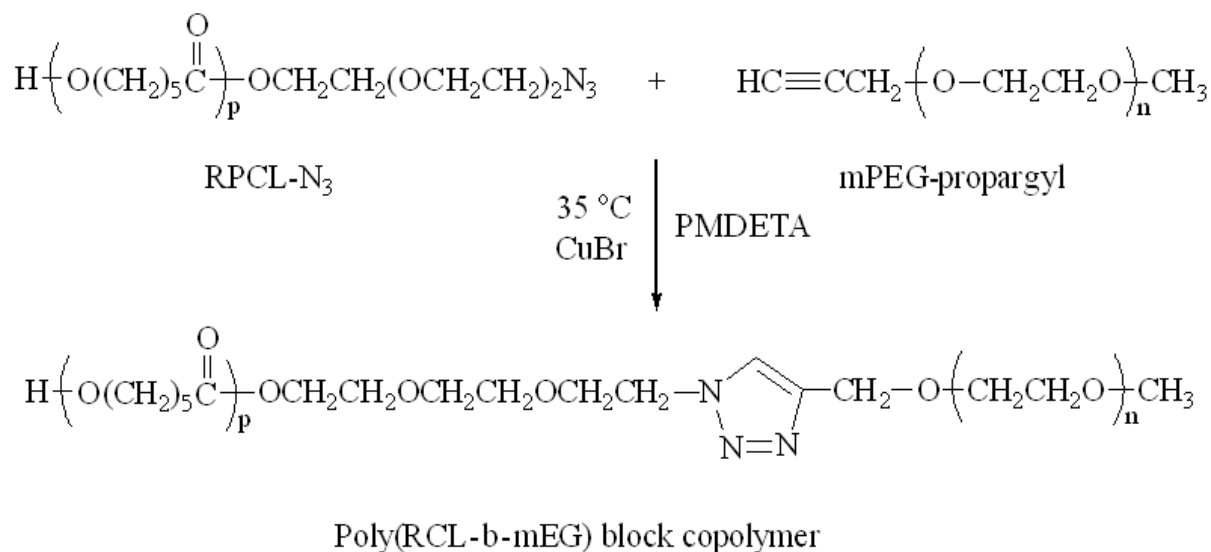
**Figure 4.** GPC curves of RPCL-N<sub>3</sub>.

#### Synthesis of poly(RCL-b-mEG) by "click" chemistry

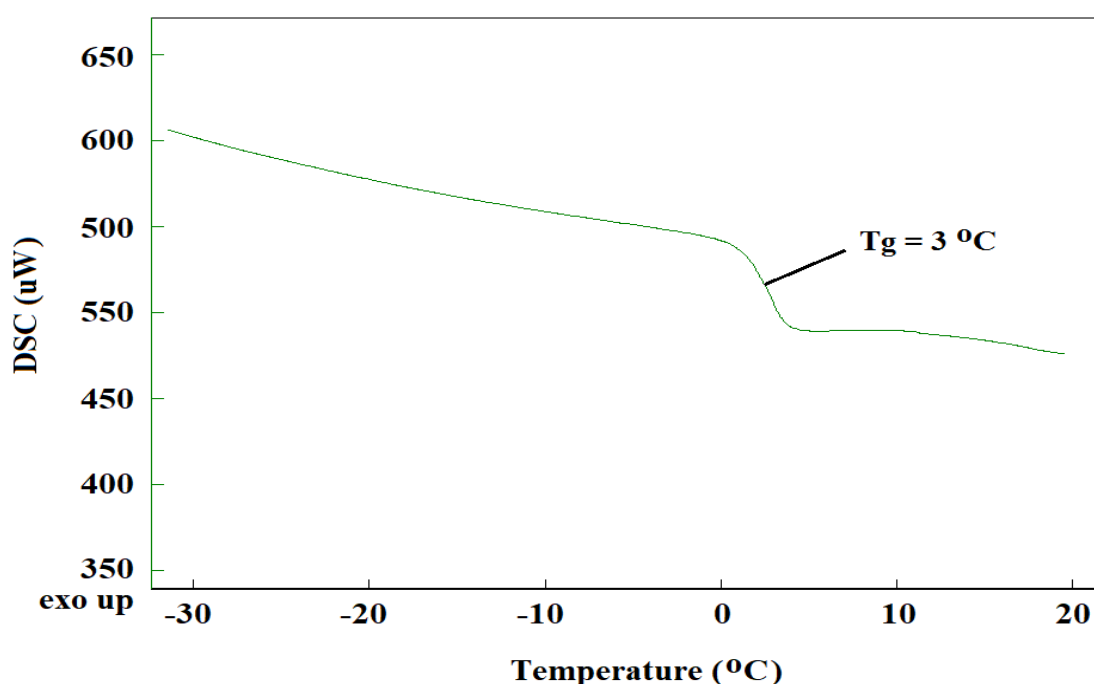
Poly(RCL-b-mEG) copolymers were obtained at 35 °C through "click" chemistry of mPEG-propargyl and RPCL-N<sub>3</sub>. Pathway of reaction is included in Scheme 2 for the block copolymers. The yield was between 75.25 wt% and 93.72 wt%. The FT-IR of poly(RCL-b-mEG) as presented in Figure 1.D presents distinctive signals which belong to the PCL and mPEG-5000 units. Furthermore, the missing of azide (2106 cm<sup>-1</sup>) and propargyl (3150 cm<sup>-1</sup>) can be appropriate for "click" reaction between the homopolymers. Records of <sup>1</sup>H-NMR of poly(RCL-b-mEG) block copolymer in Figure 2.C were obtained. <sup>1</sup>H-NMR of poly(RCL-b-mEG) block copolymer displayed peaks at 8.4 ppm for aromatic -CH of triazole, 4.0 ppm for -NCH<sub>2</sub>, 3.5 ppm for -OCH<sub>2</sub>, 1.5 ppm and 1.2 ppm for aliphatic -CH<sub>2</sub>. The signal at 8.4 ppm in the spectrum was regarded as a great evidence for aromatic -CH of triazole (Lakouraj et al., 2013; Rukmanikrishnan and Muthusamy, 2018; Çatıker, Meyvacı et al., 2019; Öztürk, Meyvacı et al., 2020).

Table 1 shows Td of poly(RCL-b-mEG) block copolymers which were obtained from TGA Figure 3 presents the TGA curves for all block copolymers. In the case of poly(RCL-b-mEG), PCL and PmEG include individual Td. As stated for many copolymers (Jamshid, 2008; Thanomsilp and Phetthianchai, 2012; Çatıker, et al., 2020; Savaş et al., 2020), units in a copolymer show Td as though units are alone. TGA demonstrated fascinating characteristics of copolymer such as continuous weight loss starting from about 200 °C to nearly 420 °C with derivatives at 306 °C and 411 °C (Figure 3.C). The glass temperature (Tg) value of poly(RCL-b-mEG) block copolymer (E-2 in Table 1) was determined by DSC. Tg value

was measured as 3 °C as shown in Figure 5. One main individual Tg of poly(RCL-b-mEG) block copolymer may be relied on high miscibility of mPEG polyether and PCL polyester units of copolymers. Mw of the block copolymers obtained from dynamic light scattering (DLS) instrument were between 6,510 Da and 10,400 Da. As the amounts of RPCL-N<sub>3</sub> have changed, Mw values of the block copolymers have interestingly also changed (Table 1). The relationship between Mw values of the block copolymers and the amounts of RPCL-N<sub>3</sub> could not observed. The molecular weights of poly(RCL-b-mEG) block copolymers more than the molecular weight values of mPEG-propargyl and RPCL-N<sub>3</sub> could prove the formation of poly(RCL-b-mEG).

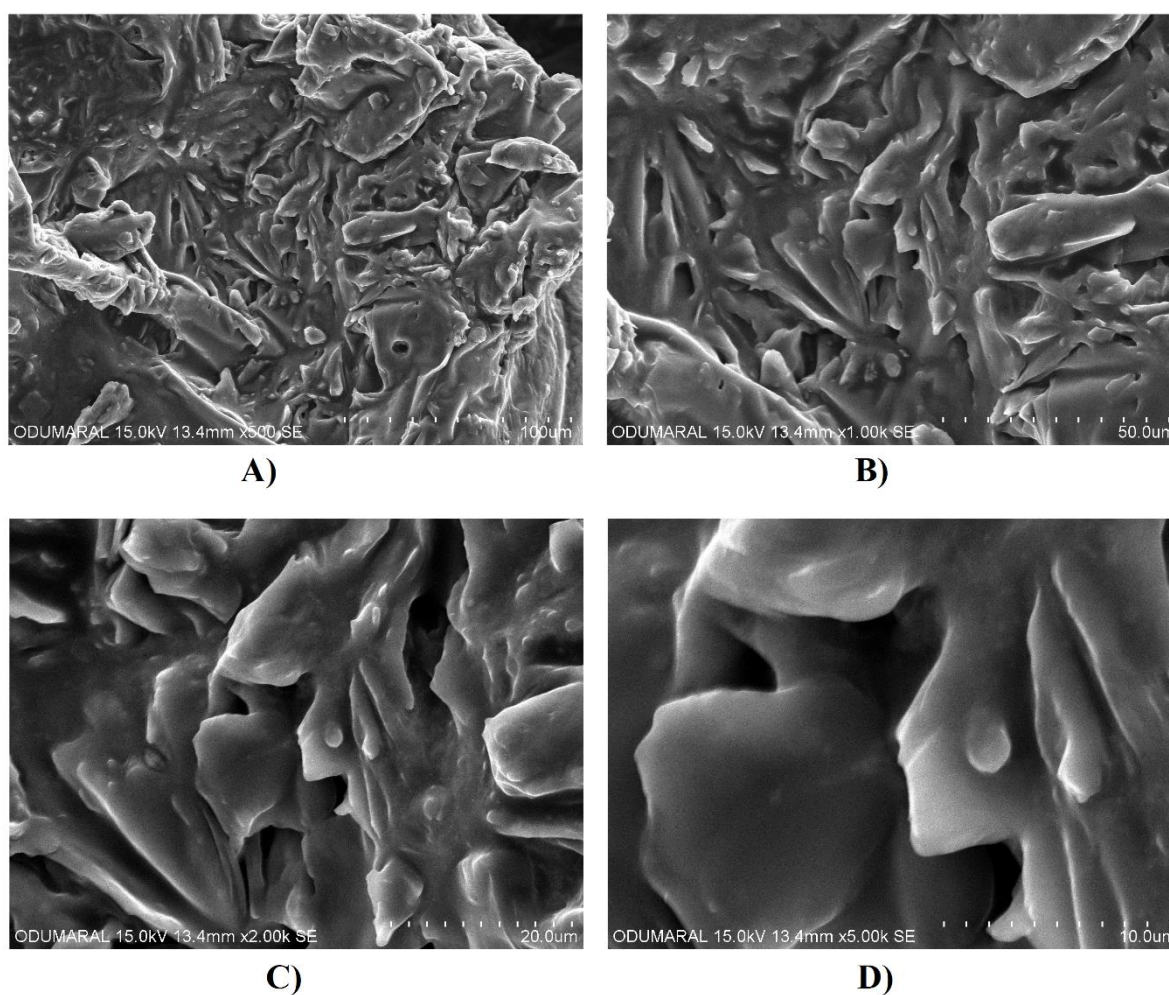


**Scheme 2.** Reaction outline for poly(RCL-b-mEG) copolymer.



**Figure 5.** DSC diagram of poly(RCL-b-mEG) (E-2 in Table 1).

To examine the morphological properties of poly(RCL-b-mEG) block copolymer, SEM device was used. The polymer was coated with a thin layer of gold on its surface. The images were received from different views. The surface morphologies of poly(RCL-b-mEG) block copolymer (E-1 in Table 1) was shown in Figure 6. According to the SEM images of copolymer, homogenization of copolymer was great. By a morphology consisting platelets with channels, the polymer sample was characterized. The rough surfaces which form a continuous phase were recognized.



**Figure 6.** SEM displays of poly(RCL-b-mEG) (coded E-1); 500 X (A), 1000 X (B), 2000 X (C), 5000 X (D).

## CONCLUSION

This work shows synthesis of poly(RCL-b-mEG). This procedure used to synthesize block copolymer is easy and effective. This work can lead the way for further and well-conceived materials used for many applications by means of combination of PCL and mPEG. Product characterization was obtained through  $^1\text{H-NMR}$ , SEM, FT-IR, TGA, DSC, DLS, GPC analyses.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by Giresun University Scientific Research Fund (FEN-BAP-C-281119-76).

## Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.



## Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

## REFERENCES

- Adams ML, Lavasanifar A, Kwon GS, 2003. Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92 (7): 1343-1355.
- Altıntaş O, Tunca U, Barner-Kowollik C, 2011. Star and miktoarm star block (co)polymers via self-assembly of ATRP generated polymer segments featuring Hamilton wedge and cyanuric acid binding motifs. *Polymer Chemistry*, 2 (5): 1146-1155.
- Altıntaş O, Tunca U, 2011. Synthesis of terpolymers by click reactions. *Chemistry - An Asian Journal*, 6 (10): 2584-2591.
- Bağlan M, Yıldırım Ü, Çakmak İ, Tekeş AT, 2018. Synthesis of PMMA-b-PEG-b-PMMA by controlled Polymerization Using Macro-RAFT Agents. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 8 (3): 243-254
- Baker YR, Galloway WRJD, Hodgkinson JT, Spring DR, 2013. Design and synthesis of a biotinylated chemical probe for detecting the molecular targets of an inhibitor of the production of the pseudomonas aeruginosa virulence factor pyocyanin. *Molecules*, 18 (10): 11783-11796.
- Barner-Kowollik C, Du Prez FE, Espeel P, Hawker CJ, Junkers T, Schlaad H, Camp WV, 2011. "Clicking" polymers or just efficient linking: what is the difference? *Angewandte Chemie International Edition*, 50 (1): 60-62.
- Binder WH, Sachsenhofer, R, 2007. "Click" chemistry in polymer and materials science. *Macromolecular Rapid Communications*, 28 (1): 15-54.
- Bolton J, Rzaev J, 2012. Tandem RAFT-ATRP synthesis of polystyrene-poly(methyl methacrylate) bottlebrush block copolymers and their self-assembly into cylindrical nanostructures. *ACS Macro Letters*, 1 (1): 15-18.
- Çatıker E, Öztürk T, Atakay M, Salih B, 2020. Synthesis and characterization of the ABA-type poly(ester-ether-ester) block copolymers. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 57 (8): 600-609.
- Çatıker E, Öztürk T, Atakay M, Salih B, 2019. Synthesis and characterization of novel ABA type poly(ester-ether) triblock copolymers. *Journal of Polymer Research*, 26 (5): 123.
- Çatıker E, Meyvacı E, Atakay M, Salih B, Öztürk, T, 2019. Synthesis and characterization of amphiphilic triblock copolymers including  $\beta$ -alanine/ $\alpha$ -methyl- $\beta$ -alanine and ethylene glycol by "click" chemistry. *Polymer Bulletin*, 76 (4): 2113-2128.
- Coulebrier O, Degee P, Hedrick JL, Dubois P, 2006. From controlled ring-opening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: especially poly(beta-malic acid) derivatives. *Progress in Polymer Science*, 31 (8): 723-747.
- Erciyes AT, Erim M, Hazer B, Yağcı Y, 1992. Synthesis of polyacrylamide flocculants with poly(ethylene glycol) segments by redox polymerization. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 200 (1): 163-171.
- Gacal B, Durmaz H, Tasdelen MA, Hizal G, Tunca U, Yagci Y, Demirel AL, 2006. Anthracene-maleimide-based Diels-Alder "click chemistry" as a novel route to graft copolymers. *Macromolecules*, 39 (16): 5330-5336.
- Göktaş M, Öztürk T, Atalar MN, Tekeş AT, Hazer B, 2014. One-step synthesis of triblock copolymers via simultaneous reversible-addition fragmentation chain transfer (RAFT) and ring-opening polymerization using a novel difunctional macro-RAFT agent based on polyethylene glycol. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 51 (11): 854-863.
- Hizal G, Sakar D, Tunca U, 2005. Synthesis of tri-arm star di-block co-polymer containing poly(tetrahydrofuran-b-methyl methacrylate) arms via combination of cationic ring-opening polymerization and photosensitized free radical polymerization routes. *Designed Monomers and Polymers*, 8 (6): 609-617.
- Jamshid MR, 2008. Synthesis and thermal properties of novel multiblock biodegradable copolymers derived from polyethylene glycol,  $\epsilon$ -caprolactone and p-dioxanone. *ScienceAsia*, 34 (2): 207-213.

- Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB, 2001. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 40 (11): 2004-2021.
- Lakouraj MM, Hasantabar V, Bagheri N, 2013. Synthesis of polyethers containing triazole units in the backbone by click chemistry in a tricomponent reaction. *Journal of Polymers*, 2013, 167106.
- Öztürk T, Hazer B, 2010. Synthesis and characterization of a novel macromonomer initiator for reversible addition fragmentation chain transfer (RAFT). Evaluation of the polymerization kinetics and gelation behaviors. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 47 (3): 265-272.
- Öztürk T, Savaş B, Meyvacı E, Kılıçlıoğlu A, Hazer B, 2020. Synthesis and characterization of the block copolymers using the novel bifunctional initiator by RAFT and FRP technics: evaluation of the primary polymerization parameters. *Journal of Polymer Research*, 27 (3): 76.
- Öztürk T, Kaygım O, Gökteş M, Hazer B, 2016. Synthesis and characterization of graft copolymers based on polyepichlorohydrin via reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 53 (6): 362-367.
- Öztürk T, Gökteş M, Hazer B, 2011. Synthesis and characterization of poly(methyl methacrylate-block-ethylene glycol-block-methyl methacrylate) block copolymers by reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 48 (1): 65-70.
- Öztürk S, Cakmak İ, Tekeş AT, Yıldıkı Ü, 2019. Synthesis and Characterization of Poly (lactic acid-b- $\epsilon$ -caprolactone) Block Copolymers. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 9 (2): 1035-1045.
- Öztürk T, Kılıçlıoğlu A, Savaş B, Hazer B, 2018. Synthesis and characterization poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-ethylene glycol) heteroarm star-type amphiphilic copolymers by "click" chemistry and ring-opening polymerization. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 55 (8): 588-594.
- Öztürk T, Yavuz M, Gökteş M, Hazer B, 2016. One-step synthesis of triarm block copolymers by simultaneous atom transfer radical and ring-opening polymerization. *Polymer Bulletin*, 73 (6): 1497-1513.
- Öztürk T, Meyvacı E, 2017. Synthesis and characterization poly( $\epsilon$ -caprolactone-b-ethylene glycol-b- $\epsilon$ -caprolactone) block copolymers via "click" chemistry and ring-opening polymerization. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 54 (9): 575-581.
- Öztürk T, Meyvacı E, Bektaş H, Mentеше E, 2019. Synthesis and characterization of ring-type and branched polymers including polyethylene glycols by "click" chemistry, *SN Applied Sciences*, 1 (4): 343.
- Öztürk T, Meyvacı E, Arslan T, 2020. Synthesis and characterization of poly(vinyl chloride-g- $\epsilon$ -caprolactone) brush type graft copolymers by ring opening polymerization and "click" chemistry. *J Macromol Sci Part A*, 57 (3): 171-180.
- Öztürk T, Yörümez C, 2020. Synthesis of block copolymer including polyepichlorohydrin and polyethylene glycol by "click" chemistry: evaluation of primary parameters of copolymerization. *Polymer Bulletin*, 77, 4773-4788.
- Öztürk T, Cavicchi, CA, 2018. Synthesis and characterization of poly(epichlorohydrin-g- $\epsilon$ -caprolactone) graft copolymers by "click" chemistry. *Journal of Polymer Materials*, 35 (2): 209-220.
- Moses JE, Moorhouse AD, 2007. The growing applications of click chemistry. *Chemical Society Reviews*, 36 (8): 1249-1262.
- Riess G, 2003. Micellization of block copolymers. *Progress in Polymer Science*, 28 (7):1107-1170.
- Rukmanikrishnan B, Muthusamy S, 2018. Preparation and properties of polyimides containing 1,2,3-triazole moieties. *Advances in Polymer Technology*, 37 (1): 21641.
- Ruzette AV, Leibler L, 2005. Block copolymers in tomorrow's plastics. *Nature Materials*, 4 (1): 19-31.
- Şanal T, Koçak İ, Hazer B, 2017. Synthesis of comb-type amphiphilic graft copolymers derived from chlorinated poly( $\epsilon$ -caprolactone) via click reaction. *Polymer Bulletin*, 74 (4): 977-995.
- Savaş B, Öztürk T, Meyvacı E, Hazer B, 2020. Synthesis and characterization of comb-type graft copolymers by redox polymerization and "click" chemistry method. *SN Applied Sciences*, 2 (2): 181.
- Thanomsilp C, Phetthianchai U, 2012. Synthesis and characterization of PLA-co-PEG copolymers. *Advanced Materials Research*, 506, 178-181.

- Tunca U, 2018. Click and multicomponent reactions work together for polymer chemistry. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 219 (16): 1800163.
- Tunca, U, 2013. Triple click reaction strategy for macromolecular diversity. *Macromolecular Rapid Communications*, 34 (1): 38-46.
- Zhu DY, Cao GS, Qiu WL, Rong MZ, Zhang MQ, 2015. Self-healing polyvinyl chloride (PVC) based on microencapsulated nucleophilic thiol-click chemistry. *Polymer*, 69, 1-9.
- Xu J, Ye J, Liu SY, 2007. Synthesis of well-defined cyclic poly(N-isopropylacrylamide) via click chemistry and its unique thermal phase transition behavior. *Macromolecules*, 40 (25): 9103-9110.
- Xi W, Scott TF, Kloxin CJ, Bowman CN, 2014. Click chemistry in materials science. *Advanced Functional Materials*, 24 (18): 2572-2590.

**Atf İçin:** Akin Kazancioglu E, 2021. Bis(Sülfonamid) İhtiva Eden Kalkon Türevlerinin Etkin Bir Şekilde Sentezi ve Karakterizasyonu. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1341-1353.

**To Cite:** Akin Kazancioglu E, 2021. Effective Synthesis and Characterization of Bis(Sulfonamide) Containing Chalcone. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1341-1353.

## Bis(Sülfonamid) İhtiva Eden Kalkon Türevlerinin Etkin Bir Şekilde Sentezi ve Karakterizasyonu

Elif AKIN KAZANCIOĞLU<sup>1\*</sup>

**ÖZET:** Bu çalışmada, sülfonamid içeren yeni kalkon türevleri hızlı ve etkili bir şekilde sentezlendi. Kalkon iskelet yapısının sentezi, baz katalize Claisen-Schmidt kondenzasyon reaksiyon yöntemi kullanılarak yapıldı. 4-metoksi asetofenon, 4-nitrobenzaldehit ve NaOH'in reaksiyonu sonucu **3** nolu kalkon %80 verimle sentezlendi. Elde edilen 1-(4-metoksifenil)-3-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-on (**3**) bileşiğindeki, nitro fonksiyonel grubunun SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O ile indirgenmesiyle hedef bileşik 3-(4-aminofenil)-1-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-on (**4**) %98 verimle elde edildi. Aminin (**4**), 3-(triflorometil)benzensülfonil klorür, 4-florobenzenesülfonil klorür, 4-metoksibenzensülfonil klorür, naftalen-1-sülfonil klorür, pridin-3-sülfonil klorür ve metansülfonil klorür ile reaksiyonu sonucu Alzheimer hastalığı başta olmak üzere birçok farklı terapötik uygulamada kullanılabilme potansiyeline sahip olan moleküllerin sentezi başarılı bir şekilde gerçekleştirildi.

**Anahtar Kelimeler:** Sülfonamid, Kalkon, Claisen-Schmidt Reaksiyonu

### Effective Synthesis and Characterization of Bis(Sulfonamide) Containing Chalcone

**ABSTRACT:** In this study, new chalcone derivatives containing sulfonamide were synthesized rapidly and efficiently. The synthesis of the chalcone skeletal structure was performed using the base-catalyzed Claisen-Schmidt condensation reaction method. Chalcone **3** was synthesized with 80% yield as a result of the reaction of 4-methoxy acetophenone, 4-nitrobenzaldehyde and NaOH. Reduction of the nitro functional group in compound 1-(4-methoxyphenyl)-3-(4-nitrophenyl)prop-2-en-1-one (**3**) with SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O obtained the target compound 3-(4-aminophenyl)-1-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (**4**) in 98% yield. The synthesis of target molecules that has the potential to be used in many different therapeutic applications, including Alzheimer's disease, has been successfully achieved as a result of the reaction of amine (**4**) with 3-(trifluoromethyl)benzenesulfonyl chloride, 4-fluorobenzenesulfonyl chloride, 4-methoxybenzenesulfonyl chloride, naphthalene-1-sulfonyl chloride, pyridine-3-sulfonyl chloride and methanesulfonyl chloride.

**Keywords:** Sulfonamide, Chalcone, Claisen-Schmidt Reaction

<sup>1</sup> Elif AKIN KAZANCIOĞLU ([Orcid ID: 0000-0001-7486-685X](https://orcid.org/0000-0001-7486-685X)), Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Kilis, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Elif AKIN KAZANCIOĞLU, e-mail: eakazancioglu@kilis.edu.tr

## GİRİŞ

Sülfonamidler, Karbonik anhidraz (CA) inhibitörleri veya aktivatörleri olarak kullanılan ve antikanser, antifungal, antiobesite, antibakteriyel, antidiüretik, antiglokoma ve anti epileptik gibi geniş biyolojik aktivitelere sahip olan bileşiklerdir (Supuran, 2008; Akin Kazancioglu ve ark., 2012). Bu nedenle, çok eski zamanlardan beri tıp alanında kullanılmaktadır. Sülfonamidler bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde de kullanılan etkin kemoterapötiklerdir Piyasada bulunan sülfonamid türevi ilaçlar; antimikrobiyal, şeker düşürücü, idrar söktürücü sülfamidler gibi çeşitli gruplarda sınıflandırılabilir. Asetazolamid, sülfadiazin, sülfapiridin ve nimesulide en sık kullanılan sülfonamid türevi ilaçlardır (Akin Kazancioglu ve Senturk, 2020). Yapılan araştırmalar bazı sülfonamid türevi bileşiklerin *in vitro* ve *in vivo* olarak önemli antitümör aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (Fidan ve ark., 2015).

Kalkonlar çok sayıda doğal ürünün iskelet yapısını oluşturan ve geniş biyolojik aktive gösteren önemli bileşiklerdir (Zhuang ve ark., 2017). Kalkonlar flavonoid türü bileşikler olup hem doğal hem de sentetik olarak elde edilebilmektedir. Bu nedenle kalkon ve türevlerine olan ilgi giderek artmakta ve özellikle biyolojik aktiviteleri üzerine birçok çalışmalar yapılmaktadır (Kocyigit ve ark., 2020). Kalkonlar; sentez kolaylığı, basit kimyası ve çok sayıda değişik fonksiyonel grubun yapıya kolayca ilave edilip hızlı bir şekilde türevlendirilebilmesinden dolayı birçok biyolojik aktivite çalışmasında tercih edilen iskelet yapılarıdır (Burmaoglu ve ark., 2020). Yapılan araştırmalar kalkonların; antibakteriyel, antimalaryal, antiviral, antiprotozoal, antikanser, anti-inflamatuar, sitotoksik, anti-HIV, antimikrobiyal etki, ayrıca protein tirozin fosfataz, aldoz redüktaz ve hCA inhibitör aktivitesi gösterdiğini ortaya koymuştur (Mathew ve ark., 2017; Kocyigit ve ark., 2017; Kocyigit ve ark., 2018). Kalkonların yapılarında bulunan, üç karbon atomundan oluşan,  $\alpha,\beta$ -doymamış karbonil grubu, elektronların hareketini sağladığı için kimyasal olarak bu yapıları önemli kılmaktadır. Bu nedenle de heterosiklik bileşiklerin sentezinde başlangıç maddesi olarak tercih edilmektedir. (Yazdan ve ark., 2015).

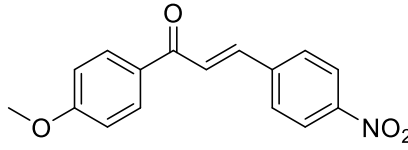
Son yıllarda bazı aktif yapıların birlikte kullanılması sonucu oluşturulan, hibrit moleküllerin sentezi hızla artmaktadır. Yeni sentezlenen hibrit türevlerin aktivitesinin, öncü moleküllerden daha etkin olduğu gözlenmektedir (Dong ve ark., 2010). Bu çalışma kapsamında da çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan kalkon ve sülfonamid yapıları bir araya getirilerek potansiyel aktif moleküllerin sentezlenmesi planlanmıştır. Kim ve arkadaşları tarafından sentezlenen ve aktivite çalışmaları yapılan Sülfonamid içeren kalkon türevlerinin etkisini gösteren patent çalışması, bu hipotezi desteklemektedir (U.S. Patent No. US20200190024, 2020).

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyaller ve Cihazlar

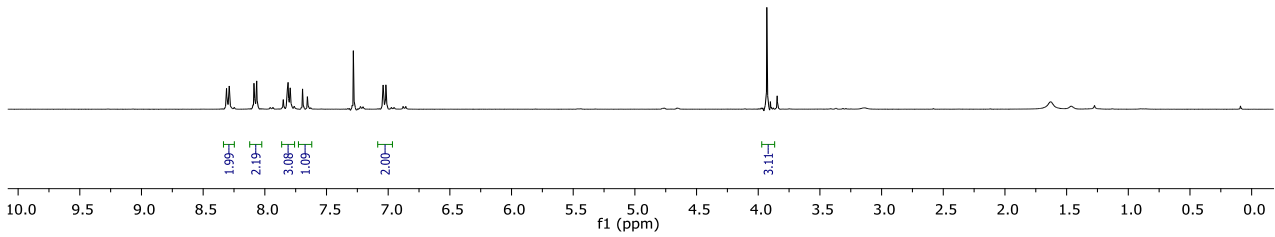
Bu çalışmada ticari olarak temin edilen reaktifler, herhangi bir ilave saflaştırma yapılmaksızın doğrudan kullanılmıştır. Çalışmamızdaki reaksiyonlar aksi belirtilmedikçe azot atmosferi altında gerçekleştirilmiştir. Susuz çözücüler, kullanımdan önce uygun kurutma maddeleri üzerinden damıtıldı.  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR Spektrumları Bruker 400 spektrometre; Erime noktaları ise Stuart erime noktası SMP30 aparatı kullanılarak açık cam kapiler içinde belirlendi. Kromatografik saflaştırma işlemleri, silica-gel (230-400 gözenek, 40-63  $\mu\text{m}$ ) kullanılarak ve artan polariteye sahip hekzan / EtOAc karışımları ile gerçekleştirildi. Reaksiyonların seyri, ince tabaka kromatografisi ile izlendi. Lekelerin tespiti için İTC (ince tabaka kromatografi) plakaları UV ışığına (254 ve 365 nm) maruz bırakıldı.

### Kalkon Yapısındaki Sülfonamid Türevlerinin Sentezi

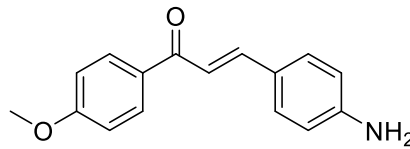


#### (3)'ün sentez yöntemi:

4-metoksi asetofenon (**1**) (1 eşdeğer), 4-nitrobenzaldehit (**2**) (1.2 eşdeğer) ve NaOH (3 eşdeğer), EtOH (2.5 mL / mmol substrat) içerisinde 3 gün karıştırıldı. 3 gün sonra reaksiyon karışımı 2 M HCl çözeltisi kullanılarak nötrale edildi. Meydana gelen çökelti süzülerek alındı ve EtOAc/Su (2 mL/mmol substrat x 3) kullanılarak ekstrakte edildi. Birleştirilen organik fazlar Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> üzerinden kurutuldu ve çözücü evaporatörde uzaklaştırıldı. Ham ürün EtOAc:Hekzan (1:4) kullanarak silika-gel üzerinden, kolon kromatografisi yöntemi kullanılarak saflaştırıldı. Sarı renkli katı (%80 verim). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 8.30 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 8.08 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.87 – 7.74 (m, 3H), 7.67 (d, J = 15.7 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H).

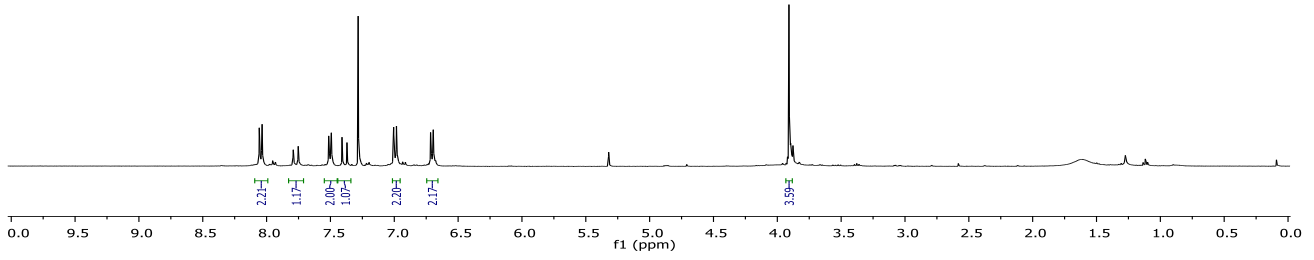


Şekil 1. (3)'ün <sup>1</sup>H NMR spektrumu



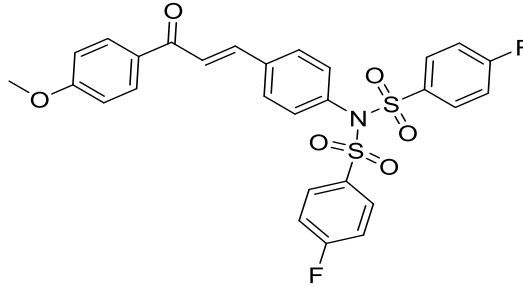
#### (4)'ün sentez yöntemi:

Kalkon (**3**) (1 eşdeğer) ve SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (5 eşdeğer)'ün EtOH içerisindeki karışımı reflüks sıcaklığında 2.5 saat karıştırıldı. Daha sonra su ilave edilerek durdurulan reaksiyon, doymuş NaHCO<sub>3</sub> çözeltisi kullanılarak nötrale edildi. Reaksiyon karışımı EtOAc ile ekstrakte edildi. Birleştirilen organik fazlar Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> üzerinden kurutuldu ve çözücü evaporatörde uzaklaştırıldı. Reaksiyon %98 verimle elde edildi ve ham ürün herhangi bir saflaştırma yapılmaksızın ileri kademelerde kullanıldı. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ 8.05 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.77 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.39 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.75 – 6.67 (m, 2H), 3.91 (s, 3H).

Şekil 2. (4)'ün <sup>1</sup>H NMR spektrumu

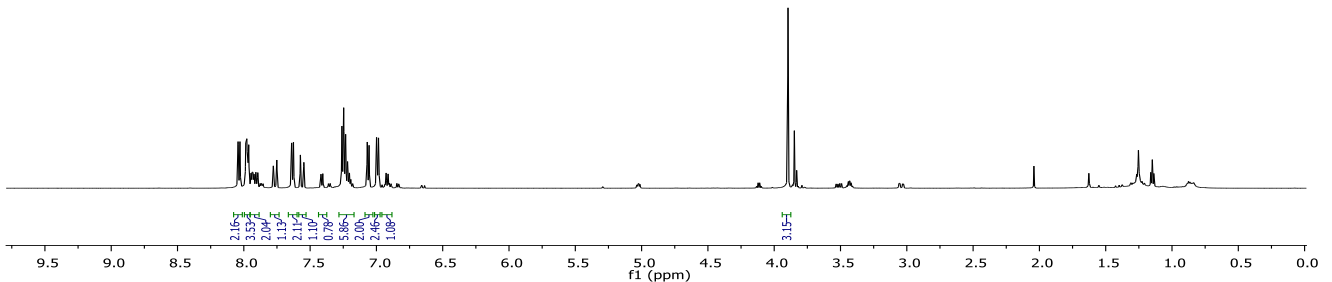
### Sülfonamid Türevlerinin Hazırlanması İçin Genel Yöntem

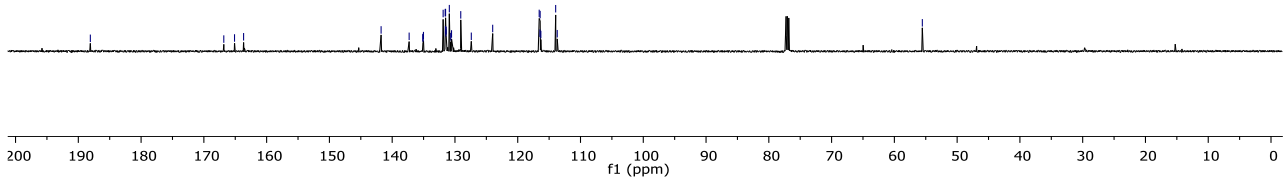
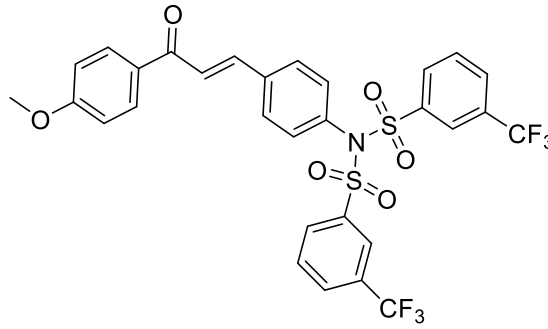
Amin (4) (1 eşdeğer), 0 °C'de DCM (metilen klorür) içerisinde çözüldü. Azot atmosferinde sırasıyla NEt<sub>3</sub> (triethyl amin) (2.17 eşdeğer) ve ilgili MsCl (mezitilchlorür) (2.1 eşdeğer) türevi ilave edilerek oda sıcaklığına gelene kadar karıştırıldı. TLC ile çıkış bileşiğinin bitmesi takip edilerek, reaksiyon su ile durduruldu. Reaksiyon karışımı DCM ile ekstrakte edildi, doygun tuz çözeltisi ile yıkandı ve birleştirilen organik fazlar Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> üzerinden kurutuldu. Ham ürünler EtOAc:Hekzan kullanarak silika-gel üzerinden, kolon kromatografisi yöntemi kullanılarak saflaştırıldı.



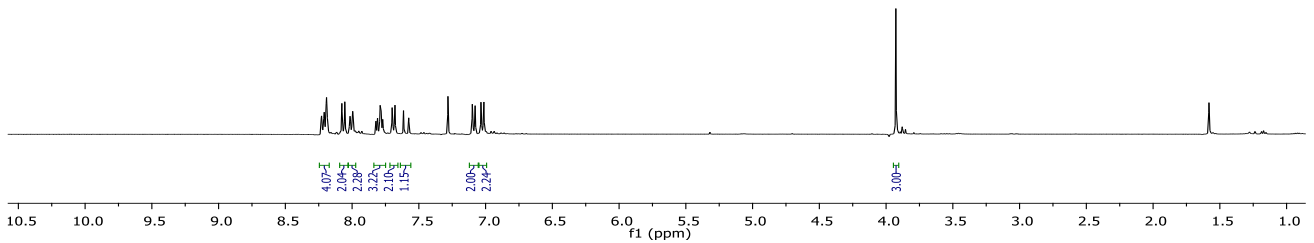
### (5)'in sentez yöntemi:

Sarı katı; %80 verim; E.N: 75-77 °C; Rf:0.8 (Hekzan:EtOAc:% 3:2); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ 8.04 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.97 (dd, J = 8.7, 4.9 Hz, 3H), 7.96 – 7.88 (m, 2H), 7.76 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.56 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.28 – 7.18 (m, 2H), 7.06 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.96 – 6.88 (m, 1H), 3.90 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ 188.1, 166.8, 165.1, 163.7, 141.8, 137.3, 135.1, 135.1, 135.0, 131.9, 131.6, 131.5, 131.5, 131.4, 131.4, 130.9, 130.7, 130.5, 129.1, 127.4, 124.0, 116.6, 116.5, 116.4, 116.3, 114.0, 113.7, 55.5; IR (neat, cm<sup>-1</sup>) 1641, 1587, 1512, 1324, 1265, 1211, 1182, 1140, 1027, 951, 829.

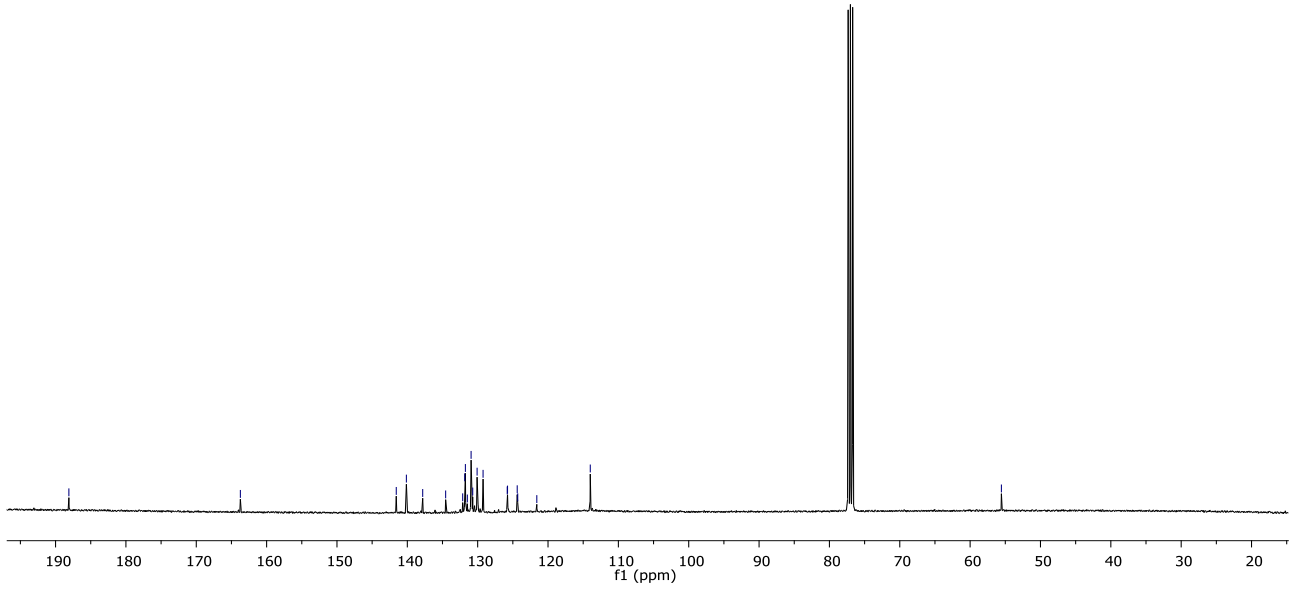
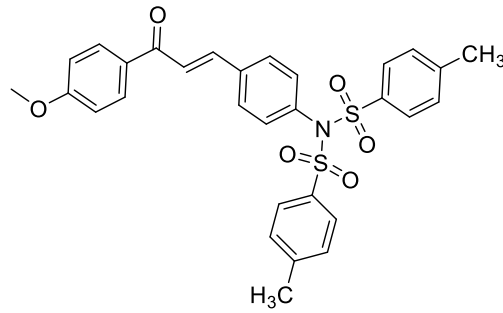
Şekil 3. (5)'in <sup>1</sup>H NMR spektrumu

Şekil 4. (5)'in <sup>13</sup>C NMR spektrumu**(6)'nın sentez yöntemi:**

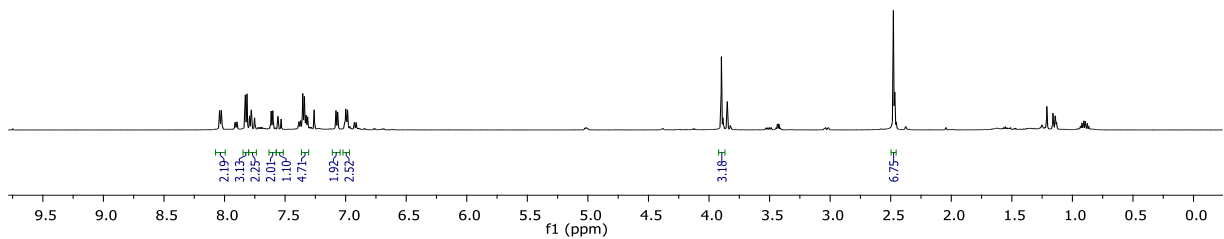
Beyaz katı; %82 verim; E.N: 120-122 °C; Rf:0.7 (Hekzan:EtOAc:% 3:2); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ 8.26 – 8.14 (m, 4H), 8.07 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 8.01 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.84 – 7.75 (m, 3H), 7.69 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.60 (d, J = 15.7 Hz, 1H), 7.09 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.02 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ 188.1, 163.7, 141.6, 140.1, 137.8, 134.5, 132.1, 131.8, 131.7, 131.5, 130.9, 130.7, 130.1, 129.2, 125.8, 125.8, 124.4, 124.3, 121.6, 114.0, 55.5; IR (neat, cm<sup>-1</sup>)1651, 1599, 1509, 1325, 1260, 1221, 1162, 1130, 1021, 911, 821.

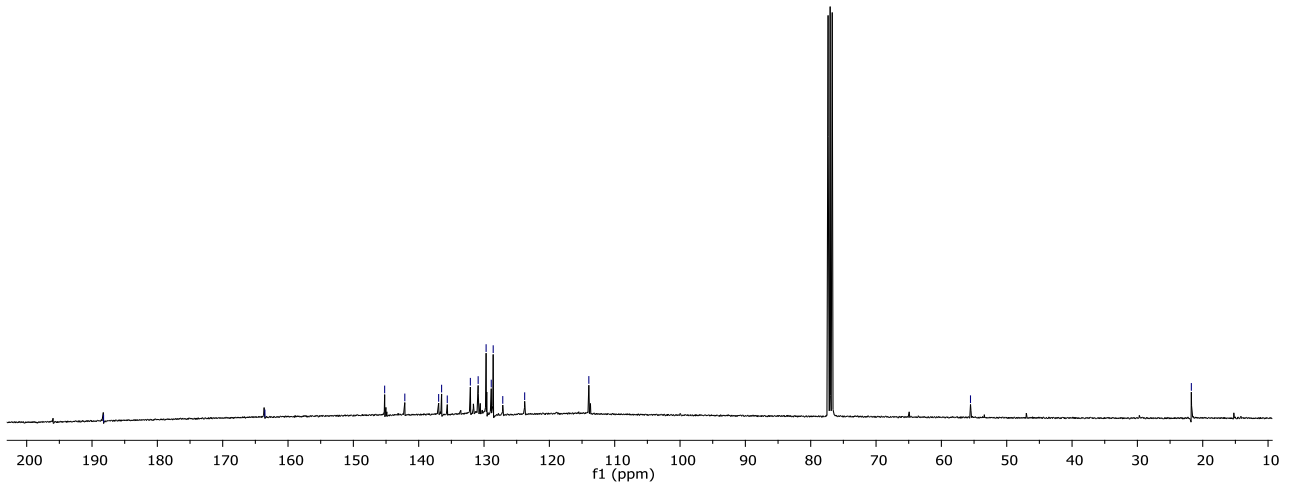
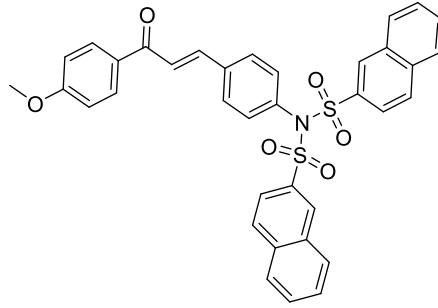
Şekil 5. (6)'nın <sup>1</sup>H NMR spektrumu



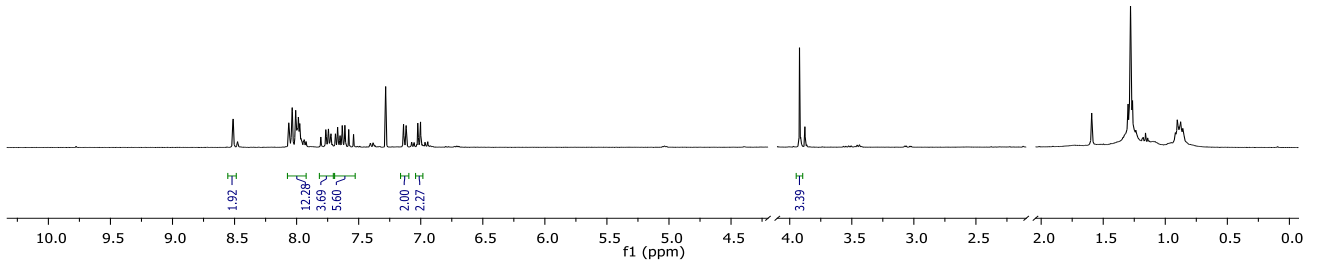
Şekil 6. (6)'nin <sup>13</sup>C NMR spektrumu**(7)'nin sentez yöntemi:**

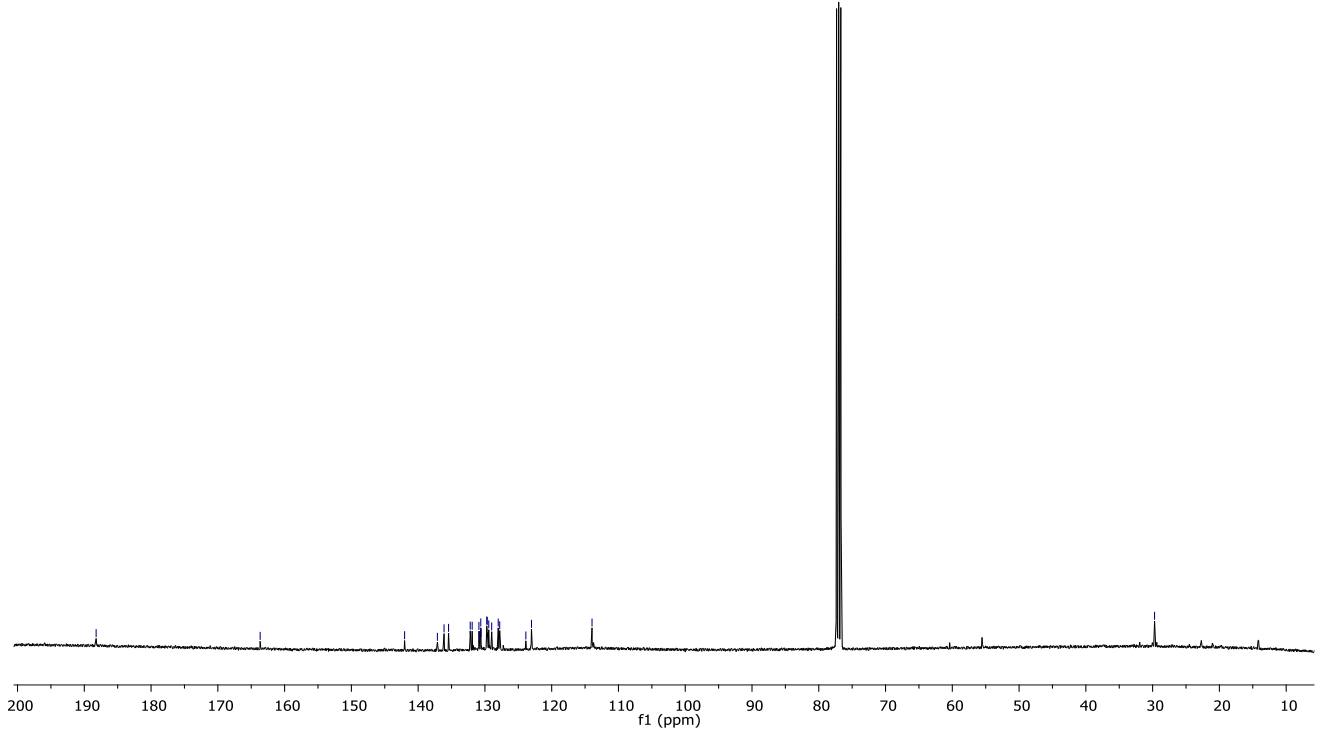
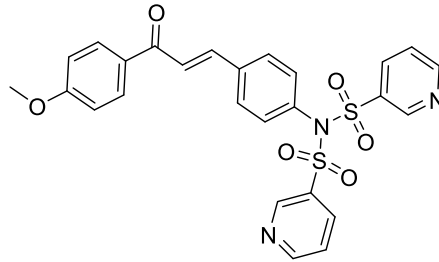
Açık sarı katı; %76 verim; E.N: 178-180 °C; Rf:0.6 (Hekzan:EtOAc % 3:2); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ 8.03 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.82 (d, J = 8.2 Hz, 3H), 7.77 (t, J = 12.5 Hz, 2H), 7.61 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.55 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.38 – 7.30 (m, 4H), 7.07 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 2.48 (s, 6H).; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ 188.23, 163.54, 145.21, 142.13, 136.95, 136.50, 135.63, 132.09, 130.90, 129.68, 128.90, 128.60, 127.13, 123.78, 113.96, 55.54, 21.74; IR (neat, cm<sup>-1</sup>) 1643, 1587, 1519, 1333, 1263, 1211, 1134, 1102, 1025, 942.

Şekil 7. (7)'nin <sup>1</sup>H NMR spektrumu

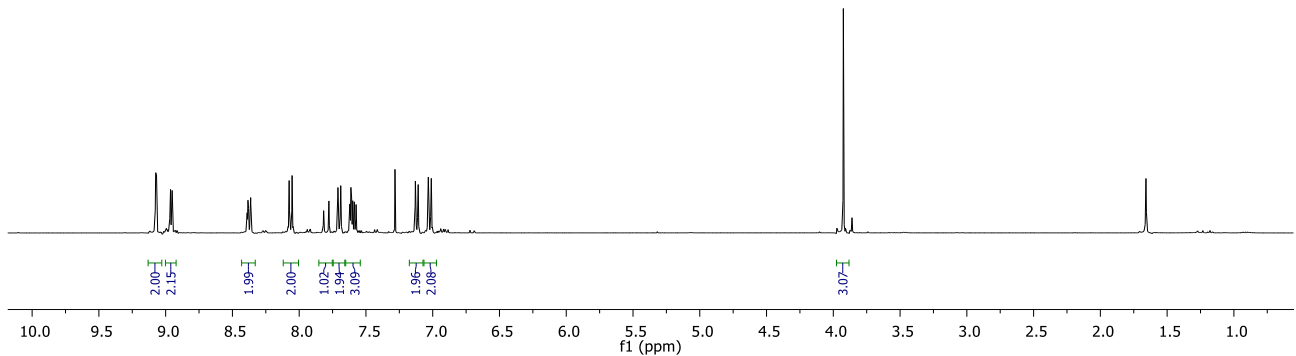
Şekil 8. (7)'nin <sup>13</sup>C NMR spektrumu**(8)'in sentez yöntemi:**

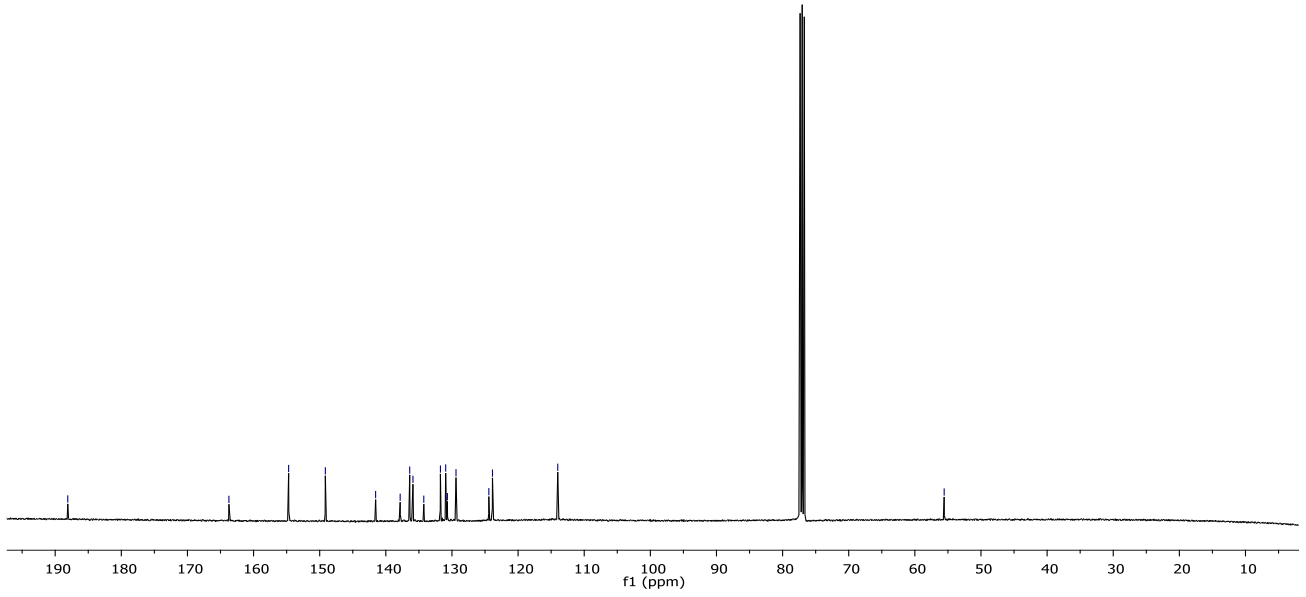
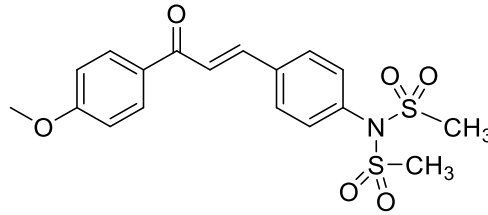
Sarı katı; %70 verim; E.N: 110-111 °C; Rf:0.6 (Hekzan:EtOAc:% 3:2); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ 8.51 (s, 2H), 8.07 – 7.96 (m, 10H), 7.82 – 7.71 (m, 3H), 7.71 – 7.52 (m, 5H), 7.13 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.01 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 3.92 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ 188.2, 163.7, 142.0, 137.1, 136.1, 135.4, 132.2, 131.9, 130.9, 130.8, 130.6, 130.6, 129.7, 129.6, 129.4, 129.0, 128.0, 127.8, 123.9, 123.0, 114.0, 29.7; IR (neat, cm<sup>-1</sup>) 1662, 1608, 1506, 1391, 1324, 1258, 1168, 1138, 1070, 923, 807.

Şekil 9. (8)'in <sup>1</sup>H NMR spektrumu

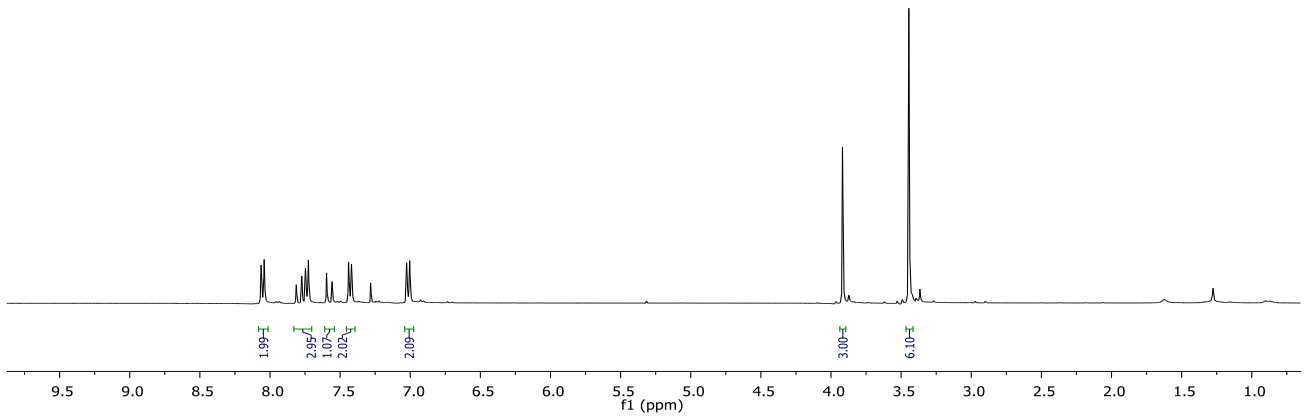
Şekil 10. (8)'in  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu**(9)'un sentez yöntemi:**

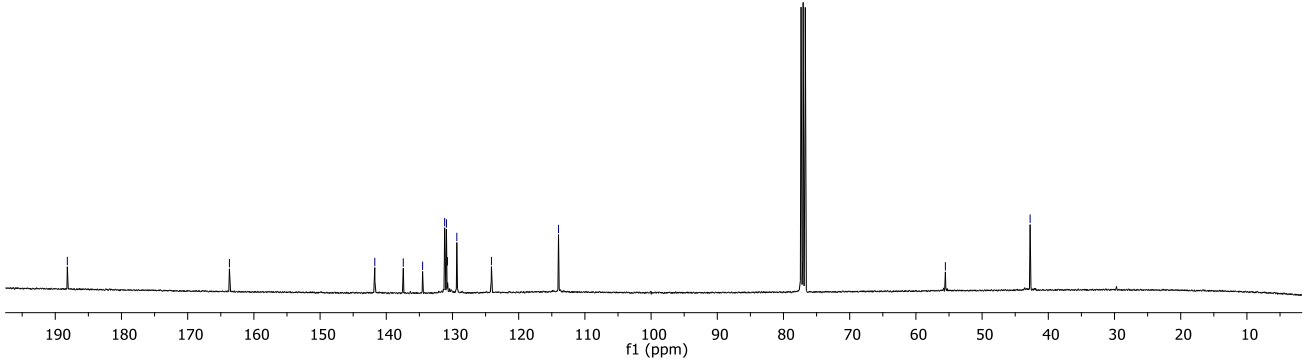
Sarı katı; %65 verim; E.N: 140-142 °C; Rf:0.2 (Hekzan:EtOAc:% 3:2);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$  9.07 (d,  $J = 2.3$  Hz, 2H), 8.96 (dd,  $J = 4.8, 1.6$  Hz, 2H), 8.37 (ddd,  $J = 8.1, 2.3, 1.7$  Hz, 2H), 8.06 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 7.80 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1H), 7.70 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.64 – 7.55 (m, 3H), 7.12 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.02 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 3.92 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$  188.1, 163.7, 154.7, 149.1, 141.5, 137.8, 136.4, 135.9, 134.3, 131.7, 130.9, 130.7, 129.4, 124.4, 123.9, 114.0, 55.6. IR (neat,  $\text{cm}^{-1}$ ) 1659, 1604, 1571, 1504, 1383, 1259, 1171, 1018, 910, 838.

Şekil 11. (9)'un  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

Şekil 12. (9)'un  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu**(10)'un sentez yöntemi:**

Açık sarı katı; %87 verim; E.N: 110-111 °C; Rf:0.6 (Hekzan:EtOAc:% 3:2);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$  8.05 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.79 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1H), 7.74 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.58 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1H), 7.43 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.02 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.45 (s, 6H).;  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$  188.2, 163.7, 141.7, 137.4, 134.5, 131.2, 130.9, 130.7, 129.3, 124.1, 114.0, 55.5, 42.7.; IR (neat,  $\text{cm}^{-1}$ ) 2923, 1663, 1598, 1507, 1365, 1324, 1258, 1219, 1158, 1020, 977, 907.

Şekil 13. (10)'un  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



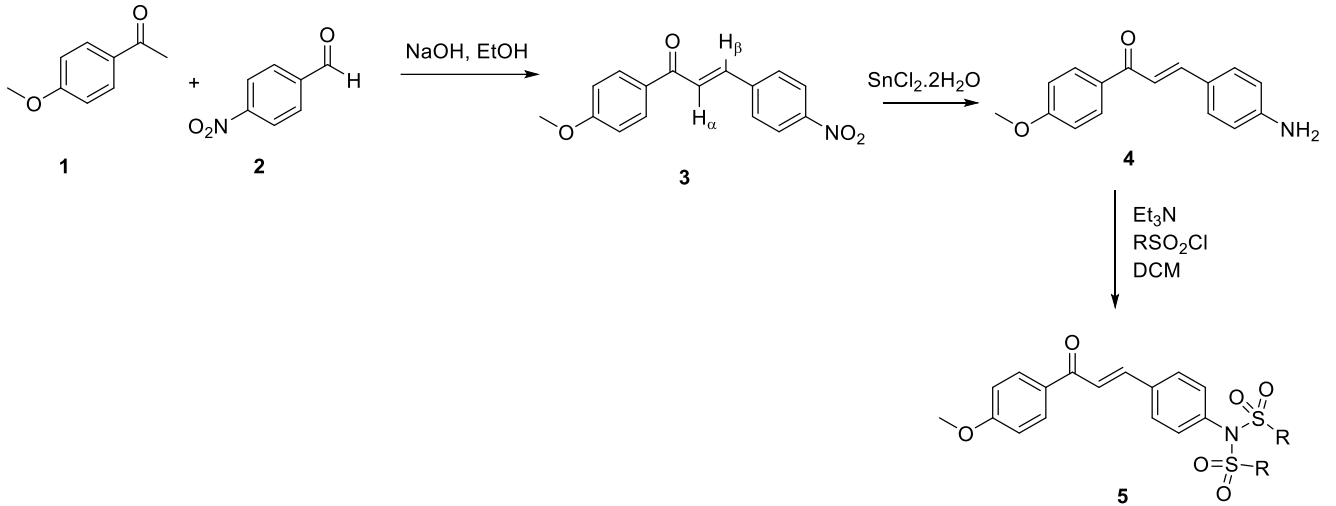
Şekil 14. (10)'un <sup>13</sup>C NMR spektrumu

## BULGULAR VE TARTIŞMA

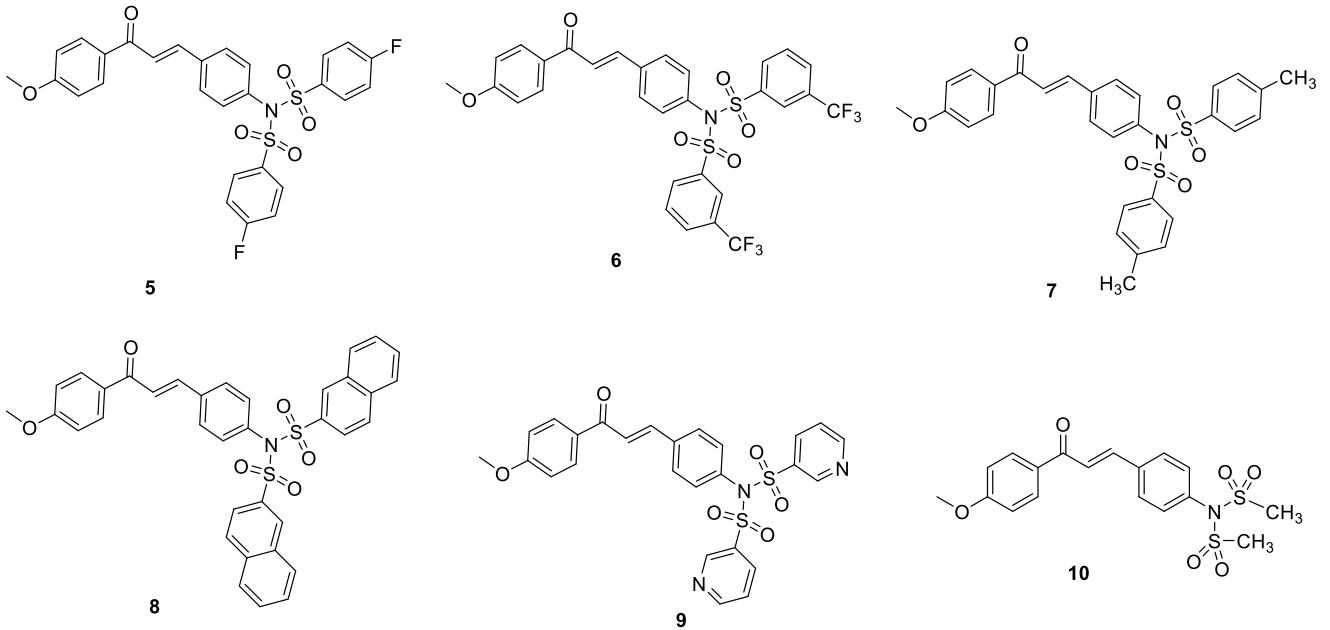
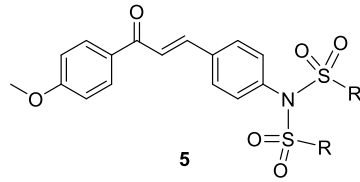
Bu araştırmada, sentetik kimyacıların ve farmakologların oldukça ilgisini çeken kalkon türevlerinin sentezi ve bu türevlerin çeşitli hetero-sülfonil klorürler ile tepkimeleri sonucunda, biyoaktif olma potansiyeline sahip olan kalkon-sülfonamid bileşikleri türetilmiştir.

Kalkonların sentezi; Suzuki, Heck, Julia-Kocienski, Wittig gibi coupling reaksiyonları, Fridel-Craft açılasyon reaksiyonu ve photo-Fries düzenlenme reaksiyon yöntemi kullanılarak yapılabilmektedir. Fakat bu yöntemlerde kullanılan katalizörlerin pahalı olması, özel gaz kullanım zorunluluğu ve uygun reaktif bulmadaki zorluklar bu yöntemlerin dezavantajlarıdır (Evranoğlu ve Ertan, 2011; Zhuang ve ark., 2017). Bundan dolayı hedef bileşiklerin iskelet yapısını sentezlemek için; asit veya baz katalizli Claisen-Schmidt kondenzasyon reaksiyon yöntemi tercih edildi.

Çıkış bileşiği olan kalkon (**3**); ucuz ve kolay uygulanabilir bir yöntem olması nedeniyle baz katalize Claisen-Schmidt kondenzasyon reaksiyon yöntemi kullanılarak sentezlendi. İlk olarak 4-metoksiasetofenon (1 eş değer)'ün MeOH içindeki çözeltisine, 4-nitrobenzaldehit (1.6 eş değer) ve KOH (%50 sulu çözeltisi) ilave edilerek oda sıcaklığında 15 saat karıştırıldı (Burmaoğlu ve ark., 2020). Çıkış bileşiğinin bitiş İTK ile takip edildi ve gerekli ekstraksiyon işlemleri yapıldı. Sonuç olarak ürün karışımı oluştuğu ve hedef bileşiğin veriminin düşük olması nedeniyle başka bir baz kullanılmasına karar verildi. 1-(4-metoksifenil)-3-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-on (**3**)'ün sentezi için, yine aynı çıkış bileşikler olan 4-metoksiasetofenon ve 4-nitrobenzaldehit'in EtOH içerisindeki çözeltisine NaOH ilave edilerek çıkış bileşiği bitene kadar karıştırıldı. Çıkış bileşiği bittiğinde, reaksiyon karışımı 2 M HCl çözeltisi kullanılarak nötralize edildi ve meydana gelen katı süzülerek alındı (Sonmez ve ark., 2011). Elde edilen katı ileri bir saflaştırmaya tabi tutulmadan bir sonraki kademeye geçilebilir. Fakat bilindiği üzere saf madde ile kurulacak olan reaksiyonların verimi daha yüksek olmaktadır. Bunun için elde edilen katının saflaştırılmasına karar verildi. Ham ürün, gerekli ekstraksiyon işlemlerine tabi tutulduktan sonra kolon kromatografisi yöntemi kullanılarak saflaştırıldı ve %80 verimle 1-(4-metoksifenil)-3-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-on (**3**) elde edildi (Şekil 15). **3** numaralı bileşiğin NMR spektrumu incelendiğinde;  $\alpha, \beta$ -doymamış olefin protonlarının, 7.5-8.1 ppm arasında dublet şeklinde gelmesi ve bu piklerin etkileşim sabitlerinin yaklaşık  $J=15.0$  Hz olarak ölçülmesi kalkon yapısının oluştuğunu göstermektedir.



Şekil 15. Kalkon Yapısındaki Sülfonamid Türevlerinin Sentez Planı



Şekil 16. Sülfonamid içeren kalkon türevlerinin açık yapısı

3-(4-aminofenil)-1-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-on (4) bileşiğinin sentezi için, (3)'deki nitro (-NO<sub>2</sub>) fonksiyonel grubunun, amine (-NH<sub>2</sub>) indirgenmesi gerekmektedir. Bunun için Pd-C/H<sub>2</sub>, SnCl<sub>2</sub>, HSiCl<sub>3</sub>, Fe/CaCl<sub>2</sub>, Zn/RuCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> gibi çeşitli indirgeyiciler literatürde kullanılmaktadır. 3 bileşiğinin yapısı incelenecek olursa; α,β-doymamış karbonil fonksiyonel grubu bulunduğu için seçilecek olan indirgeyicinin sadece nitro grubunu indirgemesi gerekmektedir. Bu nedenle nitro grubunu serbest amine indirgemek için literatürde de yaygın olarak kullanılan SnCl<sub>2</sub> indirgeyici olarak tercih edildi. 1-(4-methoxyphenyl)-3-(4-nitrophenyl)prop-2-en-1-one (3), EtOH içerisinde SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O varlığında basınçlı tüp kullanılarak 70 °C de 2.5 saat ısıtıldı. Çıkış bileşiğinin bittiği İTK (ince tabaka kromatografisi) ile tespit edildikten sonra, reaksiyon karışımını içerisindeki etanol evaporatörde uzaklaştırıldı. Metilen klorür

ve doymuş NaCl çözeltisi ile ekstraksiyon işlemlerine tabi tutuldu. Dönüşüm %98 olduğu için elde edilen ham ürün 3-(4-aminofenil)-1-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-one (**4**) herhangi bir saflaştırma yapılmadan ileri basamakta kullanıldı (Şekil 15). NO<sub>2</sub> fonksiyonel grubu taşıyan **3** ve NH<sub>2</sub> fonksiyonel grubu taşıyan **4** bileşiklerinin IR spektrumları incelendiğinde; **4**'ün IR spektrumunda 3400 cm<sup>-1</sup>'de gözlenen pikin -NO<sub>2</sub> fonksiyonel grubunun -NH<sub>2</sub> fonksiyonel grubuna indirgeniğini göstermektedir.

Elde edilen serbest amin 3-(4-aminofenil)-1-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-on (**4**) ile hedef bileşimiz olan bis sülfonamid türevlerinin sentezine geçildi. Yapılan sülfonlama tepkimelerinde baz olarak trietilamin ve polar çözücü olarak metilen klorür kullanıldı. Şartların optimize edilmesi için öncelikli olarak serbest amin grubuna sahip kalkon (1 eş değer) bileşiği ile 4-florofenilsüfonil klorür (2 eş değer) tepkimeye tabi tutuldu. Tepkime Et<sub>3</sub>N varlığında, 0°C'de DCM içeresinde gerçekleştirildi. Çıkış bileşiğinin bitişi İTK kullanılarak kontrol edildi. Çıkış bileşiği bittikten sonra gerekli ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri yapıldı ve %80 verimle **5** numaralı hedef bileşik başarılı bir şekilde elde edildi. Daha sonrasında aynı reaksiyon şartları 3-triflorometanbenzensülfonil klorür, 4-metilbenzensülfonil klorür, naftalen-2-sülfonil klorür, piridin-3-sülfonil klorür ve metansülfonil klorür bileşikleriyle tekrarlandı. Sonuç olarak, literatürde bilinmeyen 6 farklı bis sülfonamid türevi %65 ile %87 arasında verimlerle elde edildi (Şekil 16). Sentezi başarılı şekilde yapılan bis sülfonamid içeren kalkon türevlerinin <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR ve IR (Infrared spektrometre) spektrumları alınarak yapı karakterizasyonu yapıldı (Şekil 1-14).

## SONUÇ

Sonuç olarak çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan kalkon ve sülfonamid yapıları bir araya getirilerek literatürde bilinmeyen, yeni 6 adet bis sülfonamid içeren kalkon türevlerinin sentezi %65 ile %87 arasında oldukça iyi verimlerle gerçekleştirildi. Elde edilen bis sülfonamid içeren kalkon türevlerinin <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR, erime noktası ve IR (Infrared spektrometre) spektrumları alınarak yapı karakterizasyonu yapıldı. Ayrıca kalkonların sentezi sırasında kullanılan asetofenon ve aldehitlerin çok yönlü olarak türevlendirilmesiyle çok çeşitli bis sülfonamid içeren kalkon türevlerinin sentezinin mümkün olduğu elde edilen verilerle ortaya kondu. Elde edilen bileşiklerin daha etkili ilaç moleküllerinin hazırlanmasında ilaç öncülleri veya yapı taşları olarak da değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Kilis 7 Aralık Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından "12411" kodlu proje ile desteklenmiştir.

## Çıkar Çatışması

Makaleye ait çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve makalenin yazılması aşamalarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederim.

## Yazar Katkısı

Makalenin planlanması, yürütülmesi ve yazılması makale tek yazarı olarak tarafımda yapıldığı beyan ederim.

## KAYNAKLAR

Akin Kazancioglu E, Guney M, Şentürk M, Supuran CT, 2010. Simple Methanesulfonates are Hydrolyzed by the Sulfatase Carbonic Anhydrase Activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27 (6): 880-885.

- Akin Kazancioglu E, Senturk M, 2020. Synthesis of N-Phenylsulfonamide Derivatives and Investigation of Some Esterase Enzymes Inhibiting Properties. *Bioorganic Chemistry*, 104:104279.
- Burmaoglu S, Akin Kazancioglu E, Kaya R, Kazancioglu M, Karaman M, Algul O, Gulcin I, 2020. Synthesis of Novel Organohalogen Chalcone Derivatives and Screening of Their Molecular Docking Study and Some Enzymes Inhibition Effects, *Journal of Molecular Structure*, 1208:127868.
- Dong X, Du L, Pan Z, Liu T, Yang B, Hu Y, 2010. Synthesis And Biological Evaluation of Novel Hybrid Chalcone Derivatives as Vasorelaxant Agents. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 45 (9): 3986–3992.
- Evranos AB, Ertan R, 2011. Chemical and Structural Properties of Chalcones I. *Farad Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36, 223-242.
- Fidan I, Salmas RE, Arslan M, Şentürk M, Durdagi S, Ekinci D, Şentürk E, Coşgun S, Supuran CT, 2015. Carbonic Anhydrase Inhibitors: Design, Synthesis, Kinetic, Docking and Molecular Dynamics Analysis of Novel Glycine and Phenylalanine Sulfonamide Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23 (23): 7353-8.
- Kim E, Namkoong K, Jeong J, Jang S, Kwon YJ, Jun KY, Jeon KH, Park M, Kim H, Na Y, 2020. Novel Compound and Pharmaceutical Composition Comprising Same as Active Ingredient. US Patent Application Publication, US20200190024.
- Kocuyigit UM, Budak Y, Eliguzel F, Taslimi P, Kılıc D, Gulcin I, Ceylan M, 2017. Synthesis and Carbonic Anhydrase Inhibition of Tetrabromo Chalcone Derivatives. *Archiv der Pharmazie*, 350 (12).
- Kocuyigit UM, Budak Y, Gurdere MB, Erturk F, Yencilek B, Taslimi P, Gulcin I, Ceylan M, 2018. Synthesis of Chalcone-Imide Derivatives and Investigation of Their Anticancer and Antimicrobial Activities, Carbonic Anhydrase and Acetylcholinesterase Enzymes Inhibition Profiles. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 124 (1):61-68.
- Kocuyigit UM, Gezezen H, Taslimi P, 2020. Synthesis, Characterization, and Biological Studies of Chalcone Derivatives Containing Schiff Bases: Synthetic Derivatives for the Treatment of Epilepsy and Alzheimer's Disease. *Archiv der Pharmazie*, 353 (12):e2000202.
- Mathew B, Mathew GE, Ucar G, Joy M, Nafna EK, Lohidakshan KK, Suresh J, 2017. Monoamine Oxidase Inhibitory Activity of Methoxy-Substituted Chalcones. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104 (Pt A), 1321-1329.
- Sonmez F, Sevmezler S, Atahan A, Ceylan M, Demir D, Gencer N, Arslan O, Kucukislamoglu M, 2011. Evaluation of New Chalcone Derivatives as Polyphenol Oxidase Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 15; 21(24): 7479-82.
- Supuran CT, 2008. Carbonic Anhydrases: Novel Therapeutic Applications for Inhibitors and Activators. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7 (2): 168-81.
- Yazdan SK, Sagar DV, Shaik AB, 2015. Chemical and Biological Potentials of Chalcones: A Review. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, 1 (1), 1-9. 10.
- Zhuang C, Zhang W, Sheng C, Zhang W, Xing C, Miao Z, 2017. Chalcone: A Privileged Structure In Medicinal Chemistry, *Chemical Reviews*, 117, 7762–7810.



**Atf İçin:** Urhan BK, 2021. Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni Köpük Nanokompozitlerinin Doğrudan Metanol Yakıt Hücresinde Elektrot Malzemesi Olarak Kullanımı. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1354-1361.

**To Cite:** Urhan BK, 2021. Use of Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni Foam Nanocomposites as Electrode Material in Direct Methanol Fuel Cell. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1354-1361.

## **Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni Köpük Nanokompozitlerinin Doğrudan Metanol Yakıt Hücresinde Elektrot Malzemesi Olarak Kullanımı**

Bingül KURT URHAN<sup>1\*</sup>

**ÖZET:** Bu çalışmada, nikel köpük üzerindeki Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nano-iğne dizileri (Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük), basit tek-kap hidrotermal yöntemle sentezlenmiş ve ardından tek aşamalı ısı işlem uygulanmıştır. Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük nanokompozitlerinin yapısal ve morfolojik analizleri; X-ışını kırınım spektroskopisi (XRD) ve alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM) ile karakterize edilmiştir. Alkali çözeltide Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük üzerinde metanolün elektrokimyasal oksidasyonu, dönüşümlü voltametri (CV) ve kronoamperometri (CA) teknikleri ile incelenmiştir. Düşük başlangıç potansiyeli (270 mV), yüksek akım yoğunluğu (67 mA cm<sup>-2</sup>) ve uzun elektro-oksidasyon kararlılığı (%86) ile Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük mükemmel elektrokatalitik performans göstermiştir. Böylece, sentezlenen nanokompozitin doğrudan metanol yakıt hücreleri için yüksek performanslı platinsiz elektrokatalizörlere mükemmel bir aday olabileceği saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, hidrotermal sentez, metanol elektro-oksidasyonu

### **Use of Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni Foam Nanocomposites as Electrode Material in Direct Methanol Fuel Cell**

**ABSTRACT:** In this work, Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoneedle arrays on nickel foam (Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni foam) were directly synthesized by facile one step thermal treatment. The structural and morphological analysis of Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni foam nanocomposites were characterized by X-ray diffraction spectroscopy (XRD) and field emission scanning electron microscopy (FESEM). The electrochemical oxidation of methanol on Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni foam in alkaline solution was investigated by cyclic voltammetry (CV) and chronoamperometry (CA) techniques. The Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni foam showed excellent electrocatalytic performance with low onset potential (270 mV), high current density (67 mA cm<sup>-2</sup>) and long electro-oxidation stability (86%). Thus, it has been determined that the synthesized nanocomposite can be an excellent candidate for high performance platinum-free electrocatalysts directly for methanol fuel cells.

**Keywords:** Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, hydrothermal synthesis, methanol electro-oxidation

<sup>1</sup> Bingül KURT URHAN ([Orcid ID: 0000-0002-8742-6789](https://orcid.org/0000-0002-8742-6789)), Atatürk Üniversitesi, Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı, Nanomalzeme Bölümü, Erzurum, Türkiye

**\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Bingül KURT URHAN, e-mail: bingulkurt@gmail.com

## GİRİŞ

Enerji talebinin ve çevre kirliliğinin hızla artmasıyla birlikte, temiz, sürdürülebilir ve istikrarlı enerji dönüşümü ve depolama yaklaşımları geliştirmek kaçınılmaz bir zorunluluk haline gelmiştir (Dincer, 2000). Bu yaklaşımlar arasında doğrudan metanol yakıt hücreleri (DMYH'ler) yüksek enerji dönüşüm verimliliği, kullanım kolaylığı, taşınabilir elektronik cihazlar ve elektrikli araçlar için düşük kirlenici emisyonları nedeniyle son yıllarda giderek daha önemli bir rol oynamaktadır (Kamarudin et al., 2009). DMYH'lerin performansını artırmanın etkili bir yolu, yüksek aktivite ve stabiliteye sahip elektrokatalizörler geliştirmektir (Gong et al., 2018). Platin (Pt), paladyum (Pd), rutenyum (Ru) gibi asal metaller ve bazı alaşımlar metanol oksidasyonu için oldukça güçlü elektrokatalizörlerdir (Hoseini et al., 2018; Waszczuk et al., 2001). Ancak, asal metallerin yüksek maliyeti DMYH'lerin ticarileştirilmesini engellemekle birlikte endüstriyel uygulamayı büyük ölçüde sınırlamaktadır (Ramli and Kamarudin, 2018).

Son zamanlarda nano-yapılı geçiş metal oksitler ( $M_xO_y$ ,  $M=Fe, Co, Ni, Mn, vb.$ ), çoklu oksidasyon durumları ve yüksek stabiliteyi nedeniyle DMYH'lerde kullanılan asal metallere alternatif katalizörler olarak gösterilmektedir (Yuda et al., 2020; Qiao and Li, 2011). Bunlar arasında spinel kobalt oksit ( $Co_3O_4$ ); zengin redoks kimyası, nispeten düşük maliyeti, alkali çözeltide yüksek stabilite ve yüksek elektrokimyasal aktivite nedeniyle büyük ilgi görmektedir (Hong et al., 2015). Spinel  $Co_3O_4$ , farklı koordinasyon yapısına sahip tetrahedral bölgede  $Co^{2+}$  ve oktahedral bölgede  $Co^{3+}$  iyonu olmak üzere iki tür kobalt iyonundan oluşmaktadır (Palmas et al., 2007). Dolayısıyla  $Co_3O_4$ ; oksijen gazı oluşumu (Li et al., 2018), etanol oksidasyonu (Hassen et al., 2016), üre oksidasyonu (Du et al., 2019) ve metanol oksidasyonu (Lv et al., 2014) gibi küçük moleküllerin elektrokimyasal oksidasyon reaksiyonlarında kapsamlı bir şekilde çalışılmaktadır.

Hazırlama yöntemi, oksidin fizikokimyasal ve elektrokatalitik özellikleri üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir. Literatürde farklı yapısal ve morfolojik özelliklere sahip  $Co_3O_4$  elde etmek için çöktürme tekniği (Uddin and Baig, 2019), termal ayrışma (Salavati-Niasari et al., 2009), püskürtme yöntemi (Shinde et al., 2006), sol-jel (Vennela et al., 2019) ve hidrotermal sentez (Jin et al., 2014) gibi çeşitli yöntemler mevcuttur. Bunlar arasında hidrotermal sentez, spinel  $Co_3O_4$  ve  $Co_3O_4$ -tabanlı nanomalzemelerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılan, verimli ve doğrudan bir sentez yöntemidir (Rajeshkhanna et al., 2017; Zhang et al., 2018; Yuan et al., 2019). Genel olarak, elektrokimyasal uygulamalar için geliştirilen elektrot malzemelerinin temel özellikleri arasında; yüksek yüzey alanı, uygun gözeneklilik, küçük parçacık boyutu ve uygun morfoloji bulunur. Ayrıca, bu temel özelliklere sahip elektrot malzemeleri, doğrudan iletken altlık üzerinde büyütülürse, elektronların yanı sıra iyonlar/moleküller için kısa taşıma yolları sunar. Dahası,  $Co_3O_4$  iletken altlıkların yüzeyine homojen olarak dağıldığında, hazırlanan materyallerin iletkenliği iyileştirilebilir.

Burada, iletken ajan ve bağlayıcı içermeyen  $Co_3O_4$  nano-İğneler doğrudan Ni köpük üzerinde basit bir hidrotermal sentez ile büyütülmüştür. Anot materyali olarak hazırlanan nanokompozitin alkali ortamda metanol elektro-oksidasyonu için elektrokatalizör özellikleri incelenmiştir. Yapılan elektrokimyasal çalışmalar sonucunda  $Co_3O_4$ /Ni köpük elektrodun yüksek elektrokatalitik aktivite ve kararlılık gösterdiği tespit edilmiştir.

## MATERYAL VE METOT

### Kimyasallar

Bu araştırmada kullanılan bütün kimyasallar, herhangi bir saflaştırma yapılmadan, satın alındığı gibi kullanılmıştır. Kobalt nitrat heksahidrat ( $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ), amonyum florür ( $NH_4F$ ), üre ( $CO(NH_2)_2$ ), potasyum hidroksit (KOH) ve metanol ( $CH_3OH$ ) Sigma-Aldrich (ABD menşei) firmasından satın alınmıştır. Deneylede Milli-Q ultra-saf su (iletkenlik:  $5.5 \mu Sm^{-1}$ ) kullanılmıştır.

Ayrıca, 1 cm x 1 cm boyutunda kesilen Ni köpük elektrotlar yüzeylerinde yer alan oksit tabakasının kaldırılması amacıyla sırasıyla 15 dk aseton, 15 dk 3 M hidroklorik asit (HCl), 15 dk ultra saf su ve 15 dk etanol olmak üzere ultrasonik banyo edilmiş ve sonrasında 80 °C’de kurutulmuştur.

### Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni Köpük Elektrotların Sentezlenmesi

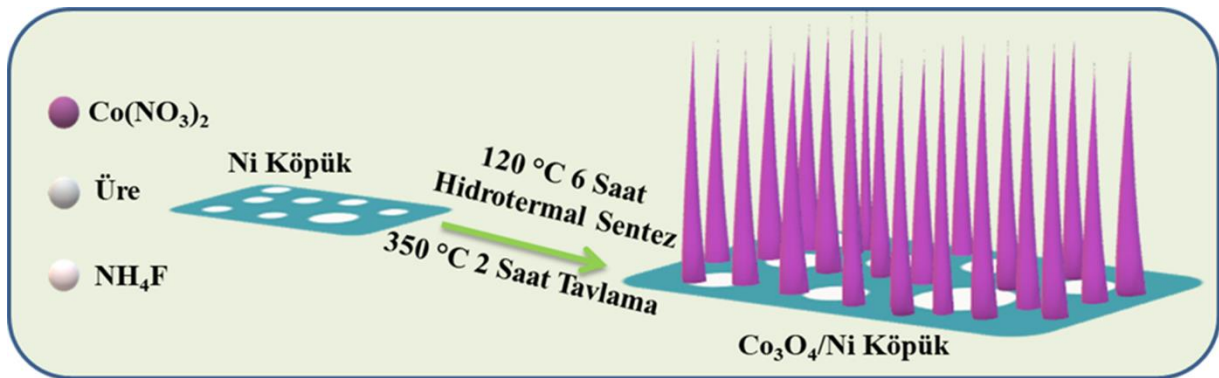
Tipik prosedürde, 1 mmol Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 2 mmol NH<sub>4</sub>F ve 2 mmol üre pembe bir karışım oluşturmak üzere 50 ml ultra-saf su ile karıştırılmıştır. Çözelti manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırıldıktan sonra içerisine temizlenmiş Ni köpük eklenerek 100 ml teflon astarlı paslanmaz çelik bir otoklava aktarılmış ve 120 °C’ye ayarlanmış etüvde 6 saat süreyle tutulmuştur. İşlem sonunda otoklav oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra öncü, ultra-saf su ve etanol ile birkaç kez yıkanıp, ardından 60 °C’de kurutulmuştur. Sonuç ürün olan Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük elde etmek için numuneler atmosferik ortamda 350 °C’de 2 saat boyunca tavlama işlemi yapılmıştır.

### Elektrokimyasal Ölçümler

Elektrokimyasal ölçümler, standart üç-elektrot hücreye bağlı BAS-100B/W model/marka cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ni köpük, Pt tel ve Ag/AgCl (3 M KCl) sırasıyla çalışma elektrodu, karşıt elektrot ve referans elektrot olarak kullanılmıştır. Metanol oksidasyon reaksiyonu (MOR) için N<sub>2</sub> gazı ile doyurulmuş KOH (1 M) ve CH<sub>3</sub>OH (0.5 M) çözeltisi içerisinde 0 ile 700 mV voltaj penceresinde alınan dönüşümlü voltamogramlar kullanılmıştır. Uzun vadeli döngüsel kararlılık, 50 mVs<sup>-1</sup> tarama hızında 500 döngü için analiz edilmiştir. Buna ek olarak, kronoamperometri testi ardışık 2500 s için 600 mV’luk potansiyel altında gerçekleştirilmiştir. Yapısal ve morfolojik karakterizasyonlar için Cu-Kα kaynaklı (λ=1.5405 Å) Rigaku-2200 D/Max marka X-ışınları cihazı, ZEISS Gemini Sigma 300 marka FESEM cihazı ve EDS ekipmanı kullanılmıştır.

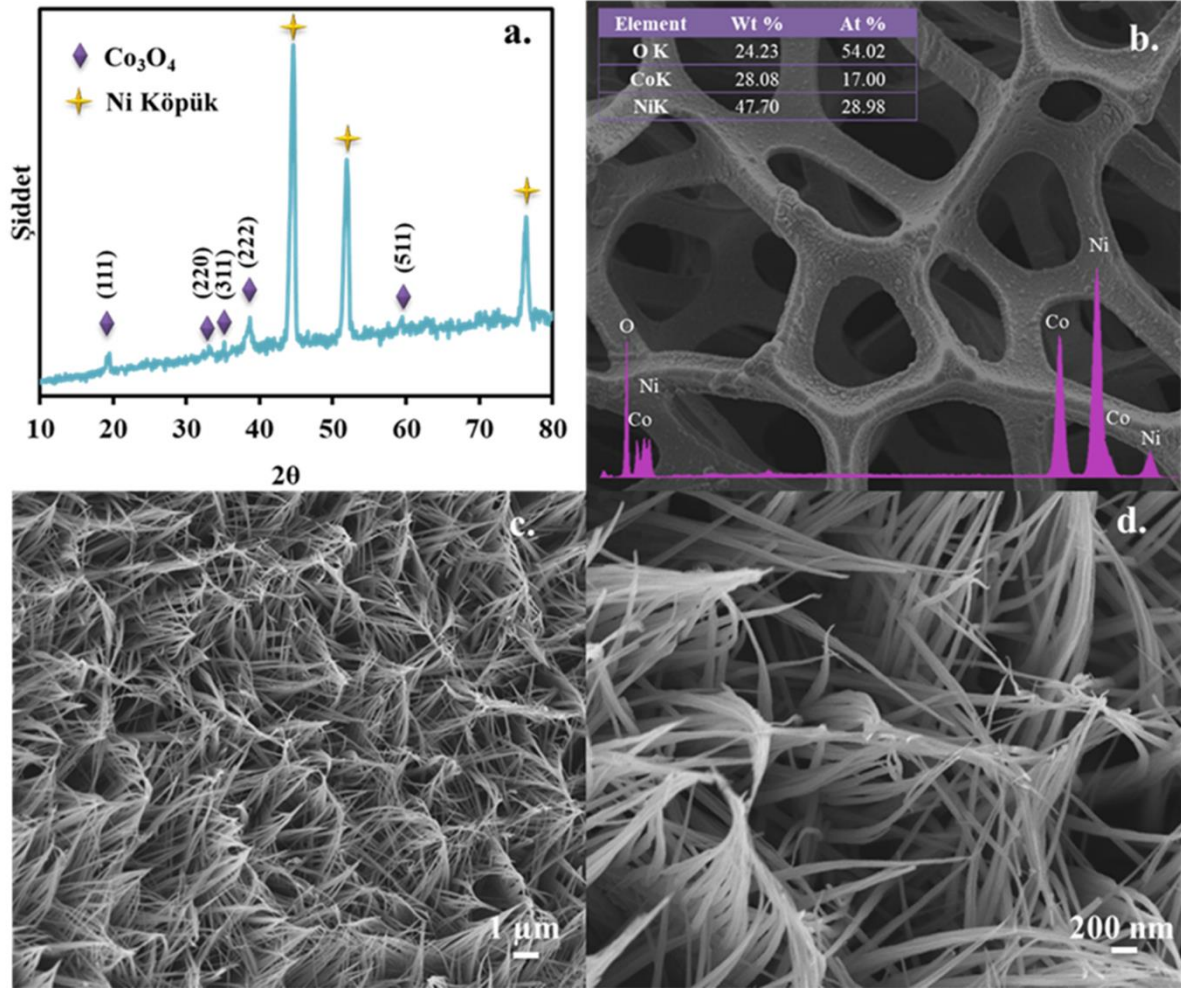
### BULGULAR VE TARTIŞMA

Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük elektrodun hazırlanma prosedürü Şekil 1’de temsili olarak gösterilmiştir. Nano-iğne spinel Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> malzemesi, basit hidrotermal yöntem ile doğrudan Ni köpük üzerinde büyütülmüş ve sonrasında tavlama işlemi yapılmıştır.



Şekil 1. Ni köpük elektrot üzerinde Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sentezinin şematik gösterimi

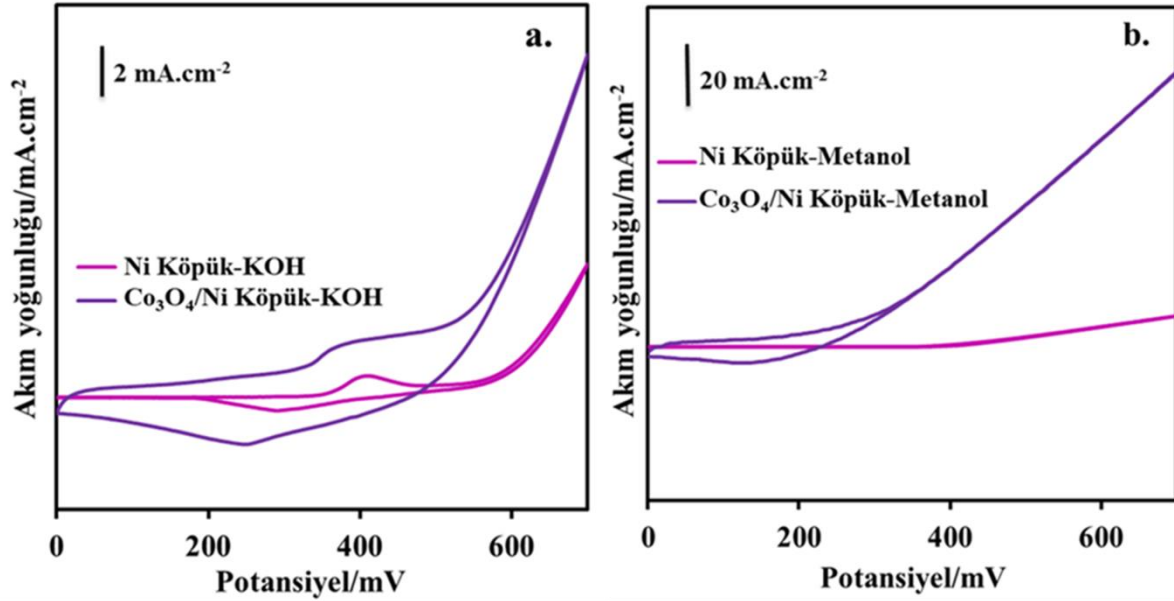
Elde edilen Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük elektrodun yapısal karakterizasyonu için XRD spektrumu alınmış ve kaydedilen spektrum Şekil 2.a’da verilmiştir. XRD spektrumu incelendiğinde Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük yapılarına ait 19.0°, 31.3°, 36.8°, 38.5° ve 59.4° kırınım açılarında sırasıyla (111), (220), (311), (222), ve (511) düzlemlerine ait piklerin oluştuğu gözlemlenmiştir (JCPDS kartı No. 42-1467) (Kurnaz Yetim, 2021). Buna ek olarak, XRD spektrumunda altlık olarak kullanılan Ni köpük elektrodan kaynaklanan 44.4°, 51.8° ve 76.3° kırınım pikleri de mevcuttur (JCPDS kartı No. 88-0773) (Kurt Urhan ve Demir, 2019).



Şekil 2. a) Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük elektroduna ait XRD spektrumu, b-d) FESEM görüntüleri (iç grafik: EDS spektrumu)

Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük yapılarına ait yüzey morfolojileri FESEM cihazı ile incelenmiştir (Şekil 2.b-d). Elde edilen FESEM görüntülerinde, Ni köpük elektrot üzerinde birbirleriyle iç içe geçmiş, düzenli ve homojen bir şekilde Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> iğne benzeri nanotellerin büyüdüğü görülmektedir. İğne şekilli nanoteller kimyasal olarak daha aktif olduğundan indirgenme-yükseltgenme reaksiyonlarında daha yüksek performans sağlamaktadır. Ayrıca, elementel bileşimin belirlenmesi amacıyla kompozit malzemenin EDS spektrumu alınmış (Şekil 2.b iç grafik) ve kompozit malzemede yaklaşık %17 oranında Co, ve %54 oranında O bulunduğu tespit edilmiştir. EDS analizi sayesinde elementel boyutta saf kompozit yapısının sentezlendiği desteklenmiştir.

Hazırlanan Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük elektrodun metanol oksidasyonundaki katalitik etkisi CV tekniği kullanılarak incelenmiştir. İlk olarak Şekil 3'te 1 M KOH çözeltisi içerisinde Ni köpük ve Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük elektrotların dönüşümlü voltamogramları karşılaştırılmıştır. Şekil 3.a'da görüldüğü gibi, 1 M KOH ortamında her iki elektrot için, 0 ile 700 mV arasındaki potansiyel aralığında, hem anodik hem de katodik tarama yönünde bir çift redoks piki gözlenmiştir. Ni alkali ortama daldırıldığında kendiliğinden çözünmesini takiben Ni(OH)<sub>2</sub> filminin oluştuğu bilinmektedir (Liu et al., 2009). Dolayısıyla Ni köpük elektrota ait oksidasyon ve indirgenme pikleri, elektrokimyasal olarak aktif Ni(OH)<sub>2</sub>/NiOOH fazlarının oluşmasıyla ilişkilendirilebilir. Benzer şekilde Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük elektrot için redoks pikleri Co<sup>2+</sup>/Co<sup>3+</sup> fazlarına karşılık gelmektedir. Çözelti içerisine 0.5 M metanol eklendiğinde metanolün elektro-oksidasyonu anodik akımdaki keskin bir artışla net bir şekilde gözlenmiştir (Şekil 3.b).



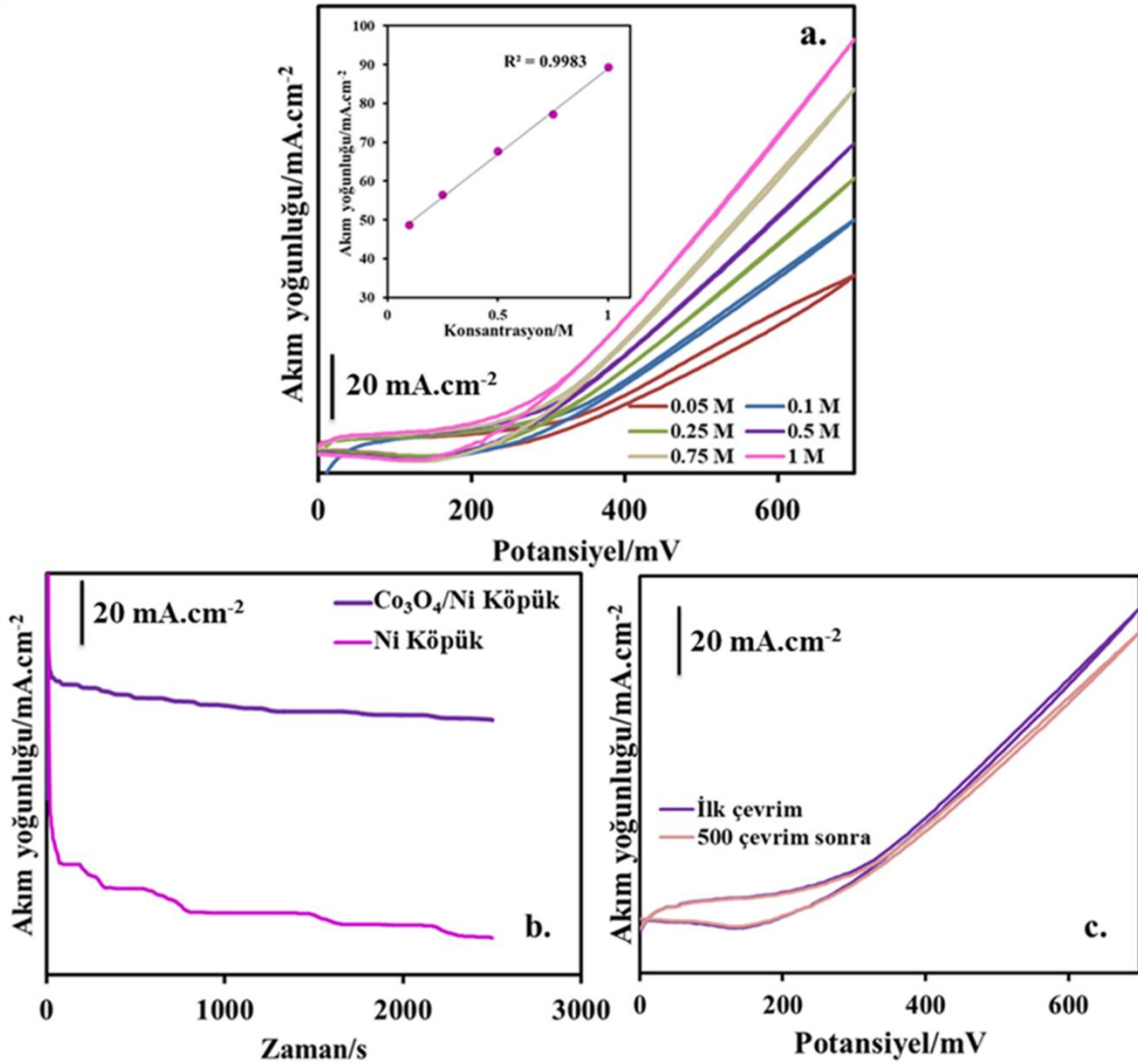
Şekil 3. Ni köpük ve Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük elektrotlara ait a) 1 M KOH ve b) 1 M KOH + 0.5 M metanol içeren çözeltilerde alınan dönüşümlü voltamogramlar. Tarama hızı: 10 mVs<sup>-1</sup>

Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük elektrodu üzerindeki metanol oksidasyon mekanizması basitçe aşağıdaki gibidir (Rajeshkhanna et al., 2017);



CV'den elde edilen başlangıç potansiyeli ve anodik akım yoğunluğu metanol oksidasyonunu değerlendirmek için önemli iki parametredir. Akım yoğunluğu, katalizörün metanol oksidasyonuna yönelik elektrokimyasal aktivitesini sergiler. Daha fazla spesifik yüzey alanı ve daha fazla aktif sahaya sahip katalizörler daha yüksek akım yoğunluğu gösterir. Başlangıç potansiyeli ise, katalizör yüzeyindeki metanol oksidasyon kinetiği ile ilgilidir. Daha düşük başlangıç potansiyeli, reaksiyon kinetiğinin daha hızlı olduğunu belirtir (Kamyabi et al., 2019). Şekil 3.b'de görüldüğü gibi, Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük elektrot için metanol oksidasyonunun başlama potansiyeli yaklaşık 270 mV olup, modifiye edilmemiş elektrotta yaklaşık 140 mV daha pozitifdir. Bu durum metanol oksidasyonunun Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük elektrotta daha az enerji ile gerçekleştiğini ifade etmektedir. Ayrıca, Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> modifiye edilmesiyle, 600 mV'da elde edilen akım yoğunluğunda yaklaşık 10 katlık bir artış sağlanmıştır. Bu durum, Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>'in yüksek elektronik iletkenliği ve çoklu bir değerlik oksit olması nedeniyle metanol oksidasyonu için daha fazla aktif sahaya sahip olmasıyla ilişkilendirilebilir. Ayrıca herhangi bir bağlayıcı kullanmadan direkt altlık üzerinde film büyütüldüğü için metanol oksidasyonu tüm elektrot yüzeyinde gerçekleşir, böylece elektroaktif türlerin kullanımını en üst düzeye çıkarmaktadır. Bu bağlamda, düşük başlangıç potansiyeli ve yüksek akım yoğunluğuna sahip Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük elektrodun metanol yakıt hücreleri için umut verici bir elektrokatalizör olduğu söylenebilir.

Metanol yakıt hücrelerinde düşük metanol konsantrasyonları için yüksek akım değeri elde edebilmek oldukça önemlidir. Bu amaçla metanol konsantrasyonuna karşı kaydedilen pik akım yoğunluğundaki değişim Şekil 4.a'da verilmiştir. Artan metanol konsantrasyonuna bağlı olarak pik akımlarında doğrusal bir artış gözlenmiştir.



Şekil 4. a) Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük elektrot için farklı metanol konsantrasyonlarında alınan CV'ler (iç grafik; metanol konsantrasyonu-pik akım yoğunluğu grafiği) b) 1 M KOH + 0.5 M metanol çözeltisi içinde 2500 s için elde edilen kronoamperomogramlar c) 1 M KOH + 0.5 M metanol çözeltisi içinde 50 mVs<sup>-1</sup> tarama hızında alınan 500 döngü için Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük elektrodunun CV eğrileri

Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ile modifiye edilmiş Ni köpük elektrodunun metanol oksidasyon reaksiyonuna karşı elektrokatalitik stabilitesi, 1 M KOH + 0.5 M metanol elektrolitinde ardışık 2500 s için 600 mV'da kronoamperometri tekniği ile test edilmiştir. Şekil 4.b' de görüldüğü gibi, metanol oksidasyon işlemi sırasında Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük elektrodunda birkaç saniyelik hızlı bir polarizasyon akımı düşüşü tespit edilmiştir. Akımdaki bu düşüş ara türlerin elektrot yüzeyinde birikerek zehirlenmeye yol açmasına bağlanabilir. Bununla birlikte, test süresinin sonuna kadar akım yoğunluğu neredeyse korunmuş ve metanol oksidasyonu için % 86'lık bir verim elde edilmiştir. Ek olarak, modifiye edilmemiş Ni köpük elektrodun benzer kronoamperometri testi gerçekleştirildikten sonra % 63'lük verime sahip olduğu belirlenmiştir. Dahası, Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük elektrodun akım yoğunluğu boş Ni köpük elektrodan daha fazladır, bu da modifiye edilmiş elektrodun yüksek elektro-katalitik metanol oksidasyon aktivitesi sergilediğini gösterir. Elde edilen bu sonuçlar, CV sonuçlarıyla iyi bir uyum içindedir. Hazırlanan elektrodun uzun vadeli stabilitesi ayrıca CV tekniği kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.c, 50 mVs<sup>-1</sup> tarama hızında alınan 500 döngüden sonra mevcut akım yoğunluğunun % 90 oranında korunduğunu göstermektedir. Performanstaki düşüş, reaksiyon sırasında metanol miktarının azalmasına ve elektrot yüzeyinde bir miktar yan ürün oluşumuna bağlanabilir.

## SONUÇ

Özetle, Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ile modifiye edilmiş Ni köpük hidrotermal sentez yoluyla başarılı bir şekilde sentezlenmiş, kompozit malzemenin yapısal ve morfolojik özellikleri farklı teknikler kullanılarak karakterize edilmiştir. Sentezlenen Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük elektrot metanolün elektro-oksidasyon reaksiyonunda kullanılmış ve modifiye edilmemiş Ni köpük elektrot ile karşılaştırıldığında başlangıç potansiyeli ve pik akım yoğunluğu olarak daha üstün elektrokatalitik etki sergilemiştir. Ayrıca, Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük elektrot 600 mV'da 67 mA cm<sup>-2</sup> akım yoğunluğuna sahip olup, 500 döngüden sonra akım yoğunluğunu % 90 oranında korumaktadır. Bu üstün katalitik performans, Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük elektrodun yüzeyini homojen bir şekilde kaplayan iğne benzeri nanotellerin çok sayıda elektroaktif alan sunarak metanolün elektro-oksidasyon performansını iyileştirmesine atfedilebilir. Elde edilen yüksek elektrokatalitik aktivite ve uzun vadeli stabilite, Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ni köpük elektrodun yüksek performanslı DMFC'ler için umut verici bir alternatif katalizör olduğunu açıkça göstermektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasında laboratuvar alt yapısının kullanılmasına izin veren Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığı'na ve sentezlenen elektrotların karakterizasyonlarının gerçekleştirildiği Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Araştırma Merkezi'ne (DAYTAM) teşekkür ederim.

## Çıkar Çatışması

Makalenin tek yazarlı olması nedeniyle yazarlar arasında çıkar çatışması söz konusu değildir.

## Yazar Katkısı

Makale tek yazar tarafından üretilmiştir. Tek yazarın katkı oranı %100'dür.

## KAYNAKLAR

- Dincer I, 2000. Renewable energy and sustainable development: A crucial review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 4: 157-175.
- Du X, Huang C, Zhang X., 2019. Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> arrays with tailored morphology as robust water oxidation and urea splitting catalyst. *Journal of Alloys and Compounds*, 809: 151821.
- Gong L, Yang Z, Li K, Xing W, Liu C, Ge J, 2018. Recent development of methanol electrooxidation catalysts for direct methanol fuel cell. *Journal of Energy Chemistry*, 27: 1618-1628.
- Hassen D, El-Safty SA, Tsuchiya K, Chatterjee A, Elmarakbi A, Shenashen MA, Sakai M, 2016. Longitudinal Hierarchy Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Mesocrystals with High-dense Exposure Facets and Anisotropic Interfaces for Direct-Ethanol Fuel Cells. *Scientific Reports*, 6:24330.
- Hong WT, Risch M, Stoerzinger KA, Grimaud A, Suntivich J, Shao-Horn Y, 2015. Toward the rational design of non-precious transition metal oxides for oxygen electrocatalysis. *Energy and Environmental Science*, 8: 1404-1427.
- Hoseini SJ, Bahrami M, Samadi Fard Z, Fatemeh Hashemi Fard S, Roushani, M, Agahi BH, Sarmoor SS, 2018. Designing of some platinum or palladium-based nanoalloys as effective electrocatalysts for methanol oxidation reaction. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43: 15095-15111.
- Jin L, Li X, Ming H, Wang H, Jia Z, Fu Y, Zheng J, 2014. Hydrothermal synthesis of Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> with different morphologies towards efficient Li-ion storage. *RSC Advances*, 4: 6083-6089.
- Kamarudin SK, Achmad F, Daud WRW, 2009. Overview on the application of direct methanol fuel cell (DMFC) for portable electronic devices. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34: 6902-6916.
- Kamyabi M, Martínez-Hincapié R, Feliu J, Herrero E, 2019. Effects of the Interfacial Structure on the Methanol Oxidation on Platinum Single Crystal Electrodes. *Surfaces*, 2(1): 177-192.
- Li Y, Li FM, Meng XY, Li, SN, Zeng JH, Chen Y, 2018. Ultrathin Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanomeshes for the Oxygen Evolution Reaction. *ACS Catalysis*, 8(3): 1913-1920.

- Liu Y, Teng H, Hou H, You T, 2009. Nonenzymatic glucose sensor based on renewable electrospun Ni nanoparticle-loaded carbon nanofiber paste electrode. *Biosens. Bioelectron.*, 24:3329-3334.
- Lv CQ, Liu C, Wang GC, 2014. A DFT study of methanol oxidation on Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. *Catalysis Communications*, 45:83-90.
- Palmas S, Ferrara F, Vacca A, Mascia M, Polcaro AM, 2007. Behavior of cobalt oxide electrodes during oxidative processes in alkaline medium. *Electrochimica Acta*, 53: 400-426.
- Qiao Y, Li, CM, 2011. Nanostructured catalysts in fuel cells. *Journal of Materials Chemistry*, 21: 4027-4036.
- Rajeshkhanna G, Umeshbabu E, Ranga Rao G, 2017. Charge storage, electrocatalytic and sensing activities of nest-like nanostructured Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. *Journal of Colloid and Interface Science*, 487:20-30.
- Ramli ZAC, Kamarudin SK, 2018. Platinum-Based Catalysts on Various Carbon Supports and Conducting Polymers for Direct Methanol Fuel Cell Applications: a Review. *Nanoscale Research Letters*, 13: 410.
- Salavati-Niasari M, Mir N, Davar F, 2009. Synthesis and characterization of Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanorods by thermal decomposition of cobalt oxalate. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 70: 847-852.
- Shinde VR, Mahadik SB, Gujar TP, Lokhande CD, 2006. Supercapacitive cobalt oxide (Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) thin films by spray pyrolysis. *Applied Surface Science*, 252: 7487-7492.
- Uddin MK, Baig U, 2019. Synthesis of Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and their performance towards methyl orange dye removal: Characterisation, adsorption and response surface methodology. *Journal of Cleaner Production*, 211: 1141-1153.
- Urhan BK, Demir Ü, 2019. Electrochemical fabrication of Ni or Ni(OH)<sub>2</sub>@Ni nanoparticle-decorated reduced graphene oxide for supercapacitor applications. *Electrochimica Acta*, 302: 109-118.
- Vennela AB, Mangalaraj D, Muthukumarasamy N, Agilan S, Hemalatha KV, 2019. Structural and optical properties of Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles prepared by sol-gel technique for photocatalytic application. *International Journal of Electrochemical Science*, 14: 3535 – 3552.
- Waszczuk P, Kim HS, Tong YY, Wieckowski A, Solla-Gullón J, Montiel V, Aldaz A, 2001. Methanol electrooxidation on platinum/ruthenium nanoparticle catalysts. *Journal of Catalysis*, Volume 203, 1-6.
- Yetim NK, 2021. Hydrothermal synthesis of Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> with different morphology: Investigation of magnetic and electrochemical properties. *Journal of Molecular Structure*, 1226: 129414.
- Yuan Z, Zhao J, Meng F, Qin W, Chen Y, Yang M, Zhao Y, 2019. Sandwich-like composites of double-layer Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and reduced graphene oxide and their sensing properties to volatile organic compounds. *Journal of Alloys and Compounds*, 793: 24-30.
- Yuda A, Ashok A, Kumar A, 2020. A comprehensive and critical review on recent progress in anode catalyst for methanol oxidation reaction. *Catalysis Reviews - Science and Engineering*, <https://doi.org/10.1080/01614940.2020.1802811>.
- Zhang X, Zhong H, Xu L, Wang S, Chi H, Pan Q, Zhang G, 2018. Fabrication of Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PEI-GO composites for gas-sensing applications at room temperature. *Materials Research Bulletin*, 102: 108-115.



**Atf için:** Çalimli, MH, 2021. Su Ortamından Ultrasonik Koşullar Altında GO Malzemesine Yüklenen Bimetalik Pt / Co ile Maxilon Blue 5G Kaldırma. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1362-1373.

**To Cite:** Çalimli, MH, 2021. Maxilon Blue 5G Removal by Bimetallic Pt/Co Loaded on GO Material under Ultrasonic Conditions from Aquatic Medium. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1362-1373.

## **Maxilon Blue 5G Removal by Bimetallic Pt/Co Loaded on GO Material under Ultrasonic Conditions from Aquatic Medium**

Mehmet Harbi ÇALIMLI<sup>1</sup>\*

**ABSTRACT:** Bimetallic Pt/Co loaded on GO adsorbance was produced following a series of simple hydrothermal methods. The produced bimetallic Pt/Co loaded GO material was used in the maxilon blue 5G removal (MB 5G) and investigated its adsorption studies. The adsorption studies on removal of MB 5G using the bimetallic Pt/Co loaded on GO material were carried out performing different experimental conditions like ultrasonic irradiation time (1-120 min), temperature (24-55 °C), initial MB 5G concentration ( $0.7 \cdot 10^{-5}$ -  $1.5 \cdot 10^{-5}$  M), and pH (4- 10) to detect optimum removal conditions. The reaction kinetics were investigated by pairing the so-called first-order pseudo-second-order and intraparticle diffusion in the adsorption process study. In addition, enthalpy, entropy and Gibbs free energy, and thermodynamic activation functions were investigated in order to understand the adsorption mechanism. These data showed that the bimetallic Pt/Co loaded on GO material can be used as an effective nano adsorbent for the removal of MB 5G as an organic pollutant in an aquatic medium.

**Keywords:** Bimetallic, adsorption, removal, kinetic, Maxilon Blue 5G

### **Su Ortamından Ultrasonik Koşullar Altında GO Malzemesine Yüklenen Bimetalik Pt / Co ile Maxilon Blue 5G Kaldırma**

**ÖZET:** Bimetalik Pt/Co'nin GO üzerine yüklenmiş adsorbent bir seri hidrotermal metod ile sentezlendi. Elde edilen adsorbance maxilon blue 5G (MB 5G)'inin giderilmesinde kullanıldı ve adsorbsiyon çalışmaları incelendi. MB 5G'inin Pt/Co yüklü GO material ile yapılan adsorbsiyon çalışmaları farklı deneysel durumlarda olan ultrasonik ışımaya zamanı (1-120 min), sıcaklık (24-55 °C), başlangıç MB 5G konstrasyonu ( $0.7 \cdot 10^{-5}$ -  $1.5 \cdot 10^{-5}$  M), ve pH (4- 10) gibi deneysel koşullar altında yapıldı. Kinetik reaksiyonlar birinci dereceden, ikinci dereceden ve intrapartikül düfüzyonu metodları ile incelendi. Buna ilaveten, entalpi, entropi, Gibbs serbest enerjisi ve termodinamik aktivasyon fonksiyoları aktivasyon mekanizmasını tespit etmek için incelendi. Elde edilen sonuçlar ile bimetalik Pt/Co'nin GO üzerine yüklenmiş adsorbent MB 5G organik boyasının giderilmesinde etkin bir şekilde kullanılabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Bimetalik, adsorpsiyon, uzaklaştırma, kinetik, Maxilon Blue 5G

<sup>1</sup> Mehmet Harbi ÇALIMLI ([Orcid ID: 0000-0001-9756-191X](https://orcid.org/0000-0001-9756-191X)), İğdır University Tuzluca Vocational School, İğdır, Türkiye

\*Sorumlu Yazar / Corresponding author: Mehmet Harbi ÇALIMLI, mharbi.calimli@igdir.edu.tr

## INTRODUCTION

Dyestuffs are used in different areas such as textile, leather, paper, and plastic and are given to the environment as wastewater (Chiou et al., 2004). It is not easy to remove dye-containing wastewater from the environment. Because these dyes gain a stable structure as a result of interaction with light, heat and oxidizing agents and become resistant (Crini, 2006). However, waste dyes contain many toxic materials in their structure (Yener et al., 2006). When the textile industry is compared for both volumetric discharge and other different reasons, it is thought that the waste water is very polluted (Singh et al., 2003). Different technological application processes are used to deal with such problems (Banat et al., 1996; Choy et al., 1999). Chemical oxidation, membrane filtration, biological degradation, separation and adsorption techniques are the most preferred treatment process systems for dye removal (Yenisoy-Karakaş et al., 2004). In this study, the adsorption technique was preferred under ultrasonic process conditions for dye removal. This processing method was effective in its use because it is easy to apply, very fast, and cost-effective (Zhang et al., 2013). Adsorption process technique, efficiency changes depending on the physical and chemical properties of the adsorbent (Yagub et al., 2014; Yenisoy-Karakaş et al., 2004). So far, different composite materials like krill clay, polymer based composites, diatomite, graphene oxide, chitosan and green clay (M. H. Çalımlı, 2020; Mehmet Harbi Çalımlı et al., 2018; Demirbaş et al., 2019, 2016; Nas et al., 2017; Şen et al., 2018) have been applied to remove organic base pollutants like dyes from aquatic environments. In recent studies, nanoparticles produced using polymer, carbon, different metals as new sorbents are highly preferred (Mittal et al., 2014; R. Wu et al., 2014). Since discovered, graphene oxide (GO) was applied in many different areas like high-quality electronics, magnetic, thermal and optical (Batra et al., 2015; Fonseca et al., 2015; Z. Liu et al., 2008). Because, it has extraordinary properties such as (Novoselov et al., 2004; Roy-Mayhew et al., 2014; W. Zhao et al., 2015). In addition, graphene material has a strong interest in many areas such as battery and sensor, electrochemistry, supercapacitor technology and adsorption process applications (Feng et al., 2015; Y. Liu et al., 2011; Song et al., 2016; Teixeira et al., 2016). Graphene material has been widely produced as a catalyst support in works involving metal alloys such as Co, Ni, Cr and Fe (Haldorai et al., 2014; Hernández-Fernández et al., 2007; Koffi et al., 2005; Lai et al., 2010; S. H. Liu et al., 2011; Shen et al., 2010; J. Zhao et al., 2011). Herein, we synthesized bimetallic Pt/Co loaded on GO material to remove MB 5G dye. The data obtained showed that bimetallic Pt/Co loaded on GO material can be effective in MB 5G removal under ultrasonic conditions from the aqueous medium. As stated in the literature, MB 5G is mixed with natural resources as a result of use in industrial activities. This paint is highly damaging to the aquatic environment and aquatic life. For the first time in our study, Bimetallic Pt/Co Loaded on GO material was used to remove MB 5G dye. With this study, the optimum conditions were determined and experimental findings were made about what conditions should be created for the removal of MB 5G dye.

## MATERIAL AND METHODS

### Chemical material

PtCl<sub>4</sub> (99%), CoCl<sub>2</sub> > 99%, MG 5G dyestuff, ethanol, superhydride and graphite chemicals were obtained from Sigma Aldrich. All chemicals are analytical grade and were used in runs without any purification process. All glassware used in the study was cleaned using distilled water and ethanol.

### Preparation and characterization of bimetallic Pt/Co loaded GO material

For bimetallic Pt/Co loaded GO material synthesis, CoCl<sub>2</sub> and PtCl<sub>4</sub> are used as precursors, and 0.25 mmol of each taken and solved in 5 ml deionized water. This mixture was mixed in an ultrasonic

bath for 10 minutes. Afterward, the required GO has added the resulting mixture. The mixture was stirred for 2 h. Then, ethanol and super hydride were added to the resulting slurry. Upon being the visible brownish color of the solution, (that shows reduction completion of metal ions to metallic state), the formed solid sample was filtered. The solid sample was washed with copious amounts of distilled water (3x10 mL), rinsed using ethanol. Afterward, this solid sample was dried in an oven at 80 ° C.

### Adsorption experimental procedure

Adsorption experiments carried out include various parameters. These are a total of 6 parameters: different temperature, pH, adsorbent concentration, MB 5G concentration, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> amount and ultrasonic power effect. A typical experimental procedure performed is as follows. Sorption kinetics studies were carried out in a 250 mL glass Erlenmeyer in an ultrasonic bath. The deionized water was used in the preparation of the dye solution samples used. The mechanism used in experimental adsorption studies was arranged according to a line on the ultrasonic device. It was subjected to the interaction between the dye and the magnetic nanoparticle for about 15 minutes for the balance of adsorption-desorption. To undergo the adsorption experiments, çömmen kinetic parameters including ultrasonic power of 400 (W) US force, 1.0x10<sup>-5</sup>M, 303 K, pH 9, and adsorbent dose (0.0020 g). It was taken at certain time intervals during the experimental work to analyze the 3ml sample. Samples were centrifuged. Absorbance peak changes in the range of 200-900 nm were tested on the sample with a UV-Vis spectrophotometer (Perkin Elmer Lambda 750). The dye removal efficiency was determined by using the data and using the equation given below(M. Alkan et al., 2008).

$$q_t=(C_0-C_t).V/m \quad (1)$$

Where; The terms C<sub>0</sub> and C<sub>t</sub> (mol.L<sup>-1</sup>) describe the liquid phase concentrations at initial and any time, respectively; q<sub>t</sub> (mmol<sup>-1</sup>) describes the amount of dyestuff adsorbed per unit mass of the supporting nanoparticle at a given time. The m indicates the mass of the supporting nanoparticles in solution (g).

## RESULTS AND DISCUSSION

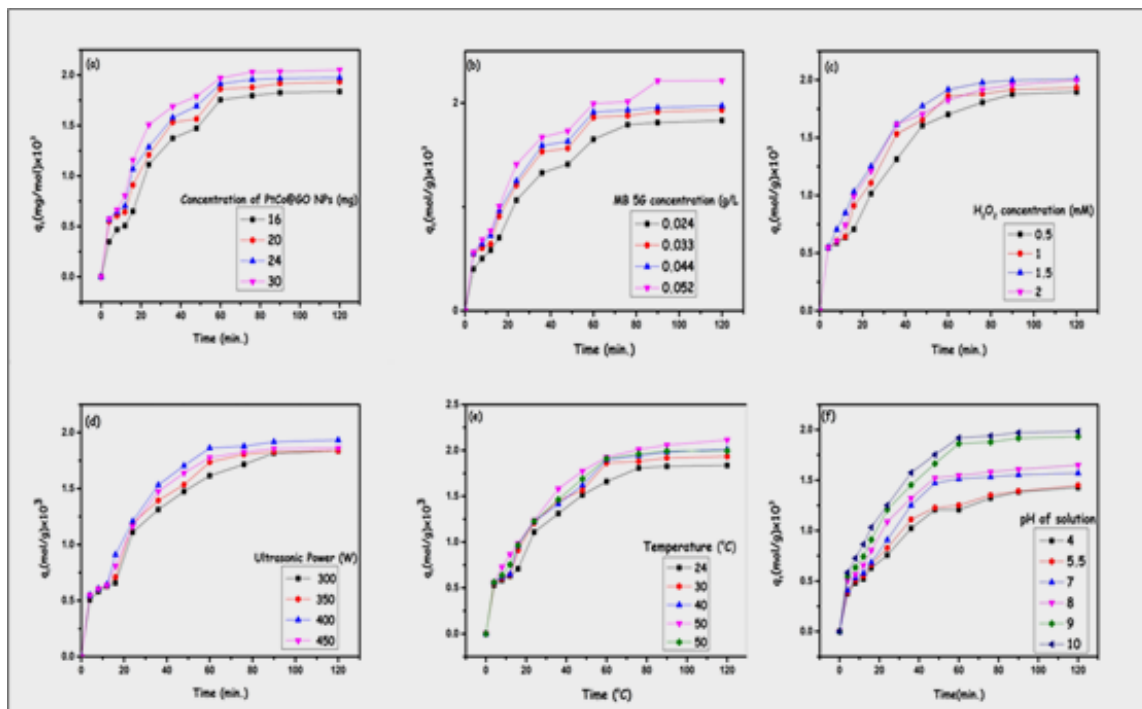
### Adsorption effect on removal of MB 5G in ultrasonic process conditions

The adsorption interaction between MB 5G and bimetallic Pt/Co loaded GO material was tested using the bimetallic Pt/Co loaded GO adsorbent, ultrasonic wavelength, dye concentrations, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration, temperatures and pH parameters. The Analysis datas reflected in Figure 1.

### The examined of sorption effect of MB 5G concentration and bimetallic Pt/Co loaded GO material concentration

The adsorbent concentration parameter test is one of the most important analyzes in dye removal in an aqueous solution environment. In the adsorption process study, it was determined that the maximum dye removal activity was reached by using 30 mg bimetallic Pt/Co loaded GO absorbance (approximately 84.6% yield). The analysis data in Figure 1 (a) are reflected. It can express this situation as a result of the increase in the number of active areas due to the increase in surface area(Çiçek et al., 2007). It was determined that the amount of adsorbent used above this value had a negative effect on the amount of dyestuff. This can be expressed as a result of the active sites on the adsorbent surface overlapping each other during the process. Also, the increased amount of adsorbent can have a negative effect on OH radicals such as scavenging function that may be caused the reduction of removal dye (Sen et al., 2018). One of the other important parameters in adsorption studies is the amount of dye concentration. In this study, the amount of MB 5G Concentration was tested in the range of 24-52 mg. In the adsorption mechanisms, it was determined that the dye concentration contributed significantly to

the mass transfer resistance between liquid and solid (Savk et al., 2019). In some paper, it was stated that some intermediate molecules formed after the adsorption of MB 5G with OH radicals cause a negative environment of resistance in dye efficacy (Dindarsafa et al., 2017).



**Figure 1.** Experimental results of MB 5G removal using bimetallic Pt/Co loaded GO materials at different experimental conditions of (a) Bimetallic Pt/Co loaded GO materials concentrations, (b) MB 5G con., (c) Ultrasonic wave., (d)  $H_2O_2$  conc., (e) Temp., (f) pH.

### The sorption effects of temperatures, and pH on the removal of MB 5G

To detect the effects of temperature, five experiments in the range of 24-55 °C given in Figure 1e. It was determined that the amount of the adsorbed dye increased in parallel with the increasing temperature and the optimum temperature value was determined as 50 °C. The temperature increase of the process medium to the environment leads to increased movement of dye molecules. In this case, the dyestuff used in the study can be explained by providing sufficient energy for the active areas on the surface to interact (Aksu et al., 2000). The increase in the temperature of the environment can cause the pore size of the adsorbent particle to change. This can create a positive synergistic effect in dye removal due to the increase in diffusion rate between the adsorbent and the dye (Khataee et al., 2016). The highest adsorption performance ( $q_m$ ) was detected to be approximately  $1150.7 \text{ mg g}^{-1}$  at 50 °C. In addition, the adsorption performance of the as-synthesised bimetallic Pt/Co loaded GO material used in this study was compared with other studies in Table 1. As seen the adsorption performance is good when compared the other materials tested in the different dyestuffs. Another parameters is pH, and the pH factor is very important in dye removal in adsorption process mechanisms. pH value caused the changing charges of adsorbents and the surface charges effect the effectiveness of adsorption performance. The experiments results conducted at different pH values are given Figure 1f. In adsorption studies, the pH value of the iso electric point of the adsorbent material has an extremely important effect. In addition, the fact that the MB 5G dye is a cationic dye creates an important effect. A percent dye removal of 64.3% was obtained at pH values of 4. This is result of a reflection resulting from competition between proton ions

for MB 5G and adsorption sites (Khataee et al., 2015). However, increasing the pH of the medium resulted in a high dye removal efficiency of 86.2%. It may be explained by the increased interaction of the binding site and its functional groups as a result of enhancing surface area of adsorbent (Mahir Alkan et al., 2005; V. Yönten et al., 2020; Vahap Yönten et al., 2020). In addition, it has made a positive contribution to the increase of OH radical functions in the environment and to increase the removal of dyestuff. This associated with the increasing the numbers of OH radicals originated from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nasuha et al., 2010). As a result, it was observed that the pH factor was extremely effective in MB 5G removal (Figure 5f).

**Table1.** Comparison adsorption performans of bimetallic Pt/Co loaded on GO materials to some adsorbents tested on the removal different dystuffs.

| Adsorbents  | Adsorption performace, mg/g | Reference                  |
|---|-----------------------------|----------------------------|
| Activated carbon nanotubes                                | 399                         | (Ma et al., 2012)          |
| Nano-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>                       | 93.08                       | (Iram et al., 2010)        |
| Chitosan–graphite oxide                                   | 64.935                      | (Zolgharnein et al., 2015) |
| Grafted polyacrylamide on SiO <sub>2</sub> nanocomposites | 378                         | (Qin et al., 2015)         |
| Turkish Green Clay  | 195.74                      | (W. Zhao et al., 2015)     |
| Graphene  | 153.85                      | (T. Liu et al., 2012)      |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /porous graphene           | 460                         | (Ghorai et al., 2014)      |
| Pt-Co@GO  | 1150.7                      | This study                 |

### The sorption effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cons, and ultrasonic iridations on MB 5G removal

In the ultrasonic process environment, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molecule is an effective factor in dye removal. In ultrasonic systems, it has been observed that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration has a positive effect on dye removal in active OH radical increase (Vadivelan et al., 2005). The results showed that the MB 5G removal efficiency was observed to be most efficient in the presence of a 1.5 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration (Figure 1c). This can be expressed as a result of the increase in the release of OH by interacting with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molecule, the propagating waves in processes operating with ultrasonic systems. When the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration exceeded this value, a noticeable reduction in dye removal efficiency was obtained. As understood in equations (2) and (3), the being of excessive amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the reaction medium lead to undesirable consequences such as the scavenging effect of OH radicals (Bagal et al., 2013).

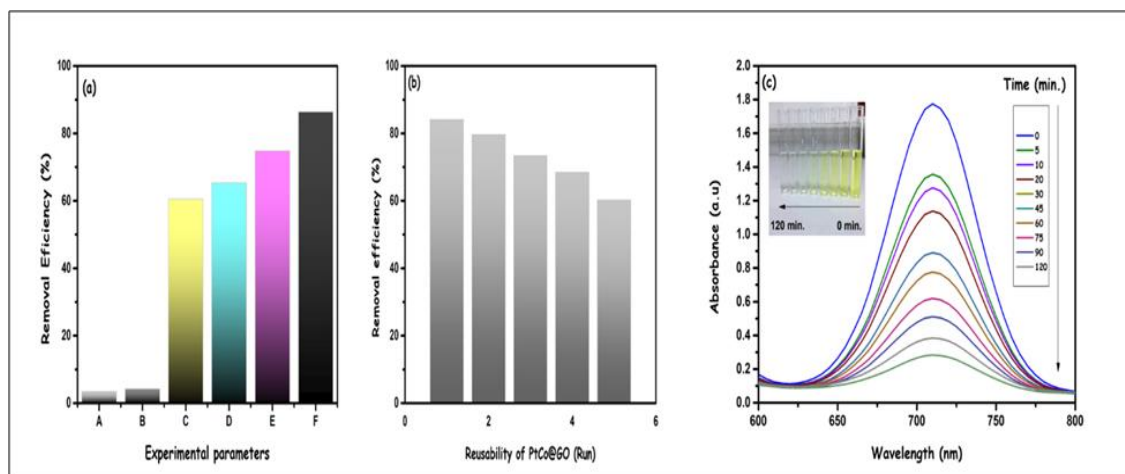


Ultrasonic power effect is another important factor in dye removal systems. (Figure 5d). The increase of ultrasound power effect creates a synergistic effect if dissolution turbans in the adsorption medium. This synergistic effect is positively reflected on the move rate of both reactive radical elements and the dye in the reaction environment(Bae et al., 2013; Q. Wu et al., 2016).

### The comparison of some parameters investigated and their re-usability efficiency

Experimental studies to compare MB 5G removal at different parameter conditions are given in Figure 6a. As indicated in Figure 2a (A), the effect of MB 5G dye removal on ultrasonic and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectively, was tested. As a result of the analysis, the efficiency of dye removal was obtained at approximately 3.25% and 5.64%. In this case, the conversion coefficient of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molecules to free OH radicals during the Adsorption process is a result of the reflection (as in equation 6) of the death of the OH radical process. Another reason is that US / Pt/Co loaded on GO / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> further increases the surface area by increasing interaction with ultrasonic waves in the presence of process conditions. thus, it

provides a positive synergistic effect to the removal of dyestuffs (Xu et al., 2012). The stability of the adsorbent used in dye removal using the adsorption method is an important factor in testing the reusability effect (Huang et al., 2014). Five consecutive sample studies were performed on the reusability of magnetic Pt/Co loaded on GO adsorbents in the presence of constant conditions (Figure 2b). As shown in Figure 2b, the nano-adsorbent activity showed that it maintained its activity at approximately 60.2% after five consecutive experiments. These data showed that Pt/Co loaded on GO adsorbent can be used as an important promoter in dye removal. Figure 2c shows the variation of the first and last absorption peaks due to the interaction between the Pt/Co loaded on GO and MB 5G in 120 min.



**Figure 2.** (a) The removal MB 5G results tested at different conditions using bimetallic Pt/Co loaded on GO adsorbents; Ultrasonic irradiation (A), cons of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B), cons. of bimetallic Pt/Co loaded on GO (C), Adsorbent /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (D), adsorbent /Ultrasonic irradiation (E), Pt-Co@GO / Ultrasonic irradiation /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (F). (b) recycle of adsorbent in the MB 5G solution. (c) Absorbance: MB 5G at 300-500 nm.

### Adsorption kinetic parameters

Kinetic data are valuable to interpret the adsorption method for determination removal pollutants in water sources. By determinations kinetic data, explaining of the mechanism of adsorption at different kinetic studies begin easier (Huang et al., 2014). In order to understand the reaction state of MB 5G dye removal in the wastewater environment, the so-called first-order kinetic model and the so-called second-order kinetic model and intra-particle diffusion model analyzes were investigated. In the calculations, the equations (7-11) given below were used to interpret the mechanism of adsorption MB 5G tested in this study (Khataee et al., 2017).

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (4)$$

$$\frac{t}{q_e} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad (5)$$

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_2 q_e} \quad (6)$$

$$h = k_2 q_e \quad (7)$$

$$q_t = k_{int} t_{1/2} + C \quad (8)$$

Where;  $t$  and  $k_i$  explain the time and adsorption rate constant, respectively. The  $q_e$  and  $q_t$  quantities describe the amount of the dye (mol.g<sup>-1</sup>) in the initial and final state, respectively. The data obtained from the kinetic analysis are reflected in Table 1. The 2, 4, and 5 kinetic inequalities are preferred to

investigate whether the adsorption mechanism is either first-order or second-order, respectively (Hassani et al., 2015). Equations 6 and 11 are preferred to test the half-life of the adsorption process and the initial rate of intra-particle diffusion, respectively (Chen et al., 2014). The expression  $k_{int}$  ( $\text{mg} (\text{g min}^{-1/2})^{-1}$ ) in Table 3 explains the intra-particle diffusion rate constant.

**Table 2.** Kinetic data of magnetic based bimetallic Pt/Co loaded on GO of the MB 5G adsorption.

| T/K | Pt-Co@GO dosage (mg.L <sup>-1</sup> ) | PH  | US power (W) | MB 5G mg.L <sup>-1</sup> | [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] (mM) | Pseudo second-order R <sup>2</sup> | q <sub>e</sub> (cal.) (mg.g <sup>-1</sup> ) 10 <sup>3</sup> | q <sub>e</sub> (exp.) (mg.g <sup>-1</sup> ).10 <sup>3</sup> | k <sub>2</sub> (g.mg min <sup>-1</sup> ) 10 <sup>11</sup> | R <sup>2</sup> | h (mol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> ) | t <sub>1/2</sub> (min) |
|-----|---------------------------------------|-----|--------------|--------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---|---|---|----------------|--|------------------------|
| 297 | 20                                    | 9   | 400          | 33                       | 1                                     | 0.59                               | 2.29  | 2.28  | 1.52  | 0.99           | 3.46                                       | 0.288                  |
| 303 | 20                                    | 9   | 400          | 33                       | 1                                     | 0.78                               | 2.43  | 2.44  | 1.62  | 0.99           | 3.95                                       | 0.253                  |
| 313 | 20                                    | 9   | 400          | 33                       | 1                                     | 0.89                               | 2.39  | 2.38  | 1.83  | 0.99           | 3.87                                       | 0.257                  |
| 323 | 20                                    | 9   | 400          | 33                       | 1                                     | 0.70                               | 2.65  | 2.65  | 1.5   | 0.99           | 3.98                                       | 0.251                  |
| 333 | 20                                    | 9   | 400          | 33                       | 1                                     | 0.76                               | 2.37  | 2.37  | 2.23  | 0.99           | 5.28                                       | 0.189                  |
| 303 | 20                                    | 4   | 400          | 33                       | 1                                     | 0.74                               | 1.71  | 1.72  | 2.51  | 0.99           | 4.32                                       | 0.231                  |
| 303 | 20                                    | 5.5 | 400          | 33                       | 1                                     | 0.81                               | 1.71  | 1.72  | 2.72  | 0.99           | 4.67                                       | 0.214                  |
| 303 | 20                                    | 7   | 400          | 33                       | 1                                     | 0.85                               | 1.82  | 1.82  | 3.51  | 0.99           | 6.38                                       | 0.156                  |
| 303 | 20                                    | 8   | 400          | 33                       | 1                                     | 0.89                               | 2.03  | 2.03  | 2.11  | 0.99           | 4.28                                       | 0.233                  |
| 303 | 20                                    | 10  | 400          | 33                       | 1                                     | 0.90                               | 2.37  | 2.38  | 2.32  | 0.99           | 5.52                                       | 0.181                  |
| 303 | 20                                    | 9   | 400          | 24                       | 1                                     | 0.82                               | 2.45  | 2.45  | 1.20  | 0.99           | 2.94                                       | 0.340                  |
| 303 | 20                                    | 9   | 400          | 44                       | 1                                     | 0.73                               | 2.23  | 2.24  | 3.36  | 0.99           | 7.52                                       | 0.132                  |
| 303 | 20                                    | 9   | 400          | 52                       | 1                                     | 0.71                               | 2.96  | 2.95  | 1.13  | 0.99           | 3.34                                       | 0.299                  |
| 303 | 16                                    | 9   | 400          | 33                       | 1                                     | 0.86                               | 2.3   | 2.29  | 1.84  | 0.99           | 4.21                                       | 0.237                  |
| 303 | 24                                    | 9   | 400          | 33                       | 1                                     | 0.75                               | 2.44  | 2.45  | 1.82  | 0.99           | 4.45                                       | 0.224                  |
| 303 | 30                                    | 9   | 400          | 33                       | 1                                     | 0.84                               | 2.36  | 2.36  | 2.85  | 0.99           | 6.72                                       | 0.148                  |
| 303 | 20                                    | 9   | 300          | 33                       | 1                                     | 0.91                               | 2.28  | 2.29  | 1.65  | 0.99           | 3.77                                       | 0.265                  |
| 303 | 20                                    | 9   | 350          | 33                       | 1                                     | 0.74                               | 2.27  | 2.27  | 1.88  | 0.99           | 4.26                                       | 0.234                  |
| 303 | 20                                    | 9   | 450          | 33                       | 1                                     | 0.82                               | 2.3   | 2.29  | 1.89  | 0.99           | 4.32                                       | 0.231                  |
| 303 | 20                                    | 9   | 400          | 33                       | 0,5                                   | 0.75                               | 2.38  | 2.37  | 1.72  | 0.99           | 4.07                                       | 0.245                  |
| 303 | 20                                    | 9   | 400          | 33                       | 1,5                                   | 0.86                               | 2.43  | 2.44  | 1.93  | 0.99           | 4.70                                       | 0.212                  |
| 303 | 20                                    | 9   | 400          | 33                       | 2                                     | 0.91                               | 2.40  | 2.41  | 1.84  | 0.99           | 4.43                                       | 0.225                  |

**Table 3.** The kinetic results for mechanism of MB 5G adsorption using bimetallic Pt/Co loaded on GO adsorbents from aquatic solution.

| T/K | Pt-Co@GO mg.L <sup>-1</sup> | pH  | Mass transfer |                                       |                          | Intraparticle diffusion                                   |                             |   |                             |
|-----|-----------------------------|-----|---------------|---------------------------------------|--------------------------|---|-----------------------------|---|-----------------------------|
|     |                             |     | US power (W)  | [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] (mM) | MB 5G mg.L <sup>-1</sup> | k <sub>int,1</sub> mg.g <sup>-1</sup> min <sup>-1/2</sup> | R <sub>1</sub> <sup>2</sup> | k <sub>int,2</sub> mg.g <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> | R <sub>2</sub> <sup>2</sup> |
| 298 | 20                          | 9   | 400           | 1                                     | 33                       | 2.189   | 0.94                        | 0.0535  | 0.84                        |
| 303 | 20                          | 9   | 400           | 1                                     | 33                       | 2.282   | 0.92                        | 0.0452  | 0.87                        |
| 308 | 20                          | 9   | 400           | 1                                     | 33                       | 2.345   | 0.99                        | 0.0243  | 0.95                        |
| 318 | 32                          | 9   | 400           | 1                                     | 33                       | 2.533   | 0.93                        | 0.0248  | 0.92                        |
| 328 | 20                          | 9   | 400           | 1                                     | 33                       | 2.465   | 0.96                        | 0.0203  | 0.94                        |
| 303 | 20                          | 4   | 400           | 1                                     | 33                       | 2.189   | 0.91                        | 0.0535  | 0.99                        |
| 303 | 20                          | 5.5 | 400           | 1                                     | 33                       | 1.854   | 0.98                        | 0.0532  | 0.99                        |
| 303 | 20                          | 7   | 400           | 1                                     | 33                       | 2.429   | 0.92                        | 0.0248  | 0.91                        |
| 303 | 20                          | 8   | 400           | 1                                     | 33                       | 2.447   | 0.99                        | 0.0294  | 0.92                        |
| 303 | 20                          | 10  | 400           | 1                                     | 33                       | 2.657   | 0.94                        | 0.0432  | 0.98                        |
| 303 | 20                          | 9   | 400           | 1                                     | 24                       | 1.983   | 0.93                        | 0.0256  | 0.97                        |
| 303 | 20                          | 9   | 400           | 1                                     | 44                       | 2.433   | 0.94                        | 0.0244  | 0.92                        |
| 303 | 20                          | 9   | 400           | 1                                     | 52                       | 2.641   | 0.99                        | 0.0365  | 0.96                        |
| 303 | 16                          | 9   | 400           | 1                                     | 33                       | 2.237   | 0.98                        | 0.0379  | 0.97                        |
| 303 | 24                          | 9   | 400           | 1                                     | 33                       | 2.331   | 0.99                        | 0.0287  | 0.98                        |
| 303 | 30                          | 9   | 400           | 1                                     | 33                       | 2.454   | 0.93                        | 0.0341  | 0.99                        |
| 303 | 20                          | 9   | 300           | 1                                     | 33                       | 2.348   | 0.98                        | 0.0364  | 0.98                        |
| 303 | 20                          | 9   | 350           | 1                                     | 33                       | 2.379   | 0.99                        | 0.0356  | 0.98                        |
| 303 | 20                          | 9   | 450           | 1                                     | 33                       | 2.562   | 0.97                        | 0.0324  | 0.95                        |
| 303 | 20                          | 9   | 400           | 0,5                                   | 33                       | 2.142   | 0.97                        | 0.0453  | 0.96                        |
| 303 | 20                          | 9   | 400           | 1,5                                   | 33                       | 2.346   | 0.92                        | 0.0265  | 0.98                        |
| 303 | 20                          | 9   | 400           | 2                                     | 33                       | 2.423   | 0,96                        | 0.0234  | 0.94                        |

### Thermodynamic values of MB 5G adsorption using bimetallic Pt/Co loaded on GO adsorbent

The constants of rate the adsorption of MB 5G are referenced using Arrhenius Equation 9. In this equation, the A and T quantities represent the Arrhenius constant and temperature independent of temperature. As indicated in Figure 3a, the activation energy was determined to be 9.55. So, the adsorption mechanism of MB 5G using bimetallic Pt/Co loaded on GO adsorbent showed that it is physically occurring. Because the activation energy (5-40 kJ / mol) explains that the adsorption process proceeds physically. However, if it is above this value, the reaction mechanism shows that it proceeds chemically (Akova et al., 2000; Doğan et al., 2003). Other thermodynamic activation functions such as enthalpy ( $\Delta H^\circ$ ), entropy ( $\Delta S^\circ$ ) and Gibbs free energy ( $\Delta G^\circ$ ) were determined using Eyring equation (10) and equation (11) (Kannan et al., 2001).

$$\ln k_2 = \ln A - \frac{E_a}{R.T} \quad (9)$$

$$\ln(k_2/T) = \ln(kb/h) + \frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT} \quad (10)$$

In equation 10, the change in Gibbs energy from the slope  $1/T$  versus  $\ln(k_2/T)$  was determined to be + 12.71 kJ / mol at 303 K. These results show that the mechanism does not automatically proceed and the process is carried out by transferring energy from an external source. In addition, the standard enthalpy change value was determined as 6.93 kJ / mol. This implies that the adsorption mechanism takes place endothermically (Figure 3b).

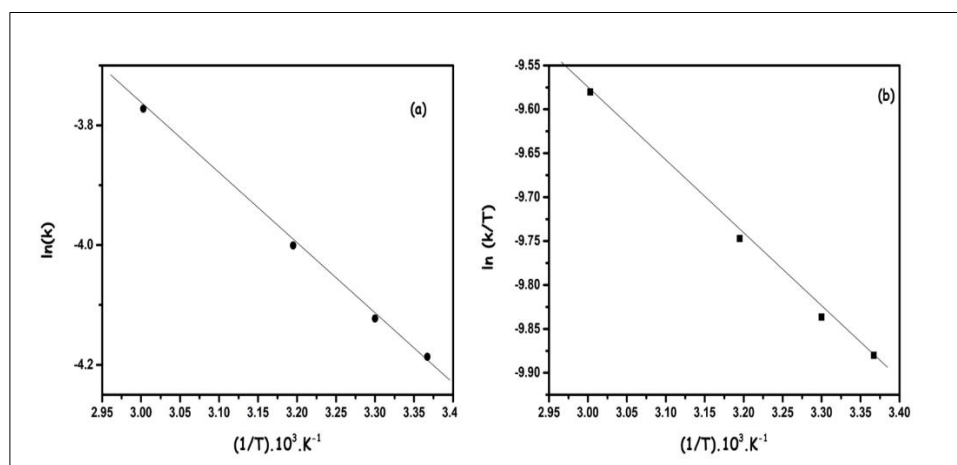


Figure 3. (a) Arrhenius plot and (b) thermodynamic function

### CONCLUSION

In this work, the bimetallic Pt/Co loaded on GO material was produced following a series of simple hydrothermal methods. It was performed in the presence of a number of experimental parameters including the effect of pH, contact time,  $H_2O_2$ , initial MB 5G dye concentration and temperatures. The most suitable parameters were determined as given below. 30 mg adsorbent amount, 0.052 g / L MB 5G amount, 1.5 mM  $H_2O_2$  concentration, 400 W ultrasonic power, 50 °C temperature and 10 pH. At the end of 120 minutes reaction time, 86.4% dye removal efficiency was obtained in the presence of pH 10. The study determined that  $O_2$  radicals have a synergistic effect on MB 5G dye removal. The kinetics data obtained in the MB 5G adsorption using bimetallic Pt/Co loaded on GO materials were used and adsorption data such as entropy ( $\Delta S^*$ ), Gibbs free energy ( $\Delta G^*$ ) and activation energy ( $E_a$ ) were obtained. The data obtained showed that it was understood that the adsorption reaction mechanism did not occur spontaneously and that the process was an endothermic event. The maximum adsorption



capacity (qm) of bimetallic Pt/Co loaded on GO material for maxilon blue 5G was found to be 1150.7 mg g<sup>-1</sup>. These data showed that bimetallic Pt/Co loaded on GO material proved to be as an effective nano adsorbent as an alternative adsorbent for organic dye removal like MB 5G.

### Conflict of Interest

I declare that there is no conflict of interest during the planning, execution and writing of the article.

### Author's Contributions

I hereby declare that the planning, execution and writing of the article was done by me as the sole author of the article.

### REFERENCES

- Akova, A, Ustun, G, 2000. Activity and adsorption of lipase from *Nigella sativa* seeds on Celite at different pH values. *Biotechnology Letters*, 22(5), 355–359.
- Aksu Z, Tezer, S, 2000. Equilibrium and kinetic modelling of biosorption of Remazol black B by *Rhizopus arrhizus* in a batch system: Effect of temperature. *Process Biochemistry*, 36(5), 431–439.
- Alkan M, Doğan M, Turhan Y, Demirbaş Ö, Turan P, 2008. Adsorption kinetics and mechanism of maxilon blue 5G dye on sepiolite from aqueous solutions. *Chemical Engineering Journal*, 139(2), 213–223.
- Alkan M, Çelikçapa S, Demirbaş Ö, Dogan M, 2005. Removal of reactive blue 221 and acid blue 62 anionic dyes from aqueous solutions by sepiolite. *Dyes and Pigments*, 65(3), 251–259.
- Bae S, Kim D, Lee W, 2013. Degradation of diclofenac by pyrite catalyzed Fenton oxidation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 134–135, 93–102.
- Bagal MV, Lele BJ, Gogate PR, 2013. Removal of 2,4-dinitrophenol using hybrid methods based on ultrasound at an operating capacity of 7 L. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1217–1225.
- Banat IM, Nigam P, Singh D, Marchant R. 1996. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: A review. In *Bioresource Technology* 58(3), 217–227.
- Batra, K, Nayak S, Behura SK, Jani O, 2015. Optimizing performance parameters of chemically-derived graphene/ p -Si heterojunction solar cell. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15(7), 4877–4882.
- Çalimli M. H, 2020. Magnetic nanocomposite cobalt-multiwalled carbon nanotube and adsorption kinetics of methylene blue using an ultrasonic batch. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 18(3), 723–740.
- Çalimli MH, Demirbaş, Ö, Aygün A, Alma MH, Nas MS, Şen F, 2018. Immobilization kinetics and mechanism of bovine serum albumin on diatomite clay from aqueous solutions. *Applied Water Science*, 8(7), 209.
- Chen Z, Fu J, Wang M, Wang X, Zhang J, Xu Q, 2014. Adsorption of cationic dye (methylene blue) from aqueous solution using poly(cyclotriphosphazene-co-4,4'-sulfonyldiphenol) nanospheres. *Applied Surface Science*, 289, 495–501.
- Chiou MS, Ho PY, Li HY, 2004. Adsorption of anionic dyes in acid solutions using chemically cross-linked chitosan beads. *Dyes and Pigments*, 60(1), 69–84.
- Choy KKH, McKay G, Porter JF, 1999. Sorption of acid dyes from effluents using activated carbon. *Resources, Conservation and Recycling*, 27(1–2), 57–71.
- Çiçek F, Özer D, Özer A, Özer A, 2007. Low cost removal of reactive dyes using wheat bran. *Journal of Hazardous Materials*, 146(1–2), 408–416.
- Crini G, 2006. Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review. In *Bioresource Technology*, 97(9), 1061–1085.
- Demirbaş Ö, Çalimli MH, Demirkan B, Alma MH, Nas MS, Khan A, Asiri AM, Şen F, 2019. Thermodynamics, Kinetics, and Adsorption Properties of Biomolecules onto Carbon-Based Materials Obtained from Food Wastes. *BioNanoScience*, 9(3), 672–682.
- Demirbaş Ö, Nas M, 2016. Kinetics and Mechanism of the Adsorption of Methylene Blue from Aqueous Solution onto Turkish Green Clay. *Archives of Current Research International*, 6(3), 1–10.

- Dindarsafa M, Khataee A, Kaymak B, Vahid B, Karimi A, Rahmani A, 2017. Heterogeneous sono-Fenton-like process using martite nanocatalyst prepared by high energy planetary ball milling for treatment of a textile dye. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 389–399.
- Doğan M, Alkan M, 2003. Adsorption kinetics of methyl violet onto perlite. *Chemosphere*, 50(4), 517–528.
- Feng X, Zhang Y, Zhou J, Li Y, Chen S, Zhang L, Ma Y, Wang L, Yan X, 2015. Three-dimensional nitrogen-doped graphene as an ultrasensitive electrochemical sensor for the detection of dopamine. *Nanoscale*, 7(6), 2427–2432.
- Fonseca AF, Zhang H, Cho K, 2015. Formation energy of graphene oxide structures: A molecular dynamics study on distortion and thermal effects. *Carbon*, 84(1), 365–374.
- Ghorai S, Sarkar A, Raoufi M, Panda A. B, Schönherr H, Pal S, 2014. Enhanced removal of methylene blue and methyl violet dyes from aqueous solution using a nanocomposite of hydrolyzed polyacrylamide grafted xanthan gum and incorporated nanosilica. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6(7), 4766–4777.
- Haldorai Y, Kim BK, Jo Y. L, Shi, JJ, 2014. Ag@graphene oxide nanocomposite as an efficient visible-light plasmonic photocatalyst for the degradation of organic pollutants: A facile green synthetic approach. *Materials Chemistry and Physics*, 143(3), 1452–1461.
- Hassani A, Soltani RDC, Karaca S, Khataee A, 2015. Preparation of montmorillonite-alginate nanobiocomposite for adsorption of a textile dye in aqueous phase: Isotherm, kinetic and experimental design approaches. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21, 1197–1207.
- Hernández FP, Rojas S, Ocón P, de la Fuente JLG, Terreros P, Peña MA, García-Fierro J L, 2007. An opening route to the design of cathode materials for fuel cells based on PtCo nanoparticles. *Applied Catalysis B: Environmental*, 77(1–2), 19–28. doi: 10.1016/j.apcatb.2007.07.002
- Huang R, Fang Z, Fang X, Tsang EP, 2014. Ultrasonic Fenton-like catalytic degradation of bisphenol A by ferrous oxide (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles prepared from steel pickling waste liquor. *Journal of Colloid and Interface Science*, 436, 258–266.
- Iram M, Guo C, Guan Y, Ishfaq A, Liu H, 2010. Adsorption and magnetic removal of neutral red dye from aqueous solution using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> hollow nanospheres. *Journal of Hazardous Materials*, 181(1–3), 1039–1050.
- Kannan N, Sundaram MM, 2001. Kinetics and mechanism of removal of methylene blue by adsorption on various carbons - A comparative study. *Dyes and Pigments*, 51(1), 25–40.
- Khataee A, Kayan B, Kalderis D, Karimi A, Akay S, Konsolakis M, 2017. Ultrasound-assisted removal of Acid Red 17 using nanosized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-loaded coffee waste hydrochar. *Ultrasonics Sonochemistry*, 35, 72–80.
- Khataee A, Rad TS, Vahid B, Khorram S, 2016. Preparation of zeolite nanorods by corona discharge plasma for degradation of phenazopyridine by heterogeneous sono-Fenton-like process. *Ultrasonics Sonochemistry*, 33, 37–46.
- Khataee A, Saadi S, Safarpour M, Joo S. W, 2015. Sonocatalytic performance of Er-doped ZnO for degradation of a textile dye. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 379–388.
- Koffi RC, Coutanceau C, Garnier E, Léger JM, Lamy C, 2005. Synthesis, characterization and electrocatalytic behaviour of non-alloyed PtCr methanol tolerant nanoelectrocatalysts for the oxygen reduction reaction (ORR). *Electrochimica Acta*, 50(20), 4117–4127.
- Lai FJ, Su WN, Sarma LS, Liu, DG, Hsieh CA, Lee JF, Hwang BJ, 2010. Chemical Dealloying Mechanism of Bimetallic Pt-Co Nanoparticles and Enhancement of Catalytic Activity toward Oxygen Reduction. *Chemistry - A European Journal*, 16(15), 4602–4611.
- Liu SH, Zheng FS, Wu JR, 2011. Preparation of ordered mesoporous carbons containing well-dispersed and highly alloying Pt-Co bimetallic nanoparticles toward methanol-resistant oxygen reduction reaction. *Applied Catalysis B: Environmental*, 108–109, 81–89.
- Liu T, Li Y, Du Q, Sun J, Jiao Y, Yang G, Wang Z, Xia Y, Zhang W, Wang K, Zhu H, Wu D, 2012. Adsorption of methylene blue from aqueous solution by graphene. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90(1), 197–203.
- Liu Y, Liu C. Y, Liu Y, 2011. Investigation on fluorescence quenching of dyes by graphite oxide and graphene. *Applied Surface Science*, 257(13), 5513–5518.
- Liu Z, Liu, Q, Huang Y, Ma Y, Yin S, Zhang X, Sun W, Chen Y, 2008. Organic Photovoltaic Devices Based on a Novel Acceptor Material: Graphene. *Advanced Materials*, 20(20), 3924–3930.

- Ma J, Yu F, Zhou L, Jin L, Yang M, Luan J, Tang Y, Fan H, Yuan Z, Chen J, 2012. Enhanced adsorptive removal of methyl orange and methylene blue from aqueous solution by alkali-activated multiwalled carbon nanotubes. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 4(11), 5749–5760.
- Mittal H, Ballav N, Mishra S. B, 2014. Gum ghatti and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles based nanocomposites for the effective adsorption of methylene blue from aqueous solution. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20(4), 2184–2192.
- Nas MS, Gür A, Gür T, Yönten V, 2017. Exploring thermodynamics and kinetic parameters of immobilized catalase enzyme via adsorption on krill clay. *Desalination and Water Treatment*, 67, 178–186.
- Nasuha N, Hameed BH, Din ATM, 2010. Rejected tea as a potential low-cost adsorbent for the removal of methylene blue. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1–3), 126–132.
- Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV, Jiang D, Zhang Y, Dubonos SV, Grigorieva IV, Firsov AA, 2004. Electric field in atomically thin carbon films. *Science*, 306(5696), 666–669.
- Qin J, Qiu F, Rong X, Yan J, Zhao H, Yang D, 2015. Adsorption behavior of crystal violet from aqueous solutions with chitosan-graphite oxide modified polyurethane as an adsorbent. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(17), 41828.
- Roy-Mayhew J D, Aksay IA, 2014. Graphene materials and their use in dye-sensitized solar cells. In *Chemical Reviews*. 114,12, 6323–6348).
- Savk A, Özdil B, Demirkan B, Nas MS, Calimli MH, Alma MH, Inamuddin, Asiri AM, Şen, F. 2019. Multiwalled carbon nanotube-based nanosensor for ultrasensitive detection of uric acid, dopamine, and ascorbic acid. *Materials Science and Engineering C*, 99, 248–254.
- Sen B, Şavk A, Sen F, 2018. Highly efficient monodisperse Pt nanoparticles confined in the carbon black hybrid material for hydrogen liberation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 520, 112–118.
- Şen F, Demirbaş Ö, Çalimli MH, Aygün A, Alma MH, Nas MS, 2018. The dye removal from aqueous solution using polymer composite films. *Applied Water Science*, 8(7), 206.
- Shen J, Shi M, Li N, Yan B, Ma H, Hu Y, Ye M, 2010. Facile Synthesis and Application of Ag-Chemically Converted Graphene Nanocomposite. *Nano Res*, 3, 339–349.
- Singh KP, Mohan D, Sinha S, Tondon GS, Gosh D, 2003. Color removal from wastewater using low-cost activated carbon derived from agricultural waste material. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 42(9), 1965–1976.
- Song Z, Liu W, Wei W, Quan C, Sun N, Zhou Q, Liu G, Wen X, 2016. Preparation and electrochemical properties of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/reduced graphene oxide aerogel (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/rGOA) composites for supercapacitors. *Journal of Alloys and Compounds*, 685, 355–363.
- Teixeira SR, Lloyd C, Yao S, Andrea SG, Whitaker IS, Francis L, Conlan, RS, Azzopardi E, 2016. Polyaniline-graphene based  $\alpha$ -amylase biosensor with a linear dynamic range in excess of 6 orders of magnitude. *Biosensors and Bioelectronics*, 85, 395–402.
- Vadivelan V, Vasanth, KK, 2005. Equilibrium, kinetics, mechanism, and process design for the sorption of methylene blue onto rice husk. *Journal of Colloid and Interface Science*, 286(1), 90–100.
- Wu Q, Zhang H, Zhou, L, Bao C, Zhu H, Zhang Y, 2016. Synthesis and application of rGO/CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> composite for catalytic degradation of methylene blue on heterogeneous Fenton-like oxidation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 67, 484–494.
- Wu R, Liu JH, Zhao L, Zhang X, Xie J, Yu B, Ma X, Yang ST, Wang H, Liu Y, 2014. Hydrothermal preparation of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles for dye adsorption. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(2), 907–913.
- Xu L, Wang J, 2012. Fenton-like degradation of 2,4-dichlorophenol using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles. *Applied Catalysis B: Environmental*, 123–124, 117–126.
- Yagub MT, Sen TK, Afroze S, Ang HM, 2014. Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: A review. In *Advances in Colloid and Interface Science*. 209, 172–184.
- Yener J, Kopac T, Dogu G, Dogu T, 2006. Adsorption of Basic Yellow 28 from aqueous solutions with clinoptilolite and amberlite. *Journal of Colloid and Interface Science*, 294(2), 255–264.
- Yenisoy KS, Aygün A, Güneş M, Tahtasakal E, 2004. Physical and chemical characteristics of polymer-based spherical activated carbon and its ability to adsorb organics. *Carbon*, 42(3), 477–484.
- Yönten V, Özgüven A, Ahmed AA, Akçay ME, 2020. Effect of some medium parameters on Brilliant Blue G biosorption by Amberlite resin/Agaricus campestris. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1–10.

- Yönten, Vahap, Sanyürek NK, Kivanç MR, 2020. A thermodynamic and kinetic approach to adsorption of methyl orange from aqueous solution using a low cost activated carbon prepared from *Vitis vinifera* L. *Surfaces and Interfaces*, 20, 100529.
- Zhang X, Zhang P, Wu Z, Zhang L, Zeng G, Zhou C, 2013. Adsorption of methylene blue onto humic acid-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 435, 85–90.
- Zhao J, Manthiram A, 2011. Preleached Pd-Pt-Ni and binary Pd-Pt electrocatalysts for oxygen reduction reaction in proton exchange membrane fuel cells. *Applied Catalysis B: Environmental*, 101(3–4), 660–668.
- Zhao W, Tang Y, Xi J, Kong J, 2015. Functionalized graphene sheets with poly(ionic liquid)s and high adsorption capacity of anionic dyes. *Applied Surface Science*, 326, 276–284.
- Zolgharnein J, Bagtash M, Shariatmanesh T, 2015. Simultaneous removal of binary mixture of Brilliant Green and Crystal Violet using derivative spectrophotometric determination, multivariate optimization and adsorption characterization of dyes on surfactant modified nano- $\gamma$ -alumina. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 137, 1016–1028.

**Atf İçin:** Akbaba Y, 2021, Potansiyel Biyolojik Aktif Bazı Asimetrik Feniletıl Üre Türevlerinin Sentezi. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1374-1384.

**To Cite:** Akbaba Y, 2021, Synthesis of Potentially Biologically Active Some Asymmetric Phenylethyl Urea Derivatives, Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1374-1384.

## Potansiyel Biyolojik Aktif Bazı Asimetrik Feniletıl Üre Türevlerinin Sentezi

Yusuf AKBABA\*

**ÖZET:** Bu çalışmada, bir dizi potansiyel biyolojik aktif asimetrik üre türevi sentezlenmiştir. Buna göre (R)-(+)-1-feniletılamin (7) 1,1'-karbonildiimidazol ile su içerisinde reaksiyona sokulmuş ve imidazolid ara ürünleri oluşturulmuştur. Daha sonra üzerine fenetilamin (8a) ve süstitüe fenetilamin türevleri (8b-e) verildi. Sonuç olarak, potansiyel biyolojik aktif yeni asimetrik üreler (R)-1-fenetil-3- (1-feniletıl) üre (9a) ve süstitüe türevleri (9b-e), % 60 - % 71 arasındaki verimlerle elde edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Asimetrik üre, 1-feniletılamin, fenetilamin, 1,1'-karbonildiimidazol.

### Synthesis of Potentially Biologically Active Some Asymmetric Phenylethyl Urea Derivatives

**ABSTRACT:** In this study, a number of potentially biologically active asymmetric urea derivatives were synthesized. Accordingly, (R)-(+)-1-phenylethylamine (7) was reacted with 1,1'-carbonyldiimidazole in water and imidazolide intermediates were formed. Then phenethylamine (8a) and substituted phenethylamine derivatives (8b-e) were given. As a result, potentially biologically active novel asymmetric ureas (R)-1-phenethyl-3-(1-phenylethyl) urea (9a) and substituted derivatives (9b-e) were obtained in yields between 60% - 71%.

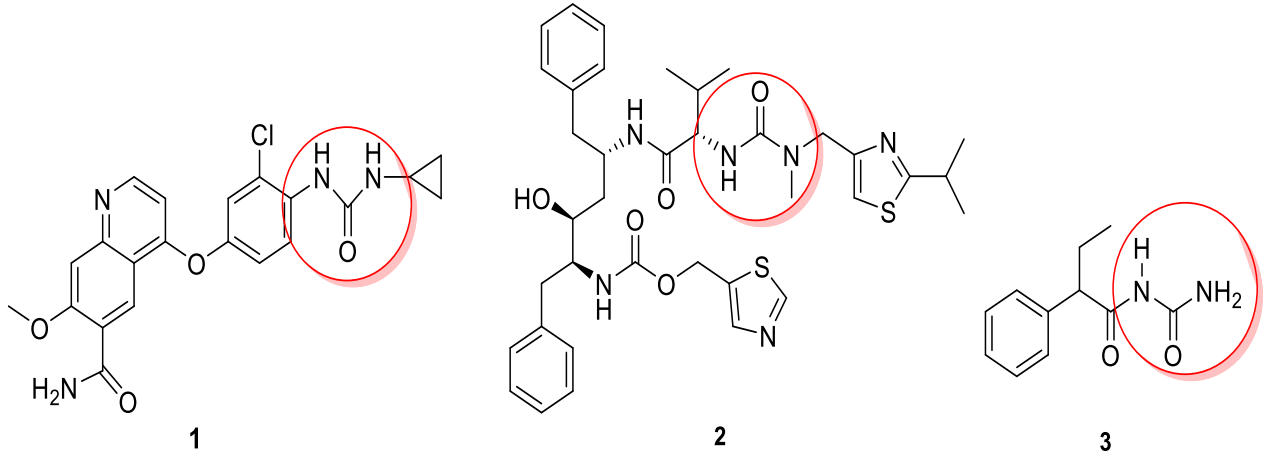
**Keywords:** Asymmetric urea, 1-phenylethylamine, phenethylamine, 1,1'-carbonyldiimidazole

<sup>1</sup> Yusuf AKBABA ([Orcid ID: 0000-0002-7770-0473](https://orcid.org/0000-0002-7770-0473)), Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü, Erzurum, Türkiye

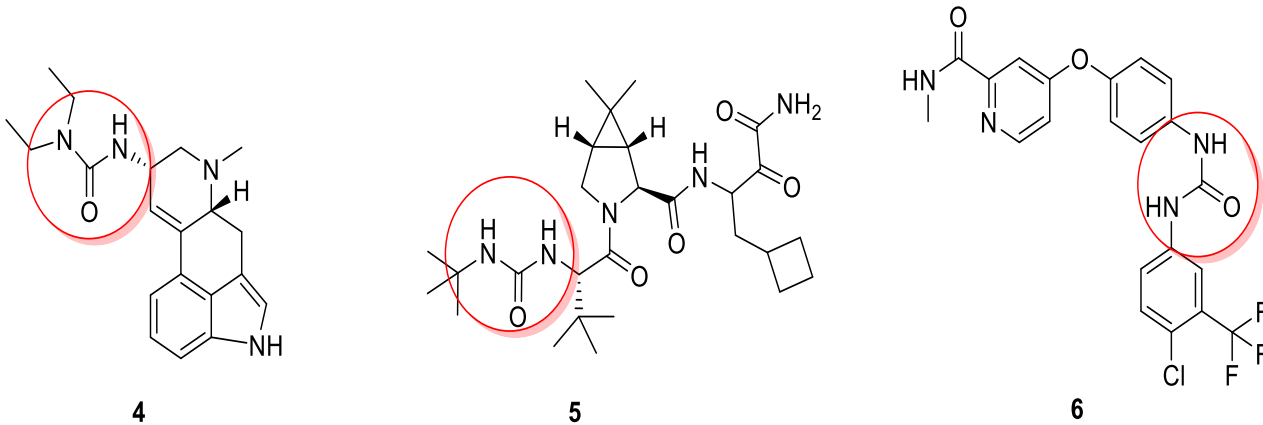
\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Yusuf AKBABA, e-mail: yusuf.akbaba@erzurum.edu.tr

## GİRİŞ

Sentetik olarak 1828 yılında Wohler tarafından ilk kez elde edilen üre kimyasal olarak  $H_2N-CO-NH_2$  yapısına sahiptir. Günümüzde üre; tıpta, laboratuvarlarda, tarımda, endüstride, gübrelemede, ürinterapide ve enzim üreazları gibi birçok alanda kullanılmaktadır. (Madhava ve ark., 2012). Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda üre fonksiyonel grubu içeren çoğu bileşiğin ilaç sanayisinde her geçen gün artarak yerini aldığı ve bu bileşiklerin anti-kanser, anti-viral, anti-tüberküler, anti-konvulsan ve anti-mikrobiyal gibi önemli biyolojik aktivitelere sahip olduğu belirtilmektedir (Pochampally ve ark., 2014).



Lenvatinib (1) belirli tiroid kanseri türlerinin tedavisinde ve diğer kanserler için de Lenvima ve Lenvanix ticari adıyla piyasada bulunan bir anti-kanser ilacıdır. Bununla beraber Lenvatinib (1) üzerine yapılan çalışmalarda VEGFR, VEGFR2 ve VEGFR3 kinazlarına karşı çoklu kinaz inhibitörü olduğu literatürde bildirilmiştir (Matsui ve ark., 2008). Norvir ticari adıyla satılan Ritonavir (2) HIV enfeksiyonu ile AIDS'in tedavisinde kullanılan proteaz inhibitörü sınıfından antiretroviral bir bileşiktir (Zeldin ve Petruschke, 2004). Üre fonksiyonel grubu içeren önemli bileşiklerden birisi de ticari adı Laburide olarak bilinen Pheneturide (3) antikonvulsan bir ilaçtır (Byrne ve ark., 1999).



Ticari olarak Dopergin adıyla satılan Lisurid (4), Dopamin D2, D3 ve D4 reseptörlerinin yanı sıra serotonin 5-HT1A (Hofman ve ark., 2006) ve 5-HT2A / C reseptörlerine karşı yüksek bir afiniteye sahip olan bir ilaçtır (Marona-Lewicka ve ark., 2002). Victrelis ticari adıyla bilinen Boceprevir (5), genotip 1 hepatit C virüsüyle oluşan hepatitlerin tedavisinde kullanılan bir proteaz enzim inhibitörü ilacıdır (Njoroge ve ark., 2008). Nexavar ticari adıyla bilinen Sorafenib (6) primer böbrek kanseri (Escudier ve ark., 2007) ve ileri primer karaciğer kanseri (Llovet ve ark., 2008) tedavisi için onaylanmış bir kinaz inhibitörüdür.

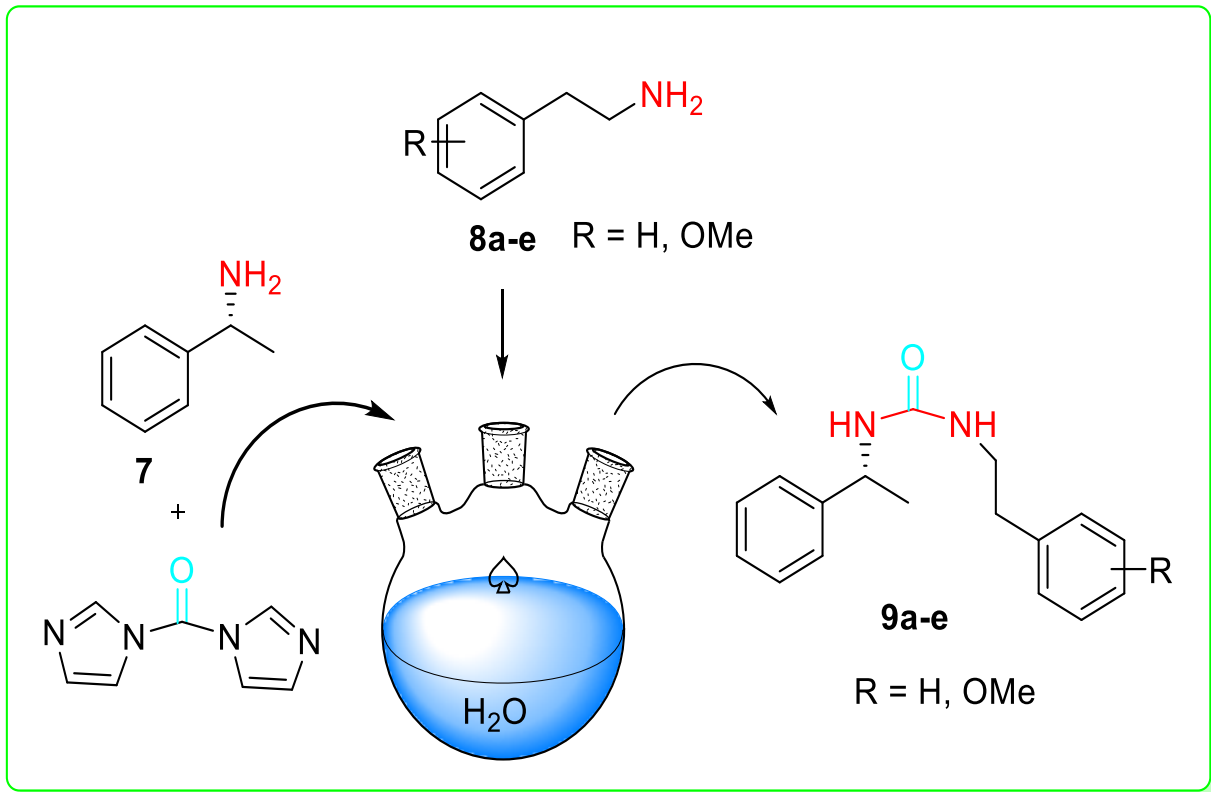
Şimdiye kadar yapılan çalışmalar gösteriyor ki üreler önemli biyolojik aktiviteler sergilemektedir. Bizde bu amaçla literatürde bilinen yöntemle tek basamakta sübtitüe feniletılamin türevlerinin asimetrik (R)-(+)-1-feniletılamin ile reaksiyonu sonucu potansiyel biyolojik aktif asimetrik üre türevlerini sentezini gerçekleştirdik.

## MATERYAL VE METOT

### Materyaller ve Cihazlar

Çalışmada çözücü olarak sadece su kullanılmış ve 1,1'-karbonildiimidazol, (R)-(+)-1-feniletılamin ile 2-feniletılamin türevleri ticari olarak satın alınıp herhangi bir saflaştırılma işlemine tabi tutulmadan kullanılmıştır.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) ve  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) spektrumları Bruker Avance II spektrometresi ile alınmıştır. IR spektrumları Perkin-Elmer spektrofotometresi ile ATR de alınmıştır. Maddelerin erime noktaları da Thermo Scientific IA9100 cihazında belirlenmiştir. Çevirme açıları Bellingham + Stanley ADP220 polarimetre cihazı ile ölçülmüştür.

### Asimetrik Ürelerin sentezi için Genel Yöntem:



Şekil 1. Asimetrik üre türevlerinin sentezi için genel yöntem

Yeni asimetrik ürelerin sentezi literatüre benzer şekilde gerçekleştirildi (Padiya ve ark., 2008). Buna göre (R)-(+)-1-feniletılamin (7) (3.3 mmol) ve hemen akabinde CDI (1,1-Karbonil diimidazol) (3.6 mmol) alınarak 0°C de 20 mL H<sub>2</sub>O içerisinde 30 dakika, daha sonra oda sıcaklığında 1 saat karıştırıldı. Ardından reaksiyon karışımına 2-feniletılamin türevleri (8a-e) (3,6 mmol) ilave edildi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 24 saat karıştırıldı. Reaksiyon sonunda cam balonda oluşan beyaz kalıntı filtre kâğıdından süzülüp 50°C' de etüvde kurutuldu.

**(R)-1-fenetil-3-(1-feniletil)üre (9a):** Beyaz renkli katı madde (%66 verim). **Erime noktası:** 53-55 °C; **<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ 7.23 – 7.09 (m, 8H, ArH), 6.99 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, ArH), 5.12 (bs, 1H, NH), 4.76 (bs, 1H, NH), 4.65 (m, 1H, CH-N), 3.26-3.20 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.65 – 2.52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.27 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ 157.9 (CO), 144.4 (C), 139.2(C), 128.8 (2CH), 128.6 (2CH), 128.5 (2CH), 127.1 (CH), 126.3 (CH), 125.9 (2CH), 49.9 (CH), 41.5 (CH<sub>2</sub>), 36.4 (CH<sub>2</sub>), 23.4 (CH<sub>3</sub>). **IR (v, cm<sup>-1</sup>):** 3315, 3026, 1626, 1558, 1494, 1450 1246. **Çevirme açısı:**  $[\alpha]_D^{25} = -3^\circ (c 1, CHCl_3)$

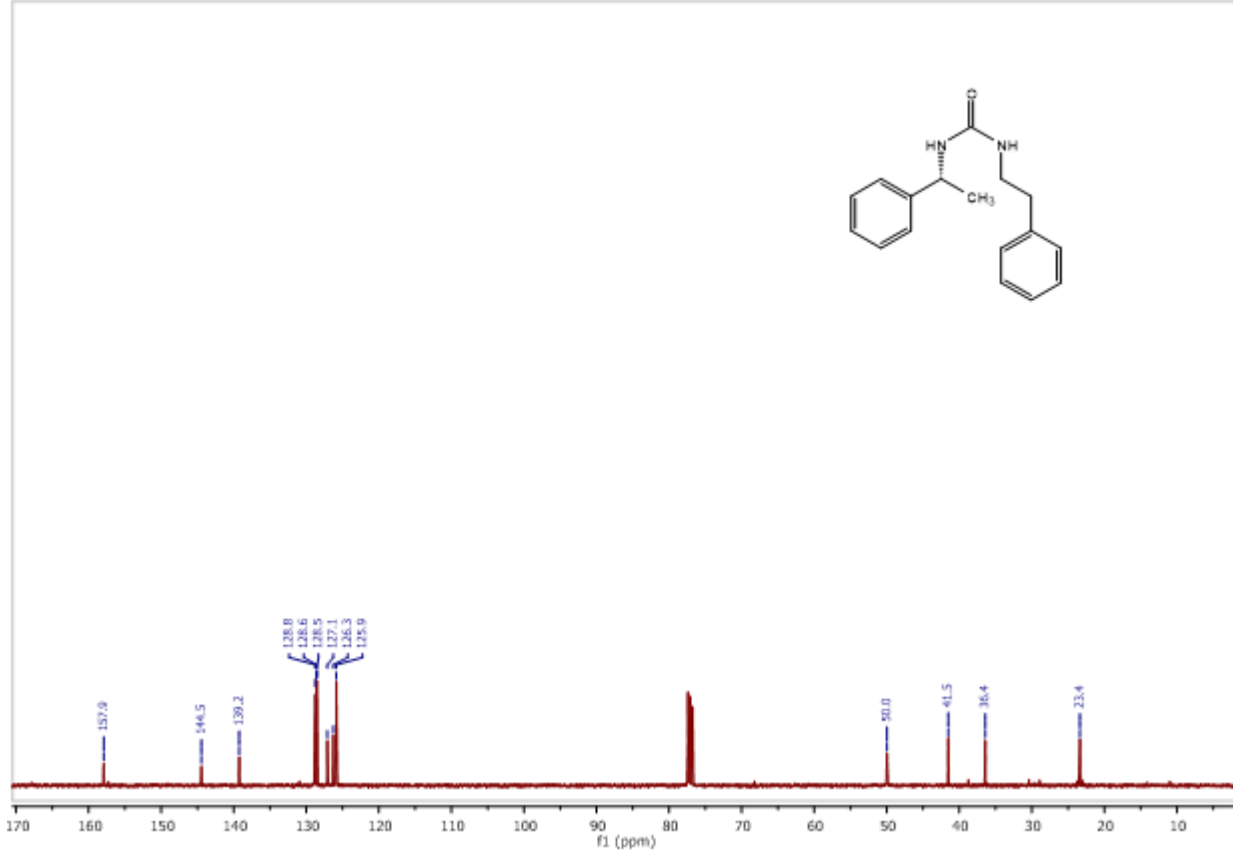
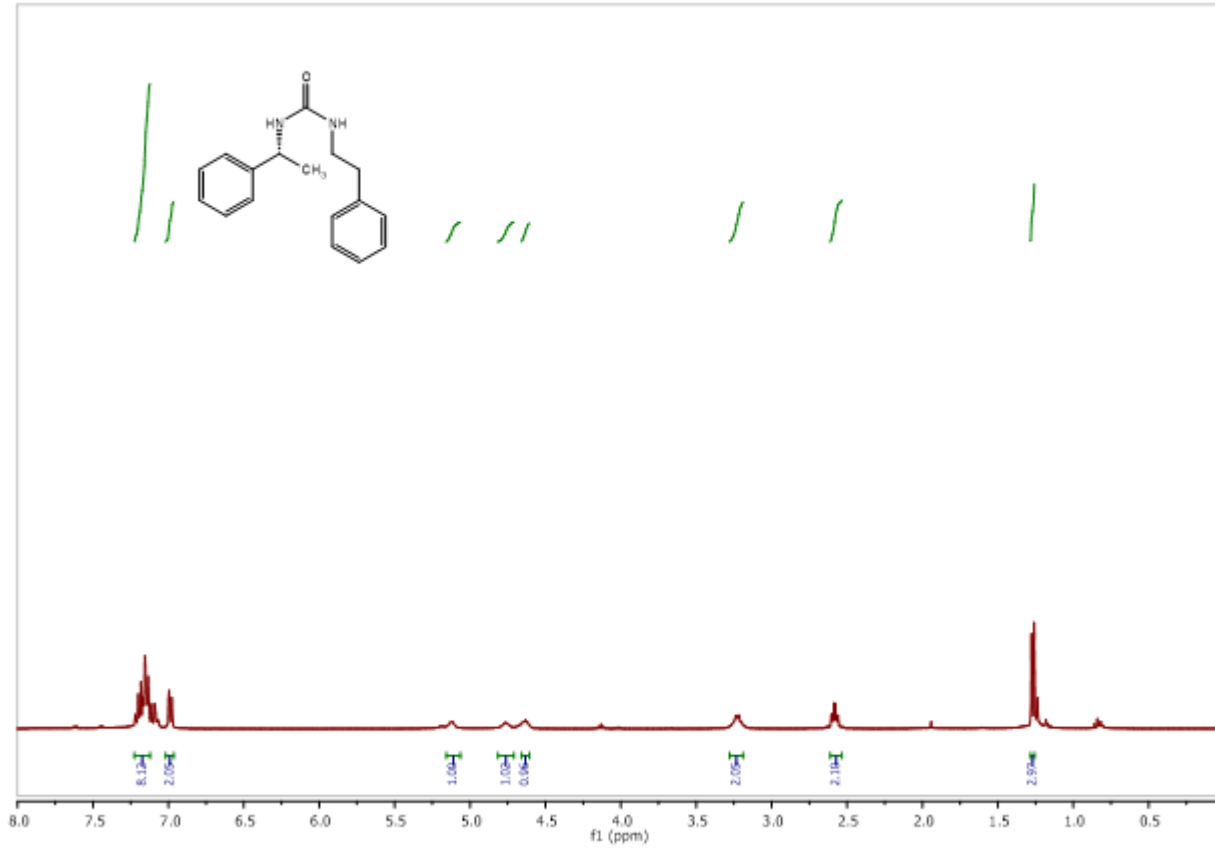
**(R)-1-(2-metoksifenetil)-3-(1-feniletil)üre (9b):** Beyaz renkli katı madde (%63 verim). **Erime noktası:** 108-110 °C; **<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ 7.36 – 7.20 (m, 6H, ArH), 7.05 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, ArH), 6.89-6.83 (m, 2H, ArH), 5.18 (bd, *J* = 6.6 Hz, 1H, NH), 4.86-4.82 (m, 1H, NH), 4.81 – 4.78 (m, 1H, CH-N), 3.76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.35-3.32 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.80 – 2.74 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.41 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ 157.9 (CO), 157.5 (C), 144.4 (C), 130.6 (CH), 128.6 (2CH), 127.7 (CH), 127.4 (C), 127.1 (CH), 125.9 (2CH), 120.6 (CH), 110.4(CH), 55.2 (OCH<sub>3</sub>), 49.8(CH), 40.4 (CH<sub>2</sub>), 31.1 (CH<sub>2</sub>), 23.2 (CH<sub>3</sub>). **IR (v, cm<sup>-1</sup>):** 3321, 2962, 2359, 2343, 1616, 1574, 1495, 1247. **Çevirme açısı:**  $[\alpha]_D^{25} = -3^\circ (c 1, CHCl_3)$

**(R)-1-(3-metoksifenetil)-3-(1-feniletil)üre (9c):** Beyaz renkli katı madde (%60 verim). **Erime noktası:** 83-85 °C;. **<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ 7.36 – 7.17 (m, 6H, ArH), 6.76 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, ArH), 6.71-6.68 (m, 2H, ArH), 5.56 (bd, *J* = 6.5 Hz, 1H, NH), 5.20 (bs, 1H, NH), 4.80-4.76 (m, 1H, CH-N), 3.77 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.42 – 3.19 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.69-2.65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.37 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ 159.7 (CO), 158.1(C), 144.6 (C), 140.9 (C), 129.5 (CH), 128.6 (2CH), 127.0(CH), 125.8 (2CH), 121.1 (CH), 114.4(CH), 111.8(CH), 55.1 (OCH<sub>3</sub>), 49.8(CH), 41.4 (CH<sub>2</sub>), 36.5 (CH<sub>2</sub>), 23.3 (CH<sub>3</sub>) **IR (v, cm<sup>-1</sup>):** 3327, 3005, 2988, 2359, 2343, 1624, 1558, 1495, 1275, 1261. **Çevirme açısı:**  $[\alpha]_D^{25} = -1^\circ (c 1, CHCl_3)$

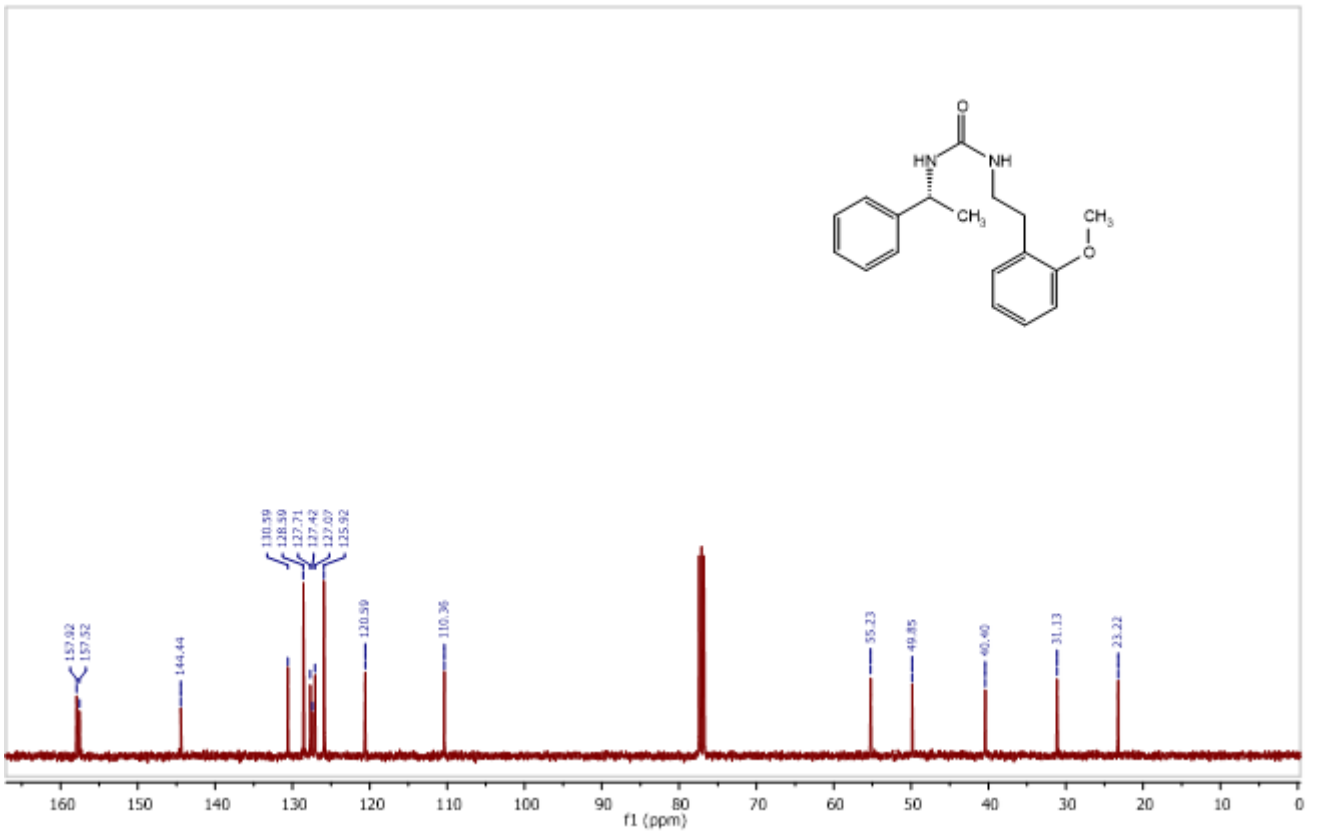
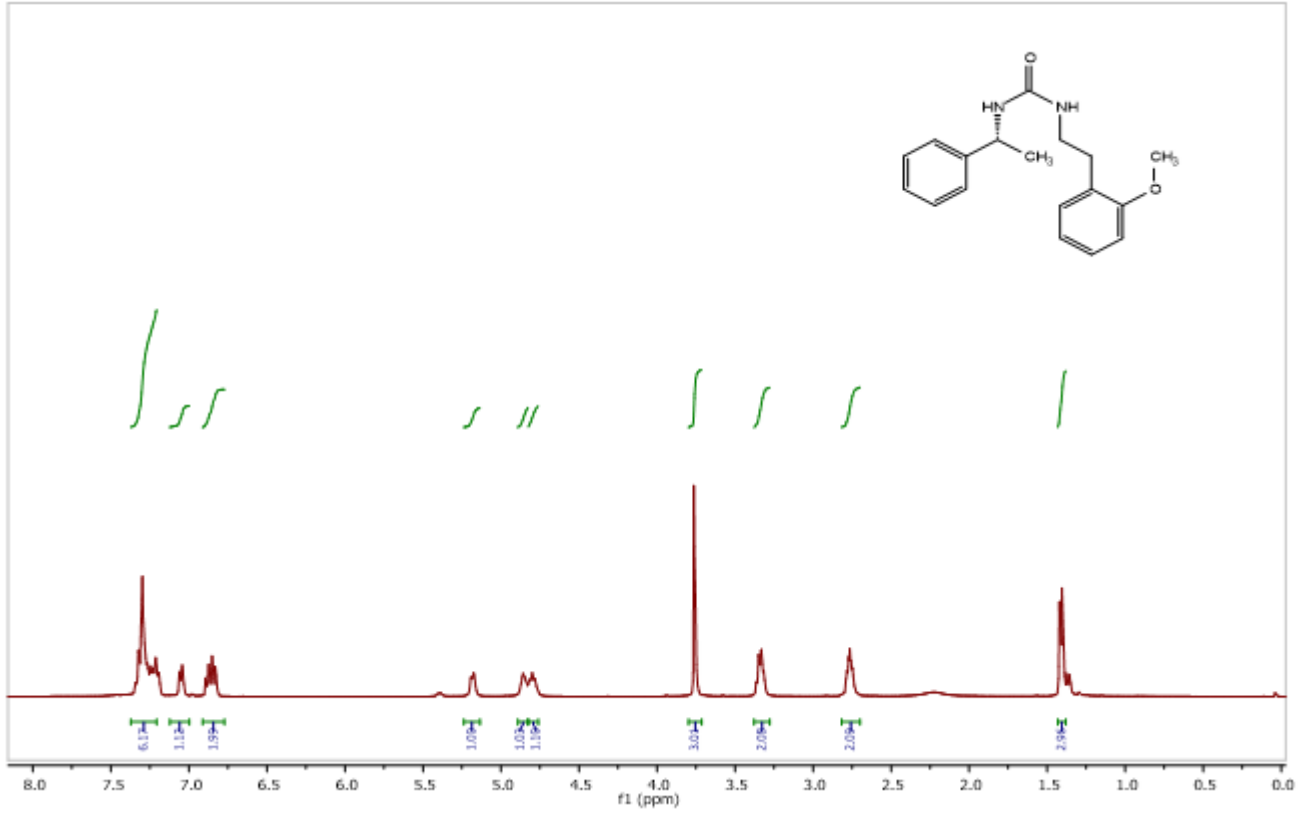
**(R)-1-(4-metoksifenetil)-3-(1-feniletil)üre (9d):** Beyaz renkli katı madde (%71 verim). **Erime noktası:** 83-85 °C;. **<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ 7.33–7.22 (m, 5H, ArH), 7.01 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, ArH), 6.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, ArH), 5.38 (bd, *J* = 6.6 Hz, 1H, NH), 5.01 (bs, 1H, NH), 4.82-4.72 (m, 1H, CH-N), 3.78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.38–3.22 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.78–2.52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.37 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ 158.08 (CO), 158.00 (C), 144.5 (C), 131.2 (C), 129.7 (2CH), 128.6 (2CH), 127.1 (CH), 125.8 (2CH), 113.9 (2CH), 55.22 (OCH<sub>3</sub>), 49.92(CH), 41.73(CH<sub>2</sub>), 35.48(CH<sub>2</sub>), 23.39 (CH<sub>3</sub>). **IR (v, cm<sup>-1</sup>):** 3317, 3003, 2988, 2359, 1574, 1558, 1154, 1456, 1275, 1259. **Çevirme açısı:**  $[\alpha]_D^{25} = +1^\circ (c 1, CHCl_3)$

**(R)-1-(3,4-dimetoksifenetil)-3-(1-feniletil)üre (9e):** Beyaz renkli katı madde (%70 verim). **Erime noktası:** 81-83 °C;. **<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ 7.44 – 7.14 (m, 5H, ArH), 6.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, ArH), 6.67 – 6.57 (m, 2H, ArH), 5.24 (bd, *J* = 6.9 Hz, 1H, NH), 4.89 (bs, 1H, NH), 4.79-4.74 (m, 1H, CH-N), 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.35-3.30 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.71 – 2.59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.38 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ 157.9(CO), 148.9(C), 147.4(C), 144.4(C), 131.7(C), 128.6(2CH), 127.1(CH), 125.8(2CH), 120.6 (CH), 111.9 (CH), 111.3 (CH), 55.8 (OCH<sub>3</sub>), 55.7 (OCH<sub>3</sub>), 49.95 (CH), 41.60 (CH<sub>2</sub>), 35.94 (CH<sub>2</sub>), 23.3(CH<sub>3</sub>) **IR (v, cm<sup>-1</sup>):** 3647, 3566, 3003, 2987, 2359, 2343, 1716, 1558, 1541, 1275,1261. **Çevirme açısı:**  $[\alpha]_D^{25} = -4^\circ (c 1, CHCl_3)$

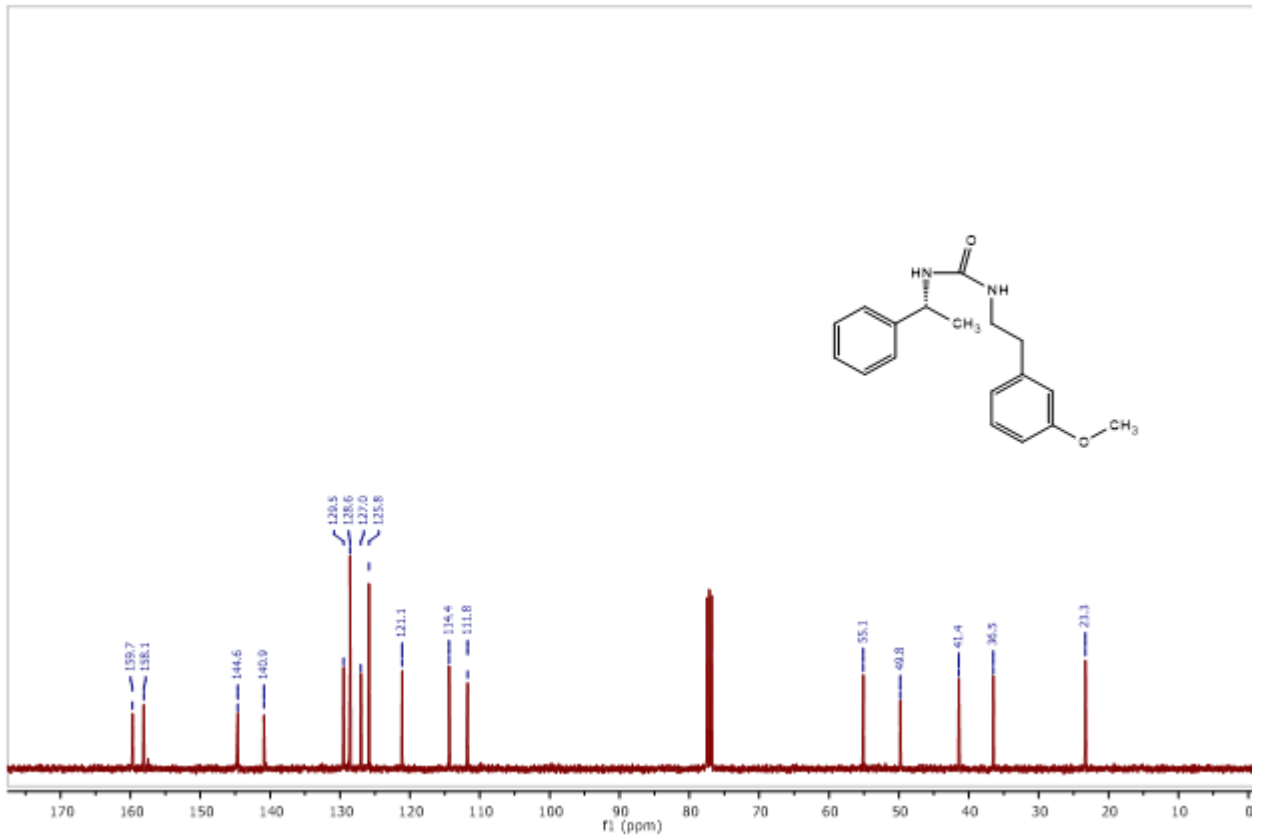
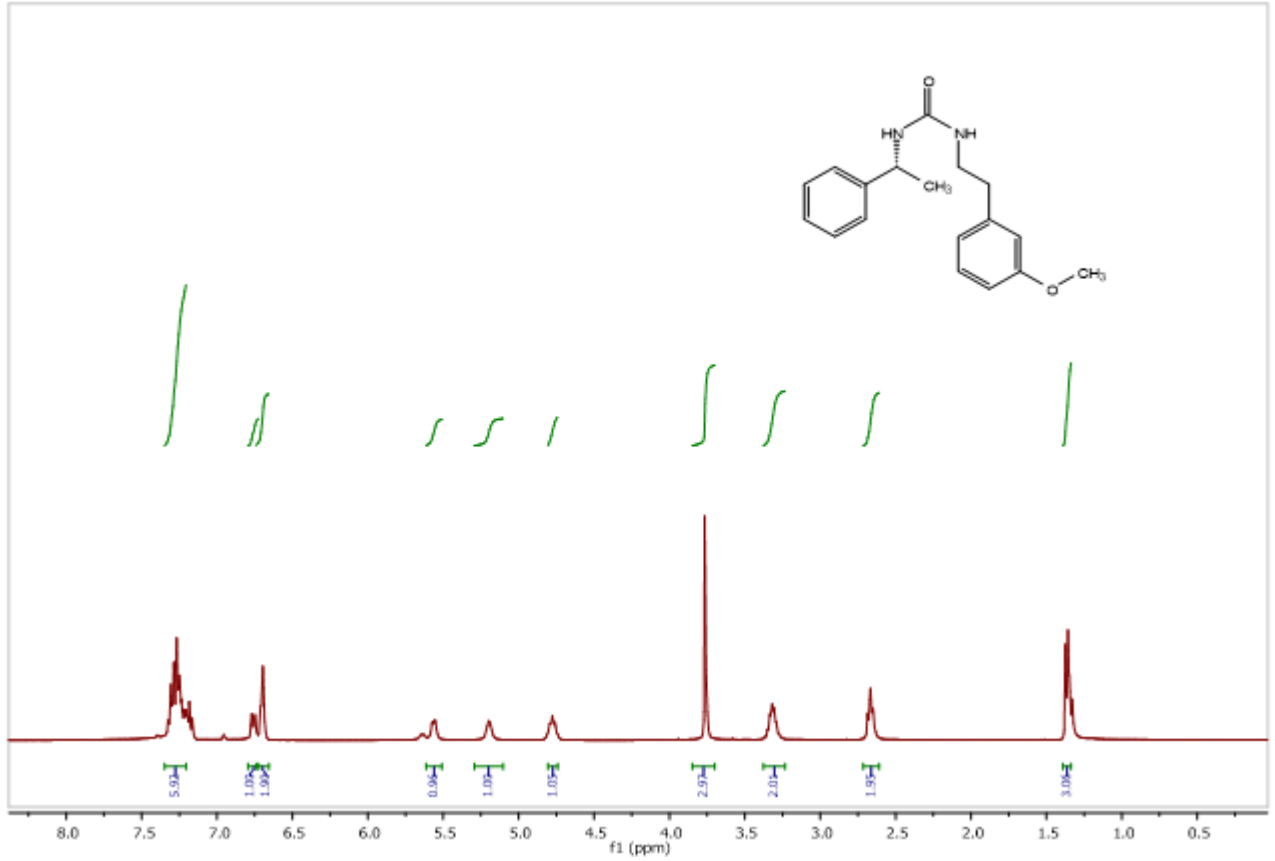




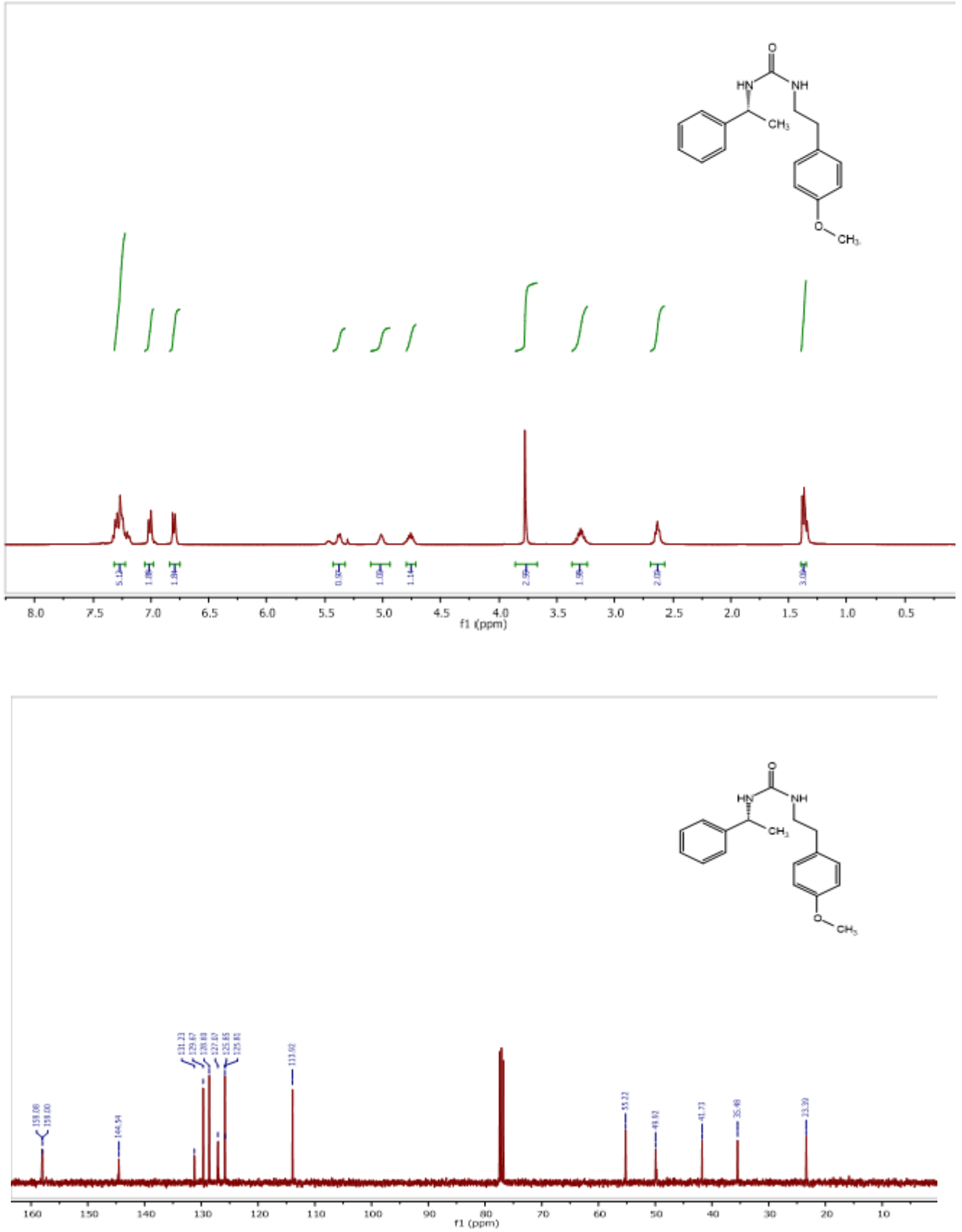
Şekil 2. (R)-1-fenetil-3-(1-feniletıl)üre (9a) bileşiğine ait  $^1\text{H}$ -NMR ve  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumları



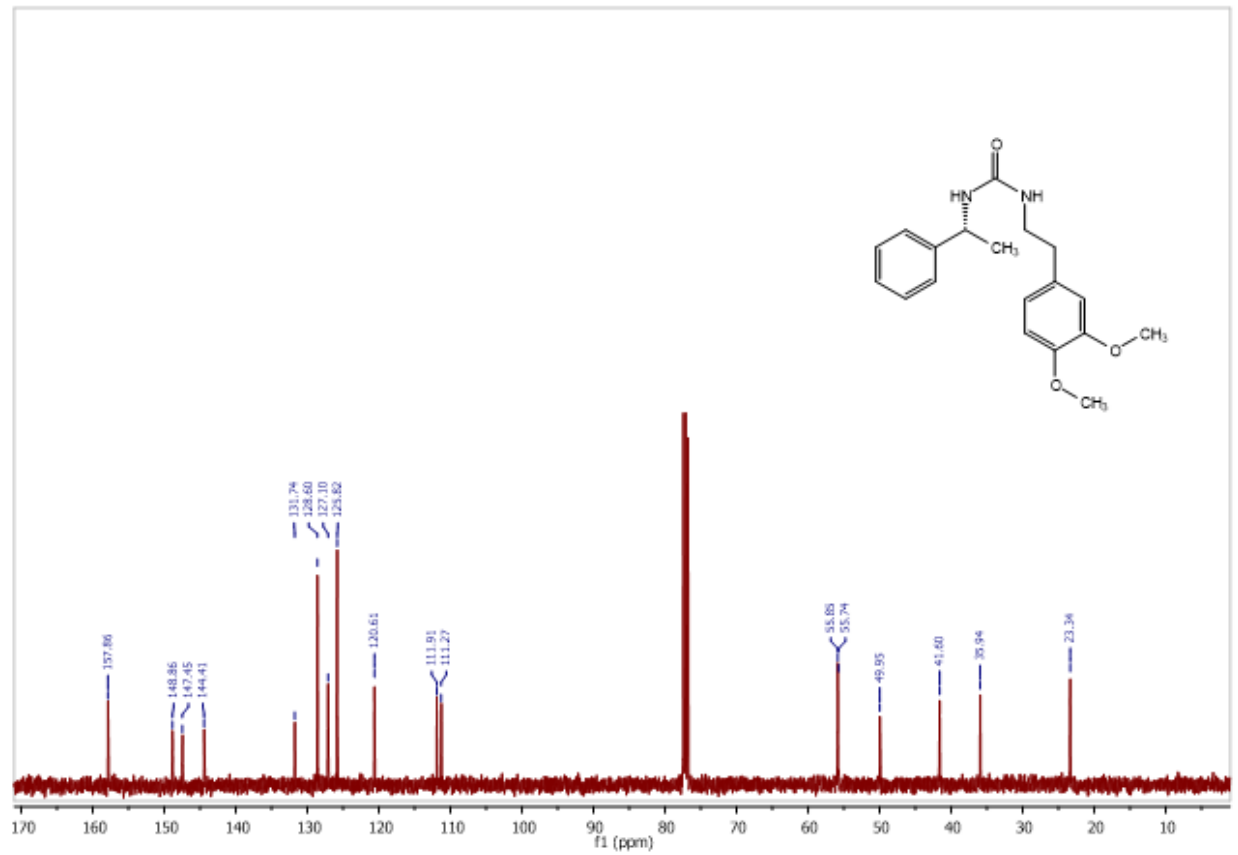
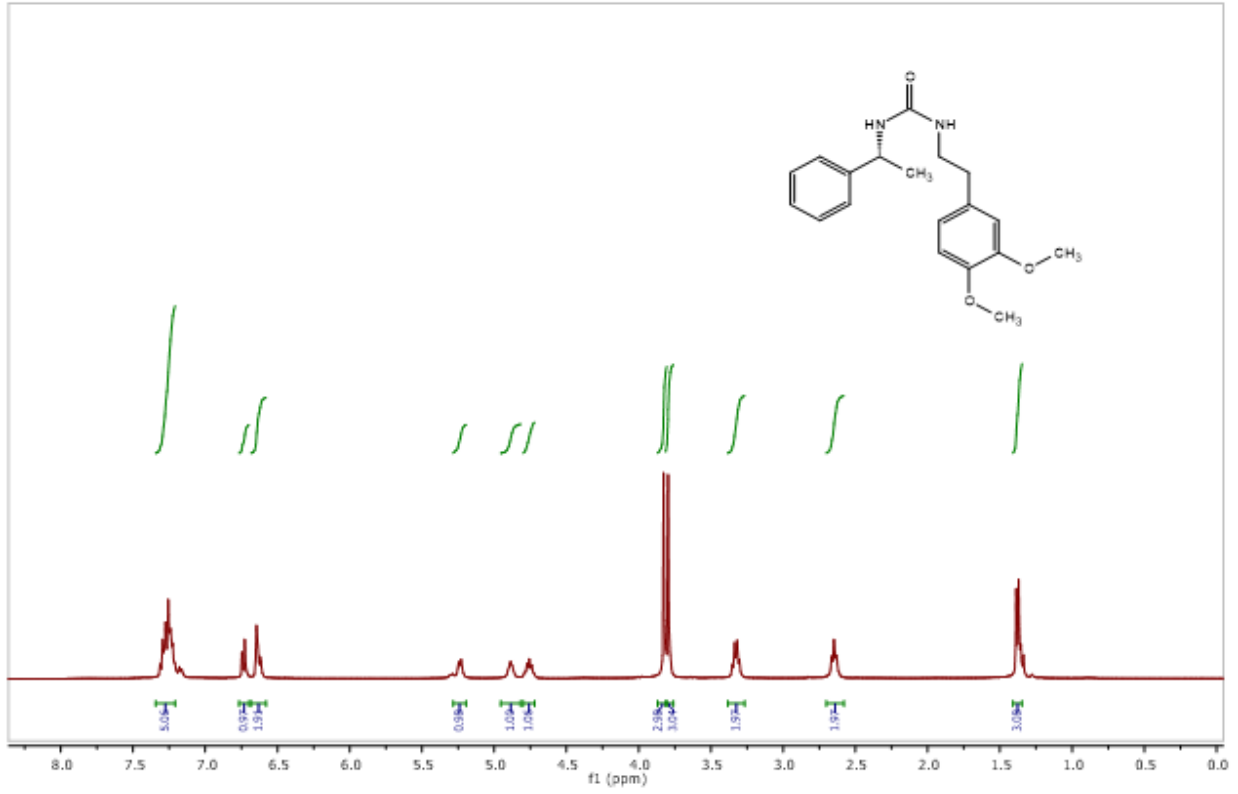
Şekil 3. (R)-1-(2-metoksifenetil)-3-(1-feniletıl)üre (**9b**) bileşiğine ait <sup>1</sup>H-NMR ve <sup>13</sup>C-NMR spektrumları



Şekil 4. (R)-1-(3-metoksifenetil)-3-(1-feniletıl)üre (9c) bileşiğine ait <sup>1</sup>H-NMR ve <sup>13</sup>C-NMR spektrumları



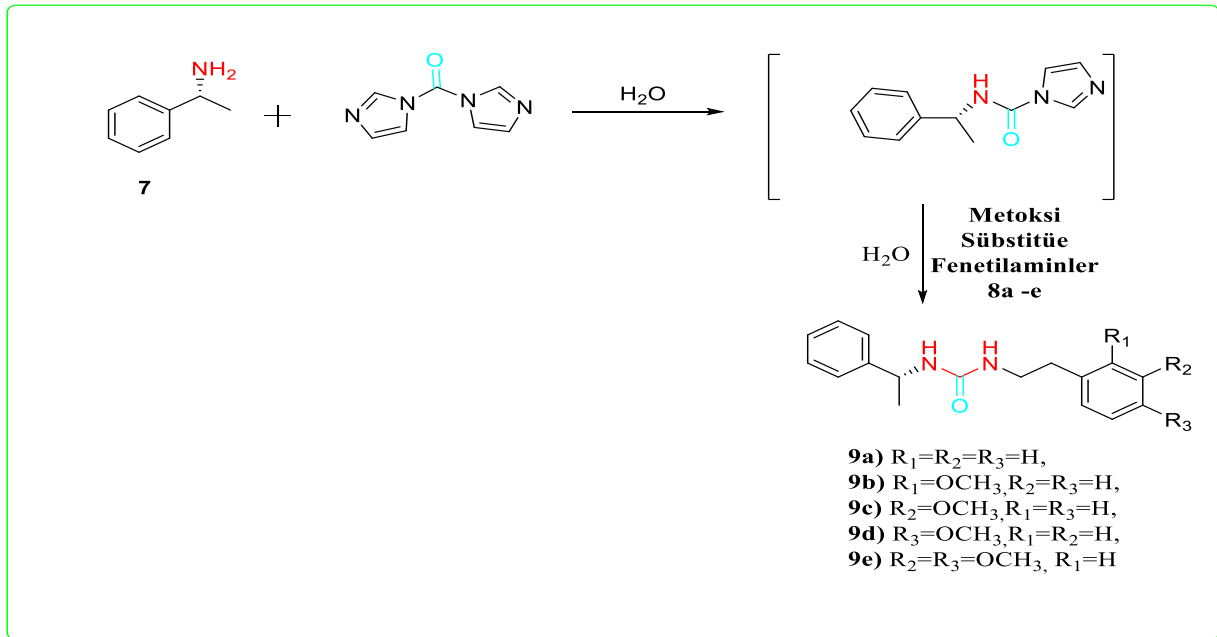
Şekil 5. (R)-1-(4-metoksifenetil)-3-(1-feniletıl)üre (9d) bileşiğine ait <sup>1</sup>H-NMR ve <sup>13</sup>C-NMR spektrumları



Şekil 6. (R)-1-(3,4-dimetoksifenetil)-3-(1-feniletıl)üre (9e) bileşiğine ait <sup>1</sup>H-NMR ve <sup>13</sup>C-NMR spektrumlar

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Literatürde yapılan çalışmalar gösteriyor ki ilaç endüstrisinde üre türevi bileşiklere olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Bununla beraber ayrıca üre fonksiyonel grubu içeren ilaç veya önemli biyolojik aktivite gösteren birçok üre bileşiğinin asimetrik merkeze sahip olduğu ve tek bir enantiyomerinin izole edilerek kullanıldığı görülmektedir. Literatürde bununla ilgili aktivite çalışmalarına bakıldığında çoğu zaman R ve S enantiyomerlerinin farklı aktiviteler sergiledikleri görülmektedir. Aynı bileşiğin izole edilen stereoizomerlerinden biri canlı organizmalarda yıkıma yol açabilecekken diğer izomer ilaç etken molekülü olabilmektedir. Bu da stereoizomerizmin ne kadar önemli olduğunu kanıtlamaktadır. Bu amaç doğrultusunda yaptığımız çalışmada tek bir izomerin kullanılması büyük önem arz etmektedir. Bununla beraber Padiya ve ark., (2012) tarafından bildirilen yöntemle göre ılıman şartlarda, çözücü olarak sadece su ortamında yeşil kimya ile hedef asimetrik ürünlerin sentezlenmesi konunun önemini bir kat daha artırmaktadır. Özgeriş (2020) tarafından yapılan yakın tarihli çalışmalarda ise süstitüe fenetilamin türevlerinden simetrik ve asimetrik üre türevlerinin sentezi gerçekleştirilmiştir (Özgeriş 2020; Özgeriş 2020). Bu bilgiler ışığında potansiyel biyolojik aktif asimetrik hedef bileşikler **9a-e** % 60-68 verimle tarafımızdan ilk kez sentezlenerek literatüre kazandırılmıştır.



Şekil 7. Sentezi yapılan asimetrik üre türevi bileşikler (**9a-e**)

## SONUÇ

Sonuç olarak, birçok biyolojik aktiviteye sahip üre fonksiyonel grubu içeren bileşiklerin yeni potansiyel biyolojik aktif asimetrik türevleri **9a-e** literatüre kazandırılmıştır. Bu reaksiyonlar tek basamakta, çok fazla kimyasal ve zaman harcamadan, ılıman şartlar altında, 1,1'-karbonildiimidazol (CDI) ve çözücü olarak sadece suyun kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Erzurum Teknik Üniversitesi Yüksek Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Organik Kimya Araştırma Laboratuvarında Yapılmıştır. Ayrıca NMR spektrumları Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde alınmıştır. Her iki kurumda teşekkür ederim.

### Çıkar Çatışması

Makaleye ait çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve makalenin yazılması aşamalarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederim.

### Yazar Katkısı

Makalenin planlanması, yürütülmesi ve yazılması makale tek yazarı olarak tarafımda yapıldığı beyan ederim.

### KAYNAKLAR

- Byrne B, Rotchild R, 1999. <sup>1</sup>H NMR studies of drugs with achiral and chiral lanthanide shift reagents: applications to the anticonvulsant pheneturide. *Chirality*, 11 (7): 529-535.
- Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simantov R, Bukowski RM, 2007. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 356 (2): 125–34
- Hofmann C, Penner U, Dorow R, Pertz HH, Jähnichen S, Horowski R, Latté KP, Palla D, Schurad B, 2006. Lisuride, a dopamine receptor agonist with 5-HT<sub>2B</sub> receptor antagonist properties: absence of cardiac valvulopathy adverse drug reaction reports supports the concept of a crucial role for 5-HT<sub>2B</sub> receptor agonism in cardiac valvular fibrosis. *Clin Neuropharmacol*, 29 (2): 80–6.
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. 2008. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 359 (4): 378–90.
- Madhava G, Subbaiah KV, Sreenivasulu R, and Naga Raju C, 2012. Synthesis of novel urea and thiourea derivatives of diphenylphosphoramidate and their antimicrobial activity. *Der Pharmacia Lettre*, 4 (4): 1194-1201.
- Marona-Lewicka D, Kurrasch-Orbaugh DM, Selken JR, Cumbay MG, Lisnicchia JG, Nichols DE, 2002. Re-evaluation of lisuride pharmacology: 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor-mediated behavioral effects overlap its other properties in rats. *Psychopharmacology*, 164 (1): 93–107.
- Matsui J, Funahashi Y, Uenaka T, Watanabe T, Tsuruoka A, Asada M, 2008. Multi-kinase inhibitor E7080 suppresses lymph node and lung metastases of human mammary breast tumor MDA-MB-231 via inhibition of vascular endothelial growth factor-receptor (VEGF-R) 2 and VEGF-R3 kinase. *Clinical Cancer Research*, 14 (17): 5459–65.
- Njoroge FG, Chen KX, Shih NY, Piwinski JJ, 2008. Challenges in modern drug discovery: a case study of boceprevir, an HCV protease inhibitor for the treatment of hepatitis C virus infectio. *Acc. Chem. Res.* 41 (1): 50–9.
- Özgeriş B, 2020. Synthesis of potentially biologically active novel phenolic derivatives of unsymmetrical ureas from substituted phenethylamines. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 151(12): 1851–1857.
- Özgeriş B, 2020. Süstitüe Fenetilaminlerin Bazı Simetrik ve Asimetrik Üre Türevlerinin Sentezi. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 10 (3): 1839-1847.
- Padiya KJ, Gavade S, Kardile B, Tiwari M, Bajare S, Mane M, Gaware V, Varghese S, Harel D, and Kurhade S, 2012. Unprecedented “In Water” Imidazole Carbonylation: Paradigm Shift for Preparation of Urea and Carbamate. *Organic Letters*, 14 (11): 2814–2817.
- Pochampally J, Valeru A, Macha R, Kishorekumar A, Tigulla P, Gandu B, Gangagnirao A, 2014. Design, Efficient new synthesis, evaluation of antimicrobial activity and molecular modelling studies of novel aryl substituted urea derivatives. *Der Pharma Chemica*, 6 (2): 269-282.
- Zeldin RK, Petruschke RA, 2004. Pharmacological and therapeutic properties of ritonavir-boosted protease inhibitor therapy in HIV-infected patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53 (1): 4–9.

**To Cite:** Güller P, 2021. Effects of 4-Ethyl Resorcinol and 5-Methylresorcinol on Human Carbonic Anhydrase-I and Molecular Docking Study. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1385-1392.

## Effects of 4-Ethyl Resorcinol and 5-Methylresorcinol on Human Carbonic Anhydrase-I and Molecular Docking Study

Pınar GÜLLER<sup>1\*</sup>

**ABSTRACT:** Carbonic Anhydrase-I (CA-I) is the most abundant CA isozyme expressed in human erythrocytes and the gastrointestinal (GI) tract. CA-I acts in promoting biocalcification. It is well known that inhibitors of carbonic anhydrase (CAIs) are widely used in the remedy of some diseases such as edema, glaucoma, idiopathic intracranial hypertension, and osteoporosis. So, in this study, it was aimed to analyze primer effects of 4-ethylresorcinol and 5-methylresorcinol on hCA-I and to clarify inhibition profiles of compounds. For this purpose, firstly hCA-I was isolated from human erythrocytes by affinity chromatography. Secondly, *in vitro* inhibition studies were performed and interactions between compounds and enzyme were explained via molecular docking study. Both 4-ethylresorcinol and 5-methylresorcinol inhibited the enzyme competitively with  $K_i$  constant of  $0.81 \pm 0.23$  and  $0.79 \pm 0.14$   $\mu\text{M}$ . According to molecular docking analysis estimated free energy of binding of compounds were predicted as  $-4.81$  and  $-4.51$   $\text{kcal.mol}^{-1}$  respectively.

**Keywords:** Binding energy, carbonic anhydrase-1, inhibition, *in vitro*, molecular docking, resorcinol

<sup>1</sup>Pınar GÜLLER ([Orcid ID: 0000-0001-8482-7889](https://orcid.org/0000-0001-8482-7889)), Atatürk University, Faculty of Science, Department of Chemistry, Erzurum, Turkey

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Pınar GÜLLER, e-mail: ptaser@atauni.edu.tr



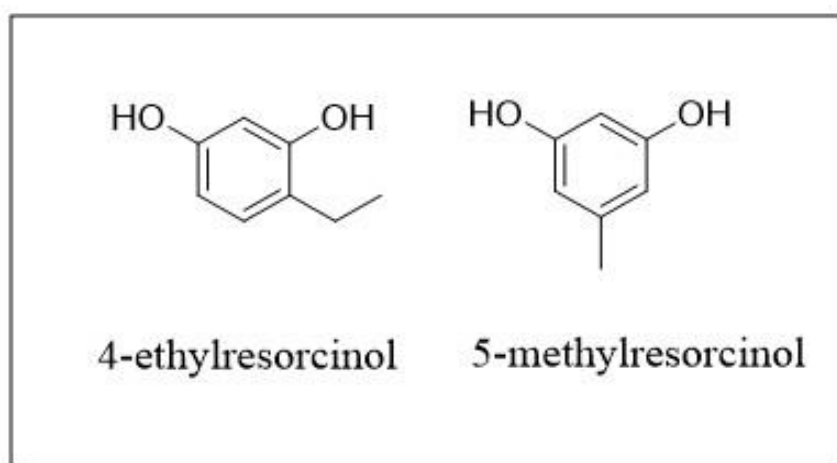
## INTRODUCTION

Carbonic Anhydrase-I (CA-I) is one of the  $\alpha$ -class CA isozymes that catalyzes the reversible conversion of carbon dioxide to bicarbonate and proton.  $\text{CO}_2$ , which is the result of oxidation metabolism, needs to be converted to water-soluble form in order to prevent cellular organelles and membrane from its damage (Aggarwal and McKenna, 2012; Alterio et al., 2012). CA-I is the cytosolic enzyme and is also largely expressed in human erythrocytes and the gastrointestinal (GI) tract. CA-I and CA-II are the only isoforms that are 62.3% identical and known to be present in erythrocytes (Supuran, 2008). The amount of CA-I is five times more than that of CA-II in erythrocyte cells, but its activity is half the total CA activity in these cells because it is less active (Supuran et al., 2003). Under normal physiological conditions, the hydration activity of CA-I decreases by 92%. Despite its low activity, the importance of CA-I is uncertain (Maren et al., 1976; Sly and Hu, 1995; Supuran et al., 2005). It is thought that in the absence of CA-II, CA-I may compensate for possible loss of CA-II. It was reported that in patients with CA-II deficiency CA-I was expressed a higher level in red blood cells, which compensated for the absence of CA-II (Sly et al., 1983).  $\text{HCO}_3^-$  which is the product of the reaction catalyzed by CA, rapidly binds Ca and forms calcium carbonate. CA-I can promote arthritis calcification, arthrosis fusion, and ossification by expediting calcium carbonate accumulation (Chang et al., 2012; Zheng et al., 2012).

Besides, in the case of breast cancer, the expression of CA-I increases at a high rate in cancerous tissue and blood and this situation causes calcification of the tumor tissue and suppression of apoptosis (Zheng et al., 2015). CA-I expression and cell calcification are suppressed when AZA (Acetazolamide), which is one of the most frequently used CA inhibitors in the clinical treatment of glaucoma, was applied to cancer cells (Chang et al., 2012; Zheng et al., 2015).

Considering the role of CA-I in promoting biocalcification, the aim of our study is to search for new CA-I inhibitors and draw attention to these inhibitors for clinical use. For this purpose, inhibition effects of 4-ethylresorcinol and 5-methylresorcinol (Figure 1) were investigated on hCA-I via both *in vitro* and *in silico* methods.

Resorcinols are known as well-rounded chemicals that can be easily used by chemists in many fields from medicine to industry to benefit living things. For example, mono-alkyl substituted resorcinols show great antiseptic properties and are widely used in a variety of therapeutic and agricultural applications. 2-alkyl substituted resorcinols have been used as a basic material in the synthesis of various pharmaceutical and agricultural reagents. Besides, 4-hexylresorcinol is used in cosmetic applications as well as pharmaceutical applications (Durairaj, 2005).



**Figure 1.** Structure of compounds of which inhibition mechanisms were studied on hCA-I

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Sepharose-4B, p-nitrophenyl acetate (PNF), dialysis bag and L-tyrosine were procured from Sigma Chem. Co. and all other chemicals from E. Merck AG. 5-methylresorcinol, and 4-ethylresorcinol were obtained from Sigma and Acros. The human erythrocyte was taken from the Turkish Red Crescent Blood Centre (Erzurum Branch).

### Methods

#### Enzyme assay

CA-I was assayed according to its esterase activity put by Verpoorte et al. (1967). The carbonic anhydrase enzyme catalyzes the hydrolysis of p-nitrophenylacetate (PNF) to p-nitrophenol or p-nitrophenylate ion which gives maximum absorption at 348 nm.

#### Purification of hCA-I via affinity chromatography

Erythrocytes obtained from the Erzurum Turkish Red Crescent, were hemolysis by stirring with five volume of ice water and cell membrane waste was precipitated by the centrifugation method for 15 min at 10 000 rpm. Before hemolysate was loaded to the Sepharose 4B-L-tyrosine-sulfanylamide column the pH of it was step up to 8.7 by using Tris (Ekinici et al., 2007; Adem et al., 2019). Column was washed with 25 mM Tris/HCl buffer (pH 8.7) including 22 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to clean other proteins adsorbed to the column. Then CA-I was eluted with 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer (pH 6.3) containing 1 M NaCl. The active eluates were combined and dialyzed against the 50 mM Tris/SO<sub>4</sub> buffer at pH 7.4. All experiments were carried out at 4°C and active enzyme solutions were stored at -20°C for use in inhibition studies.

#### Inhibition studies

For analyzing the *in vitro* inhibition effects of 4-ethylresorcinol and 5-methylresorcinol on hCA-I, activities of enzyme were assayed at five various concentrations of compounds. The activity determined in the inhibitor's absence was taken consider as 100% activity. Activities in the presence of inhibitor were calculated and Activity%-[compound] graphs were plotted and the amount of inhibitor that reduced activity by 50% (IC<sub>50</sub>) was calculated for the compounds from these plots. Activities were assayed at three various compound concentrations and five various substrate concentrations, then 1/V-1/S values were calculated and Lineweaver-Burk graphs were created. K<sub>i</sub> values and inhibition types were determined via these graphs (Lineweaver and Burk, 1934).

#### Molecular docking studies

Possible docking modes between molecules and hCA-I were studied by using the AutoDock4 (Morris et al., 2009). The crystal structures of hCA-I (PDB code: 3LXE) (Alterio et al., 2010) was used in docking calculations and its pdb file was downloaded from protein data bank (<http://www.rcsb.org/pdb>). To prepare the protein Autodock tool was used, water molecules and other unnecessary atoms were deleted, polar H atoms were added, missing atoms were checked, and Kollman charge was added. To calculate the energetic map, a grid spacing of 0.375 Å was employed. Pdb files of ligands were converted from sdf file obtained by ChemDraw through Avogadro software. Number of torsion of ligand was set. Then, pdbqt files were prepared and saved by using Autodock tool. The appropriate binding positions, orientations, and conformations of ligands were determined by using the Lamarckian genetic algorithm. The results files were analyzed using Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) Support Server. AZA (Acetazolamide) was used as standard inhibitor for hCA-I.

## RESULTS AND DISCUSSIONS

In respect of the reaction catalyzed by CAs, they play an important role in physiological functions such as respiration, pH and CO<sub>2</sub> homeostasis, electrolyte secretion and lipogenesis (Gulcin et al., 2016; Imran et al., 2016).

Up to now, it was also reported that so many compounds such as hydroxyl and phenolic compounds, tetra-pyridine-triazole-substituted phthalocyanines, some uracil derivatives, acridine bis-sulfonamides, 1,3-bis-chalcone derivatives, pyrazole derivatives, 5-methyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-one's aryl Schiff base derivatives, ureido benzenesulfonamides, chalcone substituted benzenesulfonamides, chalcones derivatives bearing morpholine moiety, Schiff bases of sulfa drugs, and alicinaldehyde-N-methylp-toluenesulfonylhydrazone were inhibited hCAs (Alyar and Adem, 2014; Esirden et al., 2015; Arslan et al., 2016; Salmas et al., 2016; Turkoglu et al., 2017; Alyar et al., 2018; Kursun Aktar et al., 2018; Lolak et al., 2019; Ozil et al., 2019; Turkan et al., 2019; Tutar et al., 2019; Arslan et al., 2020). Common CAIs such as acetazolamide (AAZ), celecoxib (CLX), ethoxzolamide (EZA), and methazolamide (MZA) have been reported as useful drugs in the treatment of many diseases such as glaucoma, edema, osteoporosis, idiopathic intracranial hypertension (Ahlskog et al., 2009).

In this research, inhibition effects of 4-ethylresorcinol and 5-methylresorcinol were examined on hCA-I through *in vitro* studies. Firstly, human erythrocytes CA-I isozyme was isolated via Sepharose-4B L-tyrosine-sulphanilamide affinity chromatography. Then inhibition studies were performed, enzyme activities were assayed considering the inhibition by reference to PNF on basis of esterase activity. As summarized in Table 1, compounds inhibit enzyme at micromolar level. *In vitro* inhibition results were found in agreement with previous results in the study regarding the effects of indole-1,2,3-triazole chalcone hybrids ( $K_i$  was found in a range of 0.18  $\mu$ M-5.5  $\mu$ M) and pyrazole-3,4-dicarboxamides ( $K_i$  was found in ranging from 0.11  $\mu$ M to 1.66  $\mu$ M) (Mert et al., 2016; Singh et al., 2020).

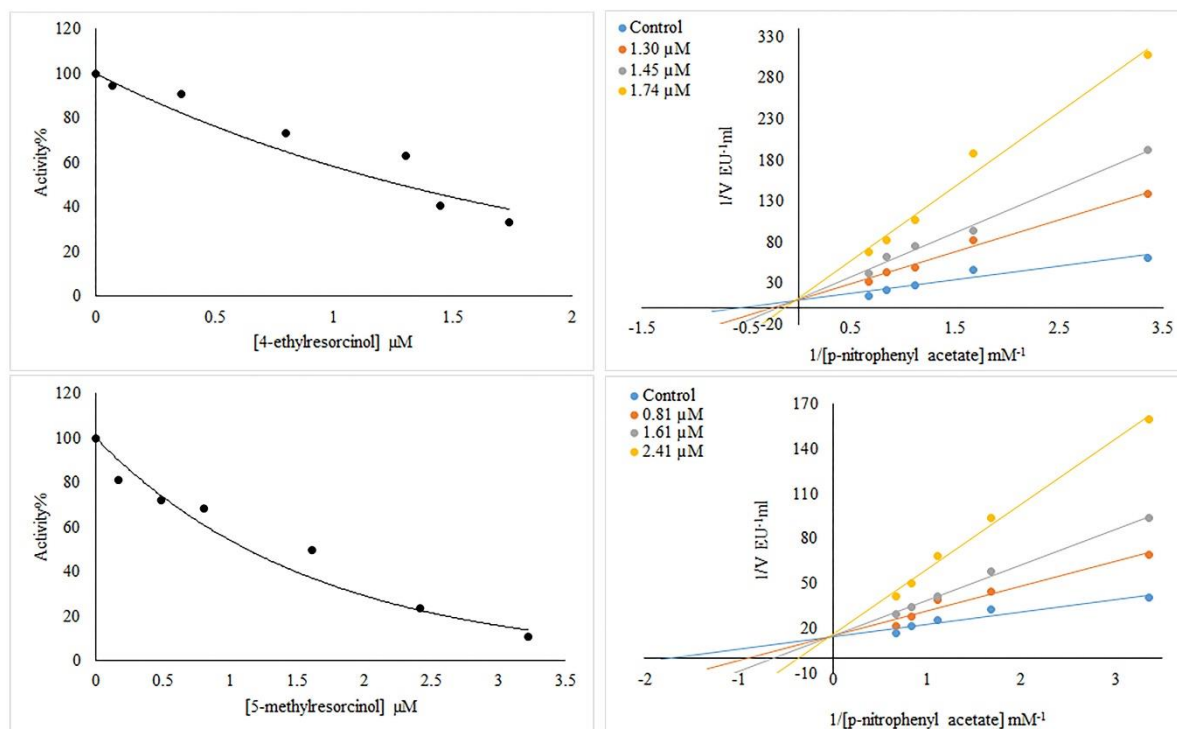
**Table 1.** *In vitro* inhibition results of 4-ethylresorcinol and 5-methylresorcinol on hCA-I

| Inhibitor          | IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) | R <sup>2</sup> | K <sub>i</sub> ( $\mu$ M) | Inhibition Type |
|--------------------|-----------------------------|----------------|---------------------------|-----------------|
| 4-ethylresorcinol  | 1.27                        | 0.900          | 0.81±0.23                 | Competitive     |
| 5-methylresorcinol | 1.12                        | 0.955          | 0.79±0.14                 | Competitive     |

The inhibitory constant ( $K_i$ ) of 4-ethylresorcinol and 5-methylresorcinol were found as 0.81±0.23  $\mu$ M and 0.79±0.14  $\mu$ M respectively. As seen from Figure 2, it was found that both compounds inhibited the enzyme as competitively; that is, inhibitors have competed with PNF in binding to the active site of the enzyme. It was concluded that the inhibitory effects of 4-ethylresorcinol and 5-methylresorcinol were higher than calix [4] azacrown substituted sulphonamides and some cardiac drugs (Argan et al., 2020; Oguz et al., 2020).

Inhibition mechanisms of CAIs were classified as five different mechanisms (Supuran, 2016,2017). Since the inhibition type was found competitive inhibition, it was predicted from *in vitro* experiments that compounds inhibited hCA-I by binding to the active site such as 2-(benzylsulfonyl) benzoic acid (D'Ambrosio et al., 2015; Supuran, 2016).

To get insight the interactions between compounds and enzyme, molecular docking was also performed and summarized in Table 2. The estimated free energy of binding was calculated as -4.81, -4.51, and -5.75 kcal.mol<sup>-1</sup> for 4-ethylresorcinol, 5-methylresorcinol and AZA respectively.



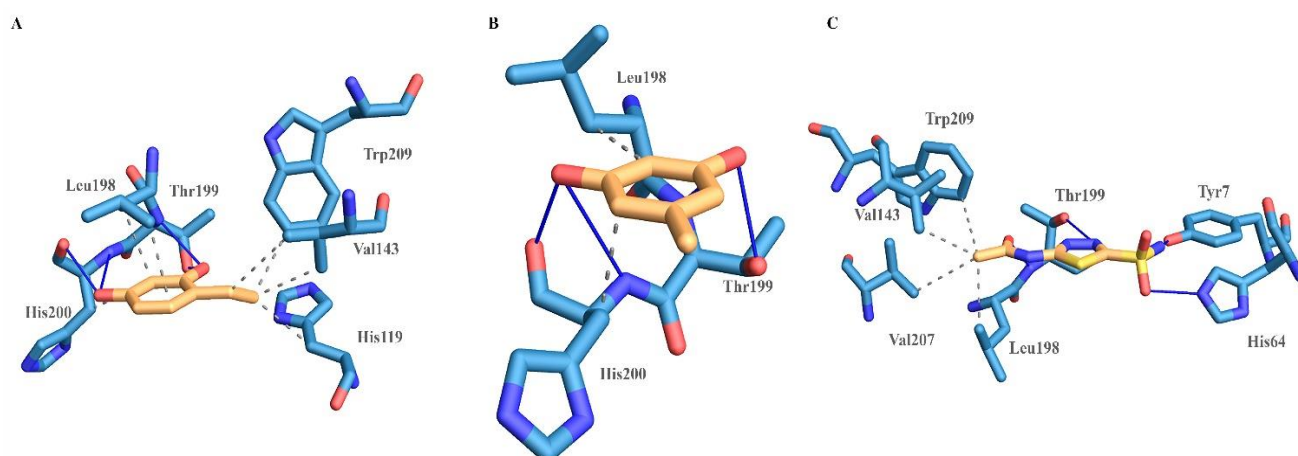
**Figure 2.** Activity%-[compound] graphs and Lineweaver-Burk graphs of 4-ethylresorcinol and 5-methylresorcinol

**Table 2.** Results of binding energies, and ligand interaction types of 4-ethylresorcinol and 5-methylresorcinol with hCA-I (PDB: 3LXE)

| Ligand             | Estimated Free Energy of Binding (kcal.mol <sup>-1</sup> ) | H-bond              | Hydrophobic Interaction                |
|--------------------|--|---------------------|--|
| 4-ethylresorcinol  | -4.81  | Thr199, His200      | His119, Val143, Leu198, His200, Trp209 |
| 5-methylresorcinol | -4.51  | Thr199, His200      | Leu198, His200                         |
| AZA*               | -5.75  | Tyr7, His64, Thr199 | Val143, Leu198, Val207, Trp209         |

\* AZA was used as standard inhibitor for hCA-I

It was seen that AZA had three hydrogen bonds with the Tyr7, His64, Thr199 residues of enzyme and interacted hydrophobically at the residues of Val143, Leu198, Val207, Trp209. The estimated binding free energy of AZA was -5.75 kcal.mol<sup>-1</sup>, which is lower than the other two compounds. It can be concluded that its higher potency of inhibition can be due to the H-bonds. 4-ethylresorcinol showed hydrogen bonds with the Thr199 (two hydrogen bonds), and His200 (two hydrogen bonds) residues of the hCA-I on its OH moiety. In addition to that, the molecule exhibited several hydrophobic interactions with the His119, Val143, Leu198, His200, and Trp209 residues (see Figure 3A). Probably due to these interactions 4-ethylresorcinol showed higher potency than 5-methylresorcinol to inhibit hCA-I. The hydrophobic interaction of 4-ethyl resorcinol is similar to that of AZA. Lowest energy conformer of 5-methylresorcinol showed four hydrogen bonds at the active site of hCA-I. One of the oxygen atoms of hydroxyl moiety of the compound acted as hydrogen bond acceptor to form two H-bond with Thr199 with a distance of 3.01 Å and 2.91 Å, respectively. The oxygen atom of other hydroxyl moiety of it acted as hydrogen bond donor against His200 with a distance of 3.83 Å and 2.82 Å. Additionally, two hydrophobic interactions were observed between 5-methylresorcinol and the active site residues of hCA-I. The interactions were displayed in Figure 3B. On the basis, it could deduce from molecular docking study that both compounds showed inhibition potency through interacting with the active pocket of hCA-I.



**Figure 3.** Potential binding modes of **A)** 4-ethylresorcinol, **B)** 5-methylresorcinol and **C)** AZA with hCA-I

## CONCLUSION

In the present work, inhibition abilities of 4-ethylresorcinol and 5-methylresorcinol on pharmacologically significant human carbonic anhydrases hCA-I was evaluated. Both compounds showed good inhibition profiles against the enzyme and acted as competitive inhibitor.  $K_i$  values were found to be  $0.81 \pm 0.23 \mu\text{M}$  and  $0.79 \pm 0.14 \mu\text{M}$  respectively. Hydrogen bonds and hydrophobic interactions were found to be dominant in inhibition mechanism of these molecules on hCA-I with estimated free energy of binding  $-4.81$  and  $-4.51 \text{ kcal.mol}^{-1}$  respectively. Moving on these, it seems that 4-ethylresorcinol and 5-methylresorcinol can give an idea on the synthesis of novel inhibitors to be used in the drug design in the case of where hCA-I's activity should be targeted.

## Conflict of Interest

I declare that there is no conflict of interest during the planning, execution and writing of the article.

## Author's Contributions

I hereby declare that the planning, execution and writing of the article was done by me as the sole author of the article.

## REFERENCES

- Adem S, Akkemik E, Aksit H, Guller P, Tufekci AR, Demirtas I, Ciftci M, 2019. Activation and Inhibition Effects of Some Natural Products on Human Cytosolic Cai and Caii. *Medicinal Chemistry Research* 28(5): 711-722.
- Aggarwal M, McKenna R, 2012. Update on Carbonic Anhydrase Inhibitors: A Patent Review (2008-2011). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 22(8): 903-915.
- Ahlskog JKJ, Dumelin CE, Trussel S, Marlind J, Neri D, 2009. In Vivo Targeting of Tumor-Associated Carbonic Anhydrases Using Acetazolamide Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19(16): 4851-4856.
- Alterio V, Di Fiore A, D'Ambrosio K, Supuran CT, De Simone G, 2012. Multiple Binding Modes of Inhibitors to Carbonic Anhydrases: How to Design Specific Drugs Targeting 15 Different Isoforms? *Chemical Reviews* 112(8): 4421-4468.
- Alterio V, Monti SM, Truppo E, Pedone C, Supuran CT, De Simone G, 2010. The First Example of a Significant Active Site Conformational Rearrangement in a Carbonic Anhydrase-Inhibitor Adduct: The Carbonic Anhydrase I-Topiramate Complex. *Organic & Biomolecular Chemistry* 8(15): 3528-3533.

- Alyar S, Adem S, 2014. Synthesis, Characterization, Antimicrobial Activity and Carbonic Anhydrase Enzyme Inhibitor Effects of Salicylaldehyde-N-Methyl P-Toluenesulfonylhydrazone and Its Palladium(II), Cobalt(II) Complexes. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 131: 294-302.
- Alyar S, Sen CH, Alyar H, Adem S, Kalkanç A, Özdemir UO, 2018. Synthesis, Characterization, Antimicrobial Activity, Carbonic Anhydrase Enzyme Inhibitor Effects, and Computational Studies on New Schiff Bases of Sulfa Drugs and Their Pd(II), Cu(II) Complexes. *Journal of Molecular Structure* 1171: 214-222.
- Argan O, Cıkrıkcı K, Baltacı A, Gencer N, 2020. The Effects of Cardiac Drugs on Human Erythrocyte Carbonic Anhydrase I and II Isozymes. *J Enzyme Inhib Med Chem* 35(1): 1359-1362.
- Arslan T, Ceylan MB, Bas H, Biyıklıoğlu Z, Senturk M, 2020. Design, Synthesis, Characterization of Peripherally Tetra-Pyridine-Triazole-Substituted Phthalocyanines and Their Inhibitory Effects on Cholinesterases (Ache/Bche) and Carbonic Anhydrases (Hca I, II and IX). *Dalton Transactions* 49(1): 203-209.
- Arslan T, Turkoglu EA, Senturk M, Supuran CT, 2016. Synthesis and Carbonic Anhydrase Inhibitory Properties of Novel Chalcone Substituted Benzenesulfonamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 26(24): 5867-5870.
- Chang XT, Zheng YB, Yang QR, Wang L, Pan JH, Xia YF, Yan XF, Han JX, 2012. Carbonic Anhydrase I (Ca1) Is Involved in the Process of Bone Formation and Is Susceptible to Ankylosing Spondylitis. *Arthritis Research & Therapy* 14(4).
- D'Ambrosio K, Carradori S, Monti SM, Buonanno M, Secci D, Vullo D, Supuran CT, De Simone G, 2015. Out of the Active Site Binding Pocket for Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Chemical Communications* 51(2): 302-305.
- Durairaj RB, 2005. *Resorcinol : Chemistry, Technology, and Applications*. Berlin ; New York, Springer.
- Ekinçi D, Beydemir S, Kufrevioğlu OI, 2007. In Vitro Inhibitory Effects of Some Heavy Metals on Human Erythrocyte Carbonic Anhydrases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 22(6): 745-750.
- Esirden I, Ulus R, Aday B, Tanc M, Supuran CT, Kaya M, 2015. Synthesis of Novel Acridine Bis-Sulfonamides with Effective Inhibitory Activity against the Carbonic Anhydrase Isoforms I, II, IX and XII. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 23(20): 6573-6580.
- Gulcin I, Scozzafava A, Supuran CT, Akincioglu H, Koksall Z, Turkan F, Alwasel S, 2016. The Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester (Cape) on Metabolic Enzymes Including Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, Glutathione S-Transferase, Lactoperoxidase, and Carbonic Anhydrase Isoenzymes I, II, IX, and XII. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 31(6): 1095-1101.
- Imran S, Taha M, Ismail NH, Fayyaz S, Khan KM, Choudhary MI, 2016. Synthesis of Novel Bisindolylmethanes: New Carbonic Anhydrase II Inhibitors, Docking, and 3d Pharmacophore Studies. *Bioorganic Chemistry* 68: 90-104.
- Kursun Aktar BS, Oruc-Emre EE, Demirtas I, Sahin Yaglioglu A, Karakucuk Iyidogan A, Guler C, Adem S, 2018. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Chalcones Bearing Morpholine Moiety as Antiproliferative Agents. *Turkish Journal of Chemistry* 42(2): 482-+.
- Lineweaver H, Burk D, 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society* 56: 658-666.
- Lolak N, Akocak S, Bua S, Sanku RKK, Supuran CT, 2019. Discovery of New Ureido Benzenesulfonamides Incorporating 1,3,5-Triazine Moieties as Carbonic Anhydrase I, II, IX and XII Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 27(8): 1588-1594.
- Maren TH, Rayburn CS, Liddell NE, 1976. Inhibition by Anions of Human Red-Cell Carbonic Anhydrase-B - Physiological and Biochemical Implications. *Science* 191(4226): 469-472.
- Mert S, Alim Z, Isgor MM, Beydemir S, Kasimogullari R, 2016. The Synthesis of Novel Pyrazole-3,4-Dicarboxamides Bearing 5-Amino-1,3,4-Thiadiazole-2-Sulfonamide Moiety with Effective Inhibitory Activity against the Isoforms of Human Cytosolic Carbonic Anhydrase I and II. *Bioorganic Chemistry* 68: 64-71.
- Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ, 2009. Autodock4 and Autodocktools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of Computational Chemistry* 30(16): 2785-2791.
- Oguz M, Kalay E, Akocak S, Nocentini A, Lolak N, Boga M, Yilmaz M, Supuran CT, 2020. Synthesis of Calix[4]Azacrown Substituted Sulphonamides with Antioxidant, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, Tyrosinase and Carbonic Anhydrase Inhibitory Action. *J Enzyme Inhib Med Chem* 35(1): 1215-1223.

- Ozil M, Balaydin HT, Senturk M, 2019. Synthesis of 5-Methyl-2,4-Dihydro-3h-1,2,4-Triazole-3-One's Aryl Schiff Base Derivatives and Investigation of Carbonic Anhydrase and Cholinesterase (Ache, Buche) Inhibitory Properties. *Bioorganic Chemistry* 86: 705-713.
- Salmas RE, Mestanoglu M, Durdagi S, Senturk M, Kaya AA, Kaya EC, 2016. Kinetic and in Silico Studies of Hydroxy-Based Inhibitors of Carbonic Anhydrase Isoforms I and II. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 31(1): 31-37.
- Singh P, Swain B, Thacker PS, Sigalapalli DK, Purnachander Yadav P, Angeli A, Supuran CT, Arifuddin M, 2020. Synthesis and Carbonic Anhydrase Inhibition Studies of Sulfonamide Based Indole-1,2,3-Triazole Chalcone Hybrids. *Bioorganic Chemistry* 99: 103839.
- Sly WS, Hu PY, 1995. Human Carbonic-Anhydrases and Carbonic-Anhydrase Deficiencies. *Annual Review of Biochemistry* 64: 375-401.
- Sly WS, Whyte M, Hewettemmett D, Yu YSL, Tashian RE, 1983. Carbonic Anhydrase-II Deficiency Identified as the Primary Defect in the Autosomal Recessive Syndrome of Osteopetrosis with Renal Tubular-Acidosis and Cerebral Calcification. *Clinical Research* 31(2): A456-A456.
- Supuran CT, 2008. Carbonic Anhydrases: Novel Therapeutic Applications for Inhibitors and Activators. *Nature Reviews Drug Discovery* 7(2): 168-181.
- Supuran CT, 2016. How Many Carbonic Anhydrase Inhibition Mechanisms Exist? *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 31(3): 345-360.
- Supuran CT, 2017. Advances in Structure-Based Drug Discovery of Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Expert Opinion on Drug Discovery* 12(1): 61-88.
- Supuran CT, Scozzafava A, Casini A, 2003. Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Medicinal Research Reviews* 23(2): 146-189.
- Supuran CT, Scozzafava A, Conway J, 2005. Carbonic Anhydrase: Its Inhibitors and Activators, MA: Taylor and Francis.
- Turkan F, Cetin A, Taslimi P, Karaman M, Gulcin I, 2019. Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking of Novel Pyrazole Derivatives as Potent Carbonic Anhydrase and Acetylcholinesterase Inhibitors. *Bioorganic Chemistry* 86: 420-427.
- Turkoglu EA, Senturk M, Supuran CT, Ekinci D, 2017. Carbonic Anhydrase Inhibitory Properties of Some Uracil Derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 32(1): 74-77.
- Tutar U, Kocyigit UM, Gezegen H, 2019. Evaluation of Antimicrobial, Antibiofilm and Carbonic Anhydrase Inhibition Profiles of 1,3-Bis-Chalcone Derivatives. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 33(4).
- Verpoorte JA, Mehta S, Edsall JT, 1967. Esterase Activities of Human Carbonic Anhydrases B and C. *The Journal of Biological Chemistry* 242: 4221-4229.
- Zheng YB, Wang L, Zhang W, Xu HW, Chang XT, 2012. Transgenic Mice over-Expressing Carbonic Anhydrase I Showed Aggravated Joint Inflammation and Tissue Destruction. *Bmc Musculoskeletal Disorders* 13.
- Zheng YB, Xu B, Zhao Y, Gu H, Li C, Wang Y, Chang XT, 2015. Ca1 Contributes to Microcalcification and Tumourigenesis in Breast Cancer. *Bmc Cancer* 15.

**Atf İçin:** Torğut G, Gürler N, 2021. Grafen Katkılı Nişasta Filmlerinin Dielektrik Özelliklerinin Geniş Frekans Aralığında İncelenmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1393-1401.

**To Cite:** Torğut G, Gürler N, 2021. Investigation of Dielectric Properties of Graphene Filled Starch Films in Wide Frequency Range. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1393-1401.

## Grafen Katkılı Nişasta Filmlerinin Dielektrik Özelliklerinin Geniş Frekans Aralığında İncelenmesi

Gülben TORĞUT<sup>1</sup>, Nedim GÜRLER<sup>2\*</sup>

**ÖZET:** Bu çalışmada, gliserol ile plastikleştirilmiş patates nişastası (PN) filmlerine, farklı oranlarda (% 0.5, 1, 2) grafen (G) eklenerek döküm yöntemi ile hazırlanmış filmlerin dielektrik sabiti, dielektrik kayıp ve kayıp tanjantı gibi bazı dielektrik özelliklerinin frekansla değişimleri incelendi. PN'nın saf hali ve G ile hazırlanmış kompozitlerinin (PNG0.5, PNG1 ve PNG2) dielektrik sabiti ( $\epsilon'$ ), dielektrik kayıp faktörü ( $\epsilon''$ ) ve kayıp tanjantı ( $\tan\delta$ ) değerleri oda sıcaklığında frekansın bir fonksiyonu olarak (100 Hz ile 10 kHz arasında) empedans analizör cihazı ile belirlendi. Nişastanın 1 kHz sabit frekans ve oda sıcaklığındaki dielektrik sabiti, dielektrik kayıp ve kayıp tanjantı değerleri sırasıyla 9.20, 4.45 ve 0.48 olarak bulundu. Ayrıca, farklı oranlarda G miktarının (ağırlıkça %0.5, %1 ve %2) filmlerin dielektrik özellikleri üzerindeki etkisi araştırıldı. G konsantrasyonu arttıkça dielektrik sabiti, dielektrik kayıp ve kayıp tanjantı değerlerinde, saf nişastaya göre önemli artış olduğu gözlemlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Film, grafen, dielektrik sabiti, dielektrik kayıp

### Investigation of Dielectric Properties of Graphene Filled Starch Films in Wide Frequency Range

**ABSTRACT:** In this study, the change of some dielectric properties such as dielectric constant, dielectric loss and loss tangent of films prepared by casting method by adding graphene (G) in different proportions (% wt 0.5, 1, 2) to potato starch (PS) films plasticized with glycerol were investigated. Dielectric constant ( $\epsilon'$ ), dielectric loss ( $\epsilon''$ ) and loss tangent ( $\tan\delta$ ) values of pure PS and its composites prepared with G (PSG0.5, PSG1 and PSG2) were determined by impedance analyzer as a function of frequency (between 100 Hz and 10 kHz) at room temperature. The dielectric constant, dielectric loss factor and loss tangent values of the starch were found to be 9.20, 4.45 ve 0.48 at 1 kHz constant frequency and at room temperature. In addition, the effect of different proportions of G (0.5%, 1% and 2% by weight) on the dielectric properties of films were investigated. (0.5%, 1% and 2% by weight) of the starch on the dielectric properties was investigated. It was observed that as the G concentration increased, the dielectric constant, dielectric loss and loss tangent values significantly increased compared to the pure starch.

**Keywords:** Film, graphene, dielectric constant, dielectric loss

<sup>1</sup> Gülben TORĞUT ([Orcid ID: 0000-0003-1730-1152](https://orcid.org/0000-0003-1730-1152)), Munzur Üniversitesi, Tunceli Meslek Yüksekokulu, Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümü, Tunceli, Türkiye

<sup>2</sup> Nedim GÜRLER ([Orcid ID: 0000-0001-5637-8262](https://orcid.org/0000-0001-5637-8262)), Munzur Üniversitesi, Tunceli Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Tunceli, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Nedim GÜRLER, e-mail: [dredimgurur@gmail.com](mailto:dredimgurur@gmail.com); [nedimgurur@munzur.edu.tr](mailto:nedimgurur@munzur.edu.tr)



## GİRİŞ

Dielektrik ölçümler, polimerler gibi katı malzemelerin karakterizasyonunda kullanılan ve birçok kimyasal analiz tekniğinden daha kolay gerçekleştirilen en popüler yöntemlerden biridir (Delipınar, 2013; Lökçü, 2013; Torğut ve Demirelli, 2016). Empedans spektroskopisi, elektrolit malzemelerin elektriksel özelliklerinin çoğunu ve bunların elektronik olarak iletken elektrotlarla arayüzlerini karakterize etmek için nispeten yeni ve güçlü bir yöntemdir. Bir malzemenin geçirgenliği, elektromanyetik enerjiyi emme, iletme ve yansıtma yeteneğini ifade eder. Geçirgenlik, dielektrik sabiti ( $\epsilon'$ ) ve dielektrik kayıp faktöründen ( $\epsilon''$ ) oluşan karmaşık bir niceliktir; burada  $\epsilon'$ , gerçek bileşendir ve maddenin kapasitansı ve elektrik enerjisini depolama yeteneği ile ilgilidir,  $\epsilon''$  ise hayali bileşendir ve enerji dağılımının çeşitli soğurma mekanizmaları ile ilgilidir (Everard ve ark., 2006; Koran ve ark., 2014). Kayıp tanjantı, kompleks dielektrik sabitinin sanal kısmının, gerçel kısmına oranıdır. Dielektrikte ısı olarak açığa çıkan enerji miktarının büyüklüğünü değerlendirmekte kullanılır (İyibakanlar, 2003).

Dielektrikler, esasen bir dış elektrik alan etkisi altında hareket edebilen serbest taşıyıcı bulundurmadıklarından dolayı yalıtıkandırlar. Dielektrik malzemeler, bir dış elektrik alana maruz kalması durumunda yük veya enerji depolayabilme yeteneği gösterirler (Symth, 1955; Koran, 2018). Elektrik yükleri arasına bir dielektrik malzeme yerleştirildiğinde, sanki birbirlerinden uzaklaştırılmışlar gibi, aralarına etki eden kuvveti azaltır. Bir malzemenin dielektrik sabiti, elektromanyetik sinyallerin malzeme içinde nasıl hareket edeceğini etkilemektedir (Figueiro ve ark., 2006). Dolayısıyla, dielektrik sabiti ve dağılım faktörü, polimerin fiziksel veya kimyasal durumu hakkında daha fazla bilgi sağlar. Polimerin dielektrik işlemi, polar gruplarının termal hareketi ve yük dağılımı ile tanımlanır (Biryen ve ark., 2017).

Genel olarak, polimerik malzemeler düşük dielektrik geçirgenliğe sahiptir. Ancak az miktarda (hacimce % 1), iletken dolgu maddesi eklenmesi dielektrik geçirgenliği önemli ölçüde artırır (Ahmad ve ark., 2019; Torğut, 2019). Bu bağlamda, karbon siyahı, karbon nanotüpler, grafen, grafen oksit, grafit, gibi dolgular kullanılarak nano boyutta polimerik kompozitler hazırlanmıştır (Torğut ve ark., 2019). Bu nanofiller maddelerin yalıtkan polimer matrisindeki yüksek dağılımı, kompozitlerin gelişmiş dielektrik özelliklerine yol açan daha yüksek arayüz polarizasyonuna da katkıda bulunur (Li ve ark., 2019). Böylece polimerlerin hem mekanik hem de fiziksel özellikleri gelişir. Elastikiyet, hafiflik, işlenebilirlik, termal stabilite vb. gibi benzersiz elektriksel ve mekanik özellikleri birleştiğinde kompozitler geniş uygulama alanları bulmuşlardır (Calame J.P, 2006; Panwar ve ark., 2010). İletken ile doldurulmuş polimer nanokompozitler havacılık ve denizcilik sistemleri, termistörler, enerji depolama cihazlar, kapasitörler, ışık yayan diyotlar, gaz sensörleri, piller, vb. birçok alanda kullanımları ile dünya çapında dikkat çekici hale geldi. Son zamanlarda grafen katkılı nanokompozitler, yüksek dielektrik sabiti ve düşük dielektrik kaybı nedeniyle nano dinamik uygulamaları için bilim insanlarının ilgi odağı olmuştur (Li ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2013). Çalışmalarda, polimerik malzemeye iyi dağılmış grafen, polimerin dielektrik sabitinde önemli gelişmeler göstermektedir.

Grafen,  $sp^2$ 'ye bağlı karbon atomlarının iki boyutlu (2D) tek katmanlı altıgen kafes yapısından oluşur (Wang ve ark., 2011; Zheng ve ark., 2013). Son yıllarda grafen, son derece yüksek özgül yüzey alanına, çok yüksek erime noktasına, yüksek taşıyıcı hareketliliğine, mükemmel mekanik özelliklere, kimyasal stabiliteye, yüksek termal / elektrik iletkenliğine ve iyi biyouyumluluk özelliklerine sahip olduğundan dolayı nanokarbon bir malzeme olarak büyük ilgi görmektedir (Kim ve ark., 2010; Liu ve ark., 2013; Yarahmadi ve ark., 2018; Chen ve ark., 2019; Wu ve ark., 2019). Bu üstün özellikler, grafenin biyosensörler, ilaç dağıtım sistemi, süper kapasitörler, polimer nanokompozitler ve kaplamalar gibi çeşitli uygulamalarda kullanılabileceğini ortaya koydu (Xie ve ark., 2014; Sari ve ark., 2017, Karimi ve

ark., 2017). Son yıllarda, polimerin ana faz ve grafenin ilave faz olduğu polimer nanokompozitler üzerine yapılan çalışmalar büyük ilgi görmektedir. Polimerlerin özelliklerini (özellikle iletkenlik ve mekanik) geliştirdiği için en iyi nanofiller olarak düşünülebilir (Zare ve Rhee, 2017).

Polimer nanokompozitler, fiziksel, mekanik ve biyolojik özelliklerine bağlı olarak mekanik, elektronik ve biyoloji gibi tüm bilim alanlarına sürekli olarak katkıda bulunmaktadır. Son zamanlarda araştırmacılar, çevreye zarar vermeyen doğaları için biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerleri sentezlemenin yanı sıra işlemeye odaklandılar (Usman ve ark. 2016). Şu anda biyopolimerler ile yapılan çalışmalar oldukça ilgi çekmiştir. Biyopolimerler arasında nişasta oldukça düşük maliyeti, doğada bol bulunabilirliği ve biyobozunabilen bir polimer olduğu için dikkat çekmektedir. Ancak, nişasta düşük mekanik mukavemete ve yüksek nem hassasiyetine sahiptir (Ávila-Orta ve ark. 2018).

Bu araştırmanın amacı, zayıf elektriksel iletkenlik gösteren patates nişastasına farklı oranlarda grafen ilave ederek hazırlanan filmlerin dielektrik sabiti, dielektrik kayıp faktörü ve kayıp tanjantı değerlerini incelemek ve grafenin bu özellikler üzerindeki etkisini inceleyip birbirleriyle karşılaştırmaktır.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmada kullanılan polimer ve filmler yazarların daha önceki çalışmasında sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir (Gürler ve Torğut, 2020). Dielektrik sabiti, dielektrik kayıp ve dielektrik kayıp tanjantı gibi malzemenin dielektrik özelliklerini oda sıcaklığında değişen frekanslarda ölçmek için numuneler 15 mm çapında kesilen ve kalınlığı ölçülen numuneler iki elektrot arasına sabitlenir ve paralel plakalı kondansatör elde edildi. Dielektrik parametrelerin ölçümlerinde bir Novocontrol Technologies (Alpha-AN) empedans analizörü kullanıldı. PN ve PNG kompozit filmlerinin ölçümleri, oda sıcaklığında 100 Hz ve 10 kHz frekans arasında alındı. Dielektrik parametreler aşağıdaki formüller yardımıyla hesaplandı.

$$\epsilon' = C_p \frac{d}{A\epsilon_0} \quad (1)$$

$$\epsilon'' = \epsilon' \times DF \quad (2)$$

$$\tan\delta = DF = \frac{\epsilon''}{\epsilon'} \quad (3)$$

Denklemlerde,  $\epsilon_0$ , boşluğun dielektrik sabiti olup değeri  $8.85 \times 10^{-12} \text{ Fm}^{-1}$  dir.  $C_p$ , numunenin kapasitansı (F),  $d$  numunenin çapı (m),  $A$  numunenin alanı ( $\text{m}^2$ ),  $DF$ , kayıp faktörüdür.

$\epsilon'$  dielektrik sabiti,  $\epsilon''$  dielektrik kayıp ve  $\tan\delta$  kayıp tanjantı ifade eder.

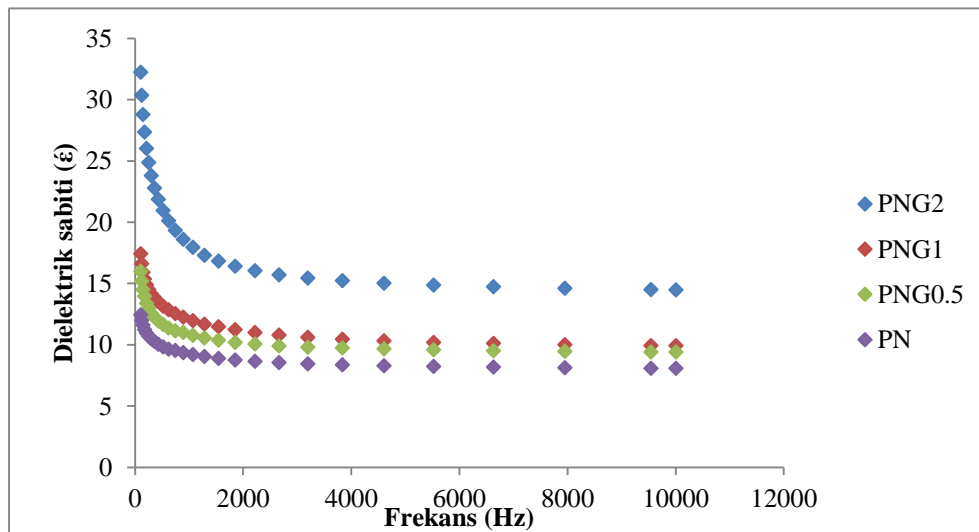
## BULGULAR VE TARTIŞMA

Polimerik malzemeler ve kompozitlerin karakterizasyonunda ve kullanım alanlarını genişletmede dielektrik özelliklerini bilmek önem arz etmektedir. Dielektrik özelliğe sahip malzemeler optik lenslerden uçak sanayisine, cep telefonlarından süper kapasitörlere ve mikrodalga parçacıklarına kadar birçok alanda kullanılmaktadır. Bu çalışmada, gliserol ile plastikleştirilmiş patates nişastası ve kütlece % 0.5, 1 ve 2 oranlarında grafen ile hazırlanmış nanokompozitlerin dielektrik sabiti, dielektrik kayıp ve kayıp tanjantı gibi dielektrik özelliklerinin frekansla değişimleri incelenmiştir ve birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

Polimerler alternatif bir elektrik alanında bırakıldığında elektron ve atomlar yer değiştirir, elektrik yük merkezleri kayar ve elektriksel polarizasyon oluşur. Materyale, dışardan bir elektrik alan uygulandığı zaman enerji depolama yeteneğine sahipse “dielektrik” olarak sınıflandırılır. Dielektrik sabiti bir alanın etkisi altında dış elektrik bölgede ne kadar enerji saklandığını ve malzeme içerisinde ne kadar enerji kaybolduğunu gösterir (İyibakanlar ve Oktay, 2007).

Frekanstaki değişimler, malzemenin dielektrik özelliklerini etkileyen en önemli faktördür. Bu nedenle, bu çalışmada grafenin patates nişastasının dielektrik özellikleri üzerine etkisi 100 Hz-10 kHz frekans aralığında araştırılmıştır. Ağırlıkça %0.5, %1 ve %2 oranında G katkılı PN kompozitlerinin ve PN'nin oda sıcaklığındaki özelliklerini karşılaştırmak için dielektrik sabiti, dielektrik kayıp ve kayıp tanjantı ölçümleri alınmıştır. Bu değerlerin grafikleri karşılaştırmalı olarak Şekil 1, 2, 3'de çizilmiş ve değerleri Çizelge 1'de özetlenmiştir.

Şekil 1'de nişastanın ve kompozitlerinin dielektrik sabitinin oda sıcaklığında frekansla değişimi görülmektedir. Özellikle düşük frekanslarda  $\epsilon$  değerleri, elektronik, atomik, iyonik ve arayüz polarizasyonlarından dolayı daha yüksekken frekans arttıkça azalmaktadır. Ayrıca, tüm numuneler için ara yüzdeki yük taşıyıcı yoğunluğundaki azalmaya bağlı olarak yüksek frekanslarda küçük değişiklik göstererek neredeyse sabit kalmıştır (Torğut ve ark., 2019; Pihtili ve ark., 2020). Ek olarak elektrik alanında oluşan çift kutupların gevşeme süresi denen denge durumuna ulaşması için zamana ihtiyacı vardır. Yüksek frekanslarda  $\epsilon$  düşüşünün nedenlerinden biri de gevşemek için yeterli zamana sahip olmamasıdır. Yüksek frekanslarda sadece elektriksel polarizasyon oluşur, bu nedenle dipollerin sayısı azdır ve  $\epsilon$  küçüktür (Tantis ve ark., 2012).  $\epsilon$ , 100 Hz'de PN için 12.46 iken 1 kHz'de 9.20 ve 10 kHz'de 8'dir. Benzer şekilde, PNG0.5 için  $\epsilon$  değeri 100 Hz'de 16 iken 1 kHz'de 10.77 ve 10 kHz'de 9.4'tür. Şekil 1 incelendiğinde, kompozit serisinde grafen oranındaki artışla  $\epsilon$  değerlerinin büyük oranda arttığı açıktır.  $\epsilon$  değeri 1 kHz'de ağırlıkça % 1 ve %2 grafen içeren kompozitler için sırasıyla 11.97 ve 17.96 olarak ölçülmüştür. Sonuçlar Şekil 1'de özetlenmiştir.  $\epsilon$  değerindeki artışın nedeni, grafen oranıyla birlikte yük taşıyıcıların kolayca geçebildiği elektrik alanındaki artıştan kaynaklı olabilir (Paszkievicz ve ark., 2017). Aynı zamanda  $\epsilon$  değerindeki bu iyileşme, kompozitlerde grafen varlığına bağlı olarak artan dipollerin oryantasyonu ve arayüzey polarizasyonuna bağlanmaktadır (Goyal ve ark. 2009; Lai ve ark., 2014).

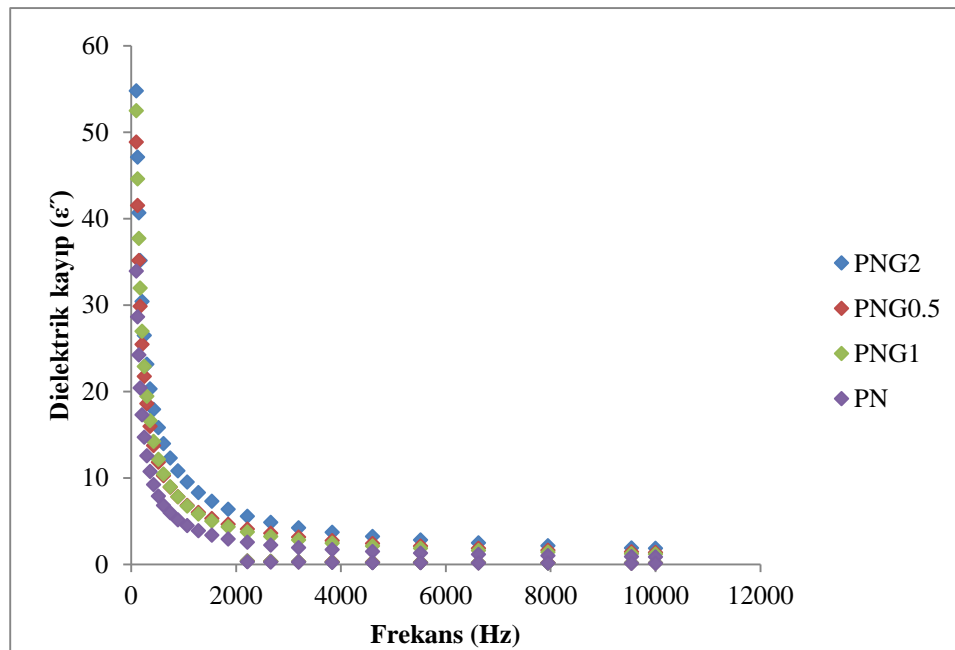


Şekil 1. PN ve G katkılı kompozitlerinin dielektrik sabitinin frekansla değişimi

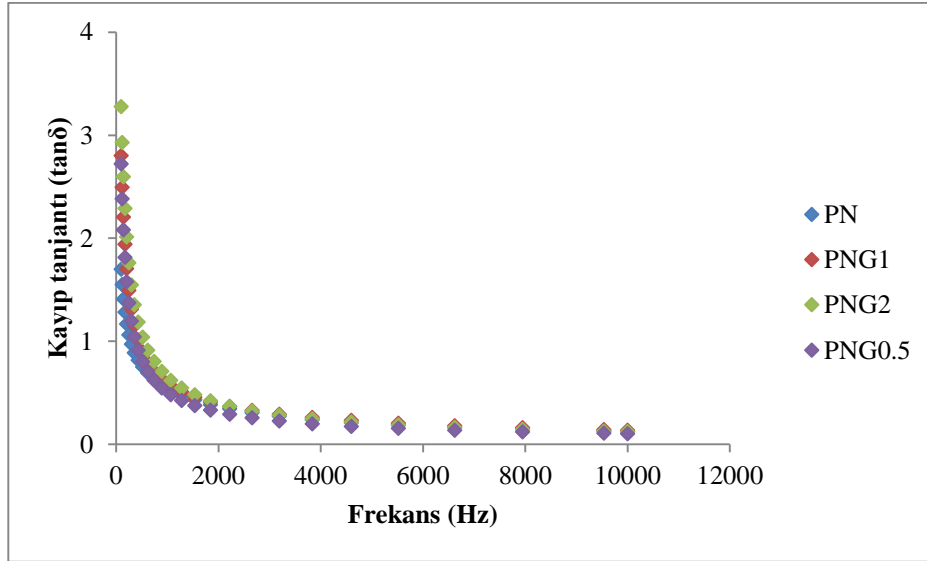
**Çizelge 1.** PN ve G katkılı kompozitlerinin dielektrik sonuçları

| Katkı yüzdesi<br>% G | Dielektrik sabiti<br>( $\epsilon'$ ) 100Hz | Dielektrik sabiti ( $\epsilon'$ )<br>1 kHz | Dielektrik kayıp<br>( $\epsilon''$ ) 100 Hz | Dielektrik kayıp<br>( $\epsilon''$ ) 1 kHz | Kayıp tanjantı<br>(tan $\delta$ ) 100 Hz | Kayıp tanjantı<br>(tan $\delta$ ) 1 kHz |
|----------------------|--|--|---|--|--|---|
| 0                    | 12.46                                      | 9.20                                       | 33.93                                       | 4.45                                       | 1.69                                     | 0.48                                    |
| 0.5                  | 16.00                                      | 10.77                                      | 48.85                                       | 6.71                                       | 2.72                                     | 0.53                                    |
| 1                    | 17.43                                      | 11.97                                      | 52.49                                       | 6.81                                       | 2.80                                     | 0.57                                    |
| 2                    | 32.23                                      | 17.96                                      | 54.76                                       | 9.5  | 3.28                                     | 0.62                                    |

Malzeme seçiminde önemli bir parametre olan dielektrik kayıp ( $\epsilon''$ ) malzemeye verilen enerjinin malzeme içinde ne kadarının ısı olarak tüketildiğini veren bir parametredir (Canbulat, 2019). Şekil 2'de PN ve grafenle hazırlanmış kompozitleri için, oda sıcaklığında frekansın bir fonksiyonu olarak çizilen dielektrik kayıp grafiği görülmektedir. Bütün numuneler için  $\epsilon''$  değerlerinin artan frekansla azaldığı net bir şekilde görülmektedir. Yüksek frekanslardaki düşük  $\epsilon''$  değeri, polimerde arayüzeyden kaynaklanan gevşeme olaylarına bağlanabilir (Pandey ve ark., 2010). Aynı zamanda düşük frekansta yüksek  $\epsilon''$  değeri, malzemeler içindeki serbest yük hareketinden kaynaklanmaktadır (Srivastava ve Mehra, 2008).  $\epsilon''$ , 100 Hz'de PN için 33.93 iken 1 kHz'de 4.45 ve 10 kHz'de 1.05'dir (Çizelge 1). Dolgu maddesinin miktarındaki artış kompozit polariteyi artırdığından  $\epsilon''$ 'yi de artırmıştır (George ve ark., 1999; Nair ve ark., 2013). 1 kHz frekansta PN için 4.45 olan  $\epsilon''$ , PNG0.5, PNG1 ve PNG2 için sırasıyla 6.71, 6.81 ve 9.5 olarak ölçülmüştür.

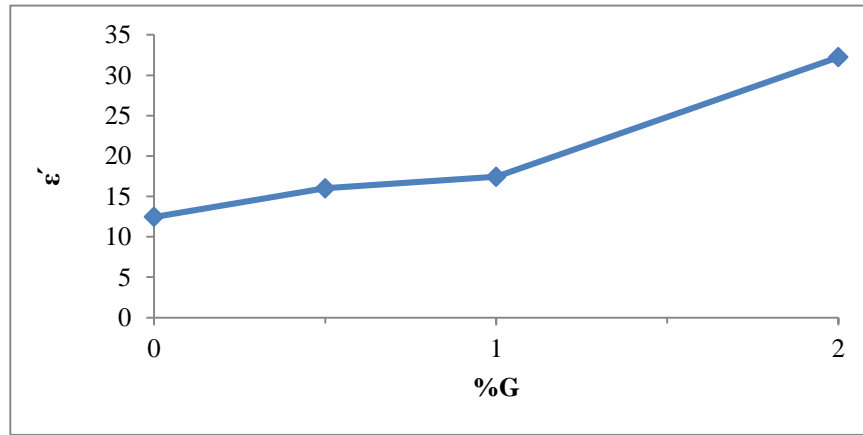
**Şekil 2.** PN ve G katkılı kompozitlerinin dielektrik kaybının frekansla değişimi

Dielektrik kayıp faktörü veya kayıp tanjantı ise dielektrik kayıplardan dolayı elektromanyetik enerjinin ısı enerjisine dönüştüğünün ölçüsünü ifade eder (Canbulat, 2019). Nişasta ve grafen katkılı kompozitleri için tan $\delta$ 'ın frekansa göre değişimi Şekil 3'te verilmiştir. Grafiklerden de görüldüğü gibi, frekans arttıkça bütün numuneler için tan $\delta$  azalmaktadır. Bu sonuç birçok çalışma ile uyum içerisindedir (İyibakanlar, 2003; Karasu ve ark., 2016). G katkısı tan $\delta$  değerlerinde artışa neden olmuştur. Sonuçlar Çizelge 1'de özetlenmiştir.

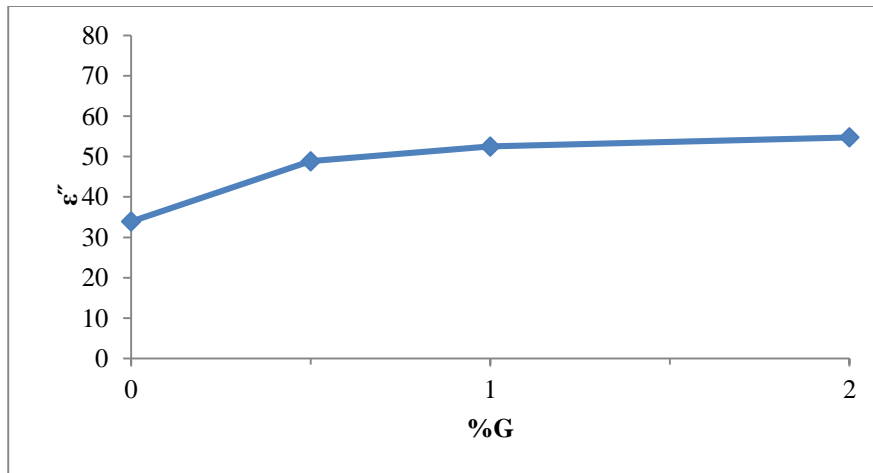


Şekil 3. PN ve G katkılı kompozitlerinin kayıp tanjantının frekansla değişimi

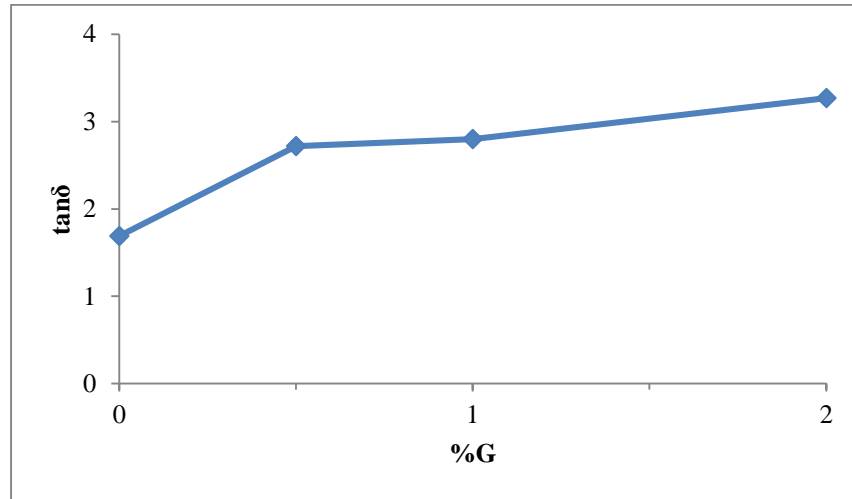
Şekil 4, Şekil 5 ve Şekil 6'da 100 Hz sabit frekansta sırasıyla dielektrik sabiti, dielektrik kayıp ve kayıp tanjantın grafenin yüzde miktarıyla değişim eğrileri görölmektedir. Her üç şekilde de grafenin patates nişastasının dielektrik özellikleri üzerine büyük etkisinin olduğu açıktır.



Şekil 4. 100 Hz frekansta ε'nin % G ile değişimi



Şekil 5. 100 Hz frekansta ε''ın % G ile değişimi



Şekil 6. 100 Hz frekansta  $\tan\delta$ 'nın % G ile değişimi

Tüm bu sonuçlar incelendiğinde bileşiklerin dielektrik özelliklerinin frekansa karşı duyarlı olduğu ve frekansın artması ile azaldığı görülmüştür. Bu tür malzemeler elektriksel yalıtkan, dielektrik kapasitörü ya da mikrodalga aygıtlarının parçalarında kullanılabilme gibi teknolojik uygulamaları nedeniyle büyük ilgi görmektedir (Yuxing ve David, 2008).

## SONUÇ

Bu çalışmada gliserol ile plastikleştirilmiş patates nişastası ve bunun kütlece farklı yüzdelerde grafen ile hazırlanmış kompozitlerinin dielektrik özellikleri empedans spektroskopisi teknikleri kullanılarak 100 Hz–10 kHz frekans aralığında incelenmiştir. Kompozit yapılarında bulunan grafen katkı maddesi maddenin içerisinde arayüzey kutuplanmasına neden olacak yükler bulundurduğundan düşük frekanslarda dielektrik sabiti ve dielektrik kayıp oldukça büyük değerler almıştır. Frekans arttıkça kutuplu moleküllerin sayısı da arttığından  $\epsilon'$  ve  $\epsilon''$  azalmış ve yeterince molekül kutuplandıktan sonra frekansla değişimi oldukça azalarak nerdeyse sabit kalmıştır. Az miktarda grafen katkısının nişastanın dielektrik sabitleri üzerinde önemli etkisi olduğu görülmektedir. Aynı şekilde nişasta ve kompozitlerinin kayıp tanjantı düşük frekanslarda büyük iken artan frekansla azalmıştır. Grafen nişasta filmlerinin dielektrik özellikleri üzerinde önemli bir gelişme sağladığından bu filmlere yeni özellikler kazandırmış ve kullanım alanlarını artırmıştır. Bu tür maddeler, dielektrik kapasitörü, cep telefonları, uydu haberleşme sistemleri, askeri arama radarları ve mikrodalga aygıtlarının parçalarına kadar çok geniş bir uygulama alanına sahiptirler.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Ahmad MW, Dey B, Sarkhel G, Bag DS, Choudhury A, 2019. Exfoliated Graphene Reinforced Polybenzimidazole Nanocomposites With High Dielectric Permittivity At Low Percolation Threshold. *Journal of Molecular Structure*, 1177: 491-498.
- Ávila-Orta CA, Soriano Corral F, Fonseca-Florido HA, Estrada Aguilar FI, Solís Rosales SG, Mata Padilla JM, Morones PG, Tavizon SF, Hernández-Hernández E, 2018. Starch-Graphene Oxide Bionanocomposites Prepared Through Melt Mixing. *Journal of Applied Polymer Science*, 135(12): 46037.

- Biryani F, Demirelli K, Torğut G, Pıhtılı G, 2017. Synthesis, Thermal Degradation And Dielectric Properties of Poly [2-Hydroxy, 3-(1-Naphthoxy) Propyl Methacrylate]. *Polymer Bulletin*, 74(2): 583-602.
- Calame JP, 2006. Finite Difference Simulations of Permittivity And Electric Field Statistics in Ceramic-Polymer Composites for Capacitor Applications. *Journal of Applied Physics*, 99(8): 084101.
- Canbulat N, (2019). Pres Kalıplama Pestilinin Mekanik ve Elektrik Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2019.
- Chen J, Long Z, Wang S, Meng Y, Zhang G, Nie S, 2019. Biodegradable Blends of Graphene Quantum Dots and Thermoplastic Starch with Solid-State Photoluminescent and Conductive Properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139: 367-376.
- Delipinar Didem, 2013. Probertit, Elektrokoagülasyon Termal Atık Ve Elektrokoagülasyon Bor Atığının Dielektrik Özelliklerinin Empedans Spektroskopisi Yöntemi İle İncelenmesi. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Fizik Anabilim Dalı, İstanbul
- Everard CD, Fagan CC, O'donnell CP, O'callaghan DJ, Lyng JG, 2006. Dielectric Properties of Process Cheese from 0.3 to 3 GHz. *Journal of Food Engineering*, 75(3): 415-422.
- Figueiro SD, Macedo AA. M, Melo MRS, Freitas ALP, Moreira RA, De Oliveira RS, Goes JC, Sombra ASB, 2006. On The Dielectric Behaviour of Collagen-Algal Sulfated Polysaccharide Blends: Effect of Glutaraldehyde Crosslinking. *Biophysical Chemistry*, 120(2): 154-159.
- George S, Varughese KT, Thomas S, 1999. Dielectric Properties of Isotactic Polypropylene/Nitrile Rubber Blends: Effects of Blend Ratio, Filler Addition, and Dynamic Vulcanization. *Journal of Applied Polymer Science*, 73(2): 255-270.
- Goyal RK, Jagadale PA, Mulik UP, 2009. Thermal, Mechanical, and Dielectric Properties Of Polystyrene/Expanded Graphite Nanocomposites. *Journal of Applied Polymer Science*, 111(4): 2071-2077.
- Gürler N, Torğut G, 2020. Graphene-Reinforced Potato Starch Composite Films: Improvement of Mechanical, Barrier and Electrical Properties. *Polymer Composites*.
- İyibakanlar, G, 2003. Polimerlerin Dielektrik Özelliklerinin Sıcaklık ve Frekansla Değişimlerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü Sivil Havacılık Anabilim Dalı, Eskişehir.
- İyibakanlar G, Oktay A, 2007. Bazı Polimerlerin Dielektrik Özelliklerinin Frekansla Değişimlerinin İncelenmesi. *Journal of Aeronautics & Space Technologies/Havacılık ve Uzay Teknolojileri Dergisi*, 3(1).
- Karasu S, Öztürk A, Şağban HM, Özmen ÖT, 2016. Au/P3HT:PCBM/n-Si Schottky Bariyer Diyotlarda PCBM Konsantrasyonunun Kapasitans-Voltaj (C-V) ve İletkenlik-Voltaj (G/w-V) Karakteristiklerine Etkisi ve Dielektrik Özelliklerin İncelenmesi, Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, 4.
- Karimi B, Ramezanzadeh B, 2017. A Comparative Study on The Effects of Ultrathin Luminescent Graphene Oxide Quantum Dot (GOQD) and Graphene Oxide (GO) Nanosheets on The Interfacial Interactions and Mechanical Properties of an Epoxy Composite. *Journal of Colloid And Interface Science*, 493, 62-76.
- Kim H, Abdala AA, Macosko CW, 2010. Graphene/Polymer Nanocomposites. *Macromolecules*, 43(16): 6515-6530.
- Koran K, Özen F, Torğut G, Pıhtılı G, Çil E, Görgülü AO, Arslan M, 2014. Synthesis, Characterization and Dielectric Properties of Phosphazenes Containing Chalcones. *Polyhedron*, 79: 213-220.
- Koran K, 2018. 2,2-(3-(Süstitüe-florofenil)-1-(4-oksifenil)prop-2-en-1-one)-4,4,6,6- bis[spiro(2',2"-dioksi-1',1"-bifenilil)]Siklotrifosfazenlerin Dielektrik ve Termal Özellikleri. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 18: 458-467.
- Lai M, Yu S, Sun R, 2014. Ceramic/Polymer Composites with Enhanced Permittivity and Low Dielectric Loss Through Grafting Modification of Polymer Matrix By Polyethylene Glycol. *Materials Letters*, 122: 45-48.
- Li B, Zhong WH, 2011. Review on Polymer/Graphite Nanoplatelet Nanocomposites. *Journal of Materials Science*, 46(17): 5595-5614.
- Li W, Song Z, Qian J, Tan Z, Chu H, Wu X, Nie W, Ran X, 2019. Enhancing Conjugation Degree and Interfacial Interactions to Enhance Dielectric Properties of Noncovalent Functionalized Graphene/Poly (Vinylidene Fluoride) Composites. *Carbon*, 141: 728-738.
- Liu J, Cui L, Losic D, 2013. Graphene and Graphene Oxide as New Nanocarriers for Drug Delivery Applications. *Acta Biomaterialia*, 9(12): 9243-9257.
- Lökçü, E, 2013. Spinel Mikrodalga Dielektrik Seramiklerinin Polimerik Jel Yöntemi İle Üretimi Ve Karakterizasyonu. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul.
- Nair AB, Kurian P and Joseph R, 2013. *European Polymer Journal*. 49: 247.

- Pandey K, Dwivedi MM, Singh M, Agrawal SL, 2010. Studies of Dielectric Relaxation and Ac Conductivity in [(100- X) PEO+ Xnh 4 SCN]: Al-Zn Ferrite Nano Composite Polymer Electrolyte. *Journal of Polymer Research*, 17(1): 127.
- Panwar V, Park JO, Park SH, Kumar S, Mehra RM, 2010. Electrical, Dielectric, and Electromagnetic Shielding Properties of Polypropylene-Graphite Composites. *Journal of Applied Polymer Science*, 115(3): 1306-1314.
- Paszkievicz S, Szymczyk A, Pilawka R, Przybyszewski B, Czulak A, RosŁaniec Z, 2017. Improved Thermal Conductivity of Poly (trimethylene terephthalate-block-poly (tetramethylene oxide) Based Nanocomposites Containing Hybrid Single-Walled Carbon Nanotubes/Graphene Nanoplatelets Fillers. *Advances in Polymer Technology*, 36(2): 236-242.
- Pihtili G, Torğut G, Biryani F, 2020. Electrical Properties of Two-Armed Poly (E-CL-Co-BMA) Composites Filled with Bentonite. *Journal of Polymer Research*, 27: 156.
- Sari MG, Shamshiri M., Ramezanzadeh B, 2017. Fabricating an Epoxy Composite Coating With Enhanced Corrosion Resistance Through Impregnation of Functionalized Graphene Oxide-Co-Montmorillonite Nanoplatelet. *Corrosion Science*, 129: 38-53.
- Srivastava NK, Mehra RM, 2008. Study of Structural, Electrical, and Dielectric Properties of Polystyrene/Foliated Graphite Nanocomposite Developed via In Situ Polymerization. *Journal of Applied Polymer Science*, 109(6): 3991-3999.
- Symth CP, 1955. *Dielectric Behaviour and Structure*. McGraw-Hill, New York, 52-61: 202-215.
- Tantis I, Psarras G. C, Tasis D, 2012. Functionalized Graphene-Poly (Vinyl Alcohol) Nanocomposites: Physical and Dielectric Properties. *Express Polym Lett* 6 (4): 283–292.
- Torgut G, Demirelli K, 2016. Block Copolymerization of Methylmethacrylate via ATRP Method Using a Macroinitiator Produced By Ring Opening Polymerization: Characterization, Dielectric Properties, and a Kinetic Investigation. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 53(11): 669-676.
- Torğut G, 2019. Fabrication, Characterization of Poly (MA-Co-NIPA)-Graphene Composites and Optimization The Dielectric Properties Using The Response Surface Method (RSM). *Polymer Testing*, 76: 312-319.
- Torğut G, Biryani F, Demirelli K, 2019. Effect of Graphite Particle Fillers on Dielectric and Conductivity Properties of Poly (NIPAM-Co-HEMA). *Bulletin of Materials Science*, 42(5): 244.
- Usman A, Hussain Z, Riaz A, Khan AN, 2016. Enhanced Mechanical, Thermal and Antimicrobial Properties of Poly (Vinyl Alcohol)/Graphene Oxide/Starch/Silver Nanocomposites Films. *Carbohydrate Polymers*, 153: 592-599.
- Wang X, Yang H, Song L, Hu Y, Xing W, Lu H, 2011. Morphology, Mechanical and Thermal Properties of Graphene-Reinforced Poly (Butylene Succinate) Nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 72(1): 1-6.
- Wu Z, Huang Y, Xiao L, Lin D, Yang Y, Wang H, Yang H, Wu D, Chen H, Qin W, 2019. Physical Properties and Structural Characterization of Starch/Polyvinyl Alcohol/Graphene Oxide Composite Films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123: 569-575.
- Xie Y, Liu Y, Zhao Y, Tsang YH, Lau SP, Huang H, Chai Y, 2014. Stretchable All-Solid-State Supercapacitor with Wavy Shaped Polyaniline/Graphene Electrode. *Journal of Materials Chemistry A*, 2(24): 9142-9149.
- Yarahmadi E, Didehban K, Sari, MG, Saeb MR, Shabaniyan M, Aryanasab F, Zarrintaj P, Paran, S MR, Mozafari M, Rallini M, Puglia D, 2018. Development and Curing Potential of Epoxy/Starch-Functionalized Graphene Oxide Nanocomposite Coatings. *Progress in Organic Coatings*, 119: 194-202.
- Yuxing R, David CL, 2008. Properties and Microstructures of Lowtemperature Processable Ultralow-Dielectric Porous Polyimide Films. *Journal of Electronic Materials*, 37: 21-28.
- Zare Y, Rhee KY, 2017. Development of a Model for Electrical Conductivity of Polymer/Graphene Nanocomposites Assuming Interphase and Tunneling Regions in Conductive Networks. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 56(32): 9107-9115.
- Zhang XJ, Wang GS, Wei YZ, Guo L, Cao MS, 2013. Polymer-Composite with High Dielectric Constant and Enhanced Absorption Properties Based on Graphene-Cus Nanocomposites and Polyvinylidene Fluoride. *Journal of Materials Chemistry A*, 1(39): 12115-12122.
- Zheng P, Ma T, Ma X, 2013. Fabrication and Properties of Starch-Grafted Graphene Nanosheet/Plasticized-Starch Composites. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(39): 14201-14207.



**Atf İçin:** Özdek U, Değer Y, 2021. Deneysel Florozis Oluşturulmuş Ratlarda Kitosan ve Kitosan Oligosakkaridin Serum ve Doku Sialik Asit Düzeyleri Üzerindeki Etkileri. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1402-1407.

**To Cite:** Özdek U, Değer Y, 2021. Effects of Chitosan and Chitosan Oligosaccharide on Serum and Tissue Sialic Acid Levels in Experimental Fluorosis. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1402-1407.

### **Deneysel Florozis Oluşturulmuş Ratlarda Kitosan ve Kitosan Oligosakkaridin Serum ve Doku Sialik Asit Düzeyleri Üzerindeki Etkileri**

Uğur ÖZDEK<sup>1\*</sup>, Yeter DEĞER<sup>2</sup>

**ÖZET:** Bu çalışmada deneysel florozisli ratlarda, kitosan (CH) ve kitosan oligosakkaritin (COS), serum ve dokularda (karaciğer, böbrek, beyin ve testis) toplam sialik asit (TSA) düzeyine etkisi araştırılmıştır. Gruplar kontrol, sodyum florür (NaF), NaF + kitosan (NaF + CH), NaF + kitosan oligosakkarit (NaF + COS), kitosan (CH) ve kitosan oligosakkarit (COS) olarak oluşturuldu. NaF gruplarının içme suyu 100 ppm sodyum florür konsantrasyonunda hazırlandı. Deneysel gruplarında, doksan gün süreyle kitosan ve kitosan oligosakkarit 250 mg/kg dozunda oral yolla uygulandı. Çalışma sonunda serum ve karaciğer, böbrek, beyin ve testis doku homojenizatlarının TSA düzeyi spektrofotometrik yöntemle belirlendi. Florür uygulanan grupta (NaF), kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, serum, karaciğer, böbrek, beyin ve testis dokularında TSA düzeylerinin arttığı görüldü ( $p < 0.05$ ). NaF grubuna göre, NaF+CH grubunda serum seviyelerinde, NaF+COS grubunda ise serum, karaciğer ve böbrek dokularında belirgin düşüş vardı. Beyin dokusu sialik asit düzeyi açısından kontrol ve deneysel grupları arasında fark olmadığı belirlendi ( $p > 0.05$ ). Sonuç olarak, flor toksikasyonunun, serum ve dokularda hücre hasarına neden olarak, TSA düzeylerinde artışa neden olduğu düşünülebilir. Sunulan çalışmada, CH ve COS'un TSA seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, COS'un TSA seviyesini azaltmada daha etkili olduğu görüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Florozis, Sodyum florid, Total sialik asit, Serum, Doku

#### **Effects of Chitosan and Chitosan Oligosaccharide on Serum and Tissue Sialic Acid Levels in Experimental Fluorosis**

**ABSTRACT:** In this study, the effect of chitosan (CH) and chitosan oligosaccharide (COS) on serum and tissue (liver, kidney, brain and testis) total sialic acid (TSA) level was investigated in rats with experimental fluorosis. The groups were formed as control, sodium fluoride (NaF), NaF+chitosan (NaF+CH), NaF+chitosan oligosaccharide (NaF+COS), chitosan (CH) and chitosan oligosaccharide (COS). Drinking water of NaF groups was prepared at a concentration of 100 ppm sodium fluoride. Chitosan and chitosan oligosaccharide were given to Experimental groups as 250 mg/kg dose by gastric gavage for ninety days. At the end of the study, TSA level was determined in serum, liver, kidney, brain and testicular tissues. Compared with the control group, it was found that TSA levels increased in serum, liver, kidney, brain and testis tissues in the group treated with sodium fluoride ( $p < 0.05$ ). According to the NaF group, there was a significant decrease in serum levels in the NaF+CH group and in the serum, liver and kidney tissues in the NaF+COS group. It was determined that there was no difference between the control and experimental groups in terms of brain tissue sialic acid level ( $p > 0.05$ ). In conclusion, it can be thought that fluorine intoxication causes an increase in TSA levels by causing cell damage in serum and tissues. In the study presented, CH and COS have been shown to reduce TSA levels. Also, in this study, COS was found to be more effective in reducing the TSA level.

**Keywords:** Fluorosis, Sodium fluoride, Total sialic acid, Serum, Tissue

<sup>1</sup> Uğur ÖZDEK ([Orcid ID: 0000-0002-0709-1545](https://orcid.org/0000-0002-0709-1545)), Van Yüzüncü Yıl University Health Services Vocational School, Van Turkey

<sup>2</sup> Yeter DEĞER ([Orcid ID: 0000-0002-9023-0699](https://orcid.org/0000-0002-9023-0699)), Van Yüzüncü Yıl University Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Van, Turkey

**\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Uğur ÖZDEK, e-mail: ugurozdek@yyu.edu.tr

Ethics Committee Approval was obtained for the animal experiment in this article with the decision Date: 27.02.2020 and Decision No.2020-02 of the Van Yüzüncü Yıl University Rectorate Animal Experiments Local Ethics Committee

## INTRODUCTION

Fluoride is one of the potent anions exposed both orally and by inhalation. Any form of exposure to excess fluoride causes fluorine toxicity (Yüksek et al., 2017). This is called fluorosis. In the damage caused by fluorosis, fluorine is known to increase the production of free radicals, causing changes in antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation (Varol and Varol, 2010; Yur et al., 2013; Kurtdede et al., 2018).

Chitosan (CH) is obtained by deacetylation of chitin, a natural polymer commonly found in the exoskeletal structure of crustaceans and insects and in the cell walls of some fungi. Because of it has many biological activities, the chitosan oligosaccharide (COS) derivative, which has a higher solubility and low molecular weight form of oligosaccharide, has been developed. Due to its widespread nature and non-toxic nature, interest to antioxidant activity of chitosan and its derivatives has increased in recent years. Chitosan and its derivatives show their antioxidant activities depending on the active hydroxyl and amino groups in the polymer chains (Yildiz and Yangilar, 2014). Besides the beneficial effects of CH and COS on immunity and performance, it also has antimicrobial, antioxidant, anticancer, antidiabetic effects, and lipid and cholesterol lowering effects (Keser and Bilal, 2010; Toz and Değer, 2018).

Sialic acids, acetylated derivatives of nine carbon sugar neuraminic acids, are structural components of the soluble and insoluble components of tissues and cells. In serum and body fluids, sialic acids are bound to proteins (protein-bound sialic acid (PSA)) and lipid molecules (lipid-bound sialic acid (LSA)). PSA and LSA fractions is form total sialic acid (TSA) (Kazezoğlu et al., 2009). Increasing or decreasing sialic acid amounts or changing the properties of sialic acids reveals damage to cells or tissues. Studies have indicated that sialic acid levels, which are indicators of the acute-phase reaction, increase in many diseases such as cancer, diabetes, cardiovascular diseases, bacterial infections, rheumatoid arthritis and chronic liver diseases (Ozcelik et al., 2014).

In this study, we aimed to investigate the effect of chitosan and chitosan oligosaccharide in serum and tissue (liver, kidney, brain and testis) TSA level in rats with experimental fluorosis.

## MATERIALS AND METHODS

In the study, 42 male Wistar albino rats, 2-3 months old, weighing 200-250 g, were obtained from the Animal Experiment Unit of Van Yuzuncu Yil University. Rats were kept at 22 ± 2 °C, 12 hours dark, 12 hours bright cycle and cages where feed and water were given as ad libitum. For this study, the approval of the Animal Experiments Local Ethics Committee of Van Yuzuncu Yil University was received with the decision number 2020/2 dated 27.02.2020. The animals were divided into six groups in 7 rats each.

Control group (K); drinking water was given, fluorine group (NaF); As drinking water, water containing 100 ppm sodium fluoride was given (Guan et al., 1998), fluorine and chitosan group (NaF+CH); As drinking water, it was given with 100 ppm sodium fluoride water and 250 mg/kg/day chitosan gastric gavage (Ito et al., 2000), fluorine and chitosan oligosaccharide group (NaF+COS); As drinking water, water containing 100 ppm sodium fluoride and 250 mg/kg/day chitosan oligosaccharide were given by gastric gavage (Zong et al., 2012), chitosan group (CH); 250 mg/kg/day chitosan was given by gastric gavage and chitosan oligosaccharide group (COS); 250 mg/kg/day chitosan oligosaccharide was given by gastric gavage.

At the end of the 90-day trial period, rats (75 mg/kg) were anesthetized with ketamine and blood samples were taken into the anticoagulant tubes by cannulating the heart. The liver, kidney, brain and

testicular tissues of rats killed by anemic release were collected quickly and carefully and washed with saline for cleaning.

Blood samples were centrifuged at 3500 rpm for 10 minutes and serum was obtained. Tissues were homogenized with 1/10 cold phosphate buffer (pH: 7.4 0.1 M) using a homogenizer. Supernatants were obtained by centrifuging tissue homogenates 20 minutes at 4000xg and +4 °C.

The method developed by Sydow was used to determine TSA levels in serum and supernatants (Sydow, 1985). Sialic acid level was calculated using the standard graph prepared from N-acetyl neuraminic acid at different concentrations prepared using phosphate buffer (pH 7.4, 0.1 M).

### Statistical analysis:

In the study, one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare group averages in terms of features (variables), and Duncan test was used to determine different groups after variance analysis. Statistical significance level was taken as  $P < 0.05$  in calculations. All analyzes were done using SPSS (20.0) package program.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Table 1.** Serum and tissue total sialic acid (TSA) levels of control and experimental groups

| Groups   | Serum (mg/mL)          | Liver (mg/gr)          | Kidney (mg/gr)         | Brain (mg/gr)            | Testis (mg/gr)         |
|----------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|
| K        | 2.68±0.01 <sup>d</sup> | 2.46±0.04 <sup>c</sup> | 2,25±0.04 <sup>c</sup> | 0,31±0.01 <sup>b</sup>   | 2.15±0,03 <sup>b</sup> |
| NaF      | 4.01±0.02 <sup>a</sup> | 3.66±0.10 <sup>a</sup> | 3.33±0.09 <sup>a</sup> | 0.33±0.01 <sup>a</sup>   | 2.66±0.10 <sup>a</sup> |
| NaF+CH   | 3.69±0.04 <sup>b</sup> | 3.61±0.16 <sup>a</sup> | 3.28±0.14 <sup>a</sup> | 0.31±0.02 <sup>a,b</sup> | 2.53±0.19 <sup>a</sup> |
| NaF +COS | 3.28±0.47 <sup>c</sup> | 3.38±0.09 <sup>b</sup> | 3.07±0.08 <sup>b</sup> | 0.31±0,03 <sup>a,b</sup> | 2.52±0.30 <sup>a</sup> |
| CH       | 2.63±0.04 <sup>d</sup> | 2.45±0.07 <sup>c</sup> | 2.22±0.07 <sup>c</sup> | 0.31±0.01 <sup>b</sup>   | 2.16±0.10 <sup>b</sup> |
| COS      | 2.59±0.11 <sup>d</sup> | 2.42±0.14 <sup>c</sup> | 2.20±0.13 <sup>c</sup> | 0.30±0.02 <sup>b</sup>   | 2.11±0.13 <sup>b</sup> |

Values are expressed as Median ± SD (n = 7), different letters in the same column show statistical significance ( $P < 0.05$ ).

The fluorine poisoning can be seen in two forms as acute and chronic fluorosis depending on fluorine intake. Acute fluorosis is formed in a short time and as a result of very high fluoride uptake. High doses and long-term intake of fluorine causes chronic fluorosis (Dobaradaran et al., 2008). Chronic fluorine toxicity is mainly observed in dental and bone tissues. However, in many experimental and epidemiological studies conducted in recent years, metabolic, functional and structural damages caused by chronic fluorosis in soft tissues and organs including kidney, liver, muscle, testicle and nervous tissue have been reported (Kaya et al., 2015; Wei et al., 2019).

Excessive intake of fluorine accelerates oxygen metabolism, causing more  $\cdot O_2$  to be produced.  $\cdot O_2$  does not directly harm, but it is harmful for living creatures as it is a source of  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$  causes lipid peroxidation in membrane lipids, and also causes enzyme inactivation and DNA damage (Koçak et al., 2020a). In fluoride-induced toxicity, oxidative stress causes greater damage to cells and tissues (Kurtdele et al., 2018).

Chitosan and its derivatives prevent lipid peroxidation, prevent disruption of the cell membrane structure and strengthen the body's antioxidant defense mechanism. It occurs by various mechanisms such as antioxidant activity, radical scavenging activity, chelating ability and preventing radical formation. Regardless of the mechanism, antioxidant capacity is closely related to the reactivity of the active hydroxyl and amino groups in the polymer chains (Yildiz and Yangilar, 2014; Toz and Değer, 2018).

It has been reported that by preventing lipid peroxidation of chitosan and chitosan derivatives in diabetes (Yuan et al., 2009), gastric ulcer (Anandan et al., 2004) and hepatic toxicity (Jeon et al., 2003;

Ozcelik et al., 2014; Ramasamy et al., 2014; Subhapradha et al., 2014), it prevents disruption of the structure of the cell membrane and strengthens the body's antioxidant defense mechanism. In addition, it has been reported that chitosan and its water-soluble derivatives are effective in preventing oxidative damage against lead (Wang et al., 2016; Toz and Değer, 2018) and zinc (Ma et al., 2014) toxicity.

Sialic acids are an important component of the terminal oligosaccharide chains of glycolipids and glycoproteins in serum and tissues. Increased sialic acid level in the tissue may be related with lipid peroxidation that occurs in the cell membrane after oxidative stress and DNA damage (Ozcelik et al., 2014; Oto et al., 2016). There is a positive correlation between serum SA levels and cellular damage. SA is an important biomarker of the diagnosis of inflammation, myocardial infarction, cancer and some other diseases. The sialic acid forms in diseases is the as a result of lipid peroxidation formed by free radicals and destruction of cell membranes (Oto et al., 2016).

Sialic acid is an important parameter for the diagnosis of fluorosis in both humans and animals (Kaya et al., 2015). Oto et al. (2016), in the study in which they investigated the effect of resveratrol on serum TSA and LSA in experimental fluorosis, determination that TSA and LSA levels were significantly increased in the fluorosis group and resveratrol was not effective in decreasing this increase. In the another study, serum LSA level was increased in sheep with fluorosis (Doğan et al., 2016). In our study, the serum, liver, kidney, brain and testicular tissue TSA levels in the NaF group were found to be statistically ( $p<0.05$ ) higher than the control group, and it is consistent with previous studies (Tablo 1). The increase in TSA levels may be due to the release of sialic acids in the membrane of cells damaged by oxidative stress developing due to fluorosis (Ozcelik et al., 2014; Koçak et al., 2020b). There are studies indicating that serum TSA (Jha et al., 1982; Ciftci et al., 2010; Doğan et al., 2016), PSA (Sharma, 1983) and testicular TSA (Kaya et al., 2015) levels decrease in fluorosis patients.

In the literature searches, we did not find any study investigating the effect of chitosan and chitosan derivatives on serum and tissue sialic acid levels in fluorosis. In the study investigating the effect of chitosan against liver toxicity created by acetaminophen in the liver, it was reported that increased serum and liver tissue TSA and LSA levels decreased significantly with the administration of chitosan. It has been stated that the decrease in sialic acid levels in serum and liver may be related with the antioxidant properties of chitosan (Ozcelik et al., 2014).

In our study, compared to the NaF group, it was determined that the serum TSA level decreased significantly ( $p<0.05$ ) in the NaF+CH and NaF+COS groups, and this decrease was higher in the COS group, but was higher than the control group (Tablo 1). It was determined that there was no difference between the control and experimental groups in terms of brain tissue sialic acid level ( $p>0.05$ ).

The significant or non-significant decreases in serum and tissue TSA levels in NaF+CH and NaF+COS groups may have resulted from CH and COS inhibiting lipid peroxidation by enhancing the endogenous antioxidant defense system. It was determined that COS has more efficacy on serum and tissue total sialic acid level compared to CH in fluorosis (Sun et al., 2008).

## CONCLUSION

As a result, it can be said that fluorosis causes cell damage, which leads to an increase in TSA levels in serum and tissue. It can be said that CH and COS reduce the TSA level increasing after fluoride toxicity and COS is more effective. Further studies can be made on the ability of CH and COS to reduce TSA levels.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the Van Yüzüncü Yıl University Scientific Research Projects Department [TSA-2018-7404].

**Conflict of Interest**

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

**Author's Contributions**

The authors declare that they have contributed equally to the article.

**REFERENCES**

- Anandan R, Nair PG, Mathew S, (2004). Anti-ulcerogenic effect of chitin and chitosan on mucosal antioxidant defence system in HCl-ethanol-induced ulcer in rats. *J Pharm Pharmacol*, 56(2): 265-9.
- Ciftci G, Cenesiz S, Yarim GF, Nisbet O, Nisbet C, Cenesiz M, Guvenc D, (2010). Effect of fluoride exposure on serum glycoprotein pattern and sialic acid level in rabbits. *Biol Trace Elem Res*, 133(1): 51.
- Dobaradaran S, Mahvi AH, Dehdashti S, Abadi DRV, Tehran I, (2008). Drinking water fluoride and child dental caries in Dashtestan, Iran. *Fluoride*, 41(3): 220-6.
- Doğan I, Mert H, Irak K, Mert N, (2016). Investigation of antioxidant compounds in fluorotic sheep. *Scientific Works C Series Vet Med* 2(1): 23-26.
- Guan ZZ, Wang YN, Xiao KQ, Dai DY, Chen YH, Liu JL, Sindelar P, Dallner G, (1998). Influence of chronic fluorosis on membrane lipids in rat brain. *Neurotoxicol Teratol*, 20(5): 537-42.
- Ito M, Ban A, Ishihara M, (2000). Anti-ulcer effects of chitin and chitosan, healthy foods, in rats. *Jpn J Pharmacol*, 82(3): 218-25.
- Jeon TI, Hwang SG, Park NG, Jung YR, Im Shin S, Choi SD, Park DK, (2003). Antioxidative effect of chitosan on chronic carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *Toxicology*, 187(1): 67-73.
- Jha M, Susheela A, Krishna N, Rajyalakshmi K, Venkiah K, (1982). Excessive ingestion of fluoride and the significance of sialic acid: glycosaminoglycans in the serum of rabbit and human subjects. *Clin Toxicol*, 19(10): 1023-1030.
- Kaya I, Deveci HA, Ekinci UV, Kaya MM, Alpay M, (2015). The Effect of Ellagic Acid and Sodium Fluoride Intake on Total Sialic Acid Levels and Total Oxidant/Antioxidant Status in Mouse Testicular Tissue. *ARRB*, 7(5): 329-335.
- Kazeroğlu C, Usta U, Gökmen SS, (2009). Total and lipid-bound sialic acid levels in experimental myocardial infarction. *Journal of Turkish Clinical Biochemistry*, 7(1): 7-15.
- Keser O, Bilal T, (2010). The use of chitosan oligosaccharide in animal nutrition II- Antioxidative, antimicrobial and the other effects. *Livestock Studies*, 50(1): 41-52.
- Koçak Y, Gökhan O, Meydan İ, Seçkin H, (2020a). Investigation of Total Flavonoid, DPPH Radical Scavenging, Lipid Peroxidation and Antimicrobial Activity of *Allium schoenoprasum* L. Plant Growing in Van Region. *Yuzuncu Yil University, Agriculture Faculty Journal of Agriculture Science*, 30(1): 147-155.
- Koçak Y, Gökhan O, Suat E, Mercan U, Bakır A, (2020b). Protective Effect of *Allium schoenoprasum* L. Ethanol Extract on Serum Total Sialic Acid and Lipid Bound Sialic Acid Levels in Experimental Carbon Tetrachloride Toxicity. *Van Healty Sciences Journal*, 13(1): 25-31.
- Kurtdede E, Pekcan M, Karagül H, (2018). Free Radicals, Reactive Oxygen Species and Relationship with Oxidative Stress. *Atatürk University J. Vet. Sci*, 13(3): 373-379.

- Ma Y, Huang Q, Lv M, Wu Z, Xie Z, Han X, Wang Y, (2014). Chitosan-Zn chelate increases antioxidant enzyme activity and improves immune function in weaned piglets. *Biol Trace Elem Res*, 158(1): 45-50.
- Oto G, Ekin S, Özdemir H, Bulduk M, Uyar H, Öksüz E, (2016). The protective role of resveratrol on serum total sialic acid and lipid-bound sialic acid in female rats with chronic fluorosis. *Eastern J Med*, 21(4): 168.
- Ozcelik E, Uslu S, Erkasap N, Karimi H, (2014). Protective effect of chitosan treatment against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *KJMS*, 30(6): 286-290.
- Ramasamy P, Subhadrappa N, Shanmugam V, Shanmugam A, (2014). Protective effect of chitosan from *Sepia kobeensis* (Hoyle 1885) cuttlebone against CCl<sub>4</sub> induced hepatic injury. *Int J Biol Macromol*, 65(559-63).
- Sharma Y, (1983). Serum sialic acid and ceruloplasmin levels in experimental fluorosis. *Toxicol. Lett*, 15(1): 1-5.
- Subhadrappa N, Saravanan R, Ramasamy P, Srinivasan A, Shanmugam V, Shanmugam A, (2014). Hepatoprotective effect of  $\beta$ -chitosan from gladius of *Sepioteuthis lessoniana* against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in Wistar rats. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 172(1): 9-20.
- Sun T, Yao Q, Zhou D, Mao F, (2008). Antioxidant activity of N-carboxymethyl chitosan oligosaccharides. *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 18(21): 5774-5776.
- Sydow G, (1985). A simplified quick method for determination of sialic acid in serum. *Biomed Biochim Acta*, 44(11-12): 1721.
- Toz H, Değer Y, (2018). The effect of chitosan on the erythrocyte antioxidant potential of lead toxicity-induced rats. *Biol Trace Elem Res*, 184(114-118).
- Varol E, Varol S, (2010). Fluorosis as an Environmental Disease and its Effect on Human Health. *TAF Prev Med Bull*, 9(3): 233-238.
- Wang Z, Yan Y, Yu X, Li W, Li B, Qin C, (2016). Protective effects of chitosan and its water-soluble derivatives against lead-induced oxidative stress in mice. *Int. J. Biol. Macromol*, 83(442-449).
- Wei W, Pang S, Sun D, (2019). The pathogenesis of endemic fluorosis: Research progress in the last 5 years. *IJMCM*, 23(4): 2333-2342.
- Yildiz PO, Yangilar F, (2014). The use of chitosan in food industry. *JIST*, 30(3): 198-206.
- Yuan W-P, Liu B, Liu C-H, Wang X-J, Zhang M-S, Meng X-M, Xia X-K, (2009). Antioxidant activity of chito-oligosaccharides on pancreatic islet cells in streptozotocin-induced diabetes in rats. *WJG*, 15(11): 1339.
- Yur F, Mert N, Dede S, Değer Y, Ertekin A, Mert H, Yaşar S, Doğan İ, Işık A, (2013). Evaluation of serum lipoprotein and tissue antioxidant levels in sheep with fluorosis. *Fluoride*, 46(2): 90-96.
- Yüksek V, Dede S, Taşpınar M, Çetin S, (2017). The Effects Of Certain Vitamins On Apoptosis and DNA Damage in Sodium Fluoride (Naf) Administered Renal And Osteoblast Cell Lines. *Fluoride* 2017, 50(3): 300-313.
- Zong C, Yu Y, Song G, Luo T, Li L, Wang X, Qin S, (2012). Chitosan oligosaccharides promote reverse cholesterol transport and expression of scavenger receptor BI and CYP7A1 in mice. *Exp Biol Med (Maywood)*, 237(2): 194-200.

**Atıf İçin:** Bayrak C, 2021. Potansiyel biyolojik aktif bazı yeni benzensülfonamid yapısı taşıyan pirazol türevlerinin sentezleri. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1408-1419.

**To Cite:** Bayrak C, 2021. Syntheses of Potential Bioactive Some New Pyrazole Derivatives Having Benzenesulfonamide Moiety. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1408-1419.

## Potansiyel Biyolojik Aktif Bazı Yeni Benzensülfonamid Yapısı Taşıyan Pirazol Türevlerinin Sentezleri

Cetin BAYRAK<sup>1\*</sup>

**ÖZET:** Bu makalede, 4-metil-2,3-difenil-2,3-dihidro-*IH*-pirazol ve 4-(4-metil-5-fenil-2,5-dihidro-*IH*-pirazol-1-il)benzensülfonamid türevi bileşikler  $\alpha,\beta$ -doymamış aldehit bileşiklerinin fenilhidrazin hidrat veya 4-sülfamoil fenil hidrazin hidrojen klorür ile tepkimelerinden elde edildi. Bu reaksiyonların takibinde bileşiklerin aromatlama tepkimeleri 2,3-dikloro-5,6-disiyano-1,4-benzokinon (DDQ) ile yapıldı. Son olarak bileşik 4-(4-metil-5-(3,4,5-trimetoksifenil)-*IH*-pirazol-1-il)benzensülfonamidin SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> grubu Et<sub>3</sub>N varlığında propiyonik anhidrit ile SO<sub>2</sub>NHCOEt grubuna dönüştürüldü. Sentezlenen bileşiklerin yapıları <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR ve HRMS analiz yöntemleri ile karakterize edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Pirazol, Biyolojik aktif, Celecoxib,  $\alpha,\beta$ -doymamış aldehit

### Syntheses of Potential Bioactive Some New Pyrazole Derivatives Having Benzenesulfonamide Moiety

**ABSTRACT:** In this article, 4-methyl-2,3-diphenyl-2,3-dihydro-*IH*-pyrazole and 4-(4-methyl-5-phenyl-2,5-dihydro-*IH*-pyrazole-1-yl) benzenesulfonamide derivatives were synthesized from the reactions of  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes with phenylhydrazine hydrate and 4-sulfamoylphenylhydrazine hydrogen chloride, respectively. Following these reactions, aromatization of the compounds were achieved with 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ). Finally, SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> group of compound 4-(4-methyl-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl) -*IH*-pyrazol-1-yl) benzenesulfonamide was converted to the SO<sub>2</sub>NHCOEt group with propionic anhydride in the presence of Et<sub>3</sub>N. The structures of the synthesized compounds were characterized by <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, and HRMS analysis.

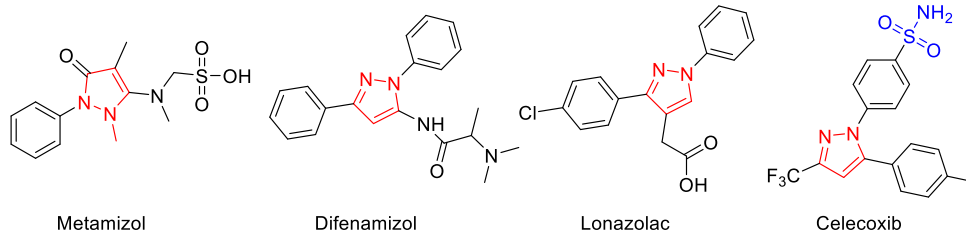
**Keywords:** Pyrazole, Biologically active, Celecoxib,  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehyde

<sup>1</sup> Cetin BAYRAK ([Orcid ID: 0000-0001-5169-7352](https://orcid.org/0000-0001-5169-7352)), Doğubayazıt Ahmed-i Hani Meslek Yüksekokulu, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Ağrı 04400, Turkey

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Cetin BAYRAK, e-mail: cbk040203@gmail.com

## GİRİŞ

Birçok ilacın etken maddesi sentetik bileşiklerden oluşur ve bu ilaç moleküllerinin çoğu heterosiklik bir halkaya sahiptir. Bu halkalardan biri doğada yaygın olarak bulunan aril pirazol halkasıdır. Çoğu pirazol türevleri çok geniş ölçekte anti hiperglisemi, anti-enflamatuar, anti bakteriyel, hipoglisemik, anti koagülan aktivite, ağrı kesici ve ateş düşürücü gibi birçok biyolojik aktiviteye sahiptirler. Celecoxib gibi NSAID (steroidal olmayan anti-inflamatuar ilaçları) araşidonik asidin prostaglandinlere ve tromboksan'a dönüşümünü katalizleyen COX-2 enzimini inhibe ederler (Nagarapu ve ark., 2011). Siklooksijenaz (COX, ayrıca Prostaglandin H Synthase veya PGHS olarak da adlandırılır), hem COX hem de peroksidaz aktivitesi gösteren iki işlevli bir enzimdir. COX bileşeni araşidonik asidi bir hidroperoksi endoperoksite (PGG<sub>2</sub>) dönüştürürken peroksidaz bileşeni endoperoksiti ilgili alkole (PGH<sub>2</sub>), prostaglandin (PG)'lerin prekürsörüne, tromboksanlara ve prostasiklinlere indirger (Nugteren ve Hazelhof 1973; Hamberg ve Samuelss 1973). Şu anda iki ayrı COX izoformu olduğu iyi bilinmektedir. COX-1, çeşitli hücre tiplerinde yapısal olarak eksprese edilir ve normal hücrel homeostazda rol oynar. Forbol esterleri, lipopolisakkaritler, mutajenler, inflamatuvar mediyatörler, tümör promotörleri ve sitokinler gibi çeşitli uyarıcılar, COX'un indüklenmiş formu olan COX-2'nin ekspresyonuna yol açarlar. COX-2, akut inflamatuvar koşullar altında PG'lerin biyosentezinden sorumludur (Xie ve ark., 1991; Blobaum ve Marnett, 2007). Bu uyarılabilir COX-2'nin, NSAID ilaçları anti-enflamatuar aktivitesi için hedef enzim olduğuna inanılmaktadır (Blobaum ve Marnett, 2007). COX-2 enzimi, normal hücrelerden farklı olarak insan tümörlerinde aşırı derecede eksprese edilir ve bir tümörijenik potansiyel geliştirebilir (Eberhart ve ark., 1994). Seçici enzim inhibisyonu ve normal apoptotik yanıtların restorasyonu, COX-2'ye bağlı antikanser mekanizması olarak bilinir (Husain ve ark., 2002; Brown ve DuBois 2005). Şema 1'de görüldüğü gibi birçok sentetik ilacın (metamizol, difenamizol, lonazolac, phenidon, celecoxib ve mepirizol) iskeletinde pirazol halkası bulunmaktadır (Abdel-Aziz ve ark., 2010).

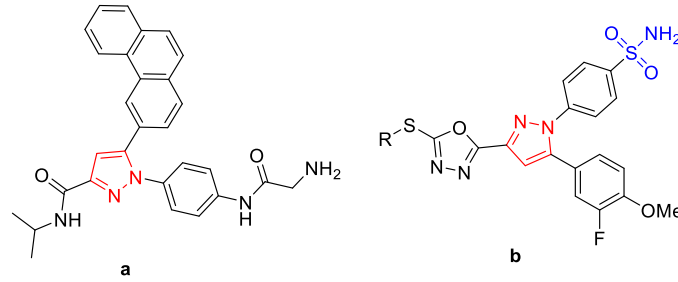


Şema 1: Pirazol halkası içeren ilaç molekülleri.

Son yıllarda kanserin yaygınlaşması ile yeni terapötik ajanların aranışına önem verilmesinin yanı sıra yeni potansiyel kemoterapötik ajanların geliştirilmesine yönelik çalışmalara da hız verilmiştir. Yapılan bir çalışmada benzen sülfonamid süstitüe pirazol bileşiklerinin önemli derecede anti tümör aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir (Faidallah ve ark., 2007). Son yıllarda yapılan çalışmalarda doğrultusunda Şema 2'de sentezlenen pirazol türevi (a) bileşiğin göğüs kanseri gibi diğer kanser hücrelerinin yanı sıra tiroid kanserine karşı oldukça aktif sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu bileşiğin seçilmiş bazı fungal patojen (*Fusarium oxysporum f.sp.niveum*, *Fusarium graminearum sehw*, *Phytophthora sp*, *Myrothecium roridum* ve *Helminthosporium maydis Nisik*) türlerine karşı anti fungal aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Ma ve ark., 2018). Başka bir çalışmada (Şema 2) benzen sülfonamid pirazol türevi (b) bileşiğinin standart ilaç olarak ampisilin kullanılarak, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *E. Coli* gibi bakterilere karşı antibakteriyel aktivitesine bakılmış ve bu

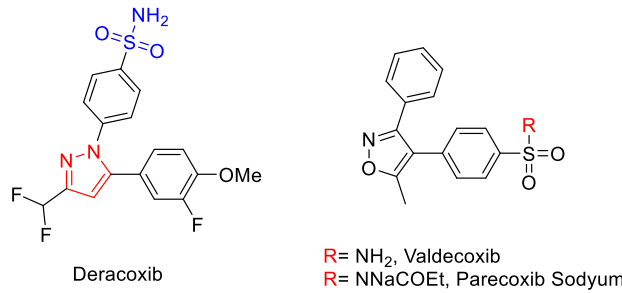


bileşiğin standart olarak kullanılan ampisilinden daha iyi antibakteriyel etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Shingare ve ark., 2018).



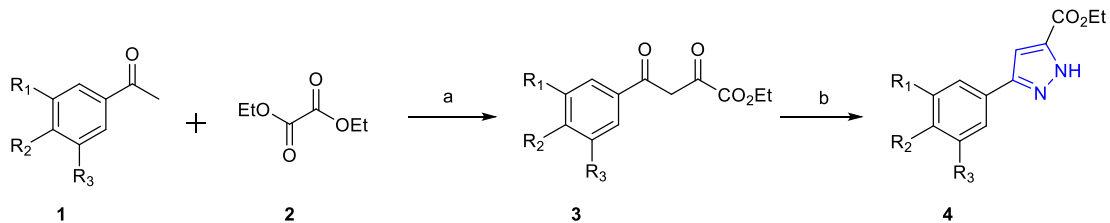
Şema 2: Biyolojik aktif pirazol bileşikleri (a ve b)

Anti-enflamatuar ilaçlar olarak kullanılan Celecoxib, Valdecoxib, Parecoxib sodium (Pal ve ark., 2003) ve Deracoxib gibi ilaçların hepsi benzen sülfonamid yapısına sahiptir (Şema 3). Benzen sülfonamid pirazol yapısı önemli ilaç bileşeni olmasının yanı sıra, anti enflamatuar anti mikrobiyal ve karbonik anhidraz (CA) inhibitörleri gibi terapötik özelliklere de sahiptirler (Shingare ve ark., 2018).



Şema 3: Biyolojik aktif sülfonamid birimi içeren pirazol bileşikleri.

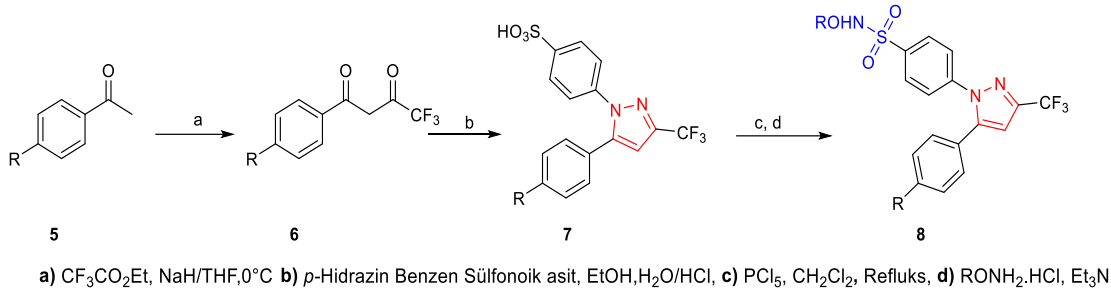
Benzen sülfonamid pirazol türevi bileşiklerinin birçok sentez yöntemleri vardır. Bunlardan biri 1,3-dikarbonil bileşiklerinin hidrazin hidrat ile katılma tepkimesidir (Kamal ve ark., 2015). Yapılan bir çalışmada dietil okzalot (2) kuvvetli bir baz varlığında sübstitüe asetofenon (1) ile muamele edilmiş ve  $\beta$ -ketoester bileşiği (3) elde edilmiştir.  $\beta$ -ketoester bileşiğinin de hidrazin hidrat ile tepkimesinden pirazol türevi (4) bileşiği elde edilmiştir (Kamal ve ark., 2015). (Şema 4)



a) Na, EtOH, rt, 4-5 Sa, b) NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.2HCl, EtOH, Refluks

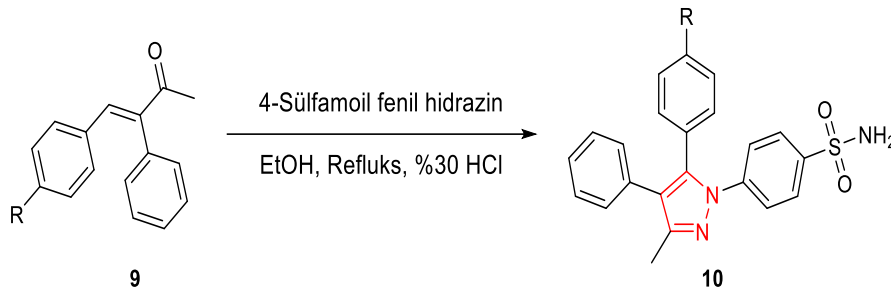
Şema 4: 1,3 Dikarbonil bileşiklerinden pirazol sentezleri.

Zheng ve grubu tarafından yapılan bir çalışmada sübstitüe asetofenon (5) ile triflorasetik asit etil esterinin kuvvetli bir baz varlığında claisen kondenzasyonu sonucu 1,3-dikarbonil bileşiği (6) elde edilmiştir. Bu bileşiğin de para sübstitüe hidrazin benzen sülfonik asit ile tepkimesi sonucu regioselektif olarak 1,5-diaril pirazol bileşiği (8) elde edilmiştir (Gao ve ark., 2009).



Şema 5: 1,3 Dikarbonil bileşiği ile para sübtitüe hidrazin benzen sülfonoik asitin reaksiyonu

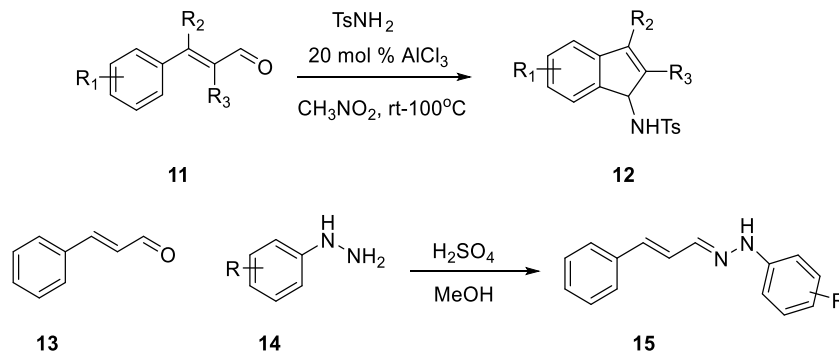
Pirazol benzen sülfonamid türevi bileşiklerinin sentez yöntemlerinden biri de  $\alpha,\beta$ -doymamış keton bileşiklerinin 4-sülfamoil fenil hidrazin ile tepkimesidir (Sharshira ve Hamada, 2012) (Şema 6).



Şema 6:  $\alpha,\beta$ -doymamış keton bileşiğinin *p*-hidrazin benzen sülfonamid ile tepkimesi.

Pirazol iskeleti doğada nadir bulunmasına rağmen biyolojik ve farmakolojik özelliklerinden dolayı bilim adamları tarafından büyük ilgi çekmiştir. Örneğin, pirazolac gibi *N*-sübtitüe pirazoller, NSAID ilaçları olarak bilinir. Seçici bir COX-2 inhibitörü olan celecoxib, osteoartrit (kireçlenme) tedavisi için klinik olarak kullanılır (Shaw ve ark., 2010). Aynı zamanda bazı kanser hücrelerinin tedavisinde kullanılan *N*-sübtitüe pirazol bileşikleri de geliştirilmiştir (Zhang ve ark., 2007a; Zhou ve ark., 2009). Sülfonamidlerin birçok biyolojik aktiviteye sahip oldukları literatürde çokça bilinmektedir. Bu bileşikler klinikte yaygın olarak anti bakteriyel, anti viral, anti-hipertansif, hipoglisemik ve diüretik ilaçlar olarak da kullanılmaktadır (Abbate ve ark., 2004).

Literatürde yapılan çalışmalarda  $\alpha,\beta$ -doymamış aldehit-keton bileşiklerinin fenil hidrazin ile tepkimeleri incelendiğinde hidrazin grubu ilk olarak karbonil grubu ile etkileşir (Gogoi ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2014b; Kashiwa ve ark., 2016; Chen ve ark., 2017) (Şema 7).



Şema 7:  $\alpha,\beta$ -doymamış karbonil bileşiklerinin fenil hidrazin ile tepkimeleri.

## MATERYAL VE METOT

### Deneysel kısım ve Spektrumlar

#### Genel deneysel prosedür

Bütün çözücüler, bilinen yöntemlerle saflaştırıldı ve kurutuldu (Şenol ve ark., 2016; Bayrak ve ark., 2018) Tüm bileşikler için, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) ve <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz) spektrumları Bruker Avance II spektrometresi ile alındı. Preparatif ince tabaka kromatografisi için silika jel 60 PF (Merck, Darmstadt, Almanya) kullanıldı. HRMS verileri LC-MS-TOF elektrosprey iyonizasyon (1200/6210, Agilent) APCI tekniği ile kaydedildi.

#### Pirazolin bileşiklerinin sentezi için standart prosedür.

İlgili  $\alpha,\beta$ -doymamış aldehit bileşikleri (1.0 mmol) alınarak 30 mL EtOH içerisinde çözüldü. Bunu takiben reaksiyon ortamına 4-sülfamoilfenil hidrazin hidroklorür veya fenilhidrazin (1.0 mmol) ilave edildi. Tepkime karışımı yağ banyosu içerisinde yerleştirildi ve reaksiyon EtOH içerisinde gece boyunca reflüks edildi. Reaksiyon TLC ile kontrol edilerek başlangıç bileşiğinin tükendiği görülünce durduruldu ve karışım oda sıcaklığına soğutuldu. Reaksiyon karışımına 100 mL su ilave edildi ve katı kısım süzgeç kağıdı yardımıyla süzülerek kurutuldu. Ham ürün preparatif ince tabaka kromatografisi ile EtOAc-hekzan (3:7) karışımı kullanılarak saflaştırıldı.

**3-(3-Brom-2,5-dimetoksifenil)-4-metil-2-fenil-2,3-dihidro-1H-pirazol (19):** Bileşik 19 (0.185 g, % 94) katı turuncu renkli olarak elde edildi; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.54 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 7.32 – 7.20 (m, 3H), 7.10 – 7.04 (m, 2H), 6.94 (s, 1H), 6.85 (t,  $J = 6.9$  Hz, 1H), 6.65 (s, NH, 1H), 3.87 (s, OMe, 3H), 3.81 (s, OMe, 3H), 2.18 (s, CH<sub>3</sub>, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 151.71 (C), 149.65 (C), 144.77 (C), 142.81 (CH), 135.89 (C), 129.27 (2 x CH), 126.84 (CH), 126.07 (C), 119.96 (CH), 116.02 (CH), 114.29 (C), 112.66 (2 x CH), 110.57 (C), 57.02 (OMe), 56.29 (OMe), 13.62 (CH<sub>3</sub>).

**4-(5-(3-Brom-2,5-dimetoksifenil)-4-metil-2,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)benzensulfonamid (20):** Bileşik 20 (0.29 g, % 91) sıvı sarı renkli olarak elde edildi; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Acetone D<sub>6</sub>)  $\delta$ : 9.68 (s, NH, 1H), 7.67 (s, CH, 1H), 7.60 (d, AB sisteminin A kısmı,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.08 (s, CH, 1H), 7.04 (d, AB sisteminin B kısmı  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.96 (s, CH, 1H), 6.59 (s, CH, 1H), 6.17 (s, NH<sub>2</sub>, 2H), 3.75 (s, OMe, 3H), 3.70 (s, OMe, 3H), 2.05 (s, CH<sub>3</sub>, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, Acetone D<sub>6</sub>)  $\delta$ : 152.67 (C), 150.57 (C), 149.22 (C), 145.62 (CH), 136.51 (C), 134.69 (C), 128.83 (CH), 128.72 (2 x CH), 126.44 (C), 116.87 (CH), 115.04 (CH), 112.32 (2 x CH), 111.17 (C), 57.20 (OMe), 56.71 (OMe), 13.66 (CH<sub>3</sub>).

**3-(2,3-Dibrom-4,5-dimetoksifenil)-4-metil-2-fenil-2,3-dihidro-1H-pirazol (21):** Bileşik 21 (0.116 g, % 93) elde edildi; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.60 (s, NH, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.30 – 7.18 (m, 2H), 7.06 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 6.89 (s, 1H), 6.86 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 6.57 (s, 1H), 3.88 (s, OMe, 3H), 3.86 (s, OMe, 3H), 2.10 (s, CH<sub>3</sub>, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 151.98 (C), 146.67 (C), 144.63 (C), 141.66 (CH), 136.54 (C), 134.61 (C), 132.16 (CH), 129.30 (2 x CH), 121.84 (C), 120.14 (CH), 117.61 (C), 113.60 (CH), 112.71 (2 x CH), 60.64 (OMe), 56.29 (OMe), 13.42 (CH<sub>3</sub>); LC-MS-QTOF: Teorik m/z: [M+H]<sup>+</sup> 452.9813; Bulunan m/z: [M+H]<sup>+</sup>: 452.9875.

**4-(4-Metil-5-(3,4,5-trimetoksifenil)-2,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)benzensulfonamid (22):** Bileşik 22 (0.24 g, % 93) katı sarı renkli olarak elde edildi; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.68 (d, AB sisteminin A kısmı,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 6.96 (d, AB sisteminin B kısmı  $J = 8.9$  Hz, 2H), 6.80 (s, 2H), 6.31 (bs, 1H), 5.06 (d, CHN,  $J = 11.7$  Hz, 1H), 4.77 (s, NH<sub>2</sub>, 2H), 3.82 (s, 3 x OMe, 9H), 3.73-3.68 (m, CH, 1H), 0.83 (d, CH<sub>3</sub>,  $J = 7.5$  Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 153.68 (C), 147.90 (2 x C),

147.33 (CH), 137.55 (CH), 131.16 (CH), 130.70 (CH), 127.93 (2 x CH), 112.93 (2 x CH), 66.08 (CHN), 60.88 (OMe), 56.20 (2 x OMe), 46.38 (CH), 13.00 (CH<sub>3</sub>).

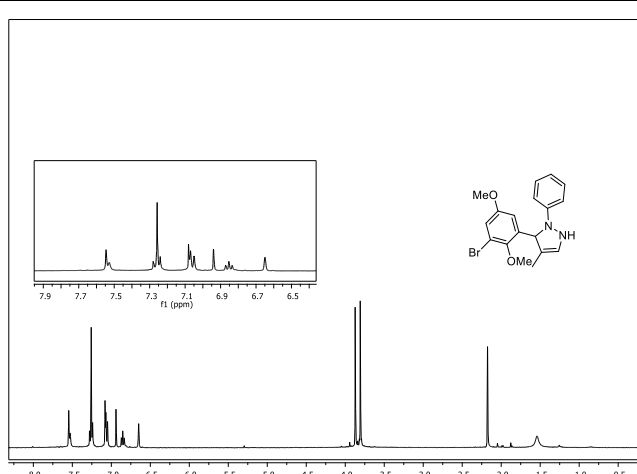
**Pirazolin bileşiklerinin DDQ ile yükseltgeme tepkimesi için standart prosedür:** Sentezlenen pirazolin bileşiği (1.0 mmol) alınarak 70 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> içerisinde çözüldü. Reaksiyon ortamına DDQ (2.0 mmol) ilave edildi. Tepkime karışımı oda sıcaklığında 6 saat karıştırıldı. Reaksiyon TLC ile kontrol edilerek başlangıç bileşiğinin tükendiği görülünce durduruldu. Ürün karışımı % 2 lik 200 mL NaOH çözeltisi ile yıkandı ve CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(2 x 40 mL) ile ekstrakte edildi. Organik faz Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> üzerinden kurutularak süzülme ve çözücü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. Yükseltgenmiş ürünler saf olarak elde edildi.

**5-(3-Brom-2,5-dimetoksifenil)-4-metil-1-fenil-1H-pirazol (23):** Bileşik **23** (0.07 g, % 78) katı turuncu renkli olarak elde edildi; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.61 (s, 1H), 7.32 – 7.14 (m, 5H), 7.06 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 3.76 (s, OMe, 3H), 3.40 (s, OMe, 3H), 2.05 (s, CH<sub>3</sub>, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 151.30 (C), 149.98 (C), 140.94 (CH), 140.81 (C), 135.97 (C), 128.62 (2 x CH), 126.67 (CH), 123.46 (2 x CH), 119.40 (C), 117.27 (C), 117.02 (CH), 115.11 (CH), 112.44 (C), 56.85 (OMe), 55.80 (OMe), 9.11 (CH<sub>3</sub>).

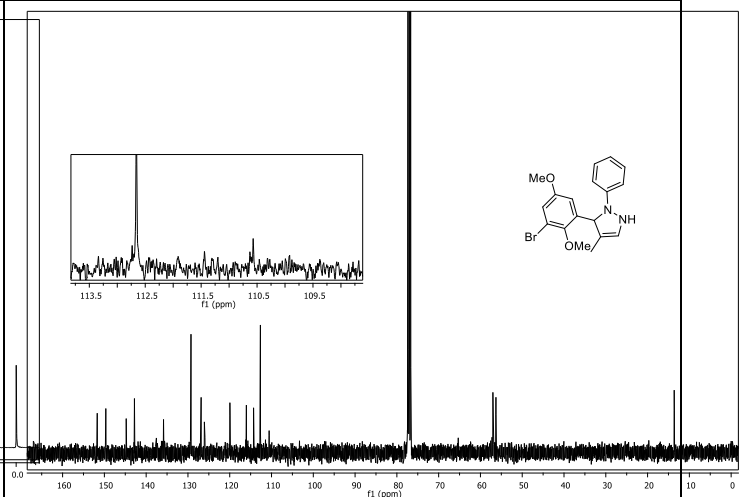
**4-(4-Metil-5-(3,4,5-trimetoksifenil)-1H-pirazol-1-il)benzensulfonamid (24):** Bileşik **24** (0.08 g, % 80) sıvı kahve renkli olarak elde edildi; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.84 (d, AB sisteminin A kısmı, J = 8.7 Hz, 2H), 7.63 (s, CHN, 1H), 7.41 (d, AB sisteminin B kısmı, J = 8.7 Hz, 2H), 6.37 (s, Aromatik, 2H), 4.89 (bs, NH<sub>2</sub>, 2H), 3.92 (s, OMe, 3H), 3.72 (s, 2xOMe, 6H), 2.12 (s, CH<sub>3</sub>, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 153.46 (CHN), 143.37 (C), 142.21 (C), 140.23 (C), 139.79 (C), 138.33 (C), 127.18 (2xCH<sub>2</sub>), 125.18 (C), 124.03 (2 x CH<sub>2</sub>), 117.62 (C), 107.08 (2 x CH<sub>2</sub>), 61.01 (OMe), 56.20 (2xOMe), 9.12 (CH<sub>3</sub>).

**N-((4-(4-Metil-5-(3,4,5-trimetoksifenil)-1H-pirazol-1-il)fenil)sülfonoil)propionamid (25) bileşiğinin sentezi:** Pirazol bileşiği (1.0 mmol) alınarak 20 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> içerisinde çözüldü. Reaksiyon ortamına Et<sub>3</sub>N (1.1 mmol) ilave edildi ve 10 dk karıştırıldı. Tepkime karışımına propiyonik anhidrit (1.1 mmol) ilave edildi ve reaksiyona 24 saat devam edildi. Reaksiyon TLC ile kontrol edilerek başlangıç bileşiğinin tükendiği görülünce durduruldu. Ürün karışımı % 1 lik 5 mL HCl çözeltisi ile yıkandı ve CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 30 mL) ile ekstrakte edildi. Organik faz Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> üzerinden kurutularak süzülme ve çözücü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. Ham ürün preparatif ince tabaka kromatografisi ile EtOAc/hekzan karışımı kullanılarak saflaştırıldı.

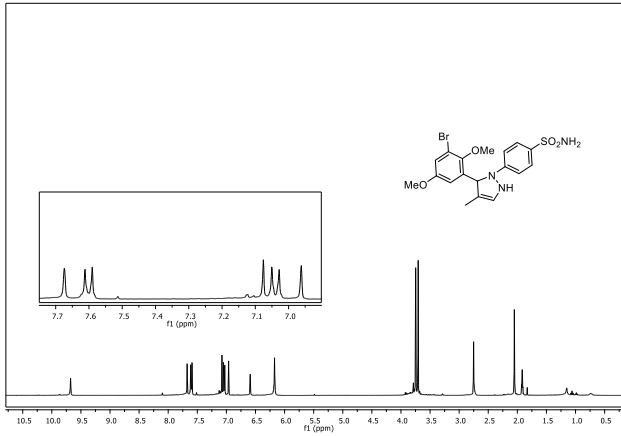
Bileşik **25** (0.1 g, % 88) sıvı turuncu renkli olarak elde edildi; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.54 (bs, NH, 1H), 7.96 (d, AB sisteminin A kısmı, J = 11.0 Hz, 2H), 7.64 (s, CHN, 1H), 7.45 (d, AB sisteminin B kısmı J = 11.0 Hz, 2H), 6.37 (s, aromatik, 2H), 3.90 (s, OMe, 3H), 3.72 (s, 2xOMe, 6H), 2.25 (q, J = 7.4 Hz, 2H), 2.12 (s, CH<sub>3</sub>, 3H), 1.05 (t, J = 7.4 Hz, 3H); LC-MS-QTOF: Teorik m/z: [M+H]<sup>+</sup> 460.1542; Bulunan m/z [M+H]<sup>+</sup> 460.1579.



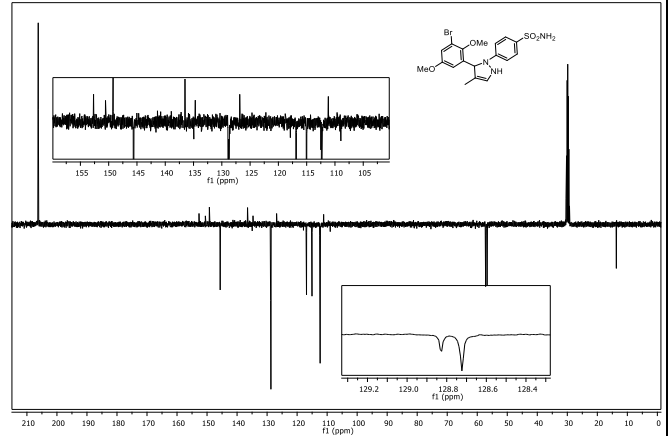
**Bileşik 19'a ait  $^1\text{H-NMR}$  ve Spektrumu (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**



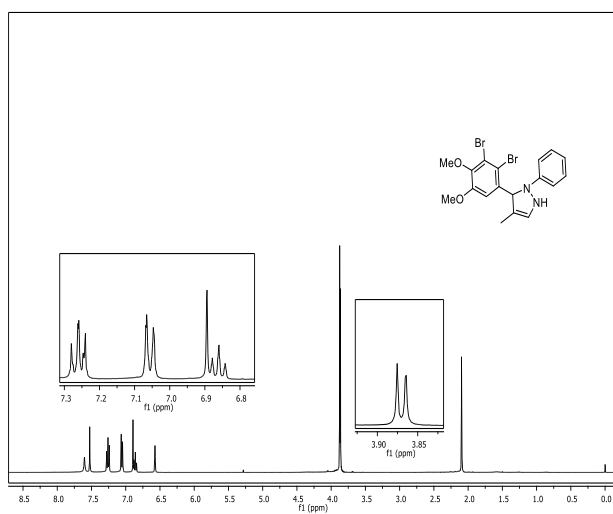
**Bileşik 19'a ait  $^{13}\text{C-NMR}$  ve Spektrumu (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**



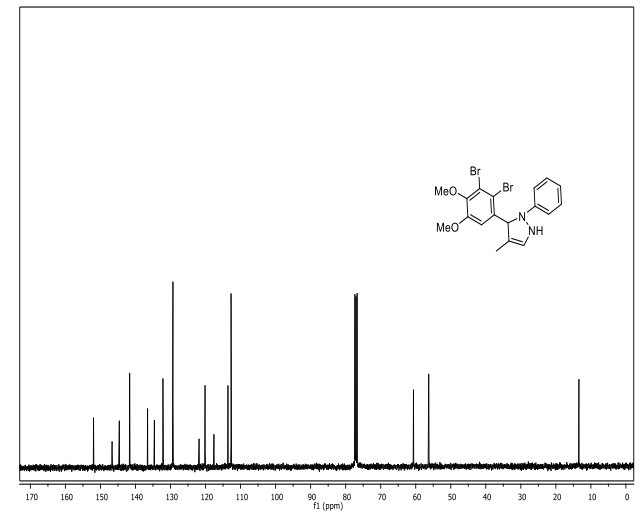
**Bileşik 20'ye ait  $^1\text{H-NMR}$  Spektrumu (400 MHz, Aseton  $\text{D}_6$ ).**



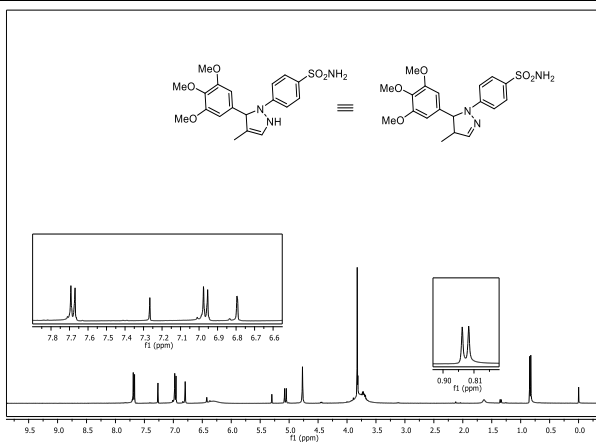
**Bileşik 20'ye ait  $^{13}\text{C-APT}$  Spektrumu (400 MHz, Aseton  $\text{D}_6$ ).**



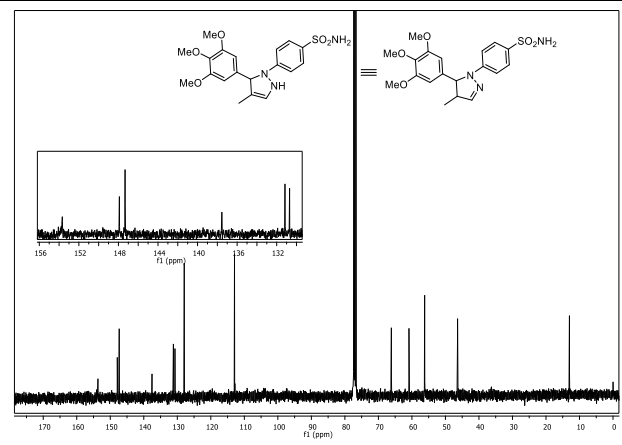
**Bileşik 21'e ait  $^1\text{H-NMR}$  Spektrumu (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**



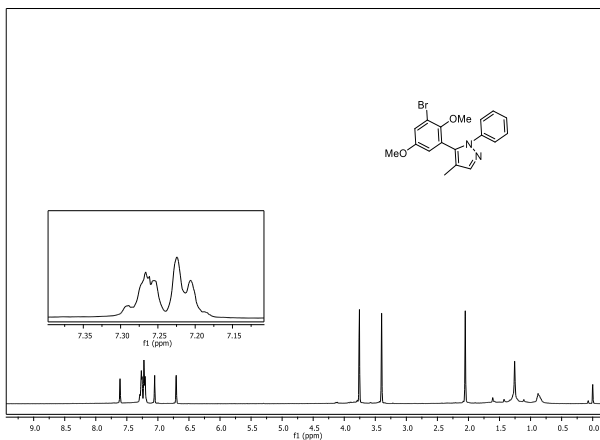
**Bileşik 21'e ait  $^{13}\text{C-NMR}$  Spektrumu (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**



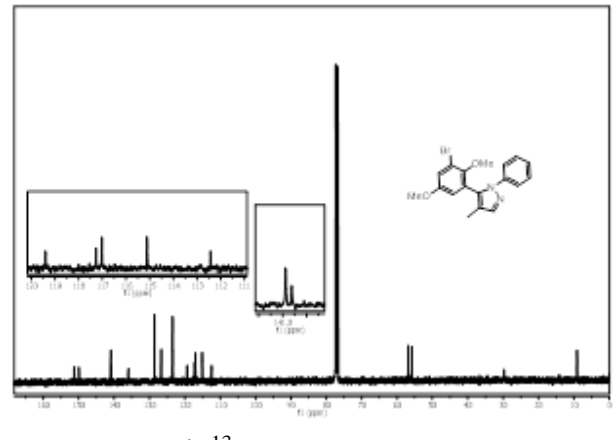
**Bileşik 22'ye ait  $^1\text{H}$ -NMR Spektrumu (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**



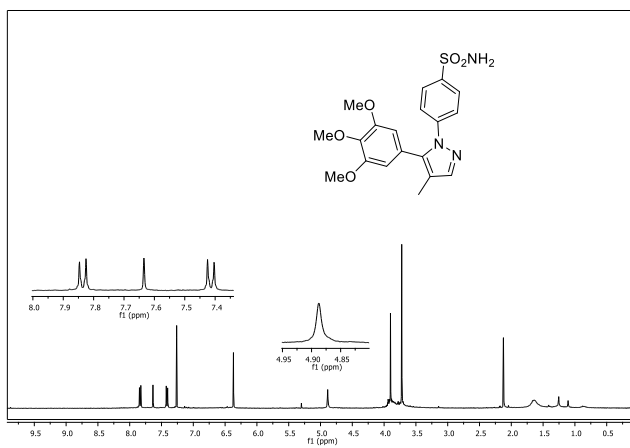
**Bileşik 22'ye ait  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrumu (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**



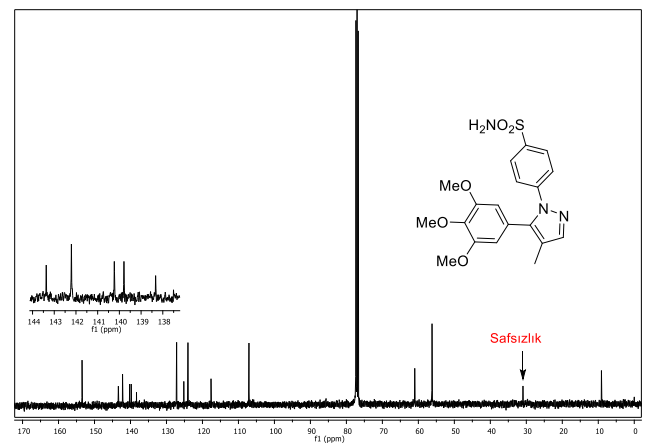
**Bileşik 23'e ait  $^1\text{H}$ -NMR Spektrumu (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**



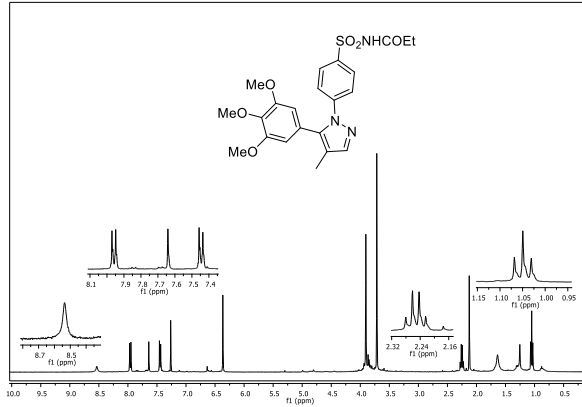
**Bileşik 23'e ait  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrumu (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**



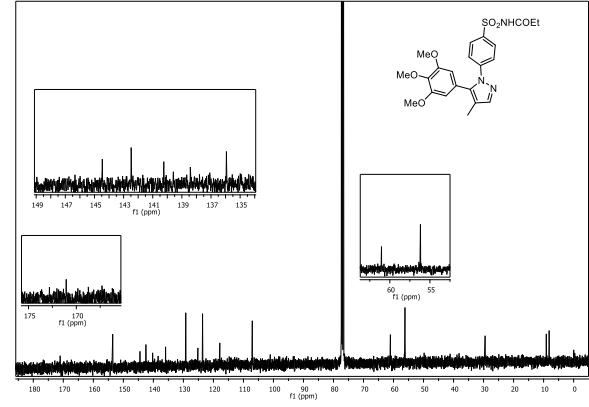
**Bileşik 24'e ait  $^1\text{H}$ -NMR ve Spektrumu (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**



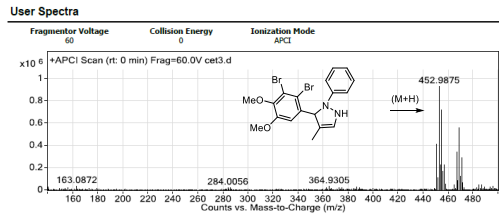
**Bileşik 24'e ait  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrumu (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**



**Bileşik 25'e ait  $^1\text{H-NMR}$  Spektrumu (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**

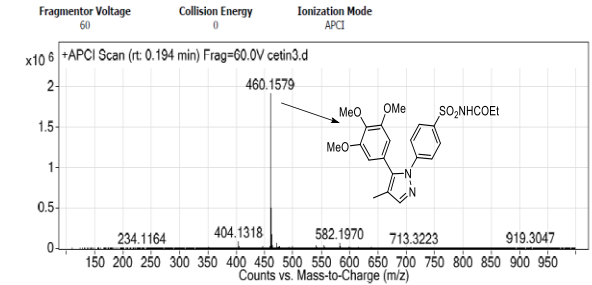


**Bileşik 25'e ait  $^{13}\text{C-NMR}$  Spektrumu (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**



**Bileşik 21'e ait kütle (HRMS) spektroskopisi**

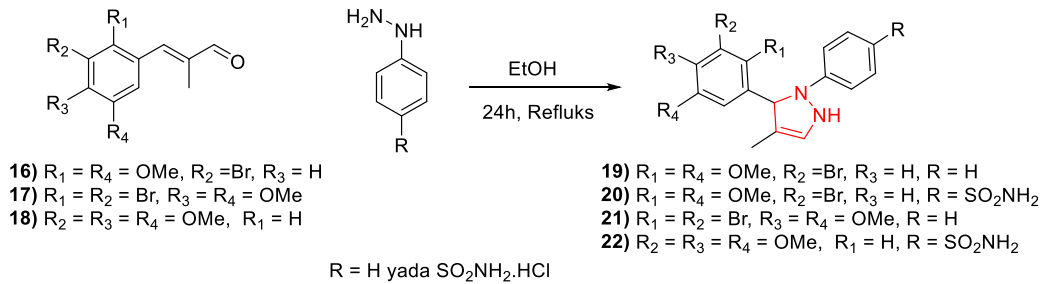
#### User Spectra



**Bileşik 25'e ait kütle (HRMS) spektroskopisi**

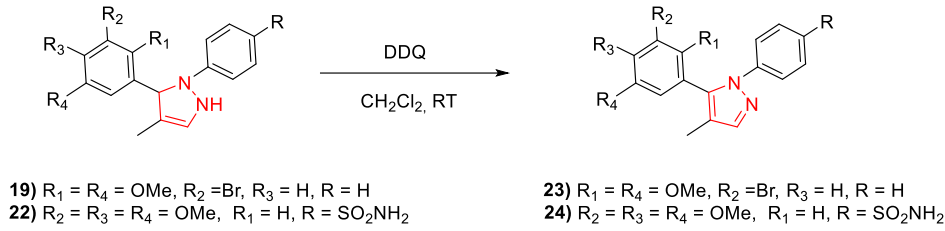
## BULGULAR VE TARTIŞMA

Pirazol ve sülfonamid bileşiklerinin önemli derecede biyolojik aktivite göstermelerinden dolayı bu çalışmada bu iki iskelet yapısını da içeren yeni bileşiklerin sentezleri amaçlandı. İlgili pirazol bileşiklerinin sentezi için öncelikle ilgili  $\alpha,\beta$ -doymamış aldehit bileşikleri (**16-18**) literatürde bilinen yöntemlere göre sentezlendi (Ning ve ark., 2013; Wijtmans ve ark., 2012). Daha sonra **16-18** nolu bileşiklerin 4-sülfamoilfenil hidrazin hidroklorür veya fenilhidrazin ile katılma tepkimeleri bilinen yöntemlere göre (Pal ve ark., 2003) yapıldı ve tepkimeler sonucunda ilgili pirazolin bileşikleri (**19-22**) sentezlendi (Şema 8). Bileşiklerin  $^1\text{H-NMR}$  ve  $^{13}\text{C-NMR}$  spektrumları yapı ile uyumludur.



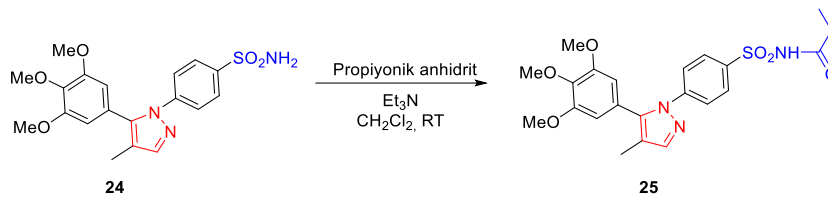
**Şema 8:** Pirazolin bileşikleri **19-22**'in sentezleri.

**19** ve **22** numaralı bileşiklerin  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  içerisinde oda sıcaklığında 2,3-dikloro-5,6-disiyano-1,4-benzokinon (DDQ) ile bilinen yöntemlere göre (Jagerovic ve ark., 2002; Wang ve ark., 2014) yükseltgenme tepkimeleri yapıldı ve ilgili pirazol bileşikleri **23** ve **24** sentezlendi.



Şema 9: Pirazolin bileşikleri **19** ve **22**'nin DDQ ile tepkimesi.

Aynı zamanda, bileşik **24**'ün de Et<sub>3</sub>N varlığında propiyonik anhidrit ile tepkimesinden bileşik **25**'in sentezi gerçekleştirildi (Şema 10).



Şema 10: Bileşik **25**'in sentezi.

## SONUÇ

Bu çalışmada, biyolojik olarak aktivite gösterebilecek 7 yeni Celecoxib türevi bileşiğin sentezi gerçekleştirildi. Sentezleri gerçekleştirilen bileşiklerden **19**, **21** ve **23** Celecoxib'deki SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> grubunun yerine H atomu taşımaktadır. Bileşikler **20**, **22** ve **24** Celecoxib ile aynı gruplara sahiptir. Bileşik **25** de ise Parecoxib bileşiğinde mevcut olan NHCOEt grubu bulunmaktadır. Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin önemli derecede biyolojik aktivite gösterebilecekleri düşünüldüğünden dolayı onların sentezleri literatüre kazandırılmıştır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde gerçekleştirilmiştir. Katkılarından dolayı bu kuruma teşekkürlerimi sunarım.

## Çıkar Çatışması

Makaleye ait çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve makalenin yazılması aşamalarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederim.

## Yazar Katkısı

Makalenin planlanması, yürütülmesi ve yazılması makale tek yazarı olarak tarafımda yapıldığı beyan ederim.

## KAYNAKLAR

- Abbate F, Casini A, Owa T, Scozzafava A, Supuran CT, 2004. Carbonic anhydrase inhibitors: E7070, a sulfonamide anticancer agent, potently inhibits cytosolic isozymes I and II, and transmembrane, tumor-associated isozyme IX. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14 (1): 217-223.
- Abdel-Aziz HA, El-Zahabi HS, Dawood KM, 2010. Microwave-assisted synthesis and in-vitro anti-tumor activity of 1,3,4-triaryl-5-N-arylpiperazine-carboxamides. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45 (6): 2427-32.



- Bayrak C, Senol H, Sırtbası S, Menzek A, Sahin E, 2018. Synthesis and rearrangement reactions of 1,4-dihydrospiro[1,4-methanonaphthalene-9,1'-cyclopropane] derivatives. *Tetrahedron*, 74(40): 5839-5849.
- Blobaum AL, Marnett LJ, 2007. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50 (7): 1425-1441.
- Brown JR, DuBois RN, 2005. COX-2: A molecular target for colorectal cancer prevention. *Journal of Clinical Oncology*, 23 (12): 2840-2855.
- Chen L, Teng W, Geng XL, Zhu YF, Guan YH, Fan X, 2017. Facile synthesis of indene and fluorene derivatives through AlCl<sub>3</sub>-catalyzed cyclization of in situ formed iminium ions. *Applied Organometallic Chemistry*, 31 (12): e3863.
- Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, Dubois RN, 1994. Up-Regulation of Cyclooxygenase-2 Gene-Expression in Human Colorectal Adenomas and Adenocarcinomas. *Gastroenterology*, 107 (4): 1183-1188.
- Faidallah HM, Al-Saadi MS, Rostom SAF, Fahmy HTY, 2007. Synthesis of some sulfonamides, disubstituted sulfonylureas or thioureas and some structurally related variants. A class of promising antitumor agents. *Medicinal Chemistry Research*, 16 (6): 300-318.
- Gao M, Wang M, Miller KD, Hutchins GD, Zheng QH, 2009. Synthesis of carbon-11 labeled celecoxib derivatives as new candidate PET radioligands for imaging of inflammation. *Appl Radiat Isot*, 67 (11): 2019-24.
- Gogoi P, Gogoi SR, Devi N, Barman P, 2014. Aluminium Chloride-Catalyzed Synthesis of 4-Benzyl Cinnolines from Aryl Hydrazones. *Synthetic Communications*, 44 (8): 1142-1148.
- Hamberg M, Samuelss B, 1973. Detection and Isolation of an Endoperoxide Intermediate in Prostaglandin Biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70 (3): 899-903.
- Husain SS, Szabo IL, Tarnawski AS, 2002. NSAID inhibition of GI cancer growth: Clinical implications and molecular mechanisms of action. *American Journal of Gastroenterology*, 97 (3): 542-553.
- Jagerovic N, Cano C, Elguero J, Goya P, Callado LF, Meana JJ, Giron R, Abalo R, Ruiz D, Goicoechea C, Martin MI, 2002. Long-acting fentanyl analogues: Synthesis and pharmacology of N-(1-phenylpyrazolyl)-N-(1-phenylalkyl-4-piperidyl)propanamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10 (3): 817-827.
- Kamal A, Reddy VS, Shaik AB, Kumar GB, Vishnuvardhan MVPS, Polepalli S, Jain N, 2015. Synthesis of (Z)-(arylamino)-pyrazolyl/isoxazolyl-2-propenones as tubulin targeting anticancer agents and apoptotic inducers. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13 (11): 3416-3431.
- Kashiwa M, Kuwata Y, Sonoda M, Tanimori S, 2016. Oxone-mediated facile access to substituted pyrazoles. *Tetrahedron*, 72 (2): 304-311.
- Ma Y, Liang S, Zhang Y, Yang D, Wang, R, 2018. Development of anti-fungal pesticides from protein kinase inhibitor-based anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 148, 349-358.
- Nagarapu L, Mateti J, Gaikwad HK, Bantu R, Sheeba Rani M, Prameela Subhashini NJ, 2011. Synthesis and anti-inflammatory activity of some novel 3-phenyl-N-[3-(4-phenylpiperazin-1yl)propyl]-1H-pyrazole-5-carboxamide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21 (14): 4138-40.
- Ning XL, Guo Y, Ma XY, Zhu RZ, Tian C, Wang XW, Ma ZZ, Zhang ZL, Liu JY, 2013. Synthesis and neuroprotective effect of E-3,4-dihydroxy styryl aralkyl ketones derivatives against oxidative stress and inflammation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23 (13): 3700-3703.
- Nugteren DH, Hazelhof E, 1973. Isolation and Properties of Intermediates in Prostaglandin Biosynthesis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 326 (3): 448-461.
- Pal M, Madan M, Padakanti S, Pattabiraman VR, Kalleda S, Vanguri A, Mullangi R, Mamidi NVSR, Casturi SR, Malde A, Gopalakrishnan B, Yeleswarapu KR, 2003. Synthesis and cyclooxygenase-2 inhibiting property of 1,5-diarylpyrazoles with substituted benzenesulfonamide moiety as pharmacophore: Preparation of sodium salt for injectable formulation. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46 (19): 3975-3984.
- Pal P, Jana N, Nanda S, 2014. Asymmetric total synthesis of paecilomycin E, 10'-epi-paecilomycin E and 6'-epi-cochliomycin C. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 12 (41): 8257-74.

- Senol H, Bayrak C, Menzek A, Sahin E, Karakus M, 2016. Cycloaddition reaction of spiro[2.4]hepta-4,6-dien-1-ylmethanol and PTAD: a new rearrangement. *Tetrahedron*, 72(20): 2587-2592.
- Sharshira EM, Hamada NM, 2012. Synthesis and antimicrobial evaluation of some pyrazole derivatives. *Molecules*, 17 (5): 4962-71.
- Shaw AY, Liao HH, Lu PJ, Yang CN, Lee CH, Chen JY, Xu Z, Flynn G, 2010. 3,5-Diaryl-1H-pyrazole as a molecular scaffold for the synthesis of apoptosis-inducing agents. *Bioorg Med Chem*, 18 (9): 3270-8.
- Shingare RM, Patil YS, Sangshetti JN, Patil RB, Rajani DP, Rajani SD, Madje BR, 2018. Benzene sulfonamide pyrazole thio-oxadiazole hybrid as potential antimicrobial and antitubercular agents. *Research on Chemical Intermediates*, 44 (7): 4437-4453.
- Wang ZL, Li HL, Ge LS, An XL, Zhang ZG, Luo X, Fossey JS, Deng WP, 2014. DDQ-mediated oxidative coupling: an approach to 2,3-dicyanofuran (thiophene). *J Org Chem*, 79 (3): 1156-65.
- Wijtmans M, Maussang D, Sirci F, Scholten DJ, Canals M, Mujic-Delic A, Chong M, Chatalic KL, Custers H, Janssen E, de Graaf C, Smit MJ, de Esch IJ, Leurs R, 2012. Synthesis, modeling and functional activity of substituted styrene-amides as small-molecule CXCR7 agonists. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 51, 184-92.
- Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL, 1991. Expression of a Mitogen-Responsive Gene Encoding Prostaglandin Synthase Is Regulated by Messenger-Rna Splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88 (7): 2692-2696.
- Zhang J, Shen B, Lin A, 2007. Novel strategies for inhibition of the p38 MAPK pathway. *Trends Pharmacol Sci*, 28 (6): 286-95.
- Zhang X, Kang J, Niu P, Wu J, Yu W, Chang J, 2014. I<sub>2</sub>-mediated oxidative C-N bond formation for metal-free one-pot synthesis of di-, tri-, and tetrasubstituted pyrazoles from alpha,beta-unsaturated aldehydes/ketones and hydrazines. *J Org Chem*, 79 (21): 10170-8.
- Zhou HB, Carlson KE, Stossi F, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, 2009. Analogs of methyl-piperidinopyrazole (MPP): antiestrogens with estrogen receptor alpha selective activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19 (1): 108-10.

## Design, Synthesis and Antimicrobial Activities of New Carbon Nanotubes Derivatives

Aybek YİĞİT<sup>1\*</sup>, Mehmet Hakki ALMA<sup>3</sup>, Yüksel AKİNAY<sup>4</sup>, Nurettin MENGES<sup>2</sup>

**ABSTRACT:** Even though natural products or crops have been more common and popular in the recent, the chemicals without side-effects have been also addressed in various fields of industries due to possibility obtaining the large quantity and more bio-efficacy. In that context, many drugs have been developed for antibacterial activities but the over-uses of those relevant drugs have caused that microorganisms have adapted and evolved resistance against those drugs. Those lead to the researchers to focus on newly synthesized or functionalized molecules. In that context, nanotechnology, especially modified nanocarbon tubes (NCTs), are of the great interest of the various industries. Along with the current study, multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) were functionalized with three steps. Firstly, the carbon nanotube with a carboxylic acid tip on its surface was commercially purchased and then converted into acyl chloride, and later converted into a more reactive group. Then, the nucleophilic amino group such as diethylene triamine is bonded onto the carbon nanotube. Finally, after the carbon nanotube material with amine groups was functionalized with boric acid, carbon nanotube molecules carrying boric acid molecules were synthesized. Following modification and functionalization of MWCNTs, the newly synthesized molecules were characterized using FT-IR, SEM, TEM and XPS. After chemical characterization, the relevant molecules were screened for their anti-bacterial activities in comparison to those of well-known antibiotics. For anti-bacterial assays, molecules were tested against *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P.aeruginosa*, *S. aureus* and *B. subtilis*. Concerning the findings of the antibacterial assays, concentrations of 40 and 80 µg /mL exhibited a range of activities but in parallel with those of standard antibiotics whereas the lower concentration, viz. 5, 10 and 20 µg / mL did not exhibit any activities. The highest activity was noted for 80 µg / mL, in comparison to those of antibiotics and other concentrations, against *B. subtilis*, with a 23 mm inhibition zone.

**Keywords:** Carbon nanotube, disc diffusion method, primary amine, antibacterial activity

<sup>1</sup> Aybek YİĞİT ([Orcid ID: 0000-0001-8279-5908](https://orcid.org/0000-0001-8279-5908)), Application and Research Center, Iğdir University, Iğdir, Turkey,

<sup>2</sup> Nurettin MENGES ([Orcid ID: 0000-0002-5990-6275](https://orcid.org/0000-0002-5990-6275)), Pharmaceutical Chemistry Section, Van Yüzüncü Yıl University, Van, Turkey

<sup>3</sup> Mehmet Hakki ALMA ([Orcid ID: 0000-0001-6323-7230](https://orcid.org/0000-0001-6323-7230)), Department of Biosystem Engineering, Iğdir University, Iğdir, Turkey

<sup>4</sup> Yüksel AKİNAY ([Orcid ID: 0000-0002-6171-6307](https://orcid.org/0000-0002-6171-6307)), Faculty of Engineering and Architecture, Department of Mining Engineering, Van Yüzüncü Yıl University, Van, Turkey

\*Corresponding Author: Aybek YİĞİT, e-mail: aybek.yigit@igdir.edu.tr

## INTRODUCTION

Infectious diseases have been of the main causes of death due to enhanced resistance of bacteria to drugs available which, in turn result in higher rate of morbidity and mortality (Allahverdiyev et al., 2011). The relevant evolved resistance of the bacteria has been attributed to excessive uses of the current available drugs, causing a big and substantial threat to the health worldwide. To be compatible with the possible emergence of increasing global alarming of microbial diseases or to develop new compounds with augmented biological activities are of the great concerns. Furthermore, the well-known compounds might be also improved in their biological activities with the nanotechnology, especially modified nanocarbon tubes (NCTs) (Khabashesku et al., 2006; Amiri et al., 2012; Aslan et al., 2012; Zardini et al., 2012; Mocan et al., 2014; Salam et al., 2017; Sah et al., 2018). Indeed, a very high antibacterial activity of carbon based nanoparticles has been well-known and disseminated in that context. Of the first relevant researches, fullerenes, single-walled CNTs and graphene oxide (GO) nanoparticles have been clearly reported to possess anti-bacterial activities toward pathogenic microorganisms (Sah et al., 2018). However, in the last decades, allotropes of this new carbon have been discovered and applied in many fields (Sokolov and Stankevich, 1993; Cataldo and Da Ros, 2008; Wang et al., 2014).

A newly synthesized, modified and consequently functionalized carbon-based material are, in general, equipped with different properties rather than other conventional materials, being exclusive in its chemical structure, tubular arrangement, modifiable surface, stability and strength (Hu et al., 2009; Sah et al., 2018). Herewith the acquired unique and distinguishable properties, CNTs are of the mostly investigated allotropes of carbon, being prime candidates to be assessed in various disciplines ranging from medicine (Eatemadi et al., 2014; Amenta and Aschberger, 2015; Alshehri et al., 2016) to agriculture (Mondal et al., 2011; De La Torre-Roche et al., 2013; Chhipa, 2017).

Specifically, in order to combat with the possible emergence of new infectious diseases or their variants or microbial problems available, a wide range arrays of studies relating with enhancing the antibacterial capacity of the conventional compounds have been great interest studied (Chen et al., 2013; Seo et al., 2014; Dizaj et al., 2015; Kassem et al., 2019). For that reason, in the current study, we assessed the antibacterial activities of functionalized MWCNTs using diethylene triamine and boric acid. The structural modifications were revealed using FT-IR, SEM, TEM and XPS. Then, the successfully-obtained and conjugated compounds were assayed for their activity with five different microorganisms such as *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P.aeruginosa*, *S. aureus* and *B. subtilis*. Then, compared with the common and well-known standard antibiotics Entamicin, Erythromycin, Amikacin, Ampicillin, and Cloxacill.

## MATERIALS AND METHODS

### Functionalization and Characterization

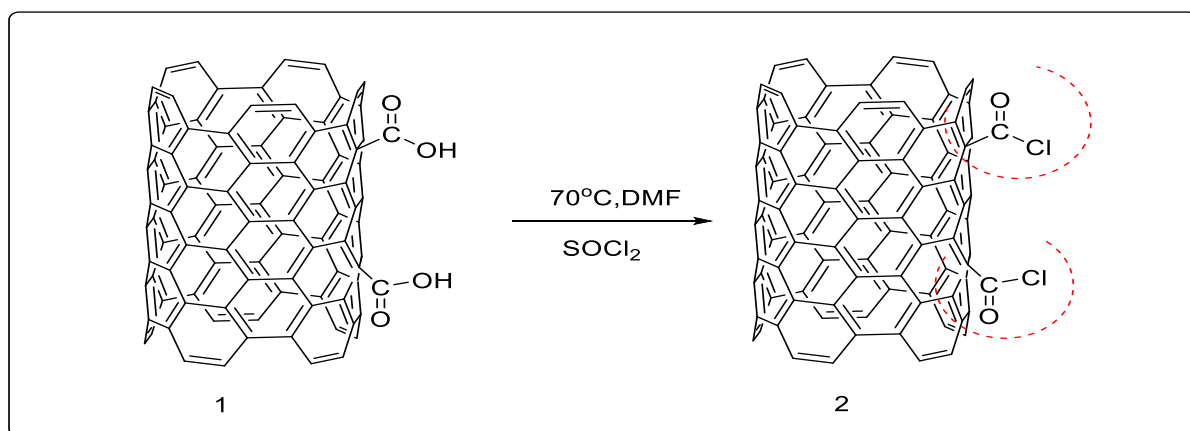
#### Materials

Thionyl chloride ( $\text{SOCl}_2$ ), dimethylformamide (DMF), anhydrous tetrahydrofuran (THF), Diethylene Triamine, and boric acid were purchased from Sigma–Aldrich. Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) were purchased from Nanografi Nano Technology with -COOH Functionalized MWCNT, Purity>96%, Outside Diameter: average diameters of 8-18 nm.

#### Functionalization of MWCNTs with Acylchloride

Figure 1 shows the schematic diagram of the surface acylation of multi-walled CNT with carboxylic acid tip. Following that acylation, 100 mg of MWCNTs (MWCNTs–COOH) was stirred in 10 mL of thionyl chloride ( $\text{SOCl}_2$ ) in the presence of 1mL of dry dimethylformamide (DMF) at 70°C

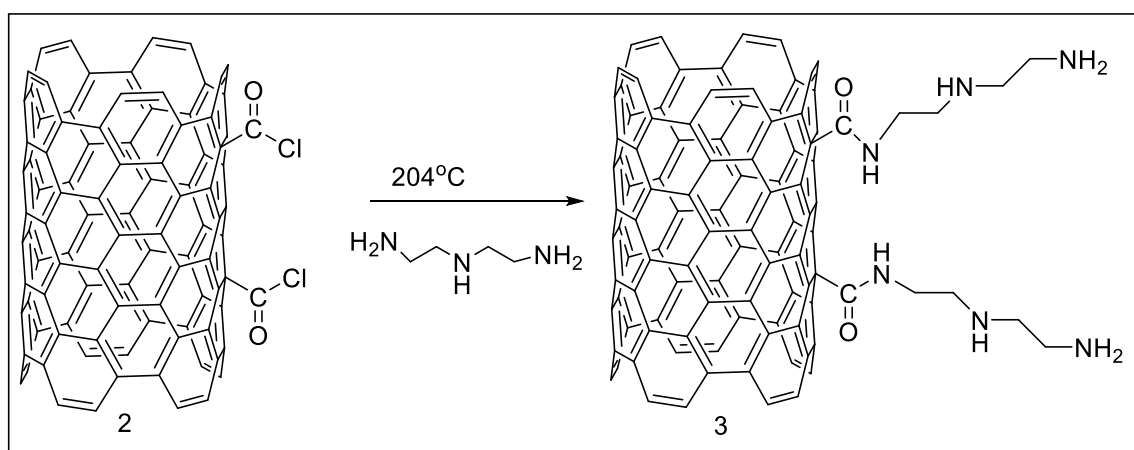
for 24 h. Then, a filtration process was followed for removal of solid from the solution using Gooch crucible (No: 3 or 4). The filtrate was firstly washed using dry diethylether, dry THF and finally with dry DMF and dried at 25 °C temperature in a vacuum oven.



**Figure 1.** Schematic diagram of the surface acylation of multi-walled CNT with carboxylic acid tip

### Functionalization of MWCNTs with Diethylenetriamine

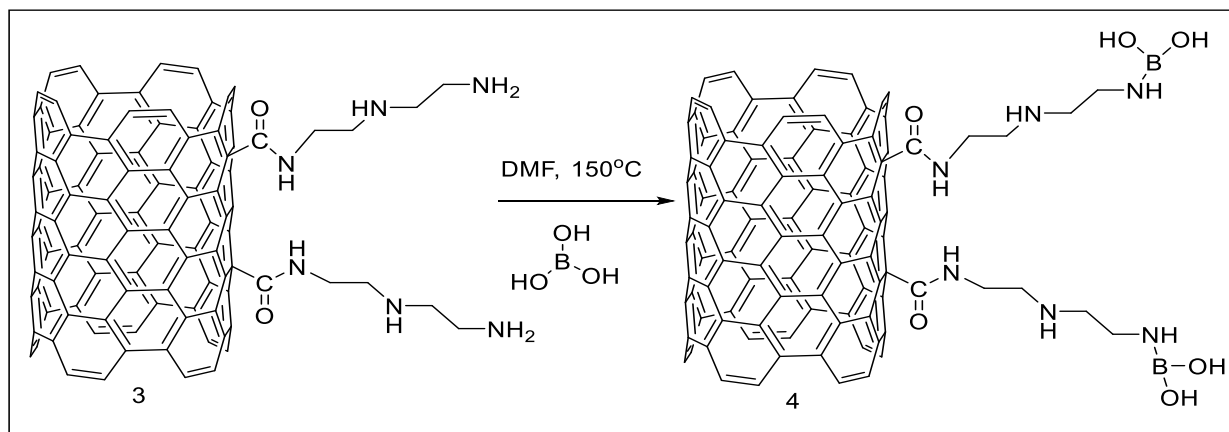
Figure 2 shows the functionalization procedure of MWCNTs–Cl with diethylene triamine. In that context, MWCNTs–Cl (250 mg) was mixed with 4 mL of diethylene triamine and stirred for 24 h at 204°C. Then, the procedure was followed by the filtration of the resulted material for removal of solid particles from the solution. Ultimately, the filtrates were washed using dry THF and dried at 25 °C temperature in a vacuum oven.



**Figure 2.** Schematic diagram of the tip of acylated multi-walled CNT with Diethylene Triamine groups.

### Functionalization of MWCNTs-NH<sub>2</sub> with boric acid

Figure 3 shows the functionalization procedure of MWCNTs-NH<sub>2</sub> with boric acid. Briefly, MWCNTs-NH<sub>2</sub> (50 mg) was mixed with boric acid (150 mg) in 5 mL dry DMF and then mixture was allowed for stirring at 150°C for 24 h. The stirring was followed by the removal of solid particles from the solution using Gooch crucible (No: 3 or 4). The filtrate was firstly washed using pure water, THF and finally with ethyl alcohol and dried at 25°C temperature in a vacuum oven.



**Figure 3.** Schematic diagram of boric acid functionalization at the end of Diethylene Triamine modified multi-walled CNT

### Characterization Instrument

#### FT-IR studies

FT-IR spectra were obtained using KBr pellets (4000–400  $\text{cm}^{-1}$ ) on Bio-Rad-Win-IR Spectrophotometer.

#### Scanning Electron Microscope (SEM)

The structure characterization of the samples was carried out using a Zeiss Sigma 300 scanning electron microscope (SEM) with SE detector at 10 kV acceleration voltage.

#### Transmission Electron Microscope (TEM)

Hitachi HT7700 transmission electron microscope (TEM) device was used for surface information in the modification processes.

#### X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) was used to identify atomic and molecular information about the surface of the material, providing information on the composition and electrostatic level of the sample surface by analyzing the core levels and subsequent analysis of the emitted core photoelectrons. Herein, for the present study, we analyzed MWCNTs-NH-B(OH)<sub>2</sub> using XPS by taking data at a depth of 10 nm from the surface. The operating conditions of the spectroscopy were as follows: X-ray source: Al K $\alpha$  Monochromatic (1486.68 eV), X-ray spot size: 300  $\mu\text{m}$ , sampling area: 60x60 mm, analyzer: 180° hemispherical analyzer-128 channel detector, 200 eV transition energy for general scanning and 50 eV transition energy for partial scanning, Scan number: XPS device surface analysis was performed in 3 operating parameters.

### Antimicrobial Studies

#### Microorganisms

The microorganisms were kindly provided from bacterial collection of Van Dursun Odabaş Medical Faculty Hospital (Van, Turkey). Three of the test microorganisms were Gram-negative bacteria (*Klebsiella pneumoniae* AATC 13883, *Escherichia coli* ATCC 36218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027), and two Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ATCC 6633 *B. subtilis*) were assayed for anti-bacterial activities. For comparison of the functionalized MWCNTs with the standard and common antibiotics, Gentamicin, Erythromycin, Amikacin, Ampicillin, and Cloxacillin were used as positive control groups. DMSO (Dimethylsulfoxide) was used as a negative control group

for antibacterial activity assays. Disk diffusion and hollow agar methods were used to determine the antimicrobial activities of multi-walled CNTs in which amine groups and different functional groups function. In the negative control group, in order to determine the effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) used on microorganisms, four different concentrations (5, 10, 15 and 20  $\mu\text{l}$ ) were studied and no activity was found.

### Determination of antibacterial activity by disk diffusion method

For the activity studies, microorganisms kept at  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  were activated, then inoculated into MHB liquid medium with the help of a loop in a sterile cabinet and left for 24 hours incubation at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Anar et al., 2016). The bacterial suspension prepared at the end of the period was adjusted according to the Mac Farland standard density (İlçim et al., 1998; Berber et al., 2013). The discs used in the disc diffusion method (Whatman No: 1) are 6 mm and sterilized before use. The substances were prepared by dissolving in DMSO, and in the same way in dilutions, they were prepared with DMSO in four different concentrations (0.025, 0.05, 0.1 and 0.2  $\text{mg}/\mu\text{l}$ ) and absorbed on discs. Discs were placed at equal intervals on the cultivated media. Likewise, the substances (DMSO 10  $\text{mg}/\text{ml}$ ) were dissolved and 5  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$ , 40  $\mu\text{l}$  and 80  $\mu\text{l}$  concentrations were prepared and studied in the well agar method. Furthermore, for positive control groups in their standard quantities, Gentamicin (CN: 10 $\mu\text{g}$ ), Erythromycin (E: 15  $\mu\text{g}$ ), Amikacin (AK: 30  $\mu\text{g}$ ), Ampicillin (AMP: 10  $\mu\text{g}$ ), Cloxacill (CX: 5  $\mu\text{g}$ ) were used. Then it was left at room temperature for 15 minutes and incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 24 h. After incubation, the results were measured in mm, inhibition diameters around the cavity and discs (Onbaşılı et al., 2011).

## RESULTS AND DISCUSSION

### FT-IR studies

Herein, the relevant functional groups of MWCNTs-NH-B(OH)<sub>2</sub> we used for the present study were evaluated using FT-IR spectroscopy. Figure 4 shows that the spectra of MWCNTs-NH-B(OH)<sub>2</sub>, revealing that 3365  $\text{cm}^{-1}$  vibration band (N-H) groups, Carbonyl (C = O) groups in vibration band amide groups of 1678  $\text{cm}^{-1}$ , 1427, 1365, 921  $\text{cm}^{-1}$  vibration band (B-O) groups, and 920  $\text{cm}^{-1}$  vibration band (C = C) groups (Amiri et al., 2012).

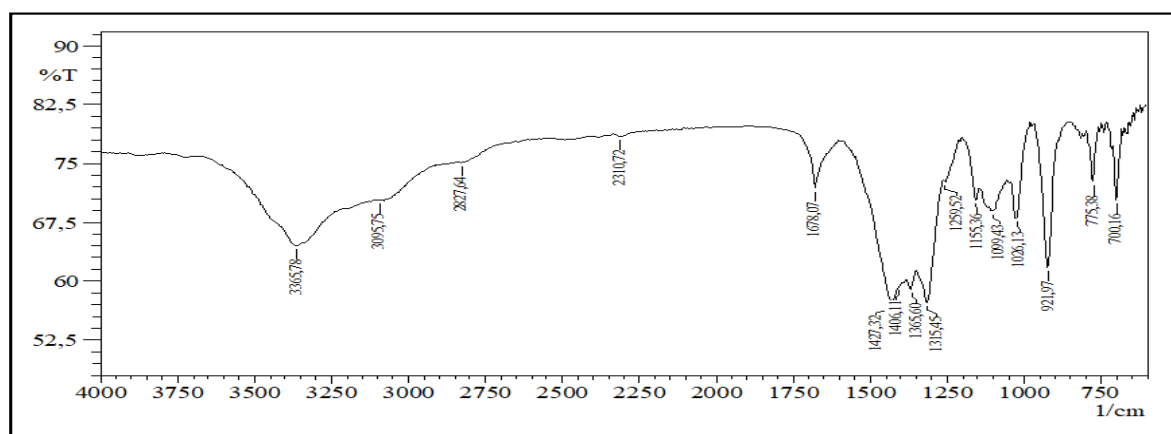
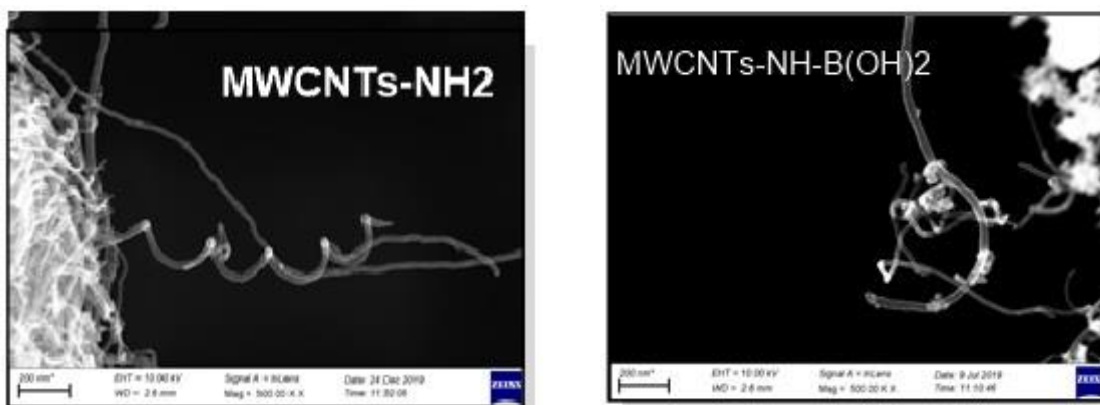


Figure 4. FT-IR spectra of MWCNTs-NH-B(OH)<sub>2</sub>

### Scanning Electron Microscope (SEM)

Figure 5 a-b represents the SEM images of MWCNTs-NH<sub>2</sub>, MWCNTs-NH-B(OH)<sub>2</sub> molecules, respectively, suggesting a diameter of the multi-walled carbon nanotube modified with the amine group varied between 1-2 micrometers (Figure 5 a). Herein, a homogenous, clear and transparent image on the

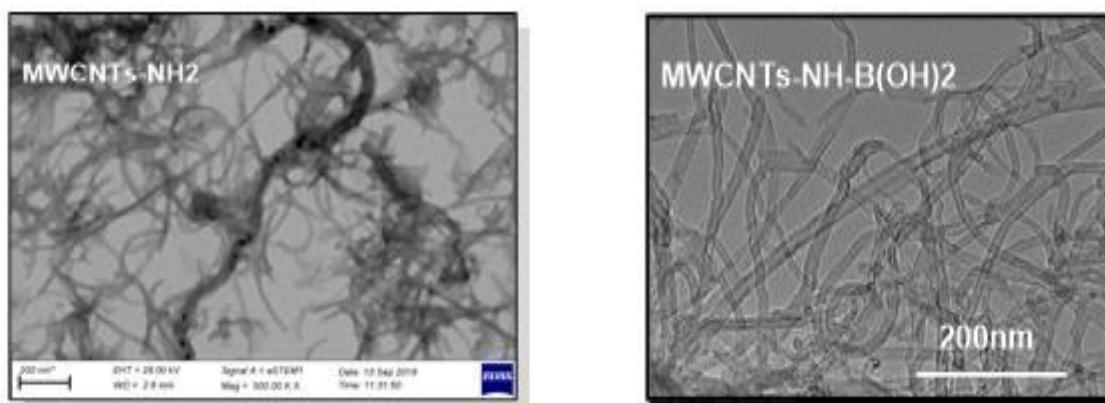
surface of the MWCNT due to the covalently bonded amine group was observed. In addition, functionalization of CNTs with amine group resulted in contraction. Regarding modification with boric acid, the diameter of MWCNTs-NH-B(OH)<sub>2</sub> obtained through functionalization with boric acid on MWCNTs-NH<sub>2</sub> was slightly smaller than MWCNTs-NH<sub>2</sub> and a more rough surface was observed (Figure 5 b) (Cao et al., 2020)



**Figure 5.** SEM images of MWCNTs-NH<sub>2</sub> and MWCNTs-NH-B(OH)<sub>2</sub> molecules

### Transmission Electron Microscope (TEM)

EM images of MWCNTs-NH<sub>2</sub>, and MWCNTs-NH-B(OH)<sub>2</sub> are given in Figure 6 a-b, respectively. As seen in Figure 6 a, in the characterization, inner pore size of MWCNTs-NH<sub>2</sub> was about an average with 10 nm and outer capsule size of MWCNTs-NH<sub>2</sub> was determined as an average of 8.5-12 nm. In addition, the inner pore size MWCNTs-NH-B(OH)<sub>2</sub> was about an average of 10 nm while the outer capsule size was determined to be between 8-11 nm (Cui et al., 2020).



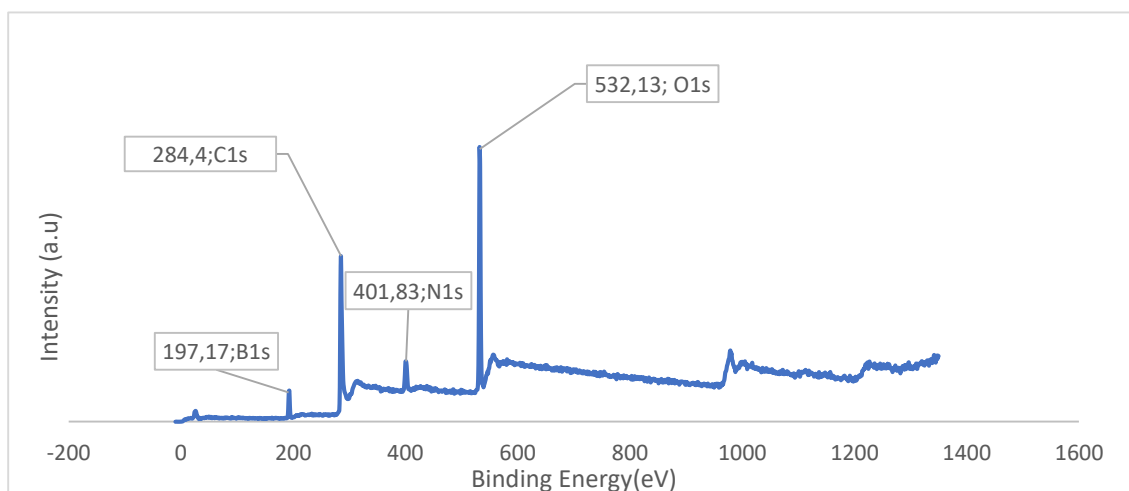
**Figure 6.** TEM image of MWCNTs-NH<sub>2</sub> and MWCNTs-NH<sub>2</sub>-B(OH)<sub>2</sub>.

### XPS analysis of MWCNTs-NH-B(OH)<sub>2</sub>

Figure 7 shows the spectra of MWCNTs-NH-B(OH)<sub>2</sub>, revealing that MWCNTs-NH-B(OH)<sub>2</sub> exhibited the C1s and O1s peaks at the binding energies of 284.4 and 532.0 eV, respectively. Functionalization of MWCNTs with diethylene triamine and boric acid exhibited two new peaks of B1s and N1s at the binding energies of 192.0 and 401.0 eV, which they did not exist in MWCNTs-Cl. The deconvolution of the C1s spectra shows the following binding energy values corresponding to 284.4 eV for C-C (sp<sup>2</sup>) / C-H and C=C, 285.19 eV for C-C(sp<sup>3</sup>)/C-H, 287.16 eV for N-C=O, and 290.76eV for π-π interactions. Two peaks of N1s region demonstrate that 400.33 eV and 401.83eV values are responsible



for CO-NH and CH<sub>2</sub>NH, respectively. Presence of two different peaks in O1s region can be explained by N-C=O (532.13 eV) and C=O (for carboxyl groups) (532.91eV). Furthermore, B1s region shows two peaks which are responsible for B-N (192.57eV) and B-OH (193.17 eV). Those relevant regional data prove that MWCNTs are properly functionalized with diethylene triamine and boric acid (Ma et al., 2014; Arumugasamy et al., 2020).



**Figure 7.** XPS spectrum for MWCNTs-NH-B(OH)<sub>2</sub>

#### Anti-bacterial activities of the common antibiotics and functionalized molecules

The findings relating activities of Gentamicin, Erythromycin, Amikacin, Ampicillin and Cloxacillin are collectively presented in Table 1. Of those antibiotics, ampicillin did not exhibit any activities against *P. aeruginosa* and erythromycin were not substantially effective against *L. monocytogenes* (Table 1). For activities of MWCNTs-NH-B(OH)<sub>2</sub>, a concentration ranging 5 to 80 µl was bio-assayed against the pathogenic bacteria. Of the tested concentrations, only 40 µg / mL and 80 µg / mL exhibited inhibitory activities, being active against *E. coli* (16 mm) and *B. subtilis* (14 mm) at concentration of 40 µg / mL and *E. coli* (20 mm), *P. aeruginosa* (15 mm), *S. aureus* (18 mm), and *B. subtilis* (23 mm) at concentration of 80 µg / mL (Table 2). The tested concentrations of the molecules ranged similar inhibition zones with those of relevant antibiotics. The highest activity was noted for 80 µg / mL, in comparison to those of antibiotics and other concentrations, against *B. subtilis*, with a 23 mm inhibition zone, leading more researches to be addressed on the inhibitory activities of the molecules against *B. subtilis*.

In the relevant reports, functionalized MWCNTs were more effective against *E. coli* than *S. aureus* (Zardini et al., 2012). Those results are consistent with the present findings. Lysine functionalized MWCNTs were also assayed against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia*, being bactericidal on both microorganisms whereas MWCNT-NH-B(OH)<sub>2</sub> did not exhibit any inhibitory effects on *K. pneumonia* (Amiri et al., 2012). We should herein utter that the volume and concentration of each solution of the present study was higher than those of Amiri et al. (2012). Those findings suggest that the activity might not be dependent on concentration but related and linked with the interaction between bacterial membrane and molecules (Liu et al., 2010), electronic structure of the CNTs (Vecitis et al., 2010), size (diameter) of the CNTs (Kang et al., 2008), and nature of the target organism (Al-Jumaili et al., 2017). Overall, the bactericidal activity of the MWCNTs is addressed on the complete surface phenomena involving leakage of the bacterial cellular components and coupling with the relevant enzyme activations (Li et al., 1997; Sah et al., 2018).

**Table 1:** Antibacterial activities of some common antibiotics

| Antibiotics        | <i>K. pneumoniae</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> |
|--------------------|----------------------|----------------|----------------------|------------------|--------------------|
| <i>Gentamisin</i>  | 17 mm                | 17 mm          | 18 mm                | 18 mm            | 18 mm              |
| <i>Amikasin</i>    | 10 mm                | 20 mm          | 25 mm                | 16 mm            | 11 mm              |
| <i>Eritromisin</i> | 19 mm                | 19 mm          | 19 mm                | 21 mm            | 20 mm              |
| <i>Ampicillin</i>  | 16 mm                | 13 mm          | -                    | 24 mm            | 14 mm              |
| <i>Cloxacillun</i> | 10 mm                | 12 mm          | 12 mm                | 25 mm            | 15 mm              |

mm corresponds to the inhibition zone and (-) represents “no inhibition zone with 6mm disc diameter”

**Table 2:** Antibacterial activities of MWCNT- NH-B(OH)<sub>2</sub>

| MWCNT- NH-B(OH) <sub>2</sub> (µg / mL) | <i>K. pneumoniae</i> | <i>E. Coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> |
|--|----------------------|----------------|----------------------|------------------|--------------------|
| 5 µl                                   | -                    | -              | -                    | -                | -                  |
| 10 µl                                  | -                    | -              | -                    | -                | -                  |
| 20 µl                                  | -                    | -              | -                    | -                | -                  |
| 40 µl                                  | -                    | 16 mm          | -                    | -                | 14 mm              |
| 80 µl                                  | -                    | 20 mm          | 15 mm                | 18 mm            | 23 mm              |

mm corresponds to the inhibition zone and (-) represents “no inhibition zone with 6mm disc diameter”

## CONCLUSION

Along with the current study, MWCNTs were successfully modified with diethylene triamine and boric acid with a three-step procedure. Those relevant modifications of MWCNT- NH-B(OH)<sub>2</sub> were clearly revealed using FTIR, XPS, SEM, and TEM analysis. Functionalized molecules were then assayed for their anti-bacterial activities. At two high concentration, a range of activities were noted for specific bacterial collections but also concentration dependent activity from 40 and 80 µg / mL was reported herein. Novel findings of the study might be deduced as that 80 µg / mL concentration of the MWCNT- NH-B (OH)<sub>2</sub> were more effective against *B. subtilis*, with a-23 mm inhibition zone, in comparison to those of common antibiotics. Those findings might lead to the more specific studies to be addressed on the inhibitory activities of the molecules against *B. subtilis*.

## ACKNOWLEDGMENT

This study was funded by both Van Yüzüncü Yil University (Project Number: 2019-FDK-7816) and Iğdir University (Project number: 2019-FBE-A27). Authors thank to The head of the center of Scientific and Application Center in Van Yüzüncü Yil University for spectral support. Also, bioactivity studies was made in Staff Chemical Reagent Company.

## Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

## Author's Contributions

NM conceived and designed the experiments, discussed the data, and wrote the manuscript. AY has progressed experiments; YA and MHA have recorded and interpreted the DTA, SEM, TEM and XPS. All authors read and approved the manuscript.

## REFERENCES

Al-Jumaili A, Alancherry S, Bazaka K, Jacob M, 2017. Review on the antimicrobial properties of carbon nanostructures. *Materials*, 10(9): 1066.

- Allahverdiyev AM, Abamor ES, Bagirova, M, & Rafailovich M, 2011. Antimicrobial effects of TiO<sub>2</sub> and Ag<sub>2</sub>O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmania parasites. *Future microbiology*, 6(8):933-940.
- Alshehri R, Ilyas AM, Hasan A, Arnaout A, Ahmed F, Memic A, 2016. Carbon nanotubes in biomedical applications: factors, mechanisms, and remedies of toxicity: miniperspective. *Journal of medicinal chemistry*, 59(18): 8149-8167.
- Amenta V, Aschberger K, 2015. Carbon nanotubes: potential medical applications and safety concerns. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 7(3): 371-386.
- Amiri A, Zardini HZ, Shanbedi M, Maghrebi M, Baniadam M, Tolueinia B, 2012. Efficient method for functionalization of carbon nanotubes by lysine and improved antimicrobial activity and water-dispersion. *Materials Letters*, 72: 153-156.
- Anar M, Orhan F, Alpsoy L, Gulluce M, Aslan A, Agar G, 2016. The antioxidant and antigenotoxic potential of methanol extract of *Cladonia foliacea* (Huds.) Willd, *Toxicology and Industrial Health*, 32 (4): 721-729.
- Arumugasamy SK, Govindaraju SK, Yun K, 2020. Electrochemical Sensor for Detecting Dopamine Using Graphene Quantum Dots Incorporated with Multiwall Carbon Nanotubes. *Appl. Surf. Sci.*, 145294.
- Aslan S, Deneufchatel M, Hashmi S, Li N, Pfefferle LD, Elimelech M, Van Tassel PR, 2012. Carbon nanotube-based antimicrobial biomaterials formed via layer-by-layer assembly with polypeptides. *Journal of colloid and interface science*, 388(1): 268-273.
- Berber İ, 2013. Sinop'da yetişen bazı bitkilerin metanolik ekstraktlarının antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin belirlenmesi. *Karaelmas Science and Engineering Journal*, 3(1): 10-16.
- Cao Y, Mohamed AM, Mousavi M, Akinay Y, 2020. Poly (pyrrole-co-styrene sulfonate)-encapsulated MWCNT/Fe-Ni alloy/NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites for microwave absorption. *Materials Chemistry and Physics*, 124169.
- Cataldo F, Da Ros T, 2008. Medicinal chemistry and pharmacological potential of fullerenes and carbon nanotubes (Vol. 1). Springer Science & Business Media.
- Chen H, Wang B, Gao D, Guan M, Zheng L, Ouyang H, Feng W, 2013. Broad-spectrum antibacterial activity of carbon nanotubes to human gut bacteria. *Small*, 9(16): 2735-2746.
- Chhipa H, 2017. Nanofertilizers and nanopesticides for agriculture. *Environmental chemistry letters*, 15(1): 15-22.
- Cui L, Huang H, Ding P, Zhu S, Jing W, Gu X, 2020. Cogeneration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and OH via a novel Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/MWCNTs composite cathode in a dual-compartment electro-Fenton membrane reactor. *Separation and Purification Technology*, 237: 116380.
- De La Torre-Roche R, Hawthorne J, Deng Y, Xing B, Cai W, Newman LA, White JC, 2013. Multiwalled carbon nanotubes and C<sub>60</sub> fullerenes differentially impact the accumulation of weathered pesticides in four agricultural plants. *Environmental Science & Technology*, 47(21): 12539-12547.
- Dizaj SM, Mennati A, Jafari S, Khezri K, Adibkia K, 2015. Antimicrobial activity of carbon-based nanoparticles. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 5(1): 19.
- Eatemadi A, Daraee H, Karimkhanloo H, Kouhi M, Zarghami N, Akbarzadeh A, Joo SW, 2014. Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications. *Nanoscale research letters*, 9(1): 393.
- Hu C, Hu S, 2009. Carbon nanotube-based electrochemical sensors: principles and applications in biomedical systems. *Journal of Sensors* 2009.
- İlçim A, Dıġrak M, Baġcı E, 1998. Bazı bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkilerinin araştırılması. *Turkish Journal of Biology*, 22: 119-125.
- Kang S, Herzberg M, Rodrigues DF, Elimelech M, 2008. Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter!. *Langmuir*, 24(13): 6409-6413.
- Kassem A, Ayoub GM, Malaeb L, 2019. Antibacterial activity of chitosan nano-composites and carbon nanotubes: A review. *Science of the total environment*, 668: 566-576.
- Kassem A, Ayoub GM, Malaeb L, 2019. Antibacterial activity of chitosan nano-composites and carbon nanotubes: a review. *Science of the total environment*, 668: 566-576.

- Khabashesku VN., & Pulikkathara MX, 2006. Chemical modification of carbon nanotubes. *Mendeleev Communications*, 16(2): 61-66.
- Li H, Fedorova OS, Grachev AN, Trumble WR, Bohach GA, Czuchajowski L, 1997. A series of meso-tris (N-methyl-pyridiniumyl)-(4-alkylamidophenyl) porphyrins: Synthesis, interaction with DNA and antibacterial activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1354(3): 252-260.
- Liu S, Ng AK, Xu R, Wei J, Tan CM, Yang Y, Chen Y, 2010. Antibacterial action of dispersed single-walled carbon nanotubes on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* investigated by atomic force microscopy. *Nanoscale*, 2(12): 2744-2750.
- Ma R, Hu J, Cai Z, Ju H, 2014. Facile synthesis of boronic acid-functionalized magnetic carbon nanotubes for highly specific enrichment of glycopeptides. *Nanoscale*, 6: 3150-3156.
- Mocan L, Ilie I, Matea C, Tabaran F, Kalman E, Iancu C, Mocan T, 2014. Surface plasmon resonance-induced photoactivation of gold nanoparticles as bactericidal agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International journal of nanomedicine*, 9: 1453.
- Mondal A, Basu R, Das S, Nandy P, 2011. Beneficial role of carbon nanotubes on mustard plant growth: an agricultural prospect. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(10): 4519.
- Onbaşı D, Altuner EM, Çelik GY, 2011. *Mnium marginatum* Özütlelerinin antimikrobiyal aktivitesi, Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 11 (2): 205-208.
- Sah, U., Sharma, K., Chaudhri, N., Sankar, M., & Gopinath, P. (2018). Antimicrobial photodynamic therapy: Single-walled carbon nanotube (SWCNT)-Porphyrin conjugate for visible light mediated inactivation of *Staphylococcus aureus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 162, 108-117.
- Salam, M. A., & Burk, R. (2017). Synthesis and characterization of multi-walled carbon nanotubes modified with octadecylamine and polyethylene glycol. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S921-S927.
- Seo Y, Hwang J, Kim J, Jeong Y, Hwang MP, Choi J, 2014. Antibacterial activity and cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes decorated with silver nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 9: 4621.
- Sokolov VI, Stankevich IV, 1993. The fullerenes—new allotropic forms of carbon: molecular and electronic structure, and chemical properties. *Russian Chemical Reviews*, 62(5): 419.
- Vecitis CD, Zodrow KR, Kang S, Elimelech M, 2010. Electronic-structure-dependent bacterial cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes. *ACS nano*, 4(9): 5471-5479.
- Wang JT, Chen C, Wang E, Kawazoe Y, 2014. A new carbon allotrope with six-fold helical chains in all-sp<sup>2</sup> bonding networks. *Scientific reports*, 4: 4339.
- Zardini HZ, Amiri A, Shanbedi M, Maghrebi M, Baniadam M, 2012. Enhanced antibacterial activity of amino acids-functionalized multi walled carbon nanotubes by a simple method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 92: 196-202.

**Atıf İçin:** Barlas Z, Ormanlı E, Öz Saraç U, Orhan A, Çalığülü U, 2021. HSS S960QL Çeliğinin MAG Kaynağında Kaynak Akımı ve Gaz Kompozisyonundaki CO<sub>2</sub> Oranının Birleştirme Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1430-1443.

**To Cite:** Barlas Z, Ormanlı E, Öz Saraç U, Orhan A, Çalığülü U, 2021. Investigation on Effects of Weld Current and CO<sub>2</sub> Content in Gas Composition in GMAW on Joint Properties of HSS S960QL Steel. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1430-1443.

### **HSS S960QL Çeliğinin MAG Kaynağında Kaynak Akımı ve Gaz Kompozisyonundaki CO<sub>2</sub> Oranının Birleştirme Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi**

Zafer BARLAS<sup>1\*</sup>, Esen ORMANLI<sup>2</sup>, Uğur ÖZSARAÇ<sup>1</sup>, Ayhan ORHAN<sup>3</sup>, Uğur ÇALIGÜLÜ<sup>3</sup>

**ÖZET:** Bu çalışmada, 8 mm kalınlığındaki HSS S960QL çelik plakalar %5 CO<sub>2</sub> ve %20 CO<sub>2</sub> içerikli iki farklı karışım gaz koruması altında 185, 215 ve 245 amper olmak üzere üç farklı kaynak akımında MAG kaynak yöntemiyle birleştirilmiştir. Uygulanan bu kaynak değişkenlerinin birleştirme denemelerinin kaynak bölgesi mekanik ve mikroyapı özelliklerine olan etkilerini tespit etmek amacıyla makro ve mikroyapı incelemelerinin yanı sıra çekme ve çentik darbe testleri ile mikrosertlik ölçümleri yapılmıştır. Gerçekleştirilen deneysel çalışma ve gözlem sonuçları göstermiştir ki kaynak akımı ve CO<sub>2</sub> oranının artmasıyla, daha geniş ve derin nüfuziyete sahip bir kaynak metali meydana gelirken, kaynak bölgesinde başlangıç mikroyapısındaki temperlenmiş martenzitin beynite oranı azalmış, ayrıca buna tane irileşmesi de eşlik etmiştir. Dolayısıyla, sertlik ölçümlerinde artan akımla birlikte nispeten daha yavaş soğuma hızına bağlı olarak ısı tesiri altındaki bölgede ve kaynak metalinde sertlik düşüşleri belirlenmiştir. Ayrıca kaynak akımı ve CO<sub>2</sub> miktarındaki artış, akma ve çekme dayanımlarının yanı sıra çentik darbe tokluğunu da düşürücü bir rol oynamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** MAG kaynak yöntemi, S960QL çeliği, kaynak akımı, koruyucu gaz kompozisyonu

### **Investigation on Effects of Weld Current and CO<sub>2</sub> Content in Gas Composition in GMAW on Joint Properties of HSS S960QL Steel**

**ABSTRACT:** In this study, HSS S960QL steel plates in thickness of 8 mm using three different welding currents which 185, 215 and 245 ampere were joined under two different shielding gas including of 5% CO<sub>2</sub> and 20% CO<sub>2</sub>. Tensile and notch impact tests, hardness measurement with macro and microstructure inspections were carried out in order to determine the effects of the used weld parameters on weld zone properties. All experimental studies show that a widener and more penetrated weld metal occurred by using a higher weld current and CO<sub>2</sub> in the shielding gas, and ratio of tempered martensite to bainite was decreased and grain growth observed in the weld zones. In the hardness measurements detected that the weld metal and heat affected zones softened due to relatively slow cooling rate according to the base metal. Using higher weld current and level of CO<sub>2</sub> in the gas mixture played a role in the decreasing of yield and tensile strengths, and the notch impact toughness.

**Keywords:** GMAW, HSS S960QL, welding current, shielding gas composition

<sup>1</sup> Zafer BARLAS ([Orcid ID: 0000-0001-9063-6501](https://orcid.org/0000-0001-9063-6501)), Uğur ÖZSARAÇ ([Orcid ID: 0000-0002-4806-1609](https://orcid.org/0000-0002-4806-1609)), Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Teknoloji Fakültesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, Sakarya, Türkiye

<sup>2</sup> Esen ORMANLI ([Orcid ID: 0000-0002-2225-2546](https://orcid.org/0000-0002-2225-2546)), Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği, Sakarya, Türkiye

<sup>3</sup> Ayhan ORHAN ([Orcid ID: 0000-0002-7648-2566](https://orcid.org/0000-0002-7648-2566)), Uğur ÇALIGÜLÜ ([Orcid ID: 0000-0003-4862-7219](https://orcid.org/0000-0003-4862-7219)), Fırat Üniversitesi, Teknoloji Fakültesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, Elazığ, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Zafer BARLAS, e-mail: barlas@subu.edu.tr

Bu çalışma Esen ORMANLI'nın Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

## GİRİŞ

Günümüzde endüstriyel uygulamalarda malzeme seçimi yaparken muhtemeldir ki öncelikli kriterler kullanılacak malzemenin sağlamlığı, hafifliği ve maliyetinin düşüklüğü olduğu söylenebilir (Alabi vd., 2018). Böylesi beklentiler, mühendis ve tasarımcıları özellikle yapısal uygulamalarda akma dayanımı  $\geq 690$  MPa olan çeliklerin kullanımına yönlendirmektedir ki bu derece yüksek dayanımlara sahip çeliklerin çekme, eğme gibi yüklemeler karşısındaki davranışlarının anlaşılması, özellikle kaynaklı uygulamalar açısından büyük önem kazanmaktadır (Slazak ve Sniezek, 2016). İşte bu noktada, otuz yıllık bir süreç içerisinde ince taneli yapı çelikleri, mikro alaşımlama gibi kavramlar teknolojinin gelişmesi ile birlikte yüksek basınç ve sıcaklığa direnç amacıyla çelik literatüründe sağlam bir yer kazanmıştır (Aydın, 2017). Su verme sonrası tavlama neticesinde oluşan ince taneli temperlenmiş martenzit ve beynit yapısının yanı sıra Cr, Mo ilavesiyle artan sertleşebilirliği ve V, Ti, Nb ile mikro düzeyde alaşımlamayla engellenen tane irileşmesi sayesinde yüksek akma ve çekme dayanımlarına ulaşabilmektedir (Gaspar, 2019). Aynı zamanda iyi sayılabilecek tokluğa sahip bu çelikler, azaltılmış kesite sahip daha az malzeme kullanımının önünü açtıkları için de araç üretimi ve taşımacılık sektörlerinde üreticilerin karbondioksit salınımlarıyla ilgili katı kurallar ve müşteri taleplerinin karşılanması hususunda gittikçe artan bir öneme sahip olmaya başlamıştır (Slazak ve Sniezek, 2015). Bununla birlikte aşınma, korozyon, darbe dayanımı geliştirilmiş ince cidarlı, dolayısıyla da hafif, yüksek mukavemetli çelikler (High Strength Steels, HSS) ağır hizmet tipinde yer alan yağ, gaz boru hatları ve depolama tanklarında, arazi, maden ve demiryolu araçlarında, inşaat ve tarım makineleri, kule, köprü ve deniz yapıları gibi birçok yapısal birçok uygulama için de tercih edilmektedir (Blacha ve ark., 2017). Yüksek bir akma dayanımı/çekme dayanımı oranına sahip esasında ultra yüksek dayanıma sahip S960QL çeliği de esnemeye karşı direnç göstermesi sebebiyle genel olarak vinç, kule ve kaldırma ekipmanları yapımında tercih edilmektedir (Cadoni ve Forni, 2019). Bu çeliklerin ilgili sektörlerde artan oranlarda kullanılmak istenmesiyle birlikte, üretimde sıklıkla kullanılan kaynakla birleştirme işlemlerinde, o malzemenin mekanik özelliklerinden taviz vermeyecek ölçüde güvenilirlik algısı da ön plana çıkmaktadır. Özellikle kaynaklı birleştirmelerin ısı tesiri altındaki bölgesinde (ITAB) tespit edilen bozulmuş ince tane yapısının sonucu olarak hem sert hem de yumuşamış kısımların varlığı başlangıç mekanik özellikleri de değiştirerek soğuk çatlama olasılıklarını temel problem olarak karşımıza çıkmaktadır (Gaspar, 2019). Mekanik özellikleriyle ön plana çıkan bu çeliklerin yapısal uygulamalarda kullanılmak istenmesi, kaynak ile birleştirme operasyonları sonrası standartlara uygunluğu büyük önem arz etmekte olup, uygulanan ergitme kaynak yöntemleri için başta kaynak akımı ve gaz kompozisyonun başlangıç mikroyapı ve mekanik özelliklerde sürekliliğin sağlanmasında önemli rolleri olduğu da bir gerçektir. Öyle ki Goss ve Marecki (2012) S960QL çeliğinin TIG kaynağı sonrası yorulma ömrünü incelemiş, kaynaklı birleştirmenin yorulma ömrünün esas metale göre yaklaşık %90 oranında düştüğünü tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Slazak ve Sniezek (2016) I ve V kaynak ağızı açılmış S960QL çeliğini MAG ile birleştirdikten sonra, kaynağın yorulma özelliklerini incelemişlerdir. Araştırmacılar I alın kaynaklı birleştirmenin diğerine göre %20-50 daha fazla yorulma ömrüne sahip olduğunu görmüşlerdir. Samardzic ve ark. (2017) 20 mm kalınlığındaki ince taneli S960QL çeliğinin farklı kaynak akımı, gerilimi ve kaynak hızları değişkenleri altında MAG ile birleştirilmesinde ITAB'ın çentik darbe tokluğunu ve sertliğini ısı girdisini değerlendirerek incelemişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre ön-ısıtma, pasolar arası sıcaklık ve ısı girdisi gibi faktörler için verilen değerlere sıkıca uyulmasının beklentilere uygun kaynak kalitesinin sağlanması açısından önemli olduğu, aksi halde yetersiz ısı girdisinin birleştirmenin mukavemet ve sertliğini azalttığı, kalıntı gerilme ve hidrojenin varlığının çatlama ve gevrek kırılma eğilimini arttırdığı vurgulanmıştır. Türker (2017) S960QL çeliği için tozaltı kaynak

uygulaması yapmış, mikroyapı incelemeleri, sertlik ölçümleri, çekme ve çentik darbe testleri gerçekleştirmiştir. Yazar, en yüksek sertliklerin nispeten daha yüksek soğuma hızı ve yeniden kristalleşme kaynaklı olarak ITAB'da olduğunu; kalınlık boyunca alınan üç farklı çekme numunesinden en iyi çekme test sonuçlarının orta ve alt kısımdakilerden alındığını belirtmiştir. Üst numunenin ise daha geniş bir kaynak metaline sahip olmasının burada dezavantaj oluşturduğu ifade edilmiştir. Ayrıca ergime sınırında en düşük çentik darbe enerjisi elde edilirken, esas metalden (EM) sonra en yüksek enerji değeri kaynak metali (KM) merkezini içeren numunede görülmüştür. Gorka ve Kotarska (2019) da S960QL çeliğinin MAG kaynağı sonrasında sertliğin esas metale göre kaynak metalinde azaldığını, ITAB'da ise arttığını; çekme testleri sonrasında birleştirmelerin esas metalle benzer çekme mukavemetleri elde edilebildiğini tespit etmişlerdir. Gaspar (2019) ise S960QL çeliğinin ark kaynağında 800-500 °C arasındaki kritik soğuma hızını ( $t_{8/5}$ ) dikkate alarak ITAB'ın mikroyapısı, sertlik ve tokluk özellikleri üzerine araştırma yapmıştır. Sonuçlar  $t_{8/5}$  geçiş süresinin 2,5-30 s olması durumunda ITAB'ın sertliğinde bir artışı, tokluğunda ise azalmayı gösterirken;  $t_{8/5} = 100$  s şartındaysa ITAB'ın kaba taneli kısmında yumuşamayı ve oldukça düşük bir çentik darbe tokluğunu işaret etmiştir. Yukarıda verilen çalışmalarından da anlaşılabilirliği üzere, ince taneli ultra yüksek mukavemetli S960QL çeliğinin MAG kaynağı ile birleştirilebilirliği üzerine oldukça sınırlı sayıda deneysel çalışmanın olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, bilindiği üzere MAG ile birleştirmede CO<sub>2</sub> ve Ar karışımı aktif gazlar pürüzsüz ve temiz bir dikiş sağlamada, kaynak metalinin esas metale kademeli olarak geçişi ve mekanizasyona uygun olması sebepleriyle yaygın olarak kullanılırken (Gres ve ark., 2018), genel olarak CO<sub>2</sub> oranı olarak %8-25 seçilmektedir (Meneses ve ark., 2016). Yine de en uygun CO<sub>2</sub> ile ilgili farklı değerlerin ortaya konulduğu da görülmektedir. Genel sonuç ise gazdaki yüksek CO<sub>2</sub> miktarı ark kararlılığını düşürmekte, bunun sonucunda ısı girdisi de azalmakta dolayısıyla ark kararlılığı sağlamak için aynı akım değerinde daha yüksek gerilim kullanılması gereksinimi ortaya çıktığıdır (Yılmaz ve Barlas, 2005). Ayrıca metal transferinin stabilitesi ile duman ve sıçranta oluşumunda da artış gözlenmektedir. Düşük oranlarda ise kaynağın iç kısımları dış kısımlarından daha sıcak olmaktadır (Meneses ve ark., 2016). Sonuç olarak bu çalışmada, S960QL çeliğinin farklı kaynak akımı, gerilimi ve gaz kompozisyonu altında yapılan birleştirmelerde makroyapı ve mikroyapı özellikleriyle, mekanik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmış, literatürde geçen çalışma sonuçlarına katkı yapılabilmesi hedeflenmiştir.

## MATERYAL VE METOT

Bu çalışma kapsamında, genellikle vinç yapımında tercih edilen ultra yüksek dayanımlı bir çelik türü olan S960QL (EN 10025-6) malzeme seçilmiş olup, levhalar lazer kesim sonrası CNC ile işlemeyle 300×150×8 mm<sup>3</sup> boyutlarına getirilmiştir. Bu malzemenin spektral analiz ile elde edilen kimyasal kompozisyonu ve mekanik özellikleri sırasıyla Çizelge 1 ve 2'de verilmiştir. S960QL levhaların, MAG kaynak yöntemiyle alın formunda birleştirilmesi için her bir iş-parçasına Şekil 1a'da gösterilen 45°, yani 90° V-kaynak ağızları açılmış; iş-parçalarının rijitliğinin sağlanabilmesi için Şekil 1b'deki gibi puntalama ve montaj işlemleri yapıldıktan sonra da Şekil 1c'de gösterilen düzende kaynak işlemleri gerçekleştirilmiştir. MAG yöntemiyle birleştirme denemeleri 185, 215 ve 245 Amper (A) olmak üzere üç farklı kaynak akımında, %93 Ar + %2 O<sub>2</sub> + %5 CO<sub>2</sub> ve %78 Ar + %2 O<sub>2</sub> + %20 CO<sub>2</sub> olmak üzere iki farklı gaz kompozisyonu koruması altındayken yapılmıştır. Denemelerde kimyasal ve mekanik özellikleri Çizelge 3 ve 4'de verilen ilave dolgu teli kullanılmıştır. Diğer kaynak parametreleri ise sabit tutulmuştur. Kaynak işlemi sonrası iş-parçaları havada soğumaya bırakılmıştır. Böylece, S960QL çeliğinin MAG ile kaynak işlemlerinde farklı akım ve gerilim değerlerinde, CO<sub>2</sub> gazı miktarının kaynak bölgesine olan etkilerinin anlaşılabilmesi hedeflenmiştir. Çizelge 5, birleştirmelerde kullanılan MAG

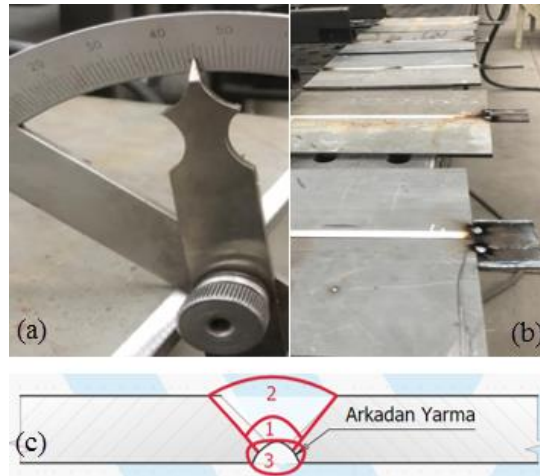
kaynak parametrelerini ve bu parametreler altında yapılan kaynak denemelerine verilen kodları göstermektedir ki bundan sonra anlatımda birleştirmeler ilgili kodlarıyla tanımlanacaktır. Kodlamada verilen ilk sayı A biriminden kaynak akımı değerini, sonraki sayı ise gaz kompozisyonundaki % CO<sub>2</sub> oranını ifade etmektedir. Tüm bunlarla beraber, gerçekleştirilen kaynak denemeleri için “(Akım × Gerilim × 60 × 0,8) / (Kaynak hızı (mm/dak) × 1000)” formülünden (Gourd, 1995) faydalanarak ısı girdileri (kJ/mm) hesaplanmıştır. Birleştirmelerde, iş-parçası kalınlığı, tel besleme hızı ve seçilen kaynak akım değerine göre diğer parametreleri otomatik olarak ayarlayabilen, su soğutmalı bir tel sürme ünitesine sahip KILMAK İNO 500 marka bir inverter gazaltı kaynak makinesi kullanılmıştır.

**Çizelge 1.** Çalışmada kullanılan HSS S960QL çeliğinin kimyasal bileşimi (ağ.%)

| C       | Mn      | Mo     | Si     | Cr     | P      | S       | Ni     |
|---------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|
| 0,152   | 1,25    | 0,598  | 0,202  | 0,191  | 0,0073 | <0,0030 | 0,0464 |
| Nb      | Ti      | Al     | V      | Co     | W      | Pb      | Fe     |
| <0,0020 | <0,0010 | 0,0619 | <0,034 | 0,0132 | <0,025 | <0,015  | 97,4   |

**Çizelge 2.** HSS S960QL çeliğinin mekanik özellikleri

| Akma Dayanımı (MPa) | Çekme Dayanımı (MPa) | % Uzama | Charpy Darbe Enerjisi (J) |
|---------------------|----------------------|---------|---------------------------|
| ≥ 960               | 980 - 1150           | 10      | 122                       |



**Şekil 1.** MAG ile kaynak işlemi öncesi hazırlıklar ve kaynağın uygulanma prosedürü (a) 45° kaynak ağı açılmış iş-parçasının kaynak kumpası ile geometrisinin doğrulanması, (b) iş-parçalarının kaynak işlemine hazır hale getirilmesi için puntalanması ve sabitlenmesi, (c) kaynak işlemi sırası 1- kök paso, 2- seçilen parametrelerde kaynaklama işlemi ve 3- arkadan yarma sonrası kök paso uygulaması.

**Çizelge 3.** İlave kaynak telinin kimyasal bileşimi (ağ.%)

| C   | Cr  | Mn  | Si   | Ni  | Cu  | Mo  |
|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| 0,1 | 0,3 | 1,7 | 0,55 | 2,5 | 0,2 | 0,5 |

**Çizelge 4.** Kaynak dolgu telinin mekanik özellikleri

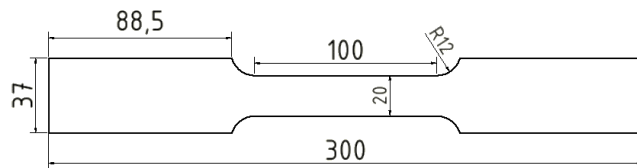
| Akma Dayanımı (MPa) | Çekme Dayanımı (MPa) | Çentik Darbe Dayanımı (ISO-V/- 40 °C) | % Uzama (L <sub>0</sub> = 5d <sub>0</sub> ) |
|---------------------|----------------------|---------------------------------------|---|
| ≥ 890               | 940 - 1180           | ≥ 47 J                                | ≥ 15  |



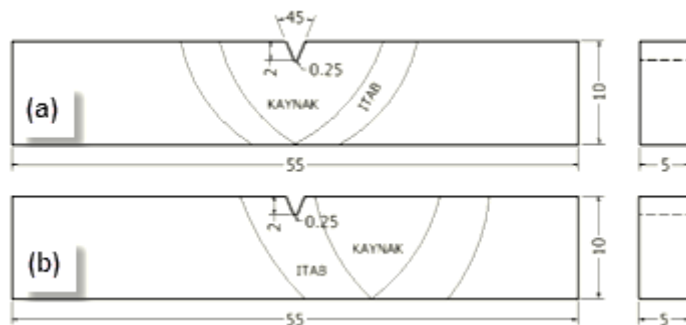
**Çizelge 5.** S960QL çeliğinin MAG ile birleştirme denemelerinde kullanılan kaynak parametreleri ve hesaplanan ısı girdisi değerleri (<sup>1</sup> kök pasonun, <sup>2</sup> arkadan yarma sonrasında kaynak şartlarını tanımlamaktadır.)

| Kaynak Kodu            | Gaz Kompozisyonu (%)                       | Akım (Amper, A) | Gerilim (Voltaj, V) | Tel Sürme Hızı (mm/dak) | Kaynak Hızı (mm/dak) | Isı Girdisi (kJ/mm) |
|------------------------|--|-----------------|---------------------|-------------------------|----------------------|---------------------|
| 185/5                  | 93Ar + 2O <sub>2</sub> + 5CO <sub>2</sub>  | 185             | 24,6                | 6,7                     |                      | 0,97                |
| 185/20                 | 78Ar + 2O <sub>2</sub> + 20CO <sub>2</sub> |                 |                     |                         |                      |                     |
| 215/5                  | 93Ar + 2O <sub>2</sub> + 5CO <sub>2</sub>  | 215             | 27,1                | 8,5                     | 224                  | 1,25                |
| 215/20                 | 78Ar + 2O <sub>2</sub> + 20CO <sub>2</sub> |                 |                     |                         |                      |                     |
| 245/5                  | 93Ar + 2O <sub>2</sub> + 5CO <sub>2</sub>  | 245             | 29,5                | 9,8                     |                      | 1,55                |
| 245/20                 | 78Ar + 2O <sub>2</sub> + 20CO <sub>2</sub> |                 |                     |                         |                      |                     |
| Kök Paso <sup>1</sup>  | 93Ar + 2O <sub>2</sub> + 5CO <sub>2</sub>  | 140             | 21,7                | 5,9                     | 400                  | 0,36                |
| Altan Kök <sup>2</sup> | 93Ar + 2O <sub>2</sub> + 5CO <sub>2</sub>  | 210             | 27,2                | 6,4                     | 448                  | 0,61                |

MAG yöntemiyle kaynak işlemleri sonrası S960QL birleştirmelerinin mekanik özelliklerinin tespit edilmesi için EM ve her bir ayrı kaynak kodlu birleştirmeden TS EN ISO 4136 standardına uygun çekme numuneleri (Şekil 2), TS EN ISO 9016 standardına uygun  $55 \times 10 \times 5$  mm<sup>3</sup> ölçülerinde KM ve ITAB'dan ayrı ayrı çentik darbe numuneleri (Şekil 3) ile TS EN ISO 9015-1:2011 standardına uygun olarak da mikrosertlik ölçüm numuneleri çıkarılmıştır. Numuneler, yine lazer kesim sonrası kesim yüzeylerinin CNC ile temizlenmesi suretiyle elde edilmiştir. Çekme testleri Zwick Roel marka test cihazında yapılmış; elde edilen akma ve çekme değerlerinin esas metalle kıyaslanabilmesi için “kaynak performansı (kp) = kaynaklı numunenin değeri / S960QL esas metalin değeri  $\times$  100” formülü kullanılmıştır. Kaynaklı denemeler için mekanik özellik - yapı ilişkisinin ortaya çıkarılması amacıyla, makroyapı ve mikroyapı incelemeleri ile sertlik ölçümlerinde kullanılmak üzere  $35 \times 15$  mm<sup>2</sup> ölçülerinde hazırlanan numuneler 60-1200 mesh zımparalarla sırasıyla zımparalanmış, ardından 3  $\mu$ m boyutta elmas pasta ile parlatılmış ve sonrasında %5 nitrik asit + %95 saf alkol çözeltisiyle dağlanmış. Dağlanmış numuneler Nikon Eclipse L150 marka optik mikroskop (OM) ile TS EN ISO 17639 standardına uygun şekilde görüntülenip incelenmiştir. Ayrıca çekme ve çentik darbe testleri uygulanmış numunelerinin kırık yüzeyleri JEOL 6060 LV marka taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Sertlik ölçümleri Highwood HWDV-X3S marka cihazda, her bir farklı mikroyapı bölgesinden üçer adet olmak üzere 10 s boyunca 1 kg yük uygulanarak yapılmıştır.



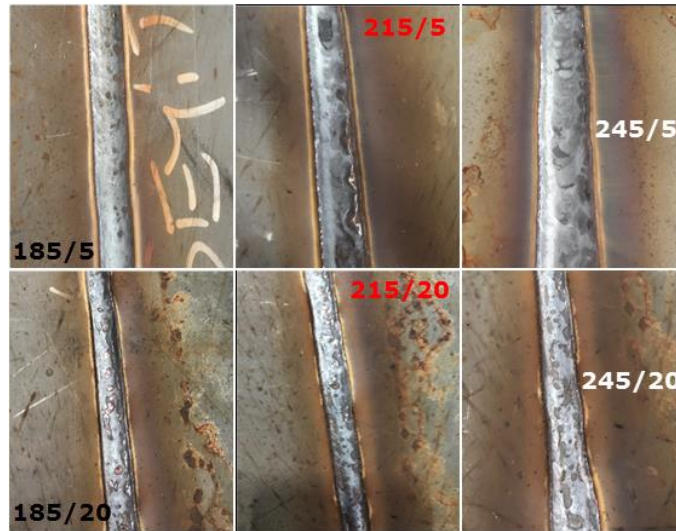
**Şekil 2.** Kaynaklı birleştirme denemeleri için kullanılan çekme testi numunesinin geometrik ölçüleri (ölçüler mm birimindedir).



**Şekil 3.** Charpy V-çentik darbe testi kullanılan (a) tamamen KM, (b) tamamen ITAB içeren numunelere ait geometrik detaylar (ölçüler mm birimindedir).

## BULGULAR VE TARTIŞMA

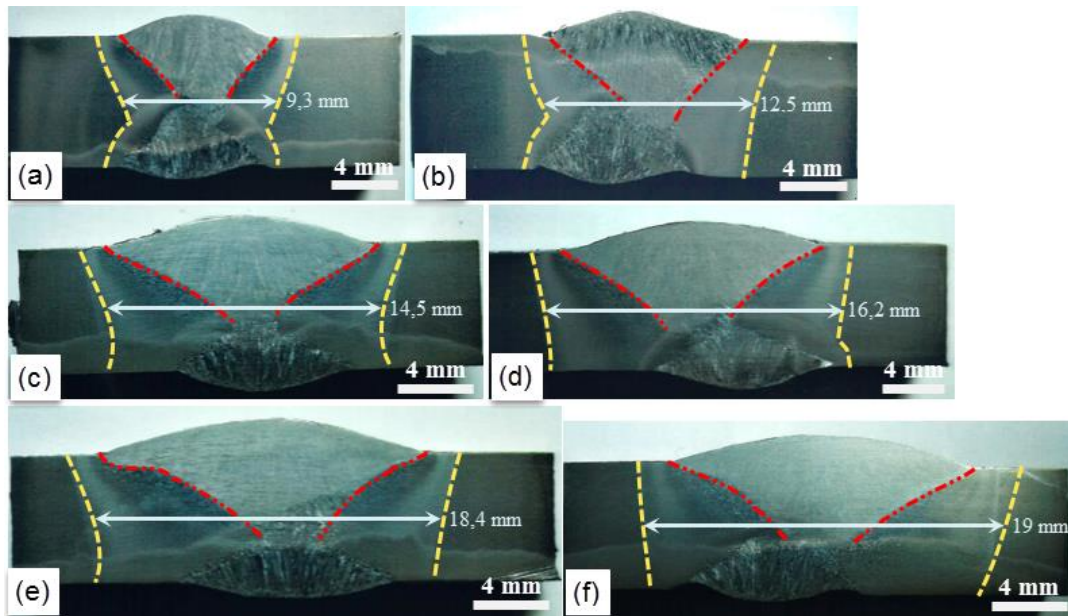
HSS S960QL çeliğinin, detayları Çizelge 5’de verilmiş olan farklı akım ve gaz kompozisyonu şartlarında MAG yöntemiyle gerçekleştirilmiş kaynak denemelerinin yüzey resimleri Şekil 4’de gösterilmektedir. Birleştirme yüzeylerinde yapılan görsel muayenelerde ilk olarak kaynak akım şiddeti ile koruyucu gaz karışımındaki CO<sub>2</sub> oranının artmasıyla beraber nispeten azalan ark kararlılığının ve daha fazla iri damla iletiminin sonucu olarak sıçrıntı miktarının arttığı gözlemlenmiştir. Akım değeri ve CO<sub>2</sub> oranındaki artışın getirdiği diğer bir sonuç olarak yanma oluğu oluşumu eğiliminin arttığıdır ki bu durum, özellikle en yüksek akım ve CO<sub>2</sub> değerlerinin kullanıldığı 245/20 kodlu birleştirmede yer yer daha belirgindir. Bununla beraber, kaynak kumpası ile yapılan ölçümlerde, bu birleştirmede tespit edilen yanma oluğu derinliğinin  $\leq 0,4$  mm olduğu, bunun da TS EN ISO 5817-Sınıf C’de yer alan “ $h \leq 0,1 \times t$ , ancak en çok 0,5 mm” şartına göre kabul edilebilir aralıkta olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4. MAG kaynağı ile birleştirilmiş S960QL çeliklerinin kaynak dikişi yüzey görünümleri.

Şekil 5’de kaynak denemelerinin, kaynak yönüne dik şekilde kesimi sonrasında parlatılıp, dağlanmış makroyapı numunelerinin kök, üst ve alt kapak pasolarını da içeren KM ve ITAB makroyapıları gösterilmektedir. Öncelikle kaynak işlemleri sonrasında bütün numuneler için yeterli bir nüfuziyetten bahsetmek mümkündür ve ayrıca makro incelemelerde boşluk vb. gibi bir içyapı süreksizliğinin varlığı da tespit edilmemiştir. Yapılan gözlem ve ölçüm sonuçlarına göre ise kaynak akım şiddetinin ve koruyucu gaz kompozisyonunda CO<sub>2</sub> oranının artmasının kombinasyonu sonucu, kırmızı renkte ve noktalı kesikli çizgilerle tanımlanan ergiyip katılmış KM bölgesine ait kep kısmının genişlediği, nüfuziyet derinliğinin arttığı, sonuçta da bu KM bölgesinin hacminde bir artışın olduğu anlaşılmaktadır. Bununla birlikte, iyi bilinmektedir ki herhangi bir yöntemle kaynak yapılmış bir iş-parçası için kalite algısındaki önemli ölçütlerden birisi de o birleştirmeye ait ITAB’daki mikroyapısal değişimler ve bu bölgenin genişliğidir ki uygulanan kaynak parametrelerince sadece bu bölgenin kontrol altında tutulmasıyla kaynaklı birleştirmenin özellikleri iyileştirilebilmektedir (Linnert, 1994). Bu noktadaki temel hedef, ısı girdisine bağlı olarak oluşan ITAB alanını, mikroyapısal değişime bağlı olarak mekanik özelliklerde meydana gelen ani değişim/azalma sebebiyle minimum seviyede tutmak olmaktadır (Gunaraj ve Murugan, 2002). Buradan hareketle, Şekil 5’de verilen makroyapılar üzerinde sarı renkli-kesikli çizgilerle sınırlandırılmış ITAB alanlarının görsel karşılaştırılması ve iş-parçası kalınlığının yarısından yapılan ölçüm sonuçlarından da anlaşılacağı gibi, aynı kaynak akımı

değerinde %20 CO<sub>2</sub> katkılı koruyucu gaz atmosferinde gerçekleştirilen birleştirmelerin ITAB genişliğinin, %5 CO<sub>2</sub> kullanımına göre daha geniş olduğu görülmektedir. Bu nedenle, aktif bir gaz olan CO<sub>2</sub>'nin karışım gazındaki artan oranı, S960QL çeliğinin MAG ile kaynağı esnasında arkta gerçekleşen ekzotermik reaksiyonlara bağlı olarak ark ısısını da arttırdığı açıktır. Ayrıca beklenildiği üzere, yine yüksek ısı girdisi sağlaması sebebiyle akım şiddetinin artışına paralel olarak ITAB genişlikleri için yine bir artış eğilimi söz konusudur (Gunaraj ve Murugan, 2002). Öte yandan, A değerine ve CO<sub>2</sub> oranına bağlı ölçüm sonuçları ayrı ayrı irdelendiğinde, kaynak akımının etkisinin daha belirleyici olduğu görülmektedir. Örneğin, sadece CO<sub>2</sub> oranına bağlı ITAB genişliğindeki en fazla artış 3,2 mm (12,5 – 9,3) ile 185 A'de olurken, akımın 185'den 245 A'ye çıkarılması durumundaki artışın değeri 5,2 mm olmuştur. Çünkü ısı girdisi hesaplamasında kullanılan eşitlik de dikkate alındığında, A faktörünün oldukça etkili olduğu; artan A ile açığa çıkan ısının önemli miktarının da metal kesiti boyunca iletiği açıktır (Adak ve ark., 2015). Bu durum, Karabulut ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışma sonuçlarıyla da uyumluluk içerisindedir, zira yazarlar mikroalaşımli çeliğin tozaltı kaynağında akım şiddetinin artırılmasının ITAB'ın genişliğinin de artmasına yola açtığını belirtmişlerdir. Son olarak dikkat edilecek olursa, Şekil 5'de sunulan benzer ölçekli resimlerde akım şiddetindeki artış, kaynak bölgesinin ifade edilebilmesi için daha geniş bir fotoğrafın kullanılmasını gerektirmiş; özellikle akımın 185 A'dan 215 ve 245 A değerlerine çıkarılmasının bu yöndeki etkisinin daha belirgin olduğu tespit edilmiştir.



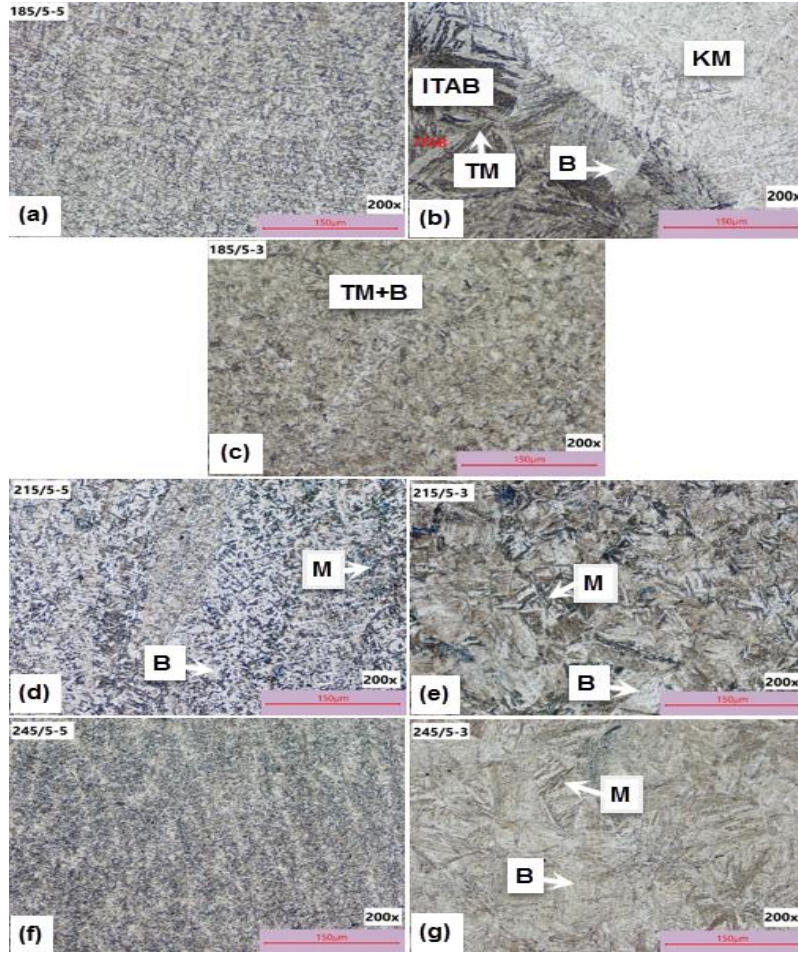
Şekil 5. Birleştirme denemelerinin makroyapıları (a) 185/5, (b) 185/20, (c) 215/5, (d) 215/20, (e) 245/5 ve (f) 245/20.

Şekil 6-8'de verilen optik mikroskop görüntülerine göre, uygulanan akım ve CO<sub>2</sub> değerlerinin kaynak bölgesinin mikroyapısal gelişimi üzerinde de etkili olduğunu göstermiştir. Üreticiden tedarik edilen S960QL EM Şekil 6'da görülebileceği gibi ince taneli temperlenmiş martenzit (TM) ve beynit (B) yapısına sahiptir. Bütün birleştirme denemelerinin kaynak bölgelerinde beynit ile beraber perlit ve ferrit dönüşümünün söz konusu olduğu düşünülmektedir ki özellikle yapılardaki beynitin martenzite olan oranının yanı sıra tane büyüklüğü farklılıklarının da belirleyici olduğu anlaşılmaktadır. Genel tespit, ısı girdisi artışını ve soğuma hızını yavaşlatıcı parametreler sonrasında tane irileşmesi ve beynitin martenzite olan oranının arttığı yönündedir. 185/5 ve 185/20 kodlu numunelerin KM'lerinin EM'ye benzer şekilde genel olarak temper martenzit + beynitten oluştuğu görülmektedir (Şekil 7a ve d). 185/5

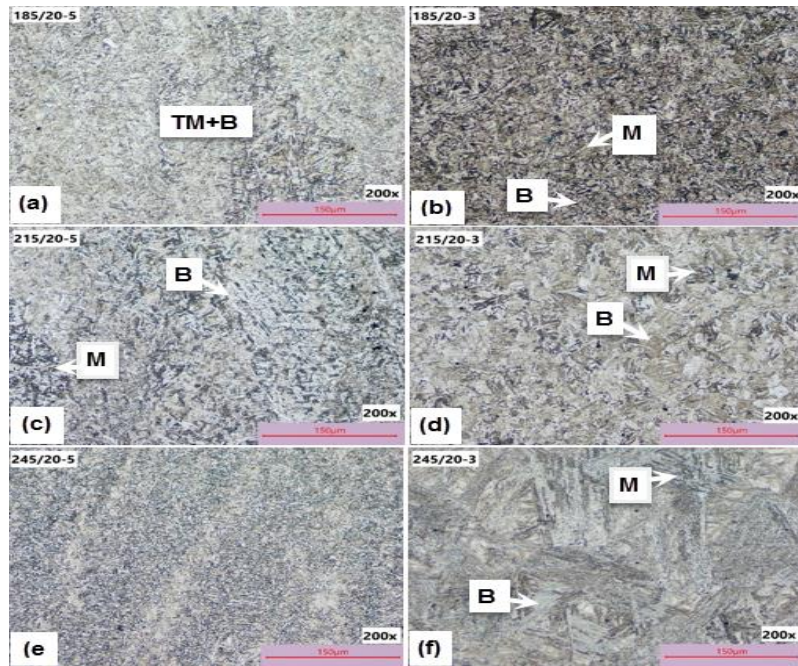
numunesinin ergime sınırına yakın ITAB'ında, denemelerdeki en düşük ısı girdisi sebebiyle Şekil 7b'den görülebileceği gibi, martenzit ve beynit yapısının korunduğu ancak nispeten daha iri tanelerin varlığı gözlenmektedir. Bununla birlikte, hemen hemen ITAB merkezinde daha ince taneli temper martenzit + beynit yapısı hakim iken, EM'ye doğru yavaş soğuma sebebiyle beynit / martenzit oranında artışın yanı sıra, ITAB / EM geçişi civarında perlit ve ferrit dönüşüm ürünlerinin de meydana geldiği belirlenmiştir. Blacha ve ark. (2017) da S960QL çeliğinin elektron ışın kaynağında ITAB'ın ergime sınırı çevresindeki yapının genel olarak martenzitten, EM'ye yakın kısımların ise beynitten meydana geldiğini görmüşlerdir. Şekil 8, %20 CO<sub>2</sub> oranında farklı akımlardaki numunelerin kaynak mikroyapılarını göstermektedir. 185/20 numunesinde ergime sınırı civarı ITAB'da 185/5'e göre daha iri taneler ve daha fazla beynit görülmüş ve yine CO<sub>2</sub> miktarındaki artışın neden olduğu ark ısısındaki artışın genel olarak ITAB'da tane irileşmesine yol açtığı anlaşılmıştır. Uygulanan A ve CO<sub>2</sub> oranındaki artışın neden olduğu bu şekildeki yapısal değişim diğer kaynak denemelerine de yansımıştır. 215/5, 215/20, 245/5 ve 245/20 birleştirmelerinin KM'lerindeki ısı girdisinin artışı ve soğuma hızının yavaşlaması beynite kıyasla martenzit oranını düşürmüştür. Ancak bu durum tahmin edilebileceği üzere, aynı akım değerindeyken %20 CO<sub>2</sub> kullanımında daha fazla olmuştur ki en yüksek akım ve CO<sub>2</sub> kullanılan 245/20 numunesinde hem KM hem de ITAB'da genel olarak beynitik yapının söz konusu olduğu gözlemlenmiştir. Gorka ve Kotarska (2019) S960QL çeliğinin MAG kaynağı ile birleştirilebilirliği çalışmasında, nispeten daha düşük girdisi sağlayacak şekilde düşük akım, düşük CO<sub>2</sub> oranı ve daha fazla paso kullanarak kaynak bölgelerinin daha hızlı soğumasını sağlamış olmaları, başlangıç temper martenzit + beynit yapısının nispeten daha fazla korunmasına yardımcı olmuştur. Bu şekilde yazarlar, KM ve ITAB'ın temper martenzit + beynit yapıda olduğunu belirlemiştir. Bu açıdan bakıldığında, S960QL çeliğinin MAG ile birleştirilmesinde başlangıç mikroyapısının korunması sonuç hedef olarak alınırsa, kaynak parametrelerini ısı girdisini minimum seviyede tutacak şekilde seçmek gerektiği sonucuna ulaşılmaktadır. Ayrıca daha kararlı ve daha düşük ark ısısı elde etmek için koruyucu gaz seçiminin önem kazandığı, bu nedenle de S960QL çeliğinin MAG kaynağı birleştirmelerinde koruyucu gazda bulunan CO<sub>2</sub> miktarının belirli bir değeri aşmaması hususunun gözden kaçırılmaması düşünülmektedir, zira literatürde bu değerin %12'yi geçmemesi de tavsiye edilmiştir (Zielinska, 2008).



Şekil 6. Çalışmada kullanılan ultra yüksek mukavemetli S960QL çeliğinin TM + B'den oluşan mikroyapı fotoğrafı.

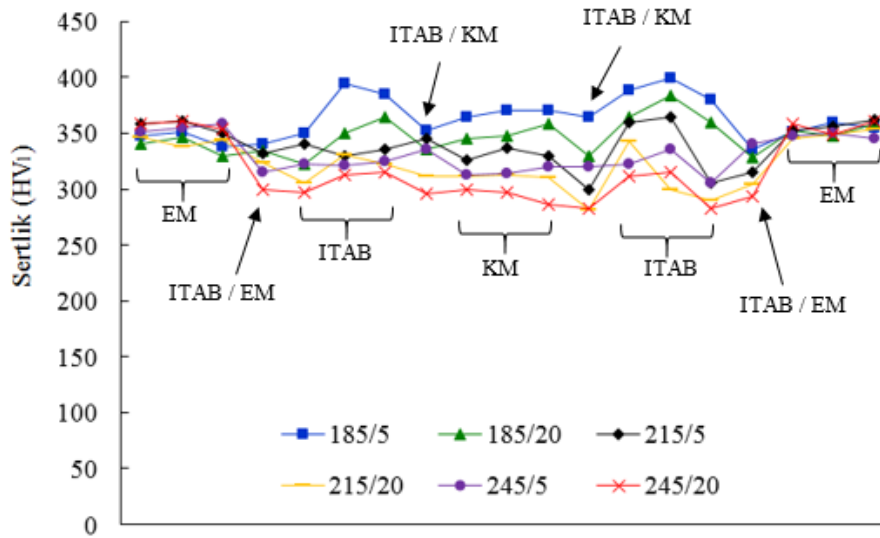


**Şekil 7.** %5 CO<sub>2</sub> değerinde, farklı A değerlerindeki birleştirme denemelerine ait kaynak bölgelerinin mikroyapı görüntüleri (a-c) 185/5 için sırasıyla KM, KM / ITAB geçişi (ergime sınırı) ve ITAB, (d ve e) 215/5 için sırasıyla KM ve ITAB, (f ve g) 245/5 için sırasıyla KM ve ITAB.



**Şekil 8.** %20 CO<sub>2</sub> değerinde, farklı A değerlerindeki birleştirme denemelerine ait kaynak bölgelerinin mikroyapı görüntüleri (a-b) 185/20 için sırasıyla KM ve ITAB, (c ve d) 215/20 için sırasıyla KM ve ITAB, (e ve f) 245/20 için sırasıyla KM ve ITAB.

Mikrosertlik ölçüm sonuçları ark ısısının artmasına, buna karşın kaynak bölgesindeki soğumanın yavaşlamasına neden olacak şekildeki akım şiddeti ve CO<sub>2</sub> oranındaki artışın, KM ve ITAB'lardaki sertlikleri düşürdüğünü ortaya koymuştur (Şekil 9). Çünkü daha önce de bahsedildiği gibi, nispeten düşük ısı girdisi ve daha hızlı soğuma şartları altında baskın yapı diğer fazlara göre daha yüksek sertliğe sahip TM iken, yüksek ısı girdisinin sonucu olarak yavaş soğuma şartları daha düşük sertliklerdeki B, tane irileşmesi gibi dönüşümlere neden olmuştur. İlaveten bu çalışmada, ısı girdisi artışına bağlı EM haricindeki KM ve ITAB kesit alanlarının genişlemesi de soğuma hızını düşürücü bir faktör olarak dikkati çekmektedir. Isı girdisi-soğuma hızı faktörlerine bağlı olarak ortaya çıkan bir başka sonuç da Mo, V gibi elementlerin alaşımında kullanılmalarının temel sebebi olan karbür ve/veya karbonitrür çökeltilerinin etkilendiğidir. Özellikle yüksek ısı girdisi bu çökeltilerin kabalaşmasına neden olmakta, dolayısıyla sertlikleri azaltıcı yönde bir rol oynamaktadır (Karabulut ve Türkmen, 2016). Ayrıca S960QL çeliğinde kaynak bölgesine yüksek enerji girdisi, sertliğin değerlerinin düşmesine neden olmaktadır (Gorka ve Kotarska, 2019). Bu nedenlerle en yüksek sertlik değerleri, A ve CO<sub>2</sub>'nin en düşük değerlerde kullanıldığı, dolayısıyla en düşük ısı girdisinin sağlandığı 185/5 kodlu numunenin her iki tarafında oluşan ITAB'ların hemen hemen merkezlerinde 395 ve 399 HV olarak ölçülmüş ve bu bölgenin ortalama sertliği 377 HV değerinde olmuştur. Çünkü bu birleştirmenin ITAB'ında ince taneli TM + B'nin varlığı söz konusuysen, KM bölgesinde EM'ye benzer bir mikroyapı oluşumu meydana gelmiştir. Samardzic ve ark. (2017) da benzer şekilde, HSS S960QL'nin MAG kaynağında ITAB sertliğinin EM'den daha yüksek olduğunu belirlemişlerse de çalışmalarında bunun nedeni hakkında herhangi bir bilgiye yer vermemişlerdir. Benzer şekilde yine bu numunenin KM sertlikleri S960QL EM'ninkinden (ort. 349 HV) bir miktar yüksek çıkarak ort. 368 HV olmuştur. 215/5 kodlu numunenin ITAB (ort. 335 HV)'ı da EM'ye göre nispeten sert iken, KM bölgesinin ort. 331 HV değeri ile çok az yumuşadığı görülmüştür. 245/5 kodlu birleştirmede ise ITAB ve KM sertlikleri EM'ye göre sırasıyla, 323 HV ve 316 HV değerlerinde çıkarak azalmıştır. 185 A ile akım değerinin düşük tutulduğu, ancak CO<sub>2</sub> oranının %5'den %20 değerine çıkarıldığı 185/20 kodlu denemede ITAB ve KM'nin EM ile benzer sertlik göstermesine rağmen, diğer birleştirmelerde daha önce anlatılan mikroyapısal farklılıklar sebebiyle hem ITAB'da hem de KM'de kaydadeğer yumuşamalar olmuştur. Örneğin, 245/5 numunesinin ITAB ve KM'i sertlikleri EM'ye kıyasla sırasıyla, %8 ve %10 oranında azalırken, bu azalma 245/20 birleştirme denemesi için ITAB'da %12, KM'de ise %16 değerlerine çıkmıştır. Göze çarpan diğer bir husus da düşük ısı girdisinin sağlandığı özellikle 185/5, 185/20 ve 215/5 kodlu birleştirmelerin ITAB/KM geçişlerinde sertlik değerlerinin iri tane yapısı sebebiyle keskin bir şekilde düştüğüdür ki bu durum, Türker (2019) tarafından MAG kaynağı sonuçları; Blacha ve ark. (2017) yaptığı elektron ışın kaynağı çalışma sonuçlarıyla da uyumludur. 215/20, 245/5 ve 245/20 kodlu denemelerde ise genel ITAB mikroyapıları bu geçişe benzer olduğu için benzer sertlik eğilimleri görülmektedir. Sonuç olarak, yüksek CO<sub>2</sub> oranının, yüksek akıma kıyasla düşük akımda iken ITAB ve KM sertliğinin azalmasında daha etkili anlaşılabilirlikle birlikte, ısı girdisini arttırıcı bu değişkenlerdeki artışın, Türker (2019) tarafından da vurgulandığı gibi, özellikle ITAB'da sertlik artışına katkı sağlayan karbür, karbonitrürlerin kabalaşmasına ve/veya çözünmesine yol açtığına da inanılmaktadır. Öte yandan, S960QL esas metalin ortalama sertliğinin 349 HV değeri ile EN 10025-6 standardındaki değerin karşılandığı; sertlik ölçümü yapılan numunelerin hiçbirinde 450 HV değerinin aşılmasına izin verilmeden EN ISO 10025-6 ve EN ISO 15614-1 standartlarına uygunluğun sağlandığının da gözden kaçırılmaması gerektiği düşünülmektedir.



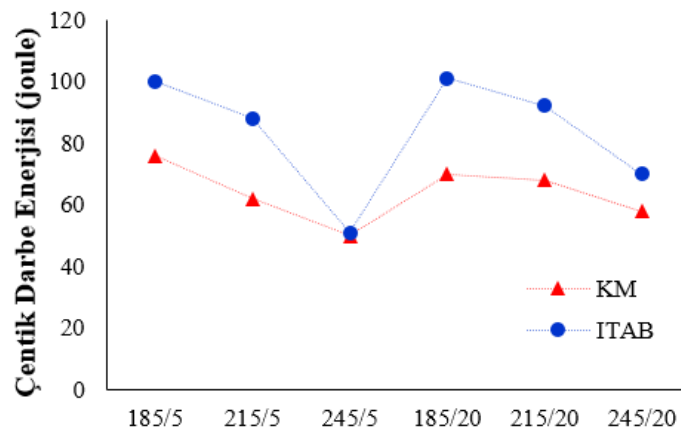
Şekil 9. Uygulanan MAG parametrelerine bağlı farklı kaynak denemelerinin kaynak bölgelerindeki sertlik grafiği.

Çizelge 6'da birleştirme denemelerinin çekme test sonuçları ile akma ve çekme performansları verilmiştir. Bu çizelgeden çıkarılabilecek en açık olan sonuç, artan kaynak akımı değeri ve CO<sub>2</sub> miktarının sonucu olarak kaynak bölgesine ısı girdisindeki artışın ve bunun da temelde ortaya çıkardığı kararsız bir ark oluşum eğiliminin, birleştirmelerin çekme testi performanslarının düşmesine neden olduğudur. Türker (2019) de yüksek ısı girdisinin tane irileşmesi, çökeltilerin çözünmesi gibi faktörler sebebiyle mekanik özellikleri azaltıcı etkisi olduğunu rapor etmiştir. Bu nedenle, S960QL EM'ye kıyasla en yüksek akma ve çekme performansları 185 A ile en düşük akım değerinin kullanıldığı uygulamalarda elde edilmiştir ve hatta %5 ile en düşük CO<sub>2</sub> oranında iken esas metalle benzer mukavemet değerlerine ulaşılmıştır. Düşük ısı girdisi sayesinde elde edilen ince taneli temper martenzit ve beynit yapısının birleştirmelerin akma dayanımlarına da katkı sağladığı açıktır (Alabi ve ark., 2018). Ayrıca bu numunede kopma, mikroyapı incelemelerinde tespit edilen ve alaşım çökeltilerinin çözünmesi kaynaklı olarak iri tanelerin, dolayısıyla düşük sertliğin meydana geldiği düşünülen ITAB / KM geçişinde olmuştur. %5 CO<sub>2</sub> oranında akımın 215 ve 245 A'ya artırılması durumunda dayanım ve yüzde uzama değerlerinde hemen hemen benzer bir azalma meydana gelmiştir. Çekme deneyleri sonrası elde edilen değerlerden göze çarpan başka bir husus da CO<sub>2</sub> oranının %5'den %20'ye çıkarılması durumundaki etkinin, özellikle yüksek akımda daha belirgin olduğudur. Şöyle ki 185/20 kodlu numunenin çekme testi özellikleri yaklaşık olarak %5 CO<sub>2</sub> içerikli birleştirmelerle benzer iken, 215/20 ve 245/20 birleştirmeleri diğerlerine göre daha düşük performanslar sergilemiştir. Bu durumun, görsel muayenede belirlenen yanma oluşu oluşumu eğilimi ve mikroyapı incelemelerinde ortaya konulan mikroyapı gözlemleriyle uyumlu olduğu görülmüştür. Ayrıca, yüksek ısı girdisi ve düşük soğuma hızına bağlı olarak kaynak bölgelerinde görülen TM'den daha düşük sertliklere sahip B miktarlarındaki değişim, perlit, ferrit gibi yapıların ortaya çıkışı ve tane büyümesi gibi faktörlerin dayanım özelliklerini düşüreceği de açıktır. Diğer bir husus ise daha önce makroyapı gözlemlerinde de belirtildiği gibi, artan akım ve CO<sub>2</sub> miktarıyla diğer bölgelere nazaran sertliği daha düşük olan KM ve ITAB kesit alanlarının da artış gösterdiğidir ki bu durumda azalan çekme testi genel sonuçlarının makroyapı ve mikrosertlik incelemeleriyle de uyumlu olduğunu söylemek mümkün olmaktadır. Bununla birlikte, yüksek CO<sub>2</sub> kullanımıyla kaynak sırasında artan oksijenin, KM içerisindeki elektrottan ve esas metalden gelen özellikle manganın varlığını olumsuz etkilendiği, bu şekilde sünekliği düşürdüğüne, kopmaların bu bölgede meydana gelmesine yol açtığına inanılmaktadır.

**Çizelge 6.** S960QL çeliğinin MAG kaynağıyla farklı A ve CO<sub>2</sub> içerikleri kullanılarak birleştirilmesi sonrası elde edilen çekme testi sonuçları

| Numune Kodu  | Akma Dayanımı (MPa) | Akma Performansı (%) | Çekme Dayanımı (MPa) | Çekme Performansı (%) | Uzama (%)   | Kopma Yeri  |
|--------------|---------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-------------|-------------|
| S960QL EM    | 952                 | -                    | 1060                 | -                     | 11,4        | -           |
| <b>185/5</b> | <b>969</b>          | <b>101,7</b>         | <b>1043</b>          | <b>98,3</b>           | <b>4,87</b> | <b>ITAB</b> |
| 215/5        | 920                 | 96,6                 | 1018                 | 96                    | 4,08        | ITAB        |
| 245/5        | 923                 | 96,9                 | 1022                 | 96,4                  | 3,96        | ITAB        |
| 185/20       | 945                 | 99,2                 | 1031                 | 97,2                  | 4,24        | ITAB        |
| 215/20       | 874                 | 91,8                 | 968                  | 91,3                  | 2,52        | KM          |
| 245/20       | 865                 | 90,8                 | 980                  | 92,4                  | 2,57        | KM          |

Birleştirmelerin, oda sıcaklığında (~20 °C) yapılan çentik darbe test sonuçlarına gelince, bütün birleştirmelerin darbe enerjilerinin S960QL EM'den (122 J) düşük olduğu görülmektedir (Şekil 10). Dolayısıyla bu çalışmada uygulanan bütün kaynak parametrelerinin kaynak bölgesi mikroyapısında meydana gelen farklılaşma, özellikle de iri tanelerin varlığı sebebiyle tokluğu düşürdüğünü söylemek mümkündür (Gaspar, 2019). Bununla birlikte, bütün birleştirme denemelerine ait sadece ITAB içeren numunelerin darbe enerjileri, sadece KM içerenlerden yüksek çıkmıştır. Kaynak akım değerindeki artışın, her iki CO<sub>2</sub> değerinde de toklukları düşürdüğü anlaşılmaktadır. Benzer bir çıkarımı, CO<sub>2</sub> oranındaki artış için de yapmak mümkün olsa da kırılma için gerekli darbe enerjisi için belirleyici faktörün, bu çalışmada daha ziyade uygulanan akım değeri olduğu söylenebilir. Çünkü en yüksek darbe enerjileri 185 A değerindeki kaynak denemelerinde elde edilebilmiş, bu akımda CO<sub>2</sub> içeriğinin %5 veya %20 olması belirgin bir farklılığa neden olmamıştır (sırasıyla 100 ve 101 J). Darbe testi sonuçlarının sertlik-mikroyapı ilişkisinde belirlenen özelliklerle uyumlu olduğu anlaşılmaktadır, zira genel olarak darbe numunelerinin ITAB sertliklerinin KM'den yüksek olduğu bilinmektedir. Türker (2019), S960QL EM'ye göre KM'de darbe enerjinin düştüğünü ancak, en düşük çentik darbe enerjisinin ergime sınırında tespit edildiğini bildirirken; Samardzic ve ark. (2017) ise ergime sınırından ITAB'a doğru 0,5 mm mesafelerde uzaklaşıldıkça kırılma enerjinin artış gösterdiğini vurgulamışlardır ki çalışmadan darbe enerjilerinin hemen hemen en yüksek sertliklerin ölçüldüğü yerler olduğu anlaşılmaktadır. KM'de nispeten yüksek ısı girdisi kaynaklı değişen martenzit / beynit oranının yanı sıra mangan varlığının olumsuz yönde etkilenmesi ve iri tane yapısının da darbe tokluğunu düşürdüğüne inanılmaktadır.



**Şekil 10.** Birleştirmelerin KM ve ITAB'larına uygulanan çentik darbe testi sonuç grafiği.



## SONUÇ

Bu çalışma kapsamında HSS S960QL çeliğinin MAG ile birleştirilmesinde akım değeri ve CO<sub>2</sub> oranının etkileri değerlendirilmeye çalışılmıştır. Kullanılan kaynak akımı ve CO<sub>2</sub> oranı karakteristik mikroyapı bölgelerinin kesit geometrilerini yani makroyapıyı, her bir mikroyapı bölgesini genel olarak karakterize eden faz türü ve miktarını, tüm bunların sonucu olarak da birleştirmelerin sertlik değerlerini, akma ve çekme dayanımlarını, süneklik ve çentik darbe tokluğu gibi özellikleri belirlemektedir. Kaynak akımı ve koruyucu gazdaki CO<sub>2</sub> oranının arttırılması, yukarıda belirtilen özellikleri direkt olarak etkileyen kaynak bölgesine ısı girdisini arttırırken, soğuma hızını azaltmıştır. Bunun sonucu olarak da TM'nin B'ye olan oranı değişmiş, sertlikleri bu faza göre daha az olan ferrit, perlit gibi diğer fazların ve tane irileşmesinin meydana gelmesine, mukavemet değerlerinin ve çentik darbe enerjilerinin düşmesine neden olmuştur. Dolayısıyla bu çalışma göstermiştir ki S960QL çeliğinin MAG ile birleştirilmesinde nispeten daha az ısı girdisi sağlayacak kaynak parametrelerinin seçilmesi büyük önem arz etmektedir.

Genel olarak çalışma sonucunda:

- 1- A ve CO<sub>2</sub> oranının artması sıçrıntı ve yanma oluşu oluşturma eğilimini arttırmıştır.
- 2- En düşük A ve CO<sub>2</sub> gaz oranının kullanıldığı, yani en düşük ısı girdisinin sağlandığı 185/5 kodlu birleştirme denemesinin kaynak bölgesinde nispeten daha dar bir ITAB meydana gelmiştir ki diğer birleştirmelere ait ITAB'lara göre ince taneli TM + B yapısının korunduğu gözlenmiştir.
- 3- 185/5 birleştirmesindeki bu yapı, sertlik ölçümlerinde S960QL EM de dahil olmak üzere en yüksek sertliklerin bu bölgede, ort. 377 HV değerinde çıkmasına neden olmuştur. Ancak A ve CO<sub>2</sub>'nin arttırılması durumunda, muhtemelen çökeltilerin çözünmesi ve nispeten daha iri tane yapıları sebebiyle KM ve ITAB'daki sertlikler azalmıştır.
- 4- Çekme testinde en yüksek performansı nispeten daha az yapısal değişimin görüldüğü, daha yüksek sertliklere sahip 185/5 kodlu birleştirme göstermiştir. Bu birleştirme EM ile benzer akma performansı (%101,7) ve çekme performansı (%98,3) sergilemiştir.
- 5- Tüm birleştirme denemelerinde tespit edilen iri tanelerin varlığı, oda sıcaklığındaki çentik darbe testinde hem ITAB hem de KM numunelerinin darbe enerjilerinin düşmesine neden olmuştur. En düşük akımın kullanıldığı 185/5 ve 185/20 kodlu birleştirmelerinin sadece ITAB içeren numuneleri ~100 J ile en yüksek enerjileri yakalamıştır. Yine uygulanan parametrelerdeki artışlar darbe enerjilerinin düşmesine neden olmuş, en düşük değerler ~50 J ile 245/5 birleştirme denemesinde görülmüştür.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Adak DK, Mukherjee M and Pal TK, 2015. Development of a Direct Correlation of Bead Geometry, Grain Size and HAZ Width with the GMAW Process Parameters on Bead-on-plate Welds of Mild Steel. Transactions of the Indian Institute of Metals, 68, 839-849.
- Alabi AA, Moore PL, Wrobel LC, Campbell JC, He W, 2018. Tensile behaviour of S690QL and S960QL under high strain rate. Journal of Constructional Steel Research, 150: 570-580.
- Aydın M, 2017. Çelik Malzemeler Aybitak Yayınları, S. 540. İstanbul.
- Błacha S, Wegłowski M, Dymek S, Kopyscianski M, 2017. Microstructural and Mechanical Characterization of Electron Beam Welded Joints of High Strength S960QL and Weldox 1300 Steel Grades. Archives of Metallurgy and Materials, 62(2): 627-634.

- Cadoni E, Forni D, 2019. Mechanical behaviour of a very-high strength steel (S960QL) under extreme conditions of high strain rates and elevated temperatures. *Fire Safety Journal*, 109, 102869.
- Gaspar M, 2019. Effect of Welding Heat Input on Simulated HAZ Areas in S960QL High Strength Steel. *Metals*, 9(11): 1226-1239.
- Górka J, Kotarska A, 2019. MAG welding of 960QL quenched and tempered steel. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*, 591, 012017
- Gourd LM, 1995. Kaynak Teknolojisinin Esasları (Eryürek, B., Bodur, O., Dikicioğlu, A. Çev.) Birsen Yayınevi. S. 43. İstanbul.
- Greš M, Viňáš J, Mulidrán P, Slezak T, Brezina J, 2018. Analysis of Shielding Welding Gas Composition Effects on the Final Microhardness of the Fillet Joints Made With Use of MAG Technology. *The International Journal of Engineering and Science*, 7(7-I): 63-70.
- Gunaraj V and Murugan N, 2002. Prediction of Heat-Affected Zone Characteristics in Submerged Arc Welding of Structural Steel Pipes. *Welding Journal* 81(3): 45/S-53/S.
- Karabulut H, Türkmen M, Erden MA and Gündüz S, 2016. Effect of Different Current Values on Microstructure and Mechanical Properties of Microalloyed Steels Joined by the Submerged Arc Welding Method. *Metals*, 6(11): 281-287.
- Karabulut H, Türkmen M, 2016. Temperleme İşleminin Tozaltı Kaynak Yöntemi ile Birleştirilen Mikroalaşımli Çeliklerin Mekanik Özelliklerine Etkisi. *Dicle Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, 7(3): 587-594.
- Linnert GE, 1994. *Welding Metallurgy Carbon and Alloy Steels*. AWS. S. 801. Miami, Florida.
- Meneses VA, Leal VS, Scotti A, 2016. Influence of Metal Transfer Stability and Shielding Gas Composition on CO and CO<sub>2</sub> Emissions during Short-circuiting MIG/MAG Welding. *Soldagem & Inspeção*, 21(3): 253-268.
- Samardžić I, Dunder M, Katinić M, Krnić N, 2017. Weldability Investigation on Real Welded Plates of Fine-Grained High-Strength Steel S960QL. *Metalurgija*, 56(1-2): 207-210.
- Slezak T, Sniezek L, 2015. A Comparative LCF Study of S960QL High Strength Steel and S355J2 Mild Steel. *Procedia Engineering*, 114: 78-85.
- Slezak T, Sniezek L, 2016. Fatigue Life of Welded Joints of High-Strength Structural Steel S960QL. *Solid State Phenomena*, 250: 169-174.
- TS EN ISO 4136: Metalik Malzemelerin Kaynakları Üzerinde Tahribatlı Deneyler-Enine Çekme Deneyi, 12.06.2013.
- TS EN ISO 9016: Metalik Malzemelerde Kaynaklar Üzerinde Tahribatlı Deneyler - Vurma Deneyleri - Deney Numunesi Yeri, Çentik Yönü ve Muayene, 12.06.2013.
- TS EN ISO 9015-1:2011: Metalik Malzemelerdeki Kaynaklar Üzerinde Tahribatlı Deneyler-Sertlik Deneyi-Bölüm 1: Ark Kaynaklı Birleştirmelerde Sertlik Deneyi, 22.11.2011.
- TS EN ISO 17639: Metalik malzemelerdeki kaynaklarda tahribatlı muayene - Kaynakların makroskopik ve mikroskopik muayenesi, 13.02.2014.
- TS EN ISO 5817: Kaynak - Çelik, nikel, titanyum ve bunların alaşımlarında ergitme kaynaklı (demet kaynağı hariç) birleştirmeler - Kusurlar için kalite seviyeleri, 29.04.2014.
- Türker M, 2017. The Effect of Welding Parameters on Microstructural and Mechanical Properties of HSLA S960QL Type Steel with Submerged Arc Welding. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 21(3): 673-682.
- Yılmaz R, Barlas Z, 2005. Paslanmaz Çeliklerin Gazaltı Kaynak Yöntemi ile Birleştirilmesinde Koruyucu Gaz Kompozisyonunun Mikroyapı ve Mekanik Özelliklere Etkisi. *Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 11(3): 391-400.
- Zielinska S, Pellerin S, Valensi F, Dzierzega K, Musio K, de Izarra C, and F Briand, 2008. Gas influence on the arc shape in MIG-MAG welding. *The European Physical Journal - Applied Physics*, 43(1): 111-122.

**Atf İçin:** Bacak S, Varol Özkavak H, Sofu M M, 2021. FDM Üç Boyutlu Yazıcı Teknolojisinde Farklı İçyapı Geometrileri İle Üretilmiş Numunelerin Çekme Dayanımlarının Karşılaştırılması. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1444-1454.

**To Cite:** Bacak S, Varol Özkavak H, Sofu M M, 2021. Comparison of Mechanical Properties of 3D-Printed Specimens Manufactured via FDM with Various Inner Geometries. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1444-1454.

## **FDM Üç Boyutlu Yazıcı Teknolojisinde Farklı İçyapı Geometrileri İle Üretilmiş Numunelerin Çekme Dayanımlarının Karşılaştırılması**

Selim BACAĞ<sup>1\*</sup>, Hatice VAROL ÖZKAVAK<sup>1</sup>, Mehmet Mahir SOFU<sup>2</sup>

**ÖZET:** Çalışmada eriyik yığıma modelleme (FDM) yöntemi ile 3B yazıcı kullanarak üretilen PLA numunelerin mekanik özelliklerden olan çekme dayanımına işlem parametrelerinin etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmada işlem parametreleri olarak 2 farklı doluluk oranı (%20 ve %100), 2 farklı baskı hızı (100,130mm/sn), 2 farklı nozul sıcaklığı (180 ve 220°C) ve oval ve köşegen desen yapılarını içeren 3 farklı desen çeşidi (Gyroid,Cross 3D ve Grid) seçilmiştir. Çalışmada, %20 doluluk oranına göre, %100 doluluk oranında daha yüksek çekme gerilmesi elde edilmiştir. %20 doluluk oranındaki numuneler kendi aralarında kıyaslandığında elde edilen en yüksek çekme gerilmesi değeri 220°C nozul sıcaklığında, 100 mm/s baskı hızında üretilen Grid desen çeşidinde 38.76 MPa olarak ölçülmüştür. Çalışmada %20 doluluk oranındaki numuneler için istatistik analiz yapılmıştır. Varyans analiz (ANOVA) yöntemi sonucu güven düzeyi %96 elde edilmiştir. Özgül dayanım açısından kıyaslama yapıldığında ise 5,893 MPa/gr özgül dayanıma sahip tam dolu parçaya en yakın desenin 5.458 MPa/gr değeri ile Cross 3D deseni olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Eriyik yığıma modelleme (FDM), Eklemeli İmalat, Çekme Dayanımı, İşlem Parametreleri, ANOVA Analizi.

### **Comparison of Mechanical Properties of 3D-Printed Specimens Manufactured Via FDM with Various Inner Geometries**

**ABSTRACT:** The aim of this study was to investigate the effects of process parameters on tensile strength for PLA specimens produced by fused deposition modeling (FDM). For this purpose, two different density rates (20% and 100%), printing speeds (100 and 130 mm/s), and nozzle temperatures (180 and 220°C) with three different hatching patterns including elliptical and diagonal (Gyroid, Cross 3D ve Grid) were selected. In the study, higher tensile stress was obtained at a rate of 100%, compared to a 20% density rate. When the samples with a 20% density rate are compared among themselves, the highest tensile stress value obtained was measured as 38.76 MPa for the Grid-patterned specimen produced at a nozzle temperature of 220°C and printing speed of 100 mm/s. Statistical analysis was also done for specimens with a 20% density rate. As a result of the variance analysis (ANOVA) method, the confidence level was achieved as 96%. When comparing in terms of specific strength, it was determined that the closest pattern to the full-filled sample with a specific strength of 5,893 MPa/gr was Cross 3D-patterned sample with a value of 5.458 MPa/gr.

**Keywords:** Fused deposition modelling (FDM), Additive Manufacturing, Tensile Strength, Process parameters, ANOVA analysis

<sup>1</sup> Selim BACAĞ ([Orcid ID: 0000-0002-9640-2893](https://orcid.org/0000-0002-9640-2893)), Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Teknik Bilimler MYO, Makine ve Metal Teknolojileri Bölümü, Isparta, Türkiye

<sup>2</sup> Hatice VAROL ÖZKAVAK ([Orcid ID: 0000-0002-0314-0119](https://orcid.org/0000-0002-0314-0119)), Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Teknik Bilimler MYO, Makine ve Metal Teknolojileri Bölümü, Isparta, Türkiye

<sup>3</sup> Mehmet Mahir SOFU ([Orcid ID: 0000-0002-0010-0832](https://orcid.org/0000-0002-0010-0832)), Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Otomotiv Mühendisliği Bölümü, Isparta, Türkiye

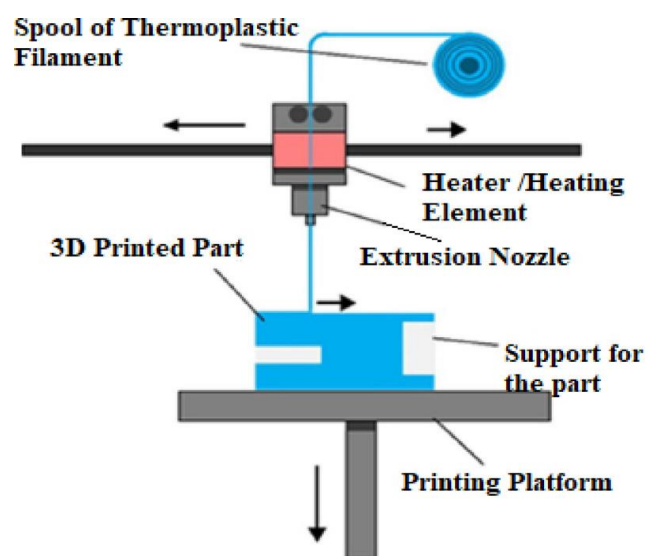
\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Selim BACAĞ, e-mail: selimbacak@isparta.edu.tr

## INTRODUCTION

Additive Manufacturing (AM) is a new manufacturing method that produces layered parts using CAD data directly. In conventional methods, manufacturing is obtained by adding new materials on the previous until the part is completed, while in AM methods 3-dimensional parts are manufactured by layers (Sheoron et al., 2019). In AM methods, it is possible to manufacture parts in any geometry or complexity with lower costs and less processing time when compared to conventional methods (Mohomed, 2015). For this reason, AM methods are widely used in military and aeronautics, automobile industry as well as dental and biomedical applications (Zaman et al., 2019; Chen et al., 2016). This type of manufacturing does not waste any material or tool (Williams, 2016). In AM methods various types of materials including thermoplastic polymers, concrete, metal, and ceramics can be used. AM also provides the opportunity to manufacture complex or customized geometries that are nearly impossible to obtain with conventional methods in shorter times.

AM methods, on the other hand, has limited use due to the changes in part quality and mechanical properties depending on the selection of process parameters. For this reason, the selection of process parameters in AM methods plays a vital role. Along with the selection, optimization of the selected parameters is also crucial. Since the importance of parameter selection is well-known, there are many studies in the literature focusing on this specific subject. DMU-Mori, a manufacturing company, has developed a commercial software called OPTOMET, which is used to optimize the process parameters in the SLS method to achieve a sound production, ([https://tr.dmgmori.com/haberler-ve-medya/dergi\\_say:1](https://tr.dmgmori.com/haberler-ve-medya/dergi_say:1), 2019).

Fused Deposition Modelling (FDM) is one of the most popular AM methods thanks to its simplicity and low cost. In this method, a thermoplastic filament is fed through a nozzle. The heater within the nozzle turns the filament into a semi-fluid. The flow of this semi-fluid filament through the nozzle is provided as a result of the pressure that occurred by the spool. The schematics of an FDM system is described in Figure 1.

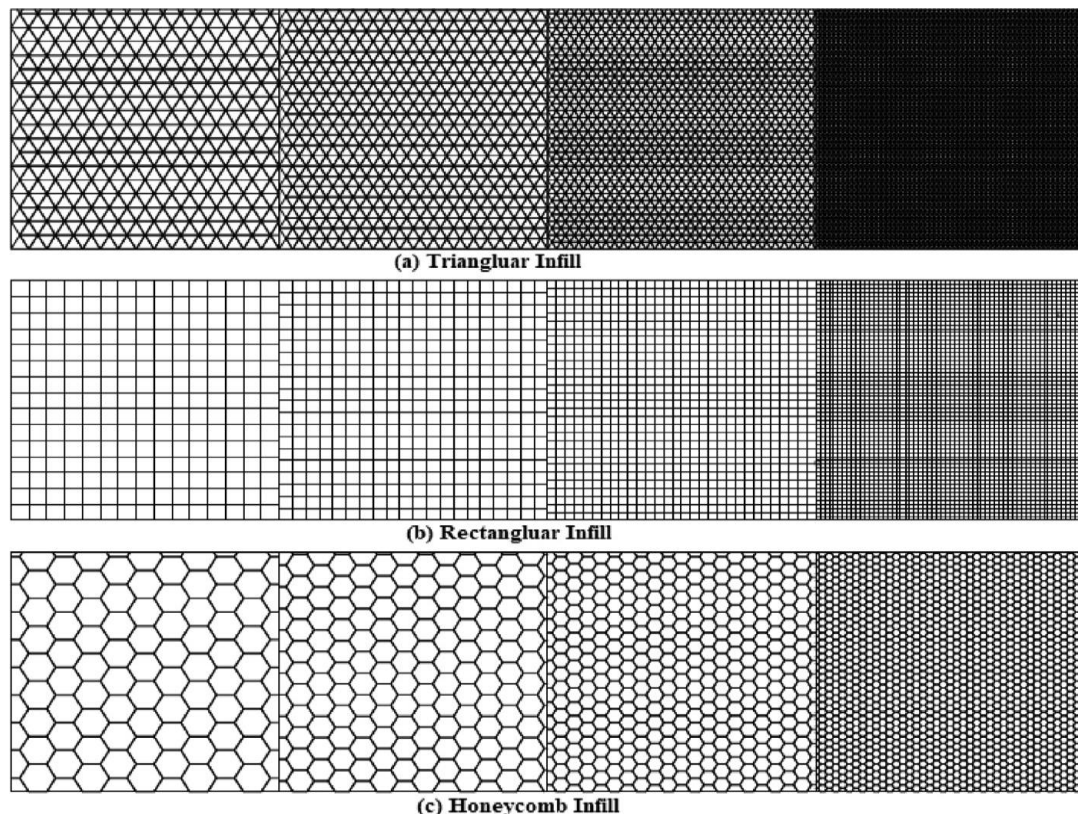


**Figure 1.** Schematics of an FDM system (Dizon vd.,2016;

<http://www.lboro.ac.uk/research/amrg/about/the7categoriesofadditivemanufacturing/materialextrusion>, 2019)

Along with its advantages such as high printing speed and low cost, FDM has disadvantages as well. Due to its material limitation to thermoplastic polymers, high dependency of material properties to

the process parameters, and low surface quality restrict the use of the FDM method. The process parameters for FDM methods are layer thickness, structure orientation, hatching angle, air holes, nozzle temperature, printing speed, density rate, nozzle diameter, scanning width, and the number of contours. The characteristics of this AM method is to produce spaces in the inner structure during manufacturing. The percentage of these spaces is determined within the process parameters. However, spaces in the structure cause changes in the mechanical properties of the manufactured part. The pattern of the spaces in the structure can be arranged in different ways (Gibson et al., 2015). Various fill patterns for the FDM method including triangle, honeycomb, and rectangle are shown in Figure 2.



Şekil 2. Fill patterns used in FDM (Sheoron vd.,2019)

Process parameters for the FDM method according to ASTM D638-IV are given in Figure 3.

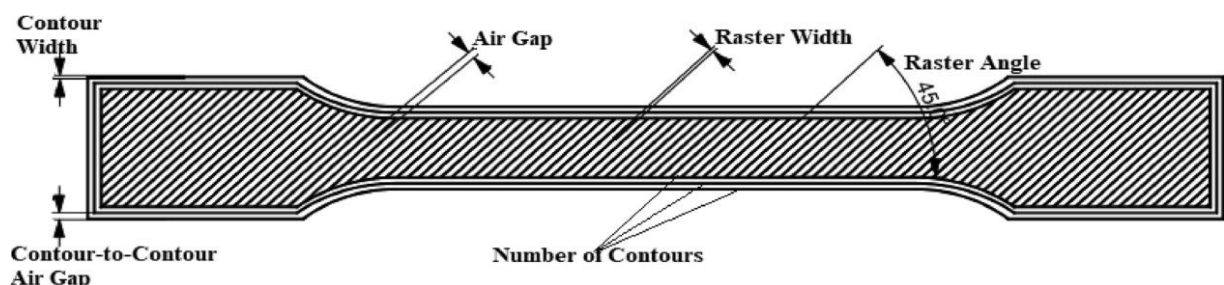


Figure 3. Process parameters according to ASTM D638-IV (Sheoron vd.,2019)

When the studies on the mechanical properties of the parts manufactured by the FDM method are investigated, it is concluded that one of the parameters affecting the mechanical properties is the scanning angle and orientation. In the studies, the mechanical properties of the parts with scanning angle  $0^\circ$  were obtained higher than the other scanning angles. This is considered as a result of the fibers being in a parallel plane. In addition, it is seen that the mechanical properties of the parts manufactured with

low layer thickness and high scanning width were higher. This situation can be explained by the increase in the adhesion area (Rajpurohit et al., 2019). For the scanning angles of  $-45^{\circ}/45^{\circ}$  and  $0^{\circ}/90^{\circ}$ , the tensile strength of PLA materials was higher than the ABS materials (Attoye et al., 2019).

The variables in the studies on mechanical properties of parts manufactured by FDM are generally nozzle temperature, printing speed, and scanning angle. In addition to these parameters, the fill pattern is also a considerable variation in these studies. When examining the studies, it is seen that different patterns including linear, diamond, and hexagonal (honeycomb) were used (Alafaghi et al., 2017; Dey et al., 2019; Wenzelburger et al., 2010). There are only a few studies on elliptic patterns in the literature.

In this study, elliptic patterns called Gyroid and Cross 3D, along with Grid patterns in hexagonal form were selected. These selected patterns are different than the traditional patterns in the literature. Specimens with one of these patterns were manufactured by using nozzle temperature of  $180^{\circ}\text{C}$  and  $220^{\circ}\text{C}$ , printing speed of  $100\text{ mm/s}$  and  $130\text{ mm s}^{-1}$ , and scanning angle of  $0^{\circ}$  and  $45^{\circ}$  as the process parameters. Thus, the effect of elliptic and diagonal shaped patterns on mechanical properties was determined and contributed to the literature. Another important contribution of this study is the comparison of the specific strengths of the manufactured samples. The specific strength is defined as the material's strength (force per unit area at failure) divided by its density. It is also known as stress-weight, strength-weight, or strength-mass ratios. Specific strength is used to measure the strength of materials with spaces in the inner structure (Durga et al., 2019).

## MATERIALS AND METHODS

### Material And Equipment

In this study, analyzed specimens were manufactured from Polylactic acid (PLA) by using FDM. The filament used in the study, which is produced by ESUN and called PLA+, has  $1.75\text{ mm}$  in diameter. In Table 1, the mechanical properties of the filament are given.

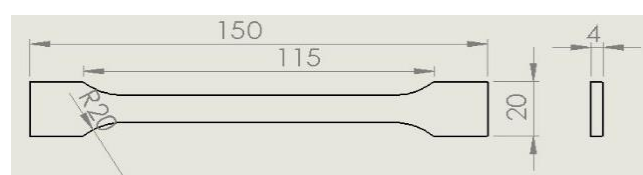
**Table 1.** Properties of PLA+ filament

| Printing Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) | Deterioration Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ , 0.45 MPa) | Density ( $\text{g/cm}^3$ ) | Tensile Strength (MPa) | Elongation at Break (%) | Buckling Strength (MPa) | Impact Strength ( $\text{kJ/m}^2$ ) |
|---|--|-----------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| 205-225                                     | 52   | 1.24                        | 60                     | 29                      | 87                      | 7                                   |

PLA+ filament was selected thanks to its better accessibility, lesser toxicity, and the ability to be used at low temperatures.

PLA+ based tensile specimens were manufactured by a 3D printer with a mobile printing table. The 3D printer used in this study, which is an open-source device and suitable for FDM technology, has a  $0.4\text{ mm}$  nozzle diameter and  $1.25\text{-micron}$  axis sensitivity.

Specimens were prepared according to ASTM D638-IV standards. For modeling, CAD software was used. Then, the model was finalized by determining G-codes. The dimensions of the tensile specimen are given in Figure 4.



**Figure 4.** Tensile specimen according to ASTM D638-IV standards.

## Experimental Design

For comparison, samples with 100% density were also manufactured to investigate the effect of scanning angle, nozzle temperature, and printing speed on the mechanical properties. Besides, various filling patterns experimented for the specimens with 20% density. Constant process parameters used in the experiment are given in Table 2.

The mechanical properties of the samples manufactured by the FDM method vary depending on the process parameters. Tensile samples were printed by using 3 different patterns (Gyroid, Cross3D, and Grid), two different printing speeds (100 and 130 mm/s), two different nozzle temperatures (180 and 220°C) and two different scanning angles (-45/45° and 0/90°). The density of the specimens was 20% with 0.3 mm wall thickness. All materials and manufacturing processes were kept the same for all specimens. As for slicing software, Xdesktop 2.0.8 by Zaxe was used. During the manufacturing, speed was reduced as 50% for the base and then set maximum for the rest of the layers.

**Table 2.** Constant process parameters

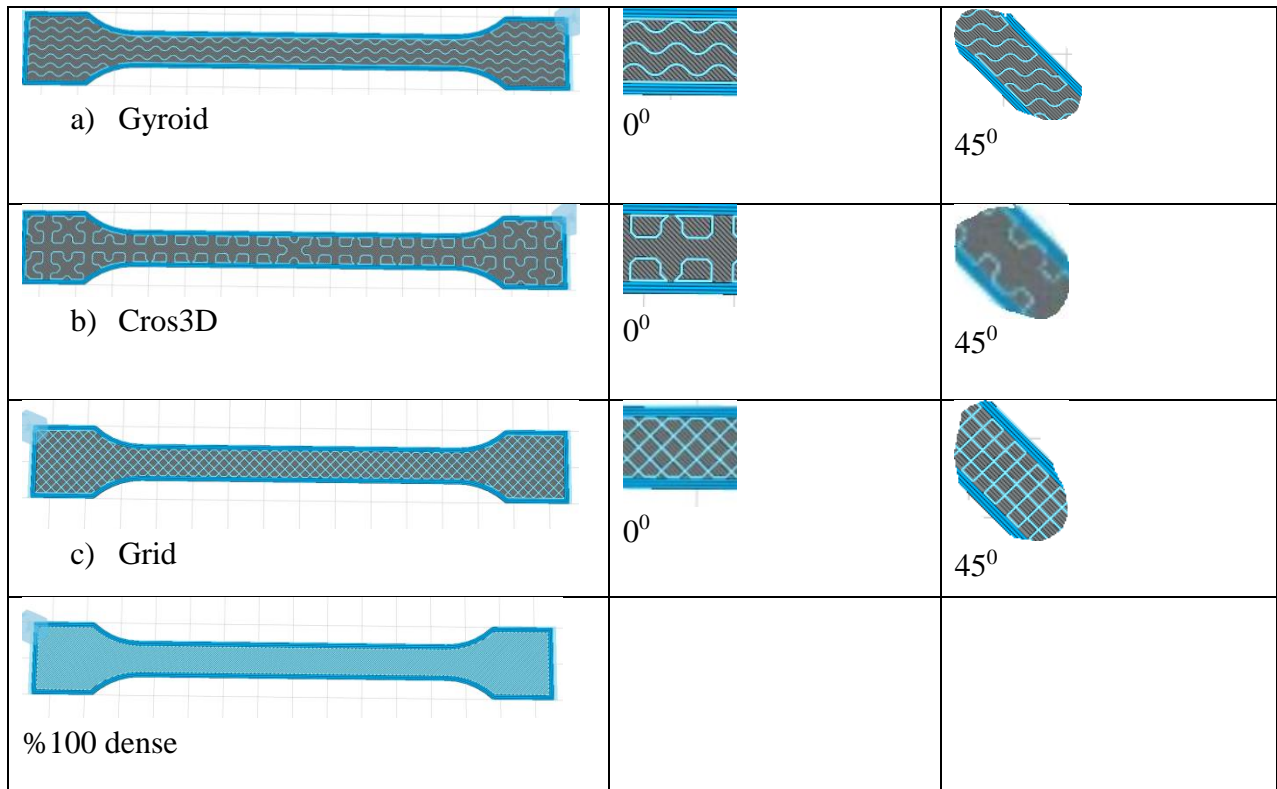
| Process parameters           | Value |
|------------------------------|-------|
| Layer thickness (mm)         | 0.2   |
| Table temperature (°C)       | 50    |
| Environment temperature (°C) | 25    |
| Number of lower shell layer  | 4     |
| Number of upper shell layer  | 4     |
| Number of outer walls        | 3     |
| Support situation            | Yok   |
| Drawback speed (mm/s)        | 20    |
| Fan speed (%)                | 100   |

The process parameters used in the experimental study are given in Table 3. Using these process parameters, 32 samples were manufactured under different conditions.

**Table 3.** Process parameters changed during the experiments

| Pattern Type | Nozzle Temperature (°C) | Printing Speed (mm/s) | Scanning Angle (°) |
|--------------|-------------------------|-----------------------|--------------------|
| Gyroid,      | 180                     | 100                   | 0                  |
| Gyroid,      | 180                     | 100                   | 45                 |
| Gyroid,      | 180                     | 130                   | 0                  |
| Gyroid,      | 180                     | 130                   | 45                 |
| Gyroid,      | 220                     | 100                   | 0                  |
| Gyroid,      | 220                     | 100                   | 45                 |
| Gyroid,      | 220                     | 130                   | 0                  |
| Gyroid,      | 220                     | 130                   | 45                 |
| .            |                         |                       |                    |
| .            |                         |                       |                    |
| .            |                         |                       |                    |
| Full dense   | 220                     | 130                   | 45                 |

Pattern differences of 3D-printed samples are given in Figure 5. For the comparison of the specific strengths, manufactured parts were weighed by using a precision scale. The determination of grammage is given in Table 4.



**Figure 5.** Specimen patterns used in experimental studies

**Table 4.** Weights of the patterns used in experimental studies

| Pattern Type | Weight (gr) |
|--------------|-------------|
| Gyroid       | 6,307       |
| Cross 3D     | 6,210       |
| Grid         | 6,770       |
| Full dense   | 9,163       |

Tensile tests in the study were carried out using a 20 kN MARES brand test device in Civil Engineering Mechanic Test Laboratory at Faculty of Technology, Isparta University of Applied Sciences. Tensile speed during the experiments was 5 mm/s. Image of the specimen during the tensile test is given in Figure 6.



**Figure 6.** Image of the tensile test



In the study, statistical analysis of the specifically selected process parameters (pattern type, temperature, printing speed, scanning angle) depending on tensile strength was performed. As a result of the variance analysis (ANOVA), the degree of influence of printing speed, temperature, scanning angle, and filling pattern on tensile strength was determined.

## RESULTS AND DISCUSSION

### The Effect of Processing Parameters on Tensile Strength

The mechanical properties of 3D-printed PLA+ materials were evaluated by using four different parameters. All of the parameters specified during manufacturing affected the manufacturing process. For the parts with 20% density, a filament with a length of 1120-120 mm was used due to pattern differences. When examining the effect of varied parameters on tensile strength for the parts with 20% density, it was seen that density rate has the highest influence on mechanical properties. Since higher density rate in the cross-section increases the capacity of meeting tensile load per unit area, an increase in tensile strength is an expected feature (Samykan et al.,2019)

In the study, it was seen that Gyroid, Cros3D, and Grid patterns that are different than traditional patterns used in the literature influence the tensile strength of the specimens. This situation can be explained by the effect of pattern shape on inner structure, and with the changes in the sidewall compositions. When the patterns selected in the study are compared among themselves, the highest tensile strength value was obtained in the Grid pattern. By analyzing the Grid pattern, it was observed that a better continuity was achieved, and there were fewer gaps within the structure. The main reason behind the selection of the elliptic structure in the study was increasing the tensile strength by eliminating the main stress concentration areas. Although the results from the study indicate the elimination of the stress concentration areas, it was seen that using elliptic pattern deteriorates the tensile strength since the contact area between layers gets smaller (Leite et al.,2018)

By examining the printing speeds in the experiments (100 and 130 mm/s), it was noticed that higher printing speed decreases the tensile strength for all pattern types (Chacon et al.,2017). The reason behind the tensile strength reduction may be considered as the increment of the printing speed causing an irregular decrease in layer thickness. Higher printing speeds can provide shorter manufacturing times; however, they can also cause a decrease in the mechanical properties of the 3D-printed parts (Lanzotti et al.,2015).

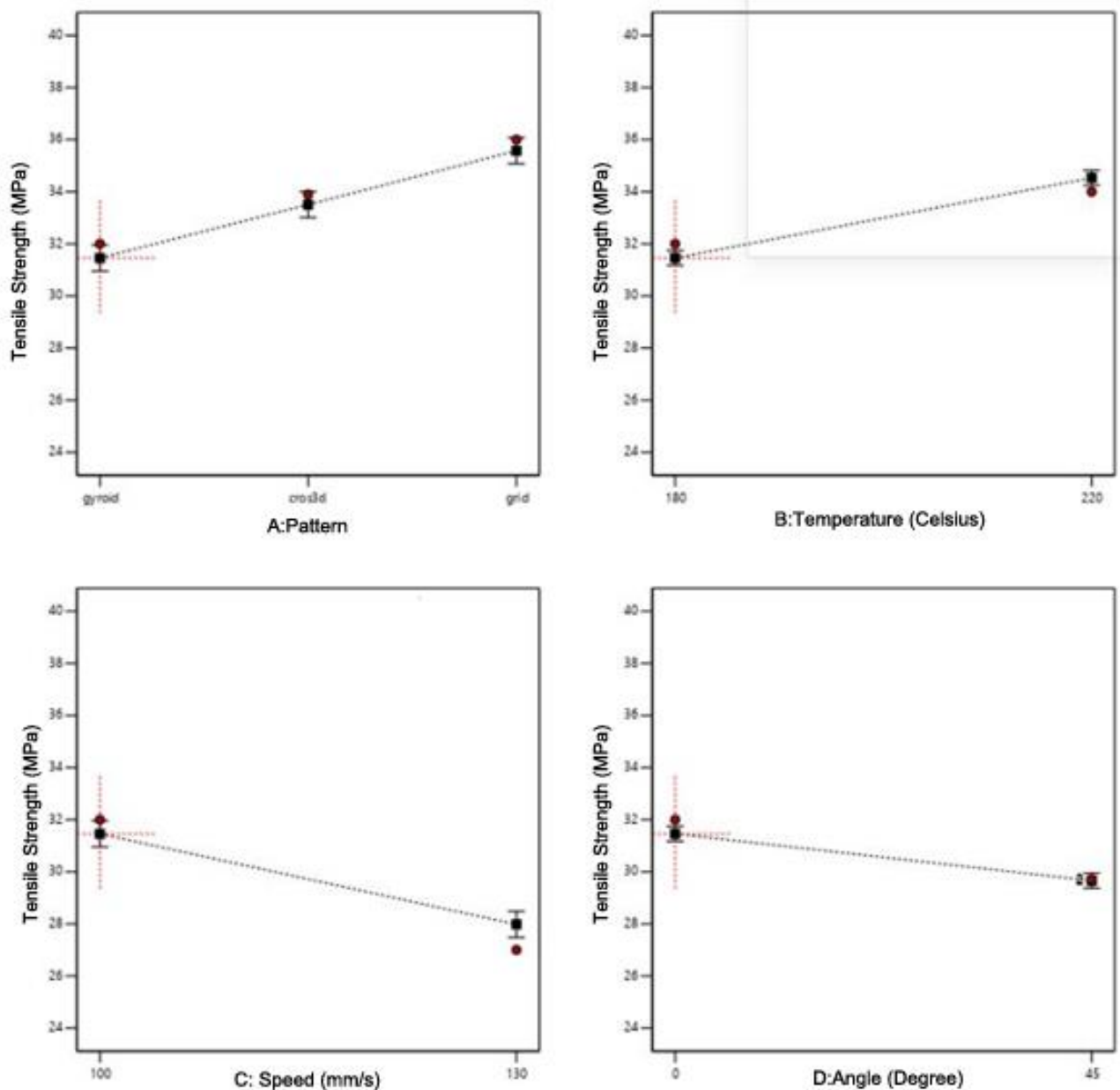
In the study, it is also observed that specimens manufactured at 220°C have better tensile strengths. It is thought that higher temperatures provide betterment in cohesion between layers, thus lead to an increase in mechanical properties.

One of the objectives of this study was to determine the effect of scanning angle on tensile strength. For this reason, scanning angles were selected as -45/+45 and 0/90. With this study, it is seen that tensile strengths of the parts manufactured with 0/90 scanning angles were higher than the parts with -45/+45 scanning angles for all selected parameters. Depending on the direction of the applied force, the stress distributions in the filaments differ due to the effect of the filament scanning angle. In some angles (0/90) filaments show pure tensile stress, while others (-45 /+ 45) create a mixture of tensile and shear stresses. Since pure tensile stress is accepted as a better circumstance, 0/90 scanning angles give better tensile and yield strengths compared to -45/+45. 0/90 raster angle causes a harder material (Samykan et al.,2018). A low raster angle provokes a decrease in mechanical properties since it weakens the bonds by increasing the stress and deformation.

In the study, the highest tensile strength for samples with 20% density was obtained with 220° C nozzle temperature, 100 mm/s printing speed, and 0/90 scanning angle in Grid pattern. The tensile

strength obtained with these process parameters was measured as 38.76 MPa in 34 minutes of manufacturing time. Similarly, for the samples with 100% density, the highest tensile strength was achieved with the same parameters and pattern type as 52.1 MPa. The manufacturing time for 100% density was determined as 51 minutes. This situation can be explained as the fracture occurs after a certain elongation in the Grid pattern. Also, the strong bond between layers in the grid pattern affected the result in this way (Chadha et al., 2019).

For the 20% density rate, the effects of the parameters on the tensile strength are examined separately and the graphics acquired are given in Figure 7. Among the graphics, the highest slope is clearly seen in pattern-tensile strength graphics. As a result of the statistical analysis, the effect of the pattern was found as the highest percentage value in terms of parameter impact.



**Figure 7.** Effect of process parameters on tensile strength

In the study, statistical analysis for the determination of the interaction between process parameters and tensile test specimens were also carried out by using variance analysis (ANOVA). The results of the analysis are given in Table 5. In the analysis, the confidence level (R<sup>2</sup>) of the analysis was 96%, while the signal-to-noise ratio (S/N) exceeded the confidence level with the value of 30.647. After examining the percentile interaction of the process parameters, it was concluded that the effect of pattern type on tensile strength was 49.4%, while the effect of nozzle temperature was 23.3%, printing speed was 12.4%, and scanning angle was 7%. The interaction of the pattern and printing speed was also found to have a 3.7% effect as a result of the analysis. The error rate of variance analysis was 3.2%.

**Table 5.** Results of ANOVA analysis for the tensile test

| Source        | Sum of the squares | Degree of freedom | Aritfmetic mean of squares | F value | P value  | R <sup>2</sup> Value | S/N Ratio | % Distribution |
|---------------|--------------------|-------------------|----------------------------|---------|----------|----------------------|-----------|----------------|
| <b>Model</b>  | 1.83               | 7                 | 0.2612                     | 67.99   | < 0.0001 | 0.96                 | 30.647    |                |
| Pattern       | 0.9354             | 2                 | 0.4677                     | 121.76  | < 0.0001 |                      |           | 49.4           |
| Temperature   | 0.4392             | 1                 | 0.4392                     | 114.33  | < 0.0001 |                      |           | 23.2           |
| Speed         | 0.2358             | 1                 | 0.2358                     | 61.38   | < 0.0001 |                      |           | 12.4           |
| Angle         | 0.1467             | 1                 | 0.1467                     | 38.18   | < 0.0001 |                      |           | 7              |
| Pattern*Spped | 0.0712             | 2                 | 0.0356                     | 9.26    | 0.0021   |                      |           | 3.7            |
| <b>Error</b>  | 0.0615             | 16                | 0.0038                     |         |          |                      |           | 3,2            |
| <b>Total</b>  | 1.89               | 23                |                            |         |          |                      |           |                |

At the end of the study, to make a specific strength comparison, the stress values are divided by their weight and the results are given in Table 6.

**Table 6.** Specific strength values of patterns

| Pattern     | Ultimate stress (MPa) | Weight (gr) | Specific Strength (MPa/gr) |
|-------------|-----------------------|-------------|----------------------------|
| Gyroid      | 32,01                 | 6,307       | 5,075                      |
| Cross 3D    | 33,9                  | 6,210       | 5,458                      |
| Grid        | 36                    | 6,770       | 5,317                      |
| Fully dense | 54                    | 9,163       | 5,893                      |

As can be seen from Table 6, Cross 3D is the closest pattern type in terms of the specific strength compared to a fully dense specimen. That means, if manufacturing for construction where weight gains importance will be made, a pattern with higher density rates can be chosen instead of fully dense manufacturing. In other words, light but durable manufacturing will be possible.

## CONCLUSION

In the study, the effect of the process parameters on the tensile strength of the samples produced from PLA+ material by using the FDM method was tried to be determined. The results obtained from the study can be summarized as follows:

- Two different temperatures (180 and 220<sup>0</sup>C), were selected in this study, and the highest tensile strength was obtained at 220<sup>0</sup>C.
- Three different pattern types were used in the study and the highest strength was obtained in the Grid pattern.
- The effect of printing speeds used in this study (100 and 130 mm/s) was determined to have less effect on tensile strength compared to nozzle temperature or pattern type. The highest tensile strength value was obtained at 100 mm/s printing speed.

- The highest tensile strength value was achieved at the sample with a 20% density rate in Grid pattern measured as 38.76 MPa. The process parameters for the sample was 100 mm/s printing speed, and 220°C nozzle temperature.
- The lowest effect among the process parameters selected for the study was determined at the scanning angle with a ratio of 7%.
- Statistical analysis of the experimental results was done by using ANOVA method and the confidence level was obtained as 96%. In addition, the signal-to-noise ratio (S/N) of the analysis was above the confidence level with a value of 30.647.
- In the specific strength comparison, the closest to the fully dense part (5,893 MPa/gr) was Cross 3D pattern type with a value of 5.458 MPa/gr.

### Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

### Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

### REFERENCES

- About Additive Manufacturing – Material Extrusion, Loughborough University, [Online], Link: <http://www.lboro.ac.uk/research/amrg/about/the7categoriesofadditivemanufacturing/materialextusion/> erişim tarihi: 05 Mart 2020.
- Alafaghani A, Qattawi A, Alrawia B, Guzman A, 2017. ScienceDirect Experimental Optimization of Fused Deposition Modelling Processing Parameters: a Design-for-Manufacturing Approach. *Procedia Manufacturing* 10, 791 – 803. 10.1016/j.promfg.2017.07.079.
- Attoye S, Malekipour E, El-Mounayri H, 2019. Correlation Between Process Parameters and Mechanical Properties in Parts Printed by the Fused Deposition Modeling Process: Proceedings of the 2018 Annual Conference on Experimental and Applied Mechanics. 10.1007/978-3-319-95083-9\_8.
- Chacón J.M, Caminero M.A., García-Plaza E., Núñez P.J. Additive manufacturing of PLA structures using fused deposition modelling.: effect of process parameters on mechanical properties and their optimal selection. *Materials and Design*. 10.1016/j.matdes.2017.03.065.
- Chen H, Yang X, Chen L, Wang Y, Sun Y, 2016. Application of FDM three-dimensional printing technology in the digital manufacture of custom edentulous mandible trays. *Scientific Reports*. 6. 19207. 10.1038/srep19207.
- Chadha A, Haq MI U1, Raina A, Singh R.R, Penumarti N.B, Bishnoi M.S, 2019. Effect of fused deposition modelling process parameters on mechanical properties of 3D printed parts. *World Journal of Engineering*. 16/4, 550-559. 10.1108/WJE-09-2018-0329.
- Dey A, Yodo N, 2019. A Systematic Survey of FDM Process Parameter Optimization and Their Influence on Part Characteristics. *Journal of Manufacturing and Materials Processing*. 3. 64. 10.3390/jmmp3030064.
- Dizon JR, Espera A, Chen Q, Advincula R, (2017. Mechanical Characterization of 3D-Printed Polymers. *Additive Manufacturing*. 20. 10.1016/j.addma.2017.12.002.
- DMG MORI, DMG MORI Dergi, <https://tr.dmgmori.com/haberler-ve-medya/dergi>, sayı:1, 2019, erişim tarihi: 05 Temmuz 2020.
- Durga P, Vanapalli R, Geethika, V, 2019. Effect of fused deposition modelling (FDM) process parameters on tensile strength of carbon fibre PLA. *Materials Today: Proceedings*. 18. 10.1016/j.matpr.2019.06.009.
- Gibson I, Rosen D, Stucker B, 2015. *Additive Manufacturing Technologies*, Springer e-Book. 10.1007/978-1-4939-2113-3,
- Lanzotti A G, Staiano M, Massimo, M G, (201). The impact of process parameters on mechanical properties of parts fabricated in PLA with an open-source 3-D printer. *Rapid Prototyping Journal*, 21, 604-617. 10.1108/RPJ-09-2014-0135.

- Leite M, João F, Augusto D, Reis L, Vaz, M F, 2018. Study Of The Influence Of 3d Printing Parameters On The Mechanical Properties Of PLA. Proceedings of the 3rd International Conference on Progress in Additive Manufacturing (Pro-AM 2018), 547-552. [10.25341/D4988C](https://doi.org/10.25341/D4988C)
- Mohamed O A, Masood S H, Bhowmik J L, 2015. Optimization of fused deposition modeling process parameters: a review of current research and future prospects, J. Adv. Manuf. 3, 42–53.
- Rajpurohit S, Dave H, 2019. Analysis of tensile strength of a fused filament fabricated PLA part using an open-source 3D printer. The International Journal of Advanced Manufacturing Technology. 101. 10.1007/s00170-018-3047-x.
- Samykan M, Selvamani S K, Kadirgama K, Ngui W K, Kanagaraj G, Sudhakar K, 2019. Mechanical property of FDM printed ABS: influence of printing parameters. The International Journal of Advanced Manufacturing Technology. <https://doi.org/10.1007/s00170-019-03313-0>
- Sheoran A, Kumar H, 2019. Fused Deposition modeling process parameters optimization and effect on mechanical properties and part quality: Review and reflection on present research. Materials Today: Proceedings. doi: 10.1016/j.matpr.2019.11.296.
- Wenzelburger M, Silber M, Gadow D, 2010. Manufacturing of Light Metal Matrix Composites by Combined Thermal Spray and Semisolid Forming Process – Summary of the Current State of Technology. Key Engineering Materials - KEY ENG MAT. 425, 217-244. 10.4028/www.scientific.net/KEM.425.217.
- Williams L, 2016. Additive Manufacturing or 3D Scanning and Printing, Manufacturing Engineering Handbook, 2nd ed., McGraw-Hill Education.
- Zaman U K, Boesch E, Siada, A, Rivette M, Baqai A, 2019. Impact of Fused Deposition Modeling (FDM) Process Parameters on strength of built parts using Taguchi's Design of Experiments. International Journal of Advanced Manufacturing Technology. 10.1007/s00170-018-3014-6.

**Atf İçin:** Ateş İ, Manay E, Şahin B, 2021. Farklı İmalat Yöntemleri İle Elde Edilen Mikrokanalların Metrolojik Karakterizasyonu. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1455-1467.

**To Cite:** Ates I, Manay E, Sahin B, 2021. Metrological Characterization of Microchannels Obtained by Different Fabrication Methods. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1455-1467.

### Farklı İmalat Yöntemleri İle Elde Edilen Mikrokanalların Metrolojik Karakterizasyonu

İbrahim ATEŞ<sup>1\*</sup>, Eyüphan MANAY<sup>1</sup>, Bayram ŞAHİN<sup>2</sup>

**ÖZET:** Mikro imalat teknolojilerindeki gelişmeler yüksek hassasiyetli, düşük maliyetli ve yüksek performansa sahip mikro sistemlerin imalatın olanaklı hale getirmiştir. Mikrokanallar, mikro sistemlerin temel bileşenlerinden biri olarak mikroelektromekanik, kimyasal ve biyolojik cihazlar gibi mikro ve nano akışkan uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikrokanalların malzemesine, boyutsal imalat hassasiyetine, yüzey yapısına, istenen mekanik ve termal özelliklerine bağlı olarak çeşitli mikro imalat yöntemleri geliştirilmiştir. Genel olarak, bu imalat yöntemlerinin hassas mekanik imalat, silikon temelli imalat ve polimer işleme teknolojilerine dayandığı söylenebilir. Ancak, mikro ölçekli imalatlarda istenen hassasiyet ve kaliteye ulaşabilmek için bu imalat tekniklerinde birtakım değişiklikler yapmak gerekir. Çoğu imalat yönteminde aynı prosesi kullanarak hem makro hem de mikro ölçekte istenen özelliklerde ürün elde etmek mümkün değildir. Bu çalışmada, farklı ısı transferi ve akış prosesinde kullanılmak üzere farklı imalat metotları ile elde edilen mikrokanallı ısı alıcıların boyut ve yüzey karakteristikleri karşılaştırılmıştır. Mikrokanallı ısı alıcılar, litografi, hassas mekanik işleme, lazer tabanlı imalat yöntemleri, elektroerozyonla işleme yöntemleri kullanılarak üretilmişlerdir. Elde edilen mikrokanalların metrolojik işlemleri optik mikroskop ve optik profilometre ile yapılmıştır. İmalat yöntemleri, her bir mikrokanal için aynı imalat toleransının yakalanabilmesi, mikrokanalların dikdörtgen kesitli profile sahip olması, mikrokanal tabanında radyüs oluşumu, yüzey pürüzlülük değerinin kontrol edilebilmesi ve yüzeyin homojen bir pürüzlülük dağılımına sahip olması açısından değerlendirilmiştir. Bu kriterleri en iyi sağlayan yöntemin dalma elektroerozyonla üretilen mikrokanallı ısı alıcılar olduğu görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Mikro imalat yöntemleri, mikrokanal, yüzey karakterizasyonu

### Metrological Characterization of Microchannels Obtained by Different Fabrication Methods

**ABSTRACT:** Advances in microfabrication technologies have enabled the production of high precision, low cost and high performance micro systems. Microchannels are widely used in microfluidic and nanofluidic applications, such as microelectromechanical, chemical and biological devices, as one of the basic components of micro systems. Various microfabrication methods have been developed depending on the material of microchannels, dimensional accuracy, surface structure, desired mechanical and thermal properties. In general, it can be said that these production methods are based on precision mechanical manufacturing, silicon-based fabrication and polymer processing technologies. However, in order to achieve the desired precision and quality in micro-scale productions, it is necessary to make some changes in these manufacturing techniques. It is not possible to obtain products with the desired properties in both macro and micro scale by using the same process in most fabrication methods. In this study, the size and surface characteristics of microchannel heat sinks obtained with different manufacturing techniques for use in heat transfer and flow process were compared. Microchannel heat sinks are manufactured using lithography, precision mechanical processing, laser-based production methods, electro-erosion processing methods. Metrological characterization of the microchannels obtained were made with an optical microscope and an optical profilometer. The microfabrication methods used have been evaluated in terms of achieving the same production tolerance for each microchannel, having micro-channels rectangular profile, radius formation at the microchannel base, controlling the surface roughness value and having a homogeneous roughness distribution of the surface. It has been observed that the method that best meets these criteria is microchannel heat sinks manufactured by sinking electro-erosion technique.

**Keywords:** Microfabrication methods, microchannel, surface characterization

<sup>1</sup>İbrahim ATEŞ (Orcid ID: 0000-0002-9644-9667), Eyüphan MANAY (Orcid ID: 0000-0002-5456-8756), Erzurum Teknik Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Makine Mühendisliği Bölümü, Erzurum, Türkiye

<sup>2</sup> Bayram ŞAHİN (Orcid ID: 0000-0002-7016-644X), Yıldız Teknik Üniversitesi, Makine Fakültesi, Makine Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

**\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** İbrahim ATEŞ, e-mail: ibrahim.ates@erzurum.edu.tr.

Bu çalışma İbrahim ATEŞ'in Doktora tezinden üretilmiştir.

## GİRİŞ

Nobel ödüllü ünlü fizikçi Richard Feynman 1959 yılında yaptığı “There is Plenty of Room at the Bottom” adlı konuşmasında mikro/nano ölçekte imalat ve ölçüm yöntemlerinin geliştirilmesiyle minyatürize edilmiş yapıların üretilip karakterize edilebileceğini ve bunun birçok yeni keşiflere ve teknolojik gelişmelere yol açabileceğini iddia etmiştir (Feynman, 1992). Takip eden yıllarda, malzeme ve imalat teknolojisindeki hızlı ilerlemelerle birlikte 1981’de taramalı tünelleme mikroskobu ve 1989’da atomsal kuvvet mikroskobunun geliştirilmesi özellikle elektromekanik ve elektronik sistemlerin gittikçe küçülen boyutlarda üretilebilmesini hızlandırmıştır. Günümüzde, minyatürleşme eğilimi bilgisayar ve cep telefonu gibi elektronik cihazlarda açık bir şekilde görülmektedir. Elektronik cihazların hem küçülmesi hem de fonksiyonlarının artması söz konusu cihazların birim hacmi başına düşen işlev sayısının üssel olarak artmasına neden olmuştur.

Mikro elektro-mekanik sistemler (MEMS) üzerine daha fazla transistör yerleştirmek sistem performansını genellikle artırır. Diğer yandan, ilave edilen her bir transistör daha fazla ısı üretimine neden olur. Bilgisayar çiplerinde ortalama ısı akısının 2-4.5 MWm<sup>-2</sup>’ye ulaşması beklenirken yerel kızgın noktalarda bu değer 12-45 MWm<sup>-2</sup> olması öngörülmektedir (Karayiannis ve Mahmoud, 2017). Füzyon reaktörleri, lazer diodları, radar cihazları ve askeri avionik sistemler gibi uygulamalarda 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> MWm<sup>-2</sup> mertebesinde çok yüksek ısı akısı değerlerine ulaşılacağı rapor edilmiştir (Kadam ve Kumar, 2014). Günden güne daha kompakt hale gelen modern elektronik sistemlerden olan ısı üretiminin artmaya devam etmesi daha yüksek ısı akılarında ısı atımı ihtiyacına yol açmıştır.

MEMS’lerin küçük yapıda olması nedeniyle yüksek ısı akılarına maruz kalmaları, performans kaybı oluşmadan çalışması için cihazda minimum sıcaklık gradyeninin sağlanması gerekliliği ve güvenli bir maksimum çalışma sıcaklığının altında tutulma zorunluluğu yeni ısıl yönetim sistemlerinin geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir. MEMS’lerde gelişmiş soğutma teknolojilerine olan bu ihtiyaç, sürekli olarak yeni soğutma tekniklerinin araştırılmasını teşvik etmiştir. Bu noktada, mikrokanallı ısı alıcılar yüksek ısı atımı potansiyeline sahip etkili yöntemlerden biri olarak görülmektedir. Mikrokanallı ısı alıcı basitçe bir plaka veya alttaş üzerine açılmış ve kanatçıklarla birbirinden ayrılmış paralel küçük kanallardan oluşan bir mikro ısı değiştirici olarak düşünülebilir. Mikro ısıl sistemler çok yüksek yüzey alan/hacim oranına sahip olmaları, yüksek hızda momentum, ısı ve kütle aktarımını gerçekleştirebilmeleri, hafif olmaları, daha az yer kaplamaları, daha az soğutucu akışkan gerektirmeleri gibi birçok üstünlüğü bünyesinde barındırdığından yüksek performanslı ısıl yönetim sistemi olarak gelecek vadetmektedir.

Mikrokanallar, mikroelektronik, MEMS, kimyasal ve biyolojik cihazlar gibi mikro ve nano akışkan uygulamalarının yaygın olduğu sistemlerin temel bileşenlerinden biridirler. Temel olarak, üretilecek parçaların malzemesine, boyutsal imalat hassasiyetine, yüzey yapısına, istenen mekanik ve termal özelliklerine bağlı olarak çeşitli imalat yöntemleri geliştirilmiştir. Diğer yandan, mikro ölçekli imalatlarda istenen hassasiyet ve kaliteye ulaşabilmek için konvansiyonel imalat tekniklerinde birtakım değişiklikler yapmak gerekir. Çünkü çoğu imalat metodunda aynı prosesi kullanarak hem makro hem de mikro ölçekte istenen özelliklerde ürün elde etmek mümkün değildir (Kockman, 2013).

Mevcut literatür incelendiğinde farklı imalat metotları ile üretilen, ısı ve akış proseslerinde kullanılan mikrokanallı ısı alıcıların metrolojik özelliklerinin karşılaştırılması ile ilgili bir çalışma yazarların bilgisi dahilinde mevcut değildir. Bu çalışmada, farklı imalat metotları ile mikrokanallı ısı alıcı imalatını ve yüzey pürüzlendirme işlemi yapılarak, bu imalat tekniklerinin üstünlükleri ve zayıf noktaları tespit edilmiştir. Mikrokanallı ısı alıcılar, litografi, hassas mekanik işleme, lazer tabanlı imalat yöntemleri, elektroerozyonla işleme yöntemleri kullanılarak üretilmiştir. Elde edilen mikrokanalların

metrolojik işlemleri optik mikroskop ve optik profilometre ile yapılmıştır. İmalat yöntemleri, her bir mikrokanal için aynı imalat toleransının yakalanabilmesi, mikrokanalların dikdörtgen kesitli profile sahip olması, mikrokanal tabanında radyüs oluşumu, yüzey pürüzlülük değerinin kontrol edilebilmesi ve yüzeyin homojen bir pürüzlülük dağılımına sahip olması açısından değerlendirilmiştir. Böylelikle, mikrokanallı ısı alıcı üretimi için kullanılan imalat tekniklerinin değerlendirmesi açısından geniş veri tabanı sunulmuş ve literatüre önemli bir katkı yapılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Bu çalışma için ilk olarak farklı mikro imalat metotları ile mikrokanallı ısı alıcı numuneleri üretilmiştir. Daha sonra, üretilen mikrokanalların boyut ve pürüzlülükle ilgili karakterizasyonu Erzurum Teknik Üniversitesi Yüksek Teknolojiler Araştırma Merkezi laboratuvarlarında bulunan Bruker marka Contour GTK 3D optik profilometre ve Carl Zeiss marka optik mikroskop kullanılarak yapılmıştır.

### Litografi

Litografi, mikrokanal imalatında yaygın olarak kullanılan başlıca imalat metotlarından biridir. Litografi temelde, bir maske üzerindeki geometrik desenin fotorezist adı verilen ışığa duyarlı bir polimer malzeme ile kaplanmış silikon gibi yarı iletken bir alttaş üzerine aktarılması işlemidir. Uygulamada farklı tipte litografi yöntemleri bulunmakla birlikte mikrokanal imalatında yaygın olanı fotolitografi yöntemidir. Fotolitografi ile alttaş üzerine aktarılan geometrik desen eklemeli (örneğin biriktirme ve lift-off işlemi) veya çıkarmalı (örneğin aşındırma işlemi) mikro imalat işlemine tabi tutularak istenen ölçü ve biçimde nihai ürün elde edilmiş olur. Fotolitografi yöntemi hakkında daha detaylı bilgiler muhtelif kaynaklarda bulunabilir (Campell, 2008; Mack, 2008; Madou, 2011; Luttge 2016).

### Aşındırma

Aşındırma prosesi, yaygın olarak kullanılan çıkarmalı mikro imalat yöntemlerindedir. Aşındırma, bir alttaş üzerindeki malzemenin kimyasal veya fiziksel yollarla uzaklaştırılması ile istenen yapının elde edilmesidir. Islak ve kuru olmak üzere aşındırma prosesi iki kategoriye ayrılabilir. Kimyasal aşındırma olarak ta bilinen ıslak aşındırma prosesinde, yüzey üzerinden malzeme kaldırma işlemi potasyum hidroksit, tetra metil amonyum hidroksit gibi kimyasal aşındırıcı sıvı solüsyonlar ile gerçekleştirilir. Literatürde uygulamaya bağlı olarak kimyasal aşındırma için birçok reçete bulmak mümkündür (Anonim, 2003). Fiziksel aşındırma olarak ta bilinen kuru aşındırma yönteminde malzeme kaldırma işlemi plazma halindeki muhtelif gazların yüzey üzerine bombardıman yapılmasıyla elde edilir. Her iki yöntemde izotropik ve anizotropik biçimde aşındırma yapmak mümkündür. İzotropik aşındırmada, aşındırma hızı yönden bağımsız olup bütün yönlerde aynı oranda malzeme kaldırma işlemi gerçekleşir. Bu yöntemle yuvarlak profile sahip şekiller elde edilir. İzotropik ve ıslak anizotropik aşındırma teknikleri ile birbirine paralel olmayan yan yüzeyler elde edilirken kuru anizotropik aşındırma temelli yöntemler ile birbirine paralel dik yüzeyler elde etmek çoğu malzeme için mümkündür.

### Mikro Mekanik İşleme

Temelde mekanik imalat yöntemlerini, frezeleme, tornalama, delme ve taşlama olarak dört sınıfa ayırabiliriz. Bu yöntemlere ait mikro işleme teknolojisindeki makineler geleneksel makro boyuttaki mekanik işlemede kullanılan makinelerin küçültülmüş versiyonu olarak düşünülebilir. Ancak makro boyuttaki mekanik işleme ile mikro boyuttaki mekanik işleme yöntemleri talaş oluşumu, kesme kuvvetleri, takım geometrisi, titreşim, proses kararlılığı gibi konularda temel farklılıklara sahiptir (Liu et al. 2004). Mikro mekanik işleme, yarı iletken temelli üretim yöntemlerine göre, alüminyum, çelik, pirinç, bakır, polimer gibi çok farklı malzemelerden üretime izin vermesine karşın, işleme sürecini



etkileyen parametreler ve imalat sırasında karşılaşılan problemler ve çözümlerine yönelik çalışmalar diğer mikro imalat yöntemlerine göre oldukça azdır (Madou, 2011).

### **Lazerli Mikro İmalat**

İlk olarak 1970'li yıllarda imalat teknolojisinde uygulanmaya başlanan lazerli işleme günümüzde birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Neredeyse bütün malzemeler için uygun olması, karmaşık mikro yapıların kalıp veya maske gerektirmeden direkt üretilebilmesi, işleme süresinin kısa ve ekonomik olması, seri üretime uygunluğu lazer-tabanlı imalat tekniklerinin yaygınlaşmasında önemli rol oynamıştır. Lazer ile uzaklaştırma yöntemi, yüksek enerjili lazer ışın demetinin iş parçası üzerine odaklanması ve bu ışın demetini oluşturan fotonların iş parçası tarafından emilmesi sonucu ısınan bölgenin buharlaşması veya süblimleşmesi ile malzeme kaldırma işlemidir. Dolayısıyla, bu yöntemde malzeme kaldırma işlemi, litografi, aşındırma ve mikro mekanik işlemeden farklı olarak ısı enerjisi etkisiyle gerçekleşmektedir.

### **Seçici Lazer Sinterleme/Ergitme**

Seçici lazer sinterleme/ergitme yöntemleri, temelde hızlı prototipleme ihtiyacını karşılamak için geliştirilen eklemeli imalat yöntemlerindedir. 1990'lı yıllarda hızlı prototipleme yöntemlerindeki gelişmelerle birlikte bu yöntemler nihai, fonksiyonel parçaların imalatında da kullanılmaya başlanmıştır (Duman ve Kayacan, 2017). 1989 yılında Dr. Carl Deckard tarafından geliştirilen ve patenti alınan Seçici Lazer Sinterleme işlemi, esas olarak, toz halindeki malzemelerin yüksek enerjili lazerler ile ısıtılması sonucu birbiriyle birleşmesi esasına dayanan katmalı imalat tekniğidir. Bu yöntemde, çelik, titanyum, kalay, krom, poliamid, seramik malzemeler, elastomerler, polikarbonatlar gibi çok çeşitli malzemeler işlenebilir.

Seçici lazer sinterleme ile aynı konseptte sahip, direk metal lazer sinterleme veya seçici lazerli ergitme yönteminde ise toz malzemelerin birleşmesi için lazerle sinterleme yerine tamamen ergitme yapılır. Bu yöntem, 1990'lı yılların ikinci yarısında F&S Streolithographietechnik GmbH firmasından Dr. M. Fockele ve Dr. D. Schwarze ve Fraunhofer ILT şirketinden Dr. W. Meiners, Dr. K. Wissenbach ve Dr. G. Andres tarafından metal parçaların üretilmesi için geliştirilmiştir. Seçici lazerli ergitme yöntemi ile ilgili kapsamlı bir literatür taraması Yap ve ark. (2015) tarafından yapılmıştır.

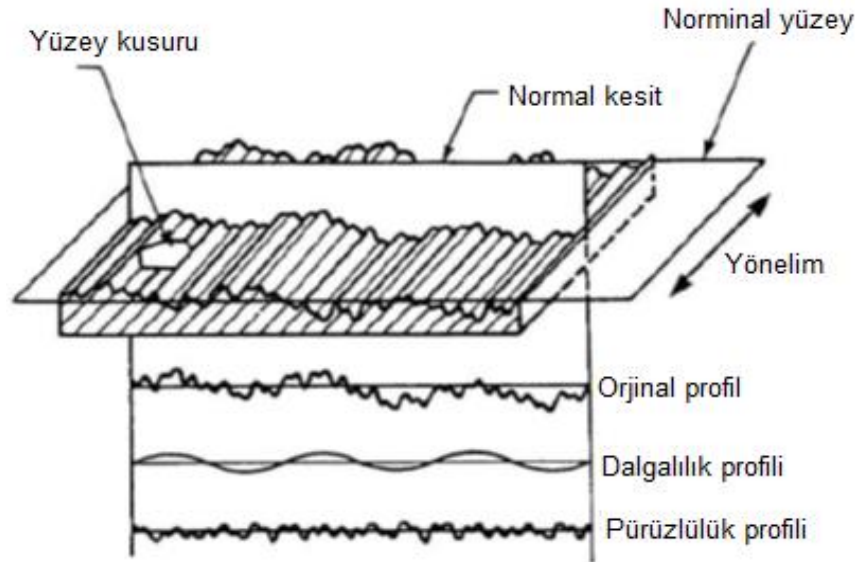
### **Elektroerozyonla İşleme Yöntemi**

Geleneksel olmayan imalat yöntemlerinin ilklerinden biri olan elektro erozyonla işleme yöntemi, dielektrik sıvı ortam içerisinde elektrot ve elektriksel olarak iletken iş parçası arasında oluşturulan kontrollü, yüksek frekanslı kıvılcımlar sonucu açığa çıkan ısı enerjisi ile malzeme kaldırma işlemidir.

İmalat teknolojisinde yaygın olarak kullanılan iki tip elektro erozyonla işleme yöntemi vardır. Bunlar, dalma elektro erozyonla işleme ve tel elektro erozyonla işleme yöntemleridir. İki yöntemde de elektriksel erozyon ile malzeme kaldırma gerçekleşmesine rağmen çalışma şekli ve kullanım yerleri açısından farklılar vardır. Dalma elektro erozyonla işleme yöntemi ilk geliştirilen yöntem olup geleneksel elektro erozyonla işleme yöntemi olarak ta bilinir. Tel elektro erozyonla işleme yöntemi, 1960-1970'li yıllarda, dalma elektro erozyonda kullanılan elektrotların daha az işçilik gerektiren ve maliyeti düşük elektrotlarla değiştirilmesine yönelik çalışmalar sonucu ortaya çıkmıştır (Markopoulos ve Davim, 2018). Tel elektro erozyonla işleme yönteminde, dalma elektro erozyondaki gibi takım, elektrot şeklinin iş parçasına izdüşümü söz konusu değildir. Dalma elektro erozyon yöntemi ile üç boyutlu karmaşık şekilli geometrilerin imalatı ve kör deliklerin açılması mümkündür. Tel elektro erozyonla işleme yönteminde ise iş parçasının tüm kesiti boyunca olan profillerin oluşturulması için uygundur (Kocabaş, 2013).

## Yüzey karakteristikleri

Yüzey yapısı veya tekstürü, nominal yüzeyden olan tekrarlayan ve rastlantısal sapmalar sonucu yüzeyin sahip olduğu üç boyutlu topografya olarak tanımlanabilir. Nominal veya ideal yüzey tasarlanan yüzey biçimi olup boyutları teknik resimde ölçülerle gösterilen yüzeylerdir. Gerçek yüzeyler ise, malzemenin sınırlarını içerirler ve yüzey yapısı hakkında bilgi verirler (Inamdar, 2006). Yüzey yapısındaki sapmaları karakterize eden başlıca fiziksel parametreler, pürüzlülük (nano ve mikro pürüzlülük), dalgalılık (makro pürüzlülük), yönelim (desen yönü) ve hata olarak sıralanabilir (Şekil 1).



Şekil 1. Yüzey yapısı karakteristikleri (Bhushan 2001).

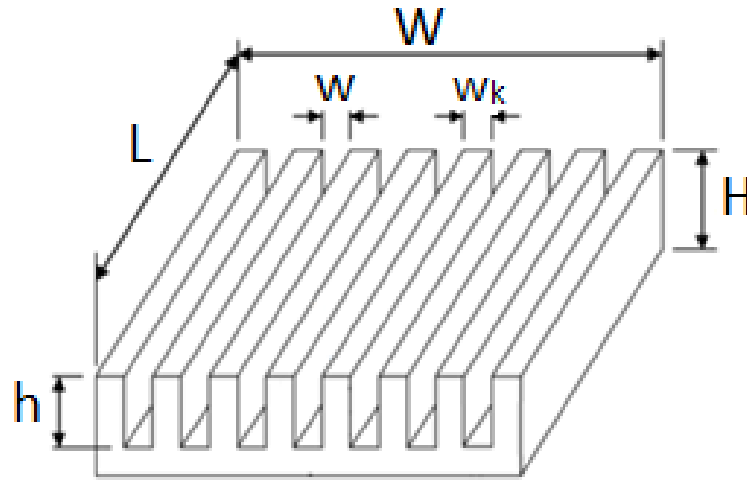
Farklı tipteki sapmalar birbirinden dalga boyu ile ayrılır. Pürüzlülük yüzeydeki kısa dalga boylu mikro/nano ölçekli dalgalanmaları gösterir. Yüzey üzerinde farklı büyüklük ve aralıklarla bulunan yükseltmeler ve vadiler pürüzlülüğe ait temel karakteristik yapılardır. Dalgalılık ise daha uzun dalga boylu yüzey düzensizlikleri olup makro pürüzlülük olarak ta adlandırılır. Makine veya iş parçasındaki bir hata, titreşimler, ısı işlem, çarpılma gibi etkenlerden kaynaklanabilir. Yönelim, imalat sürecine özgü baskın yüzey deseninin yönünü ifade eder. Hatalar, yüzeydeki istenmeyen, beklenmedik yapılardır. Bunların haricinde, yüzeyde normalden çok büyük dalga boylu sapmaların olduğu form hataları da görülebilir (Bhushan, 2001).

Gerçek yüzeyler çok karmaşık olduğundan yüzeyin özelliklerini tanımlayan çok çeşitli pürüzlülük parametresi vardır. Uygulamaya bağlı olarak bazı parametreler önem kazanabilir. Karakterizasyonda kullanılan pürüzlülük parametre sayısı arttıkça yüzey hakkında daha fazla bilgi edinilmiş olunur. Yüzey pürüzlülük parametreleri; genlik parametreleri, uzaklık parametreleri ve hibrit parametreler olmak üzere genel olarak üç kategoride incelenebilir (Gadelmawla ve ark., 2002). Genlik parametreleri, yüzeyin düşey yöndeki yüzey sapmalarını tanımlarken uzaklık parametreleri ise yatay yöndeki sapmaları tanımlar. Hibrit parametreler ise, genlik ve uzaklık parametrelerinin birleşimi olup triboloji gibi farklı mühendislik uygulamalarında yüzeyi karakterize etmede kullanılır.

## Mikrokanalların yüzey pürüzlülüğü

Çizelge 1'de, deneylerde kullanılan mikrokanallı ısı alıcıların boyutlarını göstermektedir. Bu çalışmada kullanılan mikrokanallı ısı alıcılarda, imalat prosesi sonrası yüzeylerinde ortalama pürüzlülük değeri ( $R_a$ ) 1  $\mu\text{m}$ -3  $\mu\text{m}$  aralığında olacak şekilde random pürüzlülük elde edilmiştir.

Çizelge 1. Deneyleerde kullanılan mikrokanallı ısı alıcılarının ölçüleri.



## ÖLÇÜLER

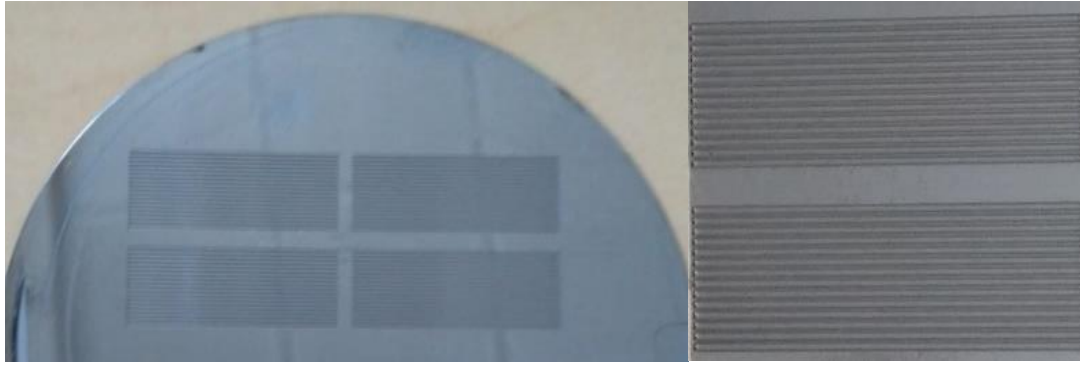
| No | Isı alıcı genişliği, $W$ (mm) | Isı alıcı uzunluğu, $L$ (mm) | Isı alıcı kalınlığı, $H$ (mm) | Mikrokanal genişliği, $w$ ( $\mu\text{m}$ ) | Mikrokanal yüksekliği, $h$ ( $\mu\text{m}$ ) | Hidrolik çap, $D_h$ ( $\mu\text{m}$ ) |
|----|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|---|--|---------------------------------------|
| 1  | 12                            | 30                           | 2,3                           | 300   | 450  | 360                                   |
| 2  | 12                            | 30                           | 2,3                           | 500   | 450  | 473                                   |
| 3  | 12                            | 30                           | 2,3                           | 700   | 450  | 547                                   |

## BULGULAR VE TARTIŞMA

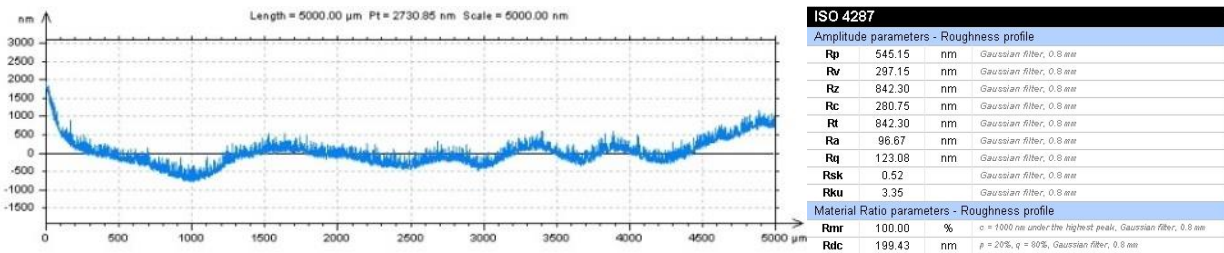
## Mikrokanallı ısı alıcılarının karakterizasyonu

Üretilen mikrokanallı ısı alıcıların boyut ve yüzey karakterizasyonu Bruker marka Contour GTK 3D optik profilometre ve Carl Zeiss marka optik mikroskop yardımıyla yapılmıştır. Mikrokanal tabanındaki yüzey pürüzlülük değerleri optik profilometre ile ölçülmüştür. Her bir mikrokanalın başlangıç, orta ve son bölgelerinden olmak üzere üç farklı noktadan yüzey pürüzlülük ölçümleri yapılmış olup, elde edilen değerlerin ortalaması mikrokanalın pürüzlülük değeri olarak belirlenmiştir. Bir ısı alıcıdaki bütün mikrokanalların yüzey pürüzlülük ölçüm değerlerinin ortalaması söz konusu ısı alıcının yüzey pürüzlülük değeri olarak alınmıştır. Mikrokanalların genişlik ve yükseklik ölçümleri optik mikroskopla karakterize edilmiştir. Optik mikroskopta ayrıca, mikrokanalların yan yüzeylerinin dikliği ve mikrokanal tabanındaki köşelerin yapısı kontrol edilmiştir.

Bu kısımda farklı imalat yöntemleri ile elde edilen mikrokanalların boyut ve yüzey karakterizasyonu sonuçları sunulmuştur. İlk olarak Sabancı Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde Şekil 2'de gösterildiği gibi silikon alttaş üzerine fotolitografi yöntemiyle değişik boyutlarda mikrokanallar açılmıştır. Kanalların yüzey pürüzlülük ölçümleri KLA-TENSOR P6 profilometre ile yapılmıştır. Örnek yüzey pürüzlülük ölçüm sonuçları Şekil 3'te verilmiştir. Mikrokanalların ortalama yüzey pürüzlülük değerlerinin 0,1 mikronun altında olduğu görülmüştür. Oldukça pürüzsüz olan yüzeylerde pürüzlülük oluşturmak için Oxford PlasmaLab System 100 ICP 300 Deep RIE cihazında kuru aşındırma (etching) işlemi uygulanmıştır. Fiziksel aşındırma olarak ta bilinen bu yöntemde malzeme kaldırma işlemi plazma halindeki muhtelif gazların yüzey üzerine bombardıman yapılmasıyla elde edilmektedir. Cihaz üzerinde, çalışma parametreleri olan gaz cinsi, debi, basınç sıcaklık, RF, aşındırma süresi değiştirilerek farklı aşındırma reçeteleri uygulanmıştır. Bu işlemler sonunda yüzey pürüzlülüğünde kayda değer bir değişim görülmemiştir.



Şekil 2. Fotolitografi yöntemiyle silikon üzerine açılan mikrokanallar.

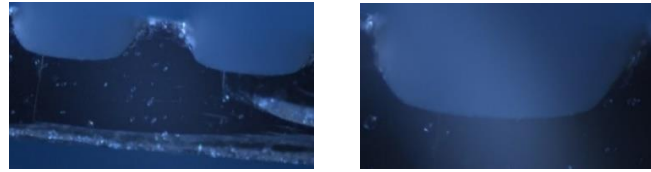
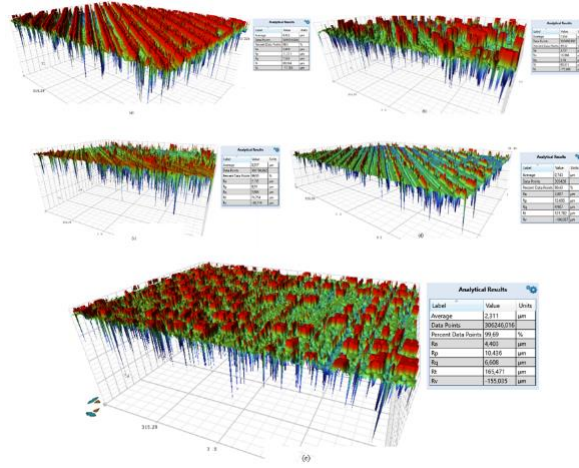


Şekil 3. Fotolitografi yöntemiyle oluşturulan mikrokanallara ait yüzey pürüzlülük ölçümü.

Bu yöntem alternatif olarak, ıslak aşındırma yöntemiyle pürüzlülük elde edilmeye çalışılmıştır. Kimyasal aşındırma olarak ta bilinen ıslak aşındırma prosesinde, yüzey üzerinden malzeme kaldırma işlemi potasyum hidroksit, tetra metil amonyum hidroksit gibi kimyasal aşındırıcı sıvı solüsyonlar ile gerçekleştirilir. Pürüzlendirme sağlamak için silikon mikrokanallar 70°C'deki saf su, amonyum hidroksit ve hidrojen peroksit karışımının 5:1:1 hacimsel oranındaki kimyasal çözeltisi içine atılmıştır. Bu yöntemde de istenen pürüzlülük değerleri elde edilememiştir. Bu yöntemin ayrıca dezavantajı kanalın bütün yüzeylerinden aşındırma yapmasıdır ki bu da kanal boyutlarının değişmesi anlamına gelmektedir. Bu yüzden, literatürde uygulamaya bağlı olarak kimyasal aşındırma için birçok reçete bulunmasına rağmen bu yöntemle daha fazla pürüzlendirme yapılmamıştır.

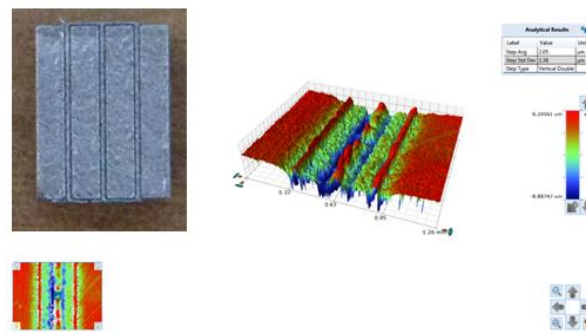
Fotolitografi ile üretilen silikon mikrokanalların pürüzlendirilmesi için kuru ve ıslak aşındırmadan başka farklı metotlar da denenmiştir. İlk olarak, Conceptlaser marka 3D metal yazıcıda kanalların pürüzlendirme denemeleri yapılmıştır. Bunun için farklı lazer atım konfigürasyonuna bağlı olarak silikon alttaş üzerinde farklı yüzey pürüzlülüklerinin oluşturulması hedeflenmiştir. Elde edilen pürüzlülük sonuçları Şekil 4'te gösterilmiştir. Bu yöntemde, 2-6 µm aralığında olacak şekilde yüzey pürüzlülük artışı sağlansa da Şekil 4'ten görüleceği gibi homojen olmayan bir yüzey yapısı elde edilmiştir. Homojen olmayan bir yüzey yapısı deneysel verileri etkileyip sonuçların yanlış olarak değerlendirilmesine yol açacağından bu yöntemle pürüzlendirme işleminden vazgeçilmiştir. Ayrıca, 3D yazıcıda parça sabitleme işlemi yapılamadığından kanalların üretilip sonradan sadece kanalların içine isabet edecek şekilde lazer gönderimi oldukça zor gözükmemektedir.

Litografi yönteminin bir diğer dezavantajı, elde edilen kanalların dikdörtgen yerine trapez veya oval kesite sahip olmasıdır. Şekil 5'de kanalların optik mikroskop ile elde edilen kesit görüntüleri verilmiştir. Bu durum, kaynama karakteristiklerini etkileyeceğinden litografi ile mikrokanallı ısı alıcı imalatı bu çalışma için uygun gözükmemektedir.



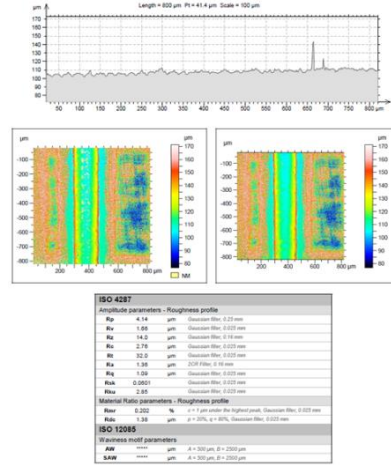
Şekil 5. Fotolitografi ile üretilen silikon mikrokanalların optik mikroskopta alınan profil görüntüleri.

İstenen özelliklerde mikrokanallar elde etmek için kullanılan yöntemlerden biri de Seçici Lazerli Ergitme yöntemi olmuştur. Bu amaçla, ConceptLaser marka üç boyutlu metal yazıcıda, 0,3 mm genişliğinde ve 0,45 mm derinliğinde paslanmaz çelik malzemeden üç adet mikrokanal imalatı yapılmıştır. Toz çapı 25-100 mikrometre arasında değişmektedir. Elde edilen parça ve optik profilometre ölçümleri Şekil 6'da gösterilmiştir. Optik profilometre görüntüleri incelendiğinde efektif bir kanal yapısının, özellikle de kanal derinliğinin oluşmadığı görülmektedir. Diğer yandan, tam olarak ergimeyen tozlar kanalın ortasında birikerek iki bölmeli bir kanal oluşumuna neden olmuştur. Kanal boyutlarının küçük olması bu tür sonuçlara yol açmış olabilir.



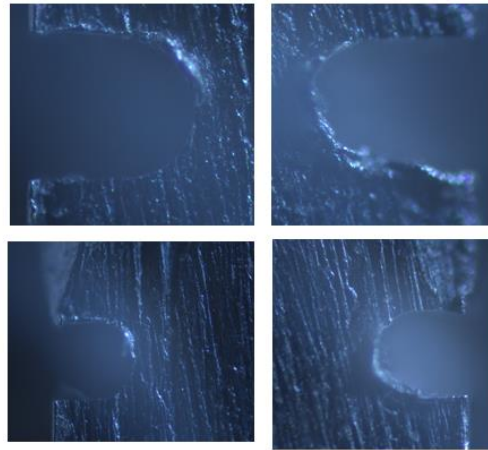
Mikrokanallı ısı alıcı imalat denemelerinde kullanılan yöntemlerden bir diğeri de mikro (ultra hassas) frezeleme yöntemi olmuştur. Mikro CNC frezeleme makinesinde, farklı işleme parametreleriyle alüminyum malzeme üzerine on adet mikrokanal açtırılmıştır. Böylelikle, işlem parametrelerini değiştirerek farklı yüzey pürüzlülük değerlerinin elde edilmesi amaçlanmıştır. Örnek bir yüzey ölçüm görüntüsü Şekil 7'de verilmiştir. Pürüzlülük ölçümleri sonucu üretilen mikrokanallardaki pürüzlülüğün

1  $\mu\text{m}$ -7  $\mu\text{m}$  aralığında olduğu görülmüştür. Ancak bazı kanallardaki ölçümlerde pürüzlülük değerlerinde 2 mikrometreyi aşan farklılıklar olduğu görülmüştür.



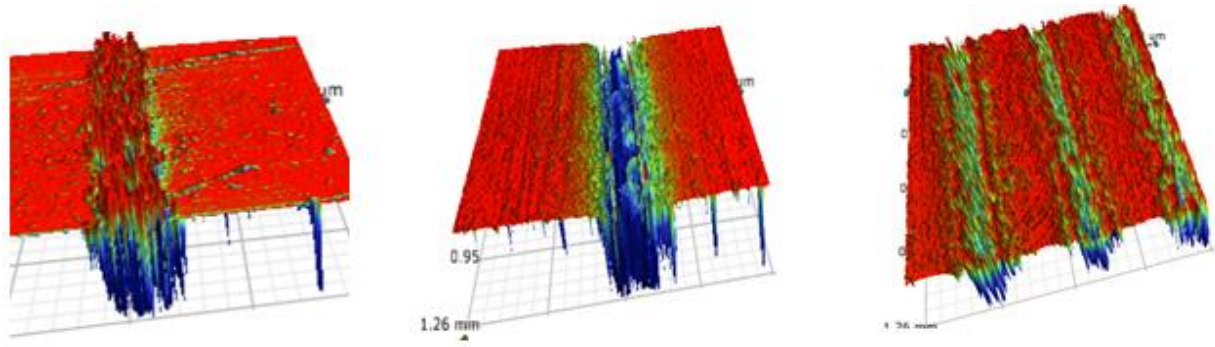
Şekil 7. Mikro frezeleme ile üretilen mikrokanallara ait örnek yüzey pürüzlülük ölçümü.

Diğer yandan, optik mikroskopla elde edilen kesit yapısı incelemelerinde ise Şekil 8’de gösterildiği gibi üretilen kanalların neredeyse yarı dairesel kesite sahip olup dikdörtgen yapıdan uzak olduğu görülmüştür. Ayrıca kanalların giriş ve çıkışlarında çapakların oluştuğu gözlenmiştir. Bu problemlerle birlikte, farklı boyutlardaki mikrokanallarda benzer yüzey pürüzlülük değerlerinin elde edilmesindeki zorluklar mikro mekanik işleminin bu çalışma için uygun olmadığını göstermiştir.



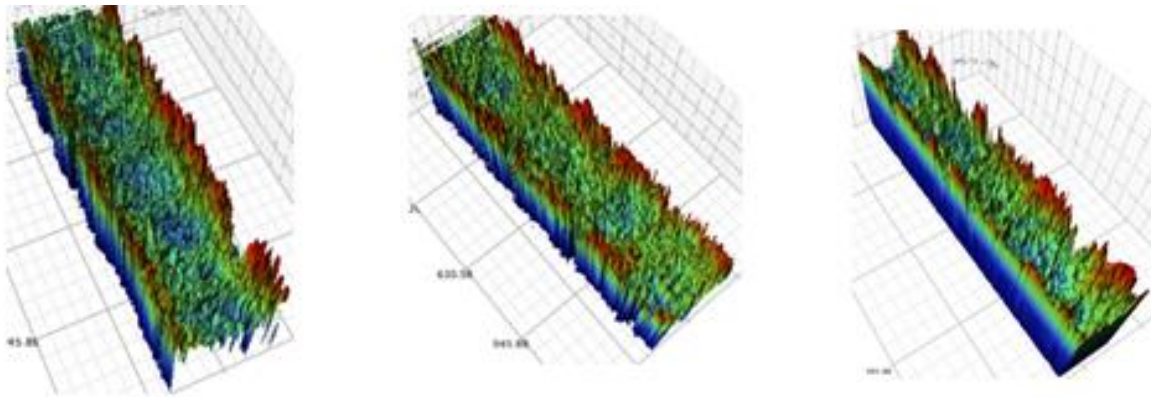
Şekil 8. Mikro frezeleme ile üretilen mikrokanalların kesit görüntüleri.

Mikrokanalların imalat yöntemleri ile ilgili literatür incelendiğinde mikro/nano/femto saniye lazerlerin bu amaçla kullanıldığı görülmektedir (Prakash ve Kumar 2015). Bu çalışma kapsamında, bakır, alüminyum ve paslanmaz çelik malzemeler üzerine nanosaniye mertebelerinde atım yapabilen lazerlerle farklı çalışma parametreleriyle (lazer gücü, frekansı, ilerleme hızı) muhtelif ölçüde mikrokanal açma denemeleri yapılmıştır. Şekil 9’da kanalların optik profilometre ile alınmış görüntüleri verilmiştir. 3D metal yazıcı ile üretilen kanallardakine benzer problemlerle karşılaşmıştır. Optik profilometre görüntüleri incelendiğinde efektif bir kanal yapısının oluşmadığı görülmüştür.



Şekil 9. Nano saniye mertebeli lazerlerle üretilen mikrokanalların optik profilometre görüntüleri.

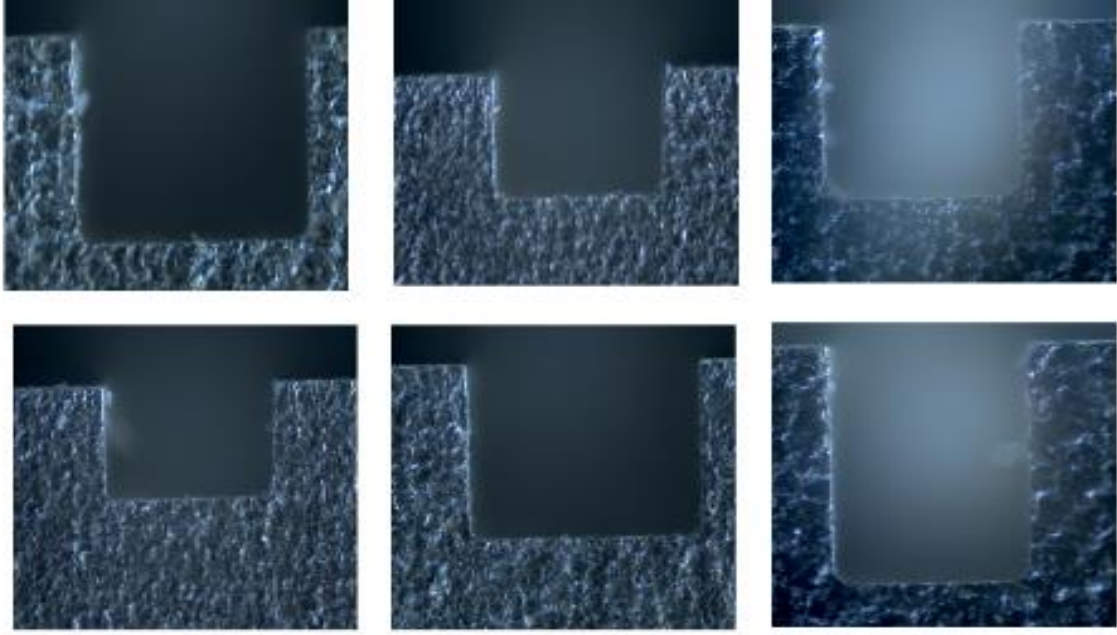
Bu çalışmada, elektro erozyonla mikrokanal imalatı ilk olarak tel elektro erozyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 10'da tel erozyonla elde edilen kanalların optik profilometre ile elde edilen yüzey yapısı gösterilmiştir. Bu yöntemde, daha önce bahsedilen yöntemlere nazaran homojen bir yüzey pürüzlülük dağılımı elde edilmiştir. Ancak, pürüzlülüğün nispeten yüksek değerlerde ( $5-12 \mu\text{m}$ ) olduğu görülmüştür. Bu durum, seçilen işleme parametrelerinden kaynaklanmış olabilir. Çünkü literatürde çok daha düşük pürüzlülük değerinin elde edildiği tel erozyon çalışmaları mevcuttur (Jones ve Garimella, 2009; Jafari ve ark., 2016). Kanal yan yüzeylerinin dik olduğu, ancak taban yüzeyiyle yan yüzeylerin birleşim köşelerinin yuvarlatılmış olduğu görülmüştür. Tel elektrotun belli bir çapa sahip olması köşelerde radyüs oluşmasına neden olmuştur. Benzer durum Jafari ve ark., (2016) tarafından da rapor edilmiştir.



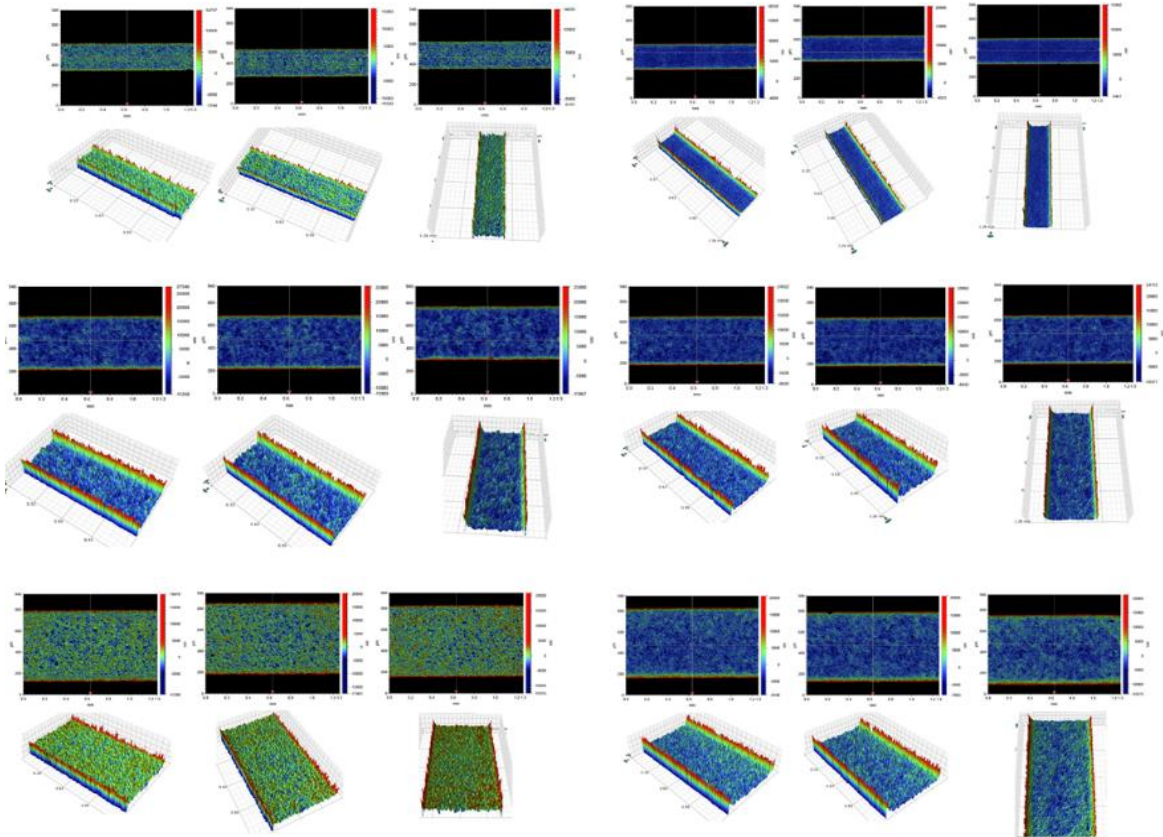
Şekil 10. Tel erozyon yöntemiyle üretilen mikokanallara ait örnek optik profilometre görüntüleri.

Tel elektro erozyonla üretilen mikrokanallar, homojen yüzey yapısına sahip olması ve kanal yan yüzeylerinin dik olması açısından üstünlüklere sahiptir. Ancak, yüzeylerin birleşme yerlerinin radyüslü olması tel çapından dolayı kaçınılmazdır. Tel elektro erozyon yönteminin diğer yöntemlere nazaran daha iyi sonuçlar vermesi endüstride tel erozyon kadar yaygın olmasa da özellikle kalıp imalatında tercih edilen, keskin köşelerin elde edilebileceği bir diğer elektro erozyon yöntemi olan dalma elektro erozyon ile mikrokanal imalatını ön plana çıkarmıştır. Bu amaçla, Ankara'da bulunan Hasemek firmasına, ilk olarak deneme amaçlı farklı ölçülerde ve yüzey pürüzlülük değerlerine 20 adet mikrokanal ürettirilmiştir. Üretilen mikrokanalların boyut ve yüzey karakterizasyonu optik profilometre ve optik mikroskop ile yapılmıştır. Şekil 12'de görüldüğü gibi üretilen mikrokanallar homojen bir pürüzlülüğe sahiptir. Yüzey pürüzlülük değerleri  $0.75 \mu\text{m}-3 \mu\text{m}$  aralığında olduğu görülmüştür. Aynı boyuttaki kanallarda farklı yüzey pürüzlülük değerleri elde edilmiştir. Aynı zamanda, farklı boyutlardaki kanallarda benzer yüzey pürüzlülük değerleri elde edilmiştir. Şekil 11'de kanalların optik mikroskoptan

alınmış kesit görüntüleri verilmiştir. Kanalların dikdörtgen bir profile sahip olduğu, köşelerde yok denecek kadar bir radyüs olduğu görülmüştür. Diğer imalat yöntemleri ile karşılaştırdığımızda en iyi profil bu metotla elde edilmiştir.



Şekil 11. Dalma erozyon yöntemiyle üretilen mikrokanalların örnek kesit görüntüleri.



Şekil 12. Dalma erozyonla üretilen mikrokanalların örnek optik profilometre görüntüleri.



Yukarıda ayrıntılarıyla verilen imalat denemeleri sonucu bu çalışma kapsamında mikrokanallı ısı alıcı imalatında kullanılan farklı imalat metotlarının karşılaştırması Çizelge 2’de verilmiştir. Sonuç olarak, en uygun yöntemin dalma elektro erozyon metodunun olduğu görülmüştür. Dalma elektro erozyon yöntemiyle, homojen yüzey yapısına sahip, boyutsal hassasiyeti yüksek, dikdörtgen kesit profilili 1 µm – 3 µm ortalama yüzey pürüzlülüğüne sahip mikrokanal imalatı gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 2.** Farklı imalat yöntemleri ile elde edilen mikrokanallı ısı alıcıların karşılaştırılması.

| İmalat Yöntemi         | Boyutsal hassasiyet | Homojen yüzey yapısı | Dik ve keskin köşeli profil | Yüzey pürüzlülüğünün kontrol edilebilirliği |
|------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------------|---|
| Litografi ve aşındırma | ✓                   | ✓                    | ✗                           | ✗   |
| Lazer temelli işleme   | ✗                   | ✗                    | ✗                           | ✗   |
| Mikro mekanik işleme   | ✓                   | ✗                    | ✗                           | ✗   |
| Tel erozyon            | ✓                   | ✓                    | ✗                           | ✓   |
| Dalma erozyon          | ✓                   | ✓                    | ✓                           | ✓   |

## SONUÇ

Bu çalışmada, akış kaynama prosesinde kullanılmak için farklı imalat metotları ile elde edilen mikrokanallı ısı alıcıların boyut ve yüzey karakteristikleri karşılaştırılmıştır. Mikrokanallı ısı alıcılar, litografi, hassas mekanik işleme, lazer tabanlı imalat yöntemleri, elektroerozyonla işleme yöntemleri kullanılarak üretilmişlerdir. Elde edilen mikrokanalların metrolojik işlemleri optik mikroskop ve optik profilometre ile yapılmıştır. İmalat yöntemleri, her bir mikrokanal için aynı imalat toleransının yakalanabilmesi, mikrokanalların dikdörtgen kesitli profile sahip olması, mikrokanal tabanında radyüs oluşumu, yüzey pürüzlülük değerinin kontrol edilebilmesi ve yüzeyin homojen bir pürüzlülük dağılımına sahip olması açısından değerlendirilmiştir. Bu kriterleri en iyi sağlayan yöntemin dalma elektroerozyonla üretilen mikrokanallı ısı alıcılar olduğu görülmüştür.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından “117M223” nolu proje ile desteklenmiştir.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Anonim, 2003. Wet-Chemical Etching and Cleaning of Silicon. Virginia Semiconductor, Web sitesi: [https://www.virginiasemi.com/?cont\\_uid=54](https://www.virginiasemi.com/?cont_uid=54), Erişim Tarihi: 03.10.2020.
- Bhushan B, 2001. Surface Roughness Analysis and Measurement Techniques. In: Modern Tribology Handbook, Bhushan B. (eds), CRC Press, 1, 49-119, USA.
- Campbell SE, 2008. Fabrication Engineering at the Micro- and Nanoscale. Oxford University Press, New York.
- Duman B, Kayacan MC, 2017. Doğrudan Metal Lazer Sinterleme/Ergitme Yöntemi ile Kanal Edilecek Parçanın Mekanik Özelliklerinin Tahmini. SDU Teknik Bilimler Dergisi, 7(1): 12-28.
- Feynman RP, 1992. There’s Plenty of Room at the Bottom [data storage]. Journal of Microelectromechanical Systems, 1(1): 60-66.

- Gadelmawla ES, Koura MM, Maksoud TMA, Elawa IM, Soliman HH, 2002. Roughness Parameters. *Journal of Material Processing Technology*, 123(1): 133-145.
- Inamdar KH, 2006. Some Studies on the Analysis of Surface Quality of Flat Metal Surfaces Using Image Processing Techniques. Doktora Tezi, Shivaji University, Kolhapur, India.
- Jafari R, Okuyucu-Özyurt T, Ünver HO, Bayer O. 2016. Experimental Investigation of the Flow Boiling of R134a in Microchannels. *Experimental Thermal and Fluid Sciences*, 79: 222-230.
- Jones BJ, Garimella SV, 2009. Surface Roughness Effect on Flow Boiling in Microchannels. *Journal of Thermal Science and Engineering Applications*, 1(4): 041007.
- Karayiannis TG, Mahmoud MM, 2017. Flow Boiling in Microchannels: Fundamentals and Applications. *Applied Thermal Engineering*, 115: 1372-1397.
- Kadam S, Kumar R, 2014. Twenty First Century Cooling Solution: Microchannel Heat Sinks. *International Journal of Thermal Sciences*, 85: 73-92.
- Kocabaş Ş, 2013. Elektroerozyonla İşlemede İşlem Parametrelerinin Malzeme Giderilmesi ve Yüzey Kalitesine Etkilerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Luttge R, 2016. Nano- and Microfabrication for Industrial and Biomedical Applications. Elsevier, Oxford.
- Mack C, 2008. Fundamental Principles of Optical Lithography. John Wiley&Sons, West Sussex.
- Madou MJ, 2011. Fundamentals of Microfabrication and Nanotechnology. CRC Press, Vol. 2, Florida.
- Markopoulos AP, Davim JP, 2018. Advanced Machining Processes: Innovative Modeling Techniques. Taylor & Francis, London.
- Prakash S, Kumar S, 2015. Fabrication of Microchannels: A Review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part B: Journal of Engineering Manufacturing*, 229(8): 1273-1288.
- Yap CY, Chua CK, Dong ZL, Liu ZH, Zhang DQ, Loh LE, Sing SL, 2015. Review of Selective Laser Melting: Materials and Applications. *Applied Physics Reviews*, 2(4): 041101.

**Atf İçin:** Değirmen N, Değirmen İ, 2021.  $A_{\{p_1, q_1\}^{\{p_2, q_2\}}(G, w)$  Uzayı ve Bazı Topolojik Özellikleri Üzerine. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1468-1480.

**To Cite:** Değirmen N, Değirmen İ, 2021. On the Space  $A_{\{p_1, q_1\}^{\{p_2, q_2\}}(G, w)$  and Some of Its Topological Properties. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1468-1480.

### $A_{\{p_1, q_1\}^{\{p_2, q_2\}}(G, w)$ Uzayı ve Bazı Topolojik Özellikleri Üzerine

Nilay DEĞİRMEN<sup>1\*</sup>, İbrahim DEĞİRMEN<sup>2</sup>

**ÖZET:**  $G$  ünimodüler yerel kompakt grup ve  $p = \min\{p_1, p_2\}$  olmak üzere  $w \in B_p$  olsun. Bu makalede,  $\|\cdot\|$  infimum normlu  $A_{\{p_1, q_1\}^{\{p_2, q_2\}}(G, w)$  uzayının bazı önemli topolojik özellikleri incelenmiştir. İlk olarak,  $A_{\{p_1, q_1\}^{\{p_2, q_2\}}(G, w)$  uzayının bir Banach uzayı olduğu ve ötelemeler altında invariant olduğu ispatlanmıştır. Ayrıca  $A_{\{p_1, q_1\}^{\{p_2, q_2\}}(G, w)$  uzayından  $A_{\{p_1, q_1\}^{\{p_2, q_2\}}(G, w)$  uzayına tanımlı  $h \rightarrow L_s h$  dönüşümünün lineer ve sınırlı olduğu gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Projektif tensör çarpımı, girişim operatörü, ağırlıklı Lorentz uzayı, Banach uzay

#### On the Space $A_{\{p_1, q_1\}^{\{p_2, q_2\}}(G, w)$ and Some of Its Topological Properties

**ABSTRACT:** Let  $G$  be a unimodular locally compact group and  $w \in B_p$  where  $p = \min\{p_1, p_2\}$ . In this paper, we examine some crucial topological properties of the space  $A_{\{p_1, q_1\}^{\{p_2, q_2\}}(G, w)$  endowed with the infimum norm  $\|\cdot\|$ . We first prove that  $A_{\{p_1, q_1\}^{\{p_2, q_2\}}(G, w)$  becomes a Banach space and invariant under translation. We also show that the mapping  $h \rightarrow L_s h$  is linear and bounded from  $A_{\{p_1, q_1\}^{\{p_2, q_2\}}(G, w)$  to  $A_{\{p_1, q_1\}^{\{p_2, q_2\}}(G, w)$ .

**Keywords:** Projective tensor product, convolution operator, weighted Lorentz space, Banach space

<sup>1</sup> Nilay DEĞİRMEN ([Orcid ID: 0000-0001-8192-8473](https://orcid.org/0000-0001-8192-8473)), Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Matematik Bölümü, Samsun, Türkiye

<sup>2</sup> İbrahim DEĞİRMEN ([Orcid ID: 0000-0001-5669-1881](https://orcid.org/0000-0001-5669-1881)), Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Matematik Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

\*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Nilay DEĞİRMEN, e-mail: nilay.sager@omu.edu.tr

## GİRİŞ

Avcı ve Gürkanlı (2007), Yap (1969) tarafından tanımlanan Lorentz uzaylarını kullanarak  $G$  yerel kompakt Abel grup olmak üzere bir  $A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G)$  uzayı ve bu uzay üzerinde bir norm tanımlamış, bu uzayın bir Banach uzay olduğunu ve sağladığı bazı temel topolojik sonuçları elde etmiştir. Ayrıca Avcı ve Gürkanlı (2007), aynı çalışmada  $L(p_1, q_1)(G)$  ve  $L(p_2, q_2)(G)$  Lorentz uzaylarının  $L^1(G)$  normuna göre projektif tensör çarpımı olan  $L(p_1, q_1)(G) \otimes_{L^1(G)} L(p_2, q_2)(G)$  uzayı ile  $A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G)$  uzayının izometrik izomorf olduğunu ispatlamıştır.

Li ve Sun (2012) ise, Carro, Raposo ve Soria (2007) tarafından tanımlanan ağırlıklı Lorentz uzaylarını kullanarak  $G$  ünimodüler yerel kompakt grup olmak üzere bazı özel  $w$  ağırlıkları için bir  $A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w)$  uzayı ve bu uzay üzerinde bir norm tanımlamış ve  $\Lambda_G^{p_1, q_1}(w)$  ve  $\Lambda_G^{p_2, q_2}(w)$  ağırlıklı Lorentz uzaylarının  $\Lambda_G^1(w)$  normuna göre projektif tensör çarpımı olan  $\Lambda_G^{p_1, q_1}(w) \otimes_{\Lambda_G^1(w)} \Lambda_G^{p_2, q_2}(w)$  uzayı ile  $A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w)$  uzayının izometrik izomorf olduğunu ispatlamıştır.

Ancak literatürde,  $A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w)$  uzayında temel topolojik özelliklerin incelenmediği saptanmıştır. Buradan yola çıkarak, bu çalışmada, Avcı ve Gürkanlı (2007) nin kullandığı yöntemlerle  $G$  ünimodüler yerel kompakt grup olmak üzere Li ve Sun (2007) tarafından tanımlanan  $A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w)$  uzayının Banach uzay olma, ötelemeler altında invaryantlık gibi bazı temel özelliklerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

## MATERYAL VE METOT

**Tanım 1.1**  $X, Y$  ve  $Z$  aynı  $F$  cismi üzerinde üç normlu lineer uzay olsun. Bir  $\phi: X \times Y \rightarrow Z$  dönüşümü verilsin. Eğer aşağıdaki özellikler sağlanırsa  $\phi$  dönüşümüne bilineer dönüşüm denir.

- i) Her  $y \in Y$  için  $x \rightarrow \phi(x, y)$  dönüşümü lineerdir.
- ii) Her  $x \in X$  için  $y \rightarrow \phi(x, y)$  dönüşümü lineerdir.

Eğer her  $x \in X$  ve her  $y \in Y$  için  $\|\phi(x, y)\| \leq M \|x\| \|y\|$  olacak şekilde pozitif bir  $M$  sayısı varsa  $\phi$  bilineer dönüşümüne sınırlıdır denir.  $\phi$  dönüşümünün normu;  $\|\phi\| = \sup \{\|\phi(x, y)\| : \|x\| \leq 1, \|y\| \leq 1\}$  ile tanımlanır (Bonsall ve Duncan, 1973).

**Tanım 1.2**  $X$  ve  $Y$ ,  $F$  cismi üzerinde iki normlu uzay,  $X'$  ve  $Y'$  de sırasıyla  $X$  ve  $Y$  nin dual uzayları olsun.  $X' \times Y'$  uzayından  $F$  cisminde tanımlı bütün sınırlı, bilineer dönüşümlerin Banach uzayını  $BL(X', Y'; F)$  ile gösterelim. Herhangi bir  $x \in X$  ve  $y \in Y$  verilsin.  $x \otimes y$ ,  $BL(X', Y'; F)$  nin  $f \in X'$  ve  $g \in Y'$  olmak üzere  $(x \otimes y)(f, g) = f(x)g(y)$  ile tanımlı elemanı olsun.  $\{x \otimes y : x \in X, y \in Y\}$  kümesinin  $BL(X', Y'; F)$  uzayında gerdiği uzaya  $X$  ve  $Y$  nin cebirsel tensör çarpımı denir ve  $X \otimes Y$  ile gösterilir (Bonsall ve Duncan, 1973).

**Teorem 1.3** Bir  $\phi: X \times Y \rightarrow Z$  bilineer dönüşümü verildiğinde her  $x \in X$  ve her  $y \in Y$  için  $\sigma(x \otimes y) = \phi(x, y)$  olacak şekilde bir tek  $\sigma: X \otimes Y \rightarrow Z$  lineer dönüşümü vardır (Bonsall ve Duncan, 1973).

**Tanım 1.4**  $X$  ve  $Y$  iki normlu uzay olsun.  $X \otimes Y$  cebirsel tensör çarpımı üzerinde  $\gamma$  projektif tensör normu;  $\gamma(u) = \inf \left\{ \sum_i \|x_i\| \|y_i\| : u = \sum_i (x_i \otimes y_i) \right\}$  ile tanımlanır. Burada infimum  $u$  nun tüm sonlu gösterimleri üzerinden alınır.  $X \otimes Y$  uzayının  $\gamma$  normuna göre tamlamasına  $X$  ve  $Y$  uzaylarının projektif tensör çarpımı denir ve  $X \otimes_\gamma Y$  ile gösterilir. Projektif tensör çarpım uzayının her  $u$  elemanı  $\sum_{i=1}^{\infty} \|x_i\| \|y_i\| < \infty$  olmak üzere  $u = \sum_{i=1}^{\infty} (x_i \otimes y_i)$  şeklindedir (Bonsall ve Duncan, 1973).

**Tanım 1.5**  $(X, \mu)$ ,  $(\bar{X}, \bar{\mu})$  ve  $(Y, \mathcal{G})$  üç ölçüm uzayı olsun. Bir  $T$  operatörü  $X$  ve  $\bar{X}$  üzerinde tanımlı basit fonksiyon çiftlerini  $Y$  üzerinde tanımlı negatif olmayan ölçülebilir fonksiyonlara dönüştürsün. Eğer  $f, f_1, f_2$  ve  $g, g_1, g_2$  basit fonksiyonları için aşağıdaki koşullar sağlanırsa bu  $T$  operatörüne pozitif girişim operatörü denir.

- i)  $\|T(f, g)\|_1 \leq \|f\|_1 \|g\|_1$
- ii)  $\|T(f, g)\|_\infty \leq \|f\|_1 \|g\|_\infty$
- iii)  $\|T(f, g)\|_\infty \leq \|f\|_\infty \|g\|_1$
- iv)  $T(f_1 + f_2, g) = T(f_1, g) + T(f_2, g)$
- v)  $T(f, g_1 + g_2) = T(f, g_1) + T(f, g_2)$  (Yap, 1969).

**Tanım 1.6**  $(X, \mu)$  bir ölçüm uzayı ve  $\mathcal{M}(X, \mu)$ ,  $X$  üzerinde hemen hemen her yerde sonlu olan ölçülebilir fonksiyonların sınıfı olsun.  $f \in \mathcal{M}(X, \mu)$ ,  $0 < \lambda < \infty$  için

$$\mu_f(\lambda) = \mu(\{x \in X : |f(x)| > \lambda\})$$

$f$  fonksiyonunun dağılım (veya distribüsyon) fonksiyonu olmak üzere  $0 < t < \infty$  için

$$f^*(t) = \inf \{ \lambda : \mu_f(\lambda) \leq t \} = \sup \{ \lambda : \mu_f(\lambda) > t \}$$

eşitliği ile tanımlı  $f^*$  fonksiyonuna  $f$  fonksiyonunun düzenleştirmesi,  $0 < t < \infty$  için

$$f^{**}(t) = \frac{1}{t} \int_0^t f^*(s) ds$$

ile tanımlı  $f^{**}$  fonksiyonuna da  $f$  fonksiyonunun ortalama (averaj) fonksiyonu denir.  $\mu_f, f^*$  ve  $f^{**}$  fonksiyonları pozitif tanımlı, artmayan, sağdan sürekli fonksiyonlardır.

$0 < p, q < \infty$  olduğunu kabul edelim.  $L^{p,q}(X)$  Lorentz uzayı,

$$\|f\|_{L^{p,q}(X)} = \left( \int_0^\infty \left( t^{1/p} f^*(t) \right)^q \frac{dt}{t} \right)^{1/q} < \infty$$

olacak şekildeki tüm  $f \in \mathcal{M}(X, \mu)$  fonksiyonlarının sınıfı olarak tanımlanır.  $0 < p \leq \infty$  için  $L^{p,\infty}(X)$  uzayı ise,

$$\|f\|_{L^{p,\infty}(X)} = \sup_{t>0} t^{1/p} f^*(t) < \infty$$

olacak şekildeki tüm  $f \in \mathcal{M}(X, \mu)$  fonksiyonlarının sınıfı olarak tanımlanır.

$L^{p,q}(X)$  Lorentz uzayı üzerinde

$$\|f\|_{L^{p,q}(X)}^* = \begin{cases} \left( \frac{q}{p} \int_0^\infty \left( t^{1/p} f^{**}(t) \right)^q \frac{dt}{t} \right)^{1/q}, & 0 < p < \infty, 0 < q < \infty \\ \sup_{t>0} t^{1/p} f^{**}(t), & 0 < p \leq \infty, q = \infty \end{cases}$$

ile tanımlı  $\|\cdot\|_{L^{p,q}(X)}^*$  fonksiyonu bir normdur. Ayrıca  $L^{1,1}(X)$  ve  $1 < p \leq \infty, 1 \leq q \leq \infty$  için  $L^{p,q}(X)$  uzayı  $\|\cdot\|_{L^{p,q}(X)}^*$  normuna göre bir Banach uzayıdır (Hunt, 1966).

**Tanım 1.7**  $\mathbb{R}$  üzerinde tanımlı negatif olmayan yerel integrallenebilir fonksiyona, yani hemen hemen her yerde  $(0, \infty)$  da değerler alan fonksiyona  $\mathbb{R}^+$  da bir ağırlık fonksiyonu denir ve  $w$  ile gösterilir (Grafakos, 2009).

$(X, \mu) = (\mathbb{R}^+, w(t)dt)$  alırsak;  $0 \leq \lambda < \infty$  için

$$\mu_f(\lambda) = \mu(x \in \mathbb{R}^+ : |f(x)| > \lambda) = w(x \in \mathbb{R}^+ : |f(x)| > \lambda) = \int_{\{x \in \mathbb{R}^+ : |f(x)| > \lambda\}} w(x) d\mu(x)$$

ve  $0 < t < \infty$  için  $f^*(t) = \inf \{ \lambda : \mu_f(\lambda) \leq t \}$  olur. Böylece  $L^{p,q}(X, \mu) = L^{p,q}(\mathbb{R}^+, w(t)dt)$  uzayı elde edilir ve bu uzay  $L^{p,q}(w)$  ile gösterilir.

$0 < p, q < \infty$  veya  $0 < p \leq \infty, q = \infty$  için  $\Lambda_X^{p,q}(w)$  ağırlıklı Lorentz uzayı Carro, Raposo ve Soria (2007) tarafından

$$\Lambda_X^{p,q}(w) = \left\{ f \in \mathcal{M}(X, \mu) : \|f\|_{\Lambda_X^{p,q}(w)} = \|f^*\|_{L^{p,q}(w)} < \infty \right\}$$

olarak tanımlanır.  $p = q$  olması durumunda

$$\Lambda_X^{p,p}(w) = \left\{ f \in \mathcal{M}(X, \mu) : \|f\|_{\Lambda_X^{p,p}(w)} = \|f^*\|_{L^{p,p}(w)} = \|f^*\|_{L^p(w)} < \infty \right\}$$

uzayı elde edilir. Burada

$$\|f^*\|_{L^p(R^+,w)} = \left[ \int_{R^+} |f^*(t)|^p (w(t))^p dt \right]^{\frac{1}{p}} \neq \left[ \int_X |f(x)|^p (w(x))^p dx \right]^{\frac{1}{p}} = \|f\|_{L^p(X,w)}$$

olduğundan  $\Lambda_X^{p,p}(w) \neq L^p(X, w)$  dir.  $\Lambda_X^{p,p}(w)$  uzayı  $\Lambda_X^p(w)$  ile gösterilir.  $w=1$  olması durumunda

$$\Lambda_X^{p,q}(1) = \left\{ f \in \mathcal{M}(X, \mu) : \|f\|_{\Lambda_X^{p,q}(1)} = \|f^*\|_{L^{p,q}(1)} < \infty \right\}$$

ve  $\mu_{f^*} = \mu_f$  eşitliği kullanıldığında

$$\|f^*\|_{L^{p,q}(R^+,1)} = \|f^*\|_{L^{p,q}(R^+,\mu)} = \left( \int_0^\infty \left( t^{1/p} (f^*)^*(t) \right)^q \frac{dt}{t} \right)^{1/q} = \left( \int_0^\infty \left( t^{1/p} f^*(t) \right)^q \frac{dt}{t} \right)^{1/q} = \|f\|_{L^{p,q}(X)}$$

olduğundan  $\Lambda_X^{p,q}(1) = L^{p,q}(X)$  dir (Carro, Raposo ve Soria, 2007).

$\Lambda_X^{p,q}(w)$  uzayının dualini ifade etmek için Lorentz uzaylarının başka bir çeşidi olan  $\Gamma$  tanımlanmıştır.

**Tanım 1.8**  $A$  operatörü;  $f \in \mathcal{M}^+(0, \infty)$  ve  $t > 0$  olmak üzere  $Af(t) = \frac{1}{t} \int_0^t f(s)ds$  ile tanımlı

Hardy operatörü olsun.  $0 < p < \infty$  için

$$\Gamma_X^p(w) = \left\{ f \in \mathcal{M}(X, \mu) : \|f\|_{\Gamma_X^p(w)} = \left( \int_0^\infty (f^{**}(t))^p w(t) dt \right)^{1/p} < \infty \right\}$$

ve  $0 < p, q < \infty$  için  $W(t) = \int_0^t w(s)ds$  olmak üzere

$$\Gamma_X^{p,q}(w) = \Gamma_X^q \left( W^{\frac{q-1}{p}} w \right)$$

tanımlanır. Burada  $\|f\|_{\Gamma_X^{p,q}(w)} = \|f\|_{\Gamma_X^q \left( W^{\frac{q-1}{p}} w \right)} = \left( \int_0^\infty (f^{**}(t))^q W^{\frac{q-1}{p}}(t) w(t) dt \right)^{1/q}$  dur (Carro, Raposo ve Soria, 2007).

**Tanım 1.9**  $0 < p < \infty$ ,  $L_{dec}^p; L^p$  de negatif olmayan artmayan fonksiyonların sınıfı,  $L_{dec}^{p,\infty}; L^{p,\infty}$  da negatif olmayan artmayan fonksiyonların sınıfı olmak üzere  $A : L_{dec}^p(w) \rightarrow L^p(w)$  Hardy operatörü

sınırlı ise  $w \in B_p$ ,  $A: L_{dec}^{p,\infty}(w) \rightarrow L^{p,\infty}(w)$  Hardy operatörü sınırlı ise  $w \in B_{p,\infty}$  ile gösterilir (Carro, Raposo ve Soria, 2007).

Arino ve Muckenhoupt 1990 yılında  $1 \leq p < \infty$  olmak üzere  $w \in B_p$  olması için gerekli ve yeterli şartın  $\int_t^\infty \frac{w(x)}{x^p} dx \leq \frac{c}{t^p} \int_0^t w(x) dx$  eşitsizliğinin sağlanması olduğunu göstermiştir (Arino ve Muckenhoupt, 1990).

Carro, Garcia ve Soria 1996 yılında  $w \in B_{1,\infty}$  olması için gerekli ve yeterli şartın  $s \leq t$  iken  $\frac{1}{t} \int_0^t w(x) dx \leq C \cdot \frac{1}{s} \int_0^s w(x) dx$  eşitsizliğinin sağlanması olduğunu elde etmiştir (Carro, Garcia ve Soria, 1996).

**Tanım 1.10**  $G$  bir yerel kompakt grup olmak üzere  $G$  üzerinde tanımlı ve aşağıdaki koşulları sağlayan pozitif, regüler  $\mu$  Borel ölçümüne sol (sağ) Haar ölçümü denir.

- i) Her  $E \subset G$  kompakt kümesi için  $\mu(E) < \infty$  dur.
- ii) Her  $E \subset G$  Borel kümesi ve her  $x \in G$  için  $\mu(xE) = \mu(E)$  ( $\mu(Ex) = \mu(E)$ ) dir (Folland, 1995).

Her yerel kompakt grup bir sol Haar ölçümüne sahiptir (Folland, 1995).

**Tanım 1.11**  $G$  bir yerel kompakt grup ve  $\mu$ ,  $G$  üzerinde tanımlı sol Haar ölçümü olsun. Eğer  $\mu$  sol Haar ölçümü aynı zamanda sağ Haar ölçümü ise  $G$  grubuna ünimodüler grup denir (Folland, 1995).

$G$  değişmeli, diskret veya kompakt bir grup ise ünimodülerdir (Folland, 1995).

**Örnek 1.12**  $n \geq 2$  için determinantı sıfırdan farklı olan  $n \times n$  tipindeki reel matrisler grubu  $GL(n, R)$ ; hem  $d_{R^{n^2}x}$  Lebesgue ölçümüne göre hem de  $|\det X|^{-n} d_{R^{n^2}x}$  Haar ölçümüne göre bir ünimodüler gruptur. Ancak bu grup çarpma işlemine göre değişmeli değildir. Diğer yandan  $n \geq 2$  için  $X = (x_{ij})$ ,  $\det X = 1$ ,  $1 \leq i \leq n$  için  $x_{ii} > 0$ ,  $1 \leq j < i \leq n$  için  $x_{ij} = 0$  olan  $n \times n$  tipindeki  $X$  reel matrislerinin grubu  $ST_+(n, R)$  bir ünimodüler grup değildir (Reiter ve Stegeman, 2000).

**Tanım 1.13**  $(X, \Sigma, \mu)$  bir ölçüm uzayı ve  $A \in \Sigma$  olsun. Eğer aşağıdaki koşullar sağlanırsa  $A$  kümesine bir atom denir.

- i)  $\mu(A) > 0$  dir.
- ii)  $B \subset A$  olan herhangi bir  $B \in \Sigma$  için  $\mu(B) = 0$  veya  $\mu(A) = \mu(B)$  dir.

Eğer pozitif ölçümlü her ölçülebilir küme bir atom içerirse  $\mu$  ölçümüne atomik ölçüm,  $\mu$  için  $\Sigma$  de hiçbir atom bulunamıyorsa  $\mu$  ölçümüne atomik olmayan ölçüm denir.  $\mu$  atomik bir ölçüm ise



$(X, \Sigma, \mu)$  ölçüm uzayına atomik ölçüm uzayı,  $\mu$  atomik olmayan bir ölçüm ise  $(X, \Sigma, \mu)$  ölçüm uzayına atomik olmayan ölçüm uzayı denir (Halmos, 1974).

**Örnek 1.14**  $\mu$  sayma ölçümü olmak üzere  $(N, \wp(N), \mu)$  ölçüm uzayı atomik ölçüm uzayı ve  $\Sigma$  Borel cebiri,  $\eta$  de Lebesgue ölçümü olmak üzere  $(R, \Sigma, \eta)$  ölçüm uzayı atomik olmayan ölçüm uzayıdır.

**Tanım 1.15**  $(X, \Sigma, \mu)$  bir ölçüm uzayı olmak üzere her  $n \in N$  için  $\mu(E_n) < \infty$  ve  $X = \bigcup_{n=1}^{\infty} E_n$  olacak şekilde bir  $(E_n) \subset \Sigma$  küme dizisi varsa  $(X, \Sigma, \mu)$  uzayına  $\sigma$  – sonlu ölçüm uzayı denir (Halmos, 1974).

**Lemma 1.16**  $G$  bir ünimodüler yerel kompakt grup,  $T$  bir girişim operatörü,  $0 < p_1, p_2, q_1, q_2 < \infty$ ,  $\frac{1}{p_1} + \frac{1}{p_2} > 1$ ,  $c$  bir sabit olmak üzere  $w \geq c > 0$ ,  $p = \min\{p_1, p_2\}$  olmak üzere  $w \in B_p$  ve  $f \in \Lambda^{p_1, q_1}(w)$ ,  $g \in \Lambda^{p_2, q_2}(w)$  için  $k = T(f, g) = f * g$  olsun. O halde  $\frac{1}{p_1} + \frac{1}{p_2} = 1 + \frac{1}{r}$ ,  $s \geq 1$  ve  $\frac{1}{q_1} + \frac{1}{q_2} \geq \frac{1}{s}$  olmak üzere  $k \in \Lambda^{r, s}(w)$  ve  $\|k\|_{\Lambda^{r, s}(w)} \leq C \cdot \|f\|_{\Lambda^{p_1, q_1}(w)} \|g\|_{\Lambda^{p_2, q_2}(w)}$  dir (Li ve Sun, 2012).

**Önerme 1.17**  $0 < p, q < \infty$  olmak üzere her  $f \in \Lambda_G^{p, q}(w)$  ve her  $s \in G$  için  $L_s f \in \Lambda_G^{p, q}(w)$ ,  $R_s f \in \Lambda_G^{p, q}(w)$  dir. Dolayısıyla  $\Lambda_G^{p, q}(w)$  uzayı ötelemeler altında invaryanttır (Li ve Sun, 2012).

**Teorem 1.18**  $1 < p < \infty$ ,  $1 \leq q < \infty$ ,  $w \in B_{1, \infty}$  ya da  $p = q = 1$ ,  $w \in B_1$  olsun. O halde  $\Lambda_G^{p, q}(w)$  ağırlıklı Lorentz uzayı  $\|\cdot\|_{\Gamma_G^{p, q}(w)}$  normuna göre bir Banach fonksiyon uzayıdır (Li ve Sun, 2012).

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu kesimde  $G$  bir ünimodüler yerel kompakt grup,  $\lambda$ ,  $G$  nin bir sol Haar ölçümü ve  $(G, \lambda)$ ,  $\sigma$  – sonlu atomik olmayan ölçüm uzayı,

$$1 < p_1, p_2 < \infty, 1 \leq q_1, q_2 < \infty,$$

$$\frac{1}{p_1} + \frac{1}{p_2} > 1, \frac{1}{p_1} + \frac{1}{p_2} = 1 + \frac{1}{r}, r > 0, \frac{1}{q_1} + \frac{1}{q_2} \geq \frac{1}{s}, s \geq 1,$$

$$w \geq c > 0,$$

$$p = \min\{p_1, p_2\} \text{ için } w \in B_p$$

olsun.  $\tilde{f}(x) = f(-x)$  olmak üzere her  $\lambda \geq 0$  için  $\mu_f(\lambda) = \mu_{\tilde{f}}(\lambda)$  olduğundan  $\|f^*\|_{L^{p,q}(w)} = \|(\tilde{f})^*\|_{L^{p,q}(w)}$  ve dolayısıyla  $\|f\|_{\Lambda_G^{p,q}(w)} = \|\tilde{f}\|_{\Lambda_G^{p,q}(w)}$  dir. Yani  $f \in \Lambda_G^{p_1, q_1}(w)$  iken  $\tilde{f} \in \Lambda_G^{p_1, q_1}(w)$  olur. Böylece Lemma 1.16 gereği her  $f \in \Lambda_G^{p_1, q_1}(w)$ ,  $g \in \Lambda_G^{p_2, q_2}(w)$  için

$$\|T(\tilde{f}, g)\|_{\Lambda_G^{r,s}(w)} \leq C \cdot \|\tilde{f}\|_{\Lambda_G^{p_1, q_1}(w)} \|g\|_{\Lambda_G^{p_2, q_2}(w)} = C \cdot \|f\|_{\Lambda_G^{p_1, q_1}(w)} \|g\|_{\Lambda_G^{p_2, q_2}(w)}$$

eşitsizliği yazılır. O halde  $\Lambda_G^{p_1, q_1}(w) \times \Lambda_G^{p_2, q_2}(w)$  uzayından  $\Lambda_G^{r,s}(w)$  uzayına bir  $k$  bilinear dönüşümünü  $f \in \Lambda_G^{p_1, q_1}(w)$ ,  $g \in \Lambda_G^{p_2, q_2}(w)$  olmak üzere  $k(f, g) = \tilde{f} * g$  şeklinde tanımlayabiliriz. Bu  $k$  dönüşümü iyi tanımlıdır. Ayrıca

$$\begin{aligned} \|k\| &= \sup \left\{ \frac{\|k(f, g)\|_{\Lambda_G^{r,s}(w)}}{\|f\|_{\Lambda_G^{p_1, q_1}(w)} \|g\|_{\Lambda_G^{p_2, q_2}(w)}} : \|f\|_{\Lambda_G^{p_1, q_1}(w)} \leq 1, \|g\|_{\Lambda_G^{p_2, q_2}(w)} \leq 1 \right\} \\ &= \sup \left\{ \frac{\|\tilde{f} * g\|_{\Lambda_G^{r,s}(w)}}{\|f\|_{\Lambda_G^{p_1, q_1}(w)} \|g\|_{\Lambda_G^{p_2, q_2}(w)}} : \|f\|_{\Lambda_G^{p_1, q_1}(w)} \leq 1, \|g\|_{\Lambda_G^{p_2, q_2}(w)} \leq 1 \right\} \\ &\leq \sup \left\{ \frac{C \cdot \|f\|_{\Lambda_G^{p_1, q_1}(w)} \|g\|_{\Lambda_G^{p_2, q_2}(w)}}{\|f\|_{\Lambda_G^{p_1, q_1}(w)} \|g\|_{\Lambda_G^{p_2, q_2}(w)}} : \|f\|_{\Lambda_G^{p_1, q_1}(w)} \leq 1, \|g\|_{\Lambda_G^{p_2, q_2}(w)} \leq 1 \right\} = C \end{aligned}$$

olduğundan  $k$  dönüşümü sınırlıdır. O halde Teorem 1.3 gereği bu sınırlı  $k$  bilinear dönüşümüne her  $f \in \Lambda_G^{p_1, q_1}(w)$ ,  $g \in \Lambda_G^{p_2, q_2}(w)$  için  $K(f \otimes g) = \tilde{f} * g$  olacak şekilde  $\Lambda_G^{p_1, q_1}(w) \otimes_{\gamma} \Lambda_G^{p_2, q_2}(w)$  uzayından  $\Lambda_G^{r,s}(w)$  uzayına tanımlı bir tek  $K$  lineer dönüşümü karşılık gelir. Yine  $\|K\| \leq C$  olup  $K$  dönüşümü de sınırlıdır (Li ve Sun, 2012).

**Tanım 2.1**  $K$  lineer dönüşümü altında  $\Lambda_G^{p_1, q_1}(w) \otimes_{\gamma} \Lambda_G^{p_2, q_2}(w)$  uzayının görüntüsünü  $A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w)$  ile gösterelim. Böylece

$$A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w) = \left\{ h = \sum_{i=1}^{\infty} \tilde{f}_i * g_i : f_i \in \Lambda_G^{p_1, q_1}(w), g_i \in \Lambda_G^{p_2, q_2}(w), K\left(\sum_{i=1}^{\infty} (f_i \otimes g_i)\right) = \sum_{i=1}^{\infty} (\tilde{f}_i * g_i), \sum_{i=1}^{\infty} \|f_i\|_{\Lambda_G^{p_1, q_1}(w)} \|g_i\|_{\Lambda_G^{p_2, q_2}(w)} < \infty \right\}$$

olur. Her  $h \in A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w)$  için  $f_i \in \Lambda_G^{p_1, q_1}(w)$ ,  $g_i \in \Lambda_G^{p_2, q_2}(w)$  olmak üzere

$$\|h\| = \inf \left\{ \sum_{i=1}^{\infty} \|f_i\|_{\Lambda_G^{p_1, q_1}(w)} \|g_i\|_{\Lambda_G^{p_2, q_2}(w)} : h = \sum_{i=1}^{\infty} (\tilde{f}_i * g_i), f_i \in \Lambda_G^{p_1, q_1}(w), g_i \in \Lambda_G^{p_2, q_2}(w) \right\}$$

ile tanımlanan  $\|\cdot\|$  fonksiyonu bir normdur. Böylece  $A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w)$  uzayı bir normlu uzay olur (Li ve Sun, 2012).

**Teorem 2.2**  $A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w)$  uzayı  $\|\cdot\|$  normuna göre bir Banach uzayıdır.

**İspat:** Herhangi bir  $(h_n) \subset A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w)$  Cauchy dizisi alalım. Bu durumda  $(h_n)$  dizisinin her  $n \in \mathbb{N}$  için  $\|k_{n+1} - k_n\| < \frac{1}{2^n}$  olacak şekilde bir  $(k_n)$  alt dizisi vardır.  $A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w)$  uzayı ve  $\|\cdot\|$  normunun tanımı gereği

i)  $k_1 = \sum_{j=1}^{\infty} (f_{1,j} * g_{1,j}),$

ii)  $\sum_{j=1}^{\infty} \|f_{1,j}\|_{\Lambda_G^{p_1, q_1}(w)} \|g_{1,j}\|_{\Lambda_G^{p_2, q_2}(w)} < \|k_1\| + 1,$

iii) Her  $n \in \mathbb{N}$  için  $k_{n+1} - k_n = \sum_{j=1}^{\infty} (f_{n+1,j} * g_{n+1,j}),$

iv) Her  $n \in \mathbb{N}$  için  $\sum_{j=1}^{\infty} \|f_{n+1,j}\|_{\Lambda_G^{p_1, q_1}(w)} \|g_{n+1,j}\|_{\Lambda_G^{p_2, q_2}(w)} < \frac{1}{2^{n-1}}$

olacak şekilde  $(f_{n,j}) \subset \Lambda_G^{p_1, q_1}(w)$ ,  $(g_{n,j}) \subset \Lambda_G^{p_2, q_2}(w)$  alt dizileri vardır.

$h = \sum_{j=1}^{\infty} (f_{1,j} * g_{1,j}) + \sum_{n=1}^{\infty} \left( \sum_{j=1}^{\infty} (f_{n+1,j} * g_{n+1,j}) \right)$  olarak tanımlayalım.

$$\begin{aligned} \|h\| &\leq \left\| \sum_{j=1}^{\infty} (f_{1,j} * g_{1,j}) \right\| + \sum_{n=1}^{\infty} \left\| \sum_{j=1}^{\infty} (f_{n+1,j} * g_{n+1,j}) \right\| \\ &\leq c_1 \sum_{j=1}^{\infty} \|f_{1,j}\|_{\Lambda_G^{p_1, q_1}(w)} \|g_{1,j}\|_{\Lambda_G^{p_2, q_2}(w)} + c_2 \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} \|f_{n+1,j}\|_{\Lambda_G^{p_1, q_1}(w)} \|g_{n+1,j}\|_{\Lambda_G^{p_2, q_2}(w)} \\ &< c_1 (\|k_1\| + 1) + c_2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{2^{n-1}} \\ &= c_1 \|k_1\| + c_1 + 2c_2 \end{aligned}$$

eşitsizliğinde  $k_1 \in A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w)$  olduğu kullanılırsa  $\|h\| < \infty$  olup  $h \in A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w)$  elde edilir.

Şimdi  $(k_n)$  alt dizisinin  $A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w)$  uzayında  $h$  elemanına yakınsadığını gösterelim.

$$\sum_{r=1}^n (k_{r+1} - k_r) = (k_2 - k_1) + (k_3 - k_2) + \dots + (k_{n+1} - k_n) = k_{n+1} - k_1$$

olduğundan  $k_{n+1} = k_1 + \sum_{r=1}^n k_{r+1} - k_r$  dir. Buradan

$$\begin{aligned} \|h - k_{n+1}\| &= \left\| h - \left( k_1 + \sum_{r=1}^n (k_{r+1} - k_r) \right) \right\| \\ &= \left\| \sum_{j=1}^{\infty} (f_{1,j} * g_{1,j}) + \sum_{r=1}^{\infty} \left( \sum_{j=1}^{\infty} (f_{r+1,j} * g_{r+1,j}) \right) - \sum_{j=1}^{\infty} (f_{1,j} * g_{1,j}) - \sum_{r=1}^n \left( \sum_{j=1}^{\infty} (f_{r+1,j} * g_{r+1,j}) \right) \right\| \\ &= \left\| \sum_{r=n+1}^{\infty} \left( \sum_{j=1}^{\infty} (f_{r+1,j} * g_{r+1,j}) \right) \right\| \\ &\leq \sum_{r=n+1}^{\infty} \left\| \sum_{j=1}^{\infty} (f_{r+1,j} * g_{r+1,j}) \right\| \\ &\leq c_3 \sum_{r=n+1}^{\infty} \sum_{j=1}^{\infty} \|f_{r+1,j}\|_{\Lambda_G^{p_1, q_1}(w)} \|g_{r+1,j}\|_{\Lambda_G^{p_2, q_2}(w)} \\ &< c_3 \sum_{r=n+1}^{\infty} \frac{1}{2^{r-1}} \end{aligned}$$

olur. Bunun sonucunda  $\lim_{n \rightarrow \infty} \|h - k_{n+1}\| = 0$  elde edilir. Bu durumda

$$\|k_n - h\| \leq \|k_n - k_{n+1}\| + \|k_{n+1} - h\| < c_4 \frac{1}{2^n} + \|k_{n+1} - h\|$$

eşitsizliğinde  $n \rightarrow \infty$  için limit alınırsa  $\lim_{n \rightarrow \infty} \|h - k_n\| = 0$  olur. Bu ise  $(k_n)$  alt dizisinin  $A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w)$  uzayında  $h$  elemanına yakınsadığını gösterir. O halde  $(h_n)$  Cauchy dizisi  $A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w)$  uzayında  $h$  elemanına yakınsar. Böylece ispat tamamlanır.

**Önerme 2.3**  $A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w)$  uzaıy ötelemeler altında invaryanttır.

**İspat:** Herhangi bir  $h \in A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w)$  alalım. Bu durumda  $f_i \in \Lambda_G^{p_1, q_1}(w)$ ,  $g_i \in \Lambda_G^{p_2, q_2}(w)$

olmak üzere  $h = \sum_{i=1}^{\infty} (\tilde{f}_i * g_i)$ ,  $\sum_{i=1}^{\infty} \|f_i\|_{\Lambda_G^{p_1, q_1}(w)} \|g_i\|_{\Lambda_G^{p_2, q_2}(w)} < \infty$  yazılır. Buradan her  $s \in G$  için

$$\|L_s h\| = \left\| L_s \sum_{i=1}^{\infty} (\tilde{f}_i * g_i) \right\| = \left\| \sum_{i=1}^{\infty} L_s (\tilde{f}_i * g_i) \right\| \tag{2.1}$$

olur. Ayrıca her  $x \in G$  için

$$\begin{aligned} L_s(\tilde{f}_i * g_i)(x) &= (\tilde{f}_i * g_i)(x-s) \\ &= \int_G \tilde{f}_i(y)g_i(x-s-y) d\mu(y) \\ &= \int_G \tilde{f}_i(u-s)g_i(x-u) d\mu(u) \\ &= \int_G L_s \tilde{f}_i(u)g_i(x-u) d\mu(u) \\ &= (L_s \tilde{f}_i) * g_i(x) \end{aligned}$$

dir. Buradan

$$L_s(\tilde{f}_i * g_i) = (L_s \tilde{f}_i) * g_i \tag{2.2}$$

elde edilir. Diğer yandan her  $x \in G$  için

$$L_s \tilde{f}_i(x) = \tilde{f}_i(x-s) = f_i(s-x) = f_i(s+(-x)) = R_s f_i(-x) = (R_s f_i)^\sim(x)$$

olur. Buradan

$$L_s \tilde{f}_i = (R_s f_i)^\sim \tag{2.3}$$

eşitliği görülür. (2.2) ve (2.3) eşitlikleri (2.1) de yerine yazılır ve  $\Lambda_G^{p_1, q_1}(w)$  uzayının ötelemeler altında invaryant olduğu kullanılırsa

$$\begin{aligned} \|L_s h\| &= \left\| \sum_{i=1}^{\infty} ((R_s f_i)^\sim * g_i) \right\| \\ &\leq c \sum_{i=1}^{\infty} \|(R_s f_i)^\sim\|_{\Lambda_G^{p_1, q_1}(w)} \|g_i\|_{\Lambda_G^{p_2, q_2}(w)} \\ &= c \sum_{i=1}^{\infty} \|(R_s f_i)\|_{\Lambda_G^{p_1, q_1}(w)} \|g_i\|_{\Lambda_G^{p_2, q_2}(w)} \\ &= c \sum_{i=1}^{\infty} \|f_i\|_{\Lambda_G^{p_1, q_1}(w)} \|g_i\|_{\Lambda_G^{p_2, q_2}(w)} < \infty \end{aligned} \tag{2.4}$$

elde edilir. Bu durumda  $L_s h \in A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w)$  olup  $A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w)$  uzayı ötelemeler altında invaryanttır. Böylece ispat tamamlanır.

**Sonuç 2.4** Her  $s \in G$  ve her  $h \in A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w)$  için

$$\|L_s h\| \leq c \|h\| \tag{2.5}$$

eşitsizliği vardır.

**İspat:** (2.4) eşitsizliğinden her  $s \in G$  ve her  $h \in A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w)$  için  $\|L_s h\| \leq c \sum_{i=1}^{\infty} \|f_i\|_{\Lambda_G^{p_1, q_1}(w)} \|g_i\|_{\Lambda_G^{p_2, q_2}(w)}$  dir. Her iki tarafın  $h = \sum_{i=1}^{\infty} (\tilde{f}_i * g_i)$ ,  $f_i \in \Lambda_G^{p_1, q_1}(w)$ ,  $g_i \in \Lambda_G^{p_2, q_2}(w)$  üzerinden infimumu alınırsa  $\|L_s h\| \leq c \|h\|$  elde edilir.

**Sonuç 2.5** Her  $s \in G$  için  $L_s \in BL(A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w))$  dır.

**İspat:**  $L_s : A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w) \rightarrow A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w)$  öteleme operatörünün lineer olduğu açıktır. Böylece (2.5) eşitsizliği gereği  $L_s$  operatörünün sınırlı olduğu elde edilir. Sonuç olarak  $L_s \in BL(A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w))$  dır.

## SONUÇ

Bu çalışmada,  $G$  yerel kompakt Abel grup olmak üzere Avcı ve Gürkanlı (2007) tarafından tanımlanan  $A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G)$  uzayının bir genelleştirmesi olarak  $G$  ünimodüler yerel kompakt grup olmak üzere Li ve Sun (2012) tarafından tanımlanan  $A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G, w)$  uzayının,  $\|\cdot\|$  normuna göre bir Banach uzayı olduğu, ötelemeler altında invariant olduğu ve öteleme operatörünün sınırlı ve lineer olduğu elde edilmiştir. Böylece  $A_{p_1, q_1}^{p_2, q_2}(G)$  uzayı ve  $\Lambda_G^{p, q}(w)$  ağırlıklı Lorentz uzayındaki Banach uzay olma ve ötelemeler altında invariantlık özellikleri bu uzaya taşınmıştır.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Arino MA, Muckenhoupt B, 1990. Maximal functions classical Lorentz spaces and Hardy' s inequality with weights for nonincreasing functions. Transactions of the American Mathematical Society, 320(2), 727-735.
- Avcı H, Gürkanlı AT, 2007. Multipliers and tensor products of  $L(p, q)$  Lorentz spaces. Acta Mathematica Scientia, 27(B)(1), 107-116.
- Bonsall FF, Duncan J, 1973. Complete normed algebras. Springer Verlag, Berlin.
- Carro MJ, Garcia del AA, Soria J, 1996. Weak-type weights and normable Lorentz spaces. Proceedings of the American Mathematical Society, 124(3), 849-857.
- Carro MJ, Raposo JA, Soria J, 2007. Recent developments in the theory of Lorentz spaces and weighted inequalities. Mem. Amer. Math. Soc., 187, no. 877.
- Folland GB, 1995. A course in abstract harmonic analysis. CRS Press, Boca Raton, Florida.
- Grafakos L, 2009. Modern Fourier analysis, Second edition. Springer Science+Business Media, New York.
- Halmos PR, 1974. Measure theory, Second edition. Springer Verlag, New York.
- Hunt R, 1966. On  $L(p, q)$  spaces. Enseign. Math., 12, 249-276.

- Li H, Sun Q, 2012. Multipliers and tensor products of the weighted Lorentz spaces  $\Lambda_G^{p, q}(w)$ . Georgian Math. Journal, 19, 721-740.
- Reiter H, Stegeman JD, 2000. Classical harmonic analysis and locally compact groups, Second edition. Clarendon Press, Oxford.
- Yap LYH, 1969. Some remarks on convolution operators and  $L(p, q)$  spaces. Duke Math. J., 36, 647-658.

## Soliton Solutions of Generalized Third-Order Nonlinear Schrödinger Equation by Using GKM

Seyma TULUCE DEMIRAY<sup>1\*</sup>, Ugur BAYRAKCI<sup>1</sup>

**ABSTRACT:** In this study, we have worked on GKM in order to obtain the soliton solutions of the generalized third-order nonlinear Schrödinger equation. Thus, we have acquired some new soliton solutions of the generalized third-order nonlinear Schrödinger equation which has an important usage area in optical fiber. Also, we have drawn some 2D and 3D surfaces of these obtained results by using Wolfram Mathematica 12. Then, we have shown the validity of the obtained solutions.

**Keywords:** Generalized Kudryashov method, generalized third-order nonlinear Schrödinger equation, soliton solutions

<sup>1</sup> Seyma TULUCE DEMIRAY ([Orcid ID: 0000-0002-8027-7290](https://orcid.org/0000-0002-8027-7290)), Ugur BAYRAKCI ([Orcid ID: 0000-0002-1765-2318](https://orcid.org/0000-0002-1765-2318)), Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Matematik Bölümü, Osmaniye, Türkiye

\*Corresponding Author: Seyma TULUCE DEMIRAY, e-mail: seymatuluçe@gmail.com



## INTRODUCTION

The nonlinear Schrödinger equations (NLSEs), a category of nonlinear evolution equations (NLEEs), are used in much areas of engineering and applied sciences kind of fluid mechanics, hydrodynamics, applied mathematics, biophysics, optical fibers, mathematical physics, plasma physics, fluid dynamics and so on (Ma, 2019; Liu et al., 2015; Chettouh et al., 2017; Chowdury et al., 2014; Azzouzi et al., 2009; Triki and Taha, 2012; Xu and Zhang, 2007; Triki et al., 2018; Arshad et al., 2017a; Arshad et al., 2017b; Biswas et al., 2017; Seadawy et al., 2018).

Generalized third-order (NLSE), which is a class of the NLSEs, has been the subject of some research recently. Generalized third-order (NLSE) is given as:

$$i \left( \frac{\partial u}{\partial t} + \frac{\partial^3 u}{\partial x^3} \right) + |u|^2 \left( \beta_1 u + i\beta_2 \frac{\partial u}{\partial x} \right) + i\beta_3 \frac{\partial(|u|^2)}{\partial x} u = 0. \quad (1)$$

Where value of  $u$  function is a complex and value of coefficients  $\beta_1$  and  $\beta_2$  are real. Generalized third-order (NLSE) given by Eq. (1) is an important model which is used to model ultra-short pulses in optical fibers. Solitons and solitary wave solutions of this model have recently been tried to be found by many researchers. Various methods have been studied such as the extended simple equation method and the  $\exp(-\phi(\xi))$ -expansion method (Lu et al., 2019), the generalized Riccati mapping method (Nasreen et al., 2019), the exp-a function and unified methods (Hosseini et al., 2020), F-expansion method (Seadawy et al., 2020b) and modified extended direct algebraic method (Seadawy et al., 2020a).

Our aim in this article is ascertain the soliton solutions of generalized third-order (NLSE) through GKM (Tuluçe Demiray and Bulut, 2015; Pandir et al., 2016; Tuluçe Demiray and Bulut, 2016; Tuluçe Demiray and Bulut, 2017; Tuluçe Demiray and Bulut, 2019). In Section 2, GKM's basic structure is given. In Section 3, some soliton solutions of generalized third-order (NLSE) have been obtained by applying GKM.

## MATERIALS AND METHODS

We take into account a general nonlinear partial differential equation (NLPDE) in the form:

$$P(u, u_t, u_x, u_{xx}, u_{xt}, \dots) = 0. \quad (2)$$

**Step1:** Firstly, we consider the travelling wave solution as following form;

$$u(x, y, t) = u(\xi) e^{iP(x,t)}, \xi = kx + wt, P(x, t) = \delta x + \lambda t. \quad (3)$$

Where  $k, w, \delta$  and  $\lambda$  arbitrary constants. Equation (2) is turned into ordinary differential equation by Eq. (3):

$$P(u, u', u'', u''', \dots) = 0. \quad (4)$$

Where superscripts denote ordinary derivatives with respect to  $\xi$ .

**Step2:** Suppose that we consider the solutions of Eq. (4) as:

$$u(\xi) = \frac{\sum_{i=0}^N a_i Z^i(\xi)}{\sum_{j=0}^M b_j Z^j(\xi)} = \frac{A[Z(\xi)]}{B[Z(\xi)]}. \quad (5)$$

Where  $Z$  is  $\frac{1}{1 \pm e^\xi}$  'dir. We should point out that  $Z$  is the solution to the following equation.

$$Z_\xi = Z^2 - Z. \quad (6)$$

**Step3:** We can ascertain the values of  $M$  and  $N$  in Eq. (5) through the homogeneous balance principle. Therefore we balance the highest order nonlinear terms in Eq. (4).

**Step4:** We substitute Eq. (5) into Eq. (4). Thus we obtain a polynomial of  $R(Z)$  of  $Z$ . Then equating the all coefficients of  $R(Z)$  to zero, we find an algebraic equation system. By solving this system, we determine  $c$  and the variable coefficients of  $a_0, a_1, a_2, \dots, a_N, b_0, b_1, b_2, \dots, b_M$ . Finally we can obtain the exact solutions of Eq. (4).

#### Application of GKM to the equation

To find the traveling wave solutions of Eq. (1) we consider the following transformation:

$$u(x, y, t) = u(\xi)e^{iP(x,t)}, \quad \xi = kx + wt, \quad P(x, t) = \delta x + \lambda t. \quad (7)$$

Replace Eq. (2) into Eq. (1) and we get the following

$$3k^2 \delta u'' + (\lambda - \delta^3)u + (\delta\beta_2 + \beta_1)u^3 = 0. \quad (8)$$

And

$$k^3 u'' + (w - 3\delta^2 k)u + \frac{k(2\beta_3 + \beta_2)}{3} u^3 = 0. \quad (9)$$

By using balance principle in Eq. (9), we obtain

$$N - M + 2 = 3N - 3M \Rightarrow N = M + 1. \quad (10)$$

If we select  $M = 1$  and  $N = 2$  we find the following solution

$$u(\xi) = \frac{a_0 + a_1 Z + a_2 Z^2}{b_0 + b_1 Z}, \quad (11)$$

$$u'(\xi) = (Z^2 - Z) \left[ \frac{(a_1 + 2a_2 Z)(b_0 + b_1 Z) - b_1(a_0 + a_1 Z + a_2 Z^2)}{(b_0 + b_1 Z)^2} \right], \quad (12)$$

$$\begin{aligned} u''(\xi) = & \frac{Z^2 - Z}{(b_0 + b_1 Z)^2} (2Z - 1) [(a_1 + 2a_2 Z)(b_0 + b_1 Z) - b_1(a_0 + a_1 Z + a_2 Z^2)] + \frac{(Z^2 - Z)^2}{(b_0 + b_1 Z)^3} \\ & + [2a_2(b_0 + b_1 Z)^2 - 2b_1(a_1 + 2a_2 Z)(b_0 + b_1 Z) \\ & + 2b_1^2(a_0 + a_1 Z + a_2 Z^2)]. \end{aligned} \quad (13)$$

We obtain the soliton solutions of Eq. (1) in the following different cases;

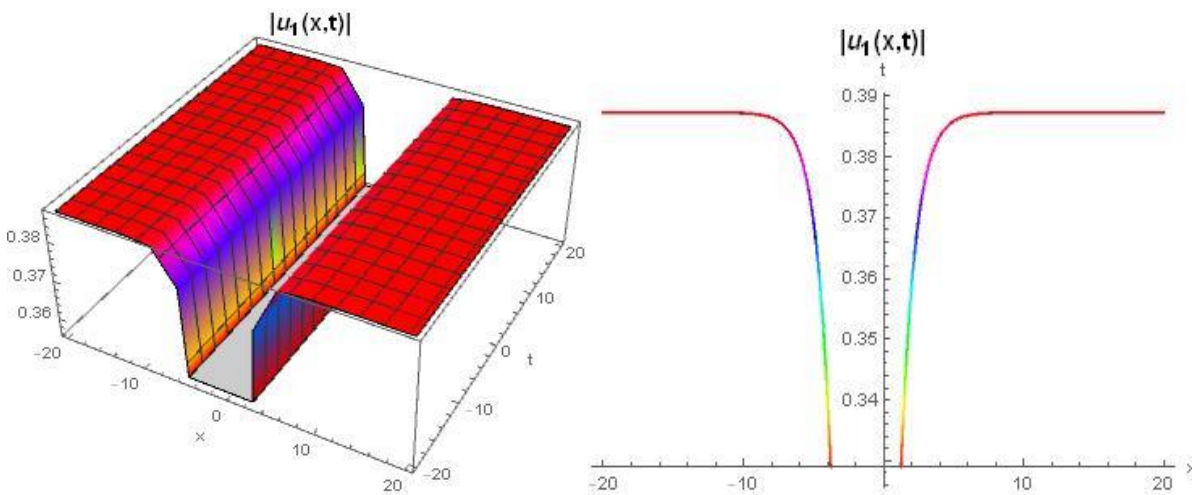
#### Case1:

$$\begin{aligned} a_0 = & -\frac{i\sqrt{\frac{3}{2}}kb_0}{\sqrt{\beta_2 + 2\beta_3}}, \quad a_1 = -\frac{a_2}{2} + \frac{i\sqrt{6}kb_0}{\sqrt{\beta_2 + 2\beta_3}}, \quad b_1 = -\frac{ia_2\sqrt{\beta_2 + 2\beta_3}}{\sqrt{6}k}, \\ w = & \frac{1}{2}k(k^2 + 6\delta^2). \end{aligned} \quad (14)$$

Substituting the above values in Eq. (11), we acquire the soliton solution of Eq. (1)

$$u_1(x, t) = -\frac{i\sqrt{\frac{3}{2}}k \tanh\left[\frac{1}{2}\left(kx + \frac{1}{2}kt(k^2 + 6\delta^2)\right)\right]}{\sqrt{\beta_2 + 2\beta_3}}. \tag{15}$$

$$u_2(x, t) = -\frac{i\sqrt{\frac{3}{2}}k \coth\left[\frac{1}{2}\left(kx + \frac{1}{2}kt(k^2 + 6\delta^2)\right)\right]}{\sqrt{\beta_2 + 2\beta_3}}. \tag{16}$$



**Figure 1:** The 3D graph of the solution (15) for  $k = 1, \delta = 2, \beta_2 = 2, \beta_3 = 2, -20 < x < 20, -20 < t < 20$  and 2D graph for this values and  $t = 0.1$ .

**Case2:**

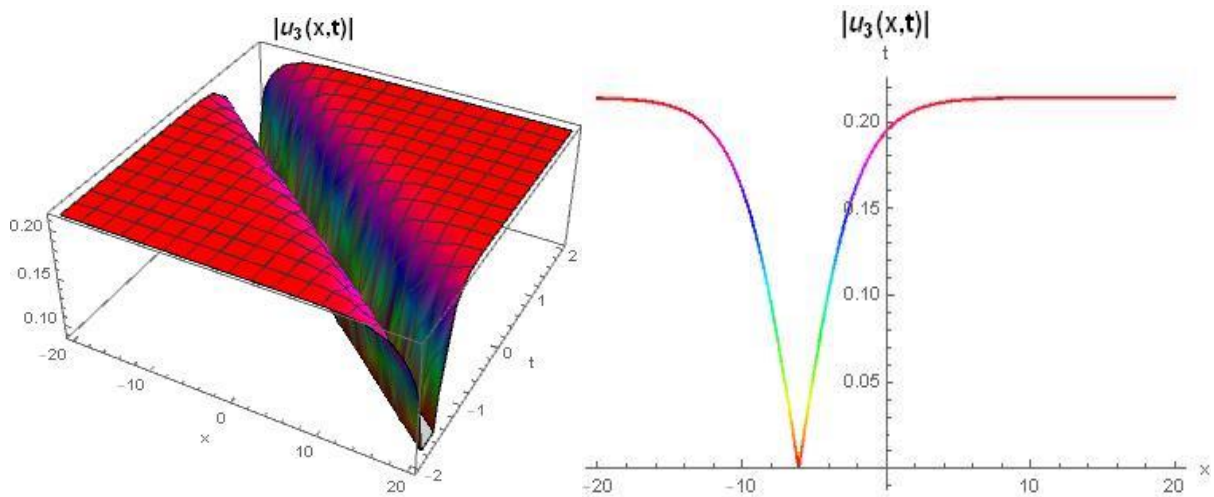
$$a_0 = \frac{\sqrt{\frac{3}{2}}\left(-3kb_1\sqrt{-\beta_2 - 2\beta_3} + \sqrt{-k^2b_1^2(\beta_2 + 2\beta_3)}\right)}{4(\beta_2 + 2\beta_3)}, a_1 = -\frac{\sqrt{6}kb_1}{\sqrt{-\beta_2 - 2\beta_3}}, a_2 = \frac{\sqrt{6}kb_1}{\sqrt{-\beta_2 - 2\beta_3}},$$

$$b_0 = -\frac{b_1}{2}, w = \frac{1}{4}k\left(5k^2 + 12\delta^2 - \frac{3k\sqrt{-k^2b_1^2(\beta_2 + 2\beta_3)}}{b_1\sqrt{-\beta_2 - 2\beta_3}}\right). \tag{17}$$

Substituting the above values in Eq. (11), we acquire the soliton solution of Eq.

$$\begin{aligned}
 u_3(x, t) = & \frac{-\sqrt{3}}{4\sqrt{2}b_1(-\beta_2 - 2\beta_3)^{3/2}} \left( -2k \left( -1 + 3\cosh \left[ kx + \frac{1}{4}kt \left( 5k^2 + 12\delta^2 - \frac{3k\sqrt{-k^2b_1^2(\beta_2 + 2\beta_3)}}{b_1\sqrt{-\beta_2 - 2\beta_3}} \right) \right] \right) \right) \\
 & \times \operatorname{csch} \left[ kx + \frac{1}{4}kt \left( 5k^2 + 12\delta^2 - \frac{3k\sqrt{-k^2b_1^2(\beta_2 + 2\beta_3)}}{b_1\sqrt{-\beta_2 - 2\beta_3}} \right) \right] b_1(\beta_2 + 2\beta_3) \\
 & - 2\operatorname{coth} \left[ \frac{1}{2} \left( kx + \frac{1}{4}kt \left( 5k^2 + 12\delta^2 - \frac{3k\sqrt{-k^2b_1^2(\beta_2 + 2\beta_3)}}{b_1\sqrt{-\beta_2 - 2\beta_3}} \right) \right) \right] \\
 & \times \sqrt{-\beta_2 - 2\beta_3} \sqrt{-k^2b_1^2(\beta_2 + 2\beta_3)}.
 \end{aligned} \tag{18}$$

$$\begin{aligned}
 u_4(x, t) = & \frac{-\sqrt{3}}{4\sqrt{2}b_1(-\beta_2 - 2\beta_3)^{3/2}} \left( -2k \left( -1 + 3\cosh \left[ kx + \frac{1}{4}kt \left( 5k^2 + 12\delta^2 - \frac{3k\sqrt{-k^2b_1^2(\beta_2 + 2\beta_3)}}{b_1\sqrt{-\beta_2 - 2\beta_3}} \right) \right] \right) \right) \\
 & \times \operatorname{csch} \left[ kx + \frac{1}{4}kt \left( 5k^2 + 12\delta^2 - \frac{3k\sqrt{-k^2b_1^2(\beta_2 + 2\beta_3)}}{b_1\sqrt{-\beta_2 - 2\beta_3}} \right) \right] b_1(\beta_2 + 2\beta_3) \\
 & - 2\tanh \left[ \frac{1}{2} \left( kx + \frac{1}{4}kt \left( 5k^2 + 12\delta^2 - \frac{3k\sqrt{-k^2b_1^2(\beta_2 + 2\beta_3)}}{b_1\sqrt{-\beta_2 - 2\beta_3}} \right) \right) \right] \\
 & \times \sqrt{-\beta_2 - 2\beta_3} \sqrt{-k^2b_1^2(\beta_2 + 2\beta_3)}.
 \end{aligned} \tag{19}$$



**Figure 2:** The 3D graph of the solution (18) for  $k = 0.5, \delta = 2, b_1 = 1, \beta_2 = 0.2, \beta_3 = 4, -20 < x < 20, -2 < t < 2$  and 2D graph for this values and  $t = 0.5$ .

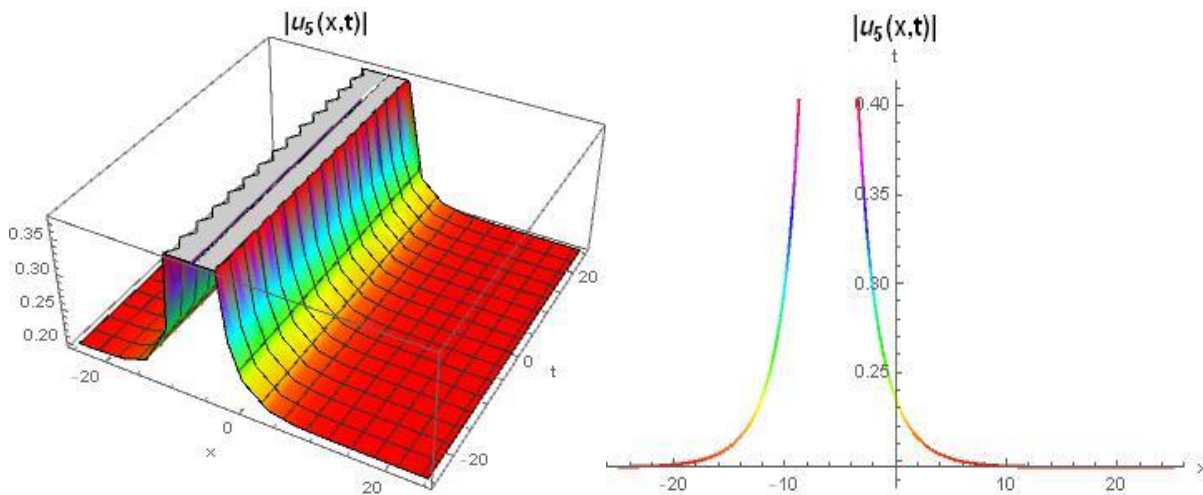
**Case3:**

$$\begin{aligned}
 a_0 = & -\frac{\sqrt{6}kb_0}{\sqrt{-\beta_2 - 2\beta_3}}, a_1 = \frac{2\sqrt{6}kb_0}{\sqrt{-\beta_2 - 2\beta_3}}, a_2 = -\frac{2\sqrt{6}kb_0}{\sqrt{-\beta_2 - 2\beta_3}}, \\
 b_1 = & -2b_0, w = (2k^3 + 3k\delta^2).
 \end{aligned} \tag{20}$$

Substituting the above values in Eq. (11), we acquire the soliton solution of Eq. (1)

$$u_5(x, t) = -\frac{\sqrt{6}k\coth[kx + t(2k^3 + 3k\delta^2)]}{\sqrt{-\beta_2 - 2\beta_3}}. \quad (21)$$

$$u_6(x, t) = -\frac{\sqrt{6}k\tanh[kx + t(2k^3 + 3k\delta^2)]}{\sqrt{-\beta_2 - 2\beta_3}}. \quad (22)$$



**Figure 3:** The 3D graph of the solution (21) for  $k = 0.2, \delta = 2, \beta_2 = 0.2, \beta_3 = 3, -25 < x < 25, -25 < t < 25$  and 2D graph for this values and  $t = 0.5$

## RESULTS AND DISCUSSION

We obtained some soliton solutions of the generalized third-order (NLSE) equation by applying GKM. We proved their accuracy by graphically representing these obtained results by aid of Wolfram Mathematica 12. Several methods were previously applied by some authors to obtain the solutions of the generalized third-order (NLSE) equation. When we check the solutions we found with those of other authors, our (15) and (22) solutions are similar to the (19) and (37) solutions given by Lu et al., the (12) solution given by Nasreen et al. and the (19) solution given by Seadawy et al. In addition to our (16) and (21) solutions are similar to the (17) solution given by Lu et al., the (13) solution given by Nasreen et al. and the (42) solution given by Seadawy et al. According to our research our (18) and (19) solutions are not given before and are new.

## CONCLUSION

In this made study, We obtained the soliton solutions of generalized third-order (NLSE) describing ultra-short pulses in optical fiber. Thus, GKM, which is easier to apply than other methods, is a very effective and reliable method for finding solutions to NLEEs. In addition, the accuracy of the obtained solutions has been shown with graphical representations.

## Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

## Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

## REFERENCES

- Arshad M, Seadawy AR, Lu D, 2017a. Bright–dark solitary wave solutions of generalized higher-order nonlinear Schrödinger equation and its application in optics. *Journal of Electromagnetic Waves and Applications*, 31(16): 1711–1721.
- Arshad M, Seadawy AR, Lu D, 2017b. Exact bright–dark solitary wave solutions of the higher-order cubic–quintic nonlinear Schrödinger equation and its stability. *Optik-International Journal for Light and Electron Optics*, 138: 40-49.
- Azzouzi F, Triki H, Mezghiche K, El Akrmı A, 2009. Solitary wave solutions for high dispersive cubic–quintic nonlinear Schrödinger equation. *Chaos Solitons and Fractals*, 39(3): 1304-1307.
- Biswas A, Triki H, Zhou Q, Moshokoa SP, Ullah MZ, Belic M, 2017. Cubic–quartic optical solitons in Kerr and power law media. *Optik-International Journal for Light and Electron Optics*, 144: 357–362.
- Chettouh S, Triki H, El-Akrmı Zhou AQ, Moshokoa SP, Ullah MZ, Biswas A, Belic M, 2017. Dipole solitons in an extended nonlinear Schrödinger's equation with higher-order even and odd terms. *Optik-International Journal for Light and Electron Optics*, 145: 644-649.
- Chowdury A, Kedziora DJ, Ankiewicz A, Akhmediev N, 2014. Soliton solutions of an integrable nonlinear Schrödinger equation with quintic terms. *Physical Review*, 90(032922): 1-9.
- Hosseini K, Osman MS, Mirzazadeh M, Rabiei F, 2020. Investigation of different wave structures to the generalized third-order nonlinear Schrödinger equation. *Optik-International Journal for Light and Electron Optics*, 206(164259): 1-7.
- Liu W, Qiu DQ, He JS, 2015. Localized properties of rogue wave for a higher-order nonlinear Schrödinger equation. *Communications in Theoretical Physics*, 63(5): 525-534.
- Lu D, Seadawy AR, Wang J, Arshad M, Farooq U, 2019. Soliton solutions of the generalised third-order nonlinear Schrödinger equation by two mathematical methods and their stability. *Pramana Journal of Physics*, 93(44): 1-9.
- Ma YL, 2019. Interaction and energy transition between the breather and rogue wave for a generalized nonlinear Schrödinger system with two higher-order dispersion operators in optical fibers. *Nonlinear Dynamics*, 97(1): 95-105.
- Nasreen N, Seadawy AR, Lu D, Albarakati WA, 2019. Dispersive solitary wave and soliton solutions of the generalised third order nonlinear Schrödinger dynamical equation by modified analytical method. *Results in Physics*, 15(102641): 1-7.
- Pandir Y, Tuluce Demiray S, Bulut H, 2016. A new approach for some NLDEs with variable coefficients. *Optik-International Journal for Light and Electron Optics*, 127(23): 11183-11190.
- Seadawy AR, Kumar D, Chakrabarty AK, 2018. Dispersive optical soliton solutions for the hyperbolic and cubic-quintic nonlinear Schrödinger equations via the extended sinh-Gordon equation expansion method. *European Physical Journal Plus*, 133(182): 1-11.
- Seadawy AR, Arshad M, Lu D, 2020a. The weakly nonlinear wave propagation of the generalized third-order nonlinear Schrödinger equation and its applications. *Waves in Random and Complex Media*, 1-13.
- Seadawy AR, Nasreen N, Lu D, 2020b. Complex model ultra-short pulses in optical fibers via generalized third-order nonlinear Schrödinger dynamical equation. *International Journal of Modern Physics B*, 34(17): 1-9.
- Triki H, Taha TR, 2012. Solitary wave solutions for a higher order nonlinear Schrödinger equation. *Mathematics and Computers in Simulation*, 82(7): 1333-1340.
- Triki H, Choudhuri A, Porsezian K, Dinda PT, 2018. Dark solitons in an extended nonlinear Schrödinger equation with higher-order odd and even terms. *Optik-International Journal for Light and Electron Optics*, 164: 661-670.
- Tuluce Demiray S, Bulut H, 2015. New exact solutions of the New Hamiltonian Amplitude-Equation and Fokas Lenells equation. *Entropy*, 17(9): 6025-6043.

- Tuluçe Demiray S, Bulut H, 2016. Generalized Kudryashov method for nonlinear fractional double sinh-poisson equation. *Journal of Nonlinear Science and Applications*, 9(3): 1349-1355.
- Tuluçe Demiray S, Bulut H, 2017. New soliton solutions of Davey-Stewartson equation with power-law nonlinearity. *Optical and Quantum Electronics*, 49(117): 1-8.
- Tuluçe Demiray S, Bulut H, 2019. Soliton solutions of some non-linear evolution problems by GKM. *Neural Computing and Applications*, 31(1): 287-294.
- Xu LP, Zhang JL, 2007. Exact solutions to two higher order nonlinear Schrodinger equations. *Chaos Solitons and Fractals*, 31(4): 937-942.

## DNA Barcoding And Species Delimitation Of *Pyrausta* (Lepidoptera: Crambidae, Pyraustinae) With Some Populations In Turkey

Sibel KIZILDAĞ<sup>1\*</sup>

**ABSTRACT:** *Pyrausta aurata* (Scopoli, 1763), *P. despicata* (Scopoli, 1763), *P. sanguinalis* (Linnaeus, 1767), *P. castalis* (Treitschke, 1829), *P. pavidalis* (Zerny in Osthelder, 1935) and *P. gulpembe* (Kemal & Koçak, 2018) from Turkey were first time barcoded in the present study. Turkish populations and new species *P. tatarica* (Kemal, Kızıldağ & Koçak, 2020) were evaluated the phylogenetic positions with other *Pyrausta* species and populations. In the phylogenetic tree based on the mtCOI gene region delimitation of species and populations constructed with Neighbor-joining, Bayesian inference, and maximum-likelihood algorithms. For understanding the importance of the phylogenetic species concept in species delimitation, was reviewed cladistic topology and genetic distances of *Pyrausta* species with new data.

**Keywords:** *Pyrausta*, barcoding, phylogeny, Turkey

<sup>1</sup> Sibel KIZILDAĞ ([Orcid ID: 0000-0003-0182-5154](https://orcid.org/0000-0003-0182-5154)), Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Van, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Sibel KIZILDAĞ, e-mail: sibelkizildag@yyu.edu.tr



## INTRODUCTION

The genus *Pyrausta* is one of the genera in the subfamily (Pyraustinae) with the largest number of species, it has over 320 species. The members of the genus are abundant in number and diversity and these moths widely distributed in the world. However, although the number of species is well known, a taxonomic revision of this genus has not been performed (Sutrisno, 2002). Most species still haven't detailed genital form and definition. This causing doubts that the numbers of species may be higher than known (Chen et al., 2018). Today, with the development of molecular techniques, species boundaries can be tested with molecular characters, and biodiversity can be determined. A strong molecular character can determine whether known species are valid/invalid, and the new species and closely related species, cryptic species in the genus (Patwardhan et al., 2014). In the last years, much progress has been made in the ability to define moths species through the use of mtCOI data (Yang et al., 2016; Mally et al., 2019). This gene region has identity information for many species and determines species boundaries stably as a DNA barcode. The reliability of species boundaries increases with the molecular data of a large number of different populations containing large geographic distributions (Silva-Brandão et al., 2009).

Currently, almost a third of *Pyrausta* species are barcoded and work is still in progress. The vast majority of barcoded samples are from the USA and Canada, then from European countries and China (other Palearctic realms are limited), very few from South America, Africa, and Australia (Anonymous, 2020a). In Turkey were recorded 14 species of this genus (some of which are new species); the names respectively are *Pyrausta aurata* (Scopoli, 1763), *P. despicata* (Scopoli, 1763), *P. sanguinalis* (Linnaeus, 1767), *P. castalis* (Treitschke, 1829), *P. virginalis* (Duponchel, 1832), *P. limbopunctalis* (Herrich-Schäffer, 1849), *P. falcatalis* (Guenée, 1854), *P. pauperalis* (Staudinger, 1879), *P. ferrealis* (Hampson, 1900), *P. mauretanic* (Rebel, 1907), *P. delicatalis* (Caradja, 1916), *P. pavidalis* (Zerny in Osthelder, 1935), *P. gulpembe* (Kemal & Koçak, 2018), and *P. tatarica* (Kemal, Kızıldağ & Koçak, 2020). But there isn't any molecular data that still belongs to them (except *P. tatarica*) (Kemal and Koçak, 2018; Kemal et al., 2020; Anonymous, 2020b).

In this study, six species of the *Pyrausta* belong to Cesa Collection recorded from Turkey were firstly barcoded. Molecular taxonomic relationships of the present *Pyrausta* species were evaluated with new data.

## MATERIALS AND METHODS

Turkish populations of *Pyrausta* were evaluated by keeping materials of the Centre for Entomological Studies Ankara (Cesa) Collection (Table 1).

**Table 1.** Registration information belong to Turkish populations of *Pyrausta*

| No | Species                     | Province | Accession numbers in GenBank | Cesa Sample ID Numbers |
|----|-----------------------------|----------|------------------------------|------------------------|
| 01 | <i>Pyrausta despicata</i>   | Bitlis   | MN630685                     | Cesa Pyr015            |
| 02 | <i>Pyrausta despicata</i>   | Van      | MN630686                     | Cesa Pyr044            |
| 03 | <i>Pyrausta castalis</i>    | Hakkari  | MN630688                     | Cesa Pyr040            |
| 04 | <i>Pyrausta pavidalis</i>   | Van      | MN624144                     | Cesa Pyr009            |
| 05 | <i>Pyrausta tatarica</i>    | Van      | MN640435                     | Cesa Pyr059            |
| 06 | <i>Pyrausta sanguinalis</i> | Bitlis   | MN630687                     | Cesa Pyr014            |
| 07 | <i>Pyrausta aurata</i>      | Van      | MN630689                     | Cesa Pyr010            |
| 08 | <i>Pyrausta aurata</i>      | Van      | MN630690                     | Cesa Pyr045            |
| 09 | <i>Pyrausta gulpembe</i>    | Siirt    | MN259520                     | Cesa Pyr002            |

The legs from the *Pyrausta* specimens were cleaned thoroughly with ethanol and dried. The RED Extract-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) previously used by Kemal et al., (2018) was used to extract the total genomic DNA extraction from the tissue in the first stage and DNA barcode region copied also in the second stage. The PCR products were sent to Macrogen (Macrogen, Amsterdam, Netherlands) with the LepF1/R1 universal primers for purification and bilateral sequencing.

For phylogenetic analysis, barcodes of 533 species/ populations belong to *Pyrausta* were downloaded from GenBank and Boldsystem database, and the data set was prepared by adding barcodes of 9 populations presented in this study (Anonymous, 2020a; 2020c). Genetic distances between populations and species were calculated using the Kimura 2-parameter distance model (Kimura, 1980). The neighbor-joining (NJ) tree was constructed used the Kimura 2-Parameter distance model in MEGA 7.0 software. Maximum-likelihood (ML) bootstrapping analyses were achieved with 1000 replicates using RAxML Blackbox on XSEDE v.8.2.4 (Stamatakis et al., 2008) on the CIPRES Science Gateway. A Bayesian inference (BI) analysis was performed in MrBayes 3.2.6 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) with the Markov chain Monte Carlo algorithm. The program JModeltest v.2.1.7 (Posada, 2008) selected the TIM3+I+G evolutionary model as the best model according to the Akaike information criterion for Bayesian inference. The program was run for 5 000 000 generations, with a sample frequency of 100 and a burn-in of 12 500.

## RESULTS AND DISCUSSION

In this study, barcodes of nine Turkish populations of seven species belonging to *Pyrausta* are presented for the first time. Also *P. gulpembe* and *P. pavidalis* were barcoded for the first time on a global scale and recorded in GenBank. *P. tatarica*'s phylogeny estimate is presented for the first time in this study.

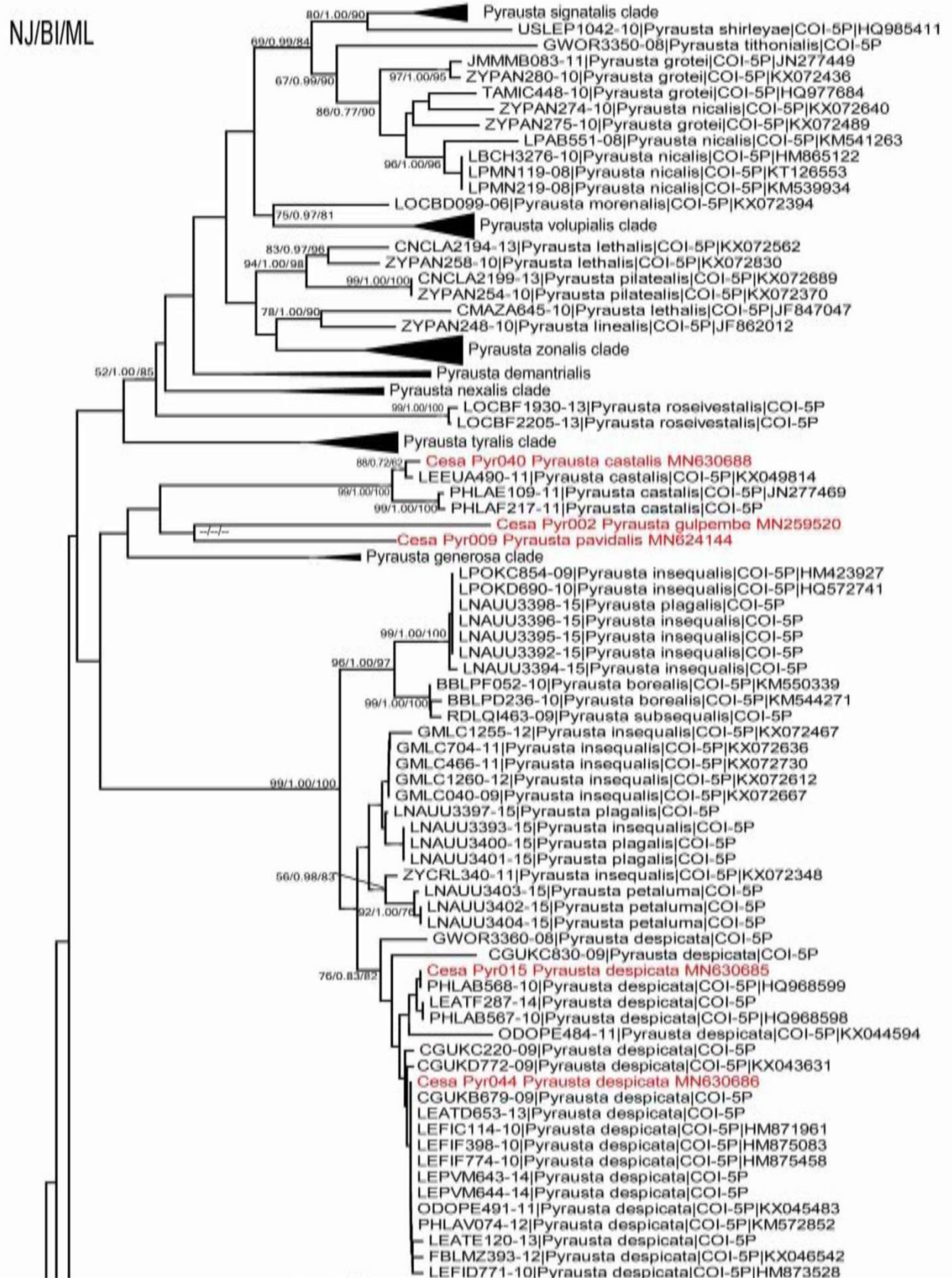
Intragenus phylogeny prediction was calculated with three algorithmic trees. Since topologies of the NJ, ML, and BI phylogenetic trees are each other similar, three-support values were shown in a single (NJ) tree (Figure 1, Figure 2, Figure 3). Today, detailed phylogenetic trees of 75 species, whose exact barcode area has already been determined, have been built. Likewise, all of the populations of these species were presented in the form of "clades" by constricting due to taking up space in the consensus phylogenetic tree. Although *Pyrausta* spp. were generally seen as monophyletic taxa, populations of some species are not monophyletic. Different populations of some species were found to be more closely related to populations of other species than congeners. These non-monophyletic populations may have been misdiagnosed morphologically or morphologically apomorphic characters could not be identified between these taxa. In the phylogenetic tree, the Turkish population of *P. castalis* is located in the "castalis clade". Genetic distances between *P. castalis* Turkish population and European (Greece, Italy and Macedonia) populations are between 0.31% and 1.39%, and NJ/BI/ML node values are 88/0.72/62. *P. pavidalis* and *P. gulpembe* located to this clade as a sister group and the *P. generosa* clade were basal to them (Figure 1). The genetic distance of the Turkish population of *P. castalis* to *P. gulpembe* was 9.31%, to *P. pavidalis* to 7.88% and for *P. generosa* is 8.25%. The genetic distance between *P. gulpembe* and *P. pavidalis* is 8.05% and 9.31% with *P. generosa*. In addition, the genetic distance between *P. pavidalis* and *P. generosa* is 9.50%.

The monophyletic *P. despicata* clade formed from the 20 populations (18 from Europe, 2 from Turkey) with the strong support values (NJ /BI /ML; 76/0.83/82) (Figure 1). The genetic distances between these populations were in the range of 0.00-1.56% and were 2.04% with the German population (KX044594). *P. despicata* clade, which also includes the Turkish population, is a monophyletic taxon and was in a closely related position with the clade, mostly North American species. Populations of North American species seemed to be phylogenetically problematic in them.

In the presented phylogenetic tree, *P. tatarica* and *P. aerealis* clade are closely related and have a sister position with almost complete support values (NJ /BI /ML; 99/1.00/100) (Figure 2). Genetic distances between populations of two species are in the range of 2.85-4.49%.

*P. sanguinalis* clade and *P. andrei* are sister groups and the genetic distance between each population is 11.39% on average (Figure 3). The genetic distance between the *P. sanguinalis* populations and the Turkish population is in the range of 0.15-1.24%.

*P. aurata*, *P. generosa*, and *P. orphisalis* are closely related species. *P. aurata* clade was separated from the two species (generosa/orphisalis) with strong support values (NJ/BI/ML; 98/1.00/97) (Figure 3). The genetic distance between *P. aurata* and *P. generosa* is 5.67% and 5.50% with *P. orphisalis*. Also, the genetic distance between *P. generosa* and *P. orphisalis* is 2.85%.



**Figure 1.** NJ, BI, and ML analyses based on mt COI gene sequences. The sequences of *Pyrausta* populations in the study are indicated in red-bold. Numbers at the nodes indicate the BI posterior probability and the NJ/ML bootstrap values. A dash indicates a value of less than 0.50 (BI) or 50% (NJ/ML). Bar, 1 substitutions per 100 nucleotide positions.

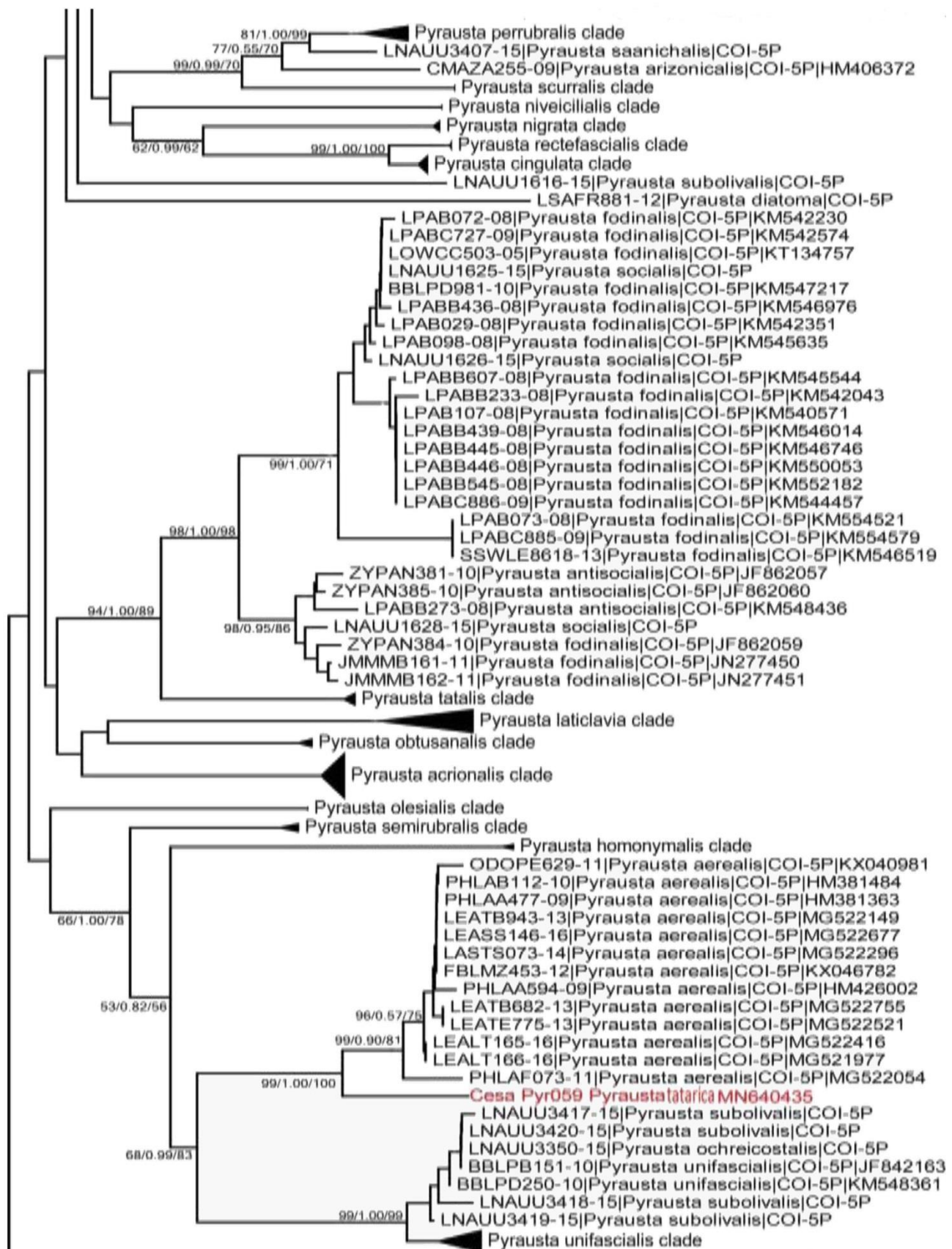


Figure 2. Continuation of the phylogenetic tree.

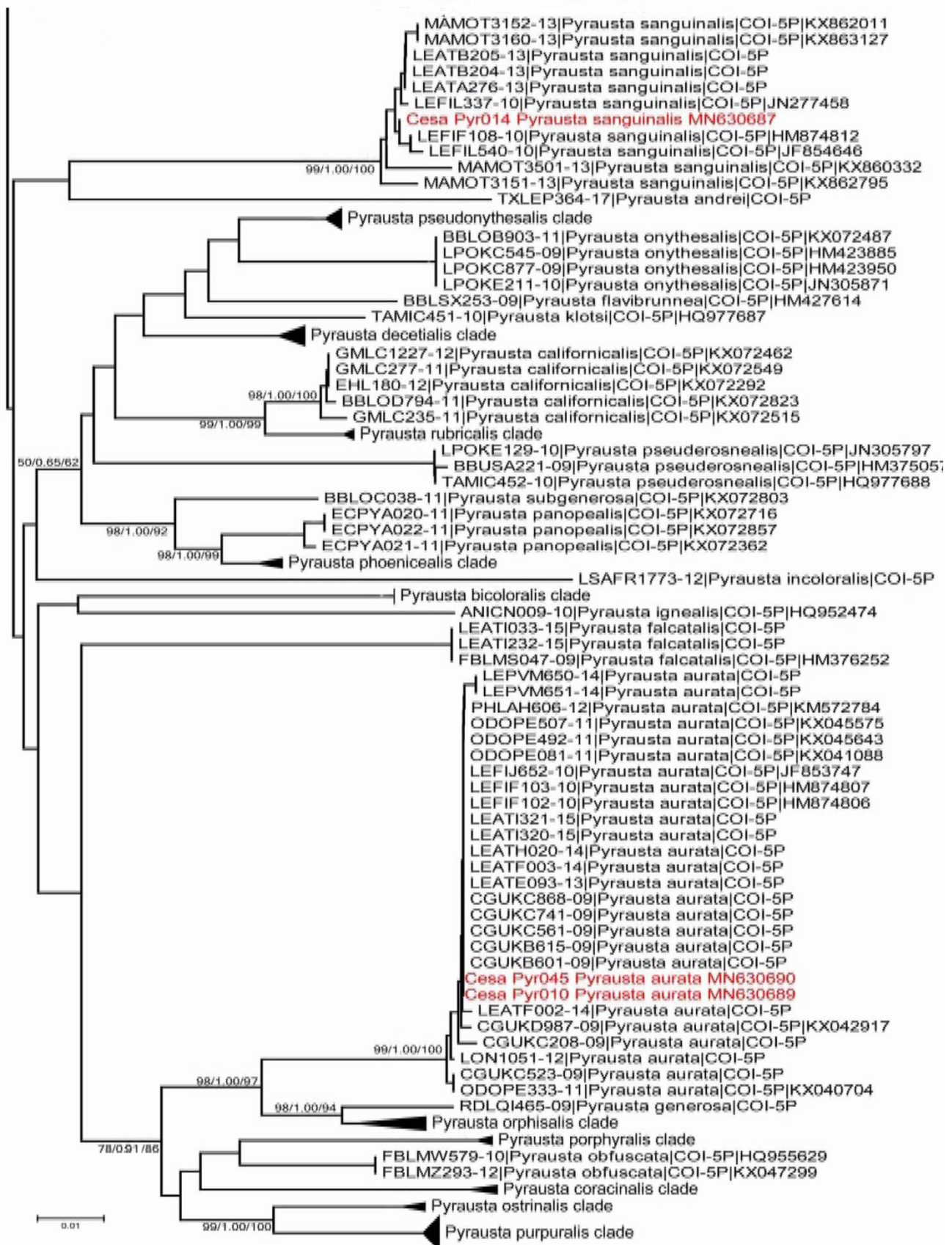


Figure 3. Continuation of the phylogenetic tree.

## CONCLUSION

In this study, *Pyrausta aurata* (Scopoli, 1763), *P. despicata* (Scopoli, 1763), *P. sanguinalis* (Linnaeus, 1767), *P. castalis* (Treitschke, 1829), *P. pavidalis* (Zerny in Osthelder, 1935) and *P. gulpembe* (Kemal and Koçak, 2018), molecular barcodes of Turkey's populations were presented for the first time.

The clustering of these populations in the same clade with their congeners in the presented phylogenetic tree indicates that they were diagnosed morphologically correctly by taxonomists. In other words, the molecular taxonomies of these species were compatible with the morphological species distinction. In addition, it has been found that the diagnostic characters of these species represent the species correctly and that the species limits are evident at the molecular level. Kemal and Koçak (2018) defined *P.gulpembe* as the new morphological species, and for the first time it was confirmed by testing phylogenetic analysis in this study that this species was a separate species. For the first time in this study, *P. tatarica* evaluated the phylogenetic position. While defining this species, the authors reported that it was the closest taxon to *P. aerealis* morphologically and molecularly. In the presented phylogenetic tree, *P. tatarica* was positioned as a sister to the *P. aerealis* clade. In other words, the morphological definition and the phylogeny prediction of *P. tatarica* were consistent.

As a result, there is a huge number of deficiencies in the molecular data of *Pyrausta*. Barcodes of a large number of species and populations from different geographies are required to estimate the correct phylogeny. For this reason, in the present study molecular taxonomic evaluation of *Pyrausta* species and populations was done by the results obtained with new data from Turkey. It is aimed to shed light on similar studies in the future.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Special thanks are given to Prof. Dr. Ahmet Ömer KOÇAK and Dr. Muhabbet KEMAL for their continuous help, comments, and use of the Cesa Collection.

## Conflict of Interest

I declare that there is no conflict of interest during the planning, execution and writing of the article.

## Author's Contributions

I hereby declare that the planning, execution and writing of the article was done by me as the sole author of the article.

## REFERENCES

- Anonymous, 2020a. Barcode Of Life Data System. <http://www.boldsystems.org/index.php>. (Date of access: 9 May 2020).
- Anonymous, 2020b. Global information system on pyraloidea. <http://www.pyraloidea.org>. (Date of access: 9 May 2020).
- Anonymous, 2020c. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Pyrausta>. (Date of access: 9 May 2020).
- Chen K, Zhang D, Stănescu M. 2018. Revision of the genus *Eumorphobotys* with descriptions of two new species (Lepidoptera, Crambidae, Pyraustinae). *Zootaxa*, 4472 (3): 489–504.
- Kemal M, Yıldız İ, Kızıldağ S, Uçak H, Koçak, AÖ. 2018. Taxonomical and molecular evaluation of *Apochima agassiz* in East Turkey, with a description of a new genus (Lepidoptera, Geometridae, Ennominae). *Miscellaneous Papers*, 169: 1–14.
- Kemal M, Koçak A. 2018. Vernal aspect of the Lepidoptera from Nemrut Mountain and the vicinity of Karadut in the Kahta district with a description of a new species (SE Turkey, Adıyaman Province). *Miscellaneous Papers*, 174:1–22.
- Kemal M, Kızıldağ S, Koçak A. 2020. Description of a new *Pyrausta* species from East Turkey with comments about related species (Lepidoptera, Pyraloidea). *Miscellaneous Papers*, 210: 1–5.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111–120.

- Maes K V N. 2002. On the systematic position of some Palaearctic Pyraustinae (Pyraloidea, Crambidae). *Nota Lepidopterologica*, 24 (4):51 –57.
- Mally R, Hayden JE, Neinhuis C, Jordal BH, Nuss M. 2019. The phylogenetic systematics of Spilomelinae and Pyraustinae (Lepidoptera: Pyraloidea: Crambidae) inferred from DNA and morphology. *Arthropod Systematics & Phylogeny*, 77(1): 141–204.
- Patwardhan A, Ray S, Roy A. 2014. Molecular Markers in Phylogenetic Studies – A Review. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 2: 131.
- Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology Evolution*, 25 (7):1253–1256.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572–1574.
- Shodotova AA. 2011. New Species of the Genus *Pyrausta* (Lepidoptera, Crambidae) from Southern Siberia and Transcaucasia. *Zoologicheskii Zhurnal*, 90 (4): 505–512.
- Silva-Brandão KL, Lyra ML, Freitas AVL. 2009. Barcoding Lepidoptera: Current Situation and Perspectives on the Usefulness of a Contentious Technique. *Neotropical Entomology*, 38 (4): 441–451.
- Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Systematic Biology*, 57(5):758–771.
- Sutrisno H. 2002. A Preliminary Study on Relationships among Selected Australian Members of the Tribe Spilomelini (Lepidoptera: Crambidae: Pyraustinae). *Zoological Science*. 19: 915–929.
- Yang Z, Landry J-F, Hebert PDN. 2016. A DNA Barcode Library for North American Pyraustinae (Lepidoptera: Pyraloidea: Crambidae). *PLoS ONE*, 11(10): e0161449.

**Atf İçin:** Sırlıbaş F. A, Kumbıçak Z, Kumbıçak Ü, 2021. Türkiye’de Yayılış Gösteren *Arctosa maculata* (Hahn, 1822) (Araneae: Lycosidae) Türünün Karyolojik Özelliklerinin Araştırılması İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1497-1503.

**To Cite:** Sırlıbaş F. A, Kumbıçak Z, Kumbıçak Ü, 2021. Demonstrating Distribution in Turkey *Arctosa maculata* (Hahn, 1822) (Araneae: Lycosidae) Type of Investigation of Karyological Features Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1497-1503.

## Türkiye’de Yayılış Gösteren *Arctosa maculata* (Hahn, 1822) (Araneae: Lycosidae) Türünün Karyolojik Özelliklerinin Araştırılması

Fahrettin Anıl SIRLIBAŞ<sup>1\*</sup>, Zübeyde KUMBIÇAK<sup>2</sup>, Ümit KUMBIÇAK<sup>2</sup>

**ÖZET:** Bu çalışmada Lycosidae familyası içerisinde yer alan *Arctosa maculata* (Hahn, 1822) türünün karyotip analizi ülkemizde ilk kez yapılmıştır. Kromozomların elde edilmesinde standart giemsa boyama yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem, gonadların elde edilmesi, hipotonik uygulama, fiksasyon ve boyama olmak üzere dört ana basamak içermektedir. Çalışmada türe ait diploid kromozom sayısı  $2n_{\sigma}=28$  olarak tespit edilmiştir. Eşey kromozomu sistemi  $X_1X_20$  olup; tüm kromozomlar telosentrik tiptedir. Otozomal kromozomların relatif uzunluklarının kademeli olarak bir azalış gösterdiği kaydedilmiştir. Eşey kromozomlarının mayoz I evrelerinde pozitif heteropiknotik özellikte, mayoz II evrelerinde ise izopiknotik özellikte oldukları belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Lycosidae, Karyotip, Eşey kromozomu

### Demonstrating Distribution in Turkey *Arctosa maculata* (Hahn, 1822) (Araneae: Lycosidae) Type of Investigation of Karyological Features

**ABSTRACT:** In this study, karyotype analysis of *Arctosa maculata* (Hahn, 1822) species in Lycosidae family was performed for the first time in our country. Standard giemsa staining method was applied to obtain chromosomes. This method includes four main steps: obtaining gonads, hypotonic application, fixation and staining. In the study, the number of diploid chromosomes belonging to the species was determined as  $2n_{\sigma} = 28$ . The sex chromosome system is  $X_1X_20$ ; all chromosomes are of telosentric type. It has been noted that the relative lengths of the autosomal chromosomes gradually decrease. It was determined that sex chromosomes have positive heteropiknotic features in meiosis I phases and isopiknotic features in meiosis II phases.

**Keywords:** Lycosidae, Karyotype, Sex chromosome

<sup>1</sup> Fahrettin Anıl SIRLIBAŞ ([Orcid ID: 0000-0002-8071-6441](https://orcid.org/0000-0002-8071-6441)), Biyoloji Bölümü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, 50300 Nevşehir

<sup>2</sup> Zübeyde KUMBIÇAK ([Orcid ID: 0000-0001-5949-1092](https://orcid.org/0000-0001-5949-1092)), Ümit KUMBIÇAK ([Orcid ID: 0000-0002-1294-3706](https://orcid.org/0000-0002-1294-3706)), Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen Edebiyat Fakültesi, Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, 50300 Nevşehir

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Fahrettin Anıl SIRLIBAŞ, e-posta: f.anilsirlibas@gmail.com



## GİRİŞ

Arthropoda şubesinin Arachnida sınıfı içerisinde yer alan örümcekler, dünya üzerinde çok geniş yayılım göstererek birçok habitatta bulunan en eski yırtıcılar olarak bilinmektedir. Örümcekler, günümüze kadar tanımı yapılmış 4163 cins ve 48440 tür ile büyük çeşitlilik göstermektedir (World Spider Catalog, 2020).

Örümcekler, Kuzey Kutup Adaları ve çöl bölgeleri dâhil yerkürenin birçok farklı bölgesinde görülmektedir (Foelix, 1983). Bitki örtüsü bakımından verimli alanlarda daha çok bulunan örümcekler; kum tepeleri, gelgit alanları ve dağ tepeleri gibi bitki örtüsünün verimsiz olduğu alanlarda da yaşayabilmektedir (Foelix, 1983; Lamoral, 1968).

Örümcekler, ekosistemde hem avcı hem de diğer canlılar için yiyecek kaynağı olmalarından dolayı küresel biyoçeşitliliğin tamamlayıcı bir parçası olarak görülmektedir. Tarım zararlılarının başat avcıları olmaları örümceklerin ekolojik önemini öne çıkarmaktadır. Ayrıca örümcekler uzun zamandır biyokimyasal (örümcek ağı ve zehri), davranışsal (kur yapma ve ağ oluşturma davranışları) ve ekolojik (yiyecek arama, av-avcı ilişkileri, entegre zararlı yönetimi) araştırmalarda önemli bir model organizma olarak kullanılmaktadır (Mathew ve ark., 2009).

Örümcekler üzerine yapılan bu çalışmalarla birlikte sitogenetik çalışmalarda son yıllarda artarak devam etmektedir (Kumbıçak ve ark., 2011). Bu çalışmalar sayesinde örümceklerin kromozom morfolojileri, diploid kromozom sayıları, eşey kromozom sistemleri ve karyotip organizasyonları hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir.

Örümcekler, Mesothelae, Mygalomorphae ve Araneomorphae olmak üzere 3 alt sınıfa ayrılmaktadır (Kumbıçak, 2014). Araneomorphae örümceklerin diploid kromozom sayısı  $2n_{\sigma}^{\delta}=7-116$  arasında değişmekte ve diğer iki alt sınıfa kıyasla daha yüksek çeşitlilik göstermektedir (Araujo, 2007). Bu üç alt sınıf içerisinde Araneomorphae örümcekler; kromozom morfolojilerinin genellikle akrosentrik olması ve düşük kromozom sayıları nedeniyle daha fazla araştırılmıştır (Kumbıçak ve ark., 2011).

Günümüze kadar 868 örümcek türünün karyotip ve eşey kromozom sistemi tespit edilmiştir (Araujo ve ark., 2020). Yapılan çalışmalarda örümcek karyotiplerinde çoklu eşey kromozom sisteminin baskın olduğu görülmektedir. Çalışmalarda eşey kromozom sisteminin çoğunlukla  $X_0$ ,  $X_1X_20$ ,  $X_1X_2X_30$ ,  $X_1X_2X_3X_40$  şeklinde çeşitlilik gösterdiği bulunmuştur; 0, Y kromozomunun örümceklerde bulunmadığını göstermektedir (Korinkova ve Kral, 2013). Ancak bazı örümceklerde XY,  $X_1X_2Y$ ,  $X_1X_2X_3Y$  gibi eşey kromozomları da bulunmaktadır. Bu eşey kromozom sistemleri entelejin (Araneomorf örümcekler içerisinde yer alan bir grup) örümceklerde çok sık görülüp haplojin (Araneomorf örümcekler içerisinde yer alan bir grup) örümceklerde de bulunmaktadır (Kral ve ark., 2006; Suzuki, 1954).

Lycosidae familyası, Salticidae ve Araneidae ile sitogenetik çalışmaların en fazla yapıldığı örümcek ailelerinden biri olmasına rağmen; toplam tür sayısına bakıldığında yapılan sitogenetik analizlerin çok az olduğu görülmektedir. Sitogenetik çalışmalar sonucu likosid örümceklerin 23 cins ve 120 türünün analiz edildiği görülmektedir (Araujo ve ark., 2020). Bu durum 2431 türü bulunan Lycosidae familyasının %4’ünden biraz fazlasının çalışıldığını sonucunu çıkarmaktadır (World Spider Catalog, 2020). Likosid örümceklerin diploid kromozom sayısı  $2n=18$  *Lycosa sp* (Srivastava ve Shukla, 1986) ile  $2n=30$  *Arctosa alpigea* (Doleschall, 1852) (Dolejs ve ark., 2011) arasında değişmektedir. Akrosentrik kromozom morfolojisinin baskın olduğu likosid örümceklerde telosentrik tip kromozomlara az da olsa rastlanmaktadır. Likosid örümceklerin eşey kromozom sistemi  $X_1X_20$  olarak belirlenmesine rağmen

*Lycosa sp.* türünde  $X_1X_2Y$  ve *Lycosa sp.* (grup thorelli) türünde  $X_1X_2X_3$  gibi familya genelinden farklı eşey sistemleri de görülmektedir (Araujo ve ark., 2020).

Bu çalışmada, Lycosidae familyasına ait *Arctosa maculata* (Hahn, 1822) türünün hücre bölünme aşamalarında kromozom durumları analiz edilerek; diploid kromozom sayısının belirlenmesi, eşey belirleme sisteminin saptanması ve karyotipinin hazırlanması ile likosit örümceklerle ilgili yapılan sitogenetik çalışmalardaki literatür eksikliğine katkı sağlanması hedeflenmektedir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

Arazi çalışmaları örümceklerin üreme dönemlerinin aktif olduğu Mart-Mayıs ayları (2018) arasında yapılmış ve örümcekler doğrudan elle toprak yüzeyinden ve taş altlarından canlı olarak yakalanmıştır. Arazi bölgesi, Pozantı (Adana, 37°25'32.10" K ve 34°52'25.01"D, 4♂) ve Tarsus (Mersin, 36°55'39.62" K ve 34°58'05.46"D, 7♂) olmak üzere iki alanda gerçekleştirilmiştir. Her birey ayrı ayrı plastik tüplere alınmış ve canlı halde laboratuvara getirilmiştir. Diseksiyon yapıncaya kadar örümcekler sık aralıklarla sirke sinekleri ile beslenmiştir.

Bu çalışma, Bedo (1984) metodunda bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Diseksiyon sırasında canlı olan erkek örümcekler prosoma (baş ve göğüs) ve opistosoma (karın) vücut kısımlarını bağlayan pedisel bölgesinden ayrılarak öldürülmüş ve opistosoma kısmından gonadlar çıkarılmıştır. Gonadlar çıkarıldıktan sonra hipotonik uygulama yapılmıştır. Bunun için; 2000 rpm’de 5 dakika santrifürij edilerek süpernatant kısmı atılmış gonadların bulunduğu tüpe 2-3 ml hipotonik çözelti eklenerek 40 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 2000 rpm’de 5 dakika santrifürij (x2 kez) edilen ve süpernatant kısmı uzaklaştırılan gonadlar fiksasyon aşamasına hazır duruma gelmiştir. Gonadların bulunduğu tüpe fiksatif eklenerek 10 saniye vortekste karıştırılmıştır. 2000 rpm de 10 dakika santrifürij (x2 kez) yapılarak son süpernatant kısımda uzaklaştırılmıştır. Kalan malzemenin üzerine 1 ml fiksatif eklenerek cam pipetle karıştırılmış ve karışımdan bir miktar alınarak 60 cm mesafeden lam üzerine damlatılmıştır. Preparatlar gece boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış ve daha sonra en az bir gün olmak koşuluyla buzdolabında (+4°C) bekletilmiştir. Elde edilen tüm kromozom preparatları faz kontrast mikrobunda incelenerek hücre bölünmesi içeren preparatlar tespit edilmiştir. Bu preparatlar daha sonra fosfat tampon içeren %5’lik Giemsa boyası (pH=6.8) ile 50 dk boyanmıştır. Boyama işlemi sonunda preparatlar sırasıyla musluk suyu ve distile su ile yıkanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Preparatlar mikroskop incelemesi yapıncaya kadar buzdolabında (+4°C) muhafaza edilmiştir.

Hazırlanan preparatlar Olympus CX21 araştırma mikroskopunda 10X büyütmede incelenerek erkek ve dişi bireyler için mitotik metafaz ve mayoz evreler tespit edilmiştir. Kromozomların ayrıntılı olarak incelenmesi ise 100X büyütmede gerçekleştirilmiştir.

*Arctosa maculata* (Hahn, 1822)’ya ait karyotip yapılması aşamasında en az 10 metafaz evresine ait fotoğraflar, Olympus BX53 araştırma mikroskobu ve DP26 kamera sistemi, CellSens programı (Olympus) ile çekilmiştir. Kromozomların uzunlukları CellSens programı ile ölçülmüş ve kromozomların sentromer konumları Levan ve ark. (1964) göre belirlenmiştir. Kromozomların çiftler halinde sıralanması ise Adobe Photoshop CS6 programı ile gerçekleştirilmiştir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### *Arctosa maculata* (Hahn, 1822)’nin Karyotip ve Eşey Kromozomu Sistemi

*Arctosa maculata* (Hahn, 1822)’nin erkek bireylerinin spermatogonial metafaz evrelerinde diploid sayı  $2n♂=28$  olarak tespit edilmiştir (Şekil 1). Eşey kromozomu sistemi  $X_1X_20$  olup otozomlar ve eşey kromozomları dâhil olmak üzere kromozom morfolojisi telosentrik olarak bulunmuştur. Otozomal

kromozom çiftlerinin relatif uzunlukları %9.28 ve %5.36 arasında olup en büyük kromozomdan en küçük kromozoma doğru kademeli olarak azalma görülmektedir. Eşey kromozomlarının relatif uzunlukları ise  $X_1$  için %7.10 ve  $X_2$  için %5.22 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 1: *Arctosa maculata*'ya ait karyogram, 13 çift otozomal kromozomlar ve  $X_1$ ,  $X_2$  şeklindeki eşey kromozomları (Ölçüm=10  $\mu$ m).

### *Arctosa maculata* (Hahn, 1822)'nin Bazı Mitotik ve Mayotik Evrelerinin İncelenmesi

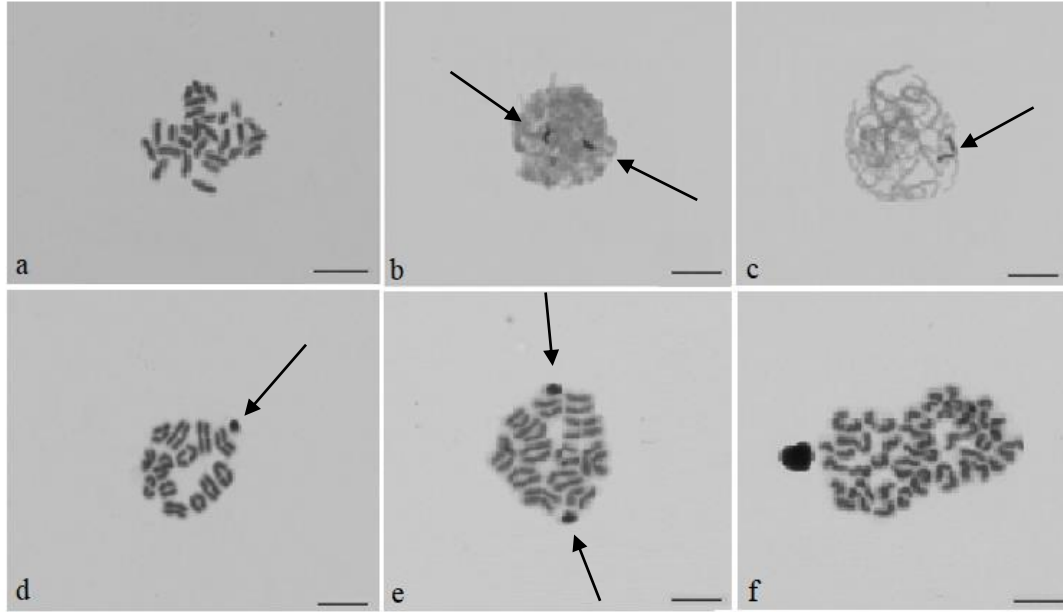
Metafaz evresinde kromozomlar kısalıp kalınlaşmış ve sayılabilir durumdadır. Bu evrede kromozomlar sayılarak diploid sayı  $2n\sigma=28$  olarak belirlenmiştir (Şekil 2a). Metafaz evresinde kromozomlar tam şeklini aldığı için kromozom morfolojisinin telosentrik tipte olduğu tespit edilmiştir.

Mayotik profaz I'in leptoten ve zigoten evrelerinde eşey kromozomları otozomlara kıyasla daha fazla kısalıp kalınlaştığı için daha koyu boyanarak pozitif heteropiknotik özellik (eşey kromozomlarının somatik kromozomlardan daha koyu boyanması) göstermektedir (Şekil 2b). Profaz I'in pakiten evresinde eşey kromozomları terminal uçları ile birbirine bağlı durumda olup pozitif heteropiktonik özellik göstermektedir (Şekil 2c). Ayrıca bu evrelerde eşey kromozomları çekirdek yüzeyinde konumlanmıştır. Diploten (Şekil 2d) ve diyakinezde (Şekil 2e) toplam 13 otozomal bivalent ve iki eşey kromozomu belirlenmiştir. Eşey kromozomları yine pozitif heteropiknotik özellikte olup çekirdek yüzeyinde yer almıştır. Anafaz I ve profaz II evrelerinde eşey kromozomları izopiknotik özellikte (eşey kromozomlarının somatik kromozomlarla aynı derecede boyanması ve aralarında bir farkın olmaması) olmaları nedeniyle otozomlardan ayırt edilememiştir (Şekil 2f). Bu evrelerde  $n=13$  (otozomlar) ve  $n=15$  (otozomlar ve iki eşey kromozomu) olan iki yeni çekirdek kaydedilmiştir. Anafaz II evresi de  $n=13$  ve  $n=15$  olan dört yeni çekirdek ile sonuçlanmıştır. Mayoz bölünme evrelerinde eşey kromozomları birbirinden ayrılmayarak aynı gamette yer almıştır.

Sitogenetik bilimi, kromozomların bir mikroskop yardımıyla kolaylıkla incelenebilmesi sebebiyle az maliyet ile veriler elde edilen bir bilim dalıdır. Bu bilim dalındaki gelişmiş metotlara rağmen örümceklerle yapılan sitogenetik analizler, örümcek kromozomlarının küçük boyutlu olması ve eşeysel dönemlerinin kısa sürmesi nedeniyle kromozom elde edilme olasılığının düşük olması gibi nedenlerle henüz yetersizdir. Günümüze kadar bilinen 48440 tür örümcekte sadece 868'inin karyotip ve eşey kromozomu sistemleri bilinmektedir (Araujo ve ark., 2020).

İlkel örümcekler olarak kabul edilen Mesothelae alt sınıfı örümcekleri ile yapılan çalışmalarda bu örümceklerin kromozom morfolojisi metasentrik, submetasentrik, akrosentrik ve telosentrik tipte heterojen bir yapıya sahip olup çok sayıda kromozom içerir. Modern örümcekler olarak kabul edilen Araneomorphae örümcekleri ise daha az sayıda kromozom içerip kromozom morfolojisi akrosentrik ya da telosentrik olmak üzere homojen bir yapı gösterir (Araujo ve ark., 2020). Örümceklerde bugüne kadar sıklıkla tespit edilmiş  $X_0$ ,  $X_1X_2$ ,  $X_1X_2X_3$ ,  $X_1X_2X_3X_4$ ,  $XY$ ,  $X_1X_2Y$ ,  $X_1X_2X_3Y$  gibi eşey kromozomu

sistemlerinin  $X_1X_20$  sisteminden geliştiği düşünülmektedir. İlkel örümcek türlerinde örneğin Liphistiidae (Mesothelae) (Suzuki, 1954) familyasına ait taksonlarda  $X_1X_20$  eşey kromozomu sisteminin varlığı bu görüşü desteklemektedir.



Şekil 2: *Arctosa maculata*; a. Mitotik metafaz,  $2n♂=28 X_1X_2$ , b. Zigoten c. Pakiten, d. Diploten, 13 otozomal bivalent ve iki eşey kromozomu, e. Diyakinez, 13 otozomal bivalent ve iki eşey kromozomu, f. Profaz II (Ölçüm=10 µm).

Lycosidae familyası, Salticidae ve Araneidae ile sitogenetik çalışmaların en fazla yapıldığı örümcek ailelerinden biri olmasına rağmen; toplam tür sayısına bakıldığında yapılan sitogenetik analizlerin 23 cins ve 120 tür ile sınırlı kaldığı dikkati çekmektedir (Araujo ve ark., 2020). Bu durum 2431 türü bulunan Lycosidae familyasının yaklaşık %4'lük kısmının kromozomal bilgilerinin elde edildiğini işaret etmektedir (The World Spider Catalogue, 2020). Yapılan çalışmalarda diploid kromozom sayısının  $2n=18-30$  arasında değiştiği tespit edilmiştir (Araujo ve ark., 2020). Baskın olarak akrosentrik kromozom morfolojisi görülen likosit örümceklerde eşey kromozom sistemi ise  $X_1X_20$  olarak belirlenmiştir (Araujo ve ark., 2020). Bu özellikler Lycosidae familyasının büyük çoğunluğunda görülmektedir. Ancak *Lycosa sp.* türünde  $X_1X_2Y$  ve *Lycosa sp.* (grup thorelli) türünde  $X_1X_2X_3$  gibi eşey kromozom sistemlerine az da olsa rastlanmaktadır.  $X_1X_2Y$  eşey kromozom sisteminin  $X_1X_20$  eşey kromozom sisteminden köken aldığı ve bu sistemde Y kromozomu oluşmasını sağlayan kromozomlar ile otozomlar arasındaki füzyonlarla ortaya çıktığı düşünülmektedir (Silva ve ark., 2002). *Lycosa sp.* (grup thorelli) de görülen  $X_1X_2X_3$  eşey kromozom sisteminin ise  $X_1X_20$  sisteminde meydana gelen non-disjunction (ayrılmama) sonucunda X kromozomları arasındaki homoloji kaybı nedeniyle oluştuğu varsayılmaktadır (Brum-Zorrilla ve Cazenave, 1974).

Şimdiye kadar *Arctosa* cinsine ait 10 türün karyotip özellikleri araştırılmıştır. *Arctosa alpigea* (Doleschall, 1852) türü hariç diploid kromozom sayıları  $2n=28$  ve eşey kromozom sistemi  $X_1X_20$  olarak tespit edilmiştir (Araujo ve ark., 2020). *Arctosa alpigea* (Doleschall, 1852) türünde ise diploid sayı  $2n=30$  olarak belirlenmiş ayrıca otozomal kromozomlar akrosentrik tipte iken eşey kromozomları subtelosentrik olarak kaydedilmiştir (Dolejs ve ark., 2011). *Arctosa* cinsine ait veriler bu çalışma ile karşılaştırıldığında *Arctosa maculata* (Hahn, 1822)'nin diploid kromozom sayısı ve eşey kromozom sisteminin cins düzeyinde korunduğu belirlenmiştir.

Ülkemizde ise Lycosidae familyasına ait *Arctosa cinerea* (Fabricius, 1777), *Arctosa perita* (Latreille, 1799), *Pardosa alacris* (C.L. Koch, 1883), *Pardosa bifasciata* (C. L. Koch 1834), *Pardosa saltans* (Töpfer-Hoffman, 2000), *Alopecosa pulverulenta* (Clerck, 1757) ve *Alopecosa accentuata* (Latreille, 1817), *Lycosa piochardi* (Simon, 1876) türlerinin kromozom sayısı ve eşey kromozomu sistemi tespit edilmiştir (Sırlıbaş, 2017). Bu çalışmalara göre bütün türlerde diploid kromozom sayısı ve eşey kromozomu sistemi  $2n♂=28$ ,  $X_1X_20$  olarak bulunmuştur. Bu sonuç likosid örümceklerin ülkemiz popülasyonlarında karyotip formülü bakımında yüksek düzeyde korunmuşluğun varlığını göstermektedir. Ayrıca bu türlerde kromozom morfolojileri akrosentrik ya da telosentrik tipte bulunurken, eşey kromozomları mayoz bölünmenin birinci evrelerinde pozitif heteropiknotik özellikte ve ikinci mayoz bölünme evrelerinde ise izopiknotik özellikte tespit edilmiştir.

## SONUÇ

Bu çalışma ile ülkemiz popülasyonuna ait *Arctosa maculata* (Hahn, 1822)’nin kromozomal özellikleri ilk kez tanımlanmıştır. Türün eşey kromozom sistemi  $X_1X_20$ , diploid kromozom sayısı ise  $2n♂=28$  olarak tespit edilmiş olup bu veriler önceki çalışmalarla uyum sağlamaktadır. Sonuç olarak bu veriler, uluslararası sitogenetik veri bankası (Arthropoda Cytogenetic Database) için veri girişi sağlaması açısından önemlidir.

## TEŞEKKÜR

Laboratuvar çalışmaları ve makale yazımı sırasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Zübeyde KUMBIÇAK’a ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ümit KUMBIÇAK’a teşekkür ederim.

## Çıkar Çatışması

Türkiye’de Yayılış Gösteren *Arctosa maculata* (Hahn, 1822) Türünün Karyolojik Özelliklerinin Araştırılması isimli makalemizde yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan etmektedir.

## KAYNAKLAR

- Araujo D, 2007. Citogenética de 13 Espécies de Aranhas Haploginas Pertencentes às Famílias Pholcidae, Sicariidae e Scytodidae (Araneomorphae): Evolução Cromossômica, Sistema Cromossômico de Determinação Sexual e Citotaxonomia. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Sao Paulo, Doctoral Thesis (Printed).
- Araujo D, Schneider MC, Paulo-Neto E, Cella DM, 2020. The spider cytogenetic database. <http://www.arthropodacytogenetics.bio.br/spiderdatabase/> (Date of access: 10 April 2020).
- Bedo DG, 1984. Karyotypic and chromosome banding studies of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera, Gelechiidae). *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 26(2): 141-145.
- Brum-Zorrilla, N., & Cazenave, A. (1974). Heterochromatin localization in the chromosomes of *Lycosa malitiosa* (Arachnida). *Experientia*, 30(1): 94-95.
- Dolejs, P., Korinkova, T., Musilova, J., Opatova, V., Kubcova, L., Buchar, J., & Kral, J. (2011). Karyotypes of central European spiders of the genera *Arctosa*, *Tricca*, and *Xerolycosa* (Araneae: Lycosidae). *European Journal of Entomology*, 108(1): 1-16.
- Foelix RF, 1983. *Biology of Spiders*. Oxford University Press, pp: 287-326, New York.
- Korinkova T, Kral J, 2013. Karyotypes, sex chromosomes, and meiotic division in spiders. W. Nentwig (Ed.), *Spider Ecophysiology*. Springer-Verlag, pp: 159-171, Berlin.
- Kral J, Musilova J, Stahlavsky F, Rezac M, Akan, Z, Edwards RL, Almerje CR, 2006. Evolution of the karyotype and sex chromosome systems in basal clades of araneomorph spiders (Araneae: Araneomorphae). *Chromosome Research*, 14(8): 859-880.

- Kumbıçak, Z. (2014). Cytogenetic characterization of ten araneomorph spiders (Araneae): Karyotypes and meiotic features. *Biologia*, 69(5): 644-650.
- Kumbıçak Z, Kumbıçak Ü, Ergene S, 2011. *Pisuara consocia* (O.P.-Cambridge, 1872) ve *Dolomedes plantarius* (Clerk, 1757) (Araneae: Pisauridae) Türlerine ait Karyolojik Analiz. *Türk Bilim Araştırma Vakfı*, 4(3): 206-213.
- Lamoral, B. (1968). On the ecology and habitat adaptations of two intertidal spiders, *Desis formidabilis* (O.P. Cambridge) and *Amaurobioides africanus* Hewitt, at "The Island" (Kommetjie, Cape Peninsula), with notes on the occurrence of two other spiders. *Annals of the Natal Museum*, 20(1): 151-193.
- Levan, A., Karl, F., & Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature of centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52(2): 201-220.
- Mathew M, Sudhikumar A, Josepj J, 2009. Natural History and Bioecology. PA Sebastian and KV Peter (Ed.), *Spiders of İndia*. Universities Press (İndia) Private Limited, pp: 40-63, Hyderabad.
- Silva, R., Klisiowicz, D., Cella, D., Mangili, O. & Sbalqueiro, I. (2002). Differential distribution of constitutive heterochromatin in two species of brown spider: *Loxosceles intermedia* and *L. Laeta* (Araneae, Sicariidae), from the metropolitan region of Curitiba, PR (Brazil). *Acta Biologica Paranaense*, 31(1-4): 123-136.
- Sırlıbaş FA, 2017. *Lycosa piochardi* Simon, 1876 (Aranea: Lycosidae)’nin Sitogenetik Özelliklerinin Araştırılması. Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış).
- Srivastava, M., & Shukla, S. (1986). Chromosome number and sex-determining mechanism in fortyseven species of Indian spiders. *Chromosome Inform. Serv.*(41): 23-26.
- Suzuki, S. (1954). Cytological studies in spiders. III. Studies on the chromosomes of fifty-seven species of spiders belonging to seventeen families, with general considerations on chromosomal evolution. *Journal of science of the Hiroshima University, Series B. Division 1*, 15(2): 23-136.
- World Spider Catalog, Version 21.0, 2020. <https://wsc.nmbe.ch/> (Date of access: 15 April 2020).

**To Cite:** Yılmaz A,2021. The Evaluations and Comparisons of Nuclear and Chloroplast DNA Regions Based on Species Identification and Phylogenetic Relationships of *Crocus* L. Taxa. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1504-1518.

## The Evaluations and Comparisons of Nuclear and Chloroplast DNA Regions Based on Species Identification and Phylogenetic Relationships of *Crocus* L. Taxa

Aykut YILMAZ<sup>1\*</sup>

**ABSTRACT:** The genus *Crocus* L. (Iridaceae) consists of about 200 species distributed from western Europe and north west Africa to western China. The genus is taxonomically very problematic and day after day it becomes more difficult to understand the relationships between *Crocus* species because of the identification of new species. Recently, the studies based on DNA sequences are frequently used for the solution of taxonomic problems, the determination of species diversity and especially the evaluation of phylogenetic relationships among the studied taxa. The use of the regions belonging to nuclear DNA and especially chloroplast genome and the combinations of these regions are frequently recommended in many studies. However, there is no information about suitable barcoding regions that can be used for all plant groups. This study focuses on determination of the most successful barcoding regions, understanding the species discrimination abilities and finally evaluation of phylogenetic relationships among the *Crocus* taxa using one region from nuclear DNA (ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2) and four regions from chloroplast DNA (1. trnK-matK IGS, 2. partial psbA gene-psbA/trnH IGS-partial trnH gene, 3. rpoC1 gene, 4. partial trnL gene-trnL/trnF IGS-partial trnF gene). Sequence informations for related DNA regions were obtained from NCBI. As a result, it can be stated that the region which is only covering ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2 separated the all taxa in species level and it is more beneficial for the phylogenetically evaluation of *Crocus* taxa. Furthermore, dendrogram show taxonomic problems belonging to some species in the genus such as *C. biflorus* taxa.

**Keywords:** *Crocus*, nuclear DNA, chloroplast DNA, *C. Biflorus*

<sup>1</sup> Aykut YILMAZ ([Orcid ID: 0000-0002-0327-8388](https://orcid.org/0000-0002-0327-8388)), Uşak Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Uşak, Türkiye

\*Corresponding Author: Aykut YILMAZ, e-mail: aykut.yilmaz@usak.edu.tr

## INTRODUCTION

The genus *Crocus* L. is a member of the family Iridaceae which is presented by about 92 genera and 2000 species (Candan, 2015; Addam et al., 2019). The genus *Crocus* containing popular ornamentals and Saffron provided from *C. sativus* which is known as the most expensive spices by weight of the world is represented by about 200 species ranging from western Europe and north west Africa to western China with the center of species diversity in the Balkan Peninsula and Turkey (Mathew, 1982; Harpke et al., 2016; Saxena, 2016; Roma-Marzio et al., 2018). The genus was divided into two subgenera based on Mathew's (1982) classification, the monotypic subgenus *Crociris* that is containing only *C. banaticus* and the subgenus *Crocus* divided into section *Crocus* and section *Nudiscapus*. After that each section is again divided into totally 15 series (section *Crocus*: six series and section: *Nudiscapus*: nine series).

The genus *Crocus* is taxonomically very problematic and very hard to understand the relationships among the species. There are several reasons of this.

Firstly, new species are continuously determined, however these new taxa especially within the section *Nudiscapus* are not assigned to any group within the section (Kerndorff et al., 2016).

Secondly, there are species exhibiting intermediate or variable characters in the some populations containing two closely related species because of introgression from one species to another as a result of hybridization between them and repeated backcrossing (Harrison and Larson, 2014; Kerndorff et al., 2016).

Thirdly, the species identification and classification based on morphological data can be reasons systematic problems and misclassifications due to the variations in morphological characters caused by environmental factors (Jonah et al., 2011; Erol et al., 2014). Many molecular studies revealed the reality of this situation and changed the taxonomical situations of some species on the genus *Crocus* (Petersen et al., 2008; Harpke et al., 2014, 2015).

Another situation is the changes frequently observed in the chromosome number within the genus (from  $2n=6$  to  $2n=70$ ) (Brighton et al., 1973; Uslu et al., 2012; Harpke et al., 2013). Even these changes in the chromosome number are observed in the same species belonging to different localities. Uslu et al. (2012) states that the endemic taxon for Turkey, chromosome number of *C. abantensis* was found  $2n = 8$ , but previously chromosome number of this taxon was reported as  $2n = 16$  by Baytop et al. (1975) and Mathew (1984). Similarly, although chromosome number of *C. ancyrensis* was reported as  $2n = 10$  by Karasawa (1950) and Mathew (1984), chromosome number was found as  $2n = 6$  by Uslu et al. (2012). All of these makes the difficult to understand the genus taxonomically and makes species identification doubtful.

Finally, phylogenetic analyse results based on Harpke et al. (2013) show that subspecies of *C. biflorus* occur in several series and anymore subspecies status can not be maintained (Harpke et al. 2016).

Recently, DNA based studies are frequently used in the solution of all these taxonomic problems and species identification (Petersen et al., 2008; Erol et al., 2011; Harpke et al., 2013; Mosolygo-Lukacs et al., 2016). Especially, DNA barcoding studies based on short DNA sequence information has gained momentum with advance of sequence analysis techniques. DNA barcoding is frequently used for the solution of stated taxonomic problems, determination of species diversity and evaluation of phylogenetic relationships. For this aim, the regions belonging to genomic DNA and plastid DNA that contain sufficient sequence variation are used to understand the phylogenetic relationships among the taxa.

Internal transcribed spacers (ITS) between rDNA genes in genomic DNA are frequently preferred by plant systematists (Sramko, 2008; Harpke et al., 2013; Sramko et al., 2014).



Especially, the regions and the region combinations belonging to chloroplast genome such as matK, trnK, rbcL, trnH-psbA, trnL-trnF and atpB-rbcL are used to solve problems and understand the phylogenetic relationships (Harpke et al., 2013, 2014). Nevertheless, there is still no information about the suitable barcoding region that can be used in all plant groups.

Consequently, the use of different regions belonging to genomic DNA and especially chloroplast DNA in various plant groups is very important to understand the species discrimination ability and to evaluate of phylogenetic relationships among the species. For this aim, in this study, the region which is covering ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2 belonging to genomic DNA and the regions which are covering trnK-matK intergenic spacer (IGS), partial psbA gene-psbA/trnH intergenic spacer (IGS)-partial trnH gene, rpoC1 gene and partial trnL gene-trnL/trnF intergenic spacer (IGS)-partial trnF gene belonging to chloroplast DNA were used to compare the species discrimination abilities with each other and finally to evaluate the phylogenetic relationships of the *Crocus* taxa.

## MATERIALS AND METHODS

Sequence informations related to studied taxa were obtained from National Centre of Biotechnology Information (NCBI). One region from the nuclear genome (ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2) and four regions from chloroplast DNA (1. trnK-matK IGS, 2. partial psbA gene-psbA/trnH IGS-partial trnH gene, 3. rpoC1 gene, 4. partial trnL gene-trnL/trnF IGS-partial trnF gene) were preferred.

The sequence informations of 51 taxa for the ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2 region belonging to nuclear DNA were provided. Similarly, the sequence informations of four regions belonging to chloroplast DNA (18 taxa for trnK-matK IGS, 36 taxa for partial psbA gene-psbA/trnH IGS-partial trnH gene, 109 taxa for rpoC1 gene, 99 taxa for partial trnL gene-trnL/trnF IGS-partial trnF gene) were provided separately. After the sequence informations of the determined taxa were provided for each studied region, these sequences belonging to determined taxa for each studied regions were aligned. In other words, multiple sequence alignments were separately performed by using Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA).

Then, different analysis using alignment sequence informations such as the probabilities of substitution from one base to another base, transition/transversion ratios for purines-pyrimidines and overall, nucleotide frequencies for each studied region were performed.

DNA regions used in this study, taxon numbers for each examined DNA regions, alignment lengths (bp), variable sites showing the sequence differences among taxa, transitional and transversional substitutions (%), transition/transversion rates for purines-pyrimidines-overall (%) and nucleotide frequencies (%) for each examined DNA region giving the informations about sequences of taxa were computed and showed in Table 6.

Finally, Neighbour-joining dendrograms that bootstrap values are reported on branches were obtained to evaluate the phylogenetic relations among taxa and to compare the studied DNA regions according to species identification ability. For this aim, totally five dendrogram that consist of four regions from chloroplast DNA and one region from nuclear DNA were created using MEGA X.

All positions containing gaps and missing data for each studied barcoding regions were eliminated with complete deletion option of program in the determination of variable sites and in other analysis such as substitutions from one base to another base, transition/transversion ratios for purines-pyrimidines, and dendrograms.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Analysis Results for The Region Which is Covering ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2

All taxa provided sequence informations from NCBI were preferred from Turkey' location (Harpke, 2012; Harpke et al., 2013; Erol et al., 2015). Totally, sequence datas of 51 taxa containing two spacer regions (ITS1 and ITS2) giving useful information in species level and one rRNA gene (5.8S rRNA) between spacer regions were used for analysis. Firstly; sequence alignments were performed by using Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA X) program. The sites with missing/ambiguous data and gaps in the determination of alignment length and variable sites among studied *Crocus* taxa were excluded for effective analyses. After these regions were excluded, alignment length for studied taxa was established as 526 bp. Besides, this DNA region has 118 variable sites for 51 taxa.

The probability of substitution from one base to another base were computed and shown in Table 1. This analysis involved nucleotide sequences belonging to 51 *Crocus* taxa and similarly, all positions containing gaps and missing data were eliminated with the complete deletion option in the program. In this table, transitional substitutions as bold and transversional substitutions as italics was shown. The rate of transitional substitutions with 72.39 % is higher than the rate of transversional substitutions. The highest base substitutions are observed in the rate of 35.04 % from T to C and 19.38 % from C to T, respectively (Table 1).

In addition to the rate of base substitutions, transition/transversion rate for purines and pirimidines was created (Table 6). According to this table, transition/transversion rate of pyrimidines ( $k_2$ ) with 8.04 is the higher than purines ( $k_1$ ) having 2.55 value. Moreover, overall transition/transversion rate (R) is 2.39 ( $R = [A * G * k_1 + T * C * k_2] / [(A + G) * (T + C)]$ ).

As the another analysis, the nucleotide frequencies for *Crocus* taxa are analysed. The nucleotide frequencies are 19.02 % (A), 17.45 % (T/U), 31.55 % (C), and 31.98 % (G). As a result, it is observed that the percentage of C and G bases (63.53 %) for related *Crocus* taxa of the region which is covering ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2 is higher than the percentage of A and T/U bases.

**Table 1.** The probability of substitution (r) from one base (row) to another base (column) for ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2 region.

|          | <b>A</b>    | <b>T</b>     | <b>C</b>     | <b>G</b>     |
|----------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>A</b> | -           | <i>2.41</i>  | <i>4.36</i>  | <b>11.27</b> |
| <b>T</b> | <i>2.63</i> | -            | <b>35.04</b> | <i>4.42</i>  |
| <b>C</b> | <i>2.63</i> | <b>19.38</b> | -            | <i>4.42</i>  |
| <b>G</b> | <b>6.7</b>  | <i>2.41</i>  | <i>4.36</i>  | -            |

Finally, Neighbor-Joining (NJ) dendrogram was drawn to understand the species discrimination ability for studied region and evaluate the phylogenetic relationships of *Crocus* taxa (Figure 1). Furthermore, dendrograms that was separately drawn for each regions were used in the comparison of the DNA sequences belonging to four region of cpDNA and one region of nuclear DNA and in determination the importance in *Crocus* taxa. The evolutionary distances in phylogenetic tree were

computed using the Maximum Composite Likelihood method (Tamura et al., 2004) and also branch lengths in phylogenetic tree infer the evolutionary distances.

It can be stated as a result of the examination of NJ tree provided from ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2 that the sequence informations of the DNA region interested for *Crocus* taxa are sufficient for the species separation and identification. Furthermore, it is observed that NJ tree identified all taxa in distinct branch as compatible with their subspecies and separated the *Crocus* taxa to two main groups except for *C. carpetanus* showing the most distinction among the studied taxa according to NJ dendrogram (Figure 1).

### Analysis Results for The Region Which is Covering trnK-matK Intergenic Spacer (IGS)

The sequence informations of 18 *Crocus* taxa were provided from NCBI (Harpke, 2018). DNA sequences belonging to 18 taxa were aligned by using MEGA X program. The missing/ambiguous data and gaps in the sequences for studied taxa were excluded for effective analyses. Alignment length of *Crocus* taxa was established as 599 bp and 10 variable site were determined among taxa.

Table 2 show the probability of substitution from one base to another base. Transitional and transversional substitutions in the table are shown as bold and as italics, respectively.

While the rate of transitional substitutions is 35.48 %, the rate of transversional substitutions is 64.52 % (Table 2, 6). In other words, transversional substitutions are higher than the transitional substitutions on the contrary of the region which is covering ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2. The highest base substitutions are observed between C and T bases (Table 2).

Table 6 show the transition/transversion rate for purines and pyrimidines belonging to trnK-matK IGS region. Transition/transversion rate for purines, pyrimidines and overall is 0.39, 1.73 and 0.48, respectively.

The nucleotide frequencies for studied *Crocus* taxa are 35.11 % (A), 35.78 % (T/U), 16.92 % (C), and 12.19 % (G). As a result of this, it can be stated that the percentage of A and T/U bases with 70.89 % is higher than G and C bases (29.11 %) on the contrary of the region which is covering ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2 (Table 6).

Finally, Neighbor-Joining (NJ) dendrogram was drawn for:

Firstly to determine the species discrimination ability for *Crocus* taxa of the trnK-matK IGS region belonging to cpDNA,

Secondly to detect the best region for the evaluation of phylogenetic relations among *Crocus* taxa (Figure 2).

NJ tree provided from the trnK-matK IGS show that related DNA region has insufficient sequence information with only 10 variable sites for species identification and phylogenetic relations, although some species were taxonomically separated from each other.

**Table 2.** The probability of substitution (r) from one base (row) to another base (column) for trnK-matK intergenic spacer (IGS) region.

|   | A            | T            | C           | G           |
|---|--------------|--------------|-------------|-------------|
| A | -            | <i>11.54</i> | <i>5.46</i> | <b>1.55</b> |
| T | <i>11.33</i> | -            | <b>9.46</b> | 3.93        |
| C | <i>11.33</i> | <b>20</b>    | -           | 3.93        |
| G | <b>4.47</b>  | <i>11.54</i> | <i>5.46</i> | -           |

### Analysis Results for The Region Which is Covering Partial psbA gene-psbA/trnH IGS-Partial trnH gene

The sequence informations belonging to 36 *Crocus* taxa for the related DNA region were obtained from NCBI (Petersen et al., 2008; Schori et al., 2018). DNA sequences obtained from NCBI were aligned by MEGA X program. DNA sequences with the missing/ambiguous data and gaps for 36 taxa were excluded for other analyses. After these regions were excluded, alignment length and variable sites for studied taxa were determined as 529 bp and 30 site, respectively (Table 6).

When the probability of substitution (r) from one base to another base is examined for the regions showing variation, the rate of transitional substitutions with 33.03 % appears to be lower than transversional substitutions (Table 3, 6). In other words, the most of the variations in the DNA sequences for 36 taxa studied are caused by base substitutions between the different base groups belonging to purine (A and G) and pyrimidine (C and T) (Table 3). The base substitutions from C to T is observed in highest rate with 11.26 % (Table 3).

The transition/transversion rates are 0.95 for purines and 1.01 for pyrimidines (Table 6). The overall transition/transversion rates is 0.45.

The nucleotide frequencies for the region which is covering partial psbA gene-psbA/trnH IGS-partial trnH gene are 31.18 % (A), 33.14 % (T/U), 16.40 % (C) and 19.29 % (G). The nucleotide frequencies for A and T/U is higher with 64.32 % than the percentage of G and C (Table 6).

Finally, Neighbor-Joining (NJ) dendrogram to show phylogenetic relations among *Crocus* taxa and to determine the importance for DNA barcoding of partial psbA gene-psbA/trnH IGS-partial trnH gene region was provided using the Maximum Composite Likelihood method (Tamura et al., 2004). The sequence informations for 30 sites showing variation among taxa studied were used for the comparisons of taxa. NJ dendrogram show to us that sequence variations for barcoding region related are not enough for identification of all species although it seperated some *Crocus* taxa from each other (Figure 3).

**Table 3.** The probability of substitution (r) from one base (row) to another base (column) for partial psbA gene-psbA/trnH intergenic spacer (IGS)-partial trnH gene region.

|   | A            | T            | C           | G           |
|---|--------------|--------------|-------------|-------------|
| A | -            | <i>11.1</i>  | <i>5.49</i> | <b>6.19</b> |
| T | <i>10.44</i> | -            | <b>5.57</b> | <i>6.46</i> |
| C | <i>10.44</i> | <b>11.26</b> | -           | <i>6.46</i> |
| G | <b>10.01</b> | <i>11.1</i>  | <i>5.49</i> | -           |

### Analysis Results for The Region Which is Covering rpoC1 gene

Sequence informations of 109 *Crocus* taxa for rpoC1 gene belonging to cpDNA are obtained from NCBI (Petersen et al., 2008). Sequence informations of the *Crocus* taxa provided from NCBI for the region which is covering rpoC1 gene are used and analysed. DNA sequences of all taxa were aligned using MEGA X program and the sequences containing the missing/ambiguous data and gaps for 109 *Crocus* taxa were excluded for effective analysis. After the exclusion of missing datas, alignment length was determined as 503 bp and 21 variable sites were observed among the *Crocus* taxa studied (Table 6).

The rates of nucleotide substitutions are shown in Table 4 as transitional substitutions and transversional substitutions in bold and italics, separately. It can be stated that transitional substitutions with the rate of 85.01 % is very high in comparison to transversional substitutions (Table 4, 6). The

highest base substitutions are observed between G-A and than A-G with 36.14 % and 31.13 %, respectively (Table 4). Transversional base substitutions have quite low rate with 14.99 % of total base substitutions (Table 4, 6).

In addition to transitional and transversional nucleotide substitutions, transition/transversion rates for purines ( $k_1$ ), pyrimidines ( $k_2$ ) and overall (R) was showed for rpoC1 genes belonging to 109 *Crocus* taxa (Table 6). The transition/transversion rate is 17.43 for purines, 4.88 for pyrimidines and 5.66 for overall.

The nucleotide frequencies for the rpoC1 gene are 27.65 % for A, 30.79 % for T/U, 17.73 % C and 23.82 % for G. It can be stated that the percentage of A and T/U bases for the rpoC1 genes belonging to 109 *Crocus* taxa studied is higher with 58.44% than the percentage of G and C bases (Table 6).

Despite NJ dendrogram separated the *Crocus* taxa to groups, it is observed that many *Crocus* taxa were not separated from each other in species level owing to insufficient variation in DNA sequences for rpoC1 gene (Figure 4). The sequence variations in only 21 nucleotide for 109 taxon were determined. In other words, it can be stated that the DNA sequence of rpoC1 gene for *Crocus* species is highly preserved and however the existing nucleotide changes in these region are meaningful to evaluate the phylogenetic relationships among *Crocus* species.

**Table 4.** The probability of substitution (r) from one base (row) to another base (column) for rpoC1 gene region.

|   | A            | T            | C           | G            |
|---|--------------|--------------|-------------|--------------|
| A | -            | 2.31         | 1.33        | <b>31.13</b> |
| T | 2.07         | -            | <b>6.48</b> | 1.79         |
| C | 2.07         | <b>11.26</b> | -           | 1.79         |
| G | <b>36.14</b> | 2.31         | 1.33        | -            |

#### Analysis Results for The Region Which is Covering Partial trnL gene-trnL/trnF IGS-Partial trnF gene

DNA sequence informations of the region which is covering partial trnL gene-trnL/trnF IGS-partial trnF gene for 99 *Crocus* taxa were obtained from NCBI (Harpke, 2012; Harpke et al., 2013; Harpke, 2014; Harpke et al., 2015). DNA sequences for trnL/trnF regions belonging to 99 *Crocus* taxa were aligned using MEGA X program and then the missing/ambiguous data and gaps within region examined were excluded to provide more accurate information in analysis. Alignment length was determined as 507 bp after the missing/ambiguous data and gaps were excluded. Furthermore 56 variable sites were observed for trnL/trnF regions belonging to *Crocus* taxa studied. The most variable site among the all studied DNA regions was determined in the region which is covering partial trnL gene-trnL/trnF IGS-partial trnF gene after the ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2 which contain 118 variable nucleotide (Table 6). Table 5 shows the probability of nucleotide substitution for trnL-trnF region. Transitional substitutions which is showed as bold are higher with the rate of 61.13 % than transversional substitutions (Table 5, 6). Moreover, the highest nucleotide substitutions occur from G to A with 24.97 % and then from C to T with 15.19 %, respectively (Table 5). The transition/transversion rates are 3.45 for purines ( $k_1$ ), 2.76 for pyrimidines ( $k_2$ ) and 1.45 for overall (R) (Table 6). The nucleotide frequencies for the DNA region related of 99 *Crocus* are 37.19 % (A), 28.27 % (T/U), 16.53 % (C) and 18 % (G). It

**The Evaluations and Comparisons of Nuclear and Chloroplast DNA Regions Based on Species Identification and Phylogenetic Relationships of *Crocus* L. Taxa**

can be stated that A and T/U nucleotide frequencies for the DNA region containig trnL gene-trnL/trnF IGS-partial trnF gene is much higher with 65.46 % than G and C nucleotides (Table 6). NJ dendrogram for the separation of species according to evolutionary distances and for the grouping the taxa examined according to phylogenetic relations was prepared (Figure 5). Although the sequence variations observed in 56 nucleotide for trnL gene-trnL/trnF IGS-partial trnF gene are secondly the highest among the regions studied, it is insufficient to identify for many species belonging to the genus *Crocus*, besides some species separated in dendrogram. In other words, NJ dendrogram shows that species separation ability of the DNA region studied for *Crocus* species is low although it has the highest variation rate among the cpDNA regions studied (Figure 5, Table 6).

**Table 5.** The probability of substitution (r) from one base (row) to another base (column) for partial trnL gene-trnL/trnF IGS-partial trnF gene region.

|   | A            | T            | C           | G            |
|---|--------------|--------------|-------------|--------------|
| A | -            | 5.5          | 3.21        | <b>12.09</b> |
| T | 7.23         | -            | <b>8.88</b> | 3.5          |
| C | 7.23         | <b>15.19</b> | -           | 3.5          |
| G | <b>24.97</b> | 5.5          | 3.21        | -            |

**Table 6.** The comparisons of all studied DNA barcoding regions.

| DNA regions              | Taxon (number) | Alignment length (bp) | Variable site | Transitional substitutions (%) | Transversional substitutions (%) | Transition/Transversion rate |                   |         | Nucleotide freq. (%) |       |
|--------------------------|----------------|-----------------------|---------------|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------|-------------------|---------|----------------------|-------|
|                          |                |                       |               |                                |                                  | Purines                      | Pyrimidines       | Overall | A+T/U                | G+C   |
|                          |                |                       |               |                                |                                  | (k <sub>1</sub> )            | (k <sub>2</sub> ) | (R)     |                      |       |
| ITS1-5.8SrRNA-ITS2       | 51             | 526                   | 118           | 72.39                          | 27.61                            | 2.55                         | 8.04              | 2.39    | 36.47                | 63.53 |
| trnK-matK IGS            | 18             | 599                   | 10            | 35.48                          | 64.52                            | 0.39                         | 1.73              | 0.48    | 70.89                | 29.11 |
| psbA-psbA/trnH IGS-trnH  | 36             | 529                   | 30            | 33.03                          | 66.97                            | 0.95                         | 1.01              | 0.45    | 64.32                | 35.68 |
| rpoC1                    | 109            | 503                   | 21            | 85.01                          | 14.99                            | 17.43                        | 4.88              | 5.66    | 58.44                | 41.56 |
| trnL-trnL/trnF IGS- trnF | 99             | 507                   | 56            | 61.13                          | 38.87                            | 3.45                         | 2.76              | 1.45    | 65.46                | 34.54 |
| <b>Total</b>             |                | 313                   |               |                                |                                  |                              |                   |         |                      |       |

The fundamental aim of this study is to determine the species identification and separation ability of different DNA regions belonging to nuclear and chloroplast genome, to find out the most successful barcoding region and to most accurately classify the species belonging to the genus *Crocus* to contribute to the solution of taxonomic problems. For this aim, four regions belonging to chloroplast genome and ITS1-5.8SrRNA-ITS2 region of nuclear genome were preferred as barcoding regions and examined. Totally 313 taxa from the genus *Crocus* for five barcoding regions were analysed in this study (Table 6).

Alignment lengths of barcoding regions used were ranged between 503 bp and 599 bp. As a result of comparison of the barcoding regions according to alignment length, it can be stated that DNA lengths of regions preferred are compatible with each other and convenient for barcoding.

When variable sites that is being the most important character in species identification and phylogenetic relationships for each barcoding regions are examined, it is observed that the region which is covering ITS1-5.8SrRNA-ITS2 has the highest variable site with 118 nucleotide. Thereafter, the barcoding regions containing the highest variable site are trnL-trnL/trnF IGS-trnF with 56 nucleotide, psbA-psbA/trnH IGS-trnH with 30 nucleotide, rpoC1 with 21 nucleotide and trnK-matK IGS with 10 nucleotide, respectively (Table 6). Especially, it is observed that the barcoding regions belonging to

chloroplast genome show low variations in DNA sequences. In other words, it can be stated that sequence information of cp DNA regions used for barcoding are highly conserved. However, although the ITS sequences between rRNA genes in nuclear DNA show more variation and seem to be more successful in taxonomically evaluation of species in comparison with other regions (Alvarez and Wendel, 2003; Hürkan, 2017), it has disadvantage due to being hundreds or thousands of ITS copies in a typical plant genome and the use of a single locus in barcoding (Coleman, 2003).

Although the number of variable sites expressing the nucleotide substitutions among the taxa studied is very important, these sequence substitutions must also be meaningful in identification and phylogenetic relationships of species. trnL-trnL/trnF IGS-trnF has the highest variation rate with 56 nucleotide among the cpDNA regions examined but it has been determined that this region are insufficient to separate and phylogenetically evaluate the most of taxa studied. The main reason for this is that the existing variations do not represent all taxa and therefore cannot reveal the differences between taxa.

When the substitutions from one base to another base which is the most important reason of sequence variations are examined for each barcoding regions, it can be stated that the most of the variations are caused by transitional base substitutions except barcoding regions which are covering trnK-matK IGS and psbA-psbA/trnH IGS-trnH. Furthermore overall transition/transversion rates for the most regions studied are higher than one.

When the nucleotide types in the DNA sequences of the each barcoding regions studied are examined, it is observed that the percentages of A+T/U nucleotides are higher than G+C nucleotides for all cpDNA regions studied except ITS1-5.8SrRNA-ITS2 region belonging to nuclear DNA. Denk and Grimm (2010) states in their study on the oaks that guanine-rich region within the 5' ITS1 region can be difficult to sequence and moreover, gene bank sequences may include missing data because of this region. For this reason, Denk and Grimm recommend to re-run the sequencing to guarantee at least one completely sequenced ITS clone per individual.

In the comparisons according to NJ dendrogram of the DNA regions studied; only the region which is covering ITS1-5.8SrRNA-ITS2 belonging to nuclear DNA separated the all taxa in species level unlike four regions of cpDNA. *C. carpetanus* from series *Carpetani* of section *Nudiscapus* showed the highest diversity according to phylogenetic tree. Similarly, *C. carpetanus* and *C. nevadensis* from series *Carpetani* of section *Nudiscapus* were grouped in the separate branch from other species in the study related to combined sequences of the ITS and trnL-F regions by Harpke et al. (2013). Moreover, Petersen et al. (2008) in the study derived from the analysis of five plastid regions showed that *C. carpetanus* and *C. nevadensis* have the highest diversity in the comparison to the other *Crocus* species. After the *C. carpetanus*, NJ dendrogram separated the *Crocus* taxa into two main groups (Figure 1). I. main group was separated to two groups containing the taxa belonging to section *Nudiscapus* and section *Crocus* (Figure 1). In other words, it can be stated that NJ dendrogram separated the species from each other and it grouped the taxa as sectional. However, new species are constantly determined in the genus *Crocus* and these new species are not assigned to any series within the section (Erol et al., 2015). This is the problematic situation for the evaluation of taxonomic relationships within genus, in addition to taxa containing intermediate or variable characters caused by introgression and backcrossing. II. main group in dendrogram belonging to Figure 1 show the reality of this situation. For example, subspecies of *C. biflorus* belonging to section *Nudiscapus* occur in distinct clade on the dendrogram. This result supports the articles stated that subspecies status for *C. biflorus* is incorrect (Petersen et al., 2008, Harpke et al.,

The Evaluations and Comparisons of Nuclear and Chloroplast DNA Regions Based on Species Identification and Phylogenetic Relationships of *Crocus* L. Taxa

2013). In other words, the term “subspecies” which was brought into the genus taxonomy by Mathew (1982) can not be maintained any more (Harpke et al., 2016).

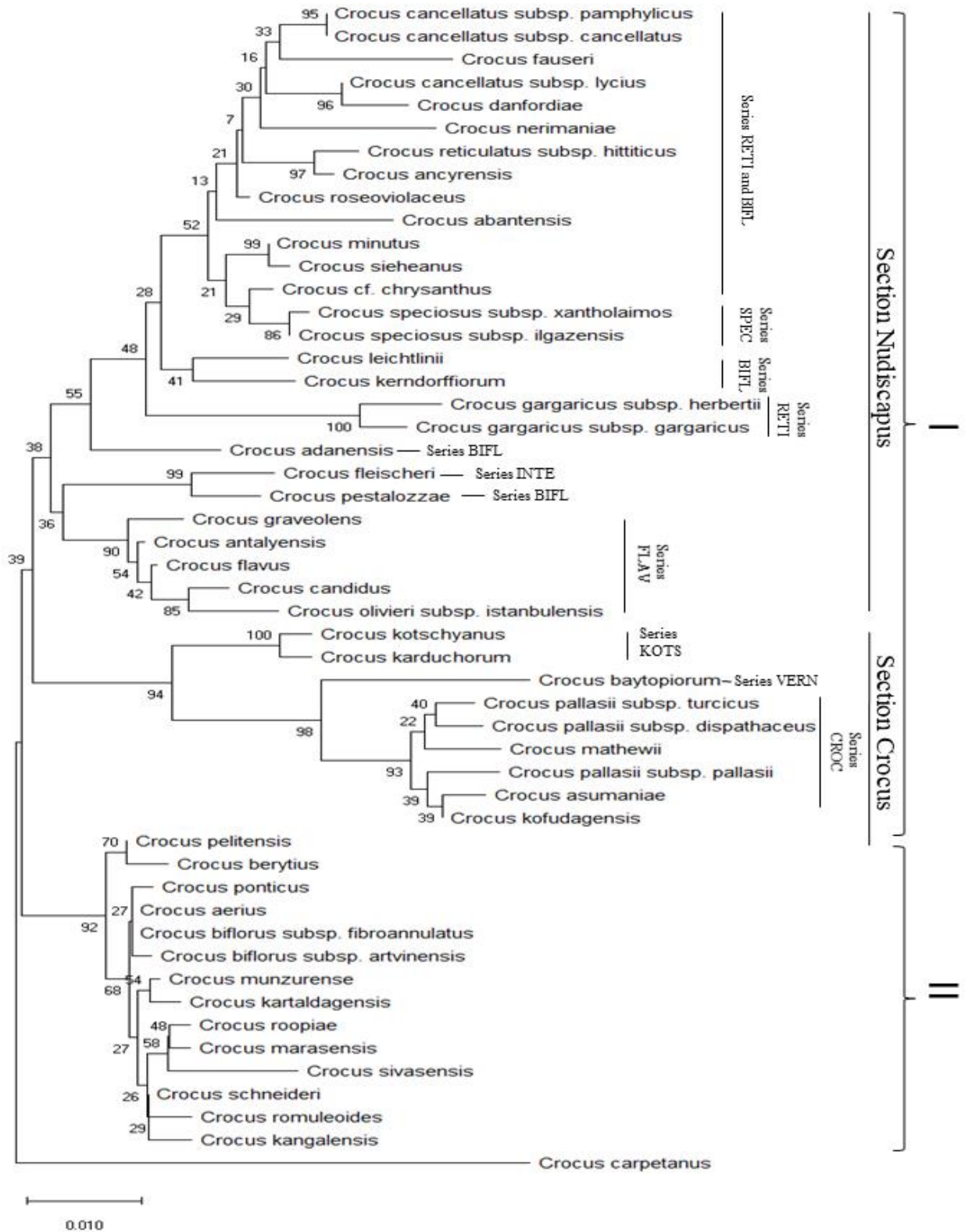
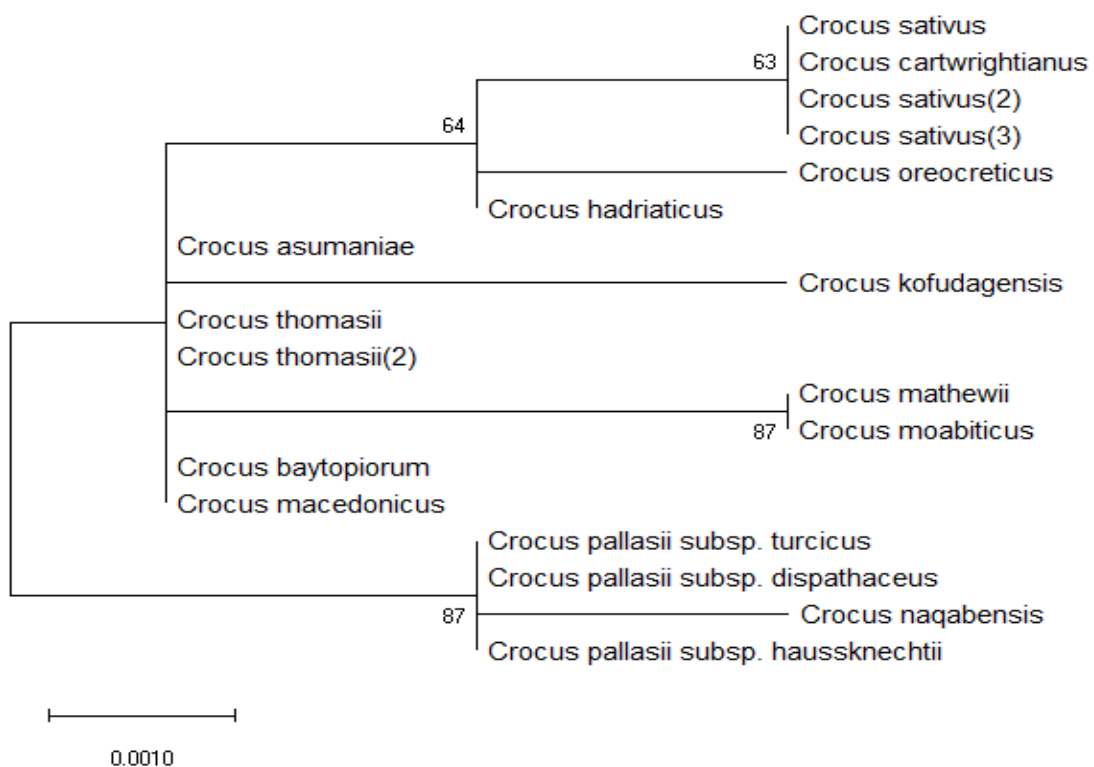


Figure 1. Neighbor-Joining dendrogram provided from ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2 region for 51 *Crocus* taxa.



In addition to the separation of taxa as sectional according to NJ dendrogram provided from ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2 region, it was observed that some taxa were grouped in different branch based on series. Especially, the taxa belonging to series *Flavi* from section *Nudiscapus* were grouped in same branch (Figure 1). Similar situation was observed in the taxa belonging to series *Crocus* from section *Crocus* (Figure 1).

In this study, four plastid DNA regions were examined with the aim of understanding the species discrimination ability and comparing of species. As a result of the using these barcoding regions, it can be stated that although cpDNA regions separated some species from others and they grouped the taxonomically close species in same or close branch, these regions examined are not enough to separate and evaluate phylogenetically the all studied species. For example, although trnL-trnL/trnF IGS- trnF region among the cpDNA regions had the highest variable site with 56 nucleotide and was examined with 99 taxa, it was observed that this region was not enough in separation of the most of species studied. Similarly, it can be said that psbA-psbA/trnH IGS-trnH region with 30 variable site and rpoC1 region with 21 variable site - 109 taxa examined are not suitable for the species identification alone. It is recommended in many studies that barcoding regions used together and region combinations can provide more effective data for phylogenetic analysis (Chase et al., 2007; Filiz and Koç, 2012). However, studies of Petersen et al. (2008) and Seberg and Petersen (2009) showed that region combinations belonging to plastid DNA are not enough for the separation and identification of *Crocus* species.



**Figure 2.** Neighbor-Joining dendrogram provided from trnK-matK intergenic spacer (IGS) region for 18 *Crocus* taxa.





partial trnL gene-trnL/trnF IGS-partial trnF gene; LM993604, LM993597, LT991689, LT991667, LT991664, LT991654, LT991646, LT991643, HE864211, HE864207, HE864229, LM993638, LM993633, LM993589, HG518229, HG518218, HG518217, HG518213, HG518211, HG518209, HG518207, HG518205, HG518201, HG518200, HE864281, HE864280, HE864278, HE864277, HE864276, HE864274, HE864273, HE864272, HE864271, HE864270, HE864268, HE864267, HE864266, HE864265, HE864264, HE864263, HE864261, HE864259, HE864256, HE864255, HE864254, HE864253, HE864252, HE864250, HE864249, HE864248, HE864247, HE864246, HE864244, HE864243, HE864242, HE864241, HE864239, HE864238, HE864236, HE864235, HE864234, HE864233, HE864231, HE864230, HE864228, HE864224, HE864223, HE864222, HE864219, HE864218, HE864216, HE864215, HE864213, HE864209, HE864205, HE864204, HE864203, HE864201, HE864199, HE864194, HE864189, HE864188, HE864186, HE864184, HE864181, HE864179, HE864175, HE864171, HE864170, HE864169, HE864168, HE864167, HE864166, LT991688, LT991683, LT991673, LT991671, LT991669, LT991665

### Conflict of Interest

I declare that there is no conflict of interest during the planning, execution and writing of the article.

### Author's Contributions

I hereby declare that the planning, execution and writing of the article was done by me as the sole author of the article.

### REFERENCES

- Addam K, Bou-Hamdan M, Sabbagh N, Takkoush J, Hout K, 2019. *Crocus baalbekensis* K. Addam and M. Bou Hamdan sp. Nov and its three forms (IRIDACEAE), new endemic species and forms from Lebanon, joined the Lebanese Flora. *MOJ Eco Environ Sci.*, 4(2): 75-83.
- Alvarez I, Wendel JF, 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29: 417-434.
- Baytop T, Mathew B, Brighton C, 1975. Four New Taxa in Turkish *Crocus* (Iridaceae). *Kew Bulletin*, 30(2): 241-246.
- Brighton CA, Mathew B, Marchant CJ, 1973. Chromosome counts in the genus *Crocus* (Iridaceae). *Kew Bulletin*, 28: 451-464.
- Candan F, 2015. Morphological and Leaf Anatomical Investigations on 2 Yellow Flowered Endemic Taxa of *Crocus* L. (*Crocus ancyrensis*, *Crocus sieheanus*) from Turkey. *International Journal of Agriculture, Forestry and Fisheries*, 3(3): 93-98.
- Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM et al., 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon*, 56(2): 295-299.
- Coleman AW, 2003. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends Genet.*, 19(7): 370-375.
- Denk, T. and Grimm, G.W. 2010. The oaks of western Eurasia: Traditional classifications and evidence from two nuclear markers. *Taxon*. 59(2): 351-366.
- Erol O, Şık L, Kaya HB, Tanyolaç B, Kuçuker O, 2011. Genetic diversity of *Crocus antalyensis* B. Mathew (Iridaceae) and a new subspecies from southern Anatolia. *Plant Syst Evol.*, 294: 281-287.
- Erol O, Kaya HB, Şık L, Tuna M, Can L, Tanyolaç MB, 2014. The genus *Crocus*, series *Crocus* (Iridaceae) in Turkey and 2 East Aegean islands: a genetic approach. *Turk J Biol.*, 38: 48-62.
- Erol O, Harpke D, Yıldırım H, 2015. A new *Crocus* L.(Iridaceae) species from SE Turkey, based on morphological and molecular data. *Phytotaxa*, 239(3): 223-232.
- Fılız E, Koç I, 2012. Bitkilerde DNA Barkodları. *AKÜ FEBİD*, 12: 53-57.
- Harpke D, 2012. *Taxonomy and Evolutionary Biology*, Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Corrensstr. 3, D-06466 Gatersleben/Germany.
- Harpke D, Meng S, Rutten T, Kerndorff H, Blattner FR, 2013. Phylogeny of *Crocus* (Iridaceae) based on one chloroplast and two nuclear loci: ancient hybridization and chromosome number evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66(3): 617-627.
- Harpke D, 2014. *Taxonomy and Evolutionary Biology*, Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Corrensstr. 3, D-06466 Gatersleben/Germany.

- Harpke D, Peruzzi L, Kerndorff H, Karamplianis T, Constantinidis T, Randelović V, Randelović N, Jušković M, Pasche E, Blattner FR, 2014. Phylogeny, geographic distribution and new taxonomic circumscription of the *Crocus reticulatus* species group (Iridaceae). Turkish Journal of Botany, 38: 1182-1198.
- Harpke D, Carta A, Tomović G, Randelović V, Randelović N, Blattner FR, Peruzzi L, 2015. Phylogeny, karyotype evolution and taxonomy of *Crocus* series *Verni* (Iridaceae). Plant Systematics and Evolution, 301: 309-325.
- Harpke D, Kerndorff H, Pasche E, Peruzzi L, 2016. Neotypification of the name *Crocus biflorus* Mill. (Iridaceae) and its consequences in the taxonomy of the genus. Phytotaxa, 260(2): 131-143.
- Harpke D, 2018. IPK-Gatersleben, Taxonomy and Evolutionary Biology, Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Corrensstr. 3, D-06466 Gatersleben/Germany.
- Harrison RG, Larson EL, 2014. Hybridization, Introgression, and the Nature of Species Boundaries. Journal of Heredity, 105: 795-809.
- Hurkan K, 2017. Karasal bitkilerde DNA barkodlama: Bazı DNA barkod bölgelerinin incelenmesi. The International Journal of Innovative Approaches in Science Research, vol. 1, no. 1.
- Jonah PM, Bello LL, Lucky O, Mıdau A, Moruppa SM, 2011. Review: the importance of molecular markers in plant breeding programmes. Global Journal of Science Frontier Research, 11: 0975-5896.
- Karasawa K, 1950. Note on the Cytology of *Crocus*. Genetica, 25(1): 188-192.
- Kerndorff H, Pasche E, Harpke D, 2016. The Genus *Crocus* (Liliiflorae, Iridaceae): Taxonomical Problems and How to Determine a Species Nowadays? STAPFIA, 105: 42-50.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K, 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, 35: 1547-1549.
- Mathew B, 1982. The *Crocus*: a revision of the genus *Crocus*. BT Batsford Ltd. London 127 pp.
- Mathew B, 1984. *Crocus* L. in Davis PH, Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Edinburgh, 8: 413-438.
- Mosolygo-Lukacs A, Sramko G, Barabas S, Czegledi L, Javor A, Molnar VA, Suranyi G, 2016. Molecular genetic evidence for allotetraploid hybrid speciation in the genus *Crocus* L. (Iridaceae). Phytotaxa, 258(2): 121-136.
- NCBI, National Centre of Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>.
- Petersen G, Seberg O, Thorsøe S, Jørgensen T, Mathew B, 2008. A phylogeny of the genus *Crocus* (Iridaceae) based on sequence data from five plastid regions. Taxon, 57(2): 487-499.
- Roma-Marzio F, Harpke D, Peruzzi L, 2018. Rediscovery of *Crocus biflorus* var. *estriatus* (Iridaceae) and its taxonomic characterisation. Italian Botanist, 6: 23-30.
- Saxena RB, 2016. Botany, Taxonomy and Cytology of *Crocus* Series *Intertexti*. Indo. American Journal of Pharmaceutical Sciences, 3(4): 321-323.
- Schori M, Emch K, Kıtko AR, Shinwari ZK, Showalter AM, 2018. National Germplasm Resources Laboratory, Agricultural Research Service, USDA, 10300 Baltimore Ave., Beltsville, MD 20705 USA.
- Seberg O, Petersen G, 2009. How many loci does it take to DNA barcode a *Crocus*? PLoS One, 4(2): E4598.
- Sramko G, 2008. Sequence variability of the nrITS in the *Ophrys fuciflora* species-complex of the Mediterranean bee-orchid (*Ophrys* L.) genus. Department of Botany. University of Debrecen, Debrecen.
- Sramko G, Attila MV, Hawkins JA, Bateman RM, 2014. Molecular phylogeny and evolutionary history of the Eurasiatic orchid genus *Himantoglossum* s.l. (Orchidaceae). Annals of Botany, 114(8): 1609-1626.
- Tamura K, Nei M, Kumar S, 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 101: 11030-11035.
- Uslu E, Babaç MT, Yılmaz A (2012). Karyological Studies On Some *Crocus* L. Taxa From Turkey. Caryologia: Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics, 65(1): 7-10.

**Atf İçin:** Yılmaz OS, Oruç MS, Ateş AM, Gülgen F, 2021. Orman Yangın Şiddetinin Google Earth Engine ve Coğrafi Bilgi Sistemleri Kullanarak Analizi: Hatay-Belen Örneği. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1519-1532.

**To Cite:** Yılmaz OS, Oruç MS, Ateş AM, Gülgen F, 2021. Analysis of Forest Fire Severity Using The Google Earth Engine and Geographical Information Systems: Hatay-Belen Case Study. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1519-1532.

**Orman Yangın Şiddetinin Google Earth Engine ve Coğrafi Bilgi Sistemleri Kullanarak Analizi: Hatay-Belen Örneği**

Osman Salih YILMAZ<sup>1\*</sup>, Mehmet Serdar ORUÇ<sup>2</sup>, Ali Murat ATEŞ<sup>3</sup>, Fatih GÜLGEN<sup>2</sup>

**ÖZET:** Türkiye’de orman yangınlarının nedenlerini kundaklama (bilerek yangın çıkarma), dikkatsizlik ve ihmal, doğal ve faili meçhul olmak üzere dört ana grup altında toplamak mümkündür. Özellikle Akdeniz ve Ege bölgelerimiz bu yangınlardan en çok etkilenen bölgelerdir. Orman Genel Müdürlüğü’nden (OGM) alınan verilere göre 1988 – 2019 yılları arasında sadece Hatay’da yangın başına 4.91 ha ormanlık alan yanmıştır. Orman yangınları tespitinde özellikle son yıllarda gelişen uydu teknolojileri ile Uzaktan Algılama (UA) teknikleri oldukça yaygın kullanılmaktadır. Bu çalışmada Sentinel-2A 09.10.2020 tarihinde Hatay’ın Belen ilçesinde çıkan orman yangını için UA yöntemi kullanılarak Google Earth Engine Platformunda (GEE) yangın şiddeti haritaları üretilmiştir. Bu amaçla yangın öncesi 04.07.2020 ve yangın sonrası 12.10.2020 tarihli Sentinel-2A (L2A) uydu görüntüleri kullanılmıştır. Normalize Edilmiş Vejetasyon İndeksi (Normalized Differenced Vegetation Index, NDVI), Normalize Edilmiş Yanma Şiddeti (Normalized Burned Ratio, NBR) ve NBR farklarından Fark Normalize Edilmiş Yanma Şiddeti (Difference Normalized Burned Ratio, dNBR) kullanılarak yanma şiddeti derecelendirilmiştir. Ayrıca Coğrafi Bilgi Sistemleri (CBS) ile yükselti, eğim ve bakı haritaları üretilerek orman yangını topografik faktörler yönünden analiz edilmiştir. Yüksekliğin 200 – 300 m arasında olduğu 50 ha alanda, eğimin %30’ dan fazla olduğu 36 ha alanda ve doğu bakıda 35 ha alanda yüksek yanma şiddeti görülmüştür. Analizler sonucu çalışma alanında, yüksek yanma şiddeti bulunan toplam alan 90.94 ha olarak hesaplanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Hatay, uzaktan algılama, coğrafi bilgi sistemleri, NBR - dNBR, NDVI, Google Earth Engine

**Analysis of Forest Fire Severity Using The Google Earth Engine and Geographical Information Systems: Hatay-Belen Case Study**

**ABSTRACT:** The causes of forest fires in Turkey can be grouped under four main groups such as arson (intentional), carelessness and negligence, natural and unknown fires. Especially the Mediterranean and Aegean regions are the places most affected by these fires. According to the data obtained from the General Directorate of Forestry (OGM), between 1988 and 2019, 4.91 ha forest area was burned per fire only in Hatay. Especially satellite technologies developed in recent years and Remote Sensing (UA) techniques are widely used in the detection of forest fires. In this study, fire severity maps were produced on the Google Earth Engine Platform (GEE) by using the UA method for the forest fire that broke out in the Belen district of Hatay on 09.10.2020. For this purpose, Sentinel-2A (L2A) satellite images dated 04.07.2020 before the fire and 12.10.2020 after the fire were used. The burning severity was graded using the Normalized Differenced Vegetation Index (NDVI), Normalized Burned Ratio (NBR) and NBR differences, Difference Normalized Burned Ratio (dNBR). In addition, elevation, slope, and aspect maps were produced with Geographical Information Systems (GIS) and forest fire was analysed in terms of topographic factors. High burning severity was observed in 50 ha area where the altitude was between 200 - 300 m, in 36 ha area where the slope is more than 30% and in 35 ha area in the eastward. As a result of the analysis, the area with high burning severity in the study area has been calculated as 90.94 ha in total.

**Keywords:** Hatay, remote sensing, geographic information systems, NBR - dNBR, NDVI, Google Earth Engine

<sup>1</sup> Osman Salih YILMAZ ([Orcid ID: 0000-0003-4632-9349](https://orcid.org/0000-0003-4632-9349)), Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Demirci Meslek Yüksekokulu, Mimarlık ve Şehir Planlama Bölümü, Manisa, Türkiye

<sup>2</sup> Mehmet Serdar ORUÇ ([Orcid ID: 0000-0002-2397-8007](https://orcid.org/0000-0002-2397-8007)), Fatih GÜLGEN ([Orcid ID: 0000-0002-8754-9017](https://orcid.org/0000-0002-8754-9017)), Yıldız Teknik Üniversitesi, İnşaat Fakültesi, Harita Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup> Ali Murat ATEŞ ([Orcid ID: 0000-0002-2815-1404](https://orcid.org/0000-0002-2815-1404)), Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Demirci Eğitim Fakültesi, Bilgisayar ve Öğr. Tek. Bölümü, Manisa, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Osman Salih YILMAZ, e-mail: osmansalih.yilmaz@cbu.edu.tr

## GİRİŞ

Ormanlar ekosistemdeki ve iklimdeki belirleyici etkisinin yanında, sanayi, ekonomi, sağlık, turizm gibi birçok alanda ülke ekonomisine fayda sağlayan en önemli yenilenebilir doğal kaynaklardan biridir. Orman yangını ekosistem, biyolojik çeşitlilik ve insan sağlığı üzerinde önemli etkiye sahip dünya üzerinde önemli ölçüde artan antropojenik ve doğal rahatsız edici bir fenomen olarak tanımlanır (Bar ve ark., 2020). Orman yangınlarının sıklıkla görüldüğü ülkemizde, özellikle Akdeniz ve Ege bölgeleri iklimin de etkisi ile yangınlardan çok fazla etkilenmektedir. Her yıl yanan ormanlar bölgede ekonomik ve ekolojik büyük tahriplere yol açmaktadır (Karabulut ve ark., 2016). Akdeniz iklim kuşağında yer alan ülkemizde ormanlarımızın büyük bir bölümü yangın tehdidi altında bulunmakta olup, toplam ormanlık alanın %60'ını birinci ve ikinci derece yangına hassas alanlar oluşturmaktadır. Bu sebeple orman yangınları ülkemiz ormancılığının öncelikli konuları arasında yer almaktadır (OGM, 2021). Türkiye'de son 20 yılda 45 681 orman yangını çıkmış ve toplamda 183 756.2 ha ormanlık alan yanmıştır (OGM, 2019). Orman yangınları, kendiliğinden doğa olayları sebepli olabileceği gibi, insan faktörünün devreye girmesi gibi çeşitli sebeplere dayanmaktadır (Beşli ve Tenekeci, 2020). Orman yangınları; topografya, yanıcı madde ve onu etkileyen faktörlere (rüzgâr, iklim, yükselti, eğim, yanıcı madde türü, yanıcı madde miktarı, yanıcı madde sürekliliği vb.) bağlı olarak farklı davranışlar göstermektedir (Küçük ve ark., 2005). Meteorolojik ve topografik faktörler üzerinde herhangi bir kontrol söz konusu olmazken, yanıcı maddeler zaman ve mekân itibarıyla değişebilir ve kontrol edilebilirler. Bu önemli özellik, yanıcı maddelere, orman yangınları için yapılan planlamalarda ve faaliyetlerde kritik önem kazandırmaktadır (Küçük ve ark., 2005). Arıcak ve ark. (2011)'de yaptıkları çalışmada uydu görüntüsü ile yanıcı madde özelliklerinden olan ağaç türü, karışımı, kapalılığı, yaş sınıfı özelliklerinin hangi derecelerde tespit edilebilir olduğunu ortaya koymuşlardır. Ağaç türlerinin yangına karşı olan dirençleri çok değişiktir. İğne yapraklı türler yapraklılara oranla orman yangınlarına karşı daha hassas olmaktadır (Çanakçıoğlu, 1985; O'Brien ve ark., 2008; Bilgili, 2014). İğne yapraklı ağaçların canlı yaprakları, oldukça yüksek tutuşma yeteneğine sahiptir ve tepe yangınının süratle ilerlemesini desteklemektedir (Bilgili, 2014). İğne yapraklı türler içinde fazla reçine içermesi, ışık ağacı olması ve kurak yetişme yörelerinde saf ve büyük meşcereler oluşturması nedeniyle yangından en çok çam türleri zarar görür. Yapraklı türler içinde ise en fazla etkilenen tür meşe olup bunu kestane ve kayın izler. Toprağa yakın kuru dalları bulunana sık meşcerelerde yangın tehlikesi daha fazlayken, örtü ve enkaz bulunmayan yaşlı meşcerelerde ise daha azdır (Çanakçıoğlu, 1985). Orman yangınlarının öncesi ve sonrası yapılacak çalışmalar, orman yangın oluşumunda ve yangınla mücadelede oldukça önem arz etmektedir (Tonbul, 2015). Yanan orman alanlarının tespit edilmesinde arazide yapılacak çalışmalar zaman alıcı olmalarının yanında önemli riskler taşımaktadır. Bu nedenle UA tekniklerinin kullanılması sıfır riskli ve daha pratik olacaktır (Saylan ve Cömert, 2019). UA, ucuz ve hızlı veri sağlaması nedeniyle sürdürülebilir çevre yönetiminden iklim değişikliğine, arazi örtüsü/kullanımı değişiminden jeolojik uygulamalara kadar geniş bir kullanım alanına sahiptir (Khatami ve ark., 2016; Yiğit ve Uysal, 2019). UA çalışmalarında birçok uydu platformlarından elde edilmiş görüntüler kullanılabilir. Bunlardan 30 m mekânsal çözünürlüklü Landsat ve 10 m mekânsal çözünürlüklü Sentinel uydu görüntüleri kullanıcılara ücretsiz sunulduğu için en çok tercih edilen görüntülerdir. Arazi kullanımı ve arazi örtüsü değişikliklerinin ve araziye yönelik farklı birçok uygulama için bir dizi farklı uzaktan algılama sınıflandırma tekniği geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Bu teknikler kontrollü ve kontrolsüz sınıflandırma teknikleri olmakla birlikte en yaygın kullanılan teknik kontrollü sınıflandırmadır (Rawat ve Kumar, 2015). UA görüntülerini işlemede çeşitli ticari ve açık kaynak kodlu CBS (ArcMap, Quantum GIS, GRASS, GeoMedia, MapInfo vb.) ve UA (ENVI, ERDAS, SNAP, eCognition) yazılımları mevcuttur. Son zamanlarda UA çalışmalarında özellikle büyük verileri

işlemede ve bulut ortamında çalışan GEE platformu dikkat çekmektedir. GEE bulut ortamında teknik kapasite gerektirmeden çok büyük mekânsal veri kümelerini işleyebilen, yüksek performanslı bilgi işlem kaynaklarını kullanan, ormansızlaşma, kuraklık, felaket, hastalık, gıda güvenliği, su yönetimi, iklim izleme ve çevresel koruma amacıyla çok geniş kitlelerin kullanabildiği bir UA platformudur. Buna ek olarak GEE, araştırmacıların sonuçlarını diğer araştırmacılara, politika yapıcılara, STK'lara, saha çalışanlarına ve hatta kamuya kolayca dağıtmalarına yardımcı olmak için tasarlanmıştır (Gorelick ve ark., 2017). UA görüntülerin sınıflandırılmasında çeşitli algoritmalar kullanılmaktadır. Kontrollü sınıflandırma da Maximum Likelihood Classification (MLC), Random Forest (RF) ve Support Vector Machines (SVM) (Butt ve ark., 2015; Haque ve Basak, 2017; Reis ve ark., 2016), kontrolsüz sınıflandırmada ise K-Means algoritması ve Iterative Self-Organizing Data Analysis Technique Algorithm (ISODATA) en çok tercih edilen algoritmalarıdır (He ve ark., 2014; Martinez, 2003). Algoritmaların yanında sınıflandırmada kullanılan amaca yönelik geliştirilmiş indeksler mevcuttur. Bu indeksler arazi örtüsü sınıflandırmasında kullanılan Normalize Edilmiş Vejetasyon İndeksi (Normalized Difference Vegetation Index, NDVI) (Rouse ve ark., 1974), yangın alanlarının tespitinde Normalize Edilmiş Yanma Şiddeti (Normalized Burn Ratio, NBR), Fark Normalize Edilmiş Yanma Şiddeti (Difference Normalized Burned Ratio, dNBR), Göreceli Yangın Oranı (Relativized Burn Ratio, RBR) indeksleridir (Atun ve ark., 2020).

Orman yangın davranışlarının izlenmesinde yükselti, eğim ve bakı önemli bir faktördür. Bu gibi arazi karakteristik özelliklerin incelenmesinde CBS oldukça önemli bir araçtır. Dünyada gelişmiş ülkeler; kaynak yönetimi, şehir planlama, mekânsal bilişim teknolojileri, UA, sosyoloji, antropoloji, ekonomi, politika, toplum yönetimi gibi alanlarda CBS'den sıklıkla yararlanmaktadır (Yomralıoğlu ve ark., 2007). CBS'de veri analizi, mekânsal ilişkilerin etkileşimine dair sorulara cevap aramanın yoludur (Stillwell ve Clarke, 2004). Veri analizinin özünde, doğru soruların sorulması, doğru işlemlerin uygulanması ve cevapların doğru olarak yorumlanması yatmaktadır.

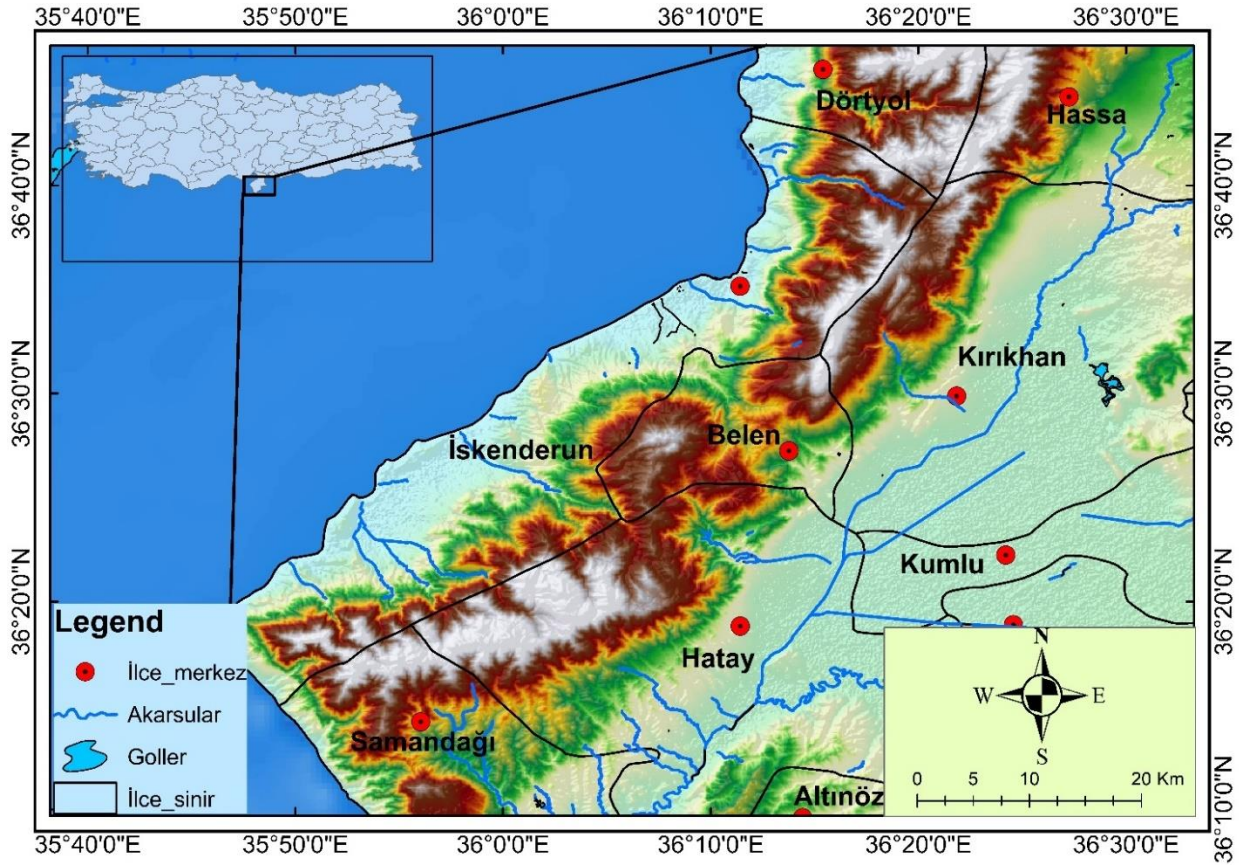
Bu çalışmada CBS ve UA teknikleri kullanarak GEE ile orman yangınlarının hızlı bir şekilde analiz yapılması ve yangın şiddetinin yüksek olduğu bölgelerin derecelendirilerek haritalanması amaçlanmıştır. Bu amaçla 09.10.2020 tarihinde Hatay ili, Belen ilçesinde çıkan orman yangını Sentinel-2 görüntüleri kullanılarak incelenmiştir. Görüntüler yangın öncesi tarih ve yangın sonrası tarihler kullanılarak yangın bölgesinde haritalama çalışması yapılmıştır. Haritalama çalışması, yangın şiddetini belirlemek için dNBR indeksi ve bitki değişimini izlemek için NDVI indeksi kullanılarak GEE platformunda JavaScript kodlama ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca Dijital Yükseklik Modeli (Digital Elevation Model, DEM) kullanılarak CBS analizleri (yükselti, eğim, bakı) ile orman yangını topografik faktörler yönünden incelenmiştir. GEE platformunda geliştirilen kod ile uydu görüntüsü indirilmeden bulut ortamında analizler gerçekleştirilecek ve yangın derecelendirme haritaları üretilebilecektir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Çalışma Alanı

Bu çalışma Türkiye'nin Hatay ili, Belen ilçesinde gerçekleştirilmiştir. Belen ilçesi Amanos dağlarında yer almaktadır (Şekil 1). Belenin deniz seviyesinden ortalama yüksekliği 700 metredir. Belen ilçesi genellikle dağlık alanlarla kaplı olup burada makiler ve ormanlık alanlar yer almaktadır. Amanos dağlarında 700 m' den 1 200 m' ye kadar kızılçam (*Pinus brutia* Ten), sedir (*Cedrus libani*), çınar (*Platanus orientalis*), karaçam (*Pinus nigra*) ve ardıç (*Juniperus* spp) türlerinin yer aldığı ormanlar bulunur. İlçede orman yangınları riskinin yüksek olduğu Akdeniz iklimi hâkimdir (Anonim, 2020a).





Şekil 1. Çalışma alanının lokasyon haritası

### Veri kaynakları

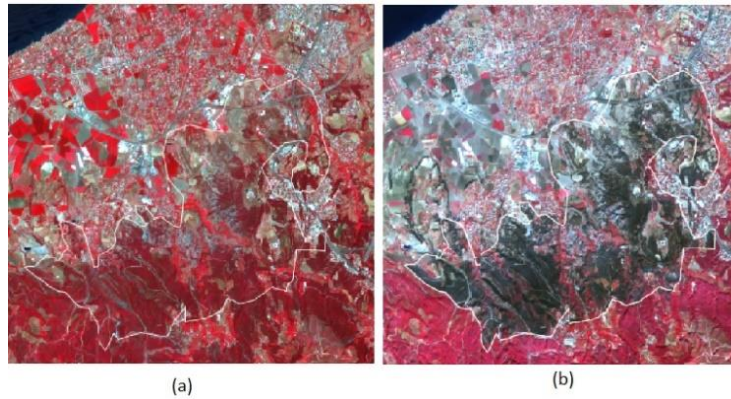
Bu çalışmada, Avrupa Uzay Ajansı (European Space Agency, ESA)'nın Sentinel-2 (MSI) uydusundan sağlanan yangın öncesi için (COPERNICUS/S2/20200704T081611\_20200704T081759\_T37SBA) ve yangın sonrası için (COPERNICUS/S2/20201012T081901\_20201012T082255\_T36SYF) id. numaralı uydu görüntüleri kullanılmıştır. Sentinel-2 uydusuna ait bantlar, spektral bilgi ve çözünürlükleri (Çizelge 1)'de verilmiştir.

Çizelge 1. Sentinel-2 (MSI) veri setlerinin spektral bantları ve çözünürlükleri (Anonim, 2020b)

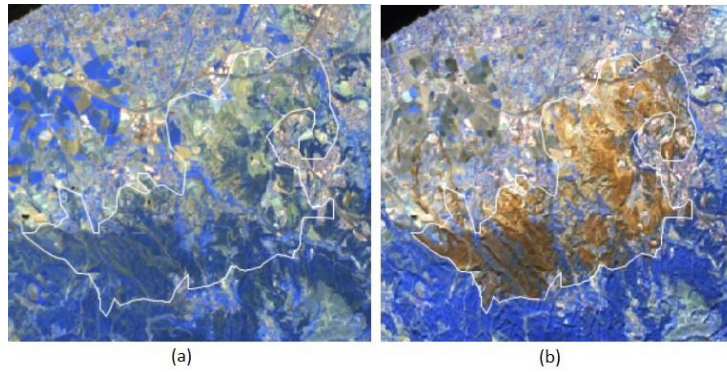
| Bant             | Sentinel-2A/2B  |         | Çözünürlük (m) |
|------------------|-----------------|---------|----------------|
|                  | Dalga boyu (nm) |         |                |
|                  | 2A              | 2B      |                |
| B2 (Blue)        | 496.6           | 492.1   | 10             |
| B3 (Green)       | 560.0           | 559.0   | 10             |
| B4 (Red)         | 664.5           | 665.0   | 10             |
| B8 (NIR)         | 835.1           | 833.0   | 10             |
| B8A (Red Edge 4) | 864.8           | 864.0   | 20             |
| B11 (SWIR-1)     | 1 613.7         | 1 610.4 | 20             |
| B12 (SWIR-2)     | 2 202.4         | 2 185.7 | 20             |

Uydu görüntülerini ilk etapta görsel yorumlamak için ve yanan alanları diğer alanlardan ayırt etmek amacıyla çeşitli bant kombinasyonları kullanılabilir. Bu çalışmada en çok tercih edilen iki bant kombinasyonu kullanılmıştır. Sentinel-2 görüntülerinde (B8(NIR) - B4(Red) - B3(Green)) bandı

kullanarak Infrared (IR) görüntü elde edilmiştir (Şekil 2). Ayrıca (B12(SWIR2) - B11(SWIR1) - B8A(RedEdge4)) bant kombinasyonu kullanılmıştır (Şekil 3).



Şekil 2: (a) 04.07.2020 tarihli Sentinel-2 görüntüsü, (b) 12.10.2020 tarihli Sentinel-2 görüntüsü



Şekil 3: (a) 04.07.2020 tarihli Sentinel-2 görüntüsü, (b) 12.10.2020 tarihli Sentinel-2 görüntüsü

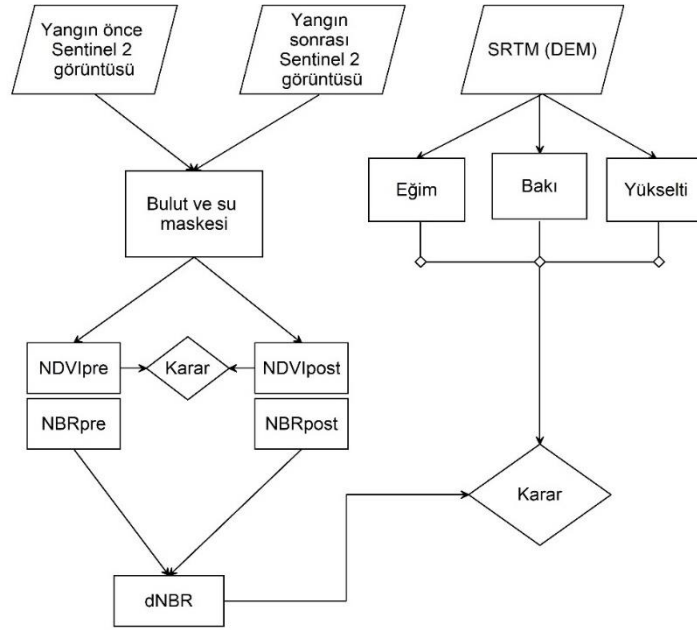
Avrupa Komisyonunun (European Commission, EC) Copernicus programının bir parçası olan Sentinel-2 uydusu Sentinel-2A ve Sentinel-2B olarak, ESA tarafından gönderilen iki farklı uydudur. Sentinel-2A ve Sentinel-2B faaliyetlerine sırasıyla 23 Haziran 2015 ve 7 Mart 2017 tarihlerinde başlamıştır. Bu uydular yaklaşık olarak 786 km yükseklikteki bir yörüngede hareket etmekte ve beş günlük zamansal çözünürlükte görüntü sağlamaktadır. Sentinel-2A ve Sentinel-2B uydularında kullanılan Multispectral Instrument (MSI) sensörü 12 bitlik radyometrik çözünürlüklüdür. 13 spektral bantta ve 10 m ile 60 m arasında değişen mekânsal çözünürlüğe sahiptir. Bu çalışmada kullanılan Sentinel-2A uydusuna ait veriler WGS84 datumlu UTM zonlarında geometrik olarak düzeltilmiş görüntülerdir. Radyometrik düzeltmeleri yapılmış Bottom-Of-Atmosphere (BOA) reflectances Level (L2A) görüntüleri Sentinels Scientific Data Hub'dan (<https://scihub.copernicus.eu/dhus/#/home>) ücretsiz olarak indirilebilmektedir. Bu çalışmada yangın öncesi 04.07.2020 tarihli ve yangın sonrası 12.10.2020 tarihli Sentinel-2A (L2A) uydu görüntüleri kullanılmıştır.

Yangın davranışlarını incelemek için bölgenin yükselti, eğim ve bakı haritalarına ihtiyaç vardır. Bu amaçla Shuttle Radar Topography Mission (SRTM) 30 m çözünürlüklü DEM verisi kullanılmıştır. DEM yüzeyin yüksekliği hakkında bilgi içeren X ve Y koordinatlarından oluşan çeşitli enterpolasyon yöntemleri ile üretilmiş, Triangulated İrregular Network (TIN) ya da Raster verilerden oluşan sürekli bir yüzey modelidir (Nguyen ve ark., 2012; Weyrer, 2011).

## Yöntem

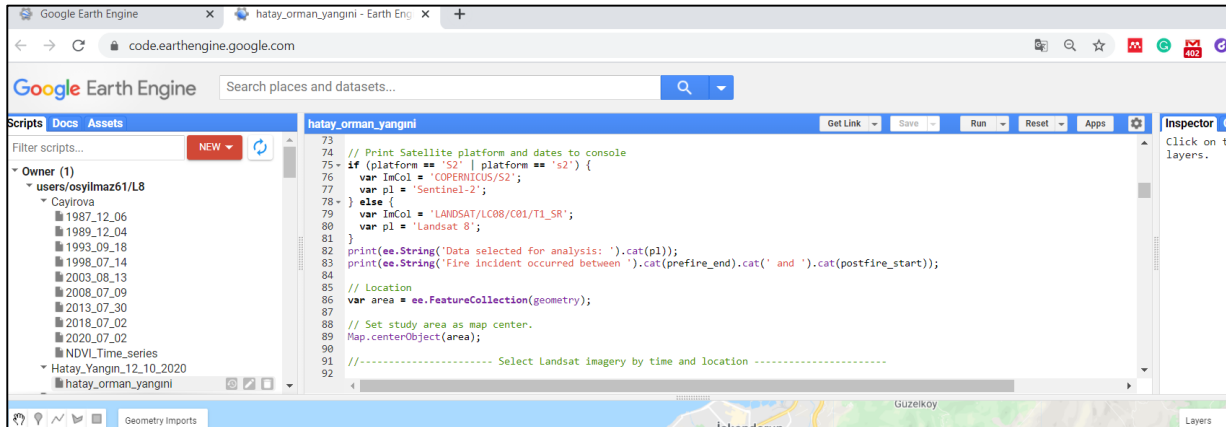
Bu çalışma GEE platformunda JavaScript kodlama dili kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma şu işlem adımlarından oluşmaktadır; (1) ilk önce yangın gerçekleşme tarihlerine uygun uydu tarihleri

seçilmiştir. (2) Seçilen uydu görüntülerine bulut ve su maskesi uygulanmıştır. (3) NBR indeksi yangın öncesi ve yangın sonrası görüntüler için hesaplanmıştır. (4) Hesaplanan NBR indeksleri kullanılarak dNBR hesaplanmıştır. (6) Hesaplanan dNBR'a göre yangın şiddeti alanları belirlenmiştir (7) Yangın öncesi ve yangın sonrası bitki değişimini izlemek için NDVI indeksi hesaplanmıştır. (8) DEM verisi kullanılarak eğim, bakı ve yükselti haritaları elde edilmiş, elde edilen haritalar kullanılarak orman yangını topografik faktörler yönünden analiz edilmiştir. İş akış diyagramı Şekil 4'te verilmiştir.



Şekil 4. İş akış diyagramı

GEE küresel boyutta uydu görüntü sağlayan ve vektör verileri, bulut tabanlı bilgi işlemek için geliştirilmiştir (Kumar ve Mutanga, 2018). Bulut ortamında çalışan GEE, Landsat ve Sentinel görüntülerinin tüm arşivlerine kolay ve eş zamanlı erişebilmektedir (Xiong ve ark., 2017). GEE uygulama program ara yüzü (API) sayesinde JavaScript ve Python kodlama dilleri ile geliştirme ve petabayt ölçeğinde verilere ulaşma ve uygulama olanağı sağlar (Dong ve ark., 2016). GEE, Şekil 5'de görüldüğü gibi çalışma dosyalarının tutulduğu alan, kod kütüphanesinin olduğu alan, verilerin yönetildiği alan, kodların yazıldığı alan, sorgulama ve verileri gönderme işlemlerinin gerçekleştiği alan, görüntülerin interaktif olarak gösterildiği alanlardan oluşmaktadır. Kullanıcılar GEE platformuna <https://earthengine.google.com> adresinden girerek kaydolup tüm arşivlere ulaşabilir.



Şekil 5. GEE ara yüzü

NDVI, bitki indeksi Rouse ve ark. tarafından 1974 yılında geliştirilmiştir (Rouse Jr ve ark., 1974). Bitki örtüsü tarafından yansıtılan kırmızı ve yakın kızılötesi ışığı kullanır. Sağlıklı bitki örtüsü, kendisine çarpan görünür ışığın çoğunu absorbe edip yakın kızıl ötesi ışığın büyük bölümünü yansıtırken, sağlıklı veya seyrek bitki örtüsü görünür ışığın çoğunu ve yakın kızıl ötesi ışığın çok azını yansıtır (Rouse Jr ve ark., 1974). Belirli bir piksel için NDVI hesaplamaları her zaman (-1) ile (+1) arasında değişen bir sayı ile sonuçlanır (Arekhi ve ark., 2019). Çalışmada NDVI bitki indeksi (Eşitlik 1) Sentinel-2 görüntüleri için hesaplanmıştır.

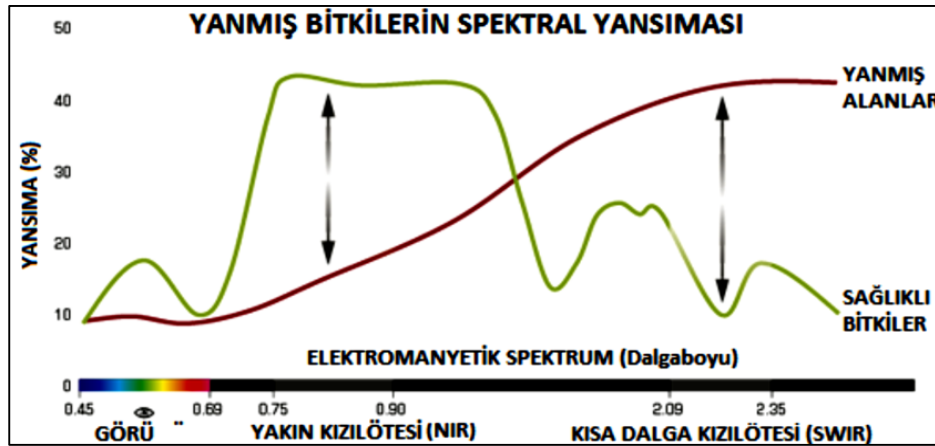
$$NDVI = (\rho_{NIR} - \rho_{Red}) / (\rho_{NIR} + \rho_{Red}) \quad (1)$$

Yangın şiddetini belirlemek için yangın öncesi hesaplanan NBR indeksi (Eşitlik 2) görüntüleri ve yangın sonrası hesaplanan NBR (Eşitlik 2) indeksi görüntülerinin farkları ile hesaplanan bir indekstir (Eşitlik 3). Burada;  $NBR_{pre}$  yangın öncesi durumu,  $NBR_{post}$  yangın sonrası durumu ifade etmektedir.

$$NBR = (\rho_{NIR} - \rho_{SWIR}) / (\rho_{NIR} + \rho_{SWIR}) \quad (2)$$

$$dNBR = NBR_{pre} - NBR_{post} \quad (3)$$

Sağlıklı bitki örtüsü, Yakın Kızılötesi (Near Infrared, NIR)'de çok yüksek bir yansımaya, spektrumun Kısa Dalga Kızılötesi (Short-Wave Infrared, SWIR) ise düşük yansımaya gösterir (Şekil 6). Yangın nedeniyle tahrip olan ormanlık alanlarda ise spektral yansımaya NIR için düşük ve SWIR için yüksek yansımaya değerine sahiptir.



Şekil 6. Yanmış bitkilerin spektral yansımaları (Yiğit ve ark., 2018; Anonim, 2021)

Yanma şiddetleri United States Geological Survey Fire Effects Monitoring and Inventory Protocol (USGS-FIREMON - <https://www.frames.gov/firemon/home>) hazırlanmış olduğu değerler temel alınmıştır. Bu değerler Çizelge 2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. Yanma şiddet dereceleri (Key ve Benson, 2006)

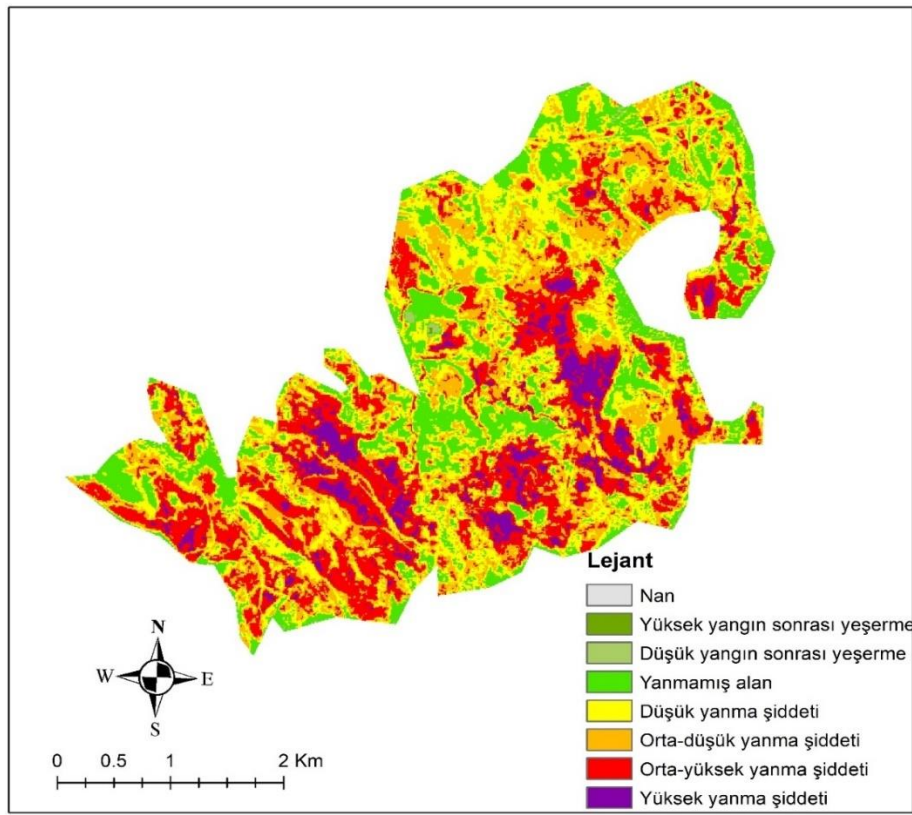
|  | dNBR      | Yanma                         |
|--|-----------|-------------------------------|
|  | <-250     | Yüksek yangın sonrası yeşerme |
|  | -250/-101 | Düşük yangın sonrası yeşerme  |
|  | -100/99   | Yanmamış alan                 |
|  | 100/269   | Düşük yanma şiddeti           |
|  | 270/439   | Orta-düşük yanma şiddeti      |
|  | 440/659   | Orta-yüksek yanma şiddeti     |
|  | >660      | Yüksek yanma şiddeti          |

Hesaplanan dNBR indeksi -2 ile +2 arasında değer alır. Yapılan çalışmada sınıflandırma kolaylığı açısından bütün değerler 1 000 ile genişletilmiştir. Çizelge 2' de görüldüğü gibi negatif değere yakın

bölgelerde yanma şiddetinin azaldığı, pozitif değerlerin arttığı yerlerde ise yanma şiddetinin arttığını göstermektedir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Yangın sonrası bitkilerde oluşan kimyasal değişimler spektral yansımalarını da değiştirmektedir. Özellikle sağlıklı bitkilerde klorofille duyarlı olan NIR bandı 833 nm-835 nm dalga boylarındadır. Hem toprak hem de bitki içeriğindeki su içeriğine, fotosentetik olmayan bitki örtüsü içeriğine, kil, oksitler gibi minarelere hassas olan SWIR-2 bandı (2 185 nm-2 202 nm) aralığındadır. Bu iki bandın matematiksel bağıntıları kullanılarak elde edilen NBR indeksi yangın sonrası alanlarda oluşan kimyasal değişime hassastır (Sabuncu ve Özener, 2019). Vegetasyondaki zararın şiddetini tespit etmek için yangın öncesi ve yangın sonrası NBR indeksi farkları dNBR ile tespit etmek mümkündür. GEE platformunda geliştirilen kodla Hatay, Belen yangın şiddeti haritası Şekil 7’de gösterilmiştir.



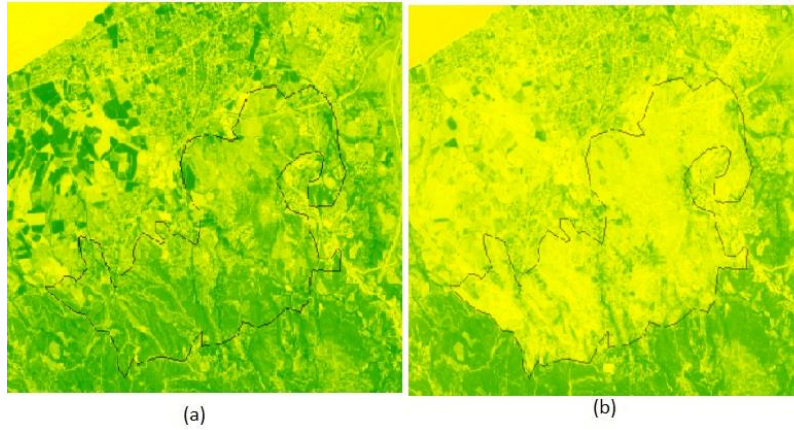
Şekil 7. dNBR yanma şiddeti haritası

Yanma şiddeti haritası raster formattan vektör veri formatına dönüştürmek için ArcMap 10.8 yazılımı kullanılmıştır. Yazılımda raster – vektör dönüşümü yapılarak her bir sınıf için alanlar hesaplanmıştır. Hesaplanan alanlar Çizelge 3’te görülmektedir.

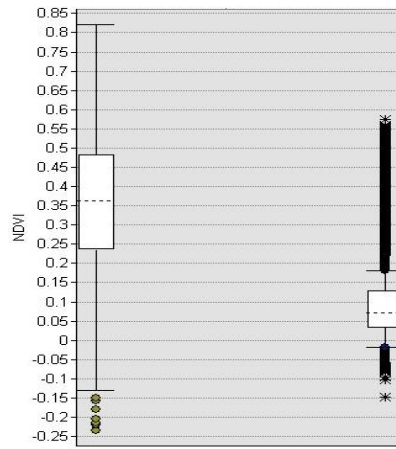
Çizelge 3. Toplam yanan alanlar

| Sınıflar                      | Alan (ha) | Oran (%) |
|-------------------------------|-----------|----------|
| Yüksek yangın sonrası yeşerme | 0.27      | 0.02     |
| Düşük yangın sonrası yeşerme  | 4.39      | 0.28     |
| Yanmamış alan                 | 285.52    | 18.36    |
| Düşük yanma şiddeti           | 397.15    | 25.54    |
| Orta-düşük yanma şiddeti      | 388.24    | 24.96    |
| Orta-yüksek yanma şiddeti     | 388.62    | 24.99    |
| Yüksek yanma şiddeti          | 90.94     | 5.85     |

Yangından önceki uydu görüntüsünde ve yangından sonraki uydu görüntüsünde hesaplanan NDVI bantları Şekil 8’de gösterilmiştir. NDVI bandı -1 ile +1 arasında değer alır. Yani canlı klorofil açısından zengin bitkiler +1 değerine yaklaşırken, ölü ya da klorofil açısından zayıf bitkiler -1’değerine yaklaşmaktadır. Şekil 8 (a) ve (b) görüntüleri incelendiğinde yangın öncesi ağaç ve bitki yoğunluğu olan alanlar daha koyu yeşil renkte görülmektedir. Şekil 8 (b)’de ise koyu yeşil alanların sarı renge döndüğü görülmüştür. Yani bitki yoğunluğunun ve bitki klorofil miktarının azaldığını göstermektedir. Aynı şekilde Şekil 9’da yanma öncesi ve yanma sonrası çizilen kutu grafiklerinde yanma öncesi NDVI değerinin 0.25 – 0.45 arasında yanma sonrası ise 0 ile 0.1 arasında değiştiği görülmektedir.



Şekil 8. NDVI bandı: (a) 04.07.2020 tarihli Sentinel-2 görüntüsü, (b) 12.10.2020 tarihli Sentinel-2 görüntüsü



Şekil 9. Yangın önce ve yangın sonrası gösteren NDVI kutu grafikleri

Literatürde yapılan çalışmalarda, Escuin ve ark. (2008)’de Landsat TM/ETM görüntülerinden türetilen NBR ve NDVI indekslerinin performansı, yangın şiddeti değerlendirmesi için İspanya’nın güneyinde meydana gelen üç yangın için analiz etmişlerdir. Bu çalışmada Escuin ve ark. yaptıkları çalışmaya benzer bir şekilde orman yangınlarını tespit etmenin en uygun yolunun yangın öncesi ve yangın sonrası NBR indekslerinin hesaplanması olduğu sonucuna varılmıştır. Quintano ve ark. (2011)’de Akdeniz ülkelerinde orman yangınlarını Orta Çözünürlüklü Görüntüleme Spektrometresi (Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer, MODIS) görüntüleri ve Yanmış Alan İndeksi (Burned Area Index, BAI), MODIS bantlarına uyarlanan Yanmış Alan İndeksi (Burned Area Index adapted to MODIS bands, BAIM), ve NBR indeksleri kullanarak incelemişlerdir. 250 m mekânsal çözünürlüklü MODIS görüntüleri kullanılarak yapılan çalışmada yangın alanlarının tespiti için yeterli olduğu sonucuna varmışlardır. Bu çalışmada MODIS görüntülerine göre daha yüksek mekânsal çözünürlüklü Sentinel görüntüsü kullanımı orman yangınları tespiti için yeterli olacaktır.

Kurnaz ve ark. (2019)'da yaptıkları çalışmada Muğla ili Zeytinköy bölgesinde meydana gelen orman yangını Sentinel - 2A görüntüsü ile incelenmiştir. Çalışma kapsamında, orta ve yüksek çözünürlüklü uydu görüntülerinde nesne tabanlı sınıflandırma tekniği kullanılarak orman yangını alanlarını belirlemişlerdir. Bu çalışmada Kurnaz ve ark. farklı olarak piksel tabanlı sınıflandırma yapılmıştır. Her iki sınıflandırmanın birbirlerine göre üstünlükleri vardır. Yüksek çözünürlüklü uydu görüntülerinde daha çok nesne tabanlı sınıflandırma kullanılırken orta çözünürlüklü görüntülerde piksel tabanlı sınıflandırma tercih edilmektedir (Mandanici ve Bitelli, 2016; Pahlevan ve ark., 2019).

DEM verisiyle üretilen yükselti, eğim, bakı haritaları (Şekil 10) ve dNBR haritası (Şekil 7) kullanılarak ArcMap 10.8 yazılımı Spatial Analyst Tools/Zonal kullanılarak aşağıdaki analizler yapılmıştır.

Çalışma alanının yükseltisi 31 m ile 550 m arasında değişmektedir (Şekil 10a). Yangın şiddetinin yüksek olduğu 90.94 hektarlık alan yükselti açısından değerlendirildiğinde, sırasıyla en yüksek yangın şiddeti; 200-300 m arasında 50 ha, 300-400 m arasında 21 ha, 100-200 m arasında 18 ha, 100 m'ye kadar olan yükseltide 1 ha ve 400 m'den yüksek yerlerde 1 ha olarak belirlenmiştir. Yangın şiddetinin yüksek ve orta-yüksek olduğu 478 hektarlık alana bakıldığında ise, sırasıyla en yüksek yangın şiddeti; 200-300 m arasında 190 ha, 100-200 m arasında 131 ha, 300-400 m arasında 121 ha, 100 m'ye kadar yükseltide 22 ha ve 400 m'den yüksek yerlerde 13 ha alan olarak belirlenmiştir. Akdeniz bölgesinde sahil kesiminden itibaren yükseltisi düşük olan alanlarda yangın riskinin fazla olduğu görülmektedir. Özellikle 200-300 m arasında saf kızılçam ormanlarının bulunması, sıcaklığın yüksek olması ve yangına birinci derecede hassas bölge olması orman yangınlarını risklerini arttırmaktadır.

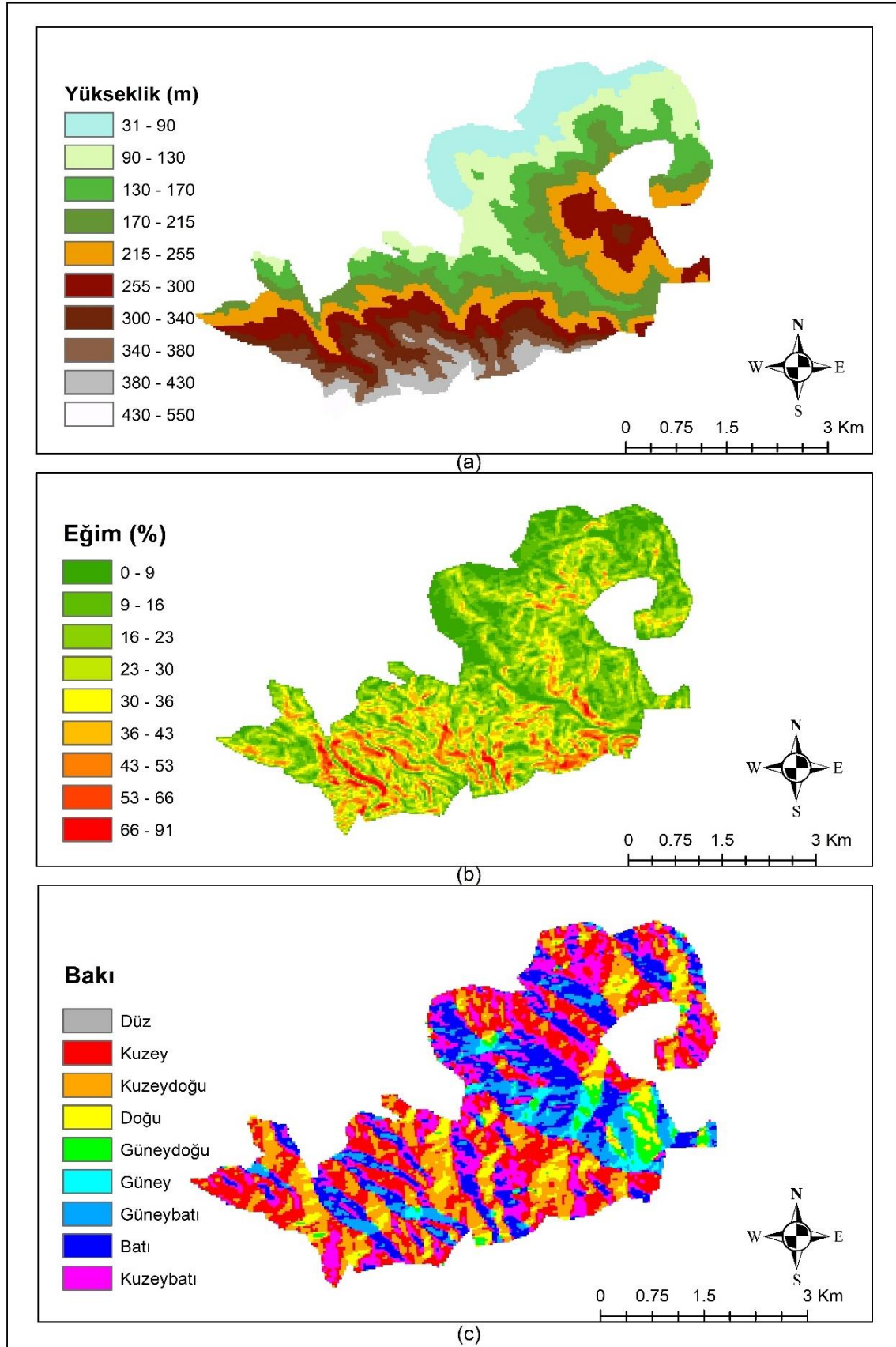
Topografik faktörlerden eğimin yangınların yayılmasında büyük önemi vardır. Diğer hususlar eşit olmak koşuluyla yangınlar eğimli arazide daha çabuk ilerlemektedir. Bilindiği üzere eğim arttıkça, yangının yayılma hızı da artar. Yangın yamaçtan yukarı şiddetli rüzgâra bağlı olarak yelpaze şeklinde ilerler (Çanakçıoğlu, 1985). Ormanlık alanlarda eğimin derecesi arttıkça yangının eğim boyunca hızı ve şiddeti artmaktadır. Ayrıca eğim derecesi arttıkça örtü yangınları tepe yangınlarına daha çabuk dönebilmekte ve bu durum yangınla mücadeleyi zorlaştırmaktadır.

Yangın şiddetinin yüksek olduğu 90.94 ha alana eğim (Şekil 10b) açısından bakıldığında sırasıyla yangın şiddeti en yüksek %30 dan fazla eğimde 36 ha, %20-30 arası eğimde 29 ha, %10-20 eğimde 21 ha, %5-10 eğimde 3 ha ve %5 eğime kadar olan yerlerde 2 ha alan olarak belirlenmiştir. Yangın şiddetinin yüksek ve orta-yüksek olduğu 478 ha alana bakıldığında ise; sırasıyla yangın şiddeti en yüksek %30 dan fazla eğimde 183 ha, %20-30 arası eğimde 144 ha, %10-20 eğimde 109 ha, %5-10 eğimde 29 ha ve %5 eğime kadar olan yerlerde 13 ha alan olarak belirlenmiştir.

Yangın şiddetinin yüksek olduğu 90.94 ha alana bakı (Şekil 10c) açısından bakıldığında; sırasıyla yangın şiddeti en yüksek doğuda 35 ha, kuzeyde 25 ha, batıda 20 ha, güneyde 10 ha ve düz alanlarda 1 ha olarak belirlenmiştir. Yangın şiddetinin yüksek ve orta-yüksek olduğu 478 hektarlık alana bakı açısından bakıldığında ise, sırasıyla en yüksek yangın şiddeti doğuda 181 ha, kuzeyde 171 ha, batıda 89 ha, güneyde 34 ha ve düz alanlarda 3 ha olarak belirlenmiştir. Belen orman yangınında sanılanın aksine en fazla kuzeyli bakılar zarar görmüştür. Mersin ilinde yapılan bir çalışmada orman yangınlarının alansal dağılımına bakı açısından bakıldığında, kuzey (%23) ve batı (%21) gruplarında yangınların fazla görüldüğü bildirilmektedir. Yangınlar dinamik yapıya sahip olduğu için Belen orman yangının davranışında bakı faktörü değişiklik göstermiştir.

Genellikle güney ve güneydoğu bakılar, yangının çıkması ve yayılması için en uygun koşullara sahiptir. Daha fazla direk güneş ışığı alan bu yerler, havanın ve yanıcı maddenin sıcaklığını artırıcı etkide bulunmaktadır (Çanakçıoğlu, 1985). Özellikle güneyli bakılarda sıcaklığın ve ışığın fazla olması sebebiyle ışık isteği fazla olan kızılçam gibi ağaç türlerinden oluşan meşcerelerde yangın tehlikesi daha

fazla görülmektedir. Bu alanlarda nem miktarının az olması da yanıcı maddenin tutuşma sıcaklığını düşürmektedir.



Şekil 10. Yükselti, eğim ve bakı haritası



## SONUÇ

Çalışma kapsamında UA ve CBS'nin birlikte kullanımının orman yangınlarını hızlı bir şekilde tespit etme, analiz etme ve yorumlamanın daha kolay olacağı vurgulanmıştır. Özellikle bu çalışmada GEE platformunun geliştirilen kod ile uydu görüntüsünü bilgisayara indirme gereksinimi duymadan bulut ortamında çok daha hızlı işlenebileceği gösterilmiştir. Bu sayede ülkenin ya da dünyanın herhangi bölgesinde çıkan orman yangınına dâhil ilk bilgilere çok hızlı ulaşılabilecektir. Gelişen uydu teknolojileri zamansal çözünürlük açısından da oldukça yüksektir. Özellikle 10 m mekânsal çözünürlüğe ve 5 gün zamansal çözünürlüğe sahip Sentinel-2 görüntüleri orman yangının hemen sonrasında bilgiye ulaşma açısından oldukça kullanışlıdır. Orman yangınlarının tespitinde, arazi değişimi incelemesinde geliştirilen indekslerin kullanımı orman yangınlarında yangın sonrası bulunacak sonuçlarında doğruluğunu artıracaktır. Bu çalışmada görüldüğü üzere yanma öncesi NDVI değerinin 0.25 – 0.45 arasında yanma sonrası ise 0 ile 0.1 arasında değiştiği görülmektedir. Aynı şekilde, vejetasyondaki zararın şiddetini tespit etmek için yangın öncesi ve yangın sonrası NBR indeksi farkları dNBR ile tespit edilebilmektedir.

Birçok bilimde oldukça fazla tercih edilen UA ve CBS, orman yangını tespitinde, yangının topografik faktörler açısından analizi oldukça fazla tercih edilen yöntemlerdir. Ayrıca CBS ile yapılan araziye yönelik yükselti, eğim ve bakı gibi karakteristik bilgiler arazinin yapısı ve yangın hakkında oldukça fazla etkili olduğu ortaya koyulmuştur. Topografik faktörlerden yükselti, eğim ve bakının, yangın şiddetinin yüksek ve orta-yüksek olduğu alanlardaki etkisi değerlendirilmiştir. Buna göre çalışma alanında yüksek ve orta-yüksek yangın şiddeti; 200-300 m arasındaki yükseltide, %30'dan fazla eğimde ve kuzeyli bakılarda görülmektedir. Bu çalışma ile GEE platformunda yanan orman alanlarının tespitinde önemli sonuçlar alınmış olup, bundan sonra dünyanın herhangi bölgesinde oluşabilecek yangın afetinde yangın sonrası elde edilen ilk uydu görüntüsü ile dakikalar içerisinde yangın şiddeti haritalarının üretilebileceği gösterilmiştir. Bu sayede çalışmanın, aynı bölgede oluşabilecek ikinci bir orman yangını durumunda karar vericiler açısından rehber olabileceği gibi orman yangını çıkan farklı alanlarda da test edildiğinde önemi aratacaktır. Ayrıca bu çalışma, ortaya konan bulgular ve sonuçlar ile literatürde bulunan çalışmalardan farklı olarak ortaya koyulmasıyla özgün bir değere sahiptir. Web tabanlı uygulamalar için esnek kütüphaneler olan Google Earth Engine platformu kullanılarak çalışma kapsamında yazılan javascript kodu için web tabanlı bir uygulama geliştirilebilir.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Anonim, 2020a. Bitki örtüsü, <https://www.belen.bel.tr/bitki-ortusu/> (Erişim Tarihi: 29.01.2021).
- Anonim, 2020b. <https://earthengine.google.com> (Erişim Tarihi: 22.01.2021).
- Anonim, 2021. [https://www.earthdatascience.org/images/courses/earth-analytics/remote-sensing/barc\\_spectral\\_response\\_US\\_forest\\_service.png](https://www.earthdatascience.org/images/courses/earth-analytics/remote-sensing/barc_spectral_response_US_forest_service.png) (Erişim Tarihi: 22.01.2021).
- Arekhi M, Goksel C, Balik Sanli F, Senel G, 2019. Comparative Evaluation of the Spectral and Spatial Consistency of Sentinel-2 and Landsat-8 OLI Data for Igneada Longos Forest. ISPRS International Journal of Geo-Information, 8(2): 56.
- Arıca B, Enez K, Küçük Ö, 2011. Uydu Görüntüsü Kullanarak Yangın Potansiyelinin Belirlenmesi. I. Ulusal Akdeniz Orman ve Çevre Sempozyumu, 26-28 Ekim, Kahramanmaraş.

- Atun R, Kalkan K, Gürsoy Ö, 2020. Determining The Forest Fire Risk with Sentinel-2 Images. *Turkish Journal of Geosciences*, 1(1): 22–26.
- Bar S, Parida BR, Pandey AC, 2020. Landsat-8 and Sentinel-2 Based Forest Fire Burn Area Mapping Using Machine Learning Algorithms on GEE Cloud Platform over Uttarakhand, Western Himalaya. *Remote Sensing Applications: Society and Environment*, 18: 100324.
- Beşli N, Tenekeci E, 2020. Uydu verilerinden karar ağaçları kullanarak orman yangını tahmini. *DÜMF Mühendislik Dergisi*, 11(3): 899–906.
- Bilgili E, 2014. Orman Koruma Dersi Geçici Ders Notları. Trabzon, 155s. <https://teyit.org/wp-content/uploads/2017/01/bilgili-ders-notu-2014.pdf> (Erişim Tarihi: 23.01.2021).
- Butt A, Shabbir R, Ahmad SS, Aziz, N, 2015. Land use change mapping and analysis using Remote Sensing and GIS: A case study of Simly watershed, Islamabad, Pakistan. *Egyptian Journal of Remote Sensing and Space Science*, 18(2): 251–259.
- Çanakçıoğlu H, 1985. Orman Koruma. İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Yayınları, İ.Ü. Yayın No: 3315, O.F. Yayın No: 376, s. 486, İstanbul-Türkiye.
- Dong J, Xiao X, Menarguez MA, Zhang G, Qin Y, Thau D, Biradar C, Moore B, 2016. Mapping Paddy Rice Planting Area in Northeastern Asia with Landsat 8 Images, Phenology-Based Algorithm and Google Earth Engine. *Remote Sensing of Environment*, 185:142-154.
- Escuin S, Navarro R, Fernández P, 2008. Fire severity assessment by using NBR (Normalized Burn Ratio) and NDVI (Normalized Difference Vegetation Index) derived from LANDSAT TM/ETM images. *International Journal of Remote Sensing*, 29(4): 1053–1073.
- Gorelick N, Hancher M, Dixon M, Ilyushchenko S, Thau D, Moore R, 2017. Google Earth Engine: Planetary-scale geospatial analysis for everyone. *Remote sensing of Environment*, 202: 18–27.
- Haque MI, Basak R, 2017. Land cover change detection using GIS and remote sensing techniques: A spatio-temporal study on Tanguar Haor, Sunamganj, Bangladesh. *Egyptian Journal of Remote Sensing and Space Science*, 20(2): 251–263.
- He T, Sun YJ, Xu JD, Wang XJ, Hu CR, 2014. Enhanced land use/cover classification using support vector machines and fuzzy k-means clustering algorithms. *Journal of Applied Remote Sensing*, 8(1): 083636.
- Karabulut M, Karakoç A, Gürbüz M, Kızılelma Y, 2016. Coğrafi Bilgi Sistemleri Kullanarak Başkonuş Dağında (Kahramanmaraş) Orman Yangını Risk Alanlarının Belirlenmesi. *Uluslararası Sosyal Araştırmalar Dergisi*, 6(24), 171-179.
- Key CH, Benson NC, 2006. Landscape assessment (LA). In: Lutes, Duncan C.; Keane, Robert E.; Caratti, John F.; Key, Carl H.; Benson, Nathan C.; Sutherland, Steve; Gangi, Larry J. 2006. FIREMON: Fire effects monitoring and inventory system. Gen. Tech. Rep. RMRS-GTR-164-CD. Fort Collins, CO: US Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. p. LA-1-55, 164.
- Khatami R, Mountrakis G, Stehman SV, 2016. A meta-analysis of remote sensing research on supervised pixel-based land-cover image classification processes: General guidelines for practitioners and future research. *Remote Sensing of Environment*, 177: 89–100.
- Küçük Ö, Bilgili E, Durmaz BD, 2005. Yangın Potansiyelinin Belirlenmesinde Yanıcı Madde Haritalarının Önemi. *Türkiye Ormancılık Dergisi*, 6(1): 104–116.
- Kumar L, Mutanga O, 2018. Google Earth Engine Applications Since Inception: Usage, Trends, and Potential. *Remote Sensing*, 10:1509.
- Kurnaz B, Bayık Ç, Abdikan S, 2019. Determination of Forest Fire Area by Using Satellite Images: Muğla Case. 3rd International Conference on Advanced Engineering Technologies (ICADET), 19-21 September.
- Martinez E, 2003. Remote Sensing Techniques for Land Use Classification, 1–5.
- Mandanici E, Bitelli G, 2016. Preliminary comparison of sentinel-2 and landsat 8 imagery for a combined use. *Remote Sensing*, 8(12): 1014-2016.
- Nguyen HT, Pearce JM, Harrap R, Barber G, 2012. The application of LiDAR to assessment of rooftop solar photovoltaic deployment potential in a municipal district unit. *Sensors*, 12(4): 4534–4558.
- O'Brien JJ, Hiers JK, Callaham Jr. MA, Mitchell SRJ, 2008. JackInteractions among overstory structure, seedling life history traits and fire in frequently burned neotropical pine forests *Ambio*, 37: 542-547.

- OGM, 2019. Ormancılık istatistikleri 2019. <https://www.ogm.gov.tr/tr/ormanlarimiz/resmi-istatistikler> (Erişim Tarihi: 30.01.2021).
- OGM, 2021. Orman Genel Müdürlüğü 2021 yılı performans programı. Strateji Geliştirme Daire Başkanlığı, Ankara <https://www.ogm.gov.tr/tr/duyurular-sitesi/Documents/ORMAN%20GENEL%20M%3%9cD%3%9cRL%3%9c%4%9e%3%9c%2021%20YILI%20PERFORMANS%20PROGRAMI%20%20c4%b0.pdf> (Erişim Tarihi: 22.01.2021).
- Pahlevan N, Chittimalli SK, Balasubramanian SV, Vellucci V, 2019. Sentinel-2/Landsat-8 product consistency and implications for monitoring aquatic systems. *Remote sensing of Environment*, 220: 19-29.
- Quintano C, Fernández-Manso A, Stein A, Bijker W, 2011. Estimation of area burned by forest fires in Mediterranean countries: A remote sensing data mining perspective. *Forest Ecology and Management*, 262(8): 1597–1607.
- Rawat JS, Kumar M, 2015. Monitoring land use/cover change using remote sensing and GIS techniques: A case study of Hawalbagh block, district Almora, Uttarakhand, India. *Egyptian Journal of Remote Sensing and Space Science*, 18(1): 77–84.
- Reis M, Dotal H, Abiz B, Tat S, 2016. Determining forest priority areas by using multi-criteria decision making method and geographic information system in Kahramanmaraş, 43–49.
- Rouse Jr JW, Haas RH, Schell JA, Deering DW, 1974. Monitoring Vegetation Systems in the Great Plains with ERTS. NASA Spe. Scientific and Technical Information Office, National Aeronautics and Space, 351: 309.
- Sabuncu A, Özener H, 2019. Uzaktan Algılama Teknikleri ile Yanmış Alanların Tespiti: İzmir Seferihisar Orman Yangını Örneği. *Doğal Afetler ve Çevre Dergisi*, 5(2): 317–326.
- Saylan İH, Cömert R, 2019. Sentinel-2A Ürünlerinin Yanmış Orman Alanlarının Haritalanmasındaki Başarının Araştırılması. *Türkiye Uzaktan Algılama Dergisi*, 1(1): 08–15.
- Stillwell J, Clarke G, 2004. *Applied GIS and spatial analysis*. Wiley Online Library, s.406
- Tonbul H, 2015. Uydu Görüntü Verileri Kullanılarak Orman Yangın Şiddeti ve Yangın Sonrası Durumun Zamansal Olarak İncelenmesi: Akdeniz Bölgesi Örneği. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış).
- Weyrer TN, 2011. GIS Based Analysis of the Potential of Solar Energy of Roof Surfaces in Baton Rouge, Louisiana, Carinthia University of Applied Science School of Geoinformation, 2. Bachelor Thesis (Printed), May 2011, s.65.
- Xiong J, Thenkabail PS, Tilton JC, Gumma MK, Teluguntla P, Oliphant A, Congalton RG, Yadav K, Gorelick N, 2017. Nominal 30-m Cropland Extend Map of Continental Africa by Integrating Pixel-Based and Object-Based Algorithms Using Sentinel-2 and Landsat-8 Data on Google Earth Engine. *Remote Sensing*, 9(10):1065.
- Yiğit A, Uysal M, 2019. Afet yönetiminde uzaktan algılamanın kullanımı. İdRc 2019 International Disaster & Resilience Congress, 26-28 June.
- Yiğit Avdan Z, Uğur A, Cömert R, 2018. Orta Çözünürlüklü Uydu Görüntülerinde Değişim Saptama İle Yanmış Orman Alanların Haritalanması. VII. Uzaktan Algılama - CBS Sempozyumu, 18-21 Eylül, Eskişehir.
- Yomralıoğlu T, Nişancı R, Uzun B, 2007. Raster tabanlı nominal değerlendirme yöntemine dayalı arsa-arazi düzenlemesi uygulaması, TMMOB Harita ve Kadastro Mühendisleri Odası 11. Türkiye Harita Bilimsel ve Teknik Kurultayı, 2–6 Nisan.

**Atf İçin:** Başer U, Bozoğlu M, 2021. Yem Fabrikalarında Kapasite Kullanımının Üretim ve Ekonomik Performans Açısından Değerlendirilmesi: Samsun İli Örneği, Türkiye. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1533-1539.

**To Cite:** Başer U, Bozoğlu M, 2021. Evaluation of Capacity Utilization in Terms of Production and Economic Performance in Feed Factories: The Case of Samsun Province, Turkey. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1533-1539.

**Yem Fabrikalarında Kapasite Kullanımının Üretim ve Ekonomik Performans Açısından Değerlendirilmesi: Samsun İli Örneği, Türkiye**

Uğur BAŞER<sup>1\*</sup>, Mehmet BOZOĞLU<sup>1</sup>

**ÖZET:** Yem fabrikalarının tarımsal ürünlerin işlenmesi, istihdam oluşturma ve ihracatla döviz getirisi sağlama gibi önemli ekonomik katkıları söz konusudur. Bu çalışmanın amacı, yem fabrikalarında kapasite kullanım oranına bağlı olarak yem üretim maliyetini belirlemek ve atıl kapasiteden kaynaklı ekonomik kaybı ortaya koymaktır. Araştırmanın materyalini Samsun ilinde karma yem üreten 3 fabrikadan anket yoluyla elde edilen veriler oluşturmaktadır. Yem fabrikalarında yem üretim maliyeti kısmi maliyet yaklaşımıyla, fabrikaların ekonomik kayıpları ise GSÜD, brüt kar, net kar ve nispi karın hesaplanmasıyla ortaya konulmuştur. Yem fabrikalarının yıllık ortalama kapasite kullanım oranı %55.43, yem üretim miktarı 161,493 ton, yem üretim masrafı ise 162.99 milyon TL'dir. Yem üretim masrafının %88.9'unu değişken masraflar, %11.1'ini sabit masraflar oluşturmaktadır. Fabrikalarda ortalama 1 kg yem üretim maliyeti 1.009 TL olup, birim maliyet tam kapasiteyle çalışan fabrikada 0.992 TL, orta kapasiteyle çalışan fabrikada 1.014 TL, düşük kapasiteyle çalışan fabrikada ise 1.018 TL'dir. Fabrikaların ortalama gayrisafı üretim değeri 183.4 milyon TL, ortalama brüt karları 38.4 milyon TL, ortalama net karları ise 20.4 milyon TL'dir. Yem fabrikalarında eksik kapasiteyle çalışılmasından dolayı üretimde %44.78'lik (597.52 bin ton), GSÜD'de %55 (672.45 milyon TL), brüt karda %54.13 (136.11 milyon TL), net karda ise %53.12'lik (69.38 milyon TL) bir kayıp yaşanmıştır. Kapasite kullanım oranının artırılması, üretim maliyetlerini azaltırken brüt ve net karın artmasını sağlayacaktır. Yem sanayine yapılacak yatırımların fizibiliteye dayandırılmasıyla birlikte, üretimin uluslararası piyasalara açılması, yaşanan ekonomik kayıpların önlenmesine ve sektörün rekabet gücünün artırılmasına önemli katkılar sağlayacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Yem fabrikası, kapasite kullanım oranı, üretim maliyeti, ekonomik performans, ekonomik kayıp, Samsun

**Evaluation of Capacity Utilization in Terms of Production and Economic Performance in Feed Factories: The Case of Samsun Province, Turkey**

**ABSTRACT:** Feed factories make important contributions to the economy such as utilizing agricultural crops, creating employment and providing foreign currency returns through exports. The aim of this study was to examine the production cost and the economic losses of feed factories arising from idle capacity. The research material consisted of the data obtained through the questionnaire from 3 factories producing concentrated feed in Samsun Province. The cost of feed production was determined by partial cost approach, and the economic losses of the factories was calculated by estimating GDP, gross profit, net profit and relative profit. The annual average capacity utilization rate of the feed factories was found as 55.43%, the feed production amount and cost were found as 161,493 tons and 162.99 million TL, respectively. About 89% of the feed production costs were variable costs and 11% were fixed costs. According to the average of the factories, the cost of feed production per 1 kg was found as 1.009 TL. However, assuming that these factories work at full, medium and low capacity, the cost of the feed for one kg was calculated as 0.992 TL, 1.014 TL and 1.018 TL, respectively. While the average gross production value of the factories was calculated as 183.4 million TL, their average gross and net profits were calculated as 38.4 million TL and 20.4 million TL, respectively. Due to working with insufficient capacity, the feed factories lost 44.78% of production (597.52 tons), 55% of GDP (672.45 million TL), 54.13% of gross profit (136.11 million TL), and 53.12% of net profit (69.38 million TL). While increasing the capacity utilization rate could increase the firms' gross and net profits, while this can decrease the production costs. Realising feasible investments and expanding to international feed markets could contribute significant benefits for the feed factories by preventing economic losses and increasing their competitiveness.

**Keywords:** Feed factory, capacity use ratio, production cost, economic performance, economic loss, Samsun

<sup>1</sup> Uğur BAŞER ([Orcid ID: 0000-0003-4961-2764](https://orcid.org/0000-0003-4961-2764)), Mehmet BOZOĞLU ([Orcid ID: 0000-0001-8333-1865](https://orcid.org/0000-0001-8333-1865)), Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Ekonomisi Bölümü, Samsun, Türkiye

**\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Uğur BAŞER, e-mail: ugur.baser@omu.edu.tr

Bu çalışma Uğur BAŞER'in "Sığır Eti Arz Zinciri ve Besi İşletmelerinin Ekonomik Sosyal ve Çevresel Sürdürülebilirliği" adlı doktora tezinden üretilmiştir.

## GİRİŞ

Yemler, hayvanların yemeleri halinde yararlanabilecekleri organik veya inorganik besin maddeleri içeren materyallerdir. Birim miktarında hazmedilebilir besin maddeleri az ve selüloz oranı yüksek olanlarına kaba yem, birim miktarında hazmedilebilir besin miktarı yüksek olanlarına ise karma (kesif) yem denilmektedir (Barz ve Uzun, 2016). Büyükbaş, küçükbaş, kanatlı hayvanlar, at, arı, balık ve süs hayvanları için yemler üreten yem fabrikaları, tarımsal ürünleri ham madde olarak işleyerek hayvancılık sektörü için karma yem girdisi üreten önemli bir sanayi koludur.

Dünya’da 2018 yılında 1.103 milyar ton karma yem üretilmiştir. Bu üretimin %35.8’i Pasifik Asya ülkelerinde, %25.1’si Avrupa’da, %18.0’i Kuzey Amerika, %14.9’u Latin Amerika’da, %3.7’si Afrika’da, %2.5’i ise Ortadoğu ülkelerinde gerçekleşmiştir. Çin 179.93 milyon ton, Amerika ise 172.73 milyon ton karma yem üretimiyle dünyada en önemli üreticiler olup, dünyada toplam karma yem üretiminin %32’sini sağlamaktadırlar (GFS, 2019). Türkiye’de 655 adet karma yem üreten fabrika bulunmakta olup, 2018 yılında 24.14 milyon ton karma yem üretmişlerdir. Bu yemin %21’ini besi yemi, %26.8’ini süt yemi, %22’sini etlik piliç yemi, %14.9’unu yumurta yemi, %15.3’ünü ise küçükbaş, at, balık ve süs hayvanları yemleri oluşturmaktadır. Türkiye’de yem depolayan ve pazarlayan 14,802 adet işletme bulunmakta olup, bunların %88.8’i perakende yem satışı yapmaktadır. (TOB, 2019).

Yem fabrikalarının, tarımsal ürünlerin işlenmesi, istihdam oluşturma ve ihracatla döviz getirisi sağlama gibi önemli ekonomik katkıları söz konusudur. Yem üreten işletmelerin kapasite kullanım oranlarına göre masrafları ve ekonomik kayıplarının ortaya konulması, ekonomik performansları ve rekabet güçlerinin artırılmasına önemli katkılar sağlayabilecektir.

Şimdiye kadar yem sektörüyle ilgili yem fabrikalarının mevcut durumu (Demir ve Elmalı, 2011; Demirel ve Şentürk Demirel, 2012; Denli ve ark., 2015), karma yemde izlenebilirlik sistemleri (Cebeci, 2007) ve yem teknolojisindeki gelişmelerin yem kalitesine ve değerine etkileri (Akbay ve Ak, 2018) konularını ele alan çalışmalar yapılmasına rağmen, yem fabrikalarının yem üretim maliyetlerini ve karlılığını ele alan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Demir ve Elmalı (2011) yem fabrikalarının en önemli sorunlarını; kaliteli hammadde temininde nakliye-ulaşım masraflarının yüksekliği (%62.50) ve pazarlamada haksız rekabetin yaşanması (%87.50) olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca Doğu Anadolu’da bulunan yem fabrikalarının kapasite kullanım oranının ortalama %44.64 olduğunu ve bunun nedeninin talep yetersizliğinden kaynaklandığını belirtmiştir. Demirel ve Şentürk Demirel (2012) Türkiye’de hayvan varlığı ile birlikte karma yem üretimi artsa da kalite olarak yetersiz olduğunu belirtmiştir. Denli ve arkadaşları (2015) çalışmasında Diyarbakır’da fabrikaların kapasite kullanım oranını %50.3 olarak tespit etmiştir. Cebeci (2007) karma yem sektöründe izlenebilirlik sistemlerinin sektörel kullanıma açılması ve sektör temsilcisi olan STK’ların sürece entegre edilmesi gerektiğini vurgulamıştır. Akbay ve Ak (2018) öğütme, karıştırma ve yeme şekil verme konusunda yaşanan teknolojik gelişmelerin karma yemin üretimine olumlu etkilerinin olduğunu belirtmiştir.

Çalışmanın amacı, yem fabrikalarında kapasite kullanım oranına bağlı olarak yem üretim maliyetini belirleyerek, atıl kapasiteden kaynaklı ekonomik kaybı ortaya koymaktır. Araştırma bulguları, yem sektörüyle ilgili alınacak mikro ve makro düzeydeki kararlara önemli katkılar sağlayabilecektir.

## MATERYAL VE METOT

Samsun’da karma yem üreten 8 fabrika bulunmaktadır. Araştırmanın materyalini, Samsun ilinde karma yem üreten en büyük 3 fabrikanın yöneticileriyle yapılan yüz yüze anketlerden elde edilen veriler oluşturmaktadır. Ayrıca Dünya ve Türkiye’nin yem üretimine dair Tarım ve Orman Bakanlığı ile Global Feed Survey araştırmalarından elde edilen ikincil verilerden de yararlanılmıştır.

İncelenen fabrikalarda birçok farklı yem üretilmektedir. Fabrikanın gelir ve giderlerini görmek için tüm farklı yem türleri tek bir çıktı gibi ele alınmıştır. Yem fabrikalarında yem üretim maliyeti için değişken ve sabit masraflar ortaya konularak birim üretim maliyeti hesaplanmıştır. Araştırmada yem ham maddesi olarak kullanılan girdiler (mısır, küspe, kepek, melas, soya, arpa vb) için yurt içi ve yurt dışından alınan girdilerin toplam parasal değeri alınmıştır. Amortismanlar, Gelir İdaresi Başkanlığının vermiş olduğu amortisman oranları çizelgesi ile bölgedeki sermayenin ortalama kullanım süresine bağlı olarak hesaplanmıştır. Reel faiz oranı %1.48 olarak alınmıştır (TCMB, 2019). Genel idare gideri için değişken masrafların %3'ü esas alınmıştır. Binaların tamir ve bakım masraflarının hesaplanmasında, bina iktisap bedelinin %1'i bakım, %2'si onarım bedeli olarak hesaplara dâhil edilmiş (Açıl, 1977) veya muhasebe beyanları göz önünde bulundurulmuştur. Alet ve makinaların yağ, yakıt, tamir-bakım giderleri için işletmecilerin fiilen yaptıkları toplam giderler esas alınmıştır. Yem fabrikalarında kira bedeli bina ve arazilerde vergi değerinin %5'i (GVK, 1960), kurumlar vergisi tutarı için ise karın %20'si alınmıştır (KVK, 2006). Araştırmada diğer masraf unsurlarının tespit edilmesinde muhasebe kayıtları ile işletmecilerin beyanları esas alınmıştır. Araştırmada GSÜD, brüt kar, net kar ve nispi kar aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır (Erkuş ve ark., 1995).

$$GSÜD = \text{Yem (Besî, süt, buzağı, küçükbaş, broiler, yumurta, özel dönem yemleri) üretim miktarı} * \text{Yem fiyatı} \quad (1)$$

$$\text{Brüt kar} = GSÜD - \text{Toplam değişken masraflar} \quad (2)$$

$$\text{Net kar} = GSÜD - \text{Toplam üretim masrafları} \quad (3)$$

$$\text{Nispi kar} = GSÜD / \text{Toplam üretim masrafları} \quad (4)$$

GSÜD bir üretim dalının bir muhasebe döneminde yarattığı toplam üretim değerini ifade etmektedir. Nispi kar, fabrikalarda yem üretim faaliyeti için yapılan 1 TL'lik masrafa karşılık ne kadar gelir elde edildiğinin göstergesidir.

Fabrikalarda kapasite kullanım oranı, fiilen kullanılan kapasitenin kurulu kapasiteye oranlanmasıyla bulunmuştur. Bu kapsamda görüşülen fabrikaların ortalama kapasite kullanım oranı %55.43'tür. En düşük yıllık kurulu kapasiteye (120,000 ton) sahip olan I. fabrika tam kapasite (%100) ile çalışırken, ikinci yem fabrikası 612,000 ton olan kurulu kapasitenin %50.57'sini, üçüncü fabrika ise 350,000 ton olan kurulu kapasitesinin %15.71'ini kullanmaktadır. Araştırmada yem fabrikaları tam, orta ve düşük kapasitede çalışanlar olarak üç kategoride incelenmiş olup, kapasite kullanım oranına göre üretim maliyeti ve ekonomik kayıp ortaya konmuştur. Çizelge 1'de kullanılan kapasite ile fiili kapasite oranları verilmiştir.

**Çizelge 1.** Yem fabrikalarının kapasite durumları

|  | I. Fabrika<br>(Tam kapasite) | II. Fabrika<br>(Orta kapasite) | III. Fabrika<br>(Düşük kapasite) | Fabrikalar<br>ortalaması |
|--|------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| Teorik kapasite (ton yıl <sup>-1</sup> ) | 120 000                      | 612 000                        | 350 000                          | 360 666.7                |
| Fiili kapasite (ton yıl <sup>-1</sup> )  | 120 000                      | 309 480                        | 55 000                           | 161 493.3                |
| Kapasite kullanım oranı (%)              | 100.00                       | 50.57                          | 15.71                            | 55.43                    |

Araştırmada sınanan hipotez şu şekildedir:

H<sub>0</sub>: Yem fabrikalarının kapasite kullanımı ile ekonomik performans arasında ilişki yoktur.

H<sub>1</sub>: Yem fabrikalarının kapasite kullanım oranının artması ekonomik performansını artırmaktadır.

Ayrıca araştırmada fabrikaların tam kapasiteyle çalışmamasından dolayı yaşanan ekonomik kaybın hesaplanması birtakım varsayımlar altında gerçekleştirilmiştir. Bu varsayımların ilki, üretim tekniği,

döviz kuru vb. gibi diğer tüm şartlar ile birlikte girdi ve çıktı fiyatlarının sabit olduğu yani değişmediğidir. Diğer varsayım ise yem fabrikaları tam kapasiteyle çalışırsa optimum üretim seviyesine ulaşacağı varsayımdır. Böylelikle fabrikalarda kapasiteyi artıracak önerilerin ortaya konması mümkün olacaktır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

İncelenen yem fabrikalarında üretilen yemin %43.29'unu besi yemi, %22'sini ise süt yemi oluşturmaktadır. Türkiye genelinde ise bu oran besi yeminde %21, süt yeminde %26.8'dir (TOB, 2019). Tam kapasite ile çalışan fabrikanın en fazla ürettiği yem, yumurta yemidir (%25). Fabrikanın besi yemi üretim miktarı ile broiler yem üretim miktarı ise aynıdır (%20). Orta kapasite ile çalışan fabrika ise en fazla besi yemi (%55.91) ve süt yemi (%21.71) üretmektedir. Üçüncü fabrika ise aynı oranda besi (%40) ve süt yemi (%40) üretimi gerçekleştirmektedir. Tam kapasite ile çalışan fabrika, büyükbaş hayvan yeminden ziyade kanatlı yemine odaklanarak kapasiteyi etkin kullanmıştır (Çizelge 2).

**Çizelge 2.** Fabrikaların yem çeşitlerine göre üretim miktarları (ton yıl<sup>-1</sup>)

|                   | I. Fabrika<br>(Tam kapasite) | II. Fabrika<br>(Orta kapasite) | III. Fabrika<br>(Düşük kapasite) | Fabrikalar<br>ortalaması | %     |
|-------------------|------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------|-------|
| Buzağı yemi       | 6 000                        | 24 000                         | 5 500                            | 11 833                   | 7.33  |
| Süt yemi          | 18 000                       | 67 200                         | 22 000                           | 35 733                   | 22.13 |
| Besi yemi         | 24 000                       | 163 752                        | 22 000                           | 69 917                   | 43.29 |
| Küçükbaş yemi     | 12 000                       | 14 568                         | 2 750                            | 9 773                    | 6.05  |
| Broiler yemi      | 24 000                       | 16 872                         | 1 375                            | 14 082                   | 8.72  |
| Yumurta yemi      | 30 000                       | 15 048                         | 1 000                            | 15 349                   | 9.50  |
| Özel dönem yemler | 6 000                        | 8 040                          | 375                              | 4 805                    | 2.98  |
| Toplam            | 120 000                      | 309 480                        | 55 000                           | 161 493                  | 100.0 |

İncelenen fabrikalarda ortalama toplam masraf 162.99 milyon TL olup, bu masrafların %88.9'unu değişken masraflar, %11.1'ini ise sabit masraflar oluşturmaktadır. Toplam masraflar içerisinde en büyük masraf unsurunu %84'lük oranıyla yem hammaddeleri oluşturmaktadır. Tam kapasite çalışan fabrikanın yem hammadde masrafı toplam masrafın %79.9'unu oluşturmakta iken, orta kapasite kullanan fabrikada bu oran %85.3, düşük kapasite kullanan fabrikada ise %85.1'dir. Tam kapasite çalışan fabrikanın yem ve hammadde nakliyesini kendi araçları ile yaptığından dolayı yakıt gideri söz konusu iken, orta ve düşük kapasitede çalışan fabrikalar nakliye şirketleri yoluyla yem ve hammadde transferi yapmaktadırlar. Tam kapasite çalışan fabrikanın 1 kg yem üretiminde 0.014 TL yakıt gideri yapmışken, orta ve düşük kapasitede üretim yapan fabrikalar sırasıyla 0.012 ile 0.011 TL nakliye gideri yapmışlardır. Bir kg yem üretimi için personel giderleri tam kapasite üretim yapan fabrikada 0.025 TL, orta kapasite üretim yapan fabrikada 0.022 TL, düşük kapasitede üretim yapan fabrikada ise 0.021 TL'dir. Fabrikaların ortalama GSÜD 183.4 milyon TL, ortalama brüt karları 38.4 milyon TL, ortalama net karları ise 20.4 milyon TL olarak hesaplanmıştır. Tam kapasite çalışan fabrikanın GSÜD 150.8 milyon TL, orta kapasitede çalışan fabrikanın GSÜD 340.5 milyon TL, düşük kapasitede çalışan fabrikanın GSÜD ise 58.9 milyon TL'dir. Yarı kapasitede çalışan fabrika, tam kapasite kullanan fabrikaya göre 2 katından daha fazla GSÜD'ne sahiptir. Düşük kapasitede çalışan fabrikanın nispi karı en düşük (1.051) iken, tam kapasite çalışan fabrikanın ise en yüksektir (1.267). Fabrikaların ortalama nispi karları ise 1.125'tir. Bir kilogram yemin ortalama üretim maliyeti ise 1.009 TL olup, birim üretim maliyeti tam kapasite çalışan fabrikada 0.992 TL, orta kapasitede çalışan fabrikada 1.014 TL, düşük kapasitede çalışan fabrikada ise 1.018 TL'dir. Tam kapasite kullanan fabrikanın yem üretim deseni daha çok kanatlı

hayvanlara yöneliktir. Bu farklılaşma tam kapasite çalışan fabrikada, yemde birim üretim maliyetini düşürmektedir. Nitekim tam kapasite ile çalışan fabrikanın 1 kg yem üretimi için harcadığı yem hammaddesi masrafı 0.79 TL iken, orta ve düşük kapasite kullanan fabrikalar 1 kg üretimi için harcadığı yem hammaddesi masrafı 0.87 TL'dir (Çizelge 3).

**Çizelge 3.** Yem fabrikalarında masraf unsurları ve karlılık durumu (TL)

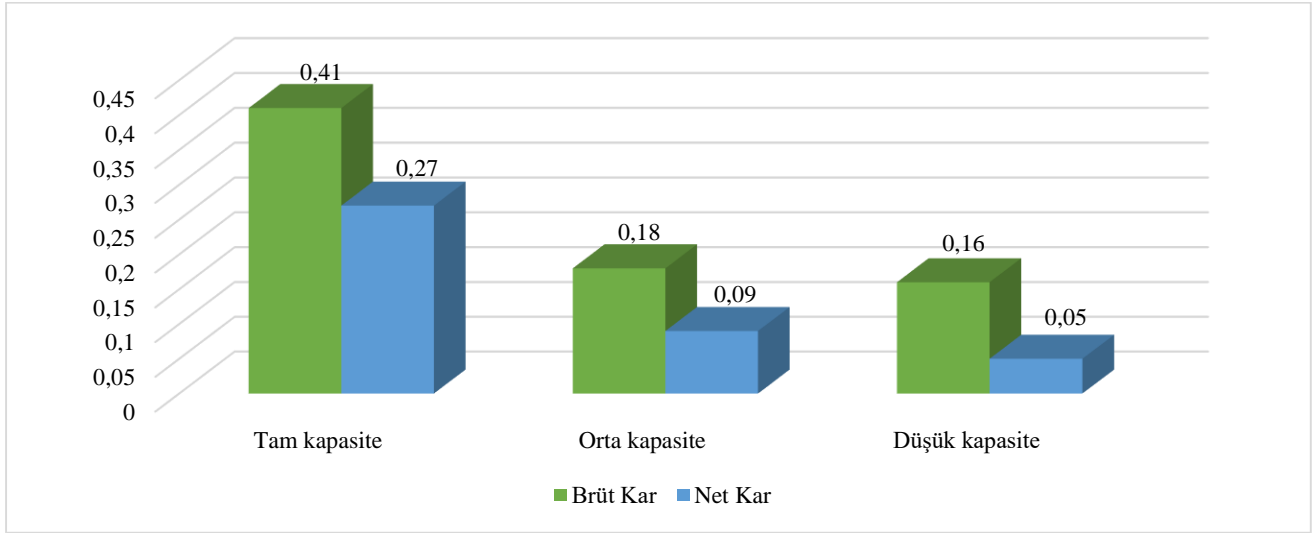
| Masraflar                         | I. Fabrika<br>(Tam kapasite) | II. Fabrika<br>(Orta kapasite) | III. Fabrika<br>(Düşük kapasite) | Fabrikalar<br>ortalaması | %            |
|-----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------|--------------|
| <b>Değişken masraflar</b>         |                              |                                |                                  |                          |              |
| Yem hammaddesi                    | 95 058 095                   | 268 071 902                    | 47 641 058                       | 136 923 685              | 84.0         |
| Elektrik                          | 840 000                      | 1 896 131                      | 327 878                          | 1 021 336                | 0.6          |
| Su                                | 84 000                       | 189 613                        | 32 788                           | 102 134                  | 0.1          |
| Yakıt                             | 1 680 000                    | 0                              | 0                                | 560 000                  | 0.3          |
| Nakliye                           | 0                            | 3 792 261                      | 655 756                          | 1 482 672                | 0.9          |
| Ambalaj ve paketleme              | 1 527 273                    | 3 938 836                      | 700 000                          | 2 055 370                | 1.3          |
| Doğalgaz                          | 576 000                      | 1 300 204                      | 224 830                          | 700 345                  | 0.4          |
| Döner sermaye faizi               | 1 476 527                    | 4 131 997                      | 733 818                          | 2 114 114                | 1.3          |
| <b>Değişken masraflar toplamı</b> | <b>101 241 895</b>           | <b>283 320 944</b>             | <b>50 316 128</b>                | <b>144 959 656</b>       | <b>88.9</b>  |
| <b>Sabit masraflar</b>            |                              |                                |                                  |                          |              |
| Personel gideri                   | 3 000 000                    | 6 771 895                      | 1 155 600                        | 3 642 498                | 2.2          |
| Sigorta                           | 627 726                      | 1 416 965                      | 241 800                          | 762 163                  | 0.5          |
| Bakım ve onarım                   | 325 000                      | 733 622                        | 126 858                          | 395 160                  | 0.2          |
| İşyeri kirası                     | 459 949                      | 495 794                        | 64 663                           | 340 135                  | 0.2          |
| Mali müşavir                      | 175 000                      | 395 027                        | 68 308                           | 212 778                  | 0.1          |
| Vergi                             | 9 198 981                    | 9 915 870                      | 1 293 254                        | 6 802 703                | 4.1          |
| Haberleşme                        | 30 000                       | 67 719                         | 11 710                           | 36 476                   | 0.1          |
| Pazarlama                         | 20 000                       | 45 146                         | 7 807                            | 24 318                   | 0.1          |
| Amortismanlar                     | 591 000                      | 1 315 204                      | 239 831                          | 715 345                  | 0.4          |
| Sermaye faizi                     | 296 000                      | 962 000                        | 962 000                          | 740 000                  | 0.5          |
| Diğer (aidat vb)                  | 15 000                       | 15 000                         | 15 000                           | 15 000                   | 0.1          |
| Genel idare gideri                | 3 037 257                    | 8 499 628                      | 1 509 484                        | 4 348 790                | 2.7          |
| <b>Sabit masraflar toplamı</b>    | <b>17 775 913</b>            | <b>30 633 870</b>              | <b>5 696 315</b>                 | <b>18 035 366</b>        | <b>11.1</b>  |
| <b>Toplam masraflar</b>           | <b>119 017 808</b>           | <b>313 954 814</b>             | <b>56 012 443</b>                | <b>162 995 022</b>       | <b>100.0</b> |
| Yem üretim miktarı (kg)           | 120 000 000                  | 309 480 000                    | 55 000 000                       | 161 493 333              |              |
| GSÜD                              | 150 840 000                  | 340 490 880                    | 58 877 500                       | 183 402 793              |              |
| Brüt kar                          | 49 598 105                   | 57 169 937                     | 8 561 372                        | 38 443 138               |              |
| Net kar                           | 31 822 192                   | 26 536 066                     | 2 865 057                        | 20 407 772               |              |
| Nispi kar (%)                     | 1.267                        | 1.085                          | 1.051                            | 1.125                    |              |
| Yem maliyeti                      | 0.992                        | 1.014                          | 1.018                            | 1.009                    |              |

Kapasite kullanım oranına göre fabrikaların birim yem üretiminden elde ettikleri brüt ve net karlar Şekil 1'de verilmiştir. Tam kapasiteyle çalışan fabrika 1 kg yemde 0.41 TL brüt kar, 0.27 TL net kar elde etmişken, orta kapasiteyle çalışan fabrika 0.18 TL brüt kar, 0.09 TL net kar, düşük kapasiteyle çalışan fabrika ise 0.16 TL brüt kar, 0.05 TL net kat elde etmiştir. Bu sonuçlar,  $H_0$  hipotezinin ret,  $H_1$  hipotezinin ise kabul edildiğini göstermektedir. Yani; fabrikaların kapasite kullanım oranının artması, yem üretimindeki ekonomik performanslarını arttırmaktadır.

Kapasite kullanım oranının eksik kullanılmasından dolayı yem fabrikalarının üretim, GSÜD, brüt ve net karda yaşadıkları ekonomik kayıplar Çizelge 4'te verilmiştir. Fabrikalarda tam kapasite ile çalışması halinde yılda toplam 1.08 milyon ton yem üretimi gerçekleştirme olanağı varken 484.48 bin ton yem üretilmiş ve eksik kapasite kullanımından kaynaklı üretimde %44.78'lik (597.52 bin ton) bir kayıp yaşanmıştır. Yaşanan bu kayıp sermayenin etkin kullanılmadığına işaret etmekte olup, bina ve alet



makine bakımı, amortisman ve sermaye faizi gibi giderlerin artmasına neden olmuştur. Eksik kapasite kullanımı nedeniyle yem fabrikalarının toplam GSÜD'de %55 (672.45 milyon TL), brüt karlarında %54.13 (136.11 milyon TL), net karlarında ise %53.12'lük (69.38 milyon TL) bir kayıp yaşanmıştır. Yem fabrikalarının kapasitelerinin tamamını kullanmamalarında; döviz kurlarında meydana gelen dalgalanmaya bağlı olarak oluşan risk ve belirsizlikle, hayvancılık sektöründe yaşanan daralmalar, finansman yetersizlikleri ile hammadde ve nitelikli işgücüne erişimde yaşanan zorlukların etkisinin bulunduğu tespit edilmiştir.



Şekil 1. Yem fabrikalarının kapasite kullanım oranlarına göre birim brüt ve net kar düzeyleri (TL kg<sup>-1</sup>)

Çizelge 4. Yem fabrikalarında eksik kapasite kullanımı kaynaklı ekonomik kayıplar

|                                  | Tam Kapasite Çalışma | Eksik Kapasite Çalışma | Ekonomik Kayıp | Ekonomik Kayıp (%) |
|----------------------------------|----------------------|------------------------|----------------|--------------------|
| Üretim (ton yıl <sup>-1</sup> )  | 1 082 000.00         | 484 480.00             | 597 520.00     | 44.78              |
| GSÜD (TL yıl <sup>-1</sup> )     | 1 222 660 000.00     | 550 208 380.00         | 672 451 620.00 | 55.00              |
| Brüt kar (TL yıl <sup>-1</sup> ) | 251 435 090.10       | 115 329 414.00         | 136 105 676.10 | 54.13              |
| Net kar (TL yıl <sup>-1</sup> )  | 130 598 733.27       | 61 223 315.00          | 69 375 418.27  | 53.12              |

## SONUÇ

Karma yem, hayvancılık sektörü için en büyük masraf unsurlarından biridir. Bu çalışmada kapasite kullanımına göre karma yem üreten fabrikaların üretim maliyetleri, ekonomik performansları ve yaşadıkları ekonomik kayıplar ortaya konulmuştur. Araştırmada tam kapasiteyle çalışan fabrikanın daha çok kanatlı yemine yöneldiği ve bu fabrikada birim yem üretim maliyetinin en düşük olduğu tespit edilmiştir. Tam kapasite üretim yapan fabrikanın birim personel ve nakliye giderleri diğer fabrikalara göre daha fazla olduğu anlaşılmaya rağmen, yem üretim deseninden kaynaklı en düşük yem hammadde giderine sahiptir. Çalışmada kapasite kullanım oranının artmasının maliyetleri düşürdüğü, buna karşın GSÜD, brüt ve net karı artırdığı da tespit edilmiştir. Eksik kapasite kullanımından dolayı işletmelerin toplam üretiminde %44.78'lik bir kayıp yaşanmıştır.

Yem fabrikaların eksik kapasiteyle çalışılmasında etkisi olan risk ve belirsizliklere karşı; yem üretim desenini çeşitlendirme, yeni pazarlar keşfetme, hammadde tedarikçilerini artırma ve stokta ürün tutma şeklinde önlemler alınmalıdır. Ayrıca döviz kurundaki dalgalanmadan daha az etkilenmek için ithal yem hammaddesi yerine büyük tahıl işletmeleriyle sözleşmeli üretim modelleri uygulanmalıdır.

Kapasite kullanım oranını artırmada yaşanan finansman yetersizlikleri için ise teşvikler ve sübvansiyonlu krediler ile sermaye kullanımı sağlanmalıdır. Ayrıca dış pazarlara açılarak mevcut kurulu kapasiteden daha yüksek oranlarda yararlanılmalıdır. Yem fabrikalarında kapasite kullanım oranını artırmanın bir başka yolu da, hayvancılık sektöründe talep yönlü politikaların uygulanmasıdır. Bunun için 2016 yılında yemde KDV oranı %1'e indirilmesine rağmen, yem fiyatları istenilen seviyeye düşürülemediği. Üreticilerin yem tedarikinde yem alım desteği gibi uygulamaların olması, yem fabrikalarının kapasite kullanım oranlarına da olumlu yansıtacaktır.

Bu çalışmanın kapsamı dışında olan döviz kurunda yaşanan artışların yem fiyatlarına etkisinin araştırılmasında yarar görülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK 2211-C Öncelikli Alanlar Yurtiçi Doktora Burs Programı tarafından desteklenmektedir.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Açıl AF, 1977. Tarımsal Ürün Maliyetlerinin Hesaplanması ve Memleketimiz Tarımsal Ürün Maliyetlerindeki Gelişmeler. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 665, Ankara.
- Akbay KC, Ak İ, 2018. Karma Yem Teknolojisindeki Gelişmelerin Karma Yem Kalitesine ve Yem Değerine Etkileri. Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 32(2): 175-188.
- Barz T, Uzun B, 2016. Dünyada ve Türkiye'de Yem Sanayisindeki Gelişmeler. 12. Ulusal Tarım Ekonomisi Kongresi. 25-27 Mayıs 2016, Isparta.
- Cebeci Z, 2007. Karma Yem Sanayinde İzlenebilirlik Sistemleri. IV. Hayvan Besleme Kongresi, 24-28 Haziran, Bursa, Türkiye.
- Demir P, Elmalı DA, 2011. Doğu Anadolu Bölgesindeki Kimi Yem Fabrikalarının Mevcut Durumu ve Sorunları. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi, 82(1): 29-34.
- Demirel R, Şentürk Demirel D, 2012. AB Üyelik Sürecinde Yem Sektörümüzün Mevcut Durumu, Sorunları ve Çözüm Önerileri. International Animal Science Congress of Turkish and Relatives Communities, 11-13 Eylül 2012, Isparta.
- Denli M, Demirel R, Sessiz A, 2015. Diyarbakır İli Karma Yem Endüstrisinin Durumu. Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 3(9): 701-706.
- Erkuş A, Bülbül M, Kıral T, Açıl AF, Demirci R, 1995. Tarım Ekonomisi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Eğitim, Araştırma ve Geliştirme Vakfı Yayınları No: 5, Ankara.
- GFS, 2019. Global Feed Survey. <https://www.alltech.com/feed-survey>. (Erişim Tarihi: 29.03.2019)
- GVK, 1960. Gelir Vergisi Kanunu. Kanun Numarası: 193 Kabul Tarihi: 31/12/1960 Yayımlandığı Resmî Gazete: Tarih : 6/1/1961 Sayı : 10700
- KVK, 2006. Kurumlar Vergisi Kanunu. Kanun Numarası: 5520 Kabul Tarihi: 13/6/2006 Yayımlandığı Resmî Gazete Tarih: 21/6/2006 Sayı: 26205
- TCMB, 2019. Türkiye Cumhuriyeti Merkez Bankası. <https://www.tcmb.gov.tr/> (Erişim Tarihi: 20.11.2019)
- TOB, 2019. Tarım ve Orman Bakanlığı. <https://www.tarimorman.gov.tr/> (Erişim Tarihi: 29.03.2019).

**Atf İçin:** Can BA, 2021. COVID-19 Pandemisinin Semt Pazarıcıları Üzerindeki Sosyoekonomik Etkisi: Kocaeli İli Örneği, İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1540-1549.

**To Cite:** Can BA, 2021. Socioeconomic Impact of COVID-19 Pandemic on the Sellers in Street Markets: A Case Study of Kocaeli Province, Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1540-1549.

## COVID-19 Pandemisinin Semt Pazarıcıları Üzerindeki Sosyoekonomik Etkisi: Kocaeli İli Örneği

Bahar AYDIN CAN<sup>1\*</sup>

**ÖZET:** Semt pazarıcıları, tarım ürünlerinin tüketicilere ulaştırılmasında önemli bir yere sahiptir. Bu çalışmada, koronavirüs (COVID-19) pandemi sürecinin semt pazarıcıları üzerindeki sosyoekonomik etkisi araştırılmıştır. Çalışmada önce pazarıcıların sosyoekonomik özellikleri incelenmiş, daha sonra pandemi sürecinin ve uygulanan önlemlerin pazarıcılar üzerindeki etkisi ortaya konulmuştur. Bu amaçla, Kocaeli'nin Kartepe ilçesinde en büyük pazar yeri olan salı pazarında kayıtlı 60 pazarıcı arasından tam sayım yöntemiyle görüşmeyi kabul eden 56 pazarıcıya anket uygulanmıştır. Araştırmada, pazarıcıların pandemi sürecinde etkilendikleri konuların demografik özellikler ile ilişkisi khi-kare ile test edilmiş ve varyans analizi yapılarak incelenmiştir. Pazarıcıların COVID-19 süreci hakkındaki düşünceleri ve uyguladıkları önlemler hakkındaki tutum ve görüşlerinin ortaya konulmasında beşli likert ölçeği kullanılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre, pazarıcıların %89.3'ünün COVID-19 pandemisinin pazardan sağladıkları gelirden düşüşe neden olduğunu ve %96.4'ünün de pazardaki tüketici sayısının azaldığını belirtmişlerdir. Bu süreçte pazarıcıların en fazla uyguladıkları önlemler arasında; ürünlerin poşetle sunulması, eldiven kullanmak ve maske takmak yer almaktadır. Çalışmada, pandemi sürecinde semt pazarıcılarının sorunları ile ilgili çözüm önerileri de sunulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** COVID-19, pandemi, Kocaeli, semt pazarıcıları

### Socioeconomic Impact of COVID-19 Pandemic on the Sellers in Street Markets: A Case Study of Kocaeli Province

**ABSTRACT:** Sellers in street markets play an essential role in the supply of agricultural products to consumers. This study was conducted for the purpose of investigating the socioeconomic impact of the COVID-19 pandemic on sellers in street markets. In the study, first the socioeconomic characteristics of sellers in street markets were analyzed and then the impact of the pandemic and measures taken on sellers in street markets was demonstrated. For this purpose, a survey was conducted on 56 sellers who accepted to interview out of 60 sellers registered to the largest street market established every Tuesday in Kartepe district of Kocaeli province. In the research, a chi-square test and a variance analysis were carried out to test and analyze the relationship between the impacts of pandemic on street market sellers and their demographic characteristics. 5-point Likert scale was employed to demonstrate sellers' thoughts about the COVID-19 pandemic and their attitudes towards and opinions on the measures they took. According to the research results, 89.3% of the sellers stated the COVID-19 pandemic had caused a decrease in the income earned from the street market and 96.4% of them indicated the number of consumers in the street market had decreased. Besides, the measures taken most by the sellers were found to be offering the products in plastic bags and using gloves and masks. In the study, street market sellers' solution suggestions for their problems during the pandemic were presented as well.

**Keywords:** COVID-19, pandemic, Kocaeli, sellers in street markets

<sup>1</sup> Bahar AYDIN CAN ([Orcid ID: 0000-0003-1096-7875](https://orcid.org/0000-0003-1096-7875)), Kocaeli Üniversitesi, İzmit Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Kocaeli, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Bahar AYDIN CAN, e-mail: baharcan@kocaeli.edu.tr

## GİRİŞ

Semt pazarları, hemen hemen tüm dünyada gelişen teknolojiye rağmen, bulunduğu yerin kültürel özelliklerini yansıtarak günümüze kadar gelebilmiş mekanlardır. Geleneksel alışverişi tercih eden tüketiciler için vazgeçilmez yer olan semt pazarları, günlük yaşamda ailelerin haftalık taze sebze-meyve ihtiyaçlarının uygun fiyatlarla karşılanabildiği önemli yerlerdir. Semt pazarları alışverişte aynı zamanda tüketiciler tarafından süpermarketlere göre daha samimi olarak da görülmektedir (Sommer et al., 1981; Williams and Paddock, 2003). Bununla birlikte ekonomik açıdan daha uygun olması nedeniyle, özellikle dar gelirli kesimler için özellikle tercih edilmektedir (Ruzhank and Chintan, 2013).

Bilindiği üzere tarım sektörü sahip olduğu pek çok önemli fonksiyonları nedeniyle stratejik bir özellik arz etmektedir. Tarımın üstlendiği bu fonksiyonlar; beslenme, nüfus ve istihdam, milli gelir ve dışsattım, sanayiye hammadde temini ve üretim faktörlerinin transferi şeklinde ortaya çıkmaktadır (Erbaş, 2020). Semt pazarları, tarım sektöründen tedarik ettiği ürünleri tüketiciye ulaştırarak insanların sağlıklı ve dengeli beslenmesinde önemli rol üstlenmektedir (Lopez Ridaura et al., 2019; Abdelhedi and Zourani, 2020; Kogo et al., 2020).

2019 Aralık ayında ilk olarak Çin'in Wuhan şehrinde ortaya çıkan küresel koronavirüs (COVID-19) pandemisi hemen hemen tüm ülkeleri etkilemiştir. Pandemi süreciyle birlikte insan beslenmesinde büyük önem arz eden tarım ürünlerinin piyasaya zamanında arz edilmesi ve tüketiciyle buluşturulması, devletlerin öncelikli görevleri haline gelmiştir.

COVID-19 pandemi sürecinin, insanlarda uzun süreli evde vakit geçirme, sosyal mesafeye uyma gerekliliği ve oluşabilecek risklerden kaçınma amaçlı olarak, günlük yaşamdaki davranışlarda değişikliğe yol açmıştır (Çakıroğlu ve ark., 2020). Bu değişiklikler neticesinde dünyada ve Türkiye'de tüketicilerin çoğu beslenme gibi temel ihtiyaçlarını karşılamak üzere çevrimiçi alışverişi daha fazla tercih etmişlerdir (Danışmaz, 2020; He and Harris, 2020; Knotek et al., 2020).

Ülkemizde de pandeminin yaşandığı ilk dönemlerde insanlar marketlere yönelmiş, kuru baklagiller, makarna, bulgur, sebze ve meyve stoğu yapmışlardır. İlerleyen dönemlerde virüsün yayılmasıyla birlikte, tüketiciler kendilerini sağlık açısından koruyabilmek için internet üzerinden alışveriş yapmaya başlamışlardır. Bu durum semt pazarlarında alışverişlerin düşmesine neden olmuştur.

Yaşanan bu zorlu süreçte, ekonomik anlamda birçok sektör olumsuz yönde etkilenmiştir. Şehirlerin önemli alışveriş merkezi olan semt pazarlarında çalışan pazarıcılar da COVID-19 pandemi döneminden en çok etkilenen kesimlerden biri olmuştur. Ticaret Bakanlığı'nın Hal Kayıt Sistemi 2019 Eylül ayı istatistik verilerine göre semt pazarıcıları esnaf ve sanayiciler arasında %28 ile en büyük paya sahiptir (Anonim, 2019a).

Semt pazarları kurulduğu bölgelerde uygun fiyatla taze sebze-meyve ürünlerini sunarak, tüketiciler için vazgeçilmez mekanlar olmaktadır. Şehirlerde kurulan semt pazarları, gerek yerel kalkınma gerek bölgesel kalkınma açısından önemli rol oynamaktadır (Can ve Ünal, 2016).

Semt pazarları ile ilgili yapılmış birçok çalışma bulunsa da, COVID-19 pandemi döneminin pazarıcıları üzerindeki sosyoekonomik etkisini inceleyen bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bugüne kadar farklı ülkelerde semt pazarları üzerine yapılmış bu araştırmalardan bazıları: Semt pazarlarının tarım ürünleri pazarlamasındaki yeri ve önemi (Bromley, 1976), ...bölgesel kalkınmadaki önemi (Schweizer, 1984), ...şehir planlamasındaki önemi, ...kültürel ve ekonomik etkisi (Khan and Alamtar, 1998; Ardhiansyah and Mahendarto, 2020; Jeong and Ban, 2020), ...işleyiş yapısı ve sorunları (Ehinmoyo and Ibitoye, 2010)'dır.

Türkiye'de de semt pazarları konusunda birçok araştırmanın yapıldığı, fakat semt pazarıcıları ile ilgili alan araştırmalarının sınırlı sayıda (Oğulata ve Akdemir, 1992; Gavcar ve ark., 2006; Koday ve

Çelikoğlu, 2011; Koçak ve Uygun, 2014; Can ve Ünal, 2018; Yüceer ve Demiryürek, 2020) olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte; semt pazarlarının kuruluş yeri bakımından önemi (Özgüç ve Mitchel, 2000; Tuncel, 2009; Berkman, 1991; Akbaş, 2019), semt pazarlarının şehirleşme üzerindeki etkisi ve katkısı (Güler, 2006; Çalışkan, 2007), semt pazarlarında alışveriş yapan tüketicilerin sosyoekonomik yapısı ve tercihleri (Tuncel, 2003; Evcil, 2014) konusunda yapılan çalışmalar da bulunmaktadır.

Bu çalışma, pandemi döneminde semt pazarıcılarının bu süreçte yaşadıkları durumun ortaya konulması, alınabilecek önlemlerin belirlenmesi ve pandemi sonrası süreçte de tarım sektörü için yol gösterici olması bakımından önem arz etmektedir.

Türkiye'nin Marmara Bölgesi'nde yer alan Kocaeli ili, km<sup>2</sup>'ye düşen 541 kişi ile İstanbul'dan sonra 2. en çok nüfus yoğunluğuna sahip olan ildir (Anonim, 2019b). Toplam nüfusu 1 953 035 olan Kocaeli ili, bir sanayi kenti olması nedeniyle oldukça fazla göç almaktadır. Bu husus, ilin nüfus yoğunluğunun fazla olmasında etkili olmaktadır.

Araştırma yöresi olarak Kocaeli ilinin seçilmesinde, bölgede COVID-19 pandemi sürecinden en fazla etkilenen bir yer olması etkili olmuştur.

Bu çalışmanın temel amacı, Kocaeli ilinde semt pazarıcılarının COVID-19 pandemi sürecinde etkilendikleri konuları ve uyguladıkları önlemleri belirleyerek, onların semt pazarlarında karşılaştıkları sorunlara yönelik çözüm önerileri sunmaktır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

Bu araştırmanın ana materyalini, Kocaeli ilinin Kartepe ilçesinde semt pazarcılığı yapan 56 pazarcıya uygulanan anketler yoluyla elde edilen veriler oluşturmuştur. Anket yoluyla elde edilen bu veriler, araştırmanın birincil verilerini oluşturmuştur.

Araştırmada Kocaeli Büyükşehir Belediyesi Zabıta Dairesi Başkanlığı ve Kocaeli Seyyar Esnaf Pazarıcılar Odası'nın istatistiki kayıtları ile konuyla ilgili yapılmış tez, makale ve web'ten de önemli ölçüde yararlanılmıştır. Bunlar da araştırmanın ikincil verilerini oluşturmaktadır.

Araştırmada, Kartepe ilçesinde en büyük semt pazarıcısına sahip olan "Salı Pazarı" gayeli olarak seçilmiş ve 56 pazarcıya anket uygulanmıştır. Örneklem yöntemi olarak tam sayım yöntemi uygulanmış ve tam sayım yöntemi ile belirlenen 60 pazarcıdan 56'sı ile görüşme yapılmıştır.

Anketler yapılırken, sosyal mesafe, maske ve hijyen kurallarına da dikkat edilmiştir. Pazarıcılar ile yapılan anketler 2020 yılının Mayıs ayında gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen verilerin analizinde SPSS 22.0 paket programı kullanılmıştır. Analizde, incelenen pazarıcıların sosyoekonomik özelliklerinin ortaya konulmasında ve karşılaştırılmalarında frekans dağılımı, ortalama ve yüzde hesaplarından yararlanılmıştır.

Verilerin analizinde öncelikte pazarıcıların demografik özellikleri ortaya konulmuş, daha sonra pazarıcıların COVID-19 pandemi sürecinde semt pazarları hakkındaki düşünceleri, etkilendikleri konular ve pandemi sürecinde çalışırken uyguladıkları önlemler ve bu konudaki görüşlerine yer verilmiştir.

Analizde, pazarıcıların COVID-19 sürecinde tutum ve görüşlerinin ortaya konulmasında beşli likert ölçeği kullanılmıştır. Likert ölçeğinde, tutum ölçeğinde yer alan ifadeler 5'li bir ölçeğe göre değerlendirilmiştir. Tutum şiddeti değerlendirilirken 1'den 5'e doğru olumlu yönde artacak şekilde ölçeklendirilmiştir.

Analizde ayrıca, sayım ile elde edilen verilere ilişkin karşılaştırmalarda khi-kare testi uygulanmıştır. Sürekli değişkenler için ise, öncelikle Kolmogorov-Simironov testi ile normal dağılım testi uygulanmış, normal dağılım gösteren ve göstermeyen değişkenler saptanmıştır. Normal dağılım gösteren değişkenler için varyans analizi yapılmıştır (Özdamar, 2004).

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### İncelenen Pazarcıların Sosyoekonomik Özellikleri

Araştırmada, öncelikle pazarcıların demografik özellikleri belirlenmiş olup Çizelge 1’de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde, incelenen pazarcıların %67.9’unun erkek ve %37.1’nin ise kadın pazarcıdan oluştuğu görülmektedir. Pazarcılık mesleği çalışma şartları nedeniyle daha çok erkekler tarafından tercih edilmektedir. 46 yaş ve üzerinde olanlar %32.1 ile en yüksek payı oluştururken, 24-28 yaş arası pazarcılar ise %16.1 ile en düşük payı oluşturmuştur. Pazarcıların yaş ortalaması 39.55’dir. İncelenen pazarcılar eğitim durumlarına göre incelendiğinde ise, ortaöğretim mezunu olanlar %46.4 ile ilk sırada yer alırken, lise mezunu olanlar %28.5 ile ikinci sırada ve ilköğretim mezunu olanlar %14.3 ile üçüncü sırada yer almaktadır. Pazarcılar mesleki deneyim bakımından incelendiğinde ise, %32.1’inin 16 yıl ve üzeri, %28.6’sının 1-5 yıl, %23.2’sinin 6-10 yıl ve %16.1’nin ise 11-15 yıl arasında mesleki deneyimi olduğu görülmektedir. Kadın pazarcıların ortalama deneyim süresi 13.8 yıl ve erkek pazarcıların ortalama deneyim süresi 11.50 yıl bulunmuştur. Tüm pazarcıların ortalama deneyim süresi 12.27 yıl olarak hesaplanmıştır. Semt pazarcıları ikamet ettikleri konutların sahipliği bakımından incelendiğinde, %51.8’inin ikamet ettiği konutun sahibi olduğu belirlenmiştir. Samsun ilinde Koçak ve Uygun (2014)’un pazarcılar üzerinde yapmış oldukları benzer çalışmada da bu oran %51.1 olarak bulunmuştur. İncelenen pazarcılar medeni durumuna göre incelendiğinde de, %50’sinin bekar, %41.1’inin evli, %5.4’ünün eşinden ayrılmış ve %3.6’sının ise eşinin vefat etmiş olduğu belirlenmiştir. Pazarcılar ailedeki birey sayısı incelendiğinde, ailedeki birey sayısı 3-4 kişi arası olanlar %51.8 ile ilk sırada yer alırken, ailedeki birey sayısı 5 kişi ve üzeri olanlar %33.9 ile ikinci sırada ve ailedeki birey sayısı 2 kişi ve altı olanlar % 14.3 ile üçüncü sırada yer almaktadır.

**Çizelge 1.** İncelenen pazarcıların demografik özellikleri

| Demografik Yapı | n  | %     |                       | n  | %     |
|-----------------|----|-------|-----------------------|----|-------|
| Cinsiyet        |    |       | Medeni Hal            |    |       |
| Kadın           | 18 | 32.1  | Evli                  | 23 | 41.0  |
| Erkek           | 38 | 67.9  | Bekar                 | 28 | 50.0  |
| Toplam          | 56 | 100.0 | Eşi vefat etmiş       | 2  | 3.6   |
|                 |    |       | Eşinden ayrılmış      | 3  | 5.4   |
| Yaş             |    |       | Toplam                | 56 | 100.0 |
| 24-28           | 9  | 16.1  |                       |    |       |
| 29-35           | 13 | 23.2  | Ailedeki Birey Sayısı |    |       |
| 36-45           | 16 | 28.6  | ≤2                    | 8  | 14.3  |
| 46+             | 18 | 32.1  | 3-4                   | 29 | 51.8  |
| Toplam          | 56 | 100.0 | ≥5                    | 19 | 33.9  |
|                 |    |       | Toplam                | 56 | 100.0 |
| Eğitim          |    |       | Deneyim               |    |       |
| Okuryazar       | 2  | 3.6   | 1-5 yıl               | 16 | 28.6  |
| İlköğretim      | 8  | 14.3  | 6-10 yıl              | 13 | 23.2  |
| Ortaöğretim     | 26 | 46.4  | 11-15 yıl             | 9  | 16.1  |
| Lise            | 16 | 28.5  | 16 yıl +              | 18 | 32.1  |
| Meslek Lisesi   | 3  | 5.4   | Toplam                | 56 | 100.0 |
| Üniversite      | 1  | 1.8   |                       |    |       |
| Toplam          | 56 | 100.0 |                       |    |       |
| Ev Mülkiyeti    |    |       |                       |    |       |
| Mülk            | 29 | 51.8  |                       |    |       |
| Kira            | 15 | 26.8  |                       |    |       |
| Anne/Babadan    | 12 | 21.4  |                       |    |       |
| Toplam          | 56 | 100.0 |                       |    |       |

Pazarcuların sosyal güvence durumu incelendiğinde, pazarcuların %48.2'sinin sosyal güvencesinin olmadığı, %37.5'inin Bağ-Kur'lu, %10.7'sinin SSK'lı ve %3.6'sının ise Emekli Sandığı'nda olduğu belirlenmiştir. Sosyal güvencesi olmayan pazarcular, gelecek ile ilgili endişe duyduklarını ifade etmektedir. İncelenen pazarcuların haftalık sağladıkları gelir düzeyi incelendiğinde, pazarcuların %26.8'inin 900 ₺ ve altı gelire, %41.1'inin 901 ₺-1200 ₺ arası gelire ve %32.1'nin 1201 ₺ ve üzeri gelire sahip olduğu görülmektedir (Çizelge 2). Araştırmada, pazarcuların haftalık ortalama geliri 1200.46 ₺ olarak tespit edilmiştir. İncelenen pazarcuların haftada pazara çıktıkları gün sayısı incelendiğinde ise, haftada 3 gün pazara çıkanlar %41.1 ile ilk sırada yer alırken, haftada 4 gün pazara çıkanlar %33.9 ile ikinci sırada ve haftada 5 gün pazara çıkanlar %10.7 ile üçüncü sırada yer almaktadır. Pazarcuların sattıkları ürünleri temin ettikleri yere gelince, pazarcuların %53.6'sının sattıkları ürünleri halden, %17.8'nin halden ve köylülerden, %12.5'nin köylülerden temin ettiği ve %16.1'nin de sattığı ürünü kendisinin yetiştirdiği belirlenmiştir. Yüceer ve Demiryürek (2020)'in Samsun'da semt pazarları üzerinde yapmış oldukları benzer çalışmada da pazarcuların %49'unun ürünlerini halden temin ettiği belirtilmiştir. Çalışmada, pazarcuların %87.5'inin ise asıl mesleğinin pazarcılık olduğu tespit edilmiştir.

**Çizelge 2.** İncelenen pazarculara yönelik ekonomik bilgiler

| Ekonomik Durum                    | n  | %     |                             | n  | %     |
|-----------------------------------|----|-------|-----------------------------|----|-------|
| Sosyal Güvence                    |    |       | Haftalık Gelir Düzeyi       |    |       |
| SSK                               | 6  | 10.7  | ≤ 900 ₺                     | 15 | 26.8  |
| Bağ-Kur                           | 21 | 37.5  | 901 ₺ -1200 ₺               | 23 | 41.1  |
| Emekli Sandığı                    | 2  | 3.6   | ≥1201 ₺                     | 18 | 32.1  |
| Sosyal Güvence Yok                | 27 | 48.2  | Toplam                      | 56 | 100.0 |
| Toplam                            | 56 | 100.0 |                             |    |       |
| Haftada Pazara Çıkılan Gün Sayısı |    |       | Ürünlerini Temin Etme Şekli |    |       |
| 1 gün                             | -  | -     | Halden                      | 30 | 53.6  |
| 2 gün                             | 4  | 7.1   | Halden ve köylülerden       | 10 | 17.8  |
| 3 gün                             | 23 | 41.1  | Köylülerden                 | 7  | 12.5  |
| 4 gün                             | 19 | 33.9  | Kendi yetiştiriyor          | 9  | 16.1  |
| 5 gün                             | 6  | 10.7  | Toplam                      | 56 | 100.0 |
| 6 gün                             | 2  | 3.6   |                             |    |       |
| 7 gün                             | 2  | 3.6   |                             |    |       |
| Toplam                            | 56 | 100.0 |                             |    |       |

### İncelenen Pazarcuların COVID-19 Pandemisi Sürecinde Semt Pazarcılığı ile İlgili Düşünceleri

Araştırmanın bu bölümünde incelenen pazarcuların COVID-19 pandemi sürecinde semt pazarları ile ilgili tutum ve görüşleri değerlendirilmiş ve Çizelge 3'de verilmiştir. Pazarcuların pandemi sürecinde semt pazarları hakkında katıldıkları düşünceler ortalama puanlara göre sırasıyla; “ürünler poşetlenerek satılmalıdır” (4.86), “belediyeler tarafından pazarımızda gereken önlemler alınmaktadır” (4.82), “sebze fiyatlarında artışa neden olmuştur” (4.73), “meyve fiyatlarında artışa neden olmuştur” (4.64), “pazarıcı tezgahlarında mesafe kurallarına uyulmaktadır” (3.82), “pazarıcı arkadaşlarımız gereken hijyen kurallarına dikkat etmektedir” (3.77), “müşterilerde yaşlılar hijyen kurallarına daha çok dikkat etmektedir” (3.64), “müşteriler pazarda alışverişte hijyen kurallarına dikkat etmektedir” (3.61) ve “müşterilerde gençler hijyen kurallarına daha çok dikkat etmektedir” (3.25) olarak tespit edilmiştir.

İncelenen pazarcuların %80.3'üne göre, COVID-19 pandemi sürecinde pazara çıktıkları gün sayısında azalma olmaktadır. Pazarcuların COVID-19 pandemi sürecinde pazara çıktıkları gün sayısındaki azalma ile haftalık ortalama gelir arasında ilişki olup olmadığına yönelik yapılan normal

dağılım testinde, değişkenlerin normal dağılım gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4). Yapılan varyans analizinde pazarcuların haftalık sağladıkları ortalama gelire göre, pazara çıktıkları gün sayısındaki azalma arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0.031<0.05$ ). Pazarcuların %96.4'ü pazara gelen müşteri sayısında azalma olduğunu düşünmektedir. Müşteri sayısının azalmasına bağlı olarak haftalık gelirlerinde düşüş olduğunu belirten pazarcular %89.3'lük oran oluşturmaktadır. Araştırmada, pandemi sürecinde pazarcuların haftalık gelirlerindeki düşüş oranı da araştırılmış ve bu oranın %27.02 olduğu belirlenmiştir.

**Çizelge 3.** İncelenen pazarcuların COVID-19 sürecinde semt pazarları hakkındaki düşünceleri

| Düşünceler   |   | Katılma Durumu* |      |      |       |       | Ortalama |
|--|---|-----------------|------|------|-------|-------|----------|
|  |   | 1               | 2    | 3    | 4     | 5     |          |
| Ürünler poşetlenerek satılmalıdır.                                   | n | -               | -    | 2    | 4     | 50    | 4.86     |
|  | % | -               | -    | 3.6  | 7.1   | 89.3  |          |
| Belediye tarafından pazarımızda gereken önlemler alınmaktadır.       | n | -               | -    | 2    | 6     | 48    | 4.82     |
|  | % | -               | -    | 3.6  | 10.7  | 85.7  |          |
| Sebze fiyatlarında artışa neden olmuştur.                            | n | -               | -    | 2    | 11    | 43    | 4.73     |
|  | % | -               | -    | 3.6  | 19.6  | 76.8  |          |
| Meyve fiyatlarında artışa neden olmuştur.                            | n | -               | 1    | 4    | 9     | 42    | 4.64     |
|  | % | -               | 1.8  | 7.1  | 16.1  | 75.0  |          |
| Pazarıcı tezgahlarında mesafe kurallarına uyulmaktadır.              | n | 1               | 12   | 7    | 12    | 24    | 3.82     |
|  | % | 1.8             | 21.4 | 12.5 | 21.40 | 42.9  |          |
| Pazarıcı arkadaşlarım gereken hijyen kurallarına dikkat etmektedir.  | n | -               | 2    | 24   | 15    | 15    | 3.77     |
|  | % | -               | 3.6  | 42.9 | 26.8  | 26.8  |          |
| Müşterilerde yaşlılar hijyen kurallarına daha çok dikkat etmektedir. | n | -               | 7    | 20   | 15    | 14    | 3.64     |
|  | % | -               | 12.5 | 35.7 | 26.8  | 25.00 |          |
| Müşteriler pazarda alışverişte hijyen kurallarına dikkat etmektedir. | n | -               | 9    | 14   | 23    | 10    | 3.61     |
|  | % | -               | 16.1 | 25.0 | 41.1  | 17.9  |          |
| Müşterilerde gençler hijyen kurallarına daha çok dikkat etmektedir.  | n | 1               | 13   | 21   | 13    | 8     | 3.25     |
|  | % | 1.8             | 23.2 | 37.5 | 23.2  | 14.3  |          |

\*1: Kesinlikle katılmıyorum, 2: Katılmıyorum, 3: Fikrim yok, 4: Katılıyorum, 5: Kesinlikle katılıyorum

**Çizelge 4.** İncelenen pazarcuların COVID-19 pandemi sürecinde pazara çıktıkları gün sayısındaki azalma ile haftalık ortalama gelir arasındaki ilişki

| Ortalama Gelir | Pazara Çıktıkları Gün Sayısında Azalma Olup-Olmama Durumu |         |         |                |         |         | F Değeri | p Değeri* |
|----------------|---|---------|---------|----------------|---------|---------|----------|-----------|
|                | Evet  |         |         | Hayır          |         |         |          |           |
|                | N <sub>1</sub>  | X       | Sd      | N <sub>2</sub> | X       | Sd      |          |           |
|                | 45  | 1129.33 | 274.288 | 11             | 1490.91 | 509.322 | 2.053    | 0.031     |

\* istatistiksel anlamlı ( $p<0.05$ )

Pazarcuların COVID-19 pandemi sürecinde etkilendikleri durumları ve uyguladıkları bazı önlemler ile onların demografik özellikleri arasındaki ilişkiyi belirlemek için khi-kare analizi yapılmış ve test sonuçları ise Çizelge 5'te verilmiştir. Buna göre, pazarcuların müşteri sayısında azalma olması ile cinsiyet arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur ( $p=0.036<0.05$ ). Pazarcuların medeni hali ile pazara giden müşterilerin yaşında etkili olma arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur ( $p=0.000<0.01$ ). Pazarcuların maske kullanması ile yaş arasındaki ilişki anlamlı bulunmamıştır ( $p=0.069>0.05$ ). Analiz sonuçlarına göre, pazarcuların eğitim düzeyi ile pazarda çalışırken sık sık el yıkama arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur ( $p=0.022<0.05$ ). Pazarcuların sosyal mesafeye dikkat etmesi ile cinsiyet arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur ( $p=0.043<0.05$ ). Ayrıca sosyal mesafe kurallarına kadınların, erkeklerden daha fazla dikkat ettikleri belirlenmiştir. Yaz aylarında tarım ürünleri üretiminde azalma olacağını düşünme ile pazarcuların gelir düzeyi arasındaki ilişki anlamlı bulunmamıştır ( $p=0.273>0.05$ ). Pazarcuların gelir düzeyi ile devletin pazarculara destek olması arasındaki ilişki de anlamlı bulunmuştur ( $p=0.005<0.01$ ).



**Çizelge 5.** Ki-Kare testlerine ilişkin sonuçlar

| Değişkenler  | $\chi^2$ | SD | p       |
|--|----------|----|---------|
| Müşteri sayısında azalma-cinsiyet ilişkisi                           | 4.379    | 1  | 0.036*  |
| Müşterilerin yaşında etkili olma-medeni hal ilişkisi                 | 27.491   | 3  | 0.000** |
| Pazarcuların maske kullanması-yaş ilişkisi                           | 19.901   | 12 | 0.069   |
| Pazarcuların sık sık el yıkaması-eğitim ilişkisi                     | 34.700   | 20 | 0.022*  |
| Pazarcuların sosyal mesafeye dikkati-cinsiyet ilişkisi               | 9.918    | 4  | 0.043*  |
| Yaz aylarında tarım ürünleri üretiminde azalma olması-gelir ilişkisi | 2.597    | 2  | 0.273   |
| Devletin pazarculara destek olması-gelir düzeyi ilişkisi             | 10.683   | 2  | 0.005** |

\* istatistiksel anlamlı(  $p < 0.05$ ), \*\*istatistiksel anlamlı ( $p < 0.01$ )

İncelenen pazarcuların %87.5'i devlet desteğini istediklerini, %12.5'i ise istemediklerini belirtmişlerdir. Devlet desteğini istemeyenlerin %85.7'sini 1201 ₺ ve üzeri haftalık gelir düzeyine sahip olanlar oluşturmaktadır (Çizelge 6). Devlet desteğini istemeyenler arasında, haftalık 900 ₺ ve altında gelir elde eden semt pazarcısı bulunmamaktadır.

**Çizelge 6.** İncelenen pazarcuların gelir düzeylerine göre devlet desteğini isteme durumu

| Gelir Düzeyi    | Pazarcuların Devlet Desteğini İsteme Durumu |       |       |      |        |       |
|-----------------|---|-------|-------|------|--------|-------|
|                 | Evet  |       | Hayır |      | Toplam |       |
|                 | n   | %     | n     | %    | n      | %     |
| <900 ₺          | 15  | 100.0 | -     | -    | 15     | 100.0 |
| 901 ₺ -1200 ₺   | 22  | 95.7  | 1     | 4.3  | 23     | 100.0 |
| 1201 ₺ ve üzeri | 12  | 66.7  | 6     | 33.3 | 18     | 100.0 |
| Toplam          | 49  | 87.5  | 7     | 12.5 | 56     | 100.0 |

**Çizelge 7.** İncelenen pazarcuların COVID-19 ile ilgili önlemlere uyma durumu

| Önlemler                      |   | Katılma Durumu* |      |      |      |      | Ortalama |
|-------------------------------|---|-----------------|------|------|------|------|----------|
|                               |   | 1               | 2    | 3    | 4    | 5    |          |
| Ürünleri poşetli olarak sunma | n | -               | 3    | 3    | 14   | 36   | 4.48     |
|                               | % | -               | 5.4  | 5.4  | 25.0 | 64.3 |          |
| Eldiven kullanma              | n | 2               | -    | 1    | 22   | 31   | 4.43     |
|                               | % | 3.6             | -    | 1.8  | 39.3 | 55.4 |          |
| Maske kullanma                | n | 1               | 2    | 15   | 9    | 29   | 4.13     |
|                               | % | 1.8             | 3.6  | 26.8 | 16.1 | 51.8 |          |
| Paraya dokunmama              | n | 2               | 6    | 9    | 15   | 24   | 3.95     |
|                               | % | 3.6             | 10.7 | 16.1 | 26.8 | 42.9 |          |
| Sosyal mesafeye dikkat etme   | n | 4               | 9    | 11   | 12   | 20   | 3.63     |
|                               | % | 7.1             | 16.1 | 19.6 | 21.4 | 35.7 |          |
| Sık sık el yıkama             | n | 7               | 20   | 7    | 6    | 16   | 3.07     |
|                               | % | 12.5            | 35.7 | 12.5 | 10.7 | 28.6 |          |
| Dezenfektan kullanma          | n | 10              | 18   | 8    | 7    | 13   | 2.91     |
|                               | % | 17.9            | 32.1 | 14.3 | 12.5 | 23.2 |          |
| Kolonya kullanma              | n | 11              | 23   | 4    | 6    | 12   | 2.73     |
|                               | % | 19.6            | 41.1 | 7.1  | 10.7 | 21.4 |          |

\*1: Hiçbir zaman, 2: Nadiren, 3: Bazen, 4: Sıklıkla, 5: Her zaman

**İncelenen Pazarcuların COVID-19 Pandemi Sürecinde Uyguladıkları Yöntemler**

COVID-19 pandemi sürecinde tüm çalışanlar gibi pazarcuların da dikkate almaları gereken birçok önem bulunmaktadır. Semt pazarlarının COVID-19 ile ilgili önlemlere uyma durumu ile ilgili belirtilen düşüncelere karşı tutum ve görüşleri Çizelge 7'de verilmiştir. Buna göre, pazarcuların uyguladıkları yöntemler puanlama sırasına göre; ürünleri poşetle sunma (4.48), eldiven kullanma (4.43), maske kullanma (4.13), paraya dokunmama (3.95), sosyal mesafeye dikkat etme (3.63), sık sık el yıkama (3.07),

dezenfektan kullanma (2.91) ve kolonya kullanma (2.73) olarak tespit edilmiştir. Tüketicilerin ürünlere dokunması sağlık açısından sakıncalı olduğu için, “ürünleri poşetle sunma”, pazarcılarının en fazla uyguladıkları önlem olmaktadır.

## SONUÇ

Kocaeli ili, nüfus yoğunluğu yüksek olan illerden biridir. Pandemi sürecinde vaka sayılarının artışında bu durumun büyük etkisi olmuştur.

Pandemi sürecinde taze sebze-meyve tüketimi, virüse karşı bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi ve sağlıklı beslenme açısından daha fazla önem taşımaktadır. İşte, semt pazarları pandemi sürecinde de insanların uygun fiyatla taze sebze-meyve ihtiyacının karşılanmasında önemli rol oynamıştır. Toplum kültüründe önemli yeri olan semt pazarlarının pandemi sonrası süreçte il yerel yönetimleri tarafından yeniden incelenmesi gerekmektedir. İlerleyen dönemlerde şehir bölge ve planlamasına uygun, modern şekilde inşa edilecek semt pazarları ile toplum sağlığı ve güvenliği daha uygun hale gelebilecektir.

Araştırmada, pandemi döneminde semt pazarlarına gelen müşteri sayısında azalma olduğu belirlenmiş ve bu azalışın pazarcılarının gelirinin düşmesinde önemli etken olduğu görülmüştür. Pazarcılar pazara gelen tüketicilerin yaşında pandeminin etkili olduğunu, pandemi öncesine göre pazarcılar, genç müşterilerin pazara daha fazla geldiklerini belirtmişlerdir.

Pandemi sürecinde pazarcılarının en fazla hassasiyet gösterdikleri konu, ürünleri poşetli olarak sunmaları olmuştur. Maske ve eldiven kullanma konusunda da dikkatli oldukları görülmektedir. Bu konuda belediyenin pazarlarda yapmış olduğu denetimlerin büyük etkisi olduğu belirlenmiştir. Bu tedbir ve denetimler sayesinde müşterilerin de daha güvenli bir şekilde alışveriş yapması sağlanmaktadır.

Araştırmada, COVID-19 pandemi sürecinde pazarcılarını en fazla etkileyeni konunun, haftalık gelir miktarındaki düşüşün olduğu belirlenmiştir. COVID-19 ile mücadelede, semt pazarcılarını yönelik uygulamalı eğitimler ile onlara sağlanacak sosyal güvence imkanları ve pazar yerlerinin daha hijyenik hale getirilmesi gibi önlemler sayesinde, bu sürecin daha az kayıpla atlatılabileceği düşünülmektedir.

## Çıkar Çatışması

Makaleye ait çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve makalenin yazılması aşamalarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederim.

## Yazar Katkısı

Makalenin planlanması, yürütülmesi ve yazılması makale tek yazarı olarak tarafımda yapıldığı beyan ederim.

## KAYNAKLAR

- Abdelhedi IT, Zouari SZ, 2020. Agriculture and Food Security in North Africa: A Theoretical and Empirical Approach. *Journal of the Knowledge Economy*, 11: 193-210.
- Akbaş F, 2019. Anadolu'daki Semt Pazarlarına Bir Örnek: Salihli (Manisa) Semt Pazarları. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Dergisi*, 1(1):17-30.
- Anonim, 2019a. Hal Kayıt Sistemi Bildirimci İstatistikleri, <http://www.hal.gov.tr/Sayfalar/Bildirimci-istatistikleri.aspx> (Erişim Tarihi: 01.08.2019).
- Anonim, 2019b. Türkiye İstatistik Kurumu, İl ve İlçelere Göre Nüfus ve Nüfus Yoğunluğu İstatistikleri (Erişim Tarihi: 01.08.2019).
- Ardhiansyah NN, Mahendarto T, 2020. Revitalizing and Reimagining the Indonesian Traditional Market (Case Study: Salaman Traditional Market Indonesia). *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* No: 436, p.1-7, Berkeley-USA
- Berkman H, 1991. İstanbul'da Semt Pazarları Üzerine Bir Araştırma, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış).

- Bromley R, 1976. Periodic Markets and Rural Development Policy. *Ekistics*, 248: 49-61.
- Can Aydın B, Ünal M, 2016. Semt Pazarıcıları ve Pazarlama Yapıları: Kocaeli İli Merkez İlçe Örneği. XII. Tarım Ekonomisi Kongresi, 25-27 Mayıs 2016, Isparta.
- Çakıroğlu KI, Pirtini S, Çengel Ö, 2020. COVID-19 Sürecinde ve Post-Pandemi Döneminde Yaşam Tarzı Açısından Tüketici Davranışlarının Değişen Eğilimi Üzerine Kavramsal Bir Çalışma. *İstanbul Ticaret Üniversitesi Sosyal Bilimler Dergisi Covid-19 Sosyal Bilimler Özel Sayısı*, 19 (37): 81-103.
- Çalışkan V, 2007. Kentsel Mekan Kullanımındaki Farklılıklar Üzerine Bir Yaklaşım: Bursa ve Çanakkale'nin Periyodik (Haftalık) Pazarlarından Örnekler. *Doğu Coğrafya Dergisi*, 12 (18): 49-78.
- Danışmaz AT, 2020. Covid-19 Salgının Tüketicilerin Online Alışveriş Tercihine Etkisi. *Sosyal Bilimler Araştırma Dergisi*, 9 (2): 83-90.
- Ehinmoyo AA, Ibitoye AO, 2010. Periodic Market, a Common Marketing Feature in Akoko Southwest. *Journal of Geography and Regional Planning*, 3 (12): 361-364.
- Erbaş N, 2020. Yozgat İli Tarım İşletmelerinde Kışlık Buğday (*Triticum aestivum* L.) Üretiminin Maliyet Analizi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(2): 1318-132
- Evcil NA, 2014. İstanbul'un Anadolu Yakasındaki Pazarlar. *Yapı*, 119: 53-58.
- Gavcar E, Uçma T, Köroğlu Ç, 2006. Seyyar Pazar Esnafının Sorunları ve Çözüm Önerileri (Muğla İli Örneği). *İstanbul Ticaret Üniversitesi, Sosyal Bilimler Dergisi*, 5(9): 133-142.
- Güler EG, 2006. Kentsel Kamusal (Dış) Mekanlar Sistemi İçinde Sosyal Bir Mekan Olarak Açık Pazar Yerlerinin Rolü ve Kent Kimliğine Etkisi: İzmir ve Londra Kent Merkezi Örnekleri, *Ege Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış)*.
- He H, Harris L, 2020. The Impact of Covid-19 Pandemic on Corporate Social Responsibility and Marketing Philosophy. *Journal of Business Research*, 116: 176-182.
- Jeong SK, Ban YU, 2020. Spatial Configurations for The Revitalization of a Traditional Market: The Case of Yukgeori Market in Cheongju, South Korea. *Sustainability*, 12(7): 1-17.
- Khan N, Alamtar A, 1998. Periodic Markets and Rural Transformation in Gonda District, Uttar Pradesh, India. *Focus*, 45(1): 34.
- Knotek ES, Schoenle R, Dietrich A, Kuester K, Müller G, Myrseth KOR, Weber M, 2020. Consumer and COVID-19: A Real- Time Survey. *Economic Commentary*, 8: 1-6.
- Koçak O, Uygun E, 2014. Göçün Tarım Sektöründe Faaliyet Gösteren Pazar Çalışanlarına Etkisi ve Yalova Örneği. *Emek ve Toplum*, 3 (5): 192-213.
- Koday S, Çelikoğlu Ş, 2011. Geleneksel Alışveriş Mekanlarına Bir Örnek: Bartın Kadınlar Pazarı (Galla Bazarı). *Atatürk Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, 15 (2): 243-262.
- Kogo BK, Kumar L, Koech R, 2020. Climate Change and Variability in Kenya: A Review of Impacts on Agriculture and Food Security Environment. *Development and Sustainability*, <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s10668-020-00589-1.pdf> (Erişim Tarihi: 13.07.2020).
- Lopez-Ridaura S, Barba-Escoto L, Reyna C, Hellin J, Gerard B, Van Wijk M, 2019. Food Security and Agriculture in The Western Highland of Guatemala. *Food Security*, 11: 817-833.
- Oğulata F, Akdemir Ş, 1992. Adana İli Seyhan İlçesi Yeni Baraj Mahallesi Semt Pazarı Satıcıları Üzerine Bir Araştırma. *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 6(2): 51-61.
- Özdamar K, 2004. Paket Programlar ile İstatistiksel Veri Analizi-1, Kaan Kitabevi, 649s.,Erzurum.
- Özgüç N, Mitchell W, 2000. Şehirlerin Alternatif Alışveriş Mekanları: İstanbul'da Haftalık Pazarlar. *Tasarım+Kuram*, 1(2): 35-58.
- Ruzhank M, Chintan G, 2013. Design for Natural Markets: Accomodating The Informal. *Built Environment*, 39(2): 277-296.
- Schweizer G, 1984. Traditional Distribution Systems Under the Influence of Recent Development Processes: Periodic Markets in the Yemen Arab Republic as an Example. *Applied Geography and Development*, 24: 24

- Sommer R, Herrick J, Sommer T, 1981. The Behavioral Ecology of Supermarkets and Farmers' Markets. *Journal of Environmental Psychology*, 1(1): 13-19.
- Tunçel H, 2003. Anadolu Şehirlerinde Semt Pazarları: Elazığ Örneği. *Fırat Üniversitesi Sosyal Bilimler Dergisi*, 13(1): 49-70.
- Tunçel H, 2009. Geleneksel Ticaret Mekanı Olarak Türkiye'de Haftalık Pazarlar. *Journal of New World Science Academy*, 4 (2): 35-52.
- Yüceer SE, Demiryürek K, 2020. Kırsal Kadının Semt Pazarlarındaki Girişimciliğini Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesi: Samsun İli Örneği. *Türk Tarım- Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 8 (2): 301-307.
- Williams CC, Paddock C, 2003. The Meaning Of Alternative Consumption Practices. *Cities*, 20(5): 311-319.

**Atf İçin:** Gönülal E, Soylu S, 2021. Tam Sulama ve Su Stresi Koşullarında Sorgum x Sudan Otu Melezi Çeşitlerinin Gelişme Dönemleri İçin Gerekli Büyüme Gün Derece Değerlerinin Belirlenmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1550-1558.

**To Cite:** Gönülal E, Soylu S, 2021. Determination of Growing Degree Days Values Required for Growth Periods of Sorghum x Sudan Grass Hybrid Varieties under Full Irrigation and Water Stress Conditions. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1550-1558.

### Tam Sulama ve Su Stresi Koşullarında Sorgum x Sudan Otu Melezi Çeşitlerinin Gelişme Dönemleri İçin Gerekli Büyüme Gün Derece Değerlerinin Belirlenmesi

Erdal GÖNÜLAL<sup>1\*</sup>, Süleyman SOYLU<sup>2</sup>

**ÖZET:** Bu çalışma sorgum x sudan otu melezi (*Sorghum bicolor* L. x *Sorghum sudanense*) çeşitlerinin su stresi ve tam sulama şartlarında çiçeklenme gün sayısı, birinci ve ikinci biçim zamanı için ihtiyaç olan gün ve Growing degree days (GDD) değerlerinin belirlenmesi amacı ile 2017 ve 2018 yıllarında Konya ekolojik koşullarında yürütülmüştür. Tesadüf bloklarında bölünmüş parseller deneme desenine göre üç tekerrürlü yürütülen çalışmada ana parselleri sulama konuları (S<sub>1</sub>: Tarla kapasitesine getirilecek şekilde sulama; S<sub>2</sub>: S<sub>1</sub>'in % 50 si kadar sulama), alt parselleri ise sorgum x sudan otu melezi çeşitleri (Hayday, Tonka, Aneto, Greengo, Sugargraze II, Master BMR ve Forage King) oluşturmuştur. Çalışmada çiçeklenme zamanı için GDD değerleri 2017 ve 2018 yıllarında tam sulanan koşullarda (S<sub>1</sub>) sırasıyla 924 °C ve 988 °C olarak elde edilmiştir. Su stresi koşullarında (S<sub>2</sub>) ise GDD değerleri 2017 ve 2018 yıllarında sırasıyla 1115.8 °C ve 1078.2 °C olarak elde edilmiştir. Birinci biçim için GDD değerleri tam sulanan koşullarda (S<sub>1</sub>) 2017 ve 2018 yıllarında sırasıyla 1116.4 °C ve 1177.3 °C olarak elde edilmiştir. Su stresi (S<sub>2</sub>) koşullarında ise GDD değerleri 2017 ve 2018 yıllarında sırasıyla 1265 °C ve 1255.5 °C olarak elde edilmiştir. Her iki yılda da çiçeklenme döneminde en düşük GDD değerleri Forage King çeşidinden (806.3-869.9 °C) elde edilmiştir. En yüksek GDD değerleri ise 2017 yılında Tonka çeşidinden (1110.7 °C) ve 2018 yılında Tonka, Greengo çeşitlerinden (1113.3 °C) elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyokütle, iklim değişikliği, GDD, sorgum, su stresi

### Determination of Growing Degree Days Values Required for Growth Periods of Sorghum x Sudan Grass Hybrid Varieties under Full Irrigation and Water Stress Conditions

**ABSTRACT:** This study was conducted to determine number of flowering days under water stress and full irrigation conditions, the days required for the first and second cut time, and the GDD (Growing degree days) of sorghum x sudan grass hybrid varieties under Konya ecological conditions in 2017 and 2018 years. The study conducted in randomized blocks – split plots experimental design with 3 replications, the main parcels were irrigated (S<sub>1</sub>: Full irrigation; S<sub>2</sub>: Irrigation 50% of S<sub>1</sub>), and the sub plots were varieties (Hayday, Tonka, Aneto, Greengo, Sugargraze II, Master BMR, Forage King). In the study, the GDD values for flowering time were determined as 924 °C and 988 °C under full irrigated conditions (S<sub>1</sub>) in 2017 and 2018 years, respectively. While in water stress conditions (S<sub>2</sub>), the GDD values were determined as 1115.8 °C and 1078.2 °C in 2017 and 2018, respectively. For the first cutting, the GDD values were determined as 1116.4 °C and 1177.3 °C under full irrigated conditions (S<sub>1</sub>) in 2017 and 2018, respectively. In water stress (S<sub>2</sub>) conditions, the GDD values were determined as 1265 °C and 1255.5 °C in 2017 and 2018 years, respectively. In both years, the lowest GDD values were determined from Forage King variety (806.3-869.9 °C), in flowering period. While the highest GDD values were determined from Tonka variety (1110.7 °C) in 2017 and from Tonka, Greengo varieties (1113.3 °C) in 2018.

**Keywords:** Biomass, climate change, GDD, sorghum, water stress

<sup>1</sup> Erdal GÖNÜLAL ([Orcid ID: 0000-0002-1621-0892](https://orcid.org/0000-0002-1621-0892)), Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü Tarla Bitkileri Bölümü, Konya, Türkiye

<sup>2</sup> Süleyman SOYLU ([Orcid ID: 0000-0002-0420-5033](https://orcid.org/0000-0002-0420-5033)), Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Konya, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Erdal GÖNÜLAL, e-mail: erdalgonulal@hotmail.com

## GİRİŞ

Sorgum sıcak iklim tahılları içerisinde su stresine toleransı ve marjinal alanlarda daha iyi verim potansiyeli ile dünyada ve Türkiye’de su kaynaklarının yeterli olmadığı kurak ve yarı kurak alanlar için mısır alternatif bir bitki olma potansiyeline sahiptir. Günümüzde de etkileri görülmeye başlayan ve 2050 yılına kadar özellikle su kaynakları üzerine olumsuz etkilerinin çok şiddetli olacağı öngörülen iklim değişikliği sürdürülebilir tarımı tehdit eden en önemli konulardan birisidir (Giannakopoulos ve ark., 2005). İklim değişikliğinin olumsuz etkilerinin özellikle kurak ve yarı kurak alanlardaki tarımsal üretimi daha da zorlaştırması beklenmekte olup, yeni araştırmalarda iklim değişikliğine uyum ile ilgili çalışmaların artırılması gerekmektedir. İklim değişikliğine uyum kapsamında su kaynakları açısından yetersiz olan ve yağış miktarı az olan bölgelerde hayvancılık işletmelerinin ihtiyacı olan silaj ve diğer kaba yemlerin su tüketimi daha az olan ve su stresine dayanıklı sorgum ve sorgum x sudan otu melezleri ile karşılanması ve bu bitkilerin bu bölgelerdeki adaptasyon ve yaygınlaştırılması ile ilgili çalışmaların artırılması önemli bir konudur. Su tüketimi benzer amaçla kullanılan mısır bitkisine göre daha az olan ve başta su stresi olmak üzere birçok abiyotik stres faktörlerine daha dayanıklı olan ve marjinal alanlarda düşük maliyetle yetişebilen (Sanchez ve ark., 2002; Li ve ark., 2010) sorgum ve melezleri yem kalitesi olarak ta mısır bitkisine benzer özelliklere sahiptir.

Yoğun ve kılcal bir kök yapısına sahip olması, yaprak ve saplarının mumsu tabaka ile kaplı olma özelliği ile daha az su kaybeden sorgum ve sorgum x sudan otu melezleri belli bir kuraklık stresi yaşadktan sonra yeniden su verildiği takdirde durgunluktan çok kolay çıkabilmekte ve hızla büyümeye devam edebilmektedir (Acar ve ark., 2002). Orta Anadolu bölgesinde halihazırda hayvancılık için gerekli olan silaj üretimi büyük oranda mısır bitkisinden karşılanmakta olup, alternatif bir bitki olarak sorgum ve sorgum x sudan otu melezleri bölgede yeni yaygınlaşmaya başlamış ve özellikle yeni sorgum x sudan otu melezi çeşitleri yüksek biyokütle verimi potansiyeli ile dikkat çekmektedir. Bölgede sorgum x sudan otu melezleri çeşitlerinin ana ve ikinci ürün olarak yetişebilme ve adaptasyon durumlarının belirlenmesi önemli bir konudur.

Bir bitki tür ve çeşidinin bir bölgeye adaptasyonu ve yaygınlaşmasında bitki büyüme gün derece değeri en güvenli sonuçlardan birisi olup, o bölgenin minimum ve maksimum sıcaklık değeri ile bitki için kullanılan temel değerinin bilinmesi ile bu değer hesaplanabilmektedir. Sorgum x sudan otu melezi ve mısır gibi sıcak iklim tahıllarının gerek verim gerekse o bölgede yetiştirilebilme potansiyelini belirleyen en önemli husus bölgenin iklim koşullarıdır. Yeterli besin maddesi, toprak nemi ve ışık olan ortamlarda sıcaklık bitki gelişmesini etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Hava sıcaklığı kolayca ölçülebilen ve büyümenin tahmininde kullanılabilen bir faktör olup, tahıllarda gelişme dönemleri için gerekli olan termal zamanın belirlenmesinde büyüme gün derecesi (GDD) sıkça kullanılabilen bir parametredir. GDD özellikle çeşit belirlenmesi, ekim zamanının ayarlanması, hastalık ve zararlıların tahmini ve erken uyarı sistemi kurulması, gelişme döneminde uygulanacak işlemlerin programlanması ve gelişme dönemlerinin belirlenmesinde kullanılmakta olup, vejetasyon süresi kısa ya da sıcaklık toplamı düşük olan bir bölge için ya da ikinci ürün yetiştiriciliği için düşük GDD ihtiyacı olan çeşitler belirlenmelidir (Young ve ark., 2000; Soler ve ark., 2005). Herhangi bir gün için GDD değeri hesaplanırken o güne ait ortalama sıcaklıktan temel sıcaklığın çıkarılması yeterli olup, bir bölge için GDD hesaplamasında o bölgedeki meteoroloji kayıtları kullanılabilir (Keser ve Ekingen, 1994). Sorgum ve sorgum x sudan otu melezlerinde gelişme ve biyokütle verimi genetik özellikler yanında birçok çevresel faktörün de etkisindedir. Sıcaklık ve özelliklede toplam sıcaklık değerleri en önemli faktörlerden birisi olup, bütün yetiştirme şartları yerinde bile olsa hatta ilave sulama bile yapılsa 38 °C üzerindeki sıcaklıkta bitki büyümesi durmakta ve gelişme durmakta hatta gerilemektedir (Aldrich ve

ark., 1982). Birçok araştırmacı sıcak iklim tahıllarında temel değeri olarak 10 °C yi kabul etmiş ve maksimum değeri mısır için 30 °C, sorgum için ise 38 °C olarak belirlenmiştir (Rocatelli ve ark., 2012; Waite, 2016). Dünyada sorgum ve sorgum x sudan otu melezlerinde bitki büyüme gün derece ile ilgili çalışmalarda GDD değerleri çeşit, ekim zamanı ve ekolojilere göre % 50 çiçeklenme dönemi için 750 - 1582 °C arasında, silaj için hasatın yapıldığı hamur olum döneminde ise 875-2310 °C arasında değişmiştir (Gerik ve ark.,2003; Larson ve ark., 2018).

Bu çalışmada yarı kurak bir iklime sahip olan ve su kaynaklarınca çok zengin olmayan ve önümüzdeki 30 yılda iklim değişikliğinin etkilerinden Türkiye’de en fazla etkilenmesi muhtemel alanlar içinde öngörülen ve Türkiye’nin en fazla büyükbaş hayvan varlığına sahip Konya ilinde önemli bir potansiyele sahip olan sorgum x sudan otu melezi çeşitlerinin ana ürün olarak yetiştirilme durumlarına ışık tutmak amacıyla normal ve su stresi şartlarında önemli gelişme dönemleri için gerekli olan gün ve GDD değerlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

Konya Karapınar ekolojik şartlarında 2017 ve 2018 yıllarında iki yıl süre ile yürütülen çalışmada ülkemizde tescilli veya üretim izinli özel şirketlerden temin edilen yedi adet sorgum x sudan otu melezi çeşidi (Hayday, Tonka, Aneto, Greengo, Sugargraze II, Master BMR ve Forage King) materyal olarak kullanılmıştır. Çalışma 7 çeşit ve iki yetiştirme koşulu (normal ve su stresi koşulları) ve üç tekerrürlü olarak tesadüf bloklarında bölünmüş parseller deneme desenine göre yürütülmüş olup, ana parselleri sulama konuları, alt parselleri ise çeşitler oluşturmuştur. Çalışma 2 yetiştirme ortamı x 7 sorgum x sudan otu melezi çeşidi x 3 tekerrür olmak üzere toplam 42 parselden oluşmuştur. Ekim işlemi her iki yılda da 45 cm sıra arası ve 5 cm sıra üzeri ekim normunda (Salman ve Budak, 2015) yapılmış, çalışmada ekimle birlikte analiz sonuçlarına göre fosfor 8 kg/da’ a tamamlanmış ve yetiştirme dönemi boyunca toplam 20 kg azot damla sulama sistemi ile parçalar halinde verilmiştir (Yüksel, 2005). Ekim işlemi 2017 yılında 9 Mayıs, 2018 yılında ise 13 Mayıs tarihinde elle yapılmıştır. Çıktılar 2017 yılında 22 Mayıs tarihinde, 2018 yılında ise 24 Mayıs tarihinde gerçekleştirilmiştir. Her bir parselin 5 metre uzunluğunda ve 6 sıradan oluştuğu çalışmada toplam parsel alanı ekimde 13.5 m<sup>2</sup> hasatta ise kenar tesirleri atıldıktan sonra 7.2 m<sup>2</sup>’den oluşmuştur.

Çalışmada ana konu olan su stresi konularından kontrol konusu (Normal koşullar) S<sub>1</sub> uygulamasında etkili kök derinliği olan 0-90 cm toprak nemi gravimetrik yöntemle göre takip edilmiş ve eksilen su tarla kapasitesine (TK) gelecek şekilde basınç ayarlı damla sulama sistemi ile sulama yapılmıştır. Su stresi uygulaması olan (Stres koşulları) S<sub>2</sub> konusunda ise S<sub>1</sub> konusuna uygulanan suyun yarısı verilmiştir. Verilen suların sayaçla ölçüldüğü çalışmada S<sub>1</sub> konusuna birinci biçime kadar 2017 ve 2018 yıllarında sırasıyla 634 ve 650 mm sulama suyu verilirken, su stresi uygulaması olan S<sub>2</sub> konusunda ise yıllara göre sırasıyla 317 ve 325 mm sulama suyu verilmiştir. Su stresi konusundaki (S<sub>2</sub>) çeşitlerde tek biçim yapılmış, ikinci biçim yapılamamıştır. S<sub>1</sub> konusunda ise ikinci biçim her iki yılda sonbahar donları dikkate alınarak 2017 yılında 10 Ekim, 2018 yılında ise 8 Ekim tarihinde yapılarak GDD değerleri hesaplanmıştır. Çalışmada birinci biçim salkımdaki daneler hamur olum döneminde iken (Lyons ve ark., 2019) yapılmış, çiçeklenme zamanı olarak da parseldeki bitkilerin %50 sinin çiçeklendiği dönem baz alınarak bu dönemlere ait GGD değerleri her çeşit için her bir güne ait minimum ve maksimum sıcaklık değerleri Rocatelli ve ark. (2012) ile Waite (2016) ‘nın bildirdiği formül ve eşik değerlere göre aşağıdaki Eşitlik 1’ e göre hesaplanmıştır. Bu araştırmacılara göre sorgumda 10/38 eşik değerler olarak alınmıştır.

$$GDD: \sum [ [(T_{max} + T_{min}) / 2] - T_{eşik} ] \quad (1)$$

Eşitlik 1’de;

GDD: Büyüme gün derece

$T_{max}$ : Güne ait en yüksek sıcaklık değeri (Maksimum sıcaklık 38 °C’nin üzerinde olursa formüle 38 °C yazılmıştır).

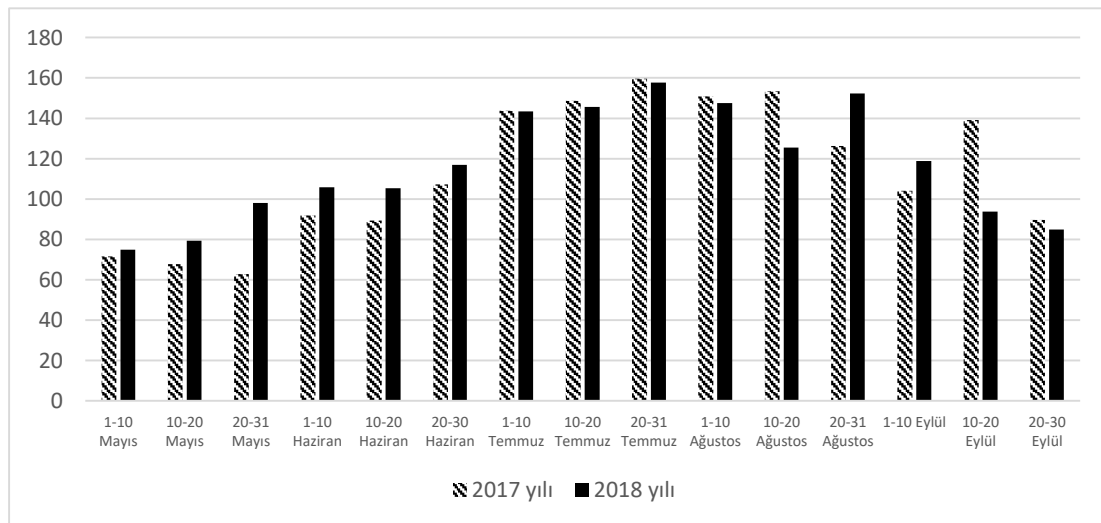
$T_{min}$ : Güne ait en düşük sıcaklık değeri (Minimum sıcaklık 10 °C’nin altında olursa formülde 10 °C olarak yazılmıştır).

$T_{eşik}$ : Sorgum için eşik sıcaklık değeri 10 °C’dir (Rocatelli ve ark., 2012; Waite, 2016) ifade etmektedir

Çalışma alanı karasal yapıda yarı kurak bir iklime sahip olup, toplam yağışı 300 mm altında olan ve bu yağışın önemli bir kısmı Kasım-Nisan ayları arasında düşen bir bölgedir. Çalışma yılları olan 2017 ve 2018 yıllarında toplam yağış sırasıyla 249.6 ve 286.7 mm olurken mayıs-eylül arası yağış ise 78 ve 83.5 mm arasında oluşmuştur. Uzun yıllar ortalamasına göre toplam yağış 291.2 mm olurken mayıs-eylül arası yağış miktarı 82.9 mm olmuştur. Her iki deneme yılında da uzun yıllar ortalamasından daha az yağış kaydedilmiştir. Çalışma alanının uzun yıllar ortalama sıcaklığı 11°C olurken bu değer 2017 yılında 11.7 °C ve 2018 yılında ise 12.2 °C olmuştur. Sorgum x sudan otu melezinin yetiştirme dönemi olan mayıs-eylül ayları incelendiğinde 2017 yılı mayıs ayının 2018 yılına göre daha serin geçtiği, ortalama sıcaklığın 2017 yılı mayıs ayında 15.6°C’den 2018 yılı mayıs ayında ise 17.6 °C olduğu görülmüştür. Mayıs- eylül ayları ortalama sıcaklık 2017 yılında 20.9 °C olurken, 2018 yılında ise 21.2 °C olmuştur (Çizelge 1).

**Çizelge 1.** Deneme alanına ait bazı meteorolojik veriler (Anonim, 2018)

| Aylar                       | Mayıs |      | Haziran |      | Temmuz |      | Ağustos |      | Eylül |      |
|-----------------------------|-------|------|---------|------|--------|------|---------|------|-------|------|
| Meteorolojik veriler/Yıllar | 2017  | 2018 | 2017    | 2018 | 2017   | 2018 | 2017    | 2018 | 2017  | 2018 |
| Ort. Sic. (°C)              | 15.6  | 17.6 | 19.5    | 20.9 | 24.6   | 24.4 | 23.9    | 23.3 | 20.7  | 19.7 |
| Max. Sic. (°C)              | 22.6  | 25.5 | 26.9    | 29.4 | 32.7   | 32.2 | 31.5    | 31.8 | 30.4  | 27.6 |
| Min. Sic. (°C)              | 8.6   | 9.6  | 12      | 12.3 | 16.5   | 16.6 | 16.4    | 14.9 | 11    | 11.8 |
| Aylık top. yağış (mm)       | 42.2  | 32.3 | 18.4    | 28.4 | 4.6    | 13.8 | 11.6    | 0.8  | 1.2   | 8    |



**Şekil 1.** 2017 ve 2018 yılına ait sorgum x sudan otu melezi için hesap edilen onar günlük GDD değerleri (1 Mayıs-30 Eylül arası)



**Tam Sulama ve Su Stresi Koşullarında Sorgum x Sudan Otu Melezi Çeşitlerinin Gelişme Dönemleri İçin Gerekli Büyüme Gün Derece Değerlerinin Belirlenmesi**

Şekil 1’de çalışma yılları olan 2017 ve 2018 yıllarına ait sorgum x sudan otu melezi için kullanılan 10/38 °C eşik değerlerine göre hesaplanan onar günlük dilimler halinde 1 Mayıs-30 Eylül tarihleri arasındaki GDD değerleri verilmiş olup mayıs ve haziran ayı değerlerinin denemenin ikinci yılında daha yüksek olduğu görülmüştür.

Çalışma alanı toprağına ait bilgiler Çizelge 2’ de verilmiştir. Buna göre deneme alanı toprağı organik maddece zayıf, kireç ve pH oranınca yüksek, tuz sorunu olmayan ve üst tabakası kumsal yapıdadır.

**Çizelge 2.** Araştırma yerinin bazı toprak özelliklerine ait analiz sonuçları

| Derinlik | Kum (%) | Silt (%) | Kil (%) | Bünye | TK (%) | SN (%) | Hacim ağırlığı (g/cm <sup>3</sup> ) | pH  | EC (dSm <sup>-1</sup> ) | Kireç (%) | Organik Madde | P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (kg/da) | K <sub>2</sub> O (kg/da) |
|----------|---------|----------|---------|-------|--------|--------|-------------------------------------|-----|-------------------------|-----------|---------------|---------------------------------------|--------------------------|
| 0-30     | 58.1    | 22.8     | 19.1    | SCL   | 20     | 9.6    | 1.37                                | 7.8 | 0.42                    | 33.5      | 1.3           | 14.5                                  | 33                       |
| 30-60    | 30.1    | 20.3     | 49.6    | C     | 24.5   | 12.6   | 1.30                                | 8.1 | 0.45                    | 28.7      | 1.1           | 5.7                                   | 26                       |
| 60-90    | 16.0    | 24.4     | 59.6    | C     | 28     | 15.4   | 1.22                                | 8.2 | 0.44                    | 29.4      | 0.6           | 2.6                                   | 24                       |

Çalışma sonucu elde edilen çiçeklenme ve birinci biçime ait GDD değerleri tesadüf bloklarında bölünmüş parseller deneme desenine göre JMP 11.2.1 paket programı ile analizleri yapılmış ve gruplandırmalar %5 önem seviyesine göre LSD testine göre yapılmıştır (JMP, 2014).

## BULGULAR ve TARTIŞMA

İki yıl süre ile Konya Karapınar şartlarında yedi adet sorgum x sudan otu melezi çeşidinin normal ve su stresi şartlarında çiçeklenme ve silaj amaçlı biçim için gerekli olan gün ve GDD değerlerinin belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmada yıllar ayrı olarak değerlendirilmiştir. Her iki yılda da çiçeklenme ve birinci biçim GDD değerleri için yetiştirme ortamı ve çeşitler arasındaki farklar %5 önem seviyesine göre önemli çıkarken, yetiştirme ortamı x çeşit etkisi önemsiz çıkmıştır. Bu durum aşağıda alt başlıklar halinde detaylı değerlendirilmiştir.

### Çiçeklenme Gün Sayısı ve GDD

Çalışmada her iki yılda da su stresi çiçeklenme için gerekli gün sayısı ve GDD değerini artırmıştır (Çizelge 3).

**Çizelge 3.** Normal ve stres koşullarında sorgum x sudan otu çeşitlerinde 2017 ve 2018 yıllarına ait % 50 çiçeklenme dönemi için elde edilen gün ve GDD değerleri

| Çeşit/Gün/GDD | 2017           |                |          |               |          | 2018           |                |         |          |          |               |
|---------------|----------------|----------------|----------|---------------|----------|----------------|----------------|---------|----------|----------|---------------|
|               | S <sub>1</sub> | S <sub>2</sub> | Çeşit    |               | Çeşit    | S <sub>1</sub> | S <sub>2</sub> | Çeşit   |          | Çeşit    |               |
| Gün           | GDD (°C)       | Gün            | GDD (°C) | GDD Ort. (°C) |          | Gün            | GDD (°C)       | Gün     | GDD (°C) |          | GDD Ort. (°C) |
| Hayday        | 89             | 988.8          | 102      | 1194.0        | 1091.4 a | Hayday         | 86             | 1064.5  | 91       | 1124.1   | 1094.3 a      |
| Tonka         | 90             | 1003.7         | 104      | 1217.7        | 1110.7 a | Tonka          | 87             | 1078.0  | 93       | 1148.5   | 1113.3 a      |
| Forage King   | 73             | 763.2          | 79       | 849.3         | 806.3 c  | Forage King    | 70             | 829.5   | 76       | 910.3    | 869.9 d       |
| Aneto         | 87             | 961.7          | 100      | 1164.4        | 1063.1 a | Aneto          | 86             | 1064.5  | 91       | 1124.1   | 1094.3 a      |
| Sugargraze II | 76             | 806.7          | 90       | 1003.7        | 905.2 b  | Sugargraze II  | 71             | 843.5   | 81       | 990.2    | 916.9 c       |
| Master BMR    | 84             | 921.9          | 102      | 1194.0        | 1058.0 a | Master BMR     | 79             | 958.2   | 89       | 1101.7   | 1030.0 b      |
| Greengo       | 91             | 1021.9         | 101      | 1187.7        | 1104.8 a | Greengo        | 87             | 1078.0  | 93       | 1148.5   | 1113.3 a      |
| Ortalama      | 84             | 924.0 b        | 97       | 1115.8 a      | 1019.9   | Ortalama       | 81             | 988.0 b | 88       | 1078.2 a | 1033.1        |

S<sub>1</sub>:TK tamamlama; S<sub>2</sub>:%50 sulama

CV: 4.6

LSD<sub>su</sub>: 101.8; LSD<sub>Çeşit</sub>:56.9

Kareler ort. (Su): 386439 Kareler ort.(Çeşit):82677

S<sub>1</sub>:TK tamamlama; S<sub>2</sub>:%50 sulama

CV: 3.2

LSD<sub>su</sub>: 24.9 LSD<sub>Çeşit</sub>: 40

Kareler ort.(Su) :85951 Kareler ort.(Çeşit):60224

Çeşitler açısından bakıldığında her iki deneme yılında da Forage King çeşidi en erkenci çeşit olurken, Tonka çeşidi ise en geç çiçeklenen çeşit olmuştur. Çalışmada her iki yılda da çiçeklenme için en düşük ve en yüksek GDD değerleri Tonka (1110.7 ve 1113.3 °C) ve Forage King (806.3 ve 869.9 °C) çeşitlerinden elde edilmiştir (Çizelge 3). Sorgum bitkisi stres koşullarında büyümesini geçiçi olarak durdurmakta olup, şartlar iyileşince tekrar büyümeye devam etmekte ve stres koşullarında çiçeklenmenin uzamasının bu durumdan kaynaklandığı düşünülmektedir.

### Birinci Biçim Gün Sayısı ve GDD

Çalışmada su stresi çiçeklenme zamanında olduğu gibi hamur olum döneminde yapılan birinci biçim zamanını da geciktirmiş ve GDD miktarı daha fazla olmuştur (Çizelge 4). Su stresinin biçim zamanını çalışmanın ilk yılında 12 gün ikinci yılında ise 6 gün uzattığı görülmüştür.

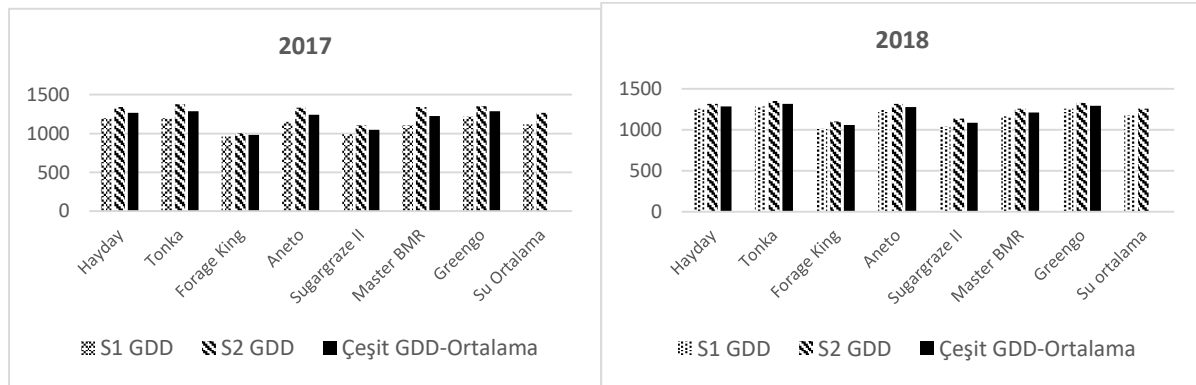
**Çizelge 4.** 2017 ve 2018 yıllarına ait birinci biçim dönemi için elde edilen gün ve GDD değerleri

|               | 2017           |          |                |          |                | 2018           |     |                |     |                |                    |
|---------------|----------------|----------|----------------|----------|----------------|----------------|-----|----------------|-----|----------------|--------------------|
|               | S <sub>1</sub> |          | S <sub>2</sub> |          | Çeşit GDD Ort. | S <sub>1</sub> |     | S <sub>2</sub> |     | Çeşit GDD Ort. |                    |
| Çeşit/Gün/GDD | Gün            | GDD (°C) | Gün            | GDD (°C) | (°C)           | Çeşit/Gün/GDD  | Gün | GDD (°C)       | Gün | GDD (°C)       | Çeşit GDD Ort.(°C) |
| Hayday        | 102            | 1194.0   | 115            | 1341.5   | 1267.8 a       | Hayday         | 101 | 1256.5         | 105 | 1313.1         | 1284.8 a           |
| Tonka         | 102            | 1194.0   | 118            | 1377.0   | 1285.5 a       | Tonka          | 103 | 1284.1         | 107 | 1339.8         | 1312.0 a           |
| Forage King   | 87             | 961.7    | 90             | 1003.7   | 982.7 b        | Forage King    | 82  | 1005.0         | 89  | 1101.7         | 1053.4 c           |
| Aneto         | 99             | 1150.8   | 114            | 1331.2   | 1241.0 a       | Aneto          | 100 | 1242.0         | 105 | 1313.1         | 1277.6 a           |
| Sugargraze II | 89             | 988.8    | 96             | 1107.3   | 1048.1 b       | Sugargraze II  | 84  | 1036.2         | 92  | 1136.1         | 1086.2 c           |
| Master BMR    | 96             | 1107.3   | 115            | 1341.5   | 1224.4 a       | Master BMR     | 94  | 1161.1         | 101 | 1256.5         | 1208.8 b           |
| Greengo       | 104            | 1218.2   | 116            | 1352.8   | 1285.5 a       | Greengo        | 101 | 1256.5         | 106 | 1326.6         | 1291.6 a           |
| Ortalama      | 97             | 1116.4 b | 109            | 1265.0 a | 1214.2         | Ortalama       | 95  | 1177.3 b       | 101 | 1255.5 a       | 1216.4             |

CV: 4.7  
S<sub>1</sub>:TK tamamlama; S<sub>2</sub>:%50 sulama  
LSD Su: 117.3; LSD Çeşit: 66  
Kareler ort. (Su):232128 Kareler ort. (Çeşit):91152

CV: 3.3  
S<sub>1</sub>: TK tamamlama; S<sub>2</sub>:%50 sulama  
LSD su: 30.2; LSD Çeşit: 47.8  
Kareler ort. (Su):64288 ; Kareler ort. (Çeşit):66588

Çeşitler ortalama değerleri üzerinden incelendiğinde Forage King çeşidi en erkenci Tonka çeşidi ise en geççi çeşit olmuştur (Şekil 2). GDD değerleri 2017 yılında 982.7 °C (Forage King) ile 1285.5 °C (Tonka ve Greengo) aralığında, 2018 yılında ise 1053.4 °C (Forage King) ile 1312.0 °C (Tonka) aralığında değişmiştir (Çizelge 4).



**Şekil 2.** Normal ve stres koşullarında sorgum x sudan otu melezi çeşitlerinde 2017 ve 2018 yıllarına ait I.biçim dönemi için elde edilen GDD değerleri

## İkinci Biçim İçin Gün Sayısı ve GDD

Çalışmada sadece eksik nemin TK tamamlandığı S<sub>1</sub> konusundaki çeşitlerde her iki yılda da sonbahar donları dikkate alınarak ikinci biçim yapılmış olup, su stresi uygulanan S<sub>2</sub> konusundaki çeşitlerde ise sadece tek biçim alınabilmektedir. Forage King çeşidi çalışmadaki en erkenci çeşit olup, birinci biçimden sonra ikinci biçime kadar en uzun süre ve GDD değerine (734.2 °C ve 731.3 °C) sahip olurken, geçici çeşitlerde ise en düşük değer 2017 yılında Greengo çeşidinden (478.2 °C), 2018 yılında ise Tonka çeşidinden (452.2 °C) elde edilmiştir (Çizelge5).

**Çizelge 5.** Çalışmada 2017 ve 2018 yıllarına ait ikinci biçim için elde edilen GDD değerleri (°C)

| Çeşit/GDD     | 2017                                |   | 2018                                |   | 2017-18 ort.(means)                 |   |
|---------------|-------------------------------------|---|-------------------------------------|---|-------------------------------------|---|
|               | Ekimden II. biçime kadar toplam GDD | I.biçimden II. biçime kadar olan toplam GDD | Ekimden II. biçime kadar toplam GDD | I.biçimden II. biçime kadar olan toplam GDD | Ekimden II. biçime kadar toplam GDD | I.biçimden II. biçime kadar olan toplam GDD |
| Hayday        | 1695.9                              | 501.9                                       | 1736.3                              | 479.8                                       | 1716.1                              | 490.9                                       |
| Tonka         | 1695.9                              | 501.9                                       | 1736.3                              | 452.2                                       | 1716.1                              | 477.1                                       |
| Forage King   | 1695.9                              | 734.2                                       | 1736.3                              | 731.3                                       | 1716.1                              | 732.8                                       |
| Aneto         | 1695.9                              | 545.1                                       | 1736.3                              | 494.3                                       | 1716.1                              | 519.7                                       |
| Sugargraze II | 1695.9                              | 707.1                                       | 1736.3                              | 700.1                                       | 1716.1                              | 703.6                                       |
| Master BMR    | 1695.9                              | 588.6                                       | 1736.3                              | 575.2                                       | 1716.1                              | 581.9                                       |
| Greengo       | 1695.9                              | 478.2                                       | 1736.3                              | 479.8                                       | 1716.1                              | 479.0                                       |
| Ortalama      | 1695.9                              | 579.6                                       | 1736                                | 559.0                                       | 1716.1                              | 569.3                                       |

Sıcak iklim tahılları içinde özellikle Sorgum bitkisi genel olarak su stresinde geç çiçeklenme göstermekte olup (Özcan, 2010; Gönülal ve Soylu, 2019), çalışmadaki %50 oranında bir su stresinde (S<sub>2</sub>) 2017 yılı mayıs ayının daha serin geçmesiyle S<sub>1</sub> konusuna göre göre 13 günlük bir gecikme olurken, 2018 yılında sıcaklıkların da etkisi ile bu fark daha az olmuştur (Çizelge 1 ve 3). Çalışmamız sonuçlarını destekler şekilde Moosavi ve ark. (2011) silaj sorgumunda sulama aralığının artması ile GDD değerinin arttığını, su stresi yaşanmayan sık sulamalarda ise GDD değerinin daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Dünyada ve Türkiye’de sorgum ve sorgum x sudan otu melezleri ile ilgili yürütülen çalışmalarda, Salman ve Budak (2015), Aneto ve Greengo çeşitlerinde çiçeklenme süresini 82-90 gün arasında, Mokhtarı (2014), Sugargraze II çeşidinde 83-85 gün arasında bulmuşlardır.

Türkiye’de sorgum x sudan otu melezi ile ilgili birçok çalışmaya rağmen GDD değeri ile ilgili çalışmaya rastlanılmamış olup, dünyada farklı ülkelerde yürütülen çalışmalarda Srivastava ve ark. (2010), 8 çeşitte yürüttükleri çalışmada %50 çiçeklenme zamanı için GDD değerini, 970-1300 °C arasında, Larson ve ark. (2018) farklı çeşitlerde % 50 çiçeklenmede zamanı için GDD değerini 1582 ile 2014 °C arasında bulmuşlardır.

Sorgum x sudan otu melezi biçim zamanına ait GDD değeri ile ilgili daha önceki çalışmalarda elde edilen değerler sonuçlarımıza büyük oranda benzerlik göstermekte olup, bu çalışmalarda Lyons ve ark. (2019) hasadın hamur olum döneminde yapılmasının en uygun dönem olduğunu ve bu döneme 1150 GDD değerinde ulaşıldığını, Wannasek ve ark. (2017), beş sorgum x sudan otu melezi çeşidinde üç yıl süre ile yürüttükleri çalışmada erkenci çeşitte biçime kadar olan GDD değerini 1100-1200 °C arasında, diğer çeşitlerde ise yıllara göre 1080-1400 °C arasında olduğunu, Rocatelia ve ark. (2012) ise iki yıllık çalışmada biçimin ekimden 14 hafta sonra yıllara göre 1503 °C ve 1590 °C arasında yapılmasının uygun olduğunu bildirmiştir. GDD değeri ile ilgili yürütülen çalışmalardan elde edilen değerlerin bazıları çalışmamız sonuçları ile benzerlik göstermekte olup, farklı değerlerin ise çeşit, ekoloji, ekim zamanı ve diğer tarımsal uygulamalardaki farklılıktan kaynaklandığını düşünülmektedir.

## SONUÇ

Orta Anadolu koşullarında sorgum x sudan otu melezleri için gerekli gün ve GDD değerlerinin belirlenmesi amacıyla iki yıl yürütülen çalışmada iki yılın ortalamasına göre çiçeklenme için gerekli GDD değeri 806.3 – 1113.3 °C aralığında, biçim için gerekli GDD değeri ise 982.7 – 1312 °C aralığında elde edilmiş olup, en erkenci çeşitlerin Forage King ve Sugargraze II, en geççi çeşitlerin ise Tonka ve Greengo çeşitleri olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada su stresinin sorgum x sudan otu melezi çeşitlerinde çiçeklenme ve biçim zamanını geciktirerek biçim zamanını çalışmanın ilk yılında 12 gün ikinci yılında ise 6 gün uzattığı görülmüştür.

Silajlık mısır yetiştiriciliği için yeterli su kaynağı olmayan alanlarda üreticilerin su stresine şartlarına toleranslı olan ve daha az su ile önemli miktarda biyokütle üretme potansiyeline sahip sorgum x sudan otu melezi çeşitlerinin hem tam sulu hem de su stresi koşullarında Orta Anadolu ve benzer şartlara sahip bölgelerde üretebilecekleri bu çalışma sonuçları ile belirlenmiştir.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

## Yazar Katkısı

Yazarlar denemenin yürütülmesi ve yazımı aşamasında eşit oranda katkı vermişlerdir.

## KAYNAKLAR

- Acar R, Akbudak MA, Sade B, 2002. Konya Ekolojik Şartlarında Sorgum x Sudan Otu Melezlerinin Verimleri ile Verimi Etkileyen Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 16:88-95.
- Anonim 2018. Konya Toprak Su ve Çölleşme ile Mücadele Araştırma Enstitüsü Meteoroloji Verileri.
- Aldrich S.R, Scott W, Leng ER, 1982. Modern Corn Production A & L Publications, Illionis.
- Chelho DT, Dale RF, 1980. An Energy Crop Growth Variable and Temperature Function for Predicting Corn Growth and Development: Planting to Silking. Agronomy Journal, 72 :503-510.
- Emeklier HY, 1993. Sıcak İklim Tahılları (Tahıllar II). Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 1296 Yardımcı Ders Kitabı, Ankara, 372.
- Gerik T, Bean BW, Vanderlip R, 2003. Sorghum growth and development. [https://oaktrust.library.tamu.edu/bitstream/handle/1969.1/87184/pdf\\_1724.pdf?sequence=1](https://oaktrust.library.tamu.edu/bitstream/handle/1969.1/87184/pdf_1724.pdf?sequence=1). Erişim tarihi:21.07.2020.
- Giannakopoulos C, Bindi M, Moriondo M, Tin T, 2005. Climate Change Impacts in the Mediterranean Resulting From A 2 °C Global Temperature Rise. A Report for WWF. <https://wwfeu.awsassets.panda.org/downloads/medreportfinal8july05.pdf>. Erişim tarihi: 22.07.2020.
- Gönülal E, Soylu S, 2019. Mısır (*Zea mays* L.) Bitkisinde Farklı Fenolojik Dönemlerdeki Su Kısıntılarının Bazı Tarımsal Özellikler Üzerine Etkileri. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 6: 753–758.
- JMP, 2014. JMP® 11.2, Copyright © 2014, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Keser M, Ekingen H, 1994. Kışlık Buğdayda Dane Doldurma Süresi ve Oranı. Tarla Bitkileri Kongresi, 25-26 Nisan 2020, İzmir.

- Larson KJ, Johnson JJ, Bartolo ME, Jones SM, Pettinger BT, Tanabe KJ, 2018. Sorghum hybrid performance trials in Eastern Colorado. Colorado State Univ. Agricultural Experiment Station Technical Report, 12-15. [https://mountainscholar.org/bitstream/handle/10217/78785/TR\\_13-1.pdf?sequence=1](https://mountainscholar.org/bitstream/handle/10217/78785/TR_13-1.pdf?sequence=1). Erişim tarihi: 22.07.2020.
- Li R, Zhang H, Zhou X, Guan Y, Yao F, Song G, Wang J, Zhang C, 2010. Genetic Diversity in Chinese Sorghum and Races Revealed by Chloroplast Simple Sequence Repeats. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57:1–15.
- Lyons SE, Ketterings QM, Godwin GS, Cherney JH, Cherney DJ, Meisinger JJ, Kilcer TF, 2019. Double-Cropping with Forage Sorghum and Forage Triticale in New York. *Agronomy Journal*, 6:3374-3382.
- Mokhtarı NEP, 2014. Sorghum Melezlerinde Tohumluğa Yapılan Ön Uygulamaların (Priming) Verim ve Verim Ögelerine Etkisi. (PhD), Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi (Basılmış).
- Moosavi SGR, Seghatoleslami MJ, Javadi H, Ansari-nia E, 2011. Effect of Irrigation Intervals and Planting Patterns on Yield and Qualitati Traits of Forage Sorghum. *Advances in Environmental, Biology*, 5(10):3363-3368.
- Rocatelia AC, Raperb RL, Balkcomc KS, Arriagac FJ, Bransbyd DI, 2012. Biomass Sorghum Production and Components under Different Irrigation/Tillage Systems for The Southeastern U.S. *Industrial Crops and Products*,36: 589-598.
- Salman A, Budak B, 2015. Farklı Sorgum X Sudanotu Melezi (*Sorghum bicolorx Sorghum sudanense* Stapf.) Çeşitlerinin Verim ve Verim Özellikleri Üzerine Bir Araştırma. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 12:93- 100.
- Sanchez AC, Subudhi PK, Rosenow DT, Nguyen HT, 2002) Mapping Qtls Associated with Drought Resistance in Sorghum. *Journal of Plant Molekuler Biology*, 48:713–726.
- Soler CMT, Sentelhas PC, Hgoogenboom G, 2005. Thermal Time Forphenological Development of Our Maize Hybrids Grown Off-Season in A Subtropical Environment. *Journal of Agricultural Science*, 143:69–182.
- Srivastava A, Kumar SN, Aggarwal PK, 2010. Assessment on Vulnerability of Sorghum to Climate Change in India. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 138: 160–169.
- Waite J, 2016. Corn and Forage Sorghum Yield and Water Use in Western Kansas, Kansas State University, PhD Thesis (Printed).
- Wannasek L, Ortner M, Amon B, Amon T, 2017. Sorghum, a Sustainable Feed Stock for Biogas Production? Impact of Climate, Variety and Harvesting Time on Maturity and Biomass Yield. *Biomass and Bioenergy*, 106: 137 -145.
- Young JA, Vanceand GF, Zhang R, 2000. Climatic Patterns in the Big Horn Basin, Wyoming. University of Wyoming. Available at [www.uwyo.edu/ces/PUBS/B-1089.pdf](http://www.uwyo.edu/ces/PUBS/B-1089.pdf) 05/03/2004.
- Yüksel O, 2005. Sorghum x Sudanotu Melezinde Farklı Azot Dozu Uygulamalarının Verim ve Bazı Kalite Özelliklerine Etkileri, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi (Basılmış)Isparta, Türkiye.

**Atf İçin:** Çöl Keskin N, Akınerdem F, 2021. Hüyük Asit Uygulamalarının Patates (*Solanum tuberosum* L.) Bitkisinin Gelişimi ve Kalite Özellikleri Üzerine Etkileri. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1559-1567.

**To Cite:** Çöl Keskin N, Akınerdem F, 2021. The Effect of Humic Acid Applications on Growth and Quality Properties of Potato (*Solanum tuberosum* L.). Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1559-1567.

### **The Effect of Humic Acid Applications on Growth and Quality Properties of Potato (*Solanum tuberosum* L.)**

Nursel ÇÖL KESKİN<sup>1\*</sup>, Fikret AKINERDEM<sup>1</sup>

**ABSTRACT:** This study was carried out in Konya Soil, Water and Combating Desertification Research Station in 2015 in order to determine the effect of humic acid applications in different amounts on the development and quality properties of some potato varieties in Konya ecological conditions. Three different potato varieties (Agria, VR808, Brooke) and four different humic acid doses (0, 3, 6, 9 L da<sup>-1</sup>) were used in this study, which was established in three replications according to "The Randomized Complete Block in a Split Plot Design". In the study, large, medium, small, discarded tuber yields per decare, protein content, specific gravity, chips yield, oil holding capacity of chips, dry matter content, starch content were investigated. It was determined that there was a significant increase in humic acid applications in large, medium, small and discarded tuber yields per decare. Oil holding capacity of chips was between 32.9 % and 46.2 %, starch content was between 11.7 % and 17.3 %, and the differences between humic acid applications were found to be statistically significant for these properties. In terms of chips yield and protein content, statistical significance was not determined among the applications. Considering all the properties examined, it was determined that increasing humic acid applications positively affected the yield of large, medium and small discarded tubers per decare and significant variations were obtained among some quality properties of the varieties.

**Keywords:** Humic acid, quality parameters, potato, variety

#### **Hüyük Asit Uygulamalarının Patates (*Solanum tuberosum* L.) Bitkisinin Gelişimi ve Kalite Özellikleri Üzerine Etkileri**

**ÖZET:** Bu araştırma, Konya ekolojik koşullarında bazı patates çeşitlerinin farklı miktarlardaki hüyük asit uygulamalarının bitkinin gelişimi ve kalite özellikleri üzerine etkisini belirlemek amacı ile 2015 yılında Konya Toprak, Su ve Çölleşme ile Mücadele Araştırma İstasyonu Müdürlüğü deneme tarlasında yürütülmüştür. "Tesadüf Blokları Bölünmüş Deneme Deseni"ne göre üç tekerrürlü olarak kurulan bu çalışmada, üç adet farklı patates çeşidi (Agria, VR808, Brooke) ve dört farklı hüyük asit dozu (0, 3, 6, 9 L da<sup>-1</sup>) kullanılmıştır. Çalışmada; dekara büyük, orta, küçük, ıskarta yumru verimleri, protein oranı, özgül ağırlık, cips verimi, cipsin yağ çekme oranı, kuru madde, nişasta oranı incelenmiştir. Dekara büyük, orta, küçük, ıskarta yumru verimlerinde artan hüyük asit uygulamalarında önemli artışlar saptanmıştır. Yağ çekme oranı % 32.9-46.2, nişasta oranı % 11.7-17.3 arasında olup, hüyük asit uygulamaları arasındaki farklılıklar istatistikî düzeyde önemli bulunmuştur. Cips verimi ve protein oranlarında ise uygulamalar arasında istatistikî düzeyde önem tespit edilmemiştir. İncelenen tüm parametreler göz önüne alındığında artan hüyük asit uygulamalarının dekara büyük, orta, küçük ıskarta yumru verimlerini olumlu yönde etkilediği ve çeşitlerin bazı kalite özellikleri arasında da önemli varyasyonlar elde edildiği saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Hüyük asit, kalite parametreleri, patates, çeşit

<sup>1</sup> Nursel ÇÖL KESKİN ([Orcid ID: 0000-0002-0089-8442](https://orcid.org/0000-0002-0089-8442)), Fikret AKINERDEM ([Orcid ID: 0000-0003-3336-6992](https://orcid.org/0000-0003-3336-6992)), Selcuk University, Department of Field Crops, Faculty of Agriculture, Konya, Turkey

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Nursel ÇÖL KESKİN, e-mail: nurselcol@selcuk.edu.tr

This article was produced from a part of Nursel ÇÖL KESKİN's Master Thesis.

## INTRODUCTION

The origin of the potato is known as the highlands of the Andes in South America. It was brought to our country from the Caucasian and Russia and its cultivation started (Gecit et al., 2009). In 2018, 368 million tons of potatoes were produced on 17.5 million hectares of land in the world (Anonymous, 2020a). In our country, in 2019, the potato planting area was recorded as 140 thousand hectares, and the production was close to 5 million tons. In Konya, which is one of the important producer centers in the potato sector of our country, 600 thousand tons of potatoes were produced in 14.3 hectares of planting area in 2019 (Anonymous, 2020b). In addition to being rich in carbohydrates, proteins, vitamins and minerals, its tubers are also used in many industries (chips, mash, frozen products (French fries), flour, alcohol, starch etc.) (Caliskan et al., 2010; Anonymous, 2020c). Improving the soil structure with cultural processes and fertilization practices increases the yield and yield factors for crop production. Due to the damage of intensive chemical fertilization to the environment and living creatures, the tendency towards organic fertilization has increased gradually in recent years. It has been reported in many studies that organic fertilization studies as an alternative to chemical fertilization positively increase the yield and quality of potato plants (Asmaa and Hafez, 2010; Seyedbagheri, 2010; Sanli et al., 2013).

One of the solutions to the organic matter problem in modern agriculture is the direct application of humic acid to the soil or plant. Humic acid and its derivatives are used to increase soil fertility and to grow healthy plants (Akinci, 2011; Celik et al., 2015). Humic acids, on the other hand, can be found in sources such as leonardite, peat, animal manure, and turbines (Akinci, 2011). Humic acids are defined as heterogeneous sources with a high molecular weight and are resistant to deterioration, varying in color from black to yellow, while remaining in the soil for a long time and slowly decomposing become useful to the soil and plant. This usefulness can be listed as providing the aeration of the soil, increasing the Cation Exchange Capacity (CEC), increasing the soil fertility, making the mineral nutrient contents suitable for intake of the plants, protecting the water-soluble inorganic fertilizers and supplying the plant as much as it needs. In addition, chemical fertilizers have positive effects on plants and soil such as minimizing the damage to the soil and plant, increasing the resistance of plants to stress conditions, diseases and pests (Akinci, 2011; Celik et al., 2015). Effects of humic substances on plant growth; it may vary depending on its source, concentration and molecular weight (Nardi et al., 2002). At the same time, humic substances encourage the growth of beneficial microorganisms in the soil thanks to natural carbon (30-36 %) in their bodies, and some types of fungi that are formed as a result of the biological activities of microorganisms in the soil give the plant resistance by producing natural antibiotics (Ozkan, 2007). In potato cultivation, humic acid increases the water conservation of the root area where it is applied, increases the resistance of the plant and provides resistance against diseases (Mosa, 2012).

In potato cultivation, it is important to reduce the excessive and unconscious chemical fertilization and to include humic acid and its derivatives in the production more consciously. Therefore, in the study, it was aimed to determine the effect of different amounts of humic acid applications on plant growth and quality properties in some potato varieties produced widely in Konya region.

## MATERIALS AND METHODS

The climatic values of the means of the year (2015) and long years in which the study was carried out in Konya province were shown in Table 1. According to the 35-year observations made in Konya, the mean temperature was 21.2 °C, the total precipitation was 101.7 mm, the mean temperature for the year the study was conducted (2015) was 21.8 °C, and the total precipitation was 127.1 mm. Accordingly, it was seen that the mean temperature during the study period was higher (Table 1). The

soil of the land where the research was established is loamy in texture, organic matter 1.09 %, inorganic nitrogen 0.04 %, favorable  $P_2O_5$  3 Kg  $da^{-1}$ , suitable  $K_2O$  53.95 Kg  $da^{-1}$  and pH 7.78.

**Table 1.** Climate data for the years in which the research was conducted\*

| Months    | Mean Temperature (°C) |       | Total Precipitation (mm) |       | Mean Relative Humidity (%) |       |
|-----------|-----------------------|-------|--------------------------|-------|----------------------------|-------|
|           | 1980-2014             | 2015  | 1980-2014                | 2015  | 1980-2014                  | 2015  |
| May       | 16.0                  | 17.4  | 42.5                     | 18.2  | 51.9                       | 48.1  |
| June      | 20.5                  | 19.3  | 41.8                     | 40.7  | 47.2                       | 55.8  |
| July      | 25.4                  | 24.4  | 6.2                      | 10.4  | 36.4                       | 37.1  |
| August    | 24.4                  | 25.1  | 3.0                      | 37.8  | 33.8                       | 42.1  |
| September | 19.5                  | 22.9  | 8.2                      | 20.0  | 36.3                       | 39.7  |
| Mean      | 21.2                  | 21.8  | 20.3                     | 25.4  | 34.3                       | 44.6  |
| Total     | 127.0                 | 130.6 | 101.7                    | 127.1 | 205.6                      | 222.8 |

\*It was taken from the Meteorology Journal of the Prime Ministry State Meteorology Affairs General Directorate (1980-2014 = long years mean)

This study, which was carried out in Konya ecological conditions in May-September 2015, was established in three replications according to "The Randomized Complete Block in a Split Plot Design". In the study, three different potato varieties (Agria, VR-808, Brooke) which was from Milva Seed Agriculture Animal Husbandry Transport Food Industry Trade Corporation and Toprak Agriculture Industry Trade Corporation and four different amounts of humic acid application as "Control ( $D_0$ ), 3 L  $da^{-1}$ , ( $D_1$ ), 6 L  $da^{-1}$  ( $D_2$ ), 9 L  $da^{-1}$  ( $D_3$ )" were used. Each sub-parcel of the experiment consists of four rows and each row consists of 15 hills, each harvesting plot was established with a size of 1.4 m x 4.5 m = 6.3  $m^2$ . In the trial area, 0.7 m between the parcels was left, and the blocks were arranged as 1.9 m. Tuber seeds kept under appropriate conditions were planted manually in 70x30 cm hills on May 15, 2015, after tuber seeds spraying with Imidacloprid active ingredient. Four humic acid applications ( $D_0$ ,  $D_1$ ,  $D_2$ ,  $D_3$ ) were randomly distributed to the parcels and 2 L  $da^{-1}$  of water was added to all doses and sprayed on the relevant plots before planting. With planting, compound (NPK) fertilizer (15-15-15) in the form of 6 Kg  $da^{-1}$  nitrogen, 6 Kg  $da^{-1}$  phosphorus, 6 Kg  $da^{-1}$  potassium was calculated and given to each parcel. As top fertilizer, 3 Kg  $da^{-1}$  N was treated in the form of urea with the growth process. Base and top fertilizers were applied as sprinkling and mixed into the soil. The irrigation was carried out by sprinkling and manual hoeing was made against weeds, and disinfestation implementation was made two times with the chemical agent in which effective substance was Azinphos-methyl (25 %) for dealing with The Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). The harvest was done by hand on 20 September 2015 by considering harvesting plots.

The tubers obtained from the harvest plots were classified separately and placed in sacks, then passed through 5.0, 3.5 and 2.8 cm sieves and divided into 4 classes according to their diameter (Ozyildirim, 2014). Dry matter content according to Kacar (1972), protein content according to Kjeldhal method (Kadaster, 1960; Augustin, 1975), specific gravity according to air-water weighing method (Incekara, 1973), starch content according to "Ewers Method" (Anonymous, 1974), chips yield according to the method specified by Senol (1973), oil holding capacity of chips using Soxhlet method (Senol, 1973; Dogan and Basoglu, 1985) were determined.

The data obtained from the study were subjected to variance analysis according to "The Randomized Complete Block in a Split Plot Design" using the "MSTAT-C" statistical program and the differences between the means were determined according to the LSD test.



## RESULTS AND DISCUSSION

Considering the large tuber yield values in the study; Brooke (3149.2 Kg da<sup>-1</sup>) was in the first group (a), followed by Agria (2623.8 Kg da<sup>-1</sup>) and VR808 (2616.3 Kg da<sup>-1</sup>) (b) in the second group. In mean humic acid, large tuber yield increased at all doses compared to D<sub>0</sub>. The values obtained from D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> were in the same group (a). In terms of variety x humic acid interaction; Agria and D<sub>0</sub> group (1964.2 Kg da<sup>-1</sup>) got the lowest value, while Brooke and D<sub>2</sub> group (3366.2 Kg da<sup>-1</sup>) got the highest value.

For medium tuber yield; among the varieties, Agria (1228.9 Kg da<sup>-1</sup>) (a), VR808 (936.5 Kg da<sup>-1</sup>) (b), Brooke (745.6 Kg da<sup>-1</sup>) (c) took place in different groups. Among the mean humic acid; In D<sub>1</sub> (1229.3 Kg da<sup>-1</sup>) (a) it was found to be the most, and the lowest in D<sub>3</sub> (838.5 Kg da<sup>-1</sup>) (c). In terms of variety x humic acid interaction, medium tuber yield showed different responses depending on the humic acid applications and varieties. While D<sub>0</sub> and Brooke (550.4 Kg da<sup>-1</sup>) was the lowest, Agria and D<sub>1</sub> (1474.7 Kg da<sup>-1</sup>) was found to be the highest.

**Table 2.** Mean values of the properties examined in the study and formed groups-1

| Humic Applications  | Large Tuber Yield (Kg da <sup>-1</sup> ) |                           |                           |                | Medium Tuber Yield (Kg da <sup>-1</sup> )  |                          |                           |                |
|---|--|---------------------------|---------------------------|----------------|--|--------------------------|---------------------------|----------------|
|   | Acid                                     |                           |                           | Varieties      | Acid   |                          |                           | Mean           |
|   | V <sub>1</sub>                           | V <sub>2</sub>            | V <sub>3</sub>            |                | V <sub>1</sub>   | V <sub>2</sub>           | V <sub>3</sub>            |                |
| D <sub>0</sub>  | 2182.9 <sup>gh</sup>                     | 2950.3 <sup>de</sup>      | <u>1964.2<sup>h</sup></u> | <b>2365.8c</b> | 1014.1 <sup>c</sup>  | <u>550.4<sup>e</sup></u> | 1320.9 <sup>ab</sup>      | <b>961.8b</b>  |
| D <sub>1</sub>  | 2501.6 <sup>ef</sup>                     | 3135.8 <sup>ab</sup>      | 2312.3 <sup>fg</sup>      | <b>2649.9b</b> | 1151.1 <sup>bc</sup>   | 1062.2 <sup>c</sup>      | <u>1474.7<sup>a</sup></u> | <b>1229.3a</b> |
| D <sub>2</sub>  | 2837.9 <sup>cd</sup>                     | <u>3366.2<sup>a</sup></u> | 3080.9 <sup>b</sup>       | <b>3095.0a</b> | 783.2 <sup>d</sup>   | 670.0 <sup>de</sup>      | 1102.0 <sup>c</sup>       | <b>851.7bc</b> |
| D <sub>3</sub>  | 2942.9 <sup>bc</sup>                     | 3144.3 <sup>ab</sup>      | 3137.7 <sup>ab</sup>      | <b>3075.0a</b> | 797.6 <sup>d</sup>   | 700.0 <sup>de</sup>      | 1018.1 <sup>c</sup>       | <b>838.5c</b>  |
| Mean  | <b>2616.3b</b>                           | <b>3149.2a</b>            | <b>2623.8b</b>            | <b>2796.4</b>  | <b>936.5b</b>  | <b>745.6c</b>            | <b>1228.9a</b>            | <b>970.3</b>   |
| LSD <sub>V</sub> :96.62; LSD <sub>HA</sub> : 134.9; LSD <sub>VXHA</sub> : 233.6 |  |                           |                           |                | LSD <sub>V</sub> : 134.9; LSD <sub>HA</sub> : 111.4; LSD <sub>VXHA</sub> : 192.9 |                          |                           |                |
| Humic Applications  | Small Tuber Yield (Kg da <sup>-1</sup> ) |                           |                           |                | Discarded Tuber Yield (Kg da <sup>-1</sup> )                                     |                          |                           |                |
|   | Acid                                     |                           |                           | Varieties      | Acid   |                          |                           | Mean           |
|   | V <sub>1</sub>                           | V <sub>2</sub>            | V <sub>3</sub>            |                | V <sub>1</sub>   | V <sub>2</sub>           | V <sub>3</sub>            |                |
| D <sub>0</sub>  | 85.1 <sup>d</sup>                        | 83.2 <sup>d</sup>         | <u>235.6<sup>a</sup></u>  | <b>134.6b</b>  | 31.3 <sup>def</sup>  | 13.0 <sup>gh</sup>       | 45.9 <sup>cd</sup>        | <b>30.0c</b>   |
| D <sub>1</sub>  | 148.5 <sup>bc</sup>                      | 134.3 <sup>c</sup>        | 188.7 <sup>b</sup>        | <b>157.2a</b>  | 42.0 <sup>cde</sup>  | 48.5 <sup>c</sup>        | 52.6 <sup>bc</sup>        | <b>47.7b</b>   |
| D <sub>2</sub>  | 88.8 <sup>d</sup>                        | 68.0 <sup>d</sup>         | 185.5 <sup>b</sup>        | <b>114.1b</b>  | 69.3 <sup>ab</sup>   | 19.3 <sup>fgh</sup>      | <u>85.6<sup>a</sup></u>   | <b>58.0a</b>   |
| D <sub>3</sub>  | 74.9 <sup>d</sup>                        | <u>60.8<sup>d</sup></u>   | 127.9 <sup>c</sup>        | <b>87.9c</b>   | <u>6.5<sup>h</sup></u>   | 28.4 <sup>efg</sup>      | 58.9 <sup>bc</sup>        | <b>31.3c</b>   |
| Mean  | <b>99.3b</b>                             | <b>86.6b</b>              | <b>184.4a</b>             | <b>123.4</b>   | <b>37.3b</b>   | <b>27.3b</b>             | <b>60.7a</b>              | <b>41.8</b>    |
| LSD <sub>V</sub> :28.99; LSD <sub>HA</sub> : 22.24; LSD <sub>VXHA</sub> : 38.53 |  |                           |                           |                | LSD <sub>V</sub> :10.58; LSD <sub>HA</sub> :9.771; LSD <sub>VXHA</sub> :16.92    |                          |                           |                |

\*: p ≤ 0.05, \*\*: p ≤ 0.01 (V<sub>1</sub>:VR808, V<sub>2</sub>: Brooke, V<sub>3</sub>: Agria) (V: Variety, HA: Humic acid)

Looking at the small tuber yield; among the varieties, small tuber yield was the highest in the Agria (184.4 Kg da<sup>-1</sup>) (a), followed by VR808 (99.3 Kg da<sup>-1</sup>), Brooke (86.6 Kg da<sup>-1</sup>) (b) in the same group. According to the mean humic acid, D<sub>1</sub> was found to be the most (157.2 Kg da<sup>-1</sup>) (a) and this was followed by D<sub>0</sub> (134.6 Kg da<sup>-1</sup>), D<sub>2</sub> (114.1 Kg da<sup>-1</sup>) (b) in the same group and the lowest yield (c) (87.9 Kg da<sup>-1</sup>) was obtained. While the highest yield was obtained with the combination of Agria and D<sub>0</sub> (235.6 Kg da<sup>-1</sup>) in the variety x humic acid interaction, the Brooke and D<sub>3</sub> (60.8 Kg da<sup>-1</sup>) were in the same group (d) with different combinations with the lowest yield.

When looking at the discarded tuber yield; in the mean of the varieties, Agria (60.7 Kg da<sup>-1</sup>) was the highest (a), VR808 (37.3 Kg da<sup>-1</sup>) followed by Brooke (27.3 Kg da<sup>-1</sup>) and they were in the same group (b). According to the mean of humic acid, D<sub>2</sub> (58.0 Kg da<sup>-1</sup>) (a) was found the most, followed by D<sub>1</sub> (47.7 Kg da<sup>-1</sup>) (b). In D<sub>0</sub> and D<sub>3</sub> (30.0 Kg da<sup>-1</sup> and 31.3 Kg da<sup>-1</sup>) the lowest yields were obtained and they were included in the same group (c). In terms of variety x humic acid interaction, the highest efficiency was obtained from Agria and D<sub>2</sub> (85.6 Kg da<sup>-1</sup>), while yield of VR808 and D<sub>3</sub> (6.5 Kg da<sup>-1</sup>) combination the lowest (Table 2).

The differences between potato varieties, applied humic acid applications and variety x humic acid interaction in terms of chips yield and protein content were not found statistically significant.

The differences between variety, humic acid, variety x humic acid interaction in terms of oil holding capacity of chips were statistically significant at 1 % level. Among the varieties, Agria (42.1 %) (a), Brooke (40.0 %) (b) and VR808 (39.9 %) (c) were ranked in different groups. According to the mean humic acid applications; while the oil holding capacity of chips was determined the most in the D<sub>0</sub> (42.3 %) (a), it was followed by D<sub>2</sub> (41.5 %) (b), D<sub>3</sub> (40.1 %) (c), D<sub>1</sub> (38.7 %) (d), respectively. Variety x humic acid interactions, the highest value was obtained in VR808 and D<sub>0</sub> (46.2 %), while the lowest value was obtained from VR808 and D<sub>1</sub> (32.9 %) (k).

**Table 3.** Mean values of the properties examined in the research and the groups formed-2

| Humic Applications  | Dry Matter Content (%) |                    |                   |                                   | Specific Gravity (g/cm <sup>3</sup> )  |                    |                    |                   |
|---|------------------------|--------------------|-------------------|-----------------------------------|--|--------------------|--------------------|-------------------|
|   | Acid                   |                    | Varieties         |                                   | Acid   |                    | Varieties          |                   |
|   | V <sub>1</sub>         | V <sub>2</sub>     | V <sub>3</sub>    | Mean                              | V <sub>1</sub>   | V <sub>2</sub>     | V <sub>3</sub>     | Mean              |
| D <sub>0</sub>  | 22.9 <sup>a</sup>      | 21.3 <sup>ab</sup> | 16.7 <sup>c</sup> | 20.3                              | 1.090  | 1.100              | 1.083              | 1.091             |
| D <sub>1</sub>  | 21.2 <sup>ab</sup>     | 21.8 <sup>ab</sup> | 19.5 <sup>b</sup> | 20.8                              | 1.090  | 1.090              | 1.070              | 1.083             |
| D <sub>2</sub>  | 21.7 <sup>ab</sup>     | 22.2 <sup>a</sup>  | 15.2 <sup>c</sup> | 19.7                              | 1.093  | 1.090              | 1.070              | 1.084             |
| D <sub>3</sub>  | 21.4 <sup>ab</sup>     | 22.3 <sup>a</sup>  | 16.6 <sup>c</sup> | 20.1                              | 1.090  | 1.100              | 1.077              | 1.089             |
| Mean  | 21.8 <sup>a</sup>      | 21.9 <sup>a</sup>  | 17.0 <sup>b</sup> | 20.2                              | 1.091 <sup>a</sup>   | 1.095 <sup>a</sup> | 1.075 <sup>b</sup> | 1.087             |
| LSD <sub>V</sub> :4.107; LSD <sub>VXHA</sub> : 2.311                                |                        |                    |                   |                                   | LSD <sub>V</sub> : 0.1281  |                    |                    |                   |
| Starch Content (%)  |                        |                    |                   | Protein Content (%)               |  |                    |                    |                   |
| D <sub>0</sub>  | 15.3 <sup>d</sup>      | 17.1 <sup>ab</sup> | 14.4 <sup>e</sup> | 15.6 <sup>a</sup>                 | 11.8   | 12.8               | 12.4               | 12.3              |
| D <sub>1</sub>  | 15.4 <sup>d</sup>      | 17.0 <sup>ab</sup> | 12.1 <sup>g</sup> | 14.8 <sup>b</sup>                 | 11.9   | 10.5               | 13.8               | 12.1              |
| D <sub>2</sub>  | 16.5 <sup>bc</sup>     | 15.7 <sup>cd</sup> | 11.7 <sup>g</sup> | 14.6 <sup>b</sup>                 | 11.3   | 12.1               | 12.1               | 11.9              |
| D <sub>3</sub>  | 16.2 <sup>c</sup>      | 17.3 <sup>a</sup>  | 13.2 <sup>f</sup> | 15.6 <sup>a</sup>                 | 11.2   | 11.7               | 10.9               | 11.3              |
| Mean  | 15.8 <sup>b</sup>      | 16.8 <sup>a</sup>  | 12.8 <sup>c</sup> | 15.2                              | 11.5   | 11.8               | 12.3               | 11.9              |
| LSD <sub>V</sub> : 0.9266; LSD <sub>HA</sub> : 0.4312; LSD <sub>VXHA</sub> : 0.7469 |                        |                    |                   |                                   |  |                    |                    |                   |
| Chips Yield (%)   |                        |                    |                   | Oil Holding Capacity of Chips (%) |  |                    |                    |                   |
| D <sub>0</sub>  | 51.6                   | 53.6               | 35.2              | 46.8                              | 46.2 <sup>a</sup>  | 41.0 <sup>d</sup>  | 39.7 <sup>g</sup>  | 42.3 <sup>a</sup> |
| D <sub>1</sub>  | 50.5                   | 46.3               | 43.0              | 46.6                              | 32.9 <sup>k</sup>  | 38.9 <sup>j</sup>  | 44.5 <sup>c</sup>  | 38.7 <sup>d</sup> |
| D <sub>2</sub>  | 49.8                   | 50.5               | 41.9              | 47.4                              | 39.4 <sup>h</sup>  | 39.9 <sup>f</sup>  | 45.3 <sup>b</sup>  | 41.5 <sup>b</sup> |
| D <sub>3</sub>  | 50.0                   | 50.8               | 39.2              | 46.7                              | 41.0 <sup>d</sup>  | 40.1 <sup>e</sup>  | 39.1 <sup>i</sup>  | 40.1 <sup>c</sup> |
| Mean  | 50.5                   | 50.3               | 39.8              | 46.9                              | 39.9 <sup>c</sup>  | 40.0 <sup>b</sup>  | 42.1 <sup>a</sup>  | 40.7              |
|   |                        |                    |                   |                                   | LSD <sub>V</sub> :0.05944; LSD <sub>HA</sub> :0.06068; LSD <sub>VXHA</sub> :0.1051 |                    |                    |                   |

\* : p ≤ 0.05, \*\* : p ≤ 0.01 (Ç<sub>1</sub>:VR808, Ç<sub>2</sub>: Brooke, Ç<sub>3</sub>: Agria) (V: Variety, HA: Humic acid)

The difference between the variety and variety x humic acid interaction in terms of dry matter content was found statistically significant at the level of 5 %. Brooke and VR808 were in the same group (a) (21.9 % and 21.8 %, respectively) and Agria (b) in the second group (17.0 %) in terms of dry matter content among the variety means. Looking at the interactions of variety x humic acid, Brooke and VR808 varieties were found in (a) and (ab) group in all humic acid applications, while the lowest dry matter content was obtained from Agria variety and D<sub>0</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> humic acid applications (16.7 %, 16.6 %, 15.2 %).

Differences between varieties in terms of specific gravity were found statistically significant at 1 % level. According to the variety means, VR808 and Brooke (1.091 and 1.095 g/cm<sup>3</sup>) were in the same group (a), followed by Agria (1.075 g/cm<sup>3</sup>) (b). The reactions of the varieties to all applications were

different, when evaluated numerically, the highest value was determined from Brooke and D<sub>0</sub>-D<sub>3</sub> combination (1.100 g/cm<sup>3</sup>), and the lowest value was determined from Agria and D<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> combinations (1.070 g/cm<sup>3</sup>).

In terms of starch content, the differences between variety, humic acid, variety x humic acid interactions were found statistically significant at 1 % level. Among the mean varieties, Brooke (16.8 %) (a), VR808 (15.8 %) (b) and Agria (12.8 %) (c) were in different groups. In humic acid means, starch content were the highest in D<sub>3</sub> and D<sub>0</sub> (15.6 %) (a), followed by D<sub>1</sub> (14.8 %) and D<sub>2</sub> (14.6 %) (b), which are in the same group, respectively. In the variety x humic acid interactions, the responses of the varieties were different in terms of starch content. A significant increase was obtained from the combination of VR808 and D<sub>2</sub> compared to D<sub>0</sub> and D<sub>1</sub>. While the Brooke had high starch content in all doses except from D<sub>2</sub>, the lowest starch content was recorded in Agria and D<sub>2</sub> and D<sub>1</sub> (11.7 % and 12.1 %). The highest starch content was obtained from the Brooke and D<sub>3</sub> combination (17.3 %) (Table 3).

**Table 4.** The mean square values of all traits examined in potato varieties grown at different humic acid doses

| Source of variation  | Df | Large Tuber Yield (Kg da <sup>-1</sup> ) | Medium Tuber Yield (Kg da <sup>-1</sup> ) | Small Tuber Yield (Kg da <sup>-1</sup> ) | Discarded Tuber Yield (Kg da <sup>-1</sup> ) | Dry Matter Content (%)            |
|----------------------|----|--|---|--|--|-----------------------------------|
| Blocks               | 2  | 9847.245                                 | 13549.656                                 | 300.105                                  | 52.437                                       | 5.315                             |
| Varieties (A)        | 2  | 1120060.379**                            | 711283.924**                              | 33930.559**                              | 3543.752**                                   | 93.128*                           |
| Error <sub>1</sub>   | 4  | 2642.178                                 | 5153.175                                  | 237.851                                  | 31.672                                       | 13.128                            |
| Humic Acid Doses (B) | 3  | 1121018.493**                            | 295849.812**                              | 7841.548**                               | 1644.589**                                   | 1.910                             |
| (A x B) Int.         | 6  | 163895.711**                             | 37305.981**                               | 2304.480**                               | 1006.582**                                   | 5.095*                            |
| Error <sub>2</sub>   | 18 | 9383.159                                 | 6739.519                                  | 268.713                                  | 51.854                                       | 1.815                             |
| Source of variation  | Df | Specific Gravity (g/cm <sup>3</sup> )    | Starch Content (%)                        | Protein Content (%)                      | Chips Yield (%)                              | Oil Holding Capacity of Chips (%) |
| Blocks               | 2  | 0.000                                    | 0.381                                     | 2.111                                    | 59.864                                       | 0.005                             |
| Varieties (A)        | 2  | 0.001**                                  | 50.548**                                  | 4.148                                    | 447.890                                      | 19.590**                          |
| Error <sub>1</sub>   | 4  | 0.000                                    | 0.243                                     | 1.769                                    | 89.998                                       | 0.001                             |
| Humic Acid Doses (B) | 3  | 0.000                                    | 2.190**                                   | 1.769                                    | 1.059  | 22.159**                          |
| (A x B) Int.         | 6  | 0.000                                    | 2.373**                                   | 2.788                                    | 31.976                                       | 50.651**                          |
| Error <sub>2</sub>   | 18 | 0.000                                    | 0.101                                     | 2.793                                    | 23.192                                       | 0.002                             |

Df: degrees of freedom; \* P<0.05; \*\* P<0.01

## CONCLUSION

Suh et al. (2014), in their studies on the development and quality of fulvic and humic acids, reported that the effect of humic and fulvic acid applications on tuber sizes was irregular and that there was a slight increase in yield in some applications, but this was not statistically significant. Sanli et al. (2013) found that the marketable tuber yield increased compared to the control, and the highest marketable tuber yield was obtained from 400 and 600 Kg ha<sup>-1</sup> leonardite applications according to the two-year results. In these studies, our study was in agreement with the findings that there is a general increase in large, medium, small, discarded tuber yields per decare, but this increase does not show a regular distribution. At the same time, the different ratios of medium-sized tubers in the varieties taken to the study were due to the different responses of the varieties to environmental and ecological conditions, as well as the different total growth duration of the varieties. It has also been reported by (Selim et al., 2009; Asmaa and Hafez, 2010).

Chips yield depends on tuber specific gravity and dry matter content. The chemical composition of potato tubers also varies according to the variety, growth period, ecological conditions and cultivation techniques (Senol, 1973; Karadogan and Gunel, 1992; Polat et al., 2008). In this study, although the varieties showed deviations, the chips productivity of the variety with high specific gravity was also high. A high value was obtained from the chips yield of the VR808, which was a high specific gravity. This situation also explained the different reactions of each variety to humic acid as a result of our study. At the same time, the chips yield of the varieties with low dry matter ratio were low, the water loss during frying in the varieties with high dry matter content caused the chips yield to be high (Sanli et al., 2013). The findings of the researchers in this direction are in agreement with our results.

The fact that chips absorb less oil is important in terms of both health and cost (Ozyildirim, 2014). There is a negative correlation between dry matter content and oil holding capacity of chips (Abong et al., 2009). This situation also explained that the chips in our study differed between applications in terms of the oil holding capacity of chips. The oil holding capacity of chips of varieties varied irregularly in terms of different humic acid applications.

The most important issue in potato cultivation is tuber quality, which is particularly related to dry matter content and protein content. At the same time, environmental factors, growing different varieties in the same environment, planting time, control program, ripening conditions before harvest, applied fertilizer dosage, form and application method, storage period and method directly affect the main factors forming the tuber and food value (Karadogan and Oral, 1995; Senol, 1973). This situation also explained the different reactions of each variety to humic acid as a result of our research.

It was reported by Karadogan and Gunel (1992) and Karadogan (1994) that there was a negative correlation between tuber dry matter ratio and specific gravity and protein ratio. Sanli et al. (2013), in their study with leonardite, concluded that the specific gravity did not make a significant difference in statistical terms, which was in parallel with this study.

Suh et al. (2014) found that the rate of humic and fulvic acid increased in the starch content compared to the control group and that the difference between starch contents in all applications was not statistically significant. In this study, our study was in agreement with the findings. The differences that tubers show in terms of protein content are due to the genetic structure of the varieties (Kara and Kara, 2016). In potato varieties, protein content are thought to be due to their genetic structure and the decrease in some applications is due to dry matter content. Because protein is a component of tuber dry matter content and the increase in the amount of dry matter content increases the protein value proportionally. At the same time, the protein content of the varieties with high tuber specific gravity are low (Karadogan and Gunel, 1992; Karadogan, 1994). This situation also explained the different responses of each variety to humic acid as a result of our study.

According to the results of the study, it can be concluded that increasing humic acid applications positively affect all large, medium, small, discarded tuber yield and some quality components, while determining the differences between varieties in terms of properties examined. Different results were obtained from humic acid applications, and significant increases were achieved in humic acid applications, which increased the yield of large, medium, small and discarded tubers. Considering the yields of large and medium tubers considered as marketable tuber yield per decare, Brooke variety (in large tuber yield with 3149.2 Kg da<sup>-1</sup>) and Agria variety (medium tuber yield with 1228.9 Kg da<sup>-1</sup>) can be recommended under Konya conditions. As for the humic acid dosage, although the reactions of the varieties to the applications of different amounts of humic acid are irregular, it was seen that the highest yield was obtained in the large tuber yield of the Brooke variety (3366.2 Kg da<sup>-1</sup>) in the application of 6

L humic acid application per decare. Although certain results were obtained in this one-year study, more research and especially multi-year studies were needed for clearer and more reliable results.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The thesis study was supported by OYP allowances numbered as 2015 - OYP - 080; and also, we would like to thank the authorities and our coordinator who provided us this opportunity.

## Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

## Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

## REFERENCES

- Abong GO, Okoth MW, Karuri EG, Kabira JN, Mathooko FM, 2009. Influence of potato cultivar and stage of maturity on oil content of French fries (chips) made from eight Kenyan potato cultivars. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 9(8).
- Augustin J, 1975. Variations in the nutritional composition of fresh potatoes, *Journal of Food Science*, 40 (6): 1295-1299. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1975.tb01076.x>
- Akinci Ş, 2011. Humic acids, plant growth and nutrient uptake, *Marmara University Journal of Science*, 23 (1): 46-56.
- Anonymous, 1974. Analytical Methods for Potato Research. No:A-6, The Inst. Res. On Storage and Process. Agrich Pred.
- Anonymous, 2020a, FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> Accessed: 01.08.2020.
- Anonymous, 2020b, TÜİK. <http://www.tuik.gov.tr/Start.do> Accessed: 01.08.2020.
- Anonymous, 2020c, Self Nutrition Data. <http://www.nutritiondata.com/facts/vegetables-and-vegetableproducts/2770/> Accessed: 05.08.2020.
- Asmaa RM, Hafez MM, 2010. Increasing productivity of potato plants (*Solanum tuberosum* L.) by using potassium fertilizer and humic acid application. *Int. J. Acad. Res.* 2:83-88.
- Caliskan ME, Onaran H, Arioglu H, 2010. Overview of the Turkish potato sector: challenges, achievements and expectations. *Potato Research*, 53(4): 255-266. doi: 10.1007/s11540-010-9170-1.
- Celik M, Yildirim M, Yildirim Z, 2015. Potato proteins, *Ömer Halisdemir University Journal of Engineering Faculty*, 4 (2): 68-77.
- Dogan A, Basoglu F, 1985. Cooking vegetable oil chemistry and technology application guide, Ankara University Agricultural Faculty Course Publications, 951.
- Gecit H, Ciftci C, Emeklier Y, İkinçikarakaya S, Adak M, Kolsarici Ö, Ekiz H, Altinok S, Sancak C, , Sevimay C, 2009. Field Crops, Ankara University Agricultural Faculty Course Publications (1569).
- Incekara F, 1973. Industrial Crops and Breeding. Starch Sugar Plants and Breeding. Ege University Agricultural Faculty Course Publications, (101).
- Kacar B, 1972. Chemical analysis of plants and soil. II. Plant analysis. Ankara University Agricultural Faculty Course Publications, 453: 50-72.
- Kadaster I, 1960. Agricultural Chemistry Application, Forage Crops -I. Ankara University Agricultural Faculty Course Publications, 113.
- Kara K, Kara T, 2016. Quality Characteristics of Some Registered Potato Varieties in Erzurum Ecological Conditions, *Journal of the Faculty of Agriculture*, 47 (2):85-88.
- Karadogan T, Gunel E, 1992. An Experiment on The Yield And Adaptation Some Potatoes under Ecological Condition in Erzurum, *Journal of the Faculty of Agriculture*, 23: 1-15.
- Karadogan T, 1994. A Study on Chips and French-Fried Quality Of Potato Cultivars, *Journal of the Faculty of Agriculture*, 25 (1): 30-38.
- Karadogan T, Oral E, 1995. Effect of Nitrogen Source and Application Times on Quality of Potatoes, *Journal of the Faculty of Agriculture*, 26 (1).
- Mosa AA, 2012. Effect of the application of humic substances on yield, quality, and nutrient content of potato tubers in Egypt. In *Sustainable Potato Production: Global Case Studies* (pp. 471-492). Springer, Dordrecht.

- Nardi S, Pizzeghello D, Muscolo A, , Vianello A, 2002. Physiological effects of humic substances on higher plants, *Soil Biology and Biochemistry*, 34 (11): 1527-1536.
- Ozkan S, 2007. Production of humic acid and fertilizer from Turkish lignites, Ankara University Graduate School of Natural and Applied Sciences, Master Thesis (Printed).
- Ozyildirim N, 2014. Effects of nitrogen fertilizer forms on yielded and yielded components of potato (*Solanum tuberosum* L.) genotypes of different maturity group, Ankara University Graduate School of Natural and Applied Sciences, Master Thesis (Printed).
- Polat T, Ozturk,E, Kavurmaci Z, , Kara K, 2008. Determination of Some Quality Properties of Potato Cultivars under Erzurum Ecological Conditions, *Alinteri Journal of Agriculture Science*, 15 (2): 33-39.
- Selim EM, El-Neklawy AS, El-Ashry SM, 2009. Beneficial effects of humic substances fertigation on soil fertility to potato grown on sandy soil. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 3:4351-4358.
- Seyedbagheri MM, 2010. Influence of humic products on soil health and potato production, *Potato research*, 53 (4): 341-349.
- Smith O, 1968. Potatoes: production, storing, processing, Potatoes: production, storing, processing.
- Suh, H. Y, Yoo KS , Suh SG, 2014. Tuber growth and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.) as affected by foliar or soil application of fulvic and humic acids, *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 55 (3): 183-189.
- Sanli A, Karadogan T, Tonguc M, 2013. Effects of leonardite applications on yield and some quality parameters of potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Turkish Journal of Field Crops*, 18(1): 20-26.
- Senol S, 1973. Effect of temperature, duration, tuber specific gravity and variety feature on sugar, dry matter and chips quality in potato storage, Atatürk University Agricultural Faculty Course Publications,159.

**Atıf İçin:** Keskin B, Temel S, Eren B, 2021. İğdir Ekolojik Şartlarında Bazı Yonca (*Medicago sativa* L.) Çeşitlerinin Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. İğdir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1568-1581.

**To Cite:** Keskin B, Temel S, Eren B, 2021. Determination of Quality Characteristics of Some Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Varieties in İğdir Ecological Conditions. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1568-1581.

### **İğdir Ekolojik Şartlarında Bazı Yonca (*Medicago sativa* L.) Çeşitlerinin Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi**

Bilal KESKİN<sup>1\*</sup>, Süleyman TEMEL<sup>1</sup>, Barış EREN<sup>2</sup>

**ÖZET:** Araştırma, tescil edilmiş 18 çeşit ve 1 yerel genotip olmak üzere toplam 19 çeşidin İğdir ekolojik şartlarında 2017, 2018 ve 2019 yıllarındaki yem kalite özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Çalışma İğdir Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezine ait sulu deneme sahasında tesadüf blokları deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Bu çalışmada Başbağ, Gea, Elçi, Kayseri, May İside, Magna 601, Savaş, Ezzeline, Magnum V, La Bella, Giulia, Plato, La Torre, Prosementi, Queen, Bilensoy 80, Emiliano, Sunter ve Gacer (yerel genotip) yonca çeşitlerinin ham protein oranı (HP), asit çözücülerde çözünemeyen lignin (ADL), nötr çözücülerde çözünemeyen lif (NDF), asit çözücülerde çözünemeyen lif (ADF), kuru madde sindirilebilirliği (KMS), kuru madde tüketimi (KMT), sindirilebilir enerji (SE), metabolik enerji (ME) ve nispi yem değeri (NYD) belirlenmiştir. Üç yıllık ortalamaya göre yonca çeşitlerinin HP oranları %16.9 ile %22.0, ADL oranları %6.88 ile %9.81, NDF oranları %39.4 ile %42.9, ADF oranları %28.1 ile %31.9, KMS oranları %64.1 ile %67.0, KMT oranları %2.82 ile %3.06, SE miktarları 3.01 ile 3.14 Mcal kg<sup>-1</sup>, ME miktarları 2.47 ile 2.58 Mcal kg<sup>-1</sup> ve NYD değerleri 141.2 ile 156.8 arasında değiştiği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Besin içeriği, *Medicago sativa*, NDF, ADF, ADL, ham protein

#### **Determination of Quality Characteristics of Some Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Varieties in İğdir Ecological Conditions**

**ABSTRACT:** The research was carried out to determine the feed quality characteristics of 19 varieties, 18 registered varieties and 1 local variety, under İğdir ecological conditions in 2017, 2018 and 2019. Experiment were set up with 3 replications according to randomized complete block design in the wet trial field of İğdir University Agricultural Research and Application Center. In this research, crude protein content (CP), acid detergent lignin (ADL), neutral detergent fiber (NDF) rate, acid detergent fiber (ADF) rate, dry matter digestibility (DMD), dry matter intake (DMI) rate, digestible energy (SE), metabolic energy (ME) and relative feed value (RFV) of Başbağ, Gea, Elçi, Kayseri, May İside, Magna 601, Savaş, Ezzeline, Magnum V, La Bella, Giulia, Plato, La Torre, Prosementi, Queen, Bilensoy 80, Emiliano, Sunter and Gacer (local variety) alfalfa varieties were determined. According to the three-year average, the CP rates of alfalfa varieties are 16.9% and 22.0%, ADL rates 6.88% and 9.81%, NDF rates 39.4% and 42.9%, ADF rates 28.1% and 31.9%, DMD rates 64.1% and 67.0%, DMI rates 2.82% with 3.06%, DE amounts between 3.01 and 3.14 Mcal kg<sup>-1</sup>, ME amounts between 2.47 and 2.58 Mcal kg<sup>-1</sup> and RFV values between 141.2 and 156.8.

**Keywords:** Nutritional content, Alfalfa, NDF, ADF, ADL, crude protein

<sup>1</sup> Bilal KESKİN ([Orcid ID: 0000-0001-6826-9768](https://orcid.org/0000-0001-6826-9768)), Süleyman TEMEL ([Orcid ID: 0000-0001-9334-8601](https://orcid.org/0000-0001-9334-8601)), İğdir Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, İğdir, Türkiye

<sup>2</sup> Barış EREN ([Orcid ID: 0000-0002-3852-6476](https://orcid.org/0000-0002-3852-6476)), İğdir Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, İğdir Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Bilal KESKİN, e-mail: bilalkeskin66@yahoo.com

## GİRİŞ

Baklagil yem bitkileri hayvanların günlük gereksinim duydukları protein ihtiyacının karşılanmasında önemli yeri olan kaliteli kaba yem kaynağı durumundadır. Dünya nüfusundaki artışa paralel olarak insan ve hayvan beslenmesinde baklagillerin önemi sürekli artmaktadır (Kaçar ve ark, 2005). Baklagiller ülkemizde hayvan beslemede en fazla kullanılan yem bitkilerindedir. Bu familya içerisine giren türler hayvan beslemenin yanında toprakların verimliliğinin artırmada ve toprağa azot kazandırmasında da katkı sağlamaktadır (Shultze and Kondorosi, 1998; Ferber, 1999; Açıkgöz, 2001; Graham and Vance, 2003; Suzan, 2008). Ülkemizde baklagil familyasına ait yem bitkilerinden yonca (*Medicago sativa.*), fiğ (*Vicia sativa*), bezelye (*Pisum arvense*) ve çayır üçgülü (*Trifolium pratense*) gibi türlerin yetiştiriciliği oldukça yaygındır.. Bu terlerden Dünya’da ve Türkiye’de en fazla öneme sahip ve aynı zamanda en çok yetiştirilen yem bitkisi yonca’dır.

Yonca bitkisi farklı iklim ve toprak şartlarına uyum gösteren, hayvan beslemede yaş ot, kuru ot ve silaj yapılarak kullanılabilen, toprağın derinlerine inebilen kök sistemine sahip olması nedeniyle ihtiyaç duyduğu su ve besin maddelerine rahatlıkla ulaşabilen ve hayvan besleme değeri yüksek olan, aşırı olmayan tuzlu topraklarda verim ve kalitesinde önemli kayıplar olmadan yetiştirilecek bir bitkidir (Sağlamtimur ve ark., 1990; Açıkgöz, 2001; Avcıoğlu ve ark., 2009; Temel ve ark., 2016; Keskin ve ark., 2020).

Yonca'nın ham protein içeriği bitkinin genç döneminden olgunlaşmanın ileri dönemlerine kadar değişmekle birlikte %9.9 ile %23.3 oranında ham protein içeriğine sahip olduğu bildirilmiştir (Açıkgöz, 1995). Hayvan beslemede kaliteli kaba yem kullanılması hayvanların verim güçlerinin iyileşmesine ve beslenmeye bağlı birçok hasatlıkların önlenmesine önemli katkı sağlamaktadır (Alçiçek ve ark.1999, Alçiçek 2002). Bu nedenle hayvan beslemede kullanılan bitkilerin yem kalite özelliklerinin ortaya konulması önem arz etmektedir. İğdır ilinde halkın en önemli geçim kaynağı hayvancılıktır. Ancak yem bitkisi yetiştiriciliği ve yem bitkilerinin kalite özellikleri üzerine bilimsel çalışmalar yapılmamıştır.

Yapısal karbonhidratlardan NDF ve ADF içerikleri kaba yemlerde bulunması ruminant hayvanların yemden yararlanma oranını artırmakta, hayvanların rumenlerinin daha sağlıklı çalışmasına neden olmakta ve ayrıca tükürük salgısını artırması sonucu bakteri ve protozoa gibi mikrobiyal sindirimde görev alan mikroorganizmaların faaliyetini artırarak birçok metabolik hastalıkların önlenmesine yardımcı olmaktadır (Tekçe ve Gül, 2014). Ruminant hayvanlar yemlerin yapısında yer alan selüloz, hemiselüloz ve pektin gibi yapısal karbonhidratları rumenlerinde bulunan bakteriler sayesinde fermente etmekte ve bu fermentasyon büyük ölçüde yemlerde bulunan NDF ve ADF miktarlarına göre değişmektedir (Van soest, 1994). Yemlerdeki NDF ve ADF miktarlarına bağlı olarak ruminant hayvanların rumenlerinde gerçekleşen bu fermentasyon, hayvanların verim ve sağlığı üzerine olumlu katkıları olmaktadır (Tilley ve Terry, 1963). Hayvanlar tarafından yemin sindirilebilmesi ve hayvansal ürüne dönüştürmesi yemin kalitesine bağlıdır (Van Soest, 1994). NDF ve ADF değerlerinden yararlanılarak belirlenen NYD değeri yonca bitkisi için 100 olarak kabul edilmektedir. NYD değerinin yüksek olması yemin değerini artırmakta, düşük olması ise yemin değerinin düşmesine neden olmaktadır (Ball et al., 1996; Redfearn ve ark. 2006).

Bu araştırma 18 yonca çeşidi ve 1 yerel yonca çeşidinin İğdır ekolojik şartlarındaki hayvan besleme yönünden önemli olan HP, ADL, NDF, ADF, KMS, KMT, SE, ME ve NYD gibi kalite değerleri belirlenmiştir. Bölgede yonca yetiştiriciliği yapılmasına rağmen hangi çeşitlerin kalite yönünden daha yüksek değere sahip olduğu bu araştırma ile belirlenmiş olunacaktır.



## MATERYAL VE YÖNTEM

Deneme İğdir Üniversitesi Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezine bağlı araştırma alanında 2017-2019 yıllarında üç (3) yıl süreyle tesadüf blokları deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur.

Denemenin kurulduğu bölgeye ait iklim değerleri incelendiğinde, uzun yıllara göre toplam yağış miktarının 266.3 mm, ortalama sıcaklık 12.4 °C, ve nisbi nem %54.6 olarak kaydedilmiştir. Araştırmanın yürütüldüğü 2017, 2018 ve 2019 yıllarındaki toplam yağış sırasıyla 220.8, 280.0 ve 158.4 mm, ortalama sıcaklık 12.4 °C, 15.1 °C ve 14.0 °C, nisbi nem ise %58.4, %60.0 ve %57.3 olarak ölçülmüştür (Çizelge 1).

Araştırma alanındaki topraklar organik içeriği düşük, az tuzlu, orta alkali, kireç içeriği yüksek olduğu görülmüştür (Çizelge 2).

**Çizelge 1.** Denemenin yürütüldüğü bölgeye ait iklim verileri (Anonim, 2019).

| İklim verileri         | Yıllar    |           |           | Uzun Yıllar         |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|---------------------|
|                        | 2017 yılı | 2018 yılı | 2019 yılı | (1978-2017 yılları) |
| Ortalama Sıcaklık (°C) | 12.4      | 15.1      | 14.0      | 12.4                |
| Toplam Yağış (mm)      | 220.8     | 280.0     | 158.4     | 266.3               |
| Ortalama Nispi Nem (%) | 58.4      | 60.0      | 57.3      | 54.6                |

**Çizelge 2.** Araştırmanın yürütüldüğü topraklara ait bazı özellikler.

| pH   | Kireç % | EC (mS/cm) | Organik Madde % | P (ppm) | K (ppm) | Ca (ppm) | Mg (ppm) |
|------|---------|------------|-----------------|---------|---------|----------|----------|
| 8,45 | 10,7    | 1.43       | 1.06            | 2.29    | 1.66    | 15       | 6.2      |

Araştırmada 18 tescilli yonca çeşidi ile 1 adet yerel yonca genotipi olan Gacer yoncası kullanılmıştır. Denemede Başbağ, Kayseri, Gea, Elçi, Magna 601, İside, Savaş, Magnum V, Ezzeline, La Bella, Plato, Giulia, Prosementi, La Torre, Bilensoy 80, Queen, Sunter Emiliano, ve Gacer çeşitleri kullanılmıştır. Çeşitlere standart olarak dekara 4 kg saf azot (%21'lik Amonyum sülfat) ve 8 kg saf fosfor (%46'lık Triple süper fosfat) gübresi uygulanmıştır. Denemede %10 çiçeklenme döneminde yıl içerisinde her biçimde yonca parsellerinden 1'er kg örnek alınarak önce gölgede, daha sonra 70 °C'ye ayarlı kurutma fırınında ağırlıkları sabitleşinceye kadar kurtulmuş ve 1 mm elek çapına sahip değirmende öğütülmüştür. Her biçimdeki öğütülmüş örnekler karıştırılarak yem analizine hazır hale getirilmiştir.

Öğütülen yonca örnekleri üzerinde yem kalite özellikleri belirlenmiştir. Mikro Kjeldahl metoduna göre belirlenen toplam azot oranı 6.25 katsayısı ile çarpılarak ham protein oranları belirlenmiştir (AOAC, 1998). NDF ve ADF oranları Ankom Fiber analiz cihazında Van Soest et al., (1991) tarafından önerilen metot kullanılarak belirlenmiştir. KMS oranı Sheaffer et al. (1995) tarafından belirlenen formüle ( $KMS = (88.9 - (0.779 \times ADF))$ ) göre hesaplanmıştır. KMT oranı (Sheaffer et al. 1995) tarafından belirlenen formüle ( $KMT = 120 / NDF$ ) göre hesaplanmıştır. SE miktarı Fonnesebeck et. al. (1984) tarafından geliştirilen eşitliğe ( $SE = 0.27 + 0,0428 \times KMS$ ) göre hesaplanmıştır. ME miktarı Khalil et al. (1986) tarafından belirlenen formüle ( $ME = 0.821 \times SE$ ) göre hesaplanmıştır. NYD Sheaffer et al. (1995) tarafından belirlenen formüle ( $NYD = (KMS \times KMT) / 1.29$ ) göre hesaplanmıştır.

Yonca çeşitlerinin yem kalite verileri SPSS 17.0 istatistik paket programında varyans analizine tabii tutulmuş ve önemli çıkan parametreler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre gruplandırılması yapılmıştır (SPSS 2008).

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Ham Protein (HP) Oranı

İğdir ekolojik şartlarında 2017, 2018 ve 2019 yıllarında denemeye alınan 19 yonca genotipine ait ham protein değerleri Çizelge 3’de verilmiştir. Çizelge 3 incelendiğinde denemenin yürütüldüğü her üç yılda ve üç yıllık ortalama ham protein oranlarının çeşitlere göre önemli miktarda değiştiği belirlenmiştir. Ham protein oranları 2017 (tesis yılı) yılında %17.0 ile %24.1, 2018 yılında %17.2 ile %24.5, 2019 yılında %15.5 ile %18.8 ve üç yıllık ortalama ise %16.9 ile %22.0 arasında olduğu tespit edilmiştir. Çeşitlerin ortalamasına göre, denemenin üçüncü yılındaki (2019 yılı) ham protein değerleri tesis yılına ve 2018 yılına göre daha düşük elde edilmiştir. En yüksek ham protein oranları 2017 ve üç yıllık ortalama göre Magna 601 çeşidinde, 2018 yılında Magna 601 ve Sunter çeşitlerinde, 2019 yılında ise Savaş çeşidinde belirlenmiştir. En düşük ham protein oranları ise, 2017, 2018 ve üç yıllık ortalama göre Başbağ çeşidinde, 2019 yılında ise Gea ve Kayseri çeşitlerinde elde edilmiştir. Araştırmanın yürütüldüğü yıllardaki iklim verilerinin (Çizelge 1) farklılık göstermesi ve kullanılan çeşitlerin farklı özelliklere sahip olması hem yıllar hem de çeşitler arasında ham protein içeriğinin önemli derecede farklı çıkmasına neden olduğu düşünülmektedir.

Farklı ekolojik şartlarda ve farklı yonca çeşitleri üzerine yapılan çalışmalarda yoncanın ham protein oranları %21.4 (Horner ve ark., 1985), %15-25 (Altınok ve Karakaya, 2002), %11.2-13.4 (Karlı ve ark., 2002), %20.3 (Kanani ve ark., 2006), %19.95-26.06 (Tucak ve ark., 2008), %17.3-19.0 (Katić ve ark., 2009), %17.3-21.7 Stanaćev ve ark., 2010), %21.31-25.35 (Monirifar, 2011), %13.5-17.7 (Çaçan ve ark., 2012), %14,10-18,69 (Albayrak ve ark., 2014), %18.15-19.56 Geleti ve ark., 2014), %18.05 (Ünalp, 2014), %17.8 (Gündel ve ark., 2014), %19.42-23.04 (Aydın ve ark., 2015), %28.09 (Çaçan ve ark., 2015), %15.65-17.53 (Yılmaz ve Albayrak, 2016), %17.06-18.88 (Gökalp ve ark., 2017), %20.32-21.06 (Erbeyli, 2017), %23.9-21.7 (Engin ve Mut, 2017), %16,78-19,01 (Dumlu ve ark., 2017), %17.4-%22.6 (Açıkbaş ve ark., 2017), %12.75-%17.86 (Öten ve Albayrak, 2018), %22.9-24.0 (Mutlu, 2018), %17.63-22.18 (Türk ve ark., 2018), %18.44-19.79 (Karaköy ve Saraç, 2018), %20.2-24.2 (Kır ve ark., 2019), %19.92-21.34 (Albayrak ve Öten, 2020) arasında belirlemiştirlerdir.

Yapılan araştırmalarda da görüldüğü gibi yonca bitkisinin farklı ekolojik şartlara ve farklı çeşitlere göre ham protein oranlarının %11.2 ile %28.09 arasında değiştiği, yaptığımız bu çalışmada da çeşitlerin ham protein oranlarının ortalama %16.9 ile %22.0 arasında değiştiği belirlenmiştir.

### Asit Çözücülerde Çözünemeyen Lignin (ADL) Oranı

Denemenin yürütüldüğü yıllara ve üç yıllık ortalama göre yonca çeşitlerinin ADL oranlarında farklılıklar gözlenmiştir (Çizelge 4). ADL oranları 2017 (tesis yılı) yılında %5.96 ile %10.10, 2018 yılında %6.43 ile %9.63, 2019 yılında %7.17 ile %10.80 ve üç yıllık ortalama ise %6.88 ile %9.81 arasında olduğu görülmüştür. Denemenin yürütüldüğü yıllar ve üç yıllık ortalama göre ADL oranlarında önemli değişiklikler olmadığı görülmektedir (Çizelge 4). En yüksek ADL oranı tesis yılında Manga 601 çeşidinde, 2018 yılı ve üç yıllık ortalama Gacer çeşidinde ve 2019 yılında Sunter ve Gacer çeşitlerinde elde edilmiştir. En düşük ADL oranları ise 2017, 2019 ve üç yıllık ortalama Başbağ çeşidinde, 2018 yılında ise Bilensoy 80 çeşidinde tespit edilmiştir.

Yapılan önceki çalışmalarda, yonca'nın farklı ekolojik şartlara ve farklı çeşitlere göre ADL oranlarını %5.49 (Kanani ve ark., 2006), %6.19-7.18 (Bani ve ark., 2007), %5.24-5.97 (Geleti ve ark., 2014), %8.38 (Ünalp, 2014) olarak belirlemiştirlerdir.

Birçok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarda yonca çeşitlerinin ADL oranlarının %5.24 ile %8.38 arasında değiştiği, yürütülen bu çalışmada da yonca çeşitlerinin ortalama ADL oranlarının %6.88 ile %9.81 arasında değiştiği görülmüştür.

**Çizelge 3.** Yonca (*Medicago sativa* L) çeşitlerine ait ham protein oranları (%)

| Çeşitler              | 2017 yılı     | 2018 yılı     | 2019 yılı     | Üç yıllık ort. |
|-----------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Başbağ                | 17.0 f        | 17.2 d        | 16.5 b-c      | 16.9 k         |
| Gea                   | 18.6 c-f      | 19.3 b-d      | 15.5 c        | 17.8 i-k       |
| Elçi                  | 19.2 b-f      | 20.2 b-d      | 17.0 a-c      | 18.8 d-i       |
| Kayseri               | 18.2 d-f      | 19.2 b-d      | 15.7 c        | 17.7 i-k       |
| May İside             | 17.9 ef       | 18.1 cd       | 16.4 bc       | 17.4 jk        |
| Magna 601             | 24.1 a        | 24.1 a        | 17.9 ab       | 22.0 a         |
| Savaş                 | 20.2 b-d      | 19.9 b-d      | 18.8 a        | 19.6 b-g       |
| Ezzeline              | 20.6 bc       | 20.5 b-d      | 17.0 a-c      | 19.4 b-h       |
| Magnum V              | 18.8 b-f      | 18.9 b-d      | 17.7 ab       | 18.5 f-j       |
| La Bella              | 19.5 b-e      | 20.4 b-d      | 16.2 bc       | 18.7 e-j       |
| Giulia                | 19.5 b-e      | 21.7 ab       | 16.2 bc       | 19.1 c-h       |
| Plato                 | 20.9 b        | 22.3 ab       | 17.7 ab       | 20.3 bc        |
| La Torre              | 18.7 b-f      | 19.5 b-d      | 17.0 a-c      | 18.4 g-j       |
| Prosementi            | 19.8 b-e      | 21.5 a-c      | 17.9 ab       | 19.7 b-f       |
| Queen                 | 20.6 bc       | 21.8 ab       | 17.9 ab       | 20.1 b-d       |
| Bilensoy 80           | 17.9 ef       | 19.2 b-d      | 17.3 a-c      | 18.2 h-k       |
| Emiliano              | 20.0 b-e      | 21.4 a-c      | 18.0 ab       | 19.8 b-e       |
| Sunter                | 19.9 b-e      | 24.5 a        | 17.2 a-c      | 20.6 b         |
| Gacer                 | 18.3 d-f      | 19.5 b-d      | 17.3 a-c      | 18.4 g-j       |
| <b>Yıl Ortalaması</b> | <b>19.5</b>   | <b>20.5</b>   | <b>17.1</b>   | <b>19.0</b>    |
| <b>F değeri</b>       | <b>5.60**</b> | <b>3.31**</b> | <b>2.32**</b> | <b>9.81**</b>  |

\*\* %1 ihtimal seviyesinde önemlidir. Aynı sütunda benzer harflerdeki değerler arasındaki fark önemli değildir.

**Çizelge 4.** Yonca (*Medicago sativa* L) çeşitlerine ait ADL oranları (%)

| Çeşitler              | 2017 yılı     | 2018 yılı     | 2019 yılı     | Üç yıllık ort. |
|-----------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Başbağ                | 5.96 i        | 7.51 e-g      | 7.17 g        | 6.88 i         |
| Gea                   | 8.65 b-e      | 7.68 d-g      | 7.96 d-g      | 8.10 f-h       |
| Elçi                  | 7.85 d-g      | 8.76 a-e      | 8.31 c-g      | 8.30 e-g       |
| Kayseri               | 7.29 f-h      | 8.47 a-f      | 10.13 ab      | 8.63 c-f       |
| May İside             | 7.54 e-h      | 8.01 b-f      | 8.94 b-e      | 8.16 f-h       |
| Magna 601             | 10.10 a       | 8.59 a-f      | 7.88 e-g      | 8.86 b-e       |
| Savaş                 | 8.68 b-e      | 9.44 ab       | 8.59 c-f      | 8.91 b-d       |
| Ezzeline              | 6.61 hi       | 8.49 a-f      | 7.82 e-g      | 7.64 h         |
| Magnum V              | 9.22 a-c      | 9.50 a        | 9.00 b-e      | 9.24 b         |
| La Bella              | 9.28 ab       | 9.64 a        | 7.58 fg       | 8.83 b-e       |
| Giulia                | 7.44 f-h      | 9.18 a-c      | 8.48 c-f      | 8.37 d-g       |
| Plato                 | 8.42 b-f      | 8.36 a-f      | 8.49 c-f      | 8.42 d-g       |
| La Torre              | 8.12 b-g      | 9.08 a-d      | 9.14 b-d      | 8.78 b-e       |
| Prosementi            | 8.05 c-g      | 7.79 c-g      | 8.63 c-f      | 8.16 f-h       |
| Queen                 | 7.11 gh       | 8.52 a-f      | 8.41 c-f      | 8.01 gh        |
| Bilensoy 80           | 8.38 b-f      | 6.43 g        | 9.47 bc       | 8.09 f-h       |
| Emiliano              | 7.99 d-g      | 7.25 fg       | 9.07 b-e      | 8.10 f-h       |
| Sunter                | 8.32 b-f      | 8.62 a-f      | 10.58 a       | 9.18 bc        |
| Gacer                 | 9.00 b-d      | 9.63 a        | 10.80 a       | 9.81 a         |
| <b>Yıl ortalaması</b> | <b>8.11</b>   | <b>8.47</b>   | <b>8.76</b>   | <b>8.45</b>    |
| <b>F değeri</b>       | <b>7.96**</b> | <b>4.07**</b> | <b>6.88**</b> | <b>14.48**</b> |

\*\* %1 ihtimal seviyesinde önemlidir. Aynı sütunda benzer harflerdeki değerler arasındaki fark önemli değildir.

### Nötr Çözücülerde Çözünemeyen Lif (NDF) Oranı

Çeşitlerin NDF oranları yıllara ve üç yıllık ortalamaya göre önemli derecede farklılıkların olduğu belirlenmiştir. NDF oranları 2017 yılında %34.4 ile %41.0, 2018 yılında %35.3 ile %44.3, 2019 yılında %40.4 ile %50.7 ve üç yıllık ortalamada ise %39.4 ile %42.9 arasında olduğu tespit edilmiştir. NDF

oranlarının yemlerde düşük olması istenir. Buna göre en düşük NDF oranları 2017 yılında Magna 601 ve Queen çeşitlerinde, 2018 yılında Elçi ve Sunter çeşitlerinde, 2019 yılında Plato çeşidinde, üç yıllık ortalamaya göre ise Magnum V çeşidinde belirlenmiştir (Çizelge 5).

Yonca'nın yem kalite içeriklerinin belirlenmesi amacıyla yürütülen bazı çalışmalarda NDF oranlarının %55.6 (Horner ve ark., 1985), %48.3-53.0 (Karlı ve ark., 2002), %34.2 (Kanani ve ark., 2006), %36.11-38.58 (Bani ve ark., 2007), %35.67-41.02 (Tucak ve ark., 2008), %45.4-48.6 (Katić ve ark., 2009), %47.03-57.43 (Monirifar, 2011), %38.9-49.8 (Çaçan ve ark., 2012), %39.30-48.13 (Albayrak ve ark., 2014), %36.86-43.53 (Geleti ve ark., 2014), %46.5 (Gündel ve ark., 2014), %48.34 (Ünalp, 2014), %39.71-48.20 (Aydın ve ark., 2015), %47.10 (Çaçan ve ark., 2015), %42.13-44.98 (Yılmaz ve Albayrak, 2016), %39.5-42.6 (Açıkbaş ve ark., 2017), %42.67-44.28 (Dumlu ve ark., 2017), %40.0-42.9 (Engin ve Mut, 2017), %36.69-40.64 (Erbeyli, 2017), %51.38-53.78 (Karaköy ve Saraç, 2018), %47.1-49.7 (Mutlu, 2018), %44.51-50.07 (Öten ve Albayrak, 2018), %39.23-43.93 (Türk ve ark., 2018), %51.1-62.5 (Kır ve ark., 2019), %38.24-40.88 (Albayrak ve Öten, 2020) arasında olduğunu belirlemiştir.

Önceki yapılan araştırmalarda yonca çeşitlerinin NDF oranlarının %34.2 ile %62.5 arasında değiştiği, yürütülen bu araştırmada ise yonca çeşitlerinin ortalama NDF oranlarının %39.4 ile %42.9 arasında değiştiği belirlenmiştir.

**Çizelge 5.** Yonca (*Medicago sativa* L) çeşitlerine ait NDF oranları (%)

| Çeşitler              | 2017 yılı     | 2018 yılı     | 2019 yılı     | Üç yıllık ort. |
|-----------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Başbağ                | 38.2 ab       | 39.0 c-f      | 45.4 b-e      | 40.9 c-f       |
| Gea                   | 38.8 ab       | 36.4 fg       | 47.6 a-c      | 41.0 b-f       |
| Elçi                  | 38.5 ab       | 35.3 g        | 45.7 b-d      | 39.8 ef        |
| Kayseri               | 38.3 ab       | 38.6 d-g      | 47.8 a-c      | 41.6 a-d       |
| May İside             | 41.0 a        | 40.3 b-e      | 41.2 f-h      | 40.9 c-f       |
| Magna 601             | 35.0 c        | 41.4 a-d      | 46.5 b-d      | 40.9 c-f       |
| Savaş                 | 38.7 ab       | 37.1 e-g      | 44.3 c-g      | 40.0 d-f       |
| Ezzeline              | 39.7 a        | 42.4 a-c      | 44.7 b-f      | 42.3 a-c       |
| Magnum V              | 36.7 bc       | 39.7 c-f      | 41.8 e-h      | 39.4 f         |
| La Bella              | 40.7 a        | 39.7 c-f      | 48.4 ab       | 42.9 a         |
| Giulia                | 36.4 bc       | 44.3 a        | 40.9 g-h      | 40.6 d-f       |
| Plato                 | 38.9 ab       | 43.6 ab       | 40.4 h        | 41.0 b-f       |
| La Torre              | 36.0 bc       | 42.1 a-d      | 43.5 d-h      | 40.5 d-f       |
| Prosementi            | 38.2 ab       | 43.8 ab       | 45.1 b-e      | 42.4 ab        |
| Queen                 | 34.4 c        | 40.4 b-e      | 46.4 b-d      | 40.4 d-f       |
| Bilensoy 80           | 36.2 bc       | 41.3 a-d      | 50.7 a        | 42.7 a         |
| Emiliano              | 36.5 bc       | 42.2 a-d      | 43.7 d-h      | 40.8 c-f       |
| Sunter                | 38.6 ab       | 35.5 g        | 47.6 a-c      | 40.6 d-f       |
| Gacer                 | 36.3 bc       | 41.7 a-d      | 41.9 e-h      | 39.9 ef        |
| <b>Yıl Ortalaması</b> | <b>37.7</b>   | <b>40.3</b>   | <b>44.9</b>   | <b>41.0</b>    |
| <b>F değeri</b>       | <b>4.05**</b> | <b>6.44**</b> | <b>6.53**</b> | <b>4.49**</b>  |

\*\* %1 ihtimal seviyesinde önemlidir. Aynı sütunda benzer harflerdeki değerler arasındaki fark önemli değildir.

#### Asit Çözücülerde Çözünemeyen Lif (ADF) Oranı

Yıllara ve üç yıllık ortalamaya göre. yonca çeşitlerinin ADF oranlarında farklılıklar olduğu belirlenmiştir. ADF oranları 2017 yılında %25.7 ile %31.6. 2018 yılında %24.3 ile %33.7. 2019 yılında %29.2 ile %36.0 ve üç yıllık ortalamada ise %28.1 ile %31.9 arasında olduğu belirlenmiştir. Çeşit ortalamalarına göre. 2017 ve 2018 yıllarında elde edilen ADF oranları 2019 yılında elde edilen ADF oranlarından daha düşük elde edilmiştir. En düşük ADF oranı 2017 yılında Ezzeline çeşidinde. 2018

yılında Queen ve Bilensoy 80 çeşitlerinde. 2019 yılında Başbağ çeşidinde ve üç yıllık ortalama da ise Plato. Queen ve Gacer çeşitlerinde tespit edilmiştir (Çizelge 6).

Farklı yonca türü ve çeşidi ile farklı lokasyonlarda yürütülen çalışmalarda yonca'nın ADF oranlarının %35.3 (Horner ve ark., 1985). %30.2-31.0 (Karşlı ve ark., 2002). %26.5 (Kanani ve ark., 2006). %27.63-29.13 (Bani ve ark., 2007). %30.16-35.91 (Tucak ve ark., 2008). %37.4-39.5 (Katić ve ark., 2009). %38.83-44.70 (Monirifar, 2011). %30.1-37.6 (Çaçan ve ark., 2012). %28.28-33.44 (Albayrak ve ark., 2014). %20.71-22.59 (Geleti ve ark., 2014). %34.3 (Gündel ve ark., 2014). %37.31 (Ünalp, 2014). %27.89-36.06 (Aydın ve ark., 2015). %31.86 (Çaçan ve ark., 2015). %30.26-35.73 (Yılmaz ve Albayrak, 2016). %28.7-32.9 (Açıkbaş ve ark., 2017). %38.60-40.32 (Dumlu ve ark., 2017). %27.5-29.7 (Engin ve Mut, 2017). %21.55-25.87 (Erbeyli, 2017). %42.66-44.19 (Karaköy ve Saraç, 2018). %33.0-35.3 (Mutlu, 2019). %34.72-39.45 (Öten ve Albayrak, 2018). %27.2-32.9 (Türk ve ark., 2018). %35.0-42.8 (Kır ve ark., 2019). %28.42-31.01 (Albayrak ve Öten, 2020) arasında olduğunu belirlemişlerdir.

Birçok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarda yonca çeşitlerinin ADF oranlarının %20.71 ile %44.70 arasında değiştiği, yürütülen bu çalışmada ise yonca çeşitlerinin ortalama ADF oranlarının %28.1 ile %31.9 arasında değiştiği belirlenmiştir.

**Çizelge 6.** Yonca (*Medicago sativa* L) çeşitlerine ait ADF oranları (%)

| Çeşitler              | 2017 yılı     | 2018 yılı     | 2019 yılı     | Üç yıllık ort. |
|-----------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Başbağ                | 29.1 a-c      | 31.1 a-c      | 29.2 i        | 29.8 c-e       |
| Gea                   | 28.2 c-d      | 25.9 fg       | 36.0 a        | 30.0 c-e       |
| Elçi                  | 29.5 a-c      | 28.1 c-f      | 34.6 a-e      | 30.7 a-c       |
| Kayseri               | 28.9 bc       | 32.6 ab       | 34.1 a-e      | 31.9 a         |
| May İside             | 29.9 a-c      | 28.0 c-f      | 34.6 a-d      | 30.8 a-c       |
| Magna 601             | 28.4 b-d      | 28.9 c-f      | 35.7 ab       | 31.0 a-c       |
| Savaş                 | 29.1 a-c      | 28.1 c-f      | 33.7 a-e      | 30.3 b-d       |
| Ezzeline              | 25.7 d        | 33.7 a        | 35.4 a-c      | 31.6 ab        |
| Magnum V              | 28.7 bc       | 29.3 c-e      | 33.0 d-g      | 30.3 b-d       |
| La Bella              | 31.6 a        | 30.5 b-d      | 31.5 f-h      | 31.2 a-c       |
| Giulia                | 27.8 cd       | 33.2 ab       | 31.3 gh       | 30.8 a-c       |
| Plato                 | 27.2 cd       | 26.4 e-g      | 30.7 hi       | 28.1 f         |
| La Torre              | 29.3 a-c      | 27.7 d-f      | 32.8 d-h      | 29.9 c-e       |
| Prosementi            | 29.6 a-c      | 30.2 b-d      | 32.9 d-g      | 30.9 a-c       |
| Queen                 | 28.0 cd       | 24.3 g        | 32.4 e-h      | 28.2 f         |
| Bilensoy 80           | 28.2 cd       | 24.3 g        | 33.6 b-f      | 28.7 ef        |
| Emiliano              | 31.0 ab       | 30.8 a-c      | 31.4 f-h      | 31.1 a-c       |
| Sunter                | 27.2 cd       | 26.6 e-f      | 34.1 a-e      | 29.3 d-f       |
| Gacer                 | 25.8 d        | 26.0 fg       | 33.5 c-g      | 28.4 f         |
| <b>Yıl ortalaması</b> | <b>28.6</b>   | <b>28.7</b>   | <b>33.2</b>   | <b>30.2</b>    |
| <b>F değeri</b>       | <b>3.44**</b> | <b>8.86**</b> | <b>7.41**</b> | <b>7.20**</b>  |

\*\* %1 ihtimal seviyesinde önemlidir. Aynı sütunda benzer harflerdeki değerler arasındaki fark önemli değildir.

### Kuru Madde Sindirilebilirliği (KMS) Oranı

İğdır ili ekolojik şartlarında 2017, 2018 ve 2019 yıllarında denemeye alınan 19 yonca çeşidine ait KMS oranları Çizelge 7'de verilmiştir. Çizelge 7 incelendiğinde denemenin yürütüldüğü her üç yılda ve üç yıllık ortalama KMS oranlarının çeşitlere göre önemli miktarda değiştiği belirlenmiştir. KMS oranları 2017 yılında %64.3 ile %68.9, 2018 yılında %62.7 ile %70.0, 2019 yılında %60.9 ile %66.2 ve üç yıllık ortalama da ise %64.1 ile %67.0 arasında olduğu belirlenmiştir. Çeşitlerin ortalamasına göre denemenin üçüncü yılındaki (2019 yılı) KMS değerleri 2017 ve 2018 yılına göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

En yüksek KMS oranları 2017 yılında Ezzeline ve Gacer çeşitlerinde. 2018 yılında Queen ve Bilensoy 80 çeşitlerinde. 2019 yılında Başbağ çeşidinde. üç yıllık ortalamaya göre ise Plato. Queen ve Gacer çeşitlerinde tespit edilmiştir.

KMS oranlarının belirlenmesi amacıyla yürütülen bazı çalışmalarda Yonca'nın KMS oranlarının %59.7 (Yavuz, 2005). %59.6-65.5 (Çaçan ve ark., 2012). %60.81-67.17 (Aydın ve ark., 2015). %64.08 (Çaçan ve ark., 2015). %61.4-63.2 (Mutlu, 2019) olarak belirlemişlerdir.

**Çizelge 7.** Yonca (*Medicago sativa* L) çeşitlerine ait KMS oranları (%)

| Çeşitler              | 2017 yılı     | 2018 yılı     | 2019 yılı     | Üç yıllık ort. |
|-----------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Başbağ                | 66.3 b-d      | 64.6 e-g      | 66.2 a        | 65.7 b-d       |
| Gea                   | 66.9 ab       | 68.8 ab       | 60.9 i        | 65.5 b-d       |
| Elçi                  | 65.9 b-d      | 67.0 b-e      | 62.0 e-i      | 65.0 d-f       |
| Kayseri               | 66.4 bc       | 63.5 fg       | 62.3 e-i      | 64.1 f         |
| May İside             | 65.6 b-d      | 67.1 b-e      | 62.0 f-i      | 64.9 d-f       |
| Magna 601             | 66.8 a-c      | 66.4 b-e      | 61.1 hi       | 64.8 d-f       |
| Savaş                 | 66.2 b-d      | 67.0 b-e      | 62.6 e-h      | 65.3 c-e       |
| Ezzeline              | 68.9 a        | 62.7 g        | 61.3 g-i      | 64.3 ef        |
| Magnum V              | 66.6 bc       | 66.1 c-e      | 63.2 c-f      | 65.3 c-e       |
| La Bella              | 64.3 d        | 65.1 d-f      | 64.3 b-d      | 64.6 d-f       |
| Giulia                | 67.3 ab       | 63.0 fg       | 64.5 bc       | 64.9 d-f       |
| Plato                 | 67.7 ab       | 68.4 a-c      | 65.0 ab       | 67.0 a         |
| La Torre              | 66.1 b-d      | 67.4 b-d      | 63.4 b-f      | 65.6 b-d       |
| Prosementi            | 65.8 b-d      | 65.4 d-f      | 63.3 c-f      | 64.8 d-f       |
| Queen                 | 67.1 ab       | 69.9 a        | 63.7 b-e      | 66.9 a         |
| Bilensoy 80           | 67.0 ab       | 70.0 a        | 62.8 d-h      | 66.6 ab        |
| Emiliano              | 64.8 cd       | 64.9 e-g      | 64.5 b-d      | 64.7 d-f       |
| Sunter                | 67.7 ab       | 68.2 a-c      | 62.4 e-i      | 66.1 a-c       |
| Gacer                 | 68.8 a        | 68.7 a-b      | 62.8 c-g      | 66.7 a         |
| <b>Yıl Ortalaması</b> | <b>66.6</b>   | <b>66.5</b>   | <b>63.1</b>   | <b>65.4</b>    |
| <b>F değeri</b>       | <b>3.44**</b> | <b>8.87**</b> | <b>7.40**</b> | <b>7.15**</b>  |

\*\* %1 ihtimal seviyesinde önemlidir. Aynı sütunda benzer harflerdeki değerler arasındaki fark önemli değildir.

### Kuru Madde Tüketim (KMT) Oranı

Denemenin yürütüldüğü yıllara ve üç yıllık ortalamaya göre yonca çeşitlerinin KMT oranları önemli derecede farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. KMT oranları 2017 yılında %2.93 ile %3.49. 2018 yılında %2.71 ile %3.41. 2019 yılında %2.37 ile %2.97 ve üç yıllık ortalamada ise %2.82 ile %3.06 arasında olduğu belirlenmiştir. KMT oranlarının yemlerde yüksek olması istenir. Buna göre en yüksek KMT oranları 2017 yılında Magna 601 ve Queen çeşitlerinde. 2018 yılında Elçi ve Sunter çeşitlerinde. 2019 yılında Plato çeşidinde. üç yıllık ortalamaya göre ise Elçi ve Magnum V çeşidinde belirlenmiştir (Çizelge 8).

KMT oranlarının belirlenmesi amacıyla yürütülen bazı çalışmalarda Yonca'nın KMT oranlarının %2.56 (Yavuz, 2005). %2.4-3.1 (Çaçan ve ark., 2012). %2.53-3.05 (Aydın ve ark., 2015). %2.6 (Çaçan ve ark., 2015) olarak tespit etmişlerdir.

### Sindirilebilir Enerji (SE)

İğdır ekolojik şartlarında 2017. 2018 ve 2019 yıllarında denemeye alınan 19 yonca çeşidine ait SE miktarları Çizelge 9'da verilmiştir. Çizelge 9 incelendiğinde denemenin yürütüldüğü her üç yılda ve üç yıllık ortalama SE miktarlarının çeşitlere göre önemli miktarda değiştiği belirlenmiştir. SE miktarları 2017 yılında 3.02 ile 3.22. 2018 yılında 2.95 ile 3.27. 2019 yılında 2.88 ile 3.10 ve üç yıllık ortalamada ise 3.01 ile 3.14 Mcal kg<sup>-1</sup> arasında olduğu belirlenmiştir. Çeşitlerin ortalamasına göre. denemenin 2019 yılı SE değerleri 2017 ve 2018 yılına göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. En yüksek SE değerleri

2017 yılında Ezzeline ve Gacer çeşitlerinde. 2018 yılında Queen ve Bilensoy 80 çeşitlerinde. 2019 yılında Başbağ çeşidinde. üç yıllık ortalamaya göre ise Plato. Queen ve Gacer çeşitlerinde olduğu bulunmuştur.

**Çizelge 8.** Yonca (*Medicago sativa* L) çeşitlerine ait KMT oranları (%)

| Çeşitler              | 2017 yılı     | 2018 yılı     | 2019 yılı     | Üç yıllık ort. |
|-----------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Başbağ                | 3.14 b-d      | 3.08 b-e      | 2.65 e-g      | 2.95 a-e       |
| Gea                   | 3.09 b-d      | 3.29 ab       | 2.52 f-h      | 2.96 a-c       |
| Elçi                  | 3.12 b-d      | 3.41 a        | 2.62 e-g      | 3.05 a         |
| Kayseri               | 3.14 b-d      | 3.11 b-d      | 2.52 f-h      | 2.92 b-f       |
| May İside             | 2.93 d        | 2.99 c-g      | 2.92 a-c      | 2.94 a-e       |
| Magna 601             | 3.43 a        | 2.90 d-h      | 2.59 e-g      | 2.98 a-c       |
| Savaş                 | 3.10 b-d      | 3.24 a-c      | 2.71 c-f      | 3.02 ab        |
| Ezzeline              | 3.02 cd       | 2.83 e-h      | 2.68 d-g      | 2.85 ef        |
| Magnum V              | 3.28 a-c      | 3.03 c-e      | 2.88 a-d      | 3.06 a         |
| La Bella              | 2.96 d        | 3.02 c-f      | 2.48 gh       | 2.82 f         |
| Giulia                | 3.29 ab       | 2.71 h        | 2.94 ab       | 2.98 a-c       |
| Plato                 | 3.09 b-d      | 2.75 f-h      | 2.97 a        | 2.94 a-e       |
| La Torre              | 3.34 ab       | 2.86 d-h      | 2.76 a-e      | 2.99 ab        |
| Prosementi            | 3.15 b-d      | 2.74 gh       | 2.66 d-g      | 2.85 d-f       |
| Queen                 | 3.49 a        | 2.97 c-h      | 2.59 e-g      | 3.02 ab        |
| Bilensoy 80           | 3.32 ab       | 2.91 d-h      | 2.37 h        | 2.87 c-f       |
| Emiliano              | 3.29 ab       | 2.85 d-h      | 2.75 b-e      | 2.96 a-d       |
| Sunter                | 3.11 b-d      | 3.39 a        | 2.53 f-h      | 3.00 ab        |
| Gacer                 | 3.32 ab       | 2.88 d-h      | 2.87 a-d      | 3.02 ab        |
| <b>Yıl ortalaması</b> | <b>3.19</b>   | <b>3.00</b>   | <b>2.68</b>   | <b>2.96</b>    |
| <b>F değeri</b>       | <b>3.94**</b> | <b>6.58**</b> | <b>6.77**</b> | <b>3.91**</b>  |

\*\* %1 ihtimal seviyesinde önemlidir. Aynı sütunda benzer harflerdeki değerler arasındaki fark önemli değildir.

**Çizelge 9.** Yonca (*Medicago sativa* L) çeşitlerine ait SE (Mcal kg<sup>-1</sup>)

| Çeşitler              | 2017 yılı     | 2018 yılı     | 2019 yılı     | Üç yıllık ort. |
|-----------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Başbağ                | 3.11 b-d      | 3.04 e-g      | 3.10 a        | 3.08 b-d       |
| Gea                   | 3.13 a-c      | 3.21 ab       | 2.88 i        | 3.07 b-d       |
| Elçi                  | 3.09 b-d      | 3.13 b-e      | 2.92 e-i      | 3.05 de        |
| Kayseri               | 3.11 b-d      | 2.99 fg       | 2.94 e-i      | 3.01 e         |
| May İside             | 3.08 b-d      | 3.14 b-d      | 2.92 e-i      | 3.05 de        |
| Magna 601             | 3.13 a-c      | 3.11 b-e      | 2.88 i        | 3.04 de        |
| Savaş                 | 3.11 b-d      | 3.14 b-e      | 2.95 d-h      | 3.06 c-e       |
| Ezzeline              | 3.22 a        | 2.95 g        | 2.89 g-i      | 3.02 e         |
| Magnum V              | 3.12 bc       | 3.10 c-e      | 2.97 c-f      | 3.06 c-e       |
| La Bella              | 3.02 d        | 3.06 d-f      | 3.02 b-d      | 3.03 de        |
| Giulia                | 3.15 ab       | 2.97 fg       | 3.03 bc       | 3.05 de        |
| Plato                 | 3.17 ab       | 3.20 a-c      | 3.05 ab       | 3.14 a         |
| La Torre              | 3.10 b-d      | 3.15 b-d      | 2.98 b-f      | 3.08 b-d       |
| Prosementi            | 3.09 b-d      | 3.07 d-f      | 2.98 b-f      | 3.04 de        |
| Queen                 | 3.14 ab       | 3.27a         | 3.00 b-e      | 3.13 a         |
| Bilensoy 80           | 3.14 ab       | 3.27 a        | 2.96 d-g      | 3.12 ab        |
| Emiliano              | 3.04 cd       | 3.05 d-g      | 3.03 bc       | 3.04 de        |
| Sunter                | 3.17 ab       | 3.19 a-c      | 2.94 e-i      | 3.10 a-c       |
| Gacer                 | 3.21 a        | 3.21 ab       | 2.96 c-g      | 3.13 a         |
| <b>Yıl Ortalaması</b> | <b>3.12</b>   | <b>3.12</b>   | <b>2.97</b>   | <b>3.07</b>    |
| <b>F değeri</b>       | <b>3.36**</b> | <b>8.95**</b> | <b>7.43**</b> | <b>6.71**</b>  |

\*\* %1 ihtimal seviyesinde önemlidir. Aynı sütunda benzer harflerdeki değerler arasındaki fark önemli değildir.

Çizelge 10. Yonca (*Medicago sativa* L) çeşitlerine ait ME (Mcal kg<sup>-1</sup>)

| Çeşitler              | 2017 yılı     | 2018 yılı     | 2019 yılı     | Üç yıllık ort. |
|-----------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Başbağ                | 2.55 c-e      | 2.49 e-g      | 2.55 a        | 2.53 b-d       |
| Gea                   | 2.57 a-d      | 2.64 ab       | 2.36 g        | 2.53 b-d       |
| Elçi                  | 2.54 c-e      | 2.57 b-e      | 2.40 e-g      | 2.50 d-f       |
| Kayseri               | 2.55 c-e      | 2.45 fg       | 2.41 e-g      | 2.47 f         |
| May İside             | 2.53 c-e      | 2.58 b-e      | 2.40 e-g      | 2.50 d-f       |
| Magna 601             | 2.57 a-d      | 2.55 b-e      | 2.37 g        | 2.50 d-f       |
| Savaş                 | 2.55 c-e      | 2.58 b-e      | 2.42 e-g      | 2.51 c-e       |
| Ezzeline              | 2.64 a        | 2.42 g        | 2.38 fg       | 2.48 ef        |
| Magnum V              | 2.56 b-d      | 2.54 c-e      | 2.44 c-e      | 2.51 c-e       |
| La Bella              | 2.48 e        | 2.51 d-f      | 2.48 b-d      | 2.49 d-f       |
| Giulia                | 2.59 a-c      | 2.44 fg       | 2.49 b-d      | 2.50 d-f       |
| Plato                 | 2.60 a-c      | 2.62 a-c      | 2.50 ab       | 2.58 a         |
| La Torre              | 2.54 c-e      | 2.59 b-d      | 2.45 b-e      | 2.53 b-d       |
| Prosementi            | 2.53 c-e      | 2.52 d-f      | 2.45 b-e      | 2.50 d-f       |
| Queen                 | 2.58 a-c      | 2.68 a        | 2.46 b-e      | 2.57 a         |
| Bilensoy 80           | 2.57 a-d      | 2.68 a        | 2.43 d-f      | 2.56 ab        |
| Emiliano              | 2.50 de       | 2.50 d-g      | 2.49 bc       | 2.49 d-f       |
| Sunter                | 2.60 a-c      | 2.62 a-c      | 2.41 e-g      | 2.54 a-c       |
| Gacer                 | 2.64 ab       | 2.63 ab       | 2.43 d-f      | 2.57 a         |
| <b>Yıl ortalaması</b> | <b>2.56</b>   | <b>2.56</b>   | <b>2.44</b>   | <b>2.52</b>    |
| <b>F değeri</b>       | <b>3.33**</b> | <b>8.85**</b> | <b>7.41**</b> | <b>7.04**</b>  |

\*\* %1 ihtimal seviyesinde önemlidir. Aynı sütunda benzer harflerdeki değerler arasındaki fark önemli değildir.

Çizelge 11. Yonca (*Medicago sativa* L) çeşitlerine ait NYD değeri

| Çeşitler              | 2017 yılı     | 2018 yılı     | 2019 yılı     | Üç yıllık ort. |
|-----------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Başbağ                | 161.4 d-f     | 154.6 b-d     | 135.7 b-f     | 150.6 a-c      |
| Gea                   | 160.3 d-f     | 175.6 a       | 119.2 gh      | 151.7 a-c      |
| Elçi                  | 159.5 d-f     | 176.6 a       | 126.2 e-h     | 154.1 ab       |
| Kayseri               | 161.2 d-f     | 153.2 b-e     | 121.5 gh      | 145.3 c-f      |
| May İside             | 148.8 ef      | 155.4 b-d     | 139.9 a-d     | 148.1 b-e      |
| Magna 601             | 177.7 ab      | 149.4 c-f     | 122.6 gh      | 149.9 b-d      |
| Savaş                 | 159.2 d-f     | 168.1 ab      | 131.5 c-g     | 153.0 ab       |
| Ezzeline              | 161.2 d-f     | 137.8 fg      | 127.7 d-h     | 142.2 ef       |
| Magnum V              | 169.1 a-d     | 155.3 b-d     | 140.7 a-c     | 155.0 ab       |
| La Bella              | 147.3 f       | 152.6 c-f     | 123.7 f-h     | 141.2 f        |
| Giulia                | 171.8 a-d     | 132.2 g       | 146.8 ab      | 150.3 a-d      |
| Plato                 | 162.5 c-e     | 145.8 c-g     | 149.8 a       | 152.7 ab       |
| La Torre              | 171.3 a-d     | 149.5 c-f     | 136.0 b-f     | 152.3 a-c      |
| Prosementi            | 160.7 d-f     | 138.9 e-g     | 130.6 c-g     | 143.4 d-f      |
| Queen                 | 181.7 a       | 161.1 b       | 127.7 d-h     | 156.8 a        |
| Bilensoy 80           | 172.6 a-d     | 158.2 b-d     | 115.5 h       | 148.8 b-e      |
| Emiliano              | 165.2 b-d     | 143.4 d-g     | 137.6 a-e     | 148.7 b-e      |
| Sunter                | 163.2 b-e     | 178.9 a       | 122.2 gh      | 154.8 ab       |
| Gacer                 | 176.6 a-c     | 153.3 b-e     | 139.6 a-d     | 156.5 a        |
| <b>Yıl Ortalaması</b> | <b>164.8</b>  | <b>154.7</b>  | <b>131.3</b>  | <b>150.3</b>   |
| <b>F değeri</b>       | <b>4.19**</b> | <b>7.98**</b> | <b>6.43**</b> | <b>4.78**</b>  |

\*\* %1 ihtimal seviyesinde önemlidir. Aynı sütunda benzer harflerdeki değerler arasındaki fark önemli değildir.

### Metabolik Enerji (ME)

Araştırmanın 2017, 2018 ve 2019 yılları ve üç yıllık ortalamaya göre incelemeye alınan yonca çeşitlerinin ME miktarlarının önemli derecede farklılık gösterdiği belirlenmiştir. ME miktarları 2017 yılında 2.48 ile 2.64, 2018 yılında 2.42 ile 2.68, 2019 yılında 2.36 ile 2.55 ve üç yıllık ortalamada ise 2.47 ile 2.58 arasında olduğu belirlenmiştir. Çeşitlerin ortalamasına göre, denemenin üçüncü yılındaki (2019 yılı) ME değerleri 2017 ve 2018 yılına göre daha düşük olduğu görülmüştür. En yüksek ME



değerleri 2017 yılında Ezzeline çeşidinde, 2018 yılında Queen ve Bilensoy 80 çeşitlerinde, 2019 yılında Başbağ çeşidinde, üç yıllık ortalamaya göre ise Plato, Queen ve Gacer çeşitlerinde olduğu bulunmuştur (Çizelge 10).

### Nispi Yem Değeri (NYD)

Yıllara ve üç yıllık ortalamaya göre yonca çeşitlerinin NYD değerlerinde önemli farklılıklar olduğu gözlenmiştir (Çizelge 11). NYD değerleri 2017 (tesis yılı) yılında 147.3 ile 181.7. 2018 yılında 132.2 ile 178.9. 2019 yılında 115.5 ile 149.8 ve üç yıllık ortalama ise 141.2 ile 156.8 arasında olduğu tespit edilmiştir. En yüksek NYD değerleri tesis yılında (2017 yılı) Queen çeşidinde. 2018 yılında Gea ve Elçi çeşitlerinde. 2019 yılında Bilensoy 80 çeşidinde ve üç yıllık ortalama ise Queen ve Gacer çeşitlerinde elde edilmiştir. En düşük NYD değerleri ise 2017 ve üç yıllık ortalamaya göre La Bella çeşitlerinde. 2018 yılında Giulia çeşidinde ve 2019 yılında ise Bilensoy 80 çeşidinde tespit edilmiştir.

Farklı yonca türü ve çeşidi ile farklı lokasyonlarda yürütülen çalışmalarda yonca'nın NYD değerlerinin 118.8 (Yavuz. 2005). 111.1 (Çaçan ve ark.. 2012). 154.1 (Geleti ve ark.. 2014). 124.5 (Gündel ve ark.. 2014). 118.75-157.32 (Aydın ve ark.. 2015). 126.6 (Çaçan ve ark.. 2015). 138.1-154.4 (Açıkbaş ve ark.. 2017). 132.5-160.6 (Engin ve Mut. 2018). 150.2-164.6 (Mutlu. 2019). 148.48-162.72 (Albayrak ve Öten. 2020) arasında olduğunu belirlemiştir.

Yonca çeşitlerinin kalite özelliklerinin belirlenmeye çalışıldığı birçok çalışmada da görüldüğü gibi NYD değerlerinin 118.75 ile 164.6 arasında değiştiği, yürütülen bu çalışmada ise yonca çeşitlerinin ortalama NYD değerlerinin 141.2 ile 156.8 arasında değiştiği belirlenmiştir.

### SONUÇ

İğdır ekolojik şartlarında yürütülen bu çalışmada denemeye alınan yonca çeşitlerinin yem kalite özelliklerinin yıllara ve çeşitlere göre önemli derecede farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle yıllar arasında tespit edilen bu farklılığın önemli iklim faktörlerinden sıcaklık nem ve yağış miktarlarının yıllara göre belirgin bir şekilde değişimler göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu amaçla denemenin üç yıl süreyle yürütülmüş olması elde edilen sonuçların daha sağlıklı olmasına ve bölge için önerilerin daha doğru olarak yapılmasına imkan vermektedir. Denemenin üçüncü yılı olan 2019 yılına göre 2017 ve 2018 yıllarında çeşitlerin HP. KMS. KMT. SE. ME ve NYD değerlerinin daha yüksek. NDF. ADF ve ADL değerlerinin ise daha düşük olduğu belirlenmiştir. Üç yıllık ortalamaya göre yem kalite değerlerinin yüksek olması istenen HP oranı Magna 601 çeşidinde; KMS. SE ve ME Plato. Queen ve Gacer çeşitlerinde; KMT oranı Elçi ve Magnum V çeşitlerinde; NYD değeri ise Queen ve Gacer çeşitlerinde elde edilmiştir. Diğer taraftan yemlerdeki miktarlarının düşük olmasının istendiği ADL oranının Başbağ çeşidinde; NDF oranının Magnum V çeşidinde; ADF oranının ise Plato. Queen ve Gacer çeşitlerinde olduğu belirlenmiştir. Çeşitler arasında kalite değerlerinin farklılık göstermesi sahip oldukları genetik yapı özelliklerinden dolayı beklenen bir sonuçtur. Mevcut bu çalışmada da her ne kadar çeşitler arasında incelemeye alınan kalite özellikleri farklılık göstermiş olsa da özellikle yoncada nispi yem değeri yemin kalitesini rakamsal olarak gösteren bir değer olduğundan; Queen çeşidi ve Gacer genotipi en yüksek NYD sahip çeşitler olmuşlardır. Dolayısıyla İğdır ekolojik koşullarında yüksek yem kalitesine sahip yem materyalleri üretilmesi amacıyla bu çeşitler önerilebilir..

### TEŞEKKÜR

Bu araştırma 2020-FBE-A04 nolu proje olarak İğdır Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenerek yürütülmüştür.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Açıkbaş S, Albayrak S, Türk M, 2017. Doğal Vejetasyondan Toplanan Bazı Yonca (*Medicago sativa* L.) Genotiplerinin Ot Verim ve Kalitelerinin Belirlenmesi. Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi. 4 (2): 155-162
- Açıkgöz E. 1995. Yembitkileri (II. Baskı). Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Basımevi No: 7-025-0210. Bursa.
- Açıkgöz E. 2001. Yembitkileri. (Yenilenmiş 3. Baskı). Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayın No: 182. Vipaş A. Ş. Yayın No: 58. İstanbul. 584 s.
- Albayrak S. Türk M. Sevimay SC. Kazaz S. Tonguç M. 2014. Göller Yöresinde Adi Yonca (*Medicago sativa* L.) Populasyonlarının Toplanması ve Karakterizasyon Çalışmaları. Tübitak. Tarım ve Ormancılık Araştırma Grubu. Proje No: 110O257.
- Albayrak S. Öten M. 2020. Döl Kontrolü Parsellerindeki Yonca (*Medicago sativa* L.) Genotiplerinin Verim ve Kalite Özellikleri ile Genel Kombinasyon Yeteneklerinin Belirlenmesi. Anadolu Tarım Bilim. Dergisi. 35: 353-360.
- Alççek A. 2002. Süt Sığırısı Rasyonu Yapımında Temel İlkeler. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları. No: 106: 124-135.
- Alççek A. Tarhan F. Özkan K. Adışen F. 1999. İzmir İli ve Civarında Bazı Süt Sığırcılığı İşletmelerinde Yapılan Silo Yemlerinin Besin Madde İçeriği ve Silaj Kalitesinin Saptanması Üzerine Bir Araştırma. Hayvansal Üretim. 39-40: 54-63.
- Altınok S. Karakaya A. 2002. Forage Yield Of Different Alfalfa Cultivars Under Ankara Conditions. Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 26(1): 11-16.
- Anonim. 2019. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Meteoroloji Genel Müdürlüğü. Ankara
- AOAC 1998. In P. Cunniff (Ed.). Official methods of analysis (16th ed.). USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Avcıoğlu R. Geren H. Tamkoç A. Karadağ Y. 2009. Yembitkileri. Baklagil Yembitkileri. Cilt II.s. 290-316. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Yayınları. s. 277-545.
- Aydın İ. Uzun F. Algan D. 2015. Farklı coğrafi lokasyonlardan toplanan bazı yabancı tek yıllık yonca türlerinin verim ve besinsel özellikleri. Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi. 30: 275-280.
- Ball DM. Hoveland CS. Lacefield GD. 1996. Forage Quality in Southern Forages. Publ. By the Williams Printing Company. 124-132.
- Bani P. Minuti A. Obonyo Luraschi A. Ligabue M. Ruoizzi F. 2007. Genetic and environmental influences on in vitro digestibility of alfalfa. Italian Journal of Animal Science. 6(1): 251-253
- Çaçan E. Aydın A. Başbağ M. 2015. Bingöl Üniversitesi Yerleşkesinde Yer Alan Bazı Baklagil Yem Bitkilerine Ait Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi. 2 (1): 105-111.
- Çaçan E. Başbağ M. Aydın A. 2012. Diyarbakır İli Doğal Meralarından Toplanan Bazı Tek Yıllık Yonca Türlerinde (*Medicago* spp.) Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. Türk Doğa ve Fen Dergisi. 1(1): 34-38.
- Dumlu SE. Çakal Ş. Aksakal E. Uzun M. Özgöz MM. Terzioğlu K. Menteşe Ö. 2017. Erzurum Ekolojik Koşullarında Yonca (*Medicago Sativa* L.) Çeşit Adayının Performansının Belirlenmesi. Alınları Zirai Bilimler Dergisi. 32 (2): 55-61.
- Engin B. Mut H. 2018. Bazı yonca (*Medicago sativa* L.) çeşitlerinin nispi yem değerleri ile kimi mineral madde içeriklerinin biçim sıralarına göre değişimi. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi. 15(02): 119-127.
- Engin B. Mut H. 2017. Farklı Yonca Çeşitlerinin Ot Verimi ve Bazı Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi. 27 (2): 212-219.

- Erbeyli B. 2017. Bursa Ekolojik Koşullarında Bazı Yonca (*Medicago Sativa* L.) Çeşitlerinin Ot Verimi Ve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek lisans tezi.
- Ferber D. 1999. Risks And Benefits: GM Crops In The Cross Hairs. *Science* 286: 1662-1666.
- Fonnesbeck PV. Clark DH. Garret WN. Speth CF. 1984. Predicting Energy Utilization from Alfalfa Hay From The Western Region. *Animal Science*. (Western Section) 35: 305-308.
- Geleti D. Hailemariam M. Mengistu A. Tolera A. 2014. Biomass yield potential and nutritive value of selected Alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars grown under tepid to cool sub-moist agro-ecology of Ethiopia. *E3 Journal of Agricultural Research and Development*. 4(1): 7-14.
- Graham PH. Vance CP. 2003. Legumes: Importance And Constraints To Greater Use. *Plant Physiol* 131: 872–877.
- Gökalp S. Yazıcı L. Çankaya N. İspirli K. 2017. Bazı Yonca (*Medicago sativa* L.) Çeşitlerinin Tokat-Kazova Ekolojik Koşullarında Ot Verimi ve Kalite Performanslarının Belirlenmesi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 34 (3): 114-127.
- Gündel FD. Karadağ Y. Çınar S. 2014. Çukurova Ekolojik Koşullarında Bazı Sıcak Mevsim Baklagil Yem Bitkilerinin Verim, Kalite ve Adaptasyonu Üzerine Bir Araştırma. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 31(3): 10-19.
- Horner JL. Bush LJ. Adams GD. Taliaferro CM. 1985. Comparative Nutritional Value of Eastern Gamagrass and Alfalfa Hay for Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*. 68: 2615-2620.
- Kaçar O. Göksu E. Azkan N. 2005. Bursa Koşullarında Farklı Bakteri Suşları İle Aşılamanın Bazı Nohut (*Cicer arietinum* L.) Çeşit ve Hatlarında Verim ve Verim Öğeleri Üzerine Etkisinin Belirlenmesi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 42 (3): 21-32.
- Kanani J. Lukefahr SD. Stanko RL. 2006. Evaluation of tropical forage legumes (*Medicago sativa*, *Dolichos lablab*, *Leucaena leucocephala* and *Desmanthus bicornutus*) for growing goats. *Small Ruminant Research*. 65: 1–7.
- Karaköy T. Saraç H. 2018. Sivas Ekolojik Koşullarında Yetiştirilen Yonca Çeşitlerinin Bazı Agronomik ve Kalite Özelliklerinin İncelenmesi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi* 5 (4): 620–627.
- Karslı MA. Denek N. Deniz S. Gündüz AŞ. 2002. Evaluation of Nutritive Value of Forages Grown around Van Lake. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 13(1-2): 25-30.
- Katić S. Milić D. Karagić Đ. Vasiljević S. Glamočić D. Jajić I. 2009. Variation of Protein, Cellulose and Mineral Contents of Lucerne as Influenced by Cultivar and Cut. *Biotechnology in Animal Husbandry* 2 (5-6): 1189-1195.
- Keskin B. Temel S. Eren B. 2020. İğdır Ekolojik Şartlarında Bazı Yonca (*Medicago sativa* L.) Çeşitlerine Ait Ot Verimlerinin Belirlenmesi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi* 7 (3): 757–764.
- Khalil JK. Sawaya WN. Hyder SZ. 1986. Nutrient Composition of Atriplex Leaves Grown in Saudi Arabia. *J. Range Manage*. 39: 104-107.
- Kır H. Tohumcu SA. Özkurt M. Karadağ Y. 2019. Sivas Şarkışla koşullarında Bazı Yonca (*Medicago sativa* L.) Çeşitlerinin Verim ve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. ISPEC Uluslararası Tarım ve Kırsal Kalkınma Kongresi. 10-12 Haziran 2019. Siirt. s: 268-276.
- Monirifar H. 2011. Path Analysis of Yield and Quality Traits in Alfalfa. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 39(2): 190-195.
- Mutlu Z. 2019. Bazı Yonca Çeşitlerinde Farklı Biçim Zamanı Uygulamalarının Ot Verimi ve Kalitesi Üzerine Etkileri. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi.
- Öten M. Albayrak S. 2018. Bazı Yonca (*Medicago sativa* L.) Genotiplerinin Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 27 (2): 55–61.
- Redfearn D. Zhang H. Caddel J. 2006. Forage quality interpretations. Oklahoma Cooperative Extension Service F-2117. <http://pods.dasn.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Document-2557/F-2117web.pdf> (Erişim Tarihi: Aralık 2020).
- Sağlamtimur T. Tansı V. Baytekin H. 1990. Yem Bitkileri Yetiştirme. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Kitabı. No:74. 238 s.

- Sheaffer CC. Peterson MA. Mccalin M. Volene JJ. Cherney JH. Johnson KD. Woodward WT. Viands. DR. 1995. Acide Detergent Fiber. Neutral Detergent Fiber Concentration and Relative Feed Value. *North American Alfalfa İmprovemnt Conference*. Minneapolis.
- Shultze M. Kondorosi A. 1998. Regulation Of Symbiotic Root Nodule Development. *Annual Review of Genetic*. 32: 33-37.
- SPSS. 2008. Statistical Package For The Social Sciences (SPSS/PC+). Chicago. IL.
- Stanaćev V. Dukic D. Kovčın S. Drinić M. Puvača N. Stanaćev V. 2010. Nutritive value of the genetically divergent genotypes of lucerne (*Medicago sativa* L.). *African Journal of Agricultural Research*. 5(11): 1284-1287.
- Tekce E. Gül M. 2014. Ruminant Beslemede NDF ve ADF'nin Önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*. 9(1): 63-73.
- Temel S. Keskin B. Şimşek U. Yılmaz İH. 2016. The Effect of Saline and Non-saline Soil Conditions on Yield and Nutritional Characteristics of Some Perennial Legumes Forages. *Journal of Agricultural Sciences (Tarım Bilimleri Dergisi)*. 22(4):528-538.
- Tilley JMA. Terry RA. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Brit. Grassland Soc*. 18: 104.
- Tucak M. Svetislav Popovic S. Bolaric S. Kozumplik V. 2008. Agronomic Evaluation of Alfalfa Genotypes under Ecological Conditions of Eastern Croatia. VII. Alps-Adria Scientific Workshop. *Cereal Research Communications*. 36: 651- 654.
- Türk M. Yağlıkara S. Albayrak S. 2018. Klon Parsellerinden Seçilen Bazı Yonca (*Medicago sativa* L.) Genotiplerinin Ot Verimi ve Kalitelerinin Belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 13(2): 52-59.
- Ünalp E. 2014. Farklı Gelişme Dönemleri ve Biçim Sıralarında Yonca (*Medicago sativa* L.) Kuru Otunun Ham Protein, Selüloz ve Bazı Mikrobiyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi. *Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi*.
- Van Soest PJ. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant* (2nd Ed.). Ithaca. N.Y.: Cornell University Press.
- Van Soest PJ. Robertson JD. Lewis BA. 1991. Methods For Diatery Fibre. Neutral Detergent Fibre And Non-Starch Polysaccharides İn Relation To Animals Nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74: 3583-3597.
- Yavuz M, 2005. Bazı Ruminant Yemlerinin Nispi Yem Değeri ve İn vitro Sindirim Değeri Belirlenmesi. *GOÜ. Ziraat Fakültesi*, 22 (1): 97-101.
- Yılmaz M. Albayrak S. 2016. Isparta Ekolojik Koşullarında Bazı Yonca (*Medicago Sativa* L.) Çeşitlerinin Ot Verim Ve Kalitelerinin Belirlenmesi. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 25(1): 42-47.

**Atıf İçin:** Mut Z, Erbaş Köse ÖD, Akay H, Sezer E, 2021. Orta ve Batı Karadeniz Bölgesinden Toplanan Yerel Yulaf Genotiplerinin Bazı Özelliklerinin Değerlendirilmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1582-1594.

**To Cite:** Mut Z, Erbaş Köse ÖD, Akay H, Sezer E, 2021. Evaluation of Some Characteristics of Local Oat Genotypes Collected from the Central and Western Black Sea Region. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1582-1594.

## **Orta ve Batı Karadeniz Bölgesinden Toplanan Yerel Yulaf Genotiplerinin Bazı Özelliklerinin Değerlendirilmesi**

Zeki MUT<sup>1</sup>, Özge Doğanay ERBAŞ KÖSE<sup>1\*</sup>, Hasan AKAY<sup>2</sup>, İsmail SEZER<sup>2</sup>

**ÖZET:** Bu çalışmada, Orta ve Batı Karadeniz bölgesinde 10 ilden (Düzce, Bolu, Zonguldak, Karabük, Kastamonu, Ordu, Sinop, Samsun, Amasya ve Tokat) toplanan 251 adet yulaf populasyonu ve 4 adet yulaf çeşidi kullanılmıştır. İki yıllık çalışma sonuçlarına göre, bütün incelenen özellikler bakımından yıllar ve genotipler arasında önemli farklar olduğu belirlenmiştir. Yıl × genotip etkileşimi sadece salkımda başakçık sayısı, salkımda tane sayısı, salkımda tane ağırlığı, tane boyu ve iç oranı için önemli bulunmuştur. Çalışmada genotipler arasında oldukça geniş varyasyon tespit edilmiş ve genotiplerin salkım uzunluğu 21.27 ile 37.70 cm, salkımda başakçık sayısı 26.08 ile 75.35 adet, başakçıkta tane sayısı 1.64 ile 2.43 adet, salkımda tane sayısı 51.54 ile 155.00 adet, salkımda tane ağırlığı 1.44 ile 4.85 g, bin tane ağırlığı 18.55 ile 38.41 g, tane boyu 9.81 ile 15.72 mm, tane eni 1.96 ile 2.94 mm, iç oranı % 51.85 ile 77.78 ve dış kavuz uzunluğu 18.12 ile 29.76 mm arasında değişmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Yulaf, yerel çeşit, toplama, salkım

### **Evaluation of Some Characteristics of Local Oat Genotypes Collected from the Central and Western Black Sea Region**

**ABSTRACT:** In this study, 251 oat populations and 4 oat cultivars collected from 10 provinces (Düzce, Bolu, Zonguldak, Karabük, Kastamonu, Ordu, Sinop, Samsun, Amasya ve Tokat) in the Central and Western Black Sea region were used. According to the results of the two-year, it was determined that there were significant differences between years and genotypes in terms of all characteristics examined. Year × genotype interaction was found to be significant only for the number of spikelet per panicle, the number of kernels per panicle, kernel weight per panicle, kernel length and groat percentage. In the study, a large variation was determined among genotypes in terms of characteristics examined, and the panicle length ranged from 21.27 to 37.70 cm, number of spikelet per panicle from 26.08 to 75.35 pieces, number of kernel per spikelet from 1.64 to 2.43 pieces, number of kernel per panicle from 51.54 to 155.00 pieces, kernel weight per panicle from 1.44 to 4.85 g, thousand-kernel weight from 18.55 to 38.41 g, kernel length from 9.81 to 15.72 mm, kernel width from 1.96 to 2.94 mm, groat percentage 51.85 to 77.78 % and glume length from 18.12 to 29.76 mm.

**Keywords:** Oat, local cultivar, collecting, panicle

<sup>1</sup>Zeki MUT ([Orcid ID: 0000-0002-1465-3630](https://orcid.org/0000-0002-1465-3630)), Özge Doğanay ERBAŞ KÖSE ([Orcid ID: 0000-0003-0429-3325](https://orcid.org/0000-0003-0429-3325)), Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Bilecik, Türkiye

<sup>2</sup>Hasan AKAY ([Orcid ID: 0000-0003-1198-8686](https://orcid.org/0000-0003-1198-8686)), İsmail SEZER ([Orcid ID: 0000-0002-8407-7448](https://orcid.org/0000-0002-8407-7448)), Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Samsun, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Özge Doğanay ERBAŞ KÖSE, e-mail: ozgedoganay.eras@bilecik.edu.tr

## GİRİŞ

*Poaceae* familyanda yer alan yulaf (*Avena sativa* L., 2n=42), yılda yaklaşık 23.1 milyon ton üretimi ile Dünya tahıl üretiminde altıncı sırada yer almaktadır (Anonim, 2019a). Türkiye’de ise 265 bin ton üretime sahiptir (Anonim, 2019b). Dünyada yulafın *Avena sativa*, *Avena byzantina* ve *Avena nuda* olmak üzere üç hexaploid türünün yetiştiriciliği yapılmaktadır (Webster, 2012).

Yulaf çoğunlukla tanesi ve otu hayvan beslemede kullanılmak amacıyla yetiştirilir. Yulaf tanesinin yüksek miktarda protein, çözümlü lif ( $\beta$ -glukanlar), doymamış yağ asitleri, vitamin, mineral ve antioksidanları içermesi ve bu besinsel maddelerin insan sağlığı üzerine öneminin anlaşılmasıyla insan gıdası olarak ve gıda sanayinde kullanımı artmaktadır (Buerstmayr ve ark., 2007). Ayrıca, kötü kolesterolü düşürmesi ve kalp-damar rahatsızlıklarını azaltması gibi sağlık üzerine etkileri de yulafa olan ilgiyi artırmakta ve onu değerli bir ürün haline getirmektedir (Finnan ve ark., 2019).

Dünya çapında 200.000'den fazla yabani ve tarımı yapılan *Avena* türü tohum gen bankalarında saklanmaktadır (Diederichsen, 2008). Bu tohumlar, yerel çeşitler, bunların yabani akrabaları, artık günümüzde yetiştirilmeyen eski çeşitler ve genetik özellikleri belirlenmiş genotiplerden oluşmaktadır. Akdeniz ve Yakın Doğu gen merkezlerinin kesişme noktasında yer alan Türkiye, genetik çeşitlilik ve gen kaynakları yönünden oldukça zengindir (Çalışkan ve Koç, 2019). Ancak, ülkemizde hızla artan nüfus, gelişen teknoloji ve endüstrileşme, artan yapılaşma, köyden kente göç gibi çevresel problemlerle birlikte insanların bilinçsiz ve duyarsız davranışları, tarım yapılan toprakların hızla ve üzerindeki doğal zenginlikleri ile kaybolmasına neden olmaktadır.

Ülkemize paralel olarak tüm dünyada da benzer problemlerin yaşanması ve bunların bazı kurumlar tarafından fark ediliyor olması, son yıllarda doğal kaynakların muhafazası ve korunmasına yönelik yapılan çalışmaların artırılması ve desteklenmesini sağlamaktadır. Çünkü bir ülkenin zenginliği sahip olduğu doğal kaynaklara dayalıdır ve biyolojik zenginlikte canlı doğal kaynakların çeşitliliği ile ölçülür. Biyolojik çeşitlilik, başta gıda olmak üzere insanların temel ihtiyaçlarını karşılamasında vazgeçilmez bir yere ve öneme sahiptir. Kültürü yapılan beyaz yulafın (*Avena sativa* L.) ve kırmızı yulafın (*Avena byzantina* Koch.) kökeninin Anadolu olduğu belirtilmekte ve ülkemizin yulaf form ve çeşit zenginliği bakımından özel bir önem taşıdığı bildirilmiştir (Kün, 1988).

Yulaf ıslahında genetik havuzunda yararlı genler sağlayabilecek genotiplerin muhafaza edilmesi, karakterize edilmesi ve kullanılması büyük önem taşımaktadır. Dünyada ve ülkemizde çok sayıda yulaf çeşidi, yerel çeşitlerden seçilen tek bitkilerden veya bu yerel çeşitlerin yer aldığı melezlerden elde edilmiştir (Nikoloudakis ve ark., 2016). Islahçılar tane verimini arttırmak için verimi etkileyen morfolojik ve bazı tanımlayıcı özelliklerinin belirlenmesinin seleksiyonda etkinliği artırmak için çok önemli olduğunu bildirmişlerdir (Vaisi ve Golparvar, 2013; Batalova ve ark., 2010; Mut ve ark., 20018b).

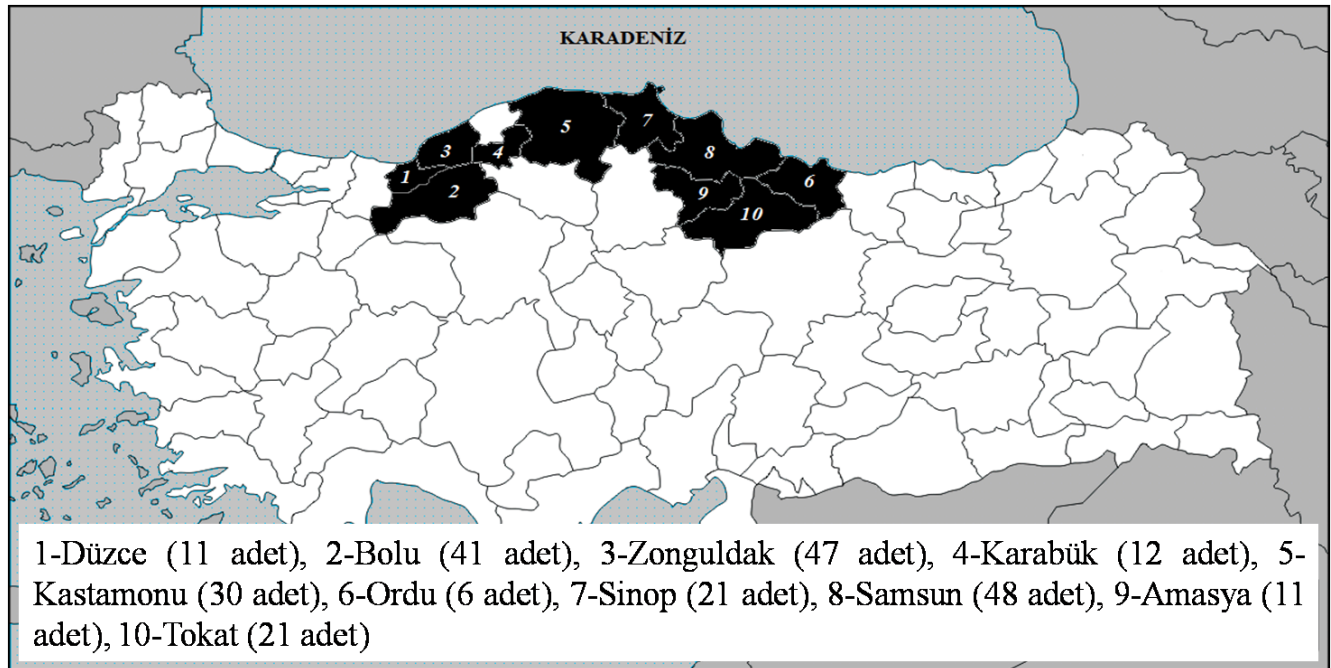
Bu çalışma, Orta ve Batı Karadeniz bölgesinden toplanan 251 yulaf genotipi ile 4 standart çeşidinin salkım uzunluğu, salkımda başakçık sayısı, başakçıkta tane sayısı, salkımda tane sayısı, salkımda tane ağırlığı, bin tane ağırlığı, tane boyu, tane eni, iç oranı ve dış kavuz uzunluğu bakımından varyasyonunu belirlemek amacıyla iki yıl süreyle yürütülmüştür.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmada, Orta ve Batı Karadeniz bölgesindeki 10 ilden toplanan 251 yulaf populasyonu ile 4 standart çeşit kullanılmıştır. Bu genotiplerden 1-11 numaralı genotipler Düzce (11 adet), 12-52 numaralı genotipler Bolu (41 adet), 53-99 numaralı genotipler Zonguldak (47 adet), 100-111 numaralı genotipler Karabük (12 adet), 112-141 numaralı genotipler Kastamonu (30 adet), 142-147 numaralı genotipler Ordu (6 adet), 148-168 numaralı genotipler Sinop (21 adet), 169-216 numaralı genotipler Samsun (48

adet), 217-230 numaralı genotipler Amasya (14 adet) ve 231-251 numaralı genotipler ise Tokat (21 adet) illerinden toplanmıştır. Denemelerde standart çeşit olarak Faikbey, Seydişehir, Yeşilköy-330 ve Yeşilköy-1779 çeşitleri kullanılmıştır.

Toplanan örnekler Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi deneme alanında 2008-2009 ve 2009-2010 yetiştirme sezonlarında Augmented deneme desenine (Federer, 2005) göre standart çeşitlerin 12 kez tekrarlanarak 2 yıl süreyle yetiştirilmiştir. Ekim işlemi her iki yılda da m<sup>2</sup>'de 450 canlı tohum bulunacak şekilde 6 metre uzunluğundaki parsellere 20 cm sıra aralığında 4 sıra olacak şekilde, birinci yıl 18.11.2008 ve ikinci yıl 05.11.2009 tarihinde elle yapılmıştır. Yabancı ot mücadelesi kardeşlenme döneminde herbisit (Tribenuran-metil (DF) %75) kullanılarak yapılmıştır. Ekimle birlikte dekara 13 kg Di-amonyum fosfat (DAP) ile 8 kg amonyum nitrat (% 33 N) gübresi verilmiştir. Kardeşlenme döneminde 13 kg amonyum nitrat (% 33 N) üst gübre olarak uygulanmıştır. Hasat işlemi her iki yılda da Haziran ayında orakla toprak yüzeyinden 5 cm yükseklikten biçilerek yapılmıştır. Hasat sonrası 3-5 gün parsellerde kurumaya bırakılan örnekler parsel harman makinesi ile harmanlanmıştır.



Şekil 1. Orta ve Batı Karadeniz Bölgesinde Tohum Toplanan İller

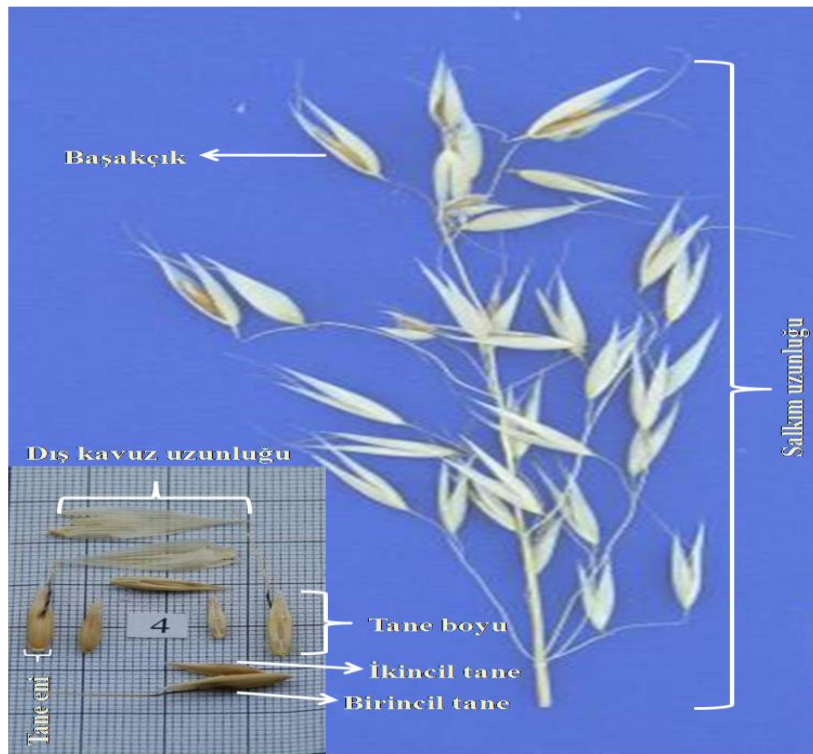
Samsun ilinin yulaf yetiştirme dönemine ait uzun yıllar yağış toplamı 498 mm, çalışmanın yürütüldüğü 2008-2009 ve 2009-2010 yıllarına ait yağış toplamları sırasıyla 553 mm ve 635 mm olmuştur. Uzun yıllara, 2008-2009 ve 2009-2010 yetiştirme dönemine ait ortalama sıcaklıklar sırasıyla 12, 13 ve 14 °C olmuştur.

Deneme alanı topraklarının bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerini tespit etmek üzere ekim öncesi 0-40 cm derinlikten alınan toprak örnekleri alınmıştır. Her iki yılda da deneme alanı toprağının killi bir bünyeye sahip, tuzsuz, fosfor içeriğinin iyi ve potasyum içeriğinin düşük olduğu görülmektedir. Deneme alanı toprağının birinci yıl pH bakımından nötr, kireçsiz organik madde bakımından orta seviyede, ikinci yıl ise pH bakımından hafif alkali, kireçli ve organik madde bakımından iyi seviyede olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, 10 bitkide belirlenen salkım uzunluğu ana saptaki salkımın ilk boğumu ile son boğumu arasındaki uzunluk cm olarak, salkımda başakçık sayısı her salkımdaki tüm başakçıklar

sayılarak adet olarak, başakçıkta tane sayısı salkımdaki taneler sayılıp salkımdaki başakçık sayısına oranlanarak adet olarak, salkımda tane sayısı salkımdaki tüm taneler sayılarak adet olarak, salkımda tane ağırlığı ise salkımdaki tanelerin ağırlıklarının hassas terazide tartılmasıyla g olarak belirlenmiştir. Bu salkımlardan elde edilen 25 başakçıkta kavuzların uzunluğu dijital kumpas ile ölçülerek dış kavuz uzunluğu mm olarak ölçülmüştür. Tane boyu ve eni bu salkımlardan elde edilen 25 adet kavuzlu tanenin boyu ve ölçülerek mm olarak belirlenmiştir (Şekil 2). İç oranı 40 adet tane kavuzlarından ayrılmış kavuzsuz taneler tartılarak toplam ağırlığa oranlanmış ve % olarak ifade edilmiştir. Bin tane ağırlığı her parselden elde edilen örneklerden 4 defa 100'er tane sayılarak tartılmış, ortalaması alınarak 10 ile çarpılmış ve g olarak ifade edilmiştir.

Denemede elde edilen veriler kullanılarak, popülasyonun genel durumunu tanımlamak amacıyla özelliklere ait ortalamaların dağılımları (histogram grafikleri), elde edilen verilerin yıllar üzerinden birleştirilmiş varyans analizleri ve incelenen özellikleri arasındaki Pearson korelasyon katsayıları JMP-07 paket programında hesaplanmıştır (JMP, 2007).



Şekil 2. Yulaf salkımının kısımları

## BULGULAR VE TARTIŞMA

İncelenen bütün özellikler bakımından genotipler ve yıllar arasında önemli ( $P < 0.01$ ) farklar belirlenmiştir. Salkımda başakçık sayısı, salkımda tane sayısı, salkımda tane ağırlığı, tane boyu ve iç oranı üzerine ise yıl  $\times$  genotip interaksiyonun etkisi önemli bulunmuştur (Çizelge 1).

Çalışmada, salkım uzunluğu, salkımda başakçık sayısı, başakçık tane sayısı, salkımda tane sayısı, salkımda tane ağırlığı ve bin tane ağırlığının ortalama dağılımlarını gösteren histogram grafikleri ve tanımlayıcı verileri Şekil 3'de, tane boyu, tane eni, iç oranı ve dış kavuz uzunluğunun ortalama dağılımlarını gösteren histogram grafikleri ve tanımlayıcı verileri Şekil 4'de verilmiştir. Yıllara göre genotiplerin incelenen özelliklerine ait ortalama değerler Şekil 5'de verilmiştir. En yüksek ve en düşük değerleri gösteren beşer genotip Çizelge 2'de verilmiştir. Bu çalışmada incelenen özellikler yulaf ıslah programlarında düzenli olarak ölçülen önemli kriterlerdir (Boyle ve ark., 2015).



**Çizelge 1.** İncelenen özelliklere ait yıllara, genotiplere ve yıl x genotip interaksiyonlarına ait kareler ortalaması ve önemlilikleri

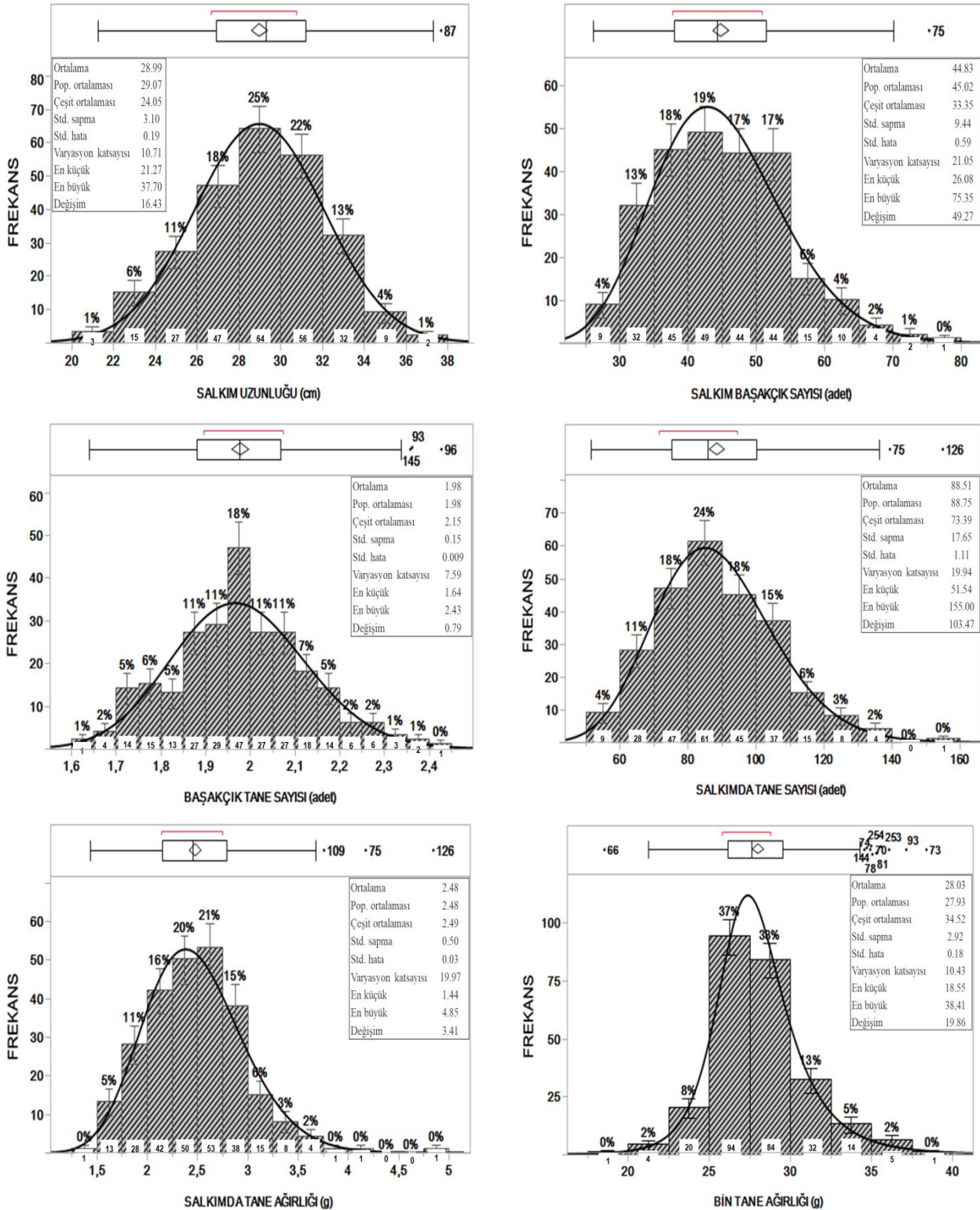
| Varyasyon kaynağı        | Yıl (Y)     | Genotip (G) | Y × G interaksiyonu |
|--------------------------|-------------|-------------|---------------------|
| Serbestlik derecesi      | 1           | 254         | 254                 |
| Salkım uzunluğu          | 1373.1**    | 27.96**     | 11.15               |
| Salkımda başakçık sayısı | 537.48**    | 194.67**    | 94.72**             |
| Başakçıkta tane sayısı   | 56.03**     | 0.21**      | 0.02                |
| Salkımda tane sayısı     | 147804.56** | 743.39**    | 425.25**            |
| Salkımda tane ağırlığı   | 202.13**    | 0.46**      | 0.32**              |
| Bin tane ağırlığı        | 1867.33**   | 25.35**     | 7.33                |
| Tane boyu                | 357.40**    | 2.06**      | 1.32**              |
| Tane eni                 | 0.19**      | 0.06**      | 0.02                |
| Tane\kavuz oranı         | 1212.43**   | 21.21**     | 13.42**             |
| Dış kavuz uzunluğu       | 1413.87**   | 14.96**     | 2.83                |

\*\*  $P < 0.01$ **Salkım Uzunluğu**

Çalışmada salkım uzunluğu bakımından genotipler ve yıllar arasında önemli ( $P < 0.01$ ) farklar belirlenmiştir. Genotiplerin salkım uzunluğu 21.27 (G145) ile 37.70 (G187) cm arasında değişmiş ve ortalama 28.99 cm olmuştur. Genotiplerin % 25'inin (64 genotip) salkım uzunluğu 28-30 cm sınıf aralığında yoğunlaşmıştır (Şekil 3). Salkım uzunluğu ortalaması toplanan populasyonlarda (29.07 cm) çeşitlerden (24.05 cm) daha uzun olmuştur (Şekil 3). Salkım uzunluğu birinci yıl ikinci yıldan daha uzun gerçekleşmiştir (Şekil 5). Yapılan çalışmalarda salkım uzunluğu bakımından genotipler arasında önemli farkların olduğu bildirilmiştir (Dumlupınar ve ark., 2017; Çalışkan ve Koç, 2019). Salkım uzunluğunu Erbaş ve Mut (2013) 16.9 ile 25.0 cm, Brunava ve ark., (2014) birinci yıl 17.0 cm ve ikinci yıl 16.0 cm olarak bildirmişlerdir. Kazıu ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada salkım uzunluğunun 26.0 ile 37.0 cm arasında değiştiğini ve uzun salkım uzunluğuna sahip çeşitlerin tane verimlerinin de yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, aynı araştırmacılar salkım uzunluğuna genotipin daha fazla etki ettiğini bildirmişlerdir.

**Salkımda Başakçık Sayısı**

Yapılan birleştirilmiş varyans analizi sonuçlarına göre salkımda başakçık sayısının yıl, genotip ve yıl × genotip interaksiyonundan istatistik olarak %1 önemlilik seviyesinde etkilendiği belirlenmiştir (Çizelge 1). Genotiplerin salkımda başakçık sayısı 26.08 (G131) ile 75.35 (G135) adet arasında değişmiştir. Genotiplerin % 19'unun (49 genotip) salkımda başakçık sayısı 40-45 adet sınıf aralığında değişmiştir. Salkımda başakçık sayısı ortalaması 44.83 adet ve populasyonların ortalaması (45.02 adet) çeşitlerin ortalamasından (33.25 adet) daha yüksek olmuştur (Şekil 3). Salkımda başakçık sayısı birinci yıl 45.90 adet, ikinci yıl 43.77 adet olmuştur (Şekil 5). Erbaş ve Mut (2013) 121 yulaf genotipi ile yaptıkları çalışmada salkımda başakçık sayısının genotipler arasında önemli farklar gösterdiğini ve ortalama 26.3 adet olduğunu bildirmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda salkımda başakçık sayısı 38.5 ile 107.7 adet (Mut ve ark., 2011), 42.33 ile 125.67 adet (Kapoor ve ark., 2011), 60.78 ile 102.11 adet (Krishna ve ark., 2014) ve 39.2 ile 49.7 (Batalova ve ark., 2015) arasında değişmiştir.



Şekil 3. 255 adet yulaf genotipinin salkım uzunluğu, salkımda başakçık sayısı, başakçıkta tane sayısı, salkımda tane sayısı, salkımda tane ağırlığı ve bin tane ağırlığını gösteren histogram grafikleri ve tanımlayıcı istatistik verileri

### Başakçıkta Tane Sayısı

Birleştirilmiş varyans analizine göre, başakçıkta tane sayısı bakımından yıllar ve genotipler arasında önemli ( $P < 0.01$ ) farklar belirlenmiştir. Genotiplerin başakçıkta tane sayısı 1.64 (G11) ile 2.43 (G96) adet arasında değişmiş ve ortalama 1.98 adet olmuştur. Genotiplerin %18'inin (47 genotip) başakçıkta tane sayısı 1.85-2.0 adet sınıf aralığında değer göstermiştir.

Başakçıkta tane sayısı ortalaması çeşitlerde 2.15 adet iken, popülasyonlarda 1.98 adet olarak belirlenmiştir (Şekil 3). Şekil 5'e göre, başakçıkta tane sayısı birinci yıl 2.31 adet, ikinci yıl 1.35 adet olmuştur (Şekil 5). Kültürü yapılan yulafların çoğunda (*Avena sativa* L. ve *Avena byzantina* L.) başakçık başına iki adet çiçek bulunur. Fakat bazı genotiplerde başakçıkta üç çiçek bulunur ki bu durum kalıtsal bir özelliktir (McBratney ve Frey, 1983). Bu çiçeklerin oluşturduğu tanelerin iriliği dipten üsttekinе gidildikçe azalmaktadır (Kün, 1988). Yapılan birçok çalışmada başakçıkta tane sayısı bakımından genotipler arasında önemli farklar olduğu bildirilmiştir (Vilaró ve ark., 2004; Erbaş ve Mut, 2013). Vilaró ve ark. (2004) birçok yulaf çeşidi ile yaptıkları çalışmada başakçıkta tane sayısının 1.91 ile 2.92 adet arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

### Salkımda Tane Sayısı

Salkımdaki tane sayısı yulafta tane verimi için önemli bir özelliktir. Yapılan birleştirilmiş varyans analizi sonuçlarına göre salkımda tane sayısının yıllara ve genotiplere göre istatistiki olarak % 1 seviyesinde önemli olduğu ve salkımda tane sayısına yıl  $\times$  genotip interaksiyonunun etkisinin önemli ( $P<0.01$ ) bulunduğu belirlenmiştir (Çizelge 1). Çalışmada genotiplerin salkımda tane sayısı 51.54 (G244) ile 155.00 adet (G126) arasında değişmiştir. Salkımda tane sayısı bakımından çeşitlerin ortalaması (73.39 adet) genel ortalamanın (88.51 adet) altında, popülasyonların ortalaması (88.75 adet) genel ortalamanın üstünde bulunmuştur. Genotiplerin % 24'ünün (81 genotip) salkımda tane sayısının 80-90 adet sınıf aralığında yer aldığı tespit edilmiştir (Şekil 3). Genotiplerin salkımda tane sayısı ortalaması birinci yıl 105.49 adet ikinci yıl ise 71.52 adet olarak gerçekleşmiştir (Şekil 5). Salkımda tane sayısının seleksiyonda en uygun kriter olabileceği bildirilmiştir (Sürek ve Valentine, 1996). Batalova ve ark. (2010) salkımda tane sayısının kalıtımının yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Dumlupınar ve ark. (2011) yerel yulaf genotipleri ile yaptıkları çalışmada salkımdaki tane sayısının genotip ve yıllardan etkilendiğini, bu özelliğin 59.0 ile 196.40 adet arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Dumlupınar ve ark. (2012) 17 yulaf genotipinde yaptıkları çalışmada, salkımda tane sayısının tane verimine % 34.30, bitki boyuna % 10.52, salkımda tane ağırlığına % 44.57 ve bin tane ağırlığına % 8.08 oranında etki ettiğini bildirmişlerdir. Yapılan diğer çalışmalarda salkımda tane sayısı 58.7 ile 167.9 adet (Mut ve ark., 2011), 10 ile 198 adet (Dumlupınar ve ark., 2017) ve 93.7 ile 153.6 adet (Kaziu ve ark., 2019) arasında değişmiştir.

### Salkımda Tane Ağırlığı

Birleştirilmiş yılların analizine göre, salkımda tane ağırlığı bakımından yıllar ve genotipler arasında önemli farklar belirlenmiştir. Yıl  $\times$  genotip interaksiyonunda bu özellik bakımında istatistiki olarak önemli ( $P<0.01$ ) bulunmuştur (Çizelge 1). Genotiplerin salkımda tane ağırlığı 1.44 (G149) ile 4.85 g (G126) arasında değişmiş ve ortalama 2.48 g olmuştur. Salkımda tane ağırlığının en yoğun olduğu sınıf aralığı 2.25 ile 2.75 g olmuş ve bu sınıflarda 103 genotip yer almıştır. Salkımda tane ağırlığı ortalaması bakımından çeşitler (2.49 g) ve populasyonlar (2.48 g) yakın değerler göstermiştir (Şekil 3). Salkımda tane ağırlığı birinci yıl (3.11 g) ikinci yıldan (1.85 g) daha yüksek değerlere sahip olmuştur (Şekil 5). Daha önce yapılan çalışmalarda ıslahçıların tane verimini arttırabilmek için bu özelliği dikkate alabilecekleri bildirilmiştir (Sawicki, 1984). Mut ve ark. (2011) dünyanın farklı yerlerinden 81 yulaf çeşidi ile farklı lokasyonlarda yaptıkları çalışmada, salkımda tane ağırlığının hem genotip hem de çevreden etkilendiğini ve 1.90 ile 4.97 g arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Dumlupınar ve ark. (2017)'da 384 yerel yulaf genotipi ile yaptıkları çalışmada genotiplerin salkımda tane ağırlığının 0.53 ile 4.23 g arasında değiştiğini, Kutlu ve Gülmezoğlu (2020) ise farklı tarımsal uygulamaların ve ekim zamanının salkımda tane ağırlığı üzerine etkili olduğunu bildirmişlerdir.

### Bin tane ağırlığı

Bin tane ağırlığı tanenin büyüklüğünü ve besin değerini tanımlamaktadır. Çalışmada genotip ve yıllar arasında bin tane ağırlığı bakımından önemli ( $P<0.01$ ) farklar olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 1). Genotiplerde bin tane ağırlığı 18.55 (G66) ile 38.41 g (G73) arasında değişmiş ve ortalama 28.03 g olmuştur. Bin tane ağırlığı en yoğun 20 ile 30 g (178 genotip) sınıf aralığında belirlenmiş ve 52 genotip 30 g'ın üstünde bin tane ağırlığına sahip olmuştur (Şekil 3). Bin tane ağırlığı ortalaması çeşitlerde 34.52 g ile populasyonlardan (27.93 g) daha yüksek (Şekil 3), birinci yıl (29.98 g) ise ikinci yıldan (Şekil 5) daha yüksek gerçekleşmiştir. Bu özellik genotip farklılıklarından, yetiştirme koşullarından ve uygulanan tarımsal işlemlerden etkilenmektedir (Mut ve ark., 2018a; Kaziu ve ark., 2019; Kutlu ve Gülmezoğlu, 2020). Bin tane ağırlığı bakımından çeşitler arasında önemli varyasyon ve yüksek kalıtım gözlemlendiğini bildirilmiştir (Dumlupınar ve ark., 2017; Mut ve ark. 2018a). Yapılan çalışmalarda bin tane ağırlığının 20.9 ile 53.01 g arasında değiştiği bildirilmiştir (Vilaró ve ark., 2004; Buerstmayr ve ark., 2007; Mut ve ark., 2016).

### Tane Boyu ve Tane Eni

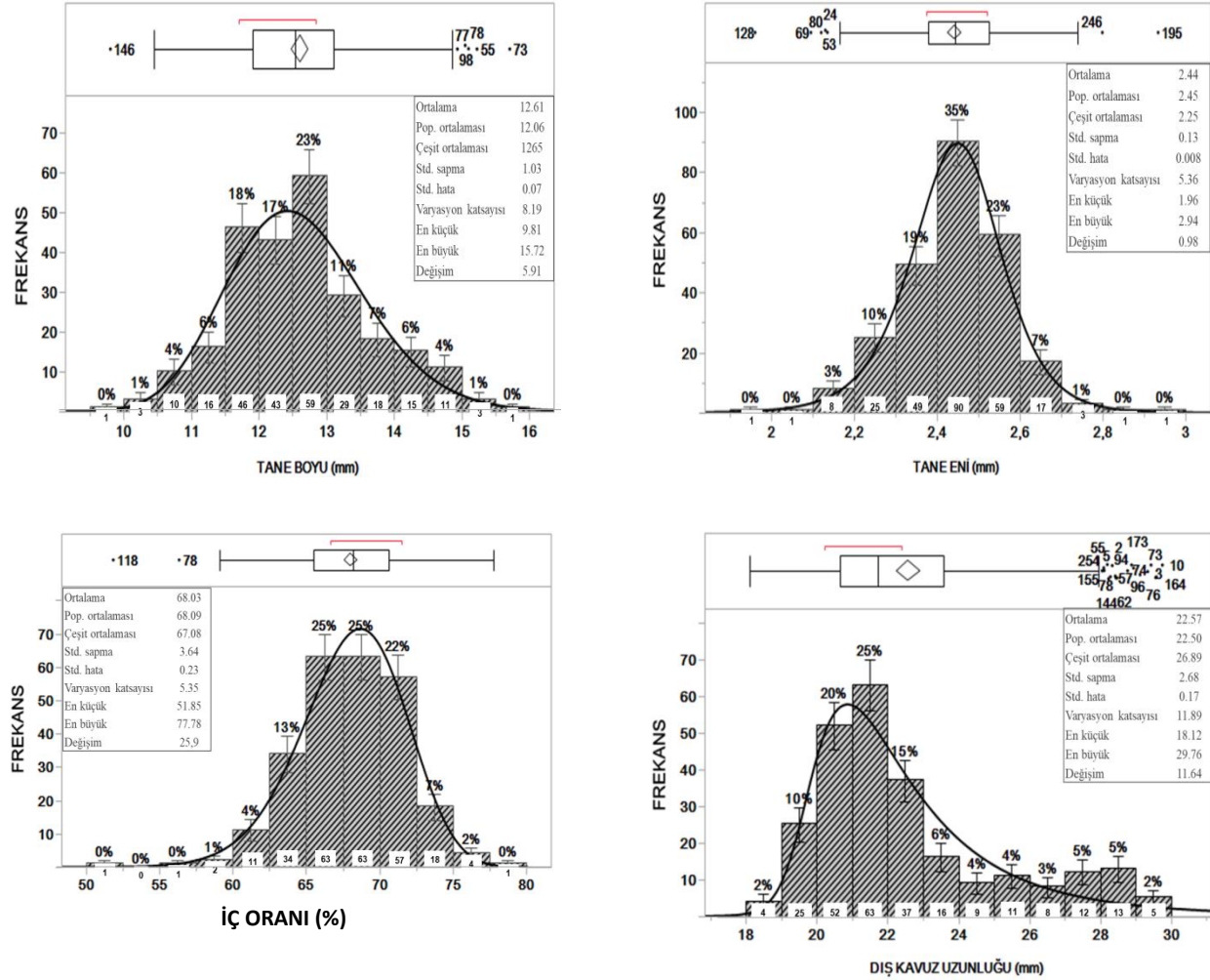
Çalışmada tane boyu ve tane eni bakımından yıl ve genotipler arasında önemli farklılıklar belirlenmiştir. Ayrıca tane boyu üzerine yıl  $\times$  genotip interaksiyonunda istatistiki olarak önemli olduğu görülmüştür. Genotiplerin tane boyu ve eni sırasıyla 9.81 (G146) ile 15.72 mm (G73) arasında ve 1.96 (G128) ile 2.94 mm (G195) arasında değişmiştir. Tane boyu ve eni ortalaması sırasıyla 12.61 mm ve 2.44 mm olarak belirlenmiştir. Tane boyu ve eni çeşitlerde sırasıyla 12.65 mm ve 2.25 mm, populasyonlarda ise sırasıyla 12.06 mm ve 2.45 mm olarak ölçülmüştür. Genotipler en yoğun tane boyuna 12.5 ile 13.0 mm (59 genotip) sınıf aralığında, tane enine ise 2.4 ile 2.5 mm (90 genotip) sınıf aralığında sahip olmuşlardır (Şekil 4). Genotiplerin birinci ve ikinci yıl tane boyu sırasıyla 13.46 mm ve 15.78 mm ve tane eni sırasıyla 2.47 mm ve 2.42 mm olmuştur (Şekil 5).

Tane boyutu, tane ağırlığı ile ilişkili olduğu için yulafta önemli bir verim bileşenidir (Koeper ve ark., 1993). Yulaf tanelerinin boyutu, yulafın ticari değerinin belirlenmesinde bir ölçü olarak ele alınmaktadır (Rasane ve ark., 2015). Ayrıca tane boyutu un verimine doğrudan etkiye sahip olduğundan öğütme sanayinde büyük öneme sahiptir (Doehlert ve ark., 2006). Vilaró ve ark. (2004), yapmış oldukları çalışmada, tane boyunun eski çeşitlerde 6.90-10.72 mm, yeni çeşitlerde 8.12-10.18 mm ve seçilen hatlarda 8.69-10.36 mm arasında değiştiğini ve bu özelliğin genotipik farklılıktan kaynaklandığını bildirmişlerdir. Mut ve ark. (2018b) yulaf çeşitlerinde salkımın farklı kısımlarından elde edilen tanelerin fiziksel ve kimyasal içeriklerini inceledikleri çalışmada tane boyu ve eni üzerine genotip, tanenin salkımdaki konumu ve yılların etkili olduğunu bildirmişlerdir. Çalışkan ve Koç (2019) 164 yulaf genotipi ile yaptıkları çalışmada yerel genotiplerde ortalama tane boyu ve enini sırasıyla 15.49 mm ve 2.63 mm olarak belirlemişlerdir.

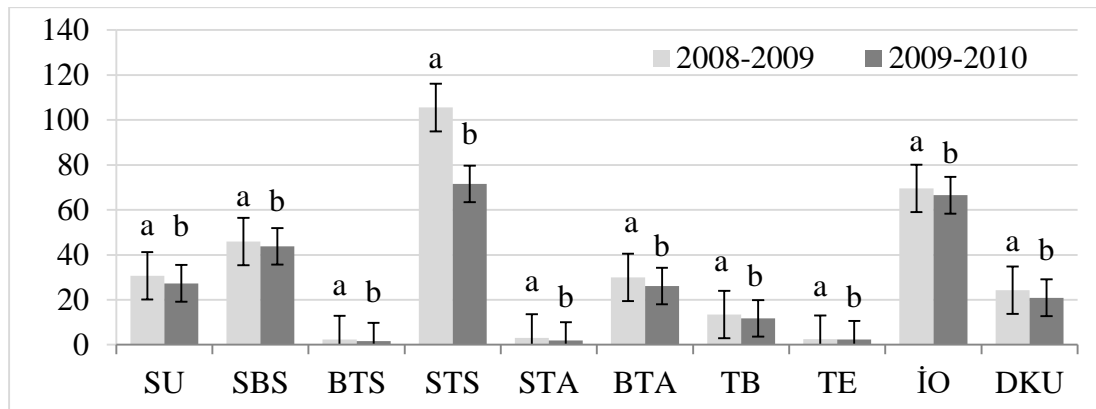
### İç Oranı

Yulafta iç oranı öğütme teknolojisinde önemli kalite özelliklerinden birisi olup yüksek olması istenmektedir (Doehlert ve ark., 1999). Birleştirilmiş yılların analizine göre, iç oranı bakımından yıllar ve genotipler arasında istatistiki olarak önemli ( $P<0.01$ ) farklar tespit edilmiştir. Ayrıca bu özelliğin yıl  $\times$  genotip interaksiyonundan istatistiki olarak ( $P<0.01$ ) etkilendiği belirlenmiştir (Çizelge 1). Çalışmada genotiplerin iç oranı % 51.85 (G118) ile 77.78 (G116) arasında değişmiş ve ortalaması % 68.03 olmuştur. Genotiplerin % 50'sinin (136 genotip) iç oranı % 65-70 sınıf aralığında yer almıştır. İç oranı çeşitlerde % 67.08, populasyonlarda ise % 68.09 olarak belirlenmiştir (Şekil 4). İç oranı birinci yıl (% 69.58) ikinci yıldan (% 66.51) daha yüksek olmuştur (Şekil 5). Yapılan bir çalışmada yulafın iç oranına, genotip ve çevrenin etkisinin hemen hemen eşit olduğu bildirilmiştir (Doehlert ve ark., 2001). Welch ve

ark. (2000), iç oranının % 32.7-62.1 arasında değiştiğini, bu özellik bakımından yulaf tür içinde ve türler arasında büyük varyasyonun olduğunu vurgulamışlardır. Buerstmayr ve ark. (2007), 120 yulaf çeşidinde yaptıkları çalışmada, çeşitler arasında önemli varyasyonun olduğunu ve iç oranının % 62.0-73.5 arasında değiştiğini ifade etmişlerdir. Yulaf kavuz oranının yüksek olmasının, bu bitkinin hayvan yemi olarak kullanımını sınırladığı bildirilmiştir (Sainio ve ark., 2004).



Şekil 4. 255 adet yulaf genotipinin tane boyu, tane eni, tane/kavuz oranı ve dış kavuz uzunluğunu gösteren histogram grafikleri ve tanımlayıcı istatistik verileri



Şekil 5. Yulaf genotiplerinin 2008-2009 ve 2009-2010 yıllarına ait incelenen özelliklerinin ortalama değerleri (SU: Salkım uzunluğu, SBS: Salkımda başakçık sayısı, BTS: Başakçıkta tane sayısı, STS: Salkımda tane sayısı, STA: Salkımda tane ağırlığı, BTA: Bin tane ağırlığı, TB: Tane boyu, TE: Tane eni, İÖ: Tane/kavuz oranı, DKU: Dış kavuz uzunluğu)

### Dış Kavuz Uzunluğu

İki yılın birleştirilmiş analizine göre, dış kavuz uzunluğu bakımından yıllar ve genotipler arasında önemli ( $P<0.01$ ) farklar belirlenmiştir (Çizelge 1). Genotiplerin dış kavuz uzunluğu 18.12 (G1) ile 29.76 mm (G10) arasında değişmiş ve ortalama 22.57 mm olmuştur. Genotiplerin % 25'sinin (63 genotip) dış kavuz uzunluğu 21-22 mm sınıf aralığında yer almıştır. Dış kavuz uzunluğu çeşitlerde 26.89 mm, populasyonlarda ise 22.50 mm olarak belirlenmiştir (Şekil 4). Dış kavuz uzunluğu birinci yıl (24.24 mm) ikinci yıldan (20.90 mm) daha düşük olmuştur (Şekil 5). Vilaro ve ark. (2004) yapmış oldukları çalışmada, dış kavuz uzunluğunun genotipik farklılıktan kaynaklandığını ve dış kavuz uzunluğunun eski çeşitlerde 19.80-29.30 mm, yeni çeşitlerde 23.40-28.30 mm ve seçilen hatlarda 23.52-28.02 mm arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Çalışkan ve Koç (2019) yaptığı çalışmada dış kavuz uzunluğunun genotipler arasında önemli farklar gösterdiğini ve dış kavuz uzunluğunun yerel genotipler ve çeşitlerde sırasıyla 24.8 mm ve 21.94 mm olduğunu bildirmişlerdir.

**Çizelge 2.** Birleştirilmiş verilere göre incelenen özelliklerin en yüksek ve en düşük değer gösterdiği beş genotip

| İncelenen özellikler     | En yüksek                     | En Düşük                |
|--------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Salkım uzunluğu          | 12, 14, 103, 196, 230         | 50, 144, 145, 164, 182  |
| Salkımda başakçık sayısı | 68, 75, 109, 118, 126         | 131, 144, 145, 216, 244 |
| Başakçıkta tane sayısı   | 93, 96, 98, 144, 145          | 11, 69, 202, 205, 221   |
| Salkımda tane sayısı     | 53, 68, 75, 118, 126          | 131, 206, 216, 244, 247 |
| Salkımda tane ağırlığı   | 75, 83, 109, 118, 126         | 133, 142, 149, 160, 244 |
| Bin tane ağırlığı        | 70, 73, 93, 96, Yeşilköy- 330 | 56, 66, 67, 111, 146    |
| Tane boyu                | 55, 73, 77, 78, 98            | 130, 146, 196, 228, 234 |
| Tane eni                 | 50, 109, 181, 195, 246        | 24, 53, 69, 80, 128     |
| Tane\kavuz oranı         | 105, 116, 243, 244, 251       | 55, 78, 118, 151, 164   |
| Dış kavuz uzunluğu       | 3, 10, 73, 76, 164            | 1, 53, 75, 133, 152     |

### İncelenen Özellikler Arasındaki İlişkiler

İki yıllık birleştirilmiş verilere göre incelenen özellikler arasındaki korelasyon katsayıları Çizelge 3'de verilmiştir. Tahıllarda verim, m<sup>2</sup>'deki bitki sayısı, salkımda başakçık sayısı ve salkımda tane sayısı gibi birçok farklı özellikten olumlu ya da olumsuz etkilenen karmaşık bir özelliktir (Kapoor ve ark., 2011). Çizelge 3'e göre, salkım uzunluğu ile SBS ( $r=0.482^{**}$ ), STS ( $r=0.419^{**}$ ), STA ( $r=0.169^{**}$ ) ve İO ( $r=0.209^{**}$ ) arasında olumlu ve önemli, BTS ( $r=-0.295^{**}$ ), BTA ( $r=-0.541^{**}$ ), TB ( $r=-0.262^{**}$ ), TE ( $r=-0.348^{**}$ ) ve DKU ( $r=-0.429^{**}$ ) arasında olumsuz ve önemli ilişki belirlenmiştir. Salkımda başakçık sayısı ile STS ( $r=0.927^{**}$ ) ve STA ( $r=0.723^{**}$ ) arasında olumlu ve önemli, BTS ( $r=-0.338^{**}$ ), BTA ( $r=-0.480^{**}$ ), TB ( $r=-0.271^{**}$ ), TE ( $r=-0.286^{**}$ ) ve DKU ( $r=-0.422^{**}$ ) arasında olumsuz ve önemli ilişki belirlenmiştir. Başakçıkta tane sayısı ile STA ( $r=0.178^{**}$ ), BTA ( $r=0.379^{**}$ ), TB ( $r=0.444^{**}$ ), TE ( $r=0.145^{*}$ ) ve DKU ( $r=0.544^{**}$ ) arasında önemli ve olumlu, İO ( $r=-0.458^{**}$ ) arasında olumsuz ve önemli ilişki belirlenmiştir. Salkımda tane sayısı ile STA ( $r=0.837^{**}$ ) arasında olumlu ve önemli, BTA ( $r=-0.379^{**}$ ), TB ( $r=-0.141^{*}$ ), TE ( $r=-0.260^{**}$ ) ve DKU ( $r=-0.279^{**}$ ) arasında olumlu ve önemli ilişki belirlenmiştir. Salkımda tane ağırlığı ile BTA ( $r=0.138^{*}$ ) arasında olumlu ve önemli ilişki belirlenirken, İO ( $r=-0.212^{*}$ ) arasında olumsuz ve önemli ilişki belirlenmiştir. Bin tane ağırlığı ile TB ( $r=0.449^{**}$ ), TE ( $r=0.476^{**}$ ) ve DKU ( $r=0.582^{**}$ ) arasında olumlu ve önemli, İO ( $r=-0.211^{**}$ ) olumsuz ve önemli ilişki belirlenmiştir. Tane boyu ile TE ( $r=0.357^{**}$ ) ve DKU ( $r=0.603^{**}$ ) arasında önemli ve olumlu, İO ( $r=-0.387^{**}$ ) arasında olumsuz ve önemli ilişki belirlenmiştir. Tane eni ile DKU ( $r=0.324^{**}$ ) arasında olumlu ve önemli ilişki belirlenirken, iç oranı ile DKU ( $r=-0.416^{**}$ ) arasında olumsuz ve önemli ilişki belirlenmiştir.

**Çizelge 3.** İki yıl süreyle değerlendirilen 255 yulaf genotiplerinin incelenen özellikler arasındaki Pearson korelasyon katsayıları ve ilişkileri

|      | SU       | SBS      | BTS      | STS      | STA     | BTA      | TB       | TE      | T\KO     |
|------|----------|----------|----------|----------|---------|----------|----------|---------|----------|
| SBS  | 0.482**  |          |          |          |         |          |          |         |          |
| BTS  | -0.295** | -0.338** |          |          |         |          |          |         |          |
| STS  | 0.419**  | 0.937**  | -0.026   |          |         |          |          |         |          |
| STA  | 0.169**  | 0.723**  | 0.178**  | 0.837**  |         |          |          |         |          |
| BTA  | -0.541** | -0.480** | 0.379**  | -0.379** | 0.138*  |          |          |         |          |
| TB   | -0.262** | -0.271** | 0.444**  | -0.141*  | 0.092   | 0.449**  |          |         |          |
| TE   | -0.348** | -0.286** | 0.145*   | -0.260** | 0.003   | 0.476**  | 0.357**  |         |          |
| T/KO | 0.209**  | 0.061    | -0.458** | -0.081   | -0.212* | -0.211** | -0.387** | 0.005   |          |
| DKU  | -0.429** | -0.422** | 0.544**  | -0.279** | 0.010   | 0.582**  | 0.603**  | 0.324** | -0.416** |

SU: Salkım uzunluğu, SBS: Salkımda başakçık sayısı, BTS: Başakçıkta tane sayısı, STS: Salkımda tane sayısı, STA: Salkımda tane ağırlığı, BTA: Bin tane ağırlığı, TB: Tane boyu, TE: Tane eni, T\KO: Tane\kavuz oranı, DKU: Dış kavuz uzunluğu

Kapoor ve ark. (2011) korelasyonun, ıslah programlarında özellikler arasındaki ilişkilerin belirlenmesinde çok önemli olduğunu bildirmiştir. Buerstmayr ve ark. (2007) yulafta tane verimi ile verim bileşenleri arasında önemli korelasyonlar olduğunu belirlemiş ve bitki boyu, bitki başına salkım sayısı ve salkım başına tane sayısının da tohum verimi ile pozitif yönde ilişkili olduğunu bildirmiştir. Aynı araştırmacı salkımda başakçık sayısı ile başakçıkta tane sayısı arasında önemli ve olumlu ilişki olduğunu bildirmiştir. Vaisi ve Golparvar (2013) yulafta yaptıkları çalışmada salkımda tane sayısı ile bin tane ağırlığı arasında olumsuz ve önemli ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Brunova ve ark. (2014) iki yıl süre ile yaptığı çalışmada her iki yılda da salkımda tane sayısı ile salkımda tane ağırlığı arasında pozitif ve önemli ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Sarı ve Ünay (2015) salkım uzunluğu ile salkımda başakçık sayısı, salkımda tane sayısı ve salkımda tane ağırlığı arasında olumlu ve önemli ilişki belirlerken, salkım boyu ile bin tane ağırlığı ve tane iriliği arasında olumsuz ve önemli ilişki belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar, verim ile bin tane ağırlığı, tane iriliği, salkımda başakçık sayısı, salkımda tane sayısı, salkımda tane ağırlığı arasında önemli pozitif ilişkilerin olduğu bildirmişlerdir (Sarı ve Ünay, 2015). Kaziu ve ark. (2019) tane verimi ile salkım uzunluğu ve salkımda tane sayısı arasında, salkım uzunluğu ile salkımda tane sayısı arasında olumlu ve önemli ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, Kaziu ve ark. (2019) salkım uzunluğu ve salkımda tane sayısı arttıkça bin tane ağırlığının azaldığını bildirmişlerdir. Dumlupınar ve ark. (2017) bitki boyu, salkım uzunluğu, salkımda tane sayısı, salkımda tane ağırlığı ve bin tane ağırlığının tane verimini artırmada önemli bir seleksiyon kriteri olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmada elde ettiğimiz bulgularda da benzer sonuçlar elde edilmiş ve incelediğimiz özelliklerin yulafta verimi iyileştirmek için seleksiyonda önemli özellikler olduğu görülmüştür.

## SONUÇ

Orta ve Batı Karadeniz Bölgesinden toplanan çok sayıda yerel yulaf genotipi ile yapılan bu çalışmada incelenen bütün özellikler bakımından genotipler arasında çok önemli varyasyonun olduğu belirlenmiştir. Popülasyonun dağılımını gösteren histogram grafikleri toplanan yulaf materyalinin oldukça zengin bir genetik tabana sahip olduğunu, bu genotiplerin çeşit geliştirmeye yönelik seleksiyon çalışmalarında ya da bazı özelliklerinden dolayı seçilerek melezleme programlarında kullanılabileceğini göstermiştir.

**TEŞEKKÜR**

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından TOVAG 107O208 numaralı proje ile desteklenmiştir.

**Çıkar Çatışması**

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

**Yazar Katkısı**

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

**KAYNAKLAR**

- Anonim, 2019a. The Food and Agriculture Organization. <http://www.fao.org/faostat/en/#data> (Erişim Tarihi: 11. 12. 2020)
- Anonim, 2019b. Türkiye İstatistik Kurumu, <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> (Erişim Tarihi: 11.12.2020)
- Batalova GA, Changzhong R, Rusakova II, Krotova NV, 2010. Breeding of Naked Oats. Russian Agricultural Sciences, 36(2): 93-95.
- Boyle R, Corke F, Howarth C, 2015. Image-Based Estimation Of Oat Panicle Development Using Local Texture Patterns. Functional Plant Biology, 42(5): 433-443.
- Brunava L, Alsina, I, Zute, S. 2014. Oat Grain Yield Variations Associated With Productivity Parameters Among Oat Cultivars Grown in Latvia. Fifth International Scientific Agricultural Symposium Agrosym 2014, Bosnia and Herzegovina, Jahorina, October 23-26, pp: 138-144.
- Buerstmayr H, Krenn N, Stephan U, Grausgruber H, Zechner H, 2007. Agronomic Performance and Quality of Oat (*Avena sativa* L.) Genotypes of Worldwide Origin Produced under Central European Growing Conditions. Field Crops Research, 101(3): 343-351.
- Çalışkan M, Koç A, 2019. Batı Akdeniz Bölgesi'ne Ait Yerel Yulaf Genotiplerinin Morfolojik Karakterizasyonu. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 28(1): 7-18.
- Diederichsen, A, 2008. Assessments of Genetic Diversity Within a World Collection of Cultivated Hexaploid Oat (*Avena sativa* L.) Based on Qualitative Morphological Characters. Genetic Resources and Crop Evolution, 55(3): 419-440.
- Doehlert DC, McMullen MS, Baumann RR, 1999. Factors Affecting Groat Percentage in Oat. Crop Sciences, 39:1858-1865.
- Doehlert DC, McMullen, MS, Hammond, JJ, (2001). Genotyping and Environmental Effects on Grain Yield and Quality of Oat Grown in North Dakota. Crop Sci., 41:1066-1072.
- Doehlert DC, McMullen MS, Jannink JL, (2006). Oat Grain/Groat Size Ratios: A Physical Basis for Test Weight. Cereal Chemistry, 83(1): 114-118.
- Dumlupınar Z, Tekin A, Herek, S, Tanrıku, A, Dokuyucu T, Akkaya A, 2017. Türkiye Kökenli Yulaf Genotiplerinin Bazı Tarımsal Özellikler Bakımından Değerlendirilmesi. Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji dergisi, 5(7): 763-772.
- Dumlupınar Z, Kara R, Dokuyucu, T, Akkaya A, 2012. Correlation and Path Analysis Of Grain Yield And Yield Components Of Some Turkish Oat Genotypes. Pakistan Journal of Botany, 44(1): 321-325.
- Dumlupınar Z, Maral H, Rukiye K, Dokuyucu T, Akkaya A, 2011. Evaluation of Turkish Oat Landraces Based on Grain Yield, Yield Components and Some Quality Traits. Turkish Journal of Field Crops, 16(2): 190-196.
- Erbaş ÖD, Mut Z, 2013. Saf Hat Yulaf Genotiplerinin Tarımsal Ve Bazı Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. 10. Tarla Bitkileri Kongresi, Konya, 19-13 Eylül, pp: 821-829.
- Federer WT, 2005. Augmented split block experiment design. Agron. J. 97(2): 578-586.
- Finnan J, Burke B, Spink J, 2019. The Plasticity of the Oat Panicle and Associated Changes in Leaf Area and Grain Weight. Field Crops Research, 242: 107592.
- JMP, 2007. JMP User Guide, Release 7 Copyright© 2007, SAS Institute Inc., Cary, NC.



- Kapoor R, Bajaj RK, Sidhu N, Kaur S, 2011. Correlation and Path Coefficient Analysis in Oat (*Avena sativa* L.). International Journal of Plant Breeding, 5(2): 133-136.
- Kaziu I, Kashta F, Celami A, 2019. Estimation of Grain Yield, Grain Components and Correlations between Them in some Oat Cultivars. Albanian Journal of Agricultural Sciences, 18(1): 13-19.
- Koeyer DL, Stuthman DD, Fulcher RG, Pomeranke GJ, 1993. Effects of recurrent selection for grain yield on oat kernel morphology. Crop science, 33(5): 924-928.
- Krishna A, Ahmed S, Pandey HC, Kumar V, 2014. Correlation, Path and Diversity Analysis of Oat (*Avena sativa* L.) Genotypes for Grain and Fodder Yield. Journal of Plant Science & Research, 1(2): 1-9.
- Kutlu I, Gulmezoglu N, 2020. Morpho-agronomic Characters of Oat growing with Humic Acid and Zinc Application in Different Sowing Times. Plant Science Today, 7(4): 594-600.
- Kün E, 1988. Serin iklim Tahılları S: 216. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 1032, Ders Kitabı No: 299.
- McBratney BD, Frey KJ, 1983. Inheritance of Tertiary Seed Development in Oats. Cereal Research Communications, 91-97.
- Mut Z, Akay H, Erbaş Köse ÖD, 2018a. Grain Yield, Quality Traits and Grain Yield Stability of Local Oat Cultivars. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 18 (1): 269-281.
- Mut Z, Akay H, Sezer İ, Gülümser A, Öner F, Erbaş Ö, 2011. Farklı Orijinli Yulaf (*Avena sativa* L.) Genotiplerinin Samsun Ekolojik Koşullarında Tarımsal ve Bazı Kalite Özelliklerinin Tespiti. 9. Tarla Bitkileri Kongresi, Bursa, 12-15 Eylül, pp: 88-93.
- Mut Z, Erbaş Köse ÖD, Akay H, 2016. Grain yield and some quality traits of different oat (*Avena sativa* L.) genotypes. International Journal of Environmental and Agriculture Research, 2 (12): 83-88.
- Mut Z, Erbaş Köse ÖD, Akay H, 2018b. Variation of Some Physical and Chemical Quality Traits of the Grains in Different Parts of The Oat Panicle. International Journal of Agriculture and Biology, 20: 268-276.
- Nikoloudakis N, Bladenopoulos K, Katsiotis A, 2016. Structural Patterns and Genetic Diversity Among Oat (*Avena*) Landraces Assessed by Microsatellite Markers and Morphological Analysis. Genetic Resources and Crop Evolution, 63(5): 801-811.
- Rasane P, Jha A, Sabikhi L, Kumar A, Unnikrishnan VS (2015) Nutritional Advantages of Oats and Opportunities for Its Processing as Value Added Foods. J Food Sci Technol., 52:662-675.
- Sainio PP, Kontturi M, Rajala A, 2004. Impact Dehulling Oat Grain Improve Quality of On-Farm Produced Feed I. Hullability and Associated Changes in Nutritive Value and Energy Content. Agricultural and Food Science, 13: 18-28.
- Sarı N, Ünay A, 2015. Yulafta (*Avena sativa* L.) Tane Verimini Etkileyen Özelliklerin Belirlenmesi. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 24(2): 115-123.
- Sawicki J, (1984). The Structure of Yield Ğn Varieties And Strains of Oats, and The Contributions of Components of Yield in The Formatin of Grain Yield. Acta Agraria et Silvestria, Agraria, 23:59-77.
- Sürek H, Valentine J, 1996. Kültürü Yapılan Yulafta (*Avena sativa* L.) Bazı Kantitatif Karakterler Arasındaki İlişkiler ve Kalıtım Dereceleri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi, 2(3): 39-43.
- Vaisi H, Golparvar AR, 2013. Determination of the Best Indirect Selection Criteria to Improve Grain Yield and Seed Weight in Oat (*Avena sativa* L.) genotypes. IJFAS, 2: 747-750.
- Vilaró M, Rebuffo M, Miranda C, Pritsch C, Abadie TM, 2004. Characterization and Analysis of A Collection of (*Avena sativa* L.) from Uruguay. Plant Genet Res. News. 140:23-31.
- Webster FH, 2012. Oat. In: R. Henry and P. Kettlewell (Eds) *Cereal grain quality*, Springer Science & Business Media, London, UK, pp: 179-199.
- Welch RW, Brown JCW, Leggett JM, 2000. Interspecific and Intraspecific Variation in Grain and Groat Characteristics of Wild Oat (*Avena*) Species: Very High Groat (1→ 3),(1→ 4)-β-D-glucan in an *Avena Atlantica* Genotype. Journal of Cereal Science, 31(3): 273-279.

**Atıf İçin:** Kaymak G, Gülümser E, Can M, Acar Z, Ayan İ. 2021. Yapraklı ve Yarı Yapraklı Yem Bezelyesi Çeşitleri ile Tek Yıllık Çim Karışımlarının Silaj Kalitesinin Belirlenmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1595-1602.

**To Cite:** Kaymak G, Gülümser E, Can M, Acar Z, Ayan İ. 2021. Determination the Silage Quality of Leafy and Semi-Leafy Forage Pea and Annual Ryegrass Mixtures. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1595-1602.

### Yapraklı ve Yarı Yapraklı Yem Bezelyesi Çeşitleri ile Tek Yıllık Çim Karışımlarının Silaj Kalitesinin Belirlenmesi

Gülcan KAYMAK<sup>1</sup>, Erdem GÜLÜMSER<sup>2</sup>, Mehmet CAN<sup>1</sup>, Zeki ACAR<sup>1\*</sup>, İlknur AYAN<sup>1</sup>

**ÖZET:** Bu çalışma, yapraklı “B” ve yarı yapraklı “YB” yem bezelyesi (*Pisum arvense* L.) çeşitlerinin, tek yıllık çim (*Lolium multiflorum* var. *westervoldicum* L.) “İÇ” ile karışımlarının (% 100:0, 80:60, 60:40, 40:60, 20:80 ve 0:100) bazı silaj kalite özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Çalışmayı oluşturan bitki materyalleri hasat edildikten sonra parça boyutu 2 cm olacak şekilde kıyılmıştır. Kıyılmış bitki materyalleri vakumlu poşetlere doldurularak 25±2 °C’de kuru bir ortamda 45 gün süre ile fermantasyona bırakılmıştır. Silaj materyallerinde; kuru madde, pH, ham protein oranı, ham kül, bazı organik asitler, asit deterjanda çözünmeyen lif (ADF), nötr deterjanda çözünmeyen lif (NDF), potasyum (K), fosfor (P), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg) ve kobalt (Co) içerikleri belirlenmiştir. En yüksek ham protein oranı yalın bezelye silajları (% 16.31 ve % 15.73) ile % 80B+20İÇ (% 15.58) karışımından elde edilmiştir. Flieg puanlamalarına göre, yapraklı bezelye (97.51) ve % 80B+20İÇ (99.19) karışımı silajları için en yüksek değerler elde edilmiş olup, tüm silajlar pekiyi kalite sınıfında yer almıştır. Silajların ADF ve NDF içerikleri sırasıyla % 25.87-30.24 ve % 34.55-45.53 arasında değişmiştir. En yüksek laktik asit % 100İÇ (% 4.448), % 80B+20İÇ (% 4.250), % 40B+60İÇ (% 3.523) ve % 20B+80İÇ (% 3.885) işlemlerinde belirlenmiştir. Silajların asetik asit miktarı % 0.103-0.224 arasında değişmiştir. Besin madde içeriklerinin hayvanların ihtiyaçlarını karşılayacak düzeyde olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, silajların kalite parametreleri dikkate alındığında, % 80B+20İÇ karışımının daha iyi olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Yem bezelyesi, tek yıllık çim, karışım, silaj, kalite.

### Determination the Silage Quality of Leafy and Semi-Leafy Forage Pea and Annual Ryegrass Mixtures

**ABSTRACT:** The aim of current study was to determine silage quality traits of leafy “L” and semi-leafy “SL” forage pea varieties (*Pisum arvense* L) and annual ryegrass “R” (*Lolium multiflorum* var. *westervoldicum* L.) mixtures (100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 and 0:100%). The harvested materials were chopped in size of 2 cm, and they filled into vacuum bags, and then let for fermentation at 25±2 °C for 45 days. In this study; dry matter, pH, crude protein, crude ash, some organic acids, acid detergent fiber (ADF), neutral detergent fiber (NDF), potassium (K), phosphorus (P), calcium (Ca), magnesium (Mg) and cobalt (Co) contents were determined. The highest crude protein content was determined sole forage pea silages (16.31% and 15.73%) and 80L+20R% (15.58%) mixture. According to the Flieg score, leaf forage pea (97.51) and 80L+20R% (99.19) silages have the highest value and, they were in very good quality class. ADF and NDF content of silages ranged between 25.87-30.24% and 34.55-45.53%, respectively. The highest lactic acid was determined in 100R% (4.448%), 80L+20R% (4.250%), 40L+60R% (3.523%) and 20L+80R% (3.885%). The mineral content of silages were at a level to meet the needs of the livestock. As a result, it was determined that the mixture of leafy forage pea and ryegrass 80+20% silage was better in terms of silage quality.

**Keywords:** Forage pea, annual ryegrass, mixture, silage, quality.

<sup>1</sup> Gülcan KAYMAK ([Orcid ID: 0000-0002-0915-0529](https://orcid.org/0000-0002-0915-0529)), Mehmet CAN ([Orcid ID: 0000-0003-0230-6209](https://orcid.org/0000-0003-0230-6209)), Zeki ACAR ([Orcid ID: 0000-0002-0484-1961](https://orcid.org/0000-0002-0484-1961)), İlknur AYAN ([Orcid ID: 0000-0002-5097-9013](https://orcid.org/0000-0002-5097-9013)) Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Türkiye

<sup>2</sup> Erdem GÜLÜMSER ([Orcid ID: 0000-0001-6291-3831](https://orcid.org/0000-0001-6291-3831)), Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Bilecik, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Zeki ACAR, e-mail: zekiacar@omu.edu.tr

## GİRİŞ

Türkiye'nin 2018 yılı verilerine göre hayvancılık için gerekli olan kaliteli kaba yem ihtiyacı 86 milyon tondur. Ülkemizde yem bitkileri tarımından ve çayır-mera alanlarından elde ettiğimiz kaliteli kaba yem miktarı ise 31 milyon tondur. İhtiyaç ve üretim verilerine bakıldığında ülkemizin kaliteli kaba yem açığı 55 milyon tondur (Acar ve ark., 2020). Bu durum üreticileri rasyonda kaba yem kaynağı olarak kalitesi düşük olan saman gibi yemleri tercih etmeye zorlamaktadır. Doğal olarak hayvansal verim ve kalitede düşüşler yaşanırken, saman fiyatları da olması gerekenden daha yükseğe çıkmaktadır (Akdeniz ve ark., 2004).

İnsanlar dengeli ve yeterli beslenebilmek için mutlaka hayvansal ürünlere ihtiyaç duyarlar. Ancak bu ürünlerin elde edilmesinde kullanılan yemlerin girdi masrafları o işletmedeki en büyük paya (% 70) sahiptir. Bu durum o işletmenin karlılığını önemli ölçüde etkilemektedir. Nitekim kaliteli kaba yemlerin oranı süt ineği rasyonlarında % 70'e, kurudaki ineklerin rasyonlarında % 100'e, koyun rasyonlarında da ise % 90'a kadar çıkabilmektedir (Ensminger ve Olentin, 1980). Bu konuda hem ucuz hem de hayvanların sağlığını olumlu yönde etkileyen silaj gibi kaliteli kaba yemler ön plana çıkmaktadır (Özkan ve Şahin Demirbağ, 2016).

Son dönemde üreticiler kaliteli kaba yem kaynağı olarak daha çok silajı tercih etmektedir. Zira kurutma işleminin bitkilerde besinsel kayıplara neden olduğu bilinen bir gerçektir. Han ve ark. (2004) ile Hancock ve Collins (2006), silo materyalinin kuru ota oranla, kuru madde kazanımının ve besleme değerinin daha yüksek olduğunu ve bu materyallerle beslenen besi sığırlarının hem kalitesinde, hem de veriminde artış sağladığını bildirmektedir.

Yem bezelyesi otu hayvan besleme açısından oldukça önemlidir. Nitekim bitkinin ham protein oranı tam çiçeklenme döneminde % 20'lere kadar ulaşabilmektedir. Tekeli ve Ateş (2007) yaprak oranı fazla ve protein içeriği ise bu denli yüksek olan yem bezelyesini hayvanların severek tükettiklerini bildirmektedir. Göçmen ve Özaslan Parlak (2017) ise, çiftçilerin gün geçtikçe baklagiller içerisinde en fazla yem bezelyesini tercih etmeye başladıklarını bildirmektedir.

Buğdaygiller familyasında yer alan tek yıllık çim (*Lolium multiflorum* var. *westervoldicum* L) lezzetli bir ota sahip olmasının yanı sıra, kolay sindirilmesi, enerji ve protein değerlerinin yüksek olması nedeniyle kaliteli bir yem bitkisidir. Tek yıllık çim yeşil ve kuru otun yanı sıra, silaj olarak da değerlendirilmektedir. Sindirilebilirliği ve besin elementleri içeriği yüksek olan bitki, yüksek kuru madde oranı sayesinde süt ve beside verim ve kalite artışı sağlar. Ayrıca uygun ekolojik koşullarda 20 günde bir biçime gelmektedir (Anonim, 2021).

Bu çalışma yapraklı ve yarı yapraklı yem bezelyesi ile tek yıllık çim karışımlarının silaj kalite özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür.

## MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada yapraklı ve yarı yapraklı yem bezelyesi çeşitleri ile tek yıllık çimin yalın ve 4 farklı karışımlarında (% 100:0, 80:60, 60:40, 40:60, 20:80 ve 0:100) silaj kalitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada materyal olarak yapraklı yem bezelyesinin "Gölyazı", yarı yapraklı bezelyesinin "Kirazlı", tek yıllık çimin ise "Caramba" çeşitleri kullanılmıştır. Çalışma, 2017-2018 yılı kış yetiştirme dönemi boyunca Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Uygulama ve Araştırma arazisinde yürütülmüştür. Yem bezelyesi ve tek yıllık çim yalın ve alternatif sıralara ikili karışım olarak Ekim ayı sonunda ekilmiştir. Hasat baklagillerde alt baklaların olgunlaştığı, çimde ise süt olum döneminde yapılmıştır. Mut ve ark. (2015) ile Mut ve ark. (2018), baklagil + tahıl karışımları ile yapılan

denemelerde tahılların hasat döneminin dikkate alınması gerektiğini bildirmektedir. Bundan dolayı karışım parsellerinde çimin hasat zamanı esas alınarak hasat yapılmıştır. Bitkiler hasat edildikten sonra 0.6 - 2.5 cm boyutunda (Alaca ve Parlak, 2017) parçalanmıştır. Bitki örnekleri 2 kg'lık vakumlu silaj paketlerine yalın ve karışım oranları dikkate alınarak üç tekerrürlü olarak doldurulmuştur. Havası alınan paketler 45 gün boyunca  $25 \pm 2$  °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

Kırkbeş gün sonra açılan silajların yaş örnek ağırlıkları tartıldıktan sonra etüve konulmuş ve sabit ağırlığa gelinceye kadar 105 °C' de kurutulmuştur. Daha sonra kuru örnek ağırlığı belirlenen silaj materyallerinin yaş örnek ağırlığına oranlanmasıyla silajların kuru madde oranları belirlenmiştir. Silajlarda pH dijital pH metre ile ölçülmüştür. Kuru madde oranı ile pH değerleri belirlenen silaj örneklerinin Kılıç (1984)'ın, belirlemiş olduğu formül yardımı ile Flieg puanları hesaplanmıştır.

$$\text{Flieg Puanı: } 220 + (2 \times \% \text{ Kuru Madde} - 15) - 40 \times \text{pH} \quad (\text{Kılıç, 1984}) \quad (1)$$

Flieg puanı 1 ile 100 arasında değişmekte olup, 5 farklı silaj kalite sınıfına ayrılmıştır. Flieg puanı 0-20 değer alan silajlar kötü, 21-40 değer alan silajlar düşük, 41-60 değer alan silajlar orta, 61-80 değer alan silajlar iyi, 81-100 değer alan silajlar pekiyi sınıfta yer almaktadır.

Fermantasyon süresini tamamladıktan sonra açılan silaj örneklerinden 20 g örnek alınarak üzerine 100 ml saf su ilave edilmiştir. Örnekler blender yardımı ile parçalanmış ve iyice karışması sağlandıktan sonra filtre kâğıdından süzümüştür (Başaran ve ark., 2018). Organik asitler (Laktik asit ve asetik asit) yüksek performanslı sıvı kromatograf (HPLC), besin elementleri (potasyum, fosfor, kalsiyum, magnezyum ve kobalt) ise İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometre (ICP-MS) cihazı ile belirlenmiştir.

Silaj örnekleri sabit ağırlığa gelene kadar 60°C'de kurutulduktan sonra 1 mm genişliğinde elekleri olan değirmende öğütülmüş ve ham protein, ham kül, asit deterjanda çözünmeyen lif (ADF) ve nötr deterjanda çözünmeyen lif (NDF) analizlerine hazır hale getirilmiştir. Ham protein analizi için Kjeldahl yöntemi kullanılmış ve örneklerin toplam N değerleri belirlenmiştir. Daha sonra bu değerler 6.25 katsayısı ile çarpılarak % ham protein oranları belirlenmiştir. Silajların ham kül içeriğinin belirlenmesinde Kacar (1972), ADF oranının belirlenmesinde Van Soest (1963), ve NDF değerlerin belirlenmesinde ise Van Soest ve Wine (1967)'nın, belirlemiş oldukları yöntemler kullanılmıştır.

Sonuçlar Tesadüf Parselleri Deneme Desenine göre SPSS 22.0 istatistik paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Grup ortalamaları arasındaki farklılıkların belirlenmesinde ise Duncan testi kullanılmıştır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmada ham protein ve kuru madde oranı ile pH ve Flieg puanları yönünden silajlar arasında  $p < 0.01$  düzeyinde çok önemli farklılıklar belirlenmiştir (Çizelge 1). En yüksek ham protein oranı istatistiksel olarak aynı grupta yer alan yalın bezelye (% 16.31 ve % 15.73) ile % 80B+20İÇ (%15.58), en düşük ise % 10.72 ile yalın çim silajından elde edilmiştir. Karışımlarda baklagil oranındaki artışa paralel olarak ham protein oranı da artmıştır. Ham protein oranı kaba yemlerin besleme değerinin belirlenmesinde en önemli faktörlerden biri olup, yemlerde en az % 6 civarında bulunması gerekmektedir (Şenel, 1986; Tan ve Serin, 1997). Tüm silajların HP oranı bu değer üzerinde bulunmuştur. Can ve ark. (2020), hindiba ile ak üçgül ve domuz ayrığı karışımlarının silaj kalitesinin belirlenmesi amacıyla yürüttükleri çalışmada, silajların ham protein oranının % 12.11-19.11, Mut ve ark. (2020) ise, koca fiğ ile tek yıllık çim karışımlarının ham protein oranının % 10.87-16.17 arasında değiştiğini bildirmiştir. Silajların kuru madde oranı % 29.40-35.61 arasında değişmiştir. İyi bir silaj için

kuru madde oranının % 25-40 arasında olması istenir (Panyasak ve Tumwasorn, 2015). Nitekim % 40'tan fazla kuru madde içeren bir yemin selüloz ve hemiselüloz içeriği yüksek olurken, yemin lezzetliliği de azalmaktadır. Diğer taraftan düşük kuru madde içeriğine sahip bir silo yeminin ise karbonhidrat içeriği düşmektedir (Panyasak ve Tumwasorn, 2015). Silo materyalinin pH'sı silaj kalitesini ortaya koyan en önemli faktörlerin başında gelmektedir. Zira pH'nın belli bir değerin üzerine çıkması silajda istenmeyen mikroorganizmalar (*enterobacteria*) ve sporların (*clostridial*) çoğalmasına neden olur (McDonald ve ark., 1991; Filya, 2001). Acar ve ark. (2019), kaliteli bir silajın pH'sının 4.0-4.5 arasında olması gerektiğini bildirmektedir. Çalışmada yalın baklagiller ve yapraklı bezelye ile çim karışımlarına ait silajların pH'sı bu seviyeler arasında olmuştur. Silajın kuru maddesi ve pH'sı kullanılarak hesaplanan Flieg puanı silajın kalite sınıfını belirlemektedir. En yüksek Flieg puanı yalın yapraklı bezelye (97.51) ve % 80B+20İÇ (99.19) silajlarında elde edilmiş olup, tüm silajlar pekiyi kalite sınıfında yer almıştır. Yozgat ekolojik koşullarında mürdümük ile arpa ve yulaf karışımlarına ait silajlarının kalite Flieg sınıfları orta ve iyi arasında değişmiştir (Başaran ve ark., 2018).

**Çizelge 1.** Silajların HP, KM, pH değerleri ile Flieg puanı ve silaj kalite sınıfları

| İşlemler    | % HP**           | % KM**          | pH**            | Flieg**          | Kalite sınıfı |
|-------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|---------------|
| % 100 İÇ    | 10.72 ± 0.22 f   | 35.61 ± 1.03 a  | 4.59 ± 0.02 abc | 92.63 ± 1.32 bc  | Pekiyi        |
| % 100 B     | 16.31 ± 0.15 a   | 34.19 ± 0.59 ab | 4.40 ± 0.01 fg  | 97.51 ± 1.57 ab  | Pekiyi        |
| % 100 YB    | 15.73 ± 0.14 ab  | 30.74 ± 0.04 de | 4.50 ± 0.01 de  | 86.49 ± 0.52 de  | Pekiyi        |
| % 80B+20İÇ  | 15.58 ± 0.52 ab  | 34.29 ± 1.06 ab | 4.36 ± 0.00 g   | 99.19 ± 2.12 a   | Pekiyi        |
| % 60B+40İÇ  | 14.52 ± 0.07 c   | 32.76 ± 0.10 bc | 4.45 ± 0.05 ef  | 92.51 ± 2.21 bc  | Pekiyi        |
| % 40B+60İÇ  | 14.09 ± 0.85 cd  | 33.33 ± 1.46 bc | 4.54 ± 0.09 bcd | 90.07 ± 6.72 cd  | Pekiyi        |
| % 20B+80İÇ  | 13.92 ± 0.43 cd  | 29.40 ± 0.21 e  | 4.45 ± 0.01 ef  | 85.80 ± 0.28 de  | Pekiyi        |
| % 80YB+20İÇ | 15.45 ± 0.48 b   | 32.58 ± 0.98 bc | 4.65 ± 0.04 a   | 84.29 ± 3.85 e   | Pekiyi        |
| % 60YB+40İÇ | 13.30 ± 0.16 bde | 33.02 ± 1.47 bc | 4.60 ± 0.02 ab  | 87.18 ± 1.95 de  | Pekiyi        |
| % 40YB+60İÇ | 13.10 ± 0.62 e   | 32.39 ± 1.94 cd | 4.62 ± 0.00 ab  | 84.99 ± 3.88 de  | Pekiyi        |
| % 20YB+80İÇ | 12.96 ± 0.29 ef  | 32.40 ± 0.43 cd | 4.51 ± 0.06 cde | 89.27 ± 1.68 cde | Pekiyi        |

(\*\*) 0.01 düzeyinde önemli. Aynı sütunda aynı harfle gösterilen ortalamalar arasında fark yoktur. HP: Ham protein oranı, KM: Kuru madde oranı; İÇ: Tek yıllık çim; B: Yapraklı bezelye; YB: Yarı yapraklı bezelye

Silajlar arasında istatistiksel olarak asetik asit oranı bakımından fark olmazken, ham kül, laktik asit, ADF ve NDF bakımından % 1 seviyesinde farklılık bulunmuştur (Çizelge 2). Silajların ham kül içeriğinin % 6.90 (% 100İÇ) - % 10.62 (% 100B) arasında olduğu belirlenmiştir. Mürdümük ile arpa ve yulaf karışımlarının yürütüldüğü çalışmada, silajlara ait ham kül içeriğinin % 7.31-8.40 arasında değiştiği bildirilmiştir (Başaran ve ark., 2018). En yüksek laktik asit onları % 100İÇ (% 4.448), % 80B+20İÇ (% 4.250), % 40B+60İÇ (% 3.523) ve % 20B+80İÇ (% 3.885) silajlarında belirlenmiş ve istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlar, en düşük ise % 100YB (% 2.011) silajından elde edilmiştir. Yalın tek yıllık çim silajının laktik asit içeriği yalın baklagillere oranla daha yüksektir. Bu durum buğdaygillerin baklagillere oranla daha fazla suda çözünebilir karbonhidrat (SÇK) içermesinin bir sonucudur. Nitekim silaj içerisinde ne kadar fazla SÇK varsa, o kadar fazla laktik asit üretmesi sağlanmaktadır (Açıkgöz, 2002). Ayrıca yapraklı bezelyenin laktik asit içeriği yarı yapraklı bezelye çeşidine oranla daha yüksek olmuştur. Bu durum karışımlarda da açık görülmekte olup, yapraklı bezelye + tek yıllık çim karışımı, yarı yapraklı bezelye + tek yıllık çim karışımına göre daha fazla laktik asit içeriğine sahip olmuştur. Diğer taraftan kaliteli bir silaj için laktik asit miktarının en az % 2.0 (Alçiçek ve Özkan 1996) olması gerektiği göz önüne alındığında, silajların tümünde laktik asit oranının bu değerin üzerinde olduğu görülmektedir. Öztürk ve ark. (2020), şerbetçi otunun mısır ve yemlik soya ile karışımlarının silaj kalitesinin belirlenmesi amacıyla yürüttükleri çalışmada, silajların laktik asit miktarı % 2.382-8.429 arasında değişmiştir. Silajların asetik asit miktarı % 0.103 (% 80YB+20İÇ) - 0.224 (%

100YB) arasında değişmiştir. Asetik asit silajın bozulduğunu gösteren sayısal bir ölçüt olduğundan dolayı silajda istenmez. Alççek ve Özkan (1996), silaj içerisinde asetik asit içeriğinin % 0.8'in üzerine çıkmadığı sürece silaj kalitesinin etkilenmeyeceğini bildirmektedir. Silajların asetik asit içeriği bu kritik seviyenin altında bulunmuştur (Çizelge 2). Kaba yemlerin hayvanlar tarafından tüketimi ve sindirimi, hücre duvarı içeriği ve bu içerikler ile ilişkili olan ADF ve NDF oranları ile yakından ilişkilidir. Yemlerin lif içeriği ne kadar fazla ise, sindirilebilirliği de o kadar zorlaşmaktadır. Rohweder ve ark. (1978), ADF ile NDF oranlarına göre; yemleri sınıflara ayırmıştır. Buna göre ADF için; <% 31= 1. Sınıf, % 31-35= 2. sınıf, % 36-40 = 3. sınıf, % 41- 42= 4. sınıf, % 43-45= 5. sınıf, >% 45= 6. sınıf olarak sınıflandırmıştır. NDF için <% 40= 1. sınıf, % 40-46= 2. sınıf, % 47-53 = 3. sınıf, % 54-60= 4. sınıf, % 61-65= 5. sınıf ve >% 65= 6. sınıf olarak sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmalara göre silajların ADF içerikleri 1. sınıf, NDF içerikleri ise 1. ve 2. sınıfta yer almıştır.

**Çizelge 2.** Silajlara ait ham kül, laktik asit, asetik asit, ADF ve NDF içeriği değerleri (%)

| İşlemler    | HK**              | LA**             | AA           | ADF**           | NDF**            |
|-------------|-------------------|------------------|--------------|-----------------|------------------|
| % 100 İÇ    | 6.90 ± 0.10 f     | 4.448 ± 0.54 a   | 0.163 ± 0.05 | 30.24 ± 0.02 a  | 45.53 ± 0.11 a   |
| % 100 B     | 10.62 ± 0.52 a    | 3.137 ± 0.83 b-e | 0.209 ± 0.02 | 25.87 ± 0.87e   | 34.55 ± 1.57 f   |
| % 100 YB    | 8.57 ± 0.30 cde   | 2.011 ± 0.14 e   | 0.218 ± 0.08 | 26.25 ± 0.95 de | 37.45 ± 0.76 e   |
| % 80B+20İÇ  | 8.24 ± 0.10 e     | 4.250 ± 0.35 ab  | 0.157 ± 0.03 | 26.45 ± 0.05 de | 39.33 ± 1.30 de  |
| % 60B+40İÇ  | 9.23 ± 0.88 b-e   | 3.167 ± 0.07 b-e | 0.188 ± 0.05 | 26.91 ± 0.03 de | 41.51 ± 2.20 bcd |
| % 40B+60İÇ  | 9.98 ± 0.30 ab    | 3.523 ± 1.18 a-d | 0.163 ± 0.04 | 27.74 ± 1.14 cd | 42.11± 3.38 bcd  |
| % 20B+80İÇ  | 8.35 ± 1.29 cde   | 3.885 ± 1.05 abc | 0.185 ± 0.00 | 26.65 ± 0.63 de | 43.04 ± 1.81 abc |
| % 80YB+20İÇ | 7.17 ± 0.23 f     | 3.132 ± 0.68 b-e | 0.103 ± 0.00 | 26.52 ± 0.59 de | 40.84 ± 0.06 cd  |
| % 60YB+40İÇ | 9.42 ± ± 0.14 bcd | 2.426 ± 0.28 de  | 0.128 ± 0.07 | 27.49 ± 1.51 cd | 42.83 ± 1.62 abc |
| % 40YB+60İÇ | 9.57 ± 0.29 bc    | 2.698 ± 0.40 cde | 0.224 ± 0.05 | 28.77 ± 0.51 bc | 44.16 ± 0.72 ab  |
| % 20YB+80İÇ | 8.91 ± 0.54 b-e   | 2.698 ± 0.46 cde | 0.198 ± 0.02 | 30.08 ± 0.04 a  | 45.33 ± 0.45 a   |

(\*\*) 0.01 düzeyinde önemli. Aynı sütunda aynı harfle gösterilen ortalamalar arasında fark yoktur. HK: Ham kül oranı, LA: Laktik asit; AA: Asetik asit; ADF: Asit deterjanda çözünmeyen lif; NDF: Nötr deterjanda çözünmeyen lif (NDF), İÇ: Tek yıllık çim; B: Yapraklı bezelye; YB: Yarı yapraklı bezelye

Farklı bezelye çeşitleri ile tek yıllık çim karışımlarının K, P, Ca, Mg ve Co içerikleri Çizelge 3'de verilmiştir. Buna göre işlemlerin etkisi Co üzerinde önemsiz iken, diğer besin elementleri üzerinde çok önemli ( $p < 0.01$ ) olmuştur. Silajların K içeriği % 1.486 (yalın tek yıllık çim) ile % 2.423 (80YB+20İÇ) arasında değişmiştir. Hayvanlar için gerekli olan makro besin elementlerinin başında gelen K vücudun asit-baz dengesini sağlamaktadır (Başbağ ve ark., 2011; Gürsoy ve Macit, 2017). Kaba yemlerin en az % 0.8 oranında K içermesi gerekmektedir (Kidambi ve ark., 1989). Silajların K içeriği istenen seviyenin üzerindedir. Can ve ark. (2019), *B. bituminosa* ile yulaf ikili karışımlarının silajlarına ait K içeriğinin % 1.665 ile % 2.225 arasında değiştiğini bildirmiştir. Silajların P içeriği % 0.198 (% 60B+40İÇ) - % 0.349 (% 40YB+60İÇ) arasında değişmiştir. Dua ve Care (1999), fosforun hayvanların iskelet yapısında ve döl veriminde etkili olduğunu belirtirken, Kidambi ve ark. (1989) ise yemlerin en az % 0.21 oranında P içermesi gerektiğini bildirmektedir. Çalışmada % 60B+40İÇ (% 0.198) karışımı dışında kalan silajların P içeriği Kidambi ve ark. (1989)'nın, bildirdiği en az değer üzerinde bulunmuştur. En yüksek Ca yalın baklagiller (% 0.740 ve % 0.629) ile % 80B+20İÇ (% 0.610) ve % 80YB+20İÇ (% 0.598), en düşük ise yalın çim (% 0.401) silajından elde edilmiştir. Makro besin elementlerinden Ca ve Mg hayvanların kemik ve diş yapısında bulunmakta ve iskelet dokusunu iyileştirmektedir. Ayrıca yemlerde bulunan Ca hayvanların süt verimini ve kalitesini artırmaktadır (Konca ve Cufadar, 2004; Başbağ ve ark., 2011; Gürsoy ve Macit, 2017). Yozgatlı (2017), sığırların normal ihtiyaçlarına göre, yemlerin Ca içeriğinin % 0.18 - 0.44 ve Mg içeriğinin ise % 0.04 - 0.10 arasında olması gerektiğini bildirmektedir. Silajların Ca ve Mg içeriklerinin hayvanların ihtiyaçlarını karşılayacak düzeyde olduğu belirlenmiştir. Can ve ark.

(2020), hindiba ile ak üçgül veya domuz ayrığı karışımlarının silajlarına ait Ca ve Mg içeriğinin sırasıyla % 0.554-1.019 ve % 0.357-0.621 arasında değiştiğini bildirmiştir. Yemlerde bulunan Co kaliteli kaba yemlerin daha iyi sindirilmesini sağlarken, rumende bulunan mikroorganizmaların vitamin B12 sentezi açısından da önem teşkil etmektedir. Buna göre, yemlerde Co düzeyinin 0.02-0.04 ppm arasında olması istenmektedir (NRC, 2001). Çalışmada silajların Co içeriği 0.059-0.119 ppm arasında değişmiş ve NRC (2001)'nin, bildirdiği değerlerin üzerinde yer almıştır. Gülümser ve ark. (2019), börülce ve soya üzerine melas veya arpa kırması ilavesi ile elde ettikleri silajların Co içeriğinin 0.085-0.120 ppm arasında değiştiğini belirlemiştir.

**Çizelge 3.** Silajların, K, P, Ca, Mg (%) ve Co (ppm) içerikleri

| İşlemler    | K**              | P**             | Ca**             | Mg**             | Co           |
|-------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|--------------|
| % 100 İÇ    | 1.486 ± 0.25 d   | 0.300 ± 0.06 a  | 0.401 ± 0.05 d   | 0.191 ± 0.01 e   | 0.096 ± 0.02 |
| % 100 B     | 2.164 ± 0.22 ab  | 0.336 ± 0.04 a  | 0.740 ± 0.19 a   | 0.422 ± 0.11 a   | 0.087 ± 0.00 |
| % 100 YB    | 2.068 ± 0.03 abc | 0.231 ± 0.03 bc | 0.629 ± 0.12 ab  | 0.385 ± 0.02 ab  | 0.096 ± 0.01 |
| % 80B+20İÇ  | 2.158 ± 0.12 ab  | 0.290 ± 0.04 ab | 0.610 ± 0.08 abc | 0.324 ± 0.01 bcd | 0.059 ± 0.01 |
| % 60B+40İÇ  | 1.951 ± 0.27 bc  | 0.198 ± 0.01 c  | 0.539 ± 0.04 bcd | 0.292 ± 0.04 cd  | 0.074 ± 0.00 |
| % 40B+60İÇ  | 1.693 ± 0.05 cd  | 0.235 ± 0.01 bc | 0.439 ± 0.00 cd  | 0.242 ± 0.00 de  | 0.072 ± 0.00 |
| % 20B+80İÇ  | 1.984 ± 0.28 abc | 0.315 ± 0.06 a  | 0.561 ± 0.09 bcd | 0.334 ± 0.02 bc  | 0.086 ± 0.01 |
| % 80YB+20İÇ | 2.423 ± 0.29 a   | 0.291 ± 0.01 ab | 0.598 ± 0.00 abc | 0.313 ± 0.02 bcd | 0.099 ± 0.01 |
| % 60YB+40İÇ | 2.073 ± 0.16 abc | 0.310 ± 0.01 a  | 0.462 ± 0.06 bcd | 0.244 ± 0.00 de  | 0.119 ± 0.04 |
| % 40YB+60İÇ | 2.291 ± 0.26 ab  | 0.349 ± 0.01 a  | 0.565 ± 0.01 bcd | 0.287 ± 0.00 cd  | 0.092 ± 0.02 |
| % 20YB+80İÇ | 1.707 ± 0.24 cd  | 0.236 ± 0.03 bc | 0.513 ± 0.09 bcd | 0.249 ± 0.06 de  | 0.093 ± 0.04 |

(\*\*) 0.01 düzeyinde önemli. Aynı sütunda aynı harfle gösterilen ortalamalar arasında fark yoktur. K: potasyum, P: Fosfor, Ca: Kalsiyum, Mg: Magnezyum, Co: Kobalt; İÇ: Tek yıllık çim; B: Yapraklı bezelye; YB: Yarı yapraklı bezelye

## SONUÇ

Yapraklı ve yarı yapraklı bezelye çeşitlerinin tek yıllık çim ile farklı karışımlarının silajlarına ait kalite özelliklerinin incelendiği bu çalışmada, karışımların yalınlara göre daha üstün performans sergilediği belirlenmiştir. Bu durum yem bezelyesi ile tek yıllık çim karışımlarının başarılı bir şekilde silolanabileceğini göstermektedir. Ayrıca, çalışmada yapraklı bezelye çeşidinin silajının hem yalın hem de karışımlarda yarı yapraklı bezelye çeşidine göre, daha kaliteli olduğu belirlenmiştir. Buna göre; tüm kalite kriterleri göz önüne alındığında, yapraklı bezelye ile tek yıllık çimin % 80+20 karışımının diğer işlemlerden daha üstün olduğu sonucuna varılmıştır.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Acar Z, Ayan İ, Önal Aşçı Ö, Mut Z, Mut H, Başaran U, Garipoğlu A V, Gülümser E, Köse ÖDE, Can M, Kaymak G, 2019. Silajlık Mısır Tarımı. Tarım Gündem Dergisi Özel Yayını, s.88, İzmir-Türkiye
- Acar Z, Tan M, Ayan İ, Önal Aşçı Ö, Mut H, Başaran U, Gülümser E, Can M, Kaymak G, 2020. Türkiye’de Yem Bitkileri Tarımının Durumu ve Geliştirme Olanakları. Türkiye Ziraat Mühendisleri IX. Teknik Kongresi, Ankara, Türkiye, 13-17 Ocak 2020, s. 529-553.
- Açıkgöz E, 2002. Silaj Yapımında Kullanılan Diğer Bitkilerin Tarımı. Silaj Bitkileri Yetiştirme ve Silaj Yapımı. Hasad Yayıncılık, s. 35-57, Ankara-Türkiye

- Akdeniz H, Yılmaz İ, Andiç N, Zorer Ş, 2004. Bazı Mısır Çeşitlerinde Verim ve Yem Değerleri Üzerine Bir Araştırma. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 14(1), 47-51.
- Alaca B, Özasan Parlak AÖ, 2017. Mısır, Sorgum Sudanotu Melezi ile Soya, Börülce ve Guarin Karışık Ekimlerinin Silaj Verimi ve Kalitesine Etkileri. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 5(1): 99-104.
- Alçıçek A, Özkan K, 1996. Silo Yemlerinde Destilasyon Yöntemi ile Süt Asidi, Asetik Asit ve Bütirik Asit Tayini. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 3:(2-3):191-198.
- Anonim, 2021. <https://www.ulusoysseed.com.tr/urun/italyan-cimi-caramba/>. (Erişim tarihi: 10.01.2021).
- Başaran U, Gülümser E, Mut H, Çopur Doğrusöz M, 2018. Mürdümük +Tahıl Karışımlarının Silaj Verimi ve Kalitesinin Belirlenmesi. Türk Tarım Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 6(9): 1237-1242.
- Başbağ M, Çağan E, Sayar MS, 2011. Güneydoğu Anadolu Bölgesi Doğal Alanlarından Toplanan Bazı Fiğ Türlerinin Ot Kalitesi Özelliklerinin Belirlenmesi. Uluslararası Katılımlı I. Ali Numan Kıraç Tarım Kongresi ve Fuarı, Bildiriler Kitabı, 27-30 Nisan, Eskişehir, s. 143-151.
- Can M, Kaymak G, Gülümser E, Acar Z, Ayan İ, 2019. Orman Üçgülü Yulaf Karışımlarının Silaj Kalitesinin Belirlenmesi. Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi, 34: 371-376.
- Can M, Acar Z, Ayan İ, Gülümser E, Mut H, 2020. Hindiba ile Ak Üçgül veya Domuz Ayrığı Karışımlarının Silaj Kalitesinin Belirlenmesi. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 10(4), 3076-3083.
- Dua K, Care AD, 1999. The Role of Phosphate on the Rates of Mineral Absorbtion from the Forestomach of Sheep. The Veterinary Journal, 157: 51-55.
- Ensminger ME, Olentin CG, 1980: Feeds Nutrition Component, 1st ed. The Ensminger Publishing Company, California.
- Filya İ, 2001. Silaj Teknolojisi. Hakan Ofset, İzmir.
- Göçmen N, Özasan Parlak, A, 2017. Yem Bezelyesi ile Arpa, Yulaf ve Tritikale Karışım Oranlarının Belirlenmesi. ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 5(1), 119-124.
- Gülümser E, Mut H, Başaran U, Çopur Doğrusöz M 2019. Melas veya Arpa Kırmısı İlavesinin Börülce ve Soya Silajlarının Kalitesi Üzerine Etkisi. BŞEÜ Fen Bilimleri Dergisi, 6 (Özel sayı): 161-167.
- Gürsoy E, Macit E, 2017. Erzurum İli Çayır ve Meralarında Doğal Olarak Yetişen Bazı Baklagil ve Buğdaygil Yem Bitkilerinin Mineral Madde Kompozisyonlarının Belirlenmesi. Alinteri Journal of Agricultural Sciences, 32(1): 1-9
- Han KJ, Collins M, Vanzant ES, Dougherty CT, 2004. Bale Density and Moisture Effects on Alfalfa Round Bale Silage. Crop Science, 44(3): 914-919.
- Hancock DW, Collins M, 2006. Forage Preservation Method Influences Alfalfa Nutritive Value and Feeding Characteristics. Crop Science, 46(2): 688-694.
- Kacar B, 1972. Bitki ve Toprağın Kimyasal Analizleri, II. Bitki Analizleri, Ankara Üniversitesi: Ziraat Fakültesi Yayınları
- Kılıç A, 1984. Silo Yemi. Bilgehan Basımevi. İzmir.
- Kidambi SP, Matches AG, Gricgs TC, 1989. Variability for Ca, Mg, K, Cu, Zn and K/(Ca +Mg) Ratio among 3 Wheat Grasses and Sainfoin on the Southern High Plains. Journal of Range Management, 42: 316-322.
- Konca Y, Cufadar Y, 2004. Yumurta Tavuklarının Fosfor İhtiyacı ve Fitaz Enziminin Fosfor İhtiyacına Etkisi. IV Ulusal Zootekni Kongresi. 1-3 Eylül 2004 Isparta. Cilt 2, Poster Bildiriler Kitabı, 319-324.
- McDonald P, Henderson AR, Heron SJE, 1991. The Biochemistry of Silage. Second Edition, Chalcombe Publication, Marlow-England.
- Mut Z, Akay H, Erbaş ÖD, 2015. Hay Yield and Quality of Oat (*Avena sativa* L.) Genotypes of Worldwide Origin. International Journal of Plant Production. 9(4): 507-522.
- Mut Z, Erbaş Köse, ÖD, Akay H, 2018. Evaluation of Hay Yield and Quality Traits of Oat Genotypes Grown at Different Locations. Revista de la Facultad de Agronomia. 35: 168-187.
- Mut H, Gülümser E, Çopur Doğrusöz M, Başaran U, 2020. Koca Fiğ (*Vicia narbonensis* L.) ile İtalyan Çimi (*Lolium multiflorum* L.) Karışımlarının Silaj Kalitesinin Belirlenmesi. ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 8 (2): 391-396



- NRC, 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle Seventh Revised Edition.
- Özkan U, Demirbağ NŞ, 2016. Türkiye’de Kaliteli Kaba Yem Kaynaklarını Mevcut Durumu. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 9(1): 23-27.
- Öztürk YE, Gülümser E, Mut H, Başaran U, Çopur Doğrusöz M, 2020. Yem Şalgamı Yulaf Karışımlarının Silaj Verimi ve Kalitesinin Tespiti. I. Uluslararası Çayır-Mera ve Yem Bitkileri Kongresi, 22-23 Şubat 2020, Adana.
- Panyasak A, Tumwasorn S, 2015. Effect of Moisture Content and Storage Time on Sweet. Walailak Journal of Science and Technology, 12(3), 237-243. DOI: 10.2004/wjst.v12i2.750
- Rohweder DA, Barnes R, Jorgensen N, 1978. Proposed Hay Grading Standart Based On Laboratory Analyses for Evaluating Quality. Journal of Animal Science, 47: 747-759
- Şenel S, 1986. Hayvan Besleme. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, İstanbul, 1986; No: 3210
- Tan M, Serin Y, 1997. Kaba Yem Olarak Kullanılan Tahılların Besleme Değerine Yaklaşımlar. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 28(1), 130-137.
- Tekeli AS, Ates E, 2005. Yield Potential and Mineral Composition of White Clover (*Trifolium repens* L.) - Tall Fescue (*Festuca arundinacea* schreb.) Mixtures. Journal of Central European Agriculture, 6: 27-34.
- Van Soest PJ, 1963. The Use of Detergents in the Analysis of Fibre Feeds. II. A Rapid Method for the Determination of Fibre and Lignin. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 46(5): 829-835.
- Van Soest PJ, Wine RH, 1967. Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. IV. Determination of Plant Cell-Wall Constituents. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 50(1): 50-55
- Yozgatlı O, 2017. Yozgat Ekolojik Koşullarına Uygun Silajlık Mısır (*Zea mays* L.) Çeşitlerinin Belirlenmesi. Yozgat Bozok Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış).

## Different Plant Growth Regulators on Improvement of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Micropropagation

Ahmet Metin KUMLAY<sup>1\*</sup>, Canan KAYA<sup>2</sup>, Bünyamin YILDIRIM<sup>1</sup>

**ABSTRACT:** The study compared the effects of MS medium containing 0.1 mg L<sup>-1</sup> gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) and  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) in combination with 2.0 mg L<sup>-1</sup> of kinetin (KIN), 2.0 mg L<sup>-1</sup> of benzyl aminopurine (BAP), 1.0 mg L<sup>-1</sup> of zeatine riboside (ZR), and 0.5 mg L<sup>-1</sup> of jasmonic acid (JA) for the micropropagation development of three potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars namely Caspar, Granola and Pasinler-92 using binodal stem explants. The results of this research clearly indicated that inclusion of JA among the other plant growth regulators significantly increased shoot regeneration and other characteristics of all potato cultivars used in the study. The minimum days to shoot proliferation on three cultivars ranged 4.0–5.5 d (best result on cv. Pasinler-92) on MS medium containing 0.5 mg L<sup>-1</sup> JA. The minimum time to root initiation (11.0 d) was observed on cv. Pasinler-92 on the same medium. The maximum number of axillary shoots (15.25) and nodes (19.0), maximum shoot length (17.25 cm), leaves (19.0) and roots (25.25) were noted on cv. Caspar. The longest roots (18.45 cm) on cv. Pasinler-92, and the maximum fresh weight (404.87 mg) and dry weight (61.85 mg) of plantlets from cv. Granola were also recorded on MS medium fortified with 0.1 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>+0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA+0.5 mg L<sup>-1</sup> JA.

**Keywords:** Potato, *Solanum tuberosum* L., micropropagation, *in vitro*, plant growth regulators

<sup>1</sup> Ahmet Metin KUMLAY ([Orcid ID: 0000-0001-9765-8674](https://orcid.org/0000-0001-9765-8674)) Bünyamin YILDIRIM ([Orcid ID: 0000-0003-2463-6989](https://orcid.org/0000-0003-2463-6989)), Department of Field Crops, Faculty of Agriculture, Iğdır University, Iğdır, Türkiye

<sup>2</sup> Canan KAYA ([Orcid ID: 0000-0003-2014-5373](https://orcid.org/0000-0003-2014-5373)), Eastern Anatolia Agricultural Research Institute, Erzurum, Türkiye

\*Corresponding Author: Ahmet Metin KUMLAY, e-mail: akumlay@hotmail.com

Bu çalışma 9-12 Mayıs 2018 tarihleri arasında Van Yüzüncüyıl Üniversitesi tarafından yapılan "I. International Agricultural Science Congress'de" özet bildiri olarak sunulmuştur.

## INTRODUCTION

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the significant industrial crops all over the world used for multipurposes. Researchers are always interested in improvement of tissue culture techniques of potato to increase high-quality pathogen-free plantlets production with consistent genetic and physiological traits that are highly efficient in terms of photosynthesis (Pruski, 2007; Mohapatra and Batra, 2017; de Morais et al., 2018). *In vitro* techniques could also be employed to stimulate the strength and improvement of potato breeding programs and to overcome negative effects related to conventional breeding methods (Tazeb, 2017). Previous reports suggest that the regeneration of potato is highly explant, PGR combinations and cultivar dependent (Hussain et al., 2005; Kumlay, 2014; Nuwagira et al., 2015; Naqvi et al., 2019). Under appropriate growth conditions, potato shoots, roots and stem explants with nodes have ability to regenerate, even without any plant growth regulators (PGRs) (Kumlay et al., 2014a; Quiroz et al., 2017; Kolachevskaya et al., 2019). However, regeneration of plantlets without PGRs is time extensive inducing low number of shoots, leaves and roots per explants (Kumlay, 2014). Therefore, adding exogenous PGRs is an effective way to accelerate plantlet regeneration and to reduce growth cycle during potato *in vitro* micropropagation (Kumlay et al., 2014b; Mendel et al., 2020). Most of the researchers prefer use of cytokinins with auxins to enhance root and shoot production (Ghaffoor et al., 2003; Kumlay and Eryiğit, 2011; Wani et al., 2018). Even though gibberellic acid (GA<sub>3</sub>), cytokinins, auxins and jasmonic acid (JA) are thought to play a significant effect in arrangement of root and shoot development in potato *in vitro* (Kumlay and Eryiğit, 2011; Kumlay, 2016), there is no study reporting effects of these in combinations on improvement of potato micropropagation.

Previous studies suggest that higher concentrations of benzyl aminopurine (BAP) together with lower concentrations of  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA), and GA<sub>3</sub> induce shoot formation and organogenesis in potato (Hussain et al., 2005; Kaur et al., 2014). Mehmood et al. (2017) noted that potato plantlets from cv. Cardinal on MS + 0.12 mg L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub> and cv. Desiree on MS + 0.25 mg L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub> illustrated reduced days to root initiation, developed maximum plantlet height and more node numbers, and took minimum days to transferable height of the plantlets. Although the employment of BAP in the culture media increased the average rate of multiplication to 3–6 shoots per plantlet (Quiroz et al., 2017), the combination of GA<sub>3</sub>+NAA gave better results since this integration improved the rate of multiplication in shoot tip culture by developing the plantlet height, the number of nodes on the plantlets (Nuwagira et al., 2015). However, Xhulaj and Gixhari (2018) suggested effective combination of GA<sub>3</sub>+BAP in the development of better explant at organogenesis phase. In another research, Xhulaj (2019) recorded better plantlet development in shoot height (8.7 cm), root length (11.2 cm) and node number (5.1) on 0.2 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>+0.02 mg L<sup>-1</sup> NAA hormonal combinations.

It has been suggested that supplementation of MS medium by zeatin riboside (ZR) and zeatin showed better plantlet growth compared to the other cytokinin-containing media (Molla et al., 2011; Chaudhary and Mittal, 2014). Similarly, Dhital et al. (2010) suggested that integration of zeatin,  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA), and GA<sub>3</sub>, in addition to BAP and GA<sub>3</sub>, might be used for direct regeneration of potato shoots under *in vitro* conditions. Minimum days to shoot induction (17 days) with maximum shoot number (12.93) and leaf number (3.22) were recorded on 5.0 mg L<sup>-1</sup> ZR supplemented MS medium (Huda et al. 2013). In another study, Campos et al. (2016) used 3 mg L<sup>-1</sup> concentration of ZR supplemented MS medium with different concentrations of NAA+GA<sub>3</sub>, and the best for shoot regeneration from potato internode explants were obtained from 0.05 mg L<sup>-1</sup> NAA+0.10 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>+3 mg L<sup>-1</sup> ZR including MS medium.

JA is generally well-known because of its tuber-stimulating property *in vitro* (Koda et al., 1991; van den Berg and Ewing, 1991) and has been associated with the promotion of senescence (Pelacho et al., 1997) in the micropropagated potatoes. However, it has been recently shown that JA has outstanding and potentially beneficial features that affect plant growth and improvement when applied exogenously to potato plantlets (Ravnikar et al., 1992; Dermastia et al., 1994). Kumlay et al. (2014) and Kumlay (2016) suggested that root formation as well as vegetative development could be stimulated on *in vitro* cultured potato explants by application of JA.

The purpose of this research was to determine the influence of integration of adenine type cytokinins, naphthalene type auxins, jasmonic acid and GA<sub>3</sub> on improvement of *in vitro* grown potato cultivars Caspar, Granola and Pasinler-92 using meristem originated binodal stem segments as explants.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation, Concentrations and Combinations of Plant Growth Regulators Used in the Research

MS medium including vitamins, sucrose [3%, (w/v)] and agar [0.8% (w/v)] was used in the study. The pH was modulated to 5.7±0.1 by using 1.0 N HCl or 1.0 N NaOH after addition of all medium constituents except agar and Ca-pantothenate. Since the combination of GA<sub>3</sub>+NAA gave better results by developing the plantlet height, the number of stems and nodes on the plantlets (Nuwagira et al., 2015), the integration of these PGRs was used as control. The stem node segments of meristem originated potato explants were regenerated on MS medium including 0.1 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>+0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA (control) with the combination of 2.0 mg L<sup>-1</sup> KIN, 2.0 mg L<sup>-1</sup> BAP, 1.0 mg L<sup>-1</sup> ZR, and 0.5 mg L<sup>-1</sup> JA. Because of thermolabile properties of GA<sub>3</sub>, ZR and JA hormones, they were not autoclaved but they were filter-sterilized by passing through 0.22-µm Millipore filters (Schleicher & Schuell, FP 30/0.2 CA-S; 0.2 µm; 7 bar max) inside a laminar flow cabin, and added to the autoclaved medium after cooling to 40–45 °C. The other PGRs were sterilized along with culture medium by autoclaving at 120 °C, 104 kPa for 15 min.

### Cultivars, Origin of Plant Material and Micropropagation of Explants in the Research

Since *in vitro* grown plantlet is more reliable explants source than field grown plant material (de Morais, 2018), binodal stem explants taken from four weeks old meristem originated seedlings regenerated on micropropagated sprouts of Caspar, Granola and Pasinler-92 potato genotypes were used in the research. Binodal stem explants were aseptically incubated on the MS medium including 10 explants per replication (n=6), totally 60 binodal cuttings per treatment. Explants were cultured under 2,000 lux light intensity with 16-h of long day photoperiod at a temperature of 24±2 °C for 6 weeks.

### Observations and Statistical Method for Evaluation the Results

The results of experiment were recorded as days to shoot and root initiation, shoot and root length (cm), the number of leaves, nodes, axillary shoots and roots per plantlet, fresh weight (FW) and dry weight (DW) of plantlet (mg). FW of harvested plantlets was determined as in mg after washing completely to remove the attached agar, sugar and salt residues from roots, and drying on soft sterile tissue paper. Plantlets were dehydrated to a stable weight at 60°C for 2 d, and then DW of plantlets was determined as in mg. A completely randomized design (CRD) was employed to reveal the performance of three potato cultivars, using five PGR combinations with six replications. Results of the study were subjected to the analysis of variance, the means were evaluated by using Duncan's multiple comparison test and data presented by various letters in the same column are different statistically. Results on all parameters were expressed as means from six replications (n=6) with standard error (± SE).

## RESULTS AND DISCUSSION

The influence of PGRs on the stimulation of plantlet characteristics is presented in Tables 1 through 10. The results showed significantly ( $P < 0.01$ ) different effects of PGRs on the length of shoots and roots, number of nodes, leaves, axillary shoots, roots per shoots along with FW and DW of the plantlets. The results indicated a significant interaction (at the 1% probability level) between PGR combinations (treatments) and cultivars potentiality for the number of leaves and nodes per explant and the length of root. Similarly, an interaction ( $P < 0.05$ ) was also recorded between variety capability and PGRs for the mean shoot length, the mean branch number, FW and DW content of regenerating plantlets.

The days to induce shoot and root initiation ranged 4.00 – 15.75 d and 11.00 – 28.00 d, respectively (Table 1). The average shoot length varied 2.70–17.25 cm, the number of axillary shoots ranged 2.50–15.25 (Table 2), the number of nodes differed 2.75–19.00, the number of leaves ranged 2.75–19.00 (Table 3), the number of roots varied 3.75–25.25, root length changed 2.45–18.45 cm (Table 4). Furthermore, the results had a clear effect on FW of plantlets with range of 186.48–809.73 mg, and the DW of the plantlets differed in range of 19.32–123.73 mg on all PGR combinations treatments. The combined use of KIN, BAP, ZR, and JA with GA<sub>3</sub> plus NAA in 1.0×MS medium resulted in 5.0–11.5 d to induce shoots and 7.5–17.0 d to induce roots. The treatments of hormones ended up with 1.2–5.4 fold increase in shoot length, 1.7–5.8 fold increment in the number of axillary shoots, 1.5–6.9 fold higher node number, 1.3–6.3 fold rise in the number of leaves, 1.5–5.7 fold higher growth in the number of roots, 1.4–6.5 fold rise in root length, 1.3–4.2 fold increase in FW of plantlets, and 1.6–6.4 fold increase in DW of plantlets compared to single application of GA<sub>3</sub> with NAA. The data of this research also illustrated that among the PGRs, the effect of JA was more pronounced in all the studied seedling properties compared to the PGRs. Because the single application of GA<sub>3</sub> and NAA at a 0.1 mg L<sup>-1</sup> concentration (control) showed weaker plantlet growth parameters and their number was much lower than the other PGR treatments, the lowest results from each character were not be discussed in detail in text. The data from of each application and their interactions with cultivar are presented below under different subheadings.

### Days to Shoot Initiation

The influence of all hormone treatments on days to shoot initiation varied significantly ( $P < 0.01$ ). The minimum days to shoot initiation were recorded on Pasinler-92 (4.00 d), followed by Granola (4.75 d) and Caspar (5.50 d) on MS medium including 0.1 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>+0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA+0.5 mg L<sup>-1</sup> JA after 6 weeks of cultivation. However, late-maturing Caspar had the most slowed shoot initiation period of 15.75 d, followed by 14.25 on Granola, and 13.75 d on Pasinler-92 on control treatment (Table 1). The results displayed that the PGR applications were efficient to shorten days to shoot initiation compared to regeneration on control medium. Single application of GA<sub>3</sub> and NAA or in combination with any of the adenine type cytokinin did not significantly reduced days to shoot initiation.

The results are in partial agreement with Zhang and Cheng (1996) who recorded significant consequences of JA on *in vitro*-grown potato nodal explants in terms of shoot induction. In another study, it has been illustrated that days to shoot appearance started 11.75 days earlier on MS medium including 2µM JA compared to the controls (Kumlay, 2016).

### Days to Root Initiation

Significant differences were noted among PGR treatments on the number of days to root initiation ( $P < 0.01$ ). The treatment with KIN, BAP, ZR and JA had a meaningful influence in lowering the days to root initiation compared to regeneration on control medium. Single application of GA<sub>3</sub> and NAA or

in combination with any of the adenine type cytokinin did not significantly reduced days to root induction.

**Table 1.** Effects of various PGR combinations on the days to shoot initiation

| PGR Combinations (mg L <sup>-1</sup> ) |     |     |     |     |     | Days to Shoot Initiation |             |             |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------------|-------------|-------------|
| GA <sub>3</sub>                        | NAA | KIN | BAP | ZR  | JA  | Pasinler-92              | Granola     | Caspar      |
| 0.1                                    | 0.1 |     |     |     |     | 13.75±0.65e              | 14.25±1.75d | 15.75±1.75d |
| 0.1                                    | 0.1 | 2.0 |     |     |     | 10.75±1.11d              | 9.50±0.48c  | 9.25±0.48c  |
| 0.1                                    | 0.1 |     | 2.0 |     |     | 8.50±0.87c               | 8.00±0.41bc | 8.75±0.48bc |
| 0.1                                    | 0.1 |     |     | 1.0 |     | 6.25±0.25b               | 7.50±0.64b  | 8.00±0.58b  |
| 0.1                                    | 0.1 |     |     |     | 0.5 | 4.00±0.25a               | 4.75±0.25a  | 5.50±0.41a  |

Average values presented by various letters in the same column are statistically different

**Table 2.** Effects of various PGR combinations on the days to root initiation

| PGR Combinations (mg L <sup>-1</sup> ) |     |     |     |     |     | Days to Root Initiation |             |             |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------------|-------------|-------------|
| GA <sub>3</sub>                        | NAA | KIN | BAP | ZR  | JA  | Pasinler-92             | Granola     | Caspar      |
| 0.1                                    | 0.1 |     |     |     |     | 22.75±0.48e             | 24.50±0.82e | 28.00±0.82e |
| 0.1                                    | 0.1 | 2.0 |     |     |     | 17.25±1.11d             | 18.75±0.25d | 20.50±0.29d |
| 0.1                                    | 0.1 |     | 2.0 |     |     | 15.00±0.57c             | 16.50±1.00c | 18.00±0.82c |
| 0.1                                    | 0.1 |     |     | 1.0 |     | 13.00±0.50b             | 14.25±0.25b | 15.50±0.96b |
| 0.1                                    | 0.1 |     |     |     | 0.5 | 11.00±0.63a             | 12.00±0.50a | 12.50±0.48a |

Average values presented by various letters in the same column are statistically different

It can be seen on Table 2 that the minimum days required for root initiation were recorded on MS medium supplemented with 0.1 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA + 0.5 mg L<sup>-1</sup> JA (11.00 d for Pasinler-92, 12.00 for Granola, and 12.50 for Caspar). Although there are no many studies of JA supplemented medium regarding days to root induction; in a previous study, involvement of 2µM JA to MS medium of micropropagated potato plantlets stimulated the improvement of roots 17.75 days earlier compared to the control (Kumlay, 2016).

#### Average Shoot Length per Plantlet (cm)

Elongation of regenerated shoots plays important roles in the initial growth stage: It facilitates easy distinction between fast- and slow-regenerating cultivars. It also helps researcher to easily distinguish cultivars with elongating shoots and fast regenerating nodes per explant (Kovac and Ravnkar, 1994).

Combinations of GA<sub>3</sub>+NAA together with KIN, BAP, ZR, and JA affected the length of shoots, demonstrating significant differences among them ( $P<0.01$ ). Reduced shoot length was noted on MS medium including only GA<sub>3</sub>+NAA. Single application of GA<sub>3</sub> and NAA or in combination with any of the adenine type cytokinin did not significantly improved shoot length (Table 3). The interaction between cultivars and PGR treatments also illustrated noteworthy differences ( $P<0.01$ ). Among the five PGRs treatments, a considerable increase was determined using GA<sub>3</sub>+NAA+JA; the longest shoots were observed in the Caspar (17.25 cm), proceeded by Granola (15.88 cm) and Pasinler-92 (15.18 cm) using MS medium including 0.1 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>+0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA+0.5 mg L<sup>-1</sup> JA after 6 weeks of cultivation (Table 3).

Irrespective of PGR combinations, MS medium containing JA showed significantly improved shoot length. The outcomes of the present experiment are in consensus with the findings of Dermastia et al. (1994), who revealed that plantlets grown in a medium supplemented with JA were taller when compared to the other PGR treatments. Zhang and Cheng (1996) noted potato cultivars exhibited various

responses to JA in shoot development when subjected to different JA concentrations in the MS medium. Pelacho et al. (1997) revealed that the application of 0.1 mg L<sup>-1</sup> JA increased the length shoot to 15.65 cm, however shoot elongation decreased to 10.56 cm on 1 mg L<sup>-1</sup> JA including MS medium. Zhang et al. (2006) obtained 8.83 cm-long shoots from cv. Helanwuhua on 2.0 mg L<sup>-1</sup> JA comprising culture medium. Kumlay (2016) obtained 5.67-times longer shoots on 1.0 µM JA including medium in comparison with control treatment.

**Table 3.** Effects of various PGR combinations on average shoot length per plantlet

| PGR Combinations (mg L <sup>-1</sup> ) |     |     |     |     |     | Shoot Length (cm) |             |             |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------|-------------|-------------|
| GA <sub>3</sub>                        | NAA | KIN | BAP | ZR  | JA  | Pasinler-92       | Granola     | Caspar      |
| 0.1                                    | 0.1 |     |     |     |     | 2.70±0.45d        | 4.23±0.62d  | 3.38±0.41d  |
| 0.1                                    | 0.1 | 2.0 |     |     |     | 7.15±0.98c        | 5.98±0.60d  | 6.50±0.47c  |
| 0.1                                    | 0.1 |     | 2.0 |     |     | 10.10±0.77b       | 8.60±0.67c  | 7.85±0.52c  |
| 0.1                                    | 0.1 |     |     | 1.0 |     | 10.63±0.33b       | 11.80±0.25b | 11.58±0.54b |
| 0.1                                    | 0.1 |     |     |     | 0.5 | 15.18±0.78a       | 15.88±0.84a | 17.25±0.35a |

Average values presented by various letters in the same column are statistically different

#### Average Number of Axillary Shoots per Plantlet

Since the increased number of axillary shoots could be multiplied easily for further shoot multiplication, the number of axillary shoots per plantlet is a significant parameter when studying the growth rate of explants. Significant differences were determined among PGRs ( $P < 0.01$ ), since variants of KIN, BAP, ZR, and JA affected the number of axillary shoots. The interaction between cultivars and PGR treatments demonstrated meaningful differences statistically ( $P < 0.05$ ). The highest quantity of axillary shoots was obtained in Caspar (15.25) pursued by Pasinler-92 (13.00) and Granola (12.00) using MS medium supplemented with 0.1 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>+0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA+0.5 mg L<sup>-1</sup> JA combination (Table 4). Reduced number of axillary shoots was noticed on control application. Single application of GA<sub>3</sub>+NAA or in combination with any of the adenine type cytokinin did not significantly improve the quantity of axillary stems per plantlet.

**Table 4.** Effects of various PGR combinations on average number of axillary shoots per plantlet

| PGR Combinations (mg L <sup>-1</sup> ) |     |     |     |     |     | Number of Axillary Shoots |             |             |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------------|-------------|-------------|
| GA <sub>3</sub>                        | NAA | KIN | BAP | ZR  | JA  | Pasinler-92               | Granola     | Caspar      |
| 0.1                                    | 0.1 |     |     |     |     | 2.50±0.29c                | 3.25±0.25d  | 2.75±0.25d  |
| 0.1                                    | 0.1 | 2.0 |     |     |     | 7.75±0.32b                | 7.50±0.29c  | 6.75±0.48c  |
| 0.1                                    | 0.1 |     | 2.0 |     |     | 8.25±0.48b                | 6.50±0.29cd | 6.50±0.29c  |
| 0.1                                    | 0.1 |     |     | 1.0 |     | 8.75±0.48b                | 8.75±0.25b  | 9.00±0.41b  |
| 0.1                                    | 0.1 |     |     |     | 0.5 | 13.00±0.41a               | 12.00±0.41a | 15.25±0.41a |

Average values presented by various letters in the same column are statistically different

The data of the current research are in partial harmony with Ravnkar et al. (1992), Zhang and Cheng (1996) and Kumlay (2016). Ravnkar et al. (1992) expressed that the inclusion of JA at lower concentrations (0.1–1.0 µM) on MS medium resulted in the emergence of lateral branches. Zhang and Cheng (1996) suggested that the quantity of lateral branches enhanced significantly depending on low JA concentrations (0.1–5 µM). Kumlay (2016) obtained 4.57 times higher lateral shoots totally and a maximum number of 8.00 branches from Caspar by addition of 1.0 µM JA to MS medium compared to the control.

The results were not similar to the findings of Rabbani et al. (2001), Hussain et al. (2005), and Uddin (2006). Rabbani et al. (2001) determined that 2.0 mg L<sup>-1</sup> BAP+GA<sub>3</sub> containing MS medium could bring significant development on the *in vitro* multiple shoot induction by increasing the number axillary shoots. Hussain et al. (2005) reported the highest number of 9.0-shoot in cv. Altamash, and 14.3 shoots in cv. Diamond using nodal cuttings on 2.0 mg L<sup>-1</sup> of BAP including MS medium. Uddin (2006) regenerated the better results with the combination of 3.0 mg L<sup>-1</sup> BAP+2.0 mg L<sup>-1</sup> KIN comprised medium, and emphasized this application was superior to using BAP or KIN alone for multiple shoot induction (2.0 shoots).

### Average Number of Nodes per Plantlet

The number of nodes per binodal explants was affected by PGR applications significantly ( $P<0.01$ ). Variations among potato varieties were also significant statistically ( $P<0.05$ ). The presented results clearly indicate role of GA<sub>3</sub>, NAA, and JA in inducing multiple nodes. Maximum number of nodes was determined in Caspar (19.00), proceeded by Granola (16.75) and Pasinler-92 (12.00) on 0.1 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>+0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA+0.5 mg L<sup>-1</sup> JA including MS medium (Table 5). Reduced number of nodes was noted on control medium. Single application of GA<sub>3</sub> and NAA or in combination with any of the adenine type cytokinin did not significantly improve number of nodes per explant.

The introduced findings are development over previous studies by Rabbani et al. (2001), and Uddin (2006). Rabbani et al. (2001) obtained the highest number of nodes (6.2) using 4.0 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> singly. Contrary to the results shown in this study, Uddin (2006) observed a better regeneration response using BAP compared to KIN. The results are in harmony with the findings of Ravnkar et al. (1990), Zhang and Cheng (1996) and Kumlay (2016) in which they recorded that JA concentration used variably showed a rise on node number per plantlet.

**Table 5.** Effects of various PGR combinations on average node number per plantlet

| PGR Combinations (mg L <sup>-1</sup> ) |     |     |         |     |     | Number of Nodes |             |             |
|--|-----|-----|---------|-----|-----|-----------------|-------------|-------------|
| GA <sub>3</sub>                        | NAA | KIN | BAP     | ZR  | JA  | Pasinler-92     | Granola     | Caspar      |
| 0.1                                    | 0.1 |     | Control |     |     | 3.00±0.41c      | 4.25±0.63c  | 2.75±0.25c  |
| 0.1                                    | 0.1 | 2.0 |         |     |     | 7.25±0.51b      | 6.50±0.29b  | 5.25±0.75b  |
| 0.1                                    | 0.1 |     | 2.0     |     |     | 6.00±0.71b      | 6.75±0.48b  | 6.75±0.25b  |
| 0.1                                    | 0.1 |     |         | 1.0 |     | 7.50±0.64b      | 6.25±0.25b  | 6.50±0.50b  |
| 0.1                                    | 0.1 |     |         |     | 0.5 | 12.00±0.41a     | 16.75±0.63a | 19.00±0.58a |

Average values presented by various letters in the same column are statistically different

### Average Number of Leaves per Plantlet

The number of leaves per plantlet demonstrated noteworthy differences ( $P<0.01$ ) after treatment with PGRs used in this research. The maximum number of leaves was detected in Caspar (19.00), succeeded by Pasinler-92 (15.50) and Granola (15.25) using MS medium supplemented with 0.1 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>+0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA+0.5 mg L<sup>-1</sup> JA (Table 6). Reduced number of leaves was noted on control medium. Single application of GA<sub>3</sub> and NAA or in combination with any of the adenine type cytokinin did not significantly improved number of leaves per explant.

The findings of the research have edge over all former studies with more number of leaves per explant emphasizing role of NAA, GA<sub>3</sub> and JA used in combination to induce leaves on regenerating plantlets. Dermastia et al. (1997) demonstrated that explants cultured on JA supplemented medium resulted in expanded leaves. Kumlay (2016) observed an increase on leaf number from Caspar (19.00), on 1.0 μM JA including medium, and emphasized that the addition of JA concluded in a 7.60-times rise in the leaf number compared to no PGRs including control medium.



**Table 6.** Effects of various PGR combinations on the average number of leaves per plantlet

| PGR Combinations (mg L <sup>-1</sup> ) |     |     |     |     |     | Number of Leaves |             |             |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|------------------|-------------|-------------|
| GA <sub>3</sub>                        | NAA | KIN | BAP | ZR  | JA  | Pasinler-92      | Granola     | Caspar      |
| 0.1                                    | 0.1 |     |     |     |     | 2.75±0.48c       | 3.50±0.29d  | 3.00±0.00c  |
| 0.1                                    | 0.1 | 2.0 |     |     |     | 7.25±0.68b       | 6.25±0.25b  | 4.50±0.29c  |
| 0.1                                    | 0.1 |     | 2.0 |     |     | 3.75±0.25c       | 5.00±0.41c  | 3.75±0.48c  |
| 0.1                                    | 0.1 |     |     | 1.0 |     | 7.50±1.26b       | 3.25±0.25d  | 10.50±0.65b |
| 0.1                                    | 0.1 |     |     |     | 0.5 | 15.50±0.65a      | 15.25±0.63a | 19.00±1.22a |

Average values presented by various letters in the same column are statistically different

### Average Number of Roots per Plantlet

Data obtained from this research showed significant influence of all PGR treatments on root number ( $P < 0.01$ ). Single application of GA<sub>3</sub> and NAA or in combination with any of the adenine type cytokinin did not significantly improve number of roots per explant. The roots of the plantlets treated with the application of GA<sub>3</sub> and NAA at a 0.1 mg L<sup>-1</sup> or any concentration of adenine type cytokinin were much weaker and their number was much lower than compared to JA containing treatments. The maximum number of roots were recorded in Caspar (25.25), succeeded by Granola (24.00) and Pasinler-92 (23.75) using MS medium containing 0.1 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>+0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA+0.5 mg L<sup>-1</sup> JA (Table 7). The results of this study showed edge of NAA, GA<sub>3</sub>, JA regenerated shoots to induce higher number of roots and enhanced rooting efficiency indicate that the NAA, GA<sub>3</sub>, JA-supplemented medium prepares plantlets for easy acclimatization to *ex vitro* conditions and increases their chance to survival under greenhouse conditions.

**Table 7.** Effects of various PGR combinations on the average number of roots

| PGR Combinations (mg L <sup>-1</sup> ) |     |     |     |     |     | Number of Roots |             |             |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----------------|-------------|-------------|
| GA <sub>3</sub>                        | NAA | KIN | BAP | ZR  | JA  | Pasinler-92     | Granola     | Caspar      |
| 0.1                                    | 0.1 |     |     |     |     | 3.75±0.25e      | 5.50±0.65e  | 4.00±0.87e  |
| 0.1                                    | 0.1 | 2.0 |     |     |     | 9.75±1.00d      | 10.25±0.48d | 9.50±0.65d  |
| 0.1                                    | 0.1 |     | 2.0 |     |     | 15.50±0.29c     | 14.75±0.25c | 15.25±0.48c |
| 0.1                                    | 0.1 |     |     | 1.0 |     | 18.00±0.82b     | 18.50±0.87b | 18.00±0.41b |
| 0.1                                    | 0.1 |     |     |     | 0.5 | 23.75±0.48a     | 24.00±0.41a | 25.25±0.48a |

Average values presented by various letters in the same column are statistically different

The results reported here are improvement over previous studies. Ravnkar et al. (1990) noted the highest root number on higher JA including MS medium, although its roots shortened and its diameter increased. Kovac and Ravnkar (1994) reported that 1.0 μM JA concentration improved the root systems of potatoes grown *in vitro*. Martin-Closas et al. (2000) implied that JA induced root establishment in *in vitro* cultured potato explants. Although Pelacho et al. (1997) obtained the highest number of 14.8 roots on 1.0 mg L<sup>-1</sup> JA including medium, and Zhang et al. (2006) determined the highest number of 12.00 roots in cv. Helanwuhua on 2.0 mg L<sup>-1</sup> JA containing MS medium. Kumlay (2016) pointed out that the inclusion of JA showed a 4.69-times higher root number. It is clear from these results that when the concentrations increased the number of roots decreased or did not increase significantly.

### Average Root Length per Plantlet (cm)

The treatment of PGRs varied the length of roots significantly ( $P < 0.01$ ) among potato cultivars. The longest roots were determined from Pasinler-92 (18.45 cm), followed by Caspar (17.10 cm) and Granola (17.03 cm) using control medium + 0.5 mg L<sup>-1</sup> JA (Table 8) without having any adverse effect

on texture of roots. Irrespective of the cultivar, the developing roots were morphologically strong did not show any abnormality or inhibition, branched and had tendency to grow with the passage of time. The results clearly demonstrate that presence of GA<sub>3</sub>+NAA+JA in one medium significantly improve root length in potato cultivars. Single application of GA<sub>3</sub> and NAA or in combination with any of the adenine type cytokinin did not significantly improve root length.

There are contradictory results and no agreement about JA containing medium in previous studies. Ravnkar et al. (1992) illustrated that JA treatment using lower concentrations (0.1–1.0 μM) resulted in a very distinction root structure with many irregular branches. Dermastia et al. (1994) demonstrated that explants cultures in JA containing medium generated a well-developed root system. Although Pelacho et al. (1997) obtained the increased the length of root on 1.0 mg L<sup>-1</sup> JA including medium (14.8 cm), Zhang et al. (2006) illustrated that the application 2 mg L<sup>-1</sup> JA including medium significantly increased root length (16.37 cm in cv. Favorita), and Kumlay (2016) determined the longest roots from cv. Pasinler-92 (14.95 cm), including 1.0 μM JA containing medium. The findings of the current research are in disagreement with the results of Vilhar et al. (1997), which showed that JA changed the root structure and inhibited root proliferation, but caused thicker roots through cell division and not cell enlargement.

**Table 8.** Effects of various PGR combinations on the average root length

| PGR Combinations (mg L <sup>-1</sup> ) |     |     |         |    |    | Root Length (cm) |             |             |             |
|--|-----|-----|---------|----|----|------------------|-------------|-------------|-------------|
| GA <sub>3</sub>                        | NAA | KIN | BAP     | ZR | JA | Pasinler-92      | Granola     | Caspar      |             |
| 0.1                                    | 0.1 |     | Control |    |    | 2.45±0.35d       | 4.85±0.55d  | 3.63±0.36e  |             |
| 0.1                                    | 0.1 | 2.0 |         |    |    | 7.28±0.38c       | 5.95±0.48cd | 6.20±0.45d  |             |
| 0.1                                    | 0.1 |     | 2.0     |    |    | 8.78±0.53c       | 6.50±0.44c  | 7.68±0.59c  |             |
| 0.1                                    | 0.1 |     | 1.0     |    |    | 11.03±0.65b      | 10.25±0.48b | 10.35±0.27b |             |
| 0.1                                    | 0.1 |     |         |    |    | 0.5              | 18.45±0.59a | 17.03±0.68a | 17.10±0.36a |

Average values presented by various letters in the same column are statistically different

#### Average Fresh Weight per Plantlet (mg)

The application of PGRs to the MS medium influenced the FW of cultured explants significantly ( $P<0.01$ ) among cultivars. The interaction of PGRs and potato cultivars on the FW of plantlets illustrated significant differences ( $P<0.05$ ). The heaviest FW of cultured explants was observed in Granola (404.87 mg), followed by Pasinler-92 (399.68 mg) and Caspar (390.08 mg) using MS medium containing control+0.5 mg L<sup>-1</sup> JA (Table 5). However, the minimum FW of plantlets was observed in cv. Caspar (93.24 mg) and cv. Pasinler-92 (94.23 mg) using MS medium containing control application (Table 9). These results clearly show that presence of GA<sub>3</sub>+NAA+JA in one medium significantly improve fresh weight in potato cultivars.

**Table 9.** Effects of various PGR combinations on the average fresh weight of plantlets

| PGR Combinations (mg L <sup>-1</sup> ) |     |     |         |    |    | Fresh Weight of Plantlet (mg) |              |              |              |
|--|-----|-----|---------|----|----|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| GA <sub>3</sub>                        | NAA | KIN | BAP     | ZR | JA | Pasinler-92                   | Granola      | Caspar       |              |
| 0.1                                    | 0.1 |     | Control |    |    | 94.23±6.9d                    | 108.57±6.3d  | 93.24±4.3d   |              |
| 0.1                                    | 0.1 | 2.0 |         |    |    | 205.30±9.7c                   | 185.62±10.0c | 195.73±12.0c |              |
| 0.1                                    | 0.1 |     | 2.0     |    |    | 208.02±6.5c                   | 139.34±14.5d | 153.84±16.9c |              |
| 0.1                                    | 0.1 |     | 1.0     |    |    | 317.07±13.8b                  | 298.78±20.8b | 331.95±17.2b |              |
| 0.1                                    | 0.1 |     |         |    |    | 0.5                           | 399.68±16.9a | 404.87±16.8a | 390.08±27.4a |

Average values presented by various letters in the same column are statistically different

The current findings are in partial harmony with previous studies, all of which used variable concentrations of JA on variable cultivars to induce maximum fresh weight. Pelacho et al. (1997) showed that increasing JA concentration decreased total FW of plantlet. Zhang et al. (2006) reported that the fresh mass of potato plantlets cultured *in vitro* significantly increased with application of JA, but higher amount of JA applications delayed the FW of cultured potato plantlets. Findings of Kumlay (2016) are in agreement with above researches that pointed out the maximum FW was obtained on cv. Pasinler of 649.38 mg on 1.0  $\mu\text{M}$  JA, but same cultivar gave 418.1 mg on 2.0  $\mu\text{M}$  JA containing MS medium.

### Average Dry Weight per Plantlet (mg)

The influence of all PGR treatments on the DW of cultured explants varied significantly ( $P < 0.01$ ). Variations among potato varieties, and the interaction of PGRs and varieties on the DW of plantlets also indicated significant differences at the 5% probability level. The highest DW were observed in Granola (61.85 mg), followed by Pasinler-92 (59.68 mg) and Caspar (57.15 mg) using MS medium including control+0.5 mg L<sup>-1</sup> JA. The results clearly indicate that presence of JA in MS medium significantly improved DW of cultured explants. However, the lowest DW content of plantlets was observed in Pasinler-92 (19.32 mg) using control medium, as well as in Caspar (10.17 mg) and Granola (11.98 mg) using 0.1 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>+2 mg L<sup>-1</sup> BAP containing MS medium (Table 10).

**Table 10.** Effects of various PGR combinations on the average dry weight of plantlets

| PGR Combinations (mg L <sup>-1</sup> ) |     |     |         |     |     | Dry Weight of Plantlet (mg) |             |             |
|--|-----|-----|---------|-----|-----|-----------------------------|-------------|-------------|
| GA <sub>3</sub>                        | NAA | KIN | BAP     | ZR  | JA  | Pasinler-92                 | Granola     | Caspar      |
| 0.1                                    | 0.1 |     | Control |     |     | 9.66±0.39c                  | 11.98±0.96b | 10.17±0.50c |
| 0.1                                    | 0.1 | 2.0 |         |     |     | 22.54±0.97bc                | 19.83±0.76b | 24.76±0.73b |
| 0.1                                    | 0.1 |     | 2.0     |     |     | 20.91±0.79c                 | 15.05±0.50b | 16.08±0.53c |
| 0.1                                    | 0.1 |     |         | 1.0 |     | 38.37±1.08b                 | 35.35±0.96b | 47.14±1.16a |
| 0.1                                    | 0.1 |     |         |     | 0.5 | 59.68±1.66a                 | 61.85±1.74a | 57.15±1.87a |

Average values presented by various letters in the same column are statistically different

The present findings are in agreement with previous studies by Castro et al. (2000) reported that JA significantly increased DW when compared to control treatment in the presence of GA<sub>3</sub>. Martin-Closas et al. (2000) also suggested that inclusion of JA increased the mean DW of shoots (60%) and average DW of roots (300%) of cultured potato explants *in vitro*. It is also presented that, although inclusion of JA increased DW at 1.0  $\mu\text{M}$  concentration, the addition of 2.0  $\mu\text{M}$  JA decreased DW of micropropagated potato plantlets (Kumlay, 2016).

### CONCLUSION

All studied cultivars responded positively to PGRs supplemented to MS medium resulting in healthy *in vitro* grown plantlets with green leaves and normal morphological traits. The results of this study revealed that irrespective of the parameter studied, presence of JA in one medium had significantly positive impact on potato cultivars used in this study compared to the results reported in previous researches. Since the exogenous addition of JA in combination with GA<sub>3</sub>+NAA effectively reduces propagation interval and increases the number of cultured potato explants under *in vitro* conditions, it can be concluded that this PGR combination plays a significant role in governing shoot and root improvement on micropropagated plantlets.

Because this study has shown the influence of different hormones on cultured explants properties differed with the cultivar and the appropriate PGR concentration may be unique for each potato cultivar, further researches might be conducted to determine the optimal PGR combinations for new improved

promising potato clones or lines. The studies could also be further expanded by investigating the factors that affect acclimatization to *ex vitro* conditions and microtuberization in micropropagated potato plantlets.

### Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

### Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

### REFERENCES

- Campos NA, da Silva GJ, de Paula MFB, Rodrigues TB, Rodrigues LAZ, Paiva LV, 2016. A Direct Organogenesis Protocol from Shoot Segments of *Solanum tuberosum* cv. Monalisa. Australian Journal of Crop Science, 10 (7): 964–968.
- Castro G, Abdala G, Agüero C, Tzio R, 2000. Interaction Between Jasmonic and Gibberellic Acids on *in vitro* Tuberization of Potato Plantlets. Potato Research, 43 (1): 83–88.
- Chaudhary B, Mittal P, 2014. The Effects of Different Concentrations and Combinations of Growth Regulators on the Micropropagation of Potato (*Solanum tuberosum*). International Journal of Education and Science Research, 1 (4): 65–70.
- de Moraes TP, Asmar SA, Silva HFJ, Luz JMQ, de Melo B, 2018. Application of Tissue Culture Techniques in Potato. Bioscience Journal, 34 (4): 952–969.
- Dermastia M, Ravnkar M, Vilhar B, Kovac M, 1994. Increased Level of Cytokinin Ribosides in Jasmonic Acid-Treated Potato (*Solanum tuberosum*) Stem Node Cultures. Physiologia Plantarum, 92 (2): 241–246.
- Dhital SP, Lim HT, Manandhar HK, 2010. Direct and Efficient Plant Regeneration from Different Explant Sources of Potato Cultivars as Influenced by Plant Growth Regulators. Nepal Journal of Science and Technology, 12: 1–6.
- Ghaffoor A, Shah GB, Waseem K, 2003. *In vitro* Response of Potato (*Solanum tuberosum* L.) to Various Growth Regulators. Biotechnology, 2 (3): 191–197.
- Huda MS, Hossain MM, Zakaria M, Haq MZ, Hannan A, 2013. Effect of Different Explant and Concentration of Zeatine Riboside for *in vitro* Regeneration of Potato. Eco-Friendly Agricultural Journal, 6 (7): 128–130.
- Hussain I, Muhammad A, Chaudhry Z, Asghar R, Naqvi SMS, Rashid H, 2005. Morphogenetic Potential of Three Potato (*Solanum tuberosum*) Cultivars from Diverse Explants, A Prerequisite in Genetic Manipulation. Pakistan Journal of Botany, 37 (4): 889–898.
- Kaur M, Kaur R, Sharma C, Kaur N, Kaur A, 2014. Effect of Growth Regulators on Micropropagation of Potato Cultivars. Journal of Cell & Tissue Research, 14 (1): 4363–4366.
- Koda Y, Kikuta Y, Tazaki H, Tsujino Y, Sakamura S, Yoshihara T, 1991. Potato Tuber-Inducing Activities of Jasmonic Acid Related Compounds. Phytochemistry, 30 (5): 1435–1438.
- Kolachevskaya OO, Lomin SN, Arkhipov DV, Romanov GA, 2019. Auxins in Potato: Molecular Aspects and Emerging Roles in Tuber Formation and Stress Resistance. Plant Cell Reports, 38: 681–698.
- Kovac M, Ravnkar M, 1994. The Effect of Jasmonic Acid on the Photosynthetic Pigments of Potato Plants Grown *In Vitro*. Plant Science, 103 (1): 11–17.
- Kumlay AM, Eryiğit, T, 2011. Growth and Development Regulators in Plants: Plant Hormones, Iğdır University Journal of the Institute of Science and Technology, 1 (2): 47–56.

- Kumlay A, 2014. Combination of the Auxins NAA, IBA, and IAA with GA<sub>3</sub> Improves the Commercial Seed-Tuber Production of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Under *in vitro* Conditions. BioMed Research International, Volume 2014, Article ID 439259, 7 pages.
- Kumlay AM, Arslan N, Kaya C, 2014a. Factors Affecting Microtuberization of Potato (*Solanum tuberosum* L.) on *in vitro* Conditions. Anadolu Journal of Agricultural Sciences, 29 (2): 154–165.
- Kumlay AM, Arslan, N, Kaya C, 2014b. The Effect of Plant Growth Regulators on *In Vitro* Grown Potato (*Solanum tuberosum* L.) Explants Under Different Photoperiod Conditions. Iğdır University Journal of the Institute of Science and Technology, 4 (2): 83–94.
- Kumlay AM, 2016. The Effect of Jasmonic Acid on the Micropropagation of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Under Long Day Conditions. Yüzüncüyıl University Journal of Agricultural Sciences, 26 (1): 79–88.
- Martin-Closas LI, Sol S, Pelacho AM, 2000. Potential Application of Jasmonic Acid for *Solanum tuberosum* Micropropagation. Part 10: Application of Biotechnology and Molecular Biology and Breeding–*In vitro* Culture, (Eds. van der Plas LHW and de Klerk GJ), *ISHS Acta Horticulturae*, XXV International Horticultural Congress, 2–7, August 1998, Brussels, Belgium, 520: 127–134.
- Mehmood A, Shah AH, Sajid M, Ahmad H, 2016. Investigation of GA<sub>3</sub> Effect on *In Vitro* Micropropagation of Potato Varieties. International Journal of Agronomy and Agricultural Research, 9 (5): 21–30.
- Mendel P, Schiavo-Capri E, Lalge AB, Vyhnanek T, Kalousek P, Trojan V, Havel L, Filippi A, Braidot E, 2020. Evaluation of Selected Characteristics in Industrial Hemp after Phytohormonal Treatment. Pakistan Journal of Agricultural Science, 57 (1): 1–7.
- Molla MMH, Nasiruddin KM, Al-Amin M, Khana ASMMR., Salam MA, 2011. Effect of 6-Benzyl Aminopurine, Thidiazuron and Zeatin Riboside on Direct Regeneration of Potato. SAARC Journal of Agriculture, 9 (1): 55–68.
- Mohapatra PP, BatraVK, 2017. Tissue Culture of Potato (*Solanum tuberosum* L.): A Review. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6 (4): 489–495.
- Naqvi B, Abbas H, Ali H, 2019. Evaluation of *In Vitro* Tuber Induction Ability of Two Potato Genotypes. Pakistan Journal of Agricultural Science, 56 (1): 77–81.
- Nuwagira F, Mukasa SB, Wagoire WW, Namugga P, Kashaija IN, Barekye A, 2015. Determination of Hormonal Combination for Increased Multiplication of Tissue Culture Potato Plantlets. Uganda Journal of Agricultural Sciences, 16 (1): 129–137.
- Pelacho AM, Perez-Katalan J, Martin-Closas LI, 1997. Root Development *In Vitro* Potato Explants as Affected by Jasmonic Acid. Biology of Root Formation and Development, In: Basic Life Sciences, (Eds. Altman A, Waisel Y), 65: 141–145.
- Pruski K, 2007. The Canon of Potato Science: *In Vitro* Multiplication through Nodal Cuttings. Potato Research, 50 (3–4): 293–296.
- Quiroz KA, Berríos M, Carrasco B, Retamales JB, Caligari PDS, García-González R, 2017. Meristem Culture and Subsequent Micropropagation of Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis* (L.) Duch.). Biological Research, 50 (1):20.
- Rabbani A, Askari B, Abbasi NA, Bhatti M, Quraishi A, 2001. Effect of Growth Regulators on *In Vitro* Multiplication of Potato. International Journal of Agriculture and Biology, 3 (2): 181–182.
- Ravnikar M, Rode J, Gogala N, Benedicic D, 1990. Regulation of Organogenesis with Jasmonic Acid. *ISHS Acta Horticulturae* (Eds. Janick J, Zimmerman RH), I. International Symposium on *In vitro* Culture and Horticultural Breeding, Bologna, Italy, 280: 169–172.

- Ravnikar M, Vilhar B, Gogala N, 1992. Stimulatory Effects of Jasmonic Acid on Potato Stem Node and Protoplast Culture. *Journal of Plant Growth Regulation*, 11 (1): 29–33.
- Tazeb A, 2017. Plant Tissue Culture Techniques as A Novel Tool in Plant Breeding: A Review Article. *American-Euroasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 17 (2): 111–118.
- Uddin NS, 2006. *In Vitro* Propagation of Elite Indigenous Potato (*Solanum tuberosum* L. var. Indurkani) of Bangladesh. *Journal of Plant Science*, 1 (3): 212–216.
- van den Berg, JH, Ewing EE, 1991. Jasmonates and Their Role in Plant Growth and Development, with Special Reference to the Control of Potato Tuberization: A Review. *American Potato Journal*, 68 (11): 781–794.
- Vilhar B, Ravnikar M, Francis D, 1997. Jasmonic Acid Affects Cell Division in Meristems of Cultured Potato Roots. *Biology of Root Formation and Development* (In: Basic Life Sciences, Eds. Altman A, Waisel Y), Springer, New York, USA, 65: 105–110.
- Wani AM, Jamir LL, Rai P, 2018. Effects of IBA, NAA and GA<sub>3</sub> on Rooting and Morphological Features of *Ginkgo biloba* Linn. Stem Cuttings. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(3): 1894–1896.
- Khulaj DB, Gixhari B, 2018. *In Vitro* Micropropagation of Potato (*Solanum tuberosum* L) Cultivars. *Agriculture and Forestry*, 64 (4): 105–112.
- Khulaj DB, 2019. Shoot Regeneration of Potato Cultivar “Montecarlo” Using Tissue Culture. Eds. Mioč B, Širić I, 54th Croatian and 14th International Symposium on Agriculture, February 17–22, 2019, Vodice, Croatia, p: 218–222.
- Zhang Z, Cheng ZM, 1996. The Effect of Jasmonic Acid on *In Vitro* Nodal Culture of Three Potato Cultivars. *HortScience*, 31 (4): 631.
- Zhang ZJ, Zhou WJ, Li HZ, Zhang GQ, Subrahmaniyan K, Yu JQ, 2006. Effect of Jasmonic Acid on *In Vitro* Explant Growth and Microtuberization in Potato. *Biologia Plantarum*, 50 (3): 453–456.

**Atf İçin:** Karasahin M, 2021. Farklı Yetiştirme Ortamı, Altlık ve Sulama Yöntemi Uygulamalarının Topraksız Rulo Çim Üzerine Etkileri. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1616-1624.

**To Cite:** Karasahin M, 2021. Effects of Different Growing Medium, Substrate and Irrigation Method Applications on Soilless Roll Sod. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1616-1624.

### **Effects of Different Growing Medium, Substrate and Irrigation Method Applications on Soilless Roll Sod**

Muhammet KARAŞAHİN<sup>1\*</sup>

**ABSTRACT:** This research was carried out in the hydroponics production field at Selcuk University, Cumra School of Applied Sciences between the dates of 01.09.2019 and 28.02.2020. This study was conducted in order to determine the effects of different growing medium (Co: control, Wp: wood powder, Pe: perlite, and Tu: turf (cocopeat)), substrates (Cf: cotton fiber, Pf: polyester fiber, Pm: polyester mesh), and irrigation method (Sp: sprinkler, Ti: tidal, and Fp: fogponic) applications on soilless roll sod, the following characteristics were examined: fresh grass yield ( $g\ m^{-2}$ ), dry matter rate (%), dry grass yield ( $g\ m^{-2}$ ), plant height (mm), emergence speed (day), covering speed (day), root length (cm), overall appearance (1-9), shoot diameter (mm), tiller number (number  $cm^{-2}$ ), leaf blade length (cm), leaf blade width (mm) and the index value (leaf blade length/leaf blade width). It was observed that there was no statistical difference between the applications in terms of overall appearance values. When root length and tiller number values, which are among the important growth parameters in the soilless roll sod production, application conveniences, biodegradability, and production costs are considered together, "Tu" growing medium, "Cf" substrate and "Sp" irrigation method applications came to the fore. To be able to obtain more realistic recommendations on this issue, land applications should be included in future research.

**Keywords:** Growing medium, irrigation method, roll sod, substrate

#### **Farklı Yetiştirme Ortamı, Altlık ve Sulama Yöntemi Uygulamalarının Topraksız Rulo Çim Üzerine Etkileri**

**ÖZET:** Araştırma, 01.09.2019 ile 28.02.2020 tarihleri arasında, Selçuk Üniversitesi Çumra Uygulamalı Bilimler Yüksekokulu hidroponik üretim alanında yürütülmüştür. Çalışma, farklı yetiştirme ortamı (Co; kontrol, Wp; odun tozu, Pe; perlit ve Tu; torf (cocopeat)), altlık (Cf; pamuk elyaf, Pf; polyester elyaf ve Pm; polyester elek) ve sulama yöntemi (Sp; yağmurlama, Ti; gel-git ve Fp; fogponik) uygulamalarının topraksız rulo çim üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yürütülmüş ve yeşil ot verimi ( $g\ m^{-2}$ ), kuru madde oranı (%), kuru ot verimi ( $g\ m^{-2}$ ), bitki boyu (mm), çıkış hızı (gün), kaplama hızı (gün), kök uzunluğu (cm), genel görünüm (1-9), sürgün çapı (mm), kardeş sayısı (adet  $cm^{-2}$ ), yaprak ayası uzunluğu (cm), yaprak ayası genişliği (mm) ile indeks değeri (Yaprak ayası uzunluğu/Yaprak ayası genişliği) özellikleri incelenmiştir. Genel görünüm değerleri bakımından uygulamalar arasında istatistiki farklılığın olmadığı görülmüştür. Topraksız rulo çim üretiminde önemli gelişim parametrelerinden kök uzunluğu ve kardeş sayısı değerleri uygulama kolaylıkları, biyo çözünürlük ve üretim maliyetleri birlikte dikkate alınarak değerlendirildiğinde Tu yetiştirme ortamı, Cf altlık ve Sp sulama yöntemi uygulamaları ön plana çıkmaktadır. Bu konuda daha gerçekçi tavsiyeler için ileride yapılacak araştırmalara arazi uygulamaları dahil edilmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** Altlık, rulo çim, sulama yöntemi, yetiştirme ortamı

<sup>1</sup> Muhammet KARAŞAHİN ([Orcid ID: 0000-0001-8586-0701](https://orcid.org/0000-0001-8586-0701)), Selçuk Üniversitesi, Çumra Uygulamalı Bilimler Yüksekokulu, Organik Tarım İşletmeciliği Bölümü, Çumra, Konya, Türkiye

**\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Muhammet KARAŞAHİN, e-mail: mkarasahin@selcuk.edu.tr

## INTRODUCTION

Grass areas are very useful in aesthetically beautifying the environment, changing the climate, and improving air quality. Grasses are the only landscape plant that can be used in areas where there is intense mobility. Grass plants have the characteristics of regrowth after chewing, plucking, and mowing processes. Grass fields are taking place among the fire control strategies in urban areas, and they take on an important task in holding the waters formed by extreme rains and lost by surface runoff. In urban centers, they are used on the roofs and facades of buildings to reduce air pollution and improve air quality (Farid et al., 2016). The benefits of grass areas can be divided into three groups as functional, recreational, and aesthetic components (Beard and Green, 1994). Grass areas are not only important in an aesthetic sense but also they add value to settlements.

Roll sod is grass harvested from its place with roots and soil clinging to them to be grown elsewhere (Pessarakli, 2008). The use of roll sod can be a quick and simple solution to repair damages that occur frequently in sports fields; because there is very little time for rooting in such areas, thick-cut roll sods are often used (Pessarakli, 2008). Roll sod is traditionally produced in agricultural lands. The biggest pressure on sustainable roll sod production is the removal of the very precious top layer of agricultural land with each harvest. For sustainable roll grass production, the production of roll grass in greenhouses in soilless environments comes across as alternative growing techniques by preventing soil losses, shortening cultivation time, and eliminating difficulties in roll sod harvesting. The use of renewable resources in production reduces costs, ensures waste management, and contributes to sustainable environmental management. For this purpose, the use of composted organic wastes as a growing material in the production of rolling sod would be a very environmental approach (Dede and Özdemir, 2011).

Sustainable agriculture is an agricultural system that minimizes waste and environmental impacts, while advising farmers to work with natural inputs to protect land and water resources (Mason, 2003). Today, most of the studies are aiming to increase the use of renewable resources. By using inorganic and organic materials mixtures and by increasing their water retention capacity, the negativities experienced in plant-feeding can be avoided (Albaho et al., 2009; Johnson, 2010; Gutierrez et al., 2012). A good growing medium should have the ability to protect and support the plant, have the ability to store enough water and plant nutrients, and provide opportunity for gas exchange between the roots and the atmosphere by providing adequate oxygen to the plant roots. Growing media have a variety of materials and structures that may have direct or indirect effects on plant growth and development. Materials such as turf, perlite, coconut fiber and mat, volcanic tuff, and compost can be used alone as growing media; additionally, their mixtures are also widely used as growing media (Gutierrez et al., 2012). In hydroponic growing systems, it is important to apply the right amount of water and plant nutrients to be able to prevent stress conditions and to keep production under control. In grass production, hydroponic systems are modern technologies that reduce the risks of weeds and disease. In the prevention of the negative effects of many diseases and pests originating from the soil, production in a controlled medium becomes important day by day. Also, the soilless culture system facilitates water and fertilizer management and increases the efficiency of their usage by plants (Savvas et al., 2013). Since grass species and varieties have different characteristics, they need different water and irrigation regime (Carrow, 1995). Whereas warm-climate grass species can be grown with less water supply, cool-climate grass species need more water and a more sensitive irrigation program for growth. The same grass species need different amounts of water when they are grown in different environmental conditions.



Grass production on plastic in soilless environments has significant advantages over the traditional grass production (Roberts et al., 2001; Karaşahin, 2020). While the production of roll sod in soil by traditional methods requires considerable time and expense, the production of grass on plastic in a soilless medium can be done in a much shorter time and more efficiently (Decker and Decker, 1988). Ventilation, moisture, plant nutrients, and growing medium components play important roles in growth and optimum quality (Bruce et al., 2000; Brien and Barker, 1995). The use of turf as grass growing medium is quite costly, so it is important to find suitable alternatives for this purpose. Compared to traditional grass production, the production time of grass on plastic was able to be reduced from 2 years to 7-10 weeks for *Festuca aurandinacea* by the use of composts derived from organic waste (Decker, 2001). In the plant production in soilless media, more products can be obtained in less time, plants can be grown denser in the unit area, with a balanced supply of air, water, and plant nutrients, the products become more resistant to diseases, and natural or biological control can be performed easily. Moreover, soil-borne diseases and pests are not seen and there is no need to fight weeds (Munoz, 2010). Various materials such as saw powder, coconut fiber, sphagnum turf, rice husk, polyurethane, growing slabs, lava tuff are used as growing materials in hydroponic production. A good growing material should have high porosity, sufficient oxygen and water dispersal, low EC and pH values between 5 and 6.5, and should be chemically inert and sterile (Yeager et al., 2007).

In this study, it was aimed to determine the effects of different growing medium, substrate, and irrigation method applications on soilless roll sod.

## MATERIALS AND METHODS

The research was carried out in the hydroponics production field at Selcuk University, Cumra School of Applied Sciences between the dates of 01.09.2019 and 28.02.2020 (Figure 1). 33x11.5 cm twelve aluminum frames were used as the cultivation setting (Figure 2).



Figure 1. Hydroponic production field



Figure 2. Cultivation setting

In the study, 50 g m<sup>-2</sup> was applied as seed amount, 20 °C as ambient temperature, control as growing medium and fertilizer source, cotton fiber as the substrate material, sprinkler as irrigation method (20 sec 6 h<sup>-1</sup>), and 15 days as cultivation duration. Only the parameters investigated have been changed in each application. In the irrigation system, the city water supply network was used as the water source (Table 1). The costs of the growing medium vary according to the capacity.

In the research, perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) was used as plant material. In order to determine the effects of different growing medium (Co: control, Wp: wood powder, Pe: perlite, and Tu: turf (cocopeat)), substrates (Cf: cotton fiber, Pf: polyester fiber, Pm: polyester mesh),

and irrigation method (Sp: sprinkler, Ti: tidal, and Fp: fogponic) applications on soilless roll sod, the following characteristics were examined: fresh grass yield ( $\text{g m}^{-2}$ ), dry matter rate (%), dry grass yield ( $\text{g m}^{-2}$ ), plant height (mm), emergence speed (day), covering speed (day), root length (cm), overall appearance (1-9), shoot diameter (mm), tiller number (number  $\text{cm}^{-2}$ ), leaf blade length (cm), leaf blade width (mm) and the index value (leaf blade length/leaf blade width).

**Table 1.** Properties of the irrigation water

| Specifications ( $\text{mg l}^{-1}$ ) |        | Specifications ( $\text{mg l}^{-1}$ ) |      |
|---------------------------------------|--------|---------------------------------------|------|
| pH                                    | 7.19   | Zn                                    | 0.94 |
| EC ( $\text{mS cm}^{-1}$ )            | 0.615  | P                                     | 0.20 |
| $\text{NO}_3$ ( $\text{mg l}^{-1}$ )  | 3.22   | K                                     | 0.03 |
| Ca ( $\text{mg l}^{-1}$ )             | 150.12 | B                                     | 0.13 |
| Mg ( $\text{mg l}^{-1}$ )             | 10.7   | Mn                                    | 0.02 |
| Na ( $\text{mg l}^{-1}$ )             | 2.93   | Cu                                    | 0.02 |

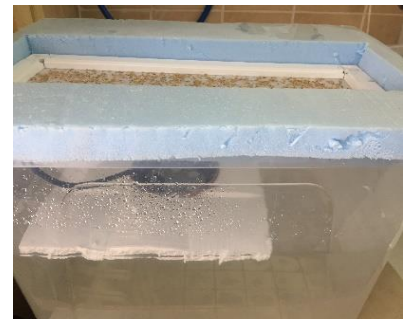
As different irrigation methods, sprinkler irrigation (irrigation in the form of droplets from the top via nozzles), tidal irrigation (filling up to a certain level with water and emptying), and fogponic irrigation (irrigation with water atomized into cold vapor by ultrasonic nozzle) were applied. In the system that can be controlled by the microprocessor, irrigation time and amount were set with the coupled electro valve (Figures 3, 4, and 5).



**Figure 3.** Sprinkler irrigation method



**Figure 4.** Tidal irrigation method



**Figure 5.** Fogponic irrigation method

The trials were conducted as three replications according to the randomized plots experimental design. The results were subjected to the variance analysis and differences were determined by using the F test. The average values of the processes whose differences were determined were grouped according to the “HSD” significance test (JMP, 2007).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Growth Parameters of Different Growing Medium Applications

The highest fresh grass yield values were obtained from Co, Wp, and Tu applications ( $377.5$ ,  $421.6$  and  $395.2 \text{ g m}^{-2}$ , respectively), and they took place in the same statistical group (a). The lowest ( $316.2 \text{ g m}^{-2}$ ) values were obtained from Pe applications ( $P < 0.01$ ). The highest dry matter rate and dry grass

yield values were obtained from Co applications (8.8 and 33.2 g m<sup>-2</sup>, P<0.05 and P<0.01, respectively). The lowest dry matter rate values were obtained from Pe and Wp applications (8.4 and 7.5%, respectively), and they were in the same statistical group (b). The lowest dry grass yield values (26.61 g m<sup>-2</sup>) were obtained from Pe applications (P<0.01). The highest (4.5 cm) root length values were obtained from Tu applications, while the lowest values were obtained from the Pe and Wp applications, and they took place in the same statistical group (c) (1.0 and 1.0 cm, respectively, p<0.01). There was no statistically significant difference between different growing medium applications in terms of plant height, emergence, and covering speed values (Table 2).

**Table 2.** Fresh grass yield, dry matter rate, dry grass yield, plant height, emergence and covering speed, root length values for different growing media

| Applications | Fresh Grass Yield (g m <sup>-2</sup> ) | Dry Matter Rate (%) | Dry Grass Yield (g m <sup>-2</sup> ) | Plant Height (cm) | Emergence Speed (day) | Covering Speed (day) | Root Length (cm) |
|--------------|--|---------------------|--------------------------------------|-------------------|-----------------------|----------------------|------------------|
| Co           | 377.5 a                                | 8.8 a               | 33.20 a                              | 8.6               | 5                     | 7                    | 3.5 b            |
| Pe           | 316.2 b                                | 8.4 b               | 26.61 c                              | 6.8               | 5                     | 7                    | 1.0 c            |
| Wp           | 421.6 a                                | 7.5 b               | 31.62 b                              | 9.0               | 5                     | 7                    | 1.0 c            |
| Tu           | 395.2 a                                | 8.1 ab              | 32.14 ab                             | 10.1              | 5                     | 7                    | 4.5 a            |
| HSD          | 35.07**                                | 0.07*               | 0.06**                               | Ns                | Ns                    | Ns                   | 0.46**           |

HSD; Honesty Significant Difference, \*, P <0.05, \*\*, P <0.01, Ns; Not significant

Whereas the highest (0.56 mm) shoot diameter values were obtained from Wp applications, the lowest (0.45 mm) values were obtained from Pe applications (P<0.01). The highest tiller number values were obtained from Wp and Tu applications (944.3 and 888.8 number cm<sup>-2</sup>, respectively), and they were in the same statistical group (a). On the other hand, the lowest (733.2 number cm<sup>-2</sup>) values were obtained from Pe applications (P<0.01). The highest leaf blade width values were obtained from Co and Wp applications (1.06 and 1.01 mm, respectively) and they were in the same statistical group (a). The lowest values, on the other hand, were obtained from Pe and Tu applications (0.81 and 0.86 mm, respectively, p<0.01) and they were in the same statistical group (b). There was no statistically difference between different growing medium applications in terms of overall appearance, leaf length, and index values (Table 3).

**Table 3.** Overall appearance, shoot diameter, tiller number, leaf blade length, leaf blade width, and index values belonging to different growing mediums

| Applications | Overall Appearance (1-9) | Shoot Diameter (mm) | Tiller Number (number cm <sup>-2</sup> ) | Leaf Blade Length (cm) | Leaf Blade Width (mm) | Index Values |
|--------------|--------------------------|---------------------|--|------------------------|-----------------------|--------------|
| Co           | 9                        | 0.51 b              | 833.2 ab                                 | 6.3                    | 1.06 a                | 59.6         |
| Pe           | 7                        | 0.45 c              | 733.2 b                                  | 5.8                    | 0.81 b                | 71.4         |
| Wp           | 9                        | 0.56 a              | 944.3 a                                  | 7.5                    | 1.01 a                | 73.8         |
| Tu           | 9                        | 0.50 b              | 888.8 a                                  | 8.1                    | 0.86 b                | 94.4         |
| HSD          | Ns                       | 0.03**              | 78.8**                                   | Ns                     | 0.07**                | Ns           |

HSD; Honesty Significant Difference, \*, P <0.05, \*\*, P <0.01, Ns; Not significant

In their study conducted to determine the optimal covering material for ecomat material, Soročan and Rogers (1995), examined germination rate, coating rate, and growth rate by using seven different materials (germinator, penn mulch, paper mulch, rubber clippings, natural clay-loam soil, straw, and very thin turf). They found that the fastest germination occurred 7 days after the sowing in the application

where ryegrass and penn mulch were used as cover material. In his study conducted in the United Arab Emirates, by germinating bermuda grass and paspalum grass seeds in different media (rock wool, jute, and rock wool together with jute), Hussain (2017), investigated the effects of these media on soilless grass production. He noted that the highest plant biomass was obtained from bermudagrass and from the applications in which the combination of rock wool and jute as well as only rock wool is used.

### Growth Parameters of Different Substrate Applications

It was observed that the effects of different substrate applications on fresh grass yield, dry matter rate, dry grass yield, plant height, emergence, covering rate, and root length values were not statistically significant (Table 4).

**Table 4.** Fresh grass yield, dry matter rate, dry grass yield, plant height, emergence, and covering rate values of different substrates

| Applications         | Fresh Grass Yield (g m <sup>-2</sup> ) | Dry Matter Rate (%) | Dry Grass Yield (g m <sup>-2</sup> ) | Plant Height (cm) | Emergence Speed (day) | Covering Speed (day) | Root Length (cm) |
|----------------------|--|---------------------|--------------------------------------|-------------------|-----------------------|----------------------|------------------|
| <b>Substrates</b> Cf | 377.5                                  | 8.8                 | 33.20                                | 8.6               | 5                     | 7                    | 3.5              |
| Pf                   | 384.1                                  | 8.8                 | 33.99                                | 8.6               | 5                     | 7                    | 3.5              |
| Pm                   | 412.3                                  | 8.1                 | 33.72                                | 8.6               | 5                     | 7                    | 3.5              |
| <b>HSD</b>           | Ns                                     | Ns                  | Ns                                   | Ns                | Ns                    | Ns                   | Ns               |

HSD; Honesty Significant Difference, \*, P <0.05, \*\*, P <0.01, Ns; Not significant

Whereas the highest shoot diameter and tiller number values were obtained from Pf applications (0.55 mm and 944.3 number cm<sup>-2</sup>, respectively), the lowest values were obtained from Pm applications (0.45 mm and 666.6 number cm<sup>-2</sup>, respectively, p<0.01). The highest leaf blade width values were obtained from Cf and Pf applications (1.06 and 0.96 mm, respectively), and they took place in the same statistical group (a). The lowest (0.80 mm) values were obtained from Pm applications (P<0.01). The effects of different substrate applications on the overall outlook, leaf blade length, and index values were not statistically significant (Table 5).

**Table 5.** Overall appearance, shoot diameter, tiller number, leaf blade length, leaf blade width, and index values of different substrates

| Applications         | Overall Appearance (1-9) | Shoot Diameter (mm) | Tiller Number (number cm <sup>-2</sup> ) | Leaf Blade Length (cm) | Leaf Blade Width (mm) | Index Values |
|----------------------|--------------------------|---------------------|--|------------------------|-----------------------|--------------|
| <b>Substrates</b> Cf | 9                        | 0.51 b              | 833.2 b                                  | 6.3                    | 1.06 a                | 59.6         |
| Pf                   | 9                        | 0.55 a              | 944.3 a                                  | 6.6                    | 0.96 a                | 68.9         |
| Pm                   | 7                        | 0.45 c              | 666.6 c                                  | 6.8                    | 0.80 b                | 85.4         |
| <b>HSD</b>           | Ns                       | 0.01**              | 72.67**                                  | Ns                     | 0.07**                | Ns           |

HSD; Honesty Significant Difference, \*, P <0.05, \*\*, P <0.01, Ns; Not significant

By placing slow-release nutrients, herbicides, and pesticides in perforated synthetic fiber material, Anton (1993), mixed it with nonwoven organic carpet material and produced soilless roll sod from cool-climate grass mixture. He stated that the biodegradability times of substrate materials used in soilless roll sod production limited their use. In their research focusing on the production of soilless roll sod in which kenaf-based material knitted like mesh was used as a biodegradable substrate, Hensler et al. (1998), stated that with this technique, production could be made faster than field-based roll sod. In the

productions of roll bermudagrass (*Cynodon magenissii*), Japanese grass (*Zoysia japonica*), centipedegrass (*Eremochloa ophiuroides*), which are performed in field conditions, a period of 3-12, 12-18 and 12-15 months is needed; however, with this technique, the same varieties can become available for sale in 6, 15, and 10 weeks, respectively. In their later research, the same researchers made the system more economical by using a cheaper cotton-based substrate instead of a kenaf-based substrate (Hensler et al., 1998). In a joint study developed and patented by Mississippi State University (2006) and commercialized by the Phillip Jennings Turf company, the dream of soilless roll sod production was realized by germinating the rhizomes of bermudagrass on cotton felt in a greenhouse environment with the help of hydroponic solution, and it was patented. Thus, they noted that for sports areas and golf courses, they could produce grass that did not come into contact with any chemical pollution, such as herbicide and pesticide.

### Growth Parameters of Different Irrigation Methods

The highest root length values (4.1 cm) were obtained from Fp applications, while the lowest values were obtained from Sp and Ti applications (3.5 and 3.5 cm, respectively), and they took place in the same statistical group (b) ( $P < 0.01$ ). It was observed that the effects of different irrigation methods on fresh grass yield, dry matter rate, dry grass yield, plant height, emergence, and covering rate were not statistically significant (Table 6).

**Table 6.** Fresh grass yield, dry matter rate, dry grass yield, plant height, emergence and covering speed, root length values of different irrigation methods

| Applications       | Fresh Grass Yield ( $\text{g m}^{-2}$ ) | Dry Matter Rate (%) | Dry Grass Yield ( $\text{g m}^{-2}$ ) | Plant Height (cm) | Emergence Speed (day) | Covering Speed (day) | Root Length (cm) |        |
|--------------------|---|---------------------|---------------------------------------|-------------------|-----------------------|----------------------|------------------|--------|
| Irrigation Methods | Sp                                      | 377.5               | 8.8                                   | 33.20             | 8.6                   | 5                    | 7                | 3.5 b  |
|                    | Ti                                      | 404.4               | 7.7                                   | 31.35             | 8.5                   | 5                    | 7                | 3.5 b  |
|                    | Fp                                      | 412.3               | 8.1                                   | 33.72             | 7.5                   | 5                    | 7                | 4.1 a  |
| HSD                | Ns                                      | Ns                  | Ns                                    | Ns                | Ns                    | Ns                   | Ns               | 0.29** |

HSD; Honesty Significant Difference, \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ , Ns; Not significant

**Table 7.** Overall appearance, shoot diameter, tiller number, leaf blade length, leaf blade width, and index values of different irrigation methods

| Applications       | Overall Appearance (1-9) | Shoot Diameter (mm) | Tiller Number ( $\text{number cm}^{-2}$ ) | Leaf Blade Length (cm) | Leaf Blade Width (mm) | Index Values |      |
|--------------------|--------------------------|---------------------|---|------------------------|-----------------------|--------------|------|
| Irrigation Methods | Sp                       | 9                   | 0.51 a                                    | 833.2 a                | 6.3                   | 1.06 a       | 59.6 |
|                    | Ti                       | 9                   | 0.53 a                                    | 722.1 b                | 7.0                   | 0.99 ab      | 70.8 |
|                    | Fp                       | 6                   | 0.41 b                                    | 555.5 c                | 6.6                   | 0.90 b       | 73.7 |
| HSD                | Ns                       | 0.04**              | 62.9**                                    | Ns                     | 0.09*                 | Ns           |      |

HSD; Honesty Significant Difference, \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ , Ns; Not significant

The highest shoot diameter values were obtained from Sp and Ti applications (0.51 and 0.53 mm, respectively) and they took place in the same statistical group (a). The lowest values (0.41 mm), on the other hand, were obtained from Fp applications ( $P < 0.01$ ). Whereas the highest (833.2 number  $\text{cm}^{-2}$ ) tiller number values were obtained from Sp applications, the lowest (555.5 number  $\text{cm}^{-2}$ ) values were obtained from Fp applications ( $P < 0.01$ ). The highest (1.06 mm) leaf blade width values were obtained from Sp applications, while the lowest (0.90 mm) values were obtained from Fp applications ( $P < 0.05$ ).

The effects of different irrigation methods on overall appearance, leaf blade length and index values were not statistically significant (Table 7).

Karaşahin (2019), conducted to experiment to determine the effects of different irrigation methods (sprinkler, NFT, tidal, and capillary) on hydroponic barley grass, was obtained the highest green fodder yield from the sprinkler irrigation method, while he obtained the lowest green fodder yield from the capillary irrigation method. On the other hand, he obtained the highest dry matter rate and the lowest values of dry matter losses from the capillary irrigation method applications. He obtained the lowest dry matter rate and the highest dry matter losses values from the sprinkler irrigation method applications. He noted that whereas the highest root length values were obtained from NFT (Nutrient Film Technique) and tidal irrigation method applications, the lowest values were obtained from the applications of the capillary irrigation method. When these data and the current study results are compared, it is assumed that the similarities and differences stem from seed genera and species, as well as seed densities and growing periods.

## CONCLUSION

According to research results, the highest fresh grass yields were obtained from Co, Wp and Tu applications. The highest dry matter rate and dry grass yield values were obtained from Co growing medium applications. While the highest root length values were obtained from the applications of the Tu growing medium and Fp irrigation method, the highest shoot diameter values were obtained from the applications of the Wp growing medium, Pf substrate, Sp, and Ti irrigation method. The highest tiller number values were obtained from the applications of Wp and Tu growing media, Pf substrate, and Sp irrigation method. On the other hand, the highest leaf blade width values were obtained from the applications of Co and Wp growing media, Cf and Pf substrates, and Sp irrigation method.

It was observed that there was no statistical difference between the applications in terms of overall appearance values. When root length and tiller number values, which are among the important growth parameters in the soilless roll sod production, application conveniences, biodegradability, and production costs are considered together, "Tu" growing medium, "Cf" substrate and "Sp" irrigation method applications came to the fore. To be able to obtain more realistic recommendations on this issue, land applications should be included in future research.

## ACKNOWLEDGMENT

The author is thankful for the support extended by Selçuk University Scientific Research Projects (BAP). This research consists of a part of the project numbered 17401185.

## Conflict of Interest

I declare that there is no conflict of interest during the planning, execution and writing of the article.

## Author's Contributions

I hereby declare that the planning, execution and writing of the article was done by me as the sole author of the article.

## REFERENCES

- Albaho M, Bhat N, Abo-Rezq H, Thomas B, 2009. Effect of Three Different Substrates on Growth and Yield of Two Cultivars. *Europe Journal of Science Resource*, 28(2): 227-233.
- Anton A, 1993. Fibrous Mat For Growing Plants. U.S. Patent 5224292 Date issued: 6 July.

- Beard JB, Green RL, 1994. The Role of Turf Grasses in Environmental Protection and Their Benefits to Humans. *J. Env. Quality*, 23: 452-460.
- Brien O, Barker AV, 1995. Evaluation of Fresh and Year Old Solid Waste Composts for Production of Wild Flower and Grass Sod on Plastic Compost. *Science and Utilization*. 3(4): 69-77.
- Bruce FS, 2000. Soilless Sod Use Tied to Economy, USGA Specs. *Turfgrass Trends* January, 9-12.
- Carrow RN, 1995. Drought Resistance Aspects of Turfgrasses in The Creeping Bentgrass Cultivar Water Use and Rooting Responses. *Crop southeast: Evapotranspiration and Crop Coefficients*. 31: 1331-1334.
- Decker HF, Decker JM, 1988. *Lawn Care: A Handbook for Professionals*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J. 304 pp.
- Decker HF, 2001. Producing Sods Over Plastic in Soilless Media. *Horticultural Review*, Vol. 27.
- Dede ÖH, Özdemir, S. 2015. Comparison of Composted Biosolid Substrate for Containerized Turfgrass Production, *Environmental Technology*, 36 (13):1651-1656.
- Farid FHM, Ahmad SS, Raub ABA, Shaari FM, 2016. Green “Breathing Facades” for Occupants’ Improved Quality of Life. *Procedia-Social and Behavioral Sciences* 234: 173-184.
- Gutierrez GAM, Altamirano GZ, Urrestarazu M, 2012. Maguey Bagasse Waste as Sustainable Substrate in Soilless Culture by Melon and Tomato Crop. *Journal of Plant Nutrition*, 35: 2135-2144.
- Hensler KL, Baldwin BS, Goatley JM, 1998. Kenaf-based Fiber Mat as a Substrate for Establishing Soilless Sod. *HortTechnology*, 8 (2): 171-175.
- Hussain RSR, 2017. Turf Grass Sod Production Utilizing Hydroponic Systems. Master Thesis. The College of Graduate Studies and the College of Food & Agriculture, UAEU.
- Johnson JH, Hochmuth GJ, Maynard DN, 2010. Soilless Culture of Greenhouse Vegetables. *Institute of Food and Agricultural Sciences*, 218: 19-22.
- Karaşahin M, 2019. The Effects of Different Irrigation Method Treatments on Hydroponic Barley (*Hordeum vulgare* L. conv. distichon) Grass. 3. International Conference on Agriculture, Food, Veterinary and Pharmacy Sciences, 16-18 April 2019, Trabzon, Turkey.
- Karaşahin M, 2020. Topraksız Rulo Çim Üretimi ve Avantajları. *HarmanTIME*, 89: 94-96.
- Mason J, 2003. *Sustainable Agriculture*. Landlinks Press, Australia. 205 pp.
- MSU, 2006. MSU-Developed Sod Has Worldwide Appeal. <http://extension.msstate.edu/news/feature-story/2006/msu-developed-sod-has-worldwide-appeal> (Reached October 5, 2018)
- Munoz H, 2010. *Hydroponics Home-Based Vegetable Production System Manual*. Institute for Cooperation on Agriculture (IICA). Guyana. <http://www.iica.int>.
- Pessarakli M, 2008. *Hand Book of Turf Grass Management and Physiology*. CRC Press, Tucson, Arizona, U.S.A. 690 pp.
- Roberts BR, Decker HF, Ganahl LM, Yarmark E, 2001. Biosolid Residues as Soilless Media for Growing Creeping Bent Grass Sod. *Hort. Technology*. 11: (3) 451- 455.
- Savvas D, Gianquinto G, Tuzel Y, Gruda N, 2013. *Soilless Culture*. FAO Plant Production and Protection Paper No. 217: Good Agricultural Practices for Greenhouse Vegetable Crops.
- Sorochan JC, Rogers JN, 1995. Soilless Sod Production Using Ecomat. *LT*, 3-9.
- Yeager TH, Fare D, Lea-Cox J, Ruter J, Bilderback TE, Gilliam CH, Niemiera AX, Warren L, Whitwell TE, Wright RD, Tilt KM, 2007. *Best Management Practices: Guide for Producing Container Grown Plants*. 2nd ed. Southern Nurserymen’s Association, Maretta, GA. pp. 4-10.

**To Cite:** Tan M, Çoruh I, 2021. Hay Production of Smooth Bromegrass (*Bromus inermis* Leyss.) as Influenced by Various Management Practices in Highlands. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1625-1634.

## Hay Production of Smooth Bromegrass (*Bromus inermis* Leyss.) as Influenced by Various Management Practices in Highlands

Mustafa TAN<sup>1\*</sup>, Irfan CORUH<sup>2</sup>

**ABSTRACT:** The effects of sowing time and companion crop on hay yield, weed rate and some hay quality parameters of smooth bromegrass were determined in 2014 and 2015. Smooth bromegrass was sown in spring and summer period with or without wheat as a companion crop. The study was established according to the experimental design of randomized complete blocks in irrigated conditions with three replications. Sowings mixed with companion crop in spring produced higher dry matter yield in the first year and in the second year. Mixed sowing with companion crop decreased the rate of weeds in the first year from 76.7% to 7.8%. Sowing time was not effective on hay quality, but the use of companion crop decreased the crude protein content and increased ADF and NDF ratios in the establishment year.

**Keywords:** Hay yield, hay quality, companion crop, sowing time

<sup>1</sup> Mustafa TAN ([Orcid ID: 0000-0001-7939-7087](https://orcid.org/0000-0001-7939-7087)), Trakya University Havsa Vocational College Department of Park and Garden Plants, Edirne, Türkiye

<sup>2</sup> Irfan CORUH ([Orcid ID: 0000-0002-6569-6163](https://orcid.org/0000-0002-6569-6163)), Atatürk University Faculty of Agriculture Department of Plant Protection, Erzurum, Türkiye

\*Corresponding Author: Mustafa TAN, e-mail: mustafatan@trakya.edu.tr



## INTRODUCTION

Smooth bromegrass (*Bromus inermis* Leyss.) is a long-lived perennial grass that grows from a deeply-extensive creeping rhizome. It is adapted to the poor soils, drought and cold climate conditions associated with the Eastern Anatolia region of Turkey. It has great importance for animal feeding in areas where it is adapted because of high yield potential and palatability (Dumlu et al., 2013; Unal and Mutlu, 2015). Moreover, it is an excellent erosion prevention plant on marginal and sloping land because of the interlocking root system. Researches show that dry matter yield in smooth bromegrass varies between 7588 and 11920 kg ha<sup>-1</sup> (Cinar et al., 2016; Saritas et al., 2017).

In highland areas, perennial grass species, such as smooth bromegrass are planted in the spring or autumn and forage is not harvested until the following year because of short growing period. Therefore, there are two important problems in the first year in smooth bromegrass cultivation. The first one is the low yield from the field in the first year, and the other is the invasion of the weeds (Miller, 1984). Generally, the use of companion crop is common to solve these problems in perennial forage crops (Lanini et al., 1991). The use of companion crops in perennial forage sowing has been a long established agricultural practice in the world. The companion crop germinates and grows faster than perennial forage plants and provides additional competition against rapidly growing weeds. It offers greater yield, reduces weed competition and erosion risk and improves land-use efficiency (Lanini et al., 1991; Wiersma et al., 1999). Examples of these applications are common in perennial legume forage crops such as alfalfa (*Medicago sativa* L.) and red clover (*Trifolium pretense* L.). Tan and Serin (2004), Cupina et al. (2010) and Acar et al. (2011) found that a companion crop such as wheat, triticale and pea increased the yield in the first year and reduced weed invasion. Companion crops can reduce weed populations and, in some cases, eliminate the need for herbicides during the establishment period (Canevari et al., 2007). Although mixed sowing with companion crop is very common practice in forage legumes, the effect on the grasses has not been investigated in detail. In the few old studies conducted, Buglass (1964), Elliott (1972) and Chastain and Grabe (1989) found that the use of a companion crop in establishment of grasses resulted in a decrease in seed yield. The fertile tillers that produce seeds in the grasses are formed in the autumn of the previous year (Langer, 1973). The use of companion crop reduces seed yields because it reduces reproductive tillers (Bean, 1978). However, there is a lack of knowledge about the effects of companion crops on hay yield and weed growth in perennial grasses.

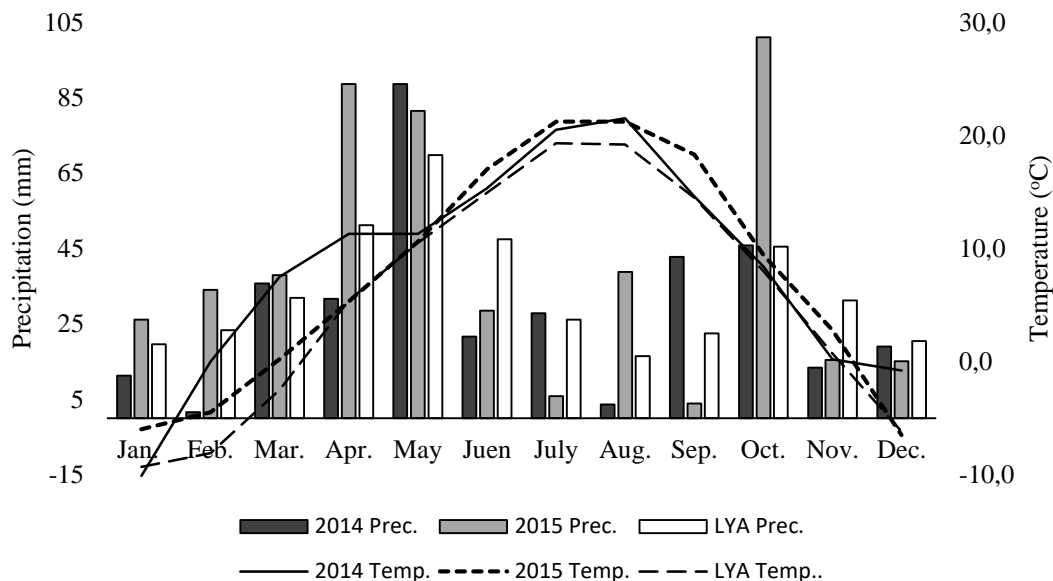
Usually another way to control weeds is to arrange the sowing time. Sowing time in plants has a great impact on yield and affects the results of the agricultural applications (Ezeaku et al., 2017). Autumn-sown crops have less weed problems than spring-sown crops (Cupina et al., 2010). If the sowing of perennial forage crops is applied at the end of summer (August), yields will be higher next year compared to this of autumn sowing (Tan et al., 2009). Already in the summer in high altitude regions, the stress of the temperature is not very severe. However, sowing in autumn in high altitudes may not produce sufficient yield in the next year (Dumlu et al., 2013). In addition, the effects of sowing time on weeds rate in smooth bromegrass were not investigated. The aims of this study were to determine yield, quality and weed rate of forage that could be obtained in the establishment and subsequent year from smooth bromegrass seeded with or without a cereal companion crop, and determine whether sowing time.

## MATERIALS AND METHODS

The research was conducted at the University of Ataturk Agricultural Research Station in 2014 and 2015 in Erzurum (39°55'N and 41°61'E), Turkey. Erzurum, where the experiment is conducted, has an altitude of 1860 m and a continental climate. The total annual rainfall in Erzurum province in 2014

and 2015 was 342.8 mm and 433.5 mm, respectively. The average annual temperature was recorded 6.7 °C and 7.4 °C. The average temperature of the years was occurred higher than the average long-term (1950-2013) temperature; the total rainfall in 2014 was less than the long-term rainfall while it was higher in 2015 than the long-term rainfall (Figure 1).

The texture of the experiment area soil is clay loam, and total salt was 0.05%, pH was 7.41, lime was 1.5%, organic matter was 0.85%, plant-available P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> was 62 kg ha<sup>-1</sup> and K<sub>2</sub>O was 1180 kg ha<sup>-1</sup>. According to these data, the experiment soil is light calcareous, salt-free, slightly alkaline, very poor in organic matter, poor in plant-available phosphorus and rich in potassium (Kacar, 2012).



**Figure 1.** Monthly temperature (lines) and precipitation (bars) of study months in Erzurum 2014, 2015 and long term average (LYA)

The field study was established on the randomized complete block design with three replications. In this study, a population of smooth bromegrass (*Bromus inermis* Leyss.) was sown in two different periods, which were spring (May 2014) and summer (August 2014). Sowing was performed both as a single and mixed crop with wheat (*Triticum aestivum* L.). Alternative Kirik wheat landrace was used as a companion crop. Smooth bromegrass was sown at 15 kg ha<sup>-1</sup> in 30 cm row spacing. The plots consist of 5 rows, they size were 3.0 m long by 1.5 m wide. Fertilizer was applied during seeding at the rate of 150 kg N ha<sup>-1</sup> and 50 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup>. In the second year (2015), only 150 kg N ha<sup>-1</sup> was applied in the parcels (Tan, 2018). Wheat was sowing by broadcasting into plots at the rate of 100 kg ha<sup>-1</sup> before sowing smooth bromegrass (Tan and Serin, 2004). Plots were irrigated once every 8-10 days in the summer period in both years. The plots, which had been mixed-planted, were harvested at the milk stage of wheat maturity in the establishment year (2014), and the plots, which had been planted as a single crop, were harvested in the first week of October. In the 2015, all harvests were made at the beginning of the flowering of smooth bromegrass (Tan, 2018). Dry matter yield was determined by harvesting 2 m x 0.9 m strip from the middle of the parcels. Fresh forages were weighed and dried by being left in the open air first and then in the drying oven at 65 °C for 48 hours, and then their dry matter yield was determined. The weed rates of hay (%) was determined on a dry weight basis by separately weighing weed and smooth bromegrass in the area of 1 m<sup>2</sup> randomly chosen from each plots. The density of weed was determined by separately counting the weed species in the frames of 1 m<sup>2</sup> which were randomly

thrown in the plots. Each sample has been grinded, and its nitrogen analysis has been made by Kjeldahl method (AOAC, 1997), acid detergent fiber (ADF) and neutral detergent fiber (NDF) analyses has been made by Ankom Fiber Analyzer (Van Soest et al., 1991). The ratios of crude protein, ADF and NDF in mixtures has been calculated in a scaled way by taking smooth bromegrass, weeds and companion crop concentration into consideration.

The data obtained from this experiment were subjected to analysis of variance, and where statistical significance difference were observed, the means were compared using the LSD multiple range test according to MSTAT-C software program (Yildiz and Bircan, 2003).

## RESULTS AND DISCUSSION

In this study, the use of companion crop and different sowing times have significantly affected the dry matter yield of smooth bromegrass (Table 1). In the establishment year (2014), the dry matter yields in the parcels sown mixed with companion crop were higher than the yields of pure sown parcels. This higher yield resulted from the companion crop that is aggressive and fast growing plant. Fast-establishing plant species that do not overwinter in winters cold regions have potential as companion crops to increase sowing year yields without reducing perennial forage establishment (Coulman et al., 2019). Although statistically insignificant, the high yield in the plots mixed with the companion crop continued in the second year. It was determined in the other studies that the mixing of the perennial forage plant with a companion crop increased the biomass production in the establishment year (Lanini et al., 1991; Acar et al., 2011; Coruh and Tan, 2016). Contrary to the findings of Lanini et al. (1991) and Waddington and Bittman (1983), but in agreement with those of Sheaffer et al. (1988) and Tan and Erkovan (2004), no decrease in hay yield was observed in the second year in the plots mixed with the companion crop. Sowings in the spring produced higher dry matter yield than summer sowings with and without companion crop. Especially in the spring, the sowings mixed with the companion crop gave higher yield (6697 kg ha<sup>-1</sup>; Table 1). Long growing season would provide an advantage for spring-seeded forages, particularly for a slow-establishing species like smooth bromegrass. Different effects of companion crop depending on sowing times caused interaction (s. time x c. crop) to be significant. In the spring and mixed with companion crop sowings, smooth bromegrass regrew vigorously because of the longer growing season before winter. Otherwise, the smooth bromegrass seedlings entering the winter without adequate development cannot produce their actual yields in the next year (in the first yield year). As a result, forage yields of the following year are relatively low. Establishment with wheat companion crop in the planting year (2014) depressed dry matter production in the year after planting (2015) in spring-seeded stands, but increased productivity in summer-seeded stands, resulting in a significant year x companion crop interaction (P<0.01).

In the pure sowings, 15% and 32% of the hay obtained from spring and summer sowings respectively were smooth bromegrass, the other rates were weeds (Figure 2). In mixed sowings with companion crop, weed ratios significantly decreased. In mixed sowings, the rates of smooth bromegrass, weed and companion crop in spring-sown are 17%, 7% and 76%, respectively. These rates were determined as 18.9%, 8.1% and 73% in summer-sown, respectively. These results showed that the companion crop decreased the rate of weed both in the first year and in the second year, and made a significant contribution to the first year hay yield.

**Table 1.** Effect of companion crop and sowing time on dry matter yields in the establishment and second year

| Sowing Time | Companion Crop | Dry Matter Yield (kg ha <sup>-1</sup> ) |        |        |
|-------------|----------------|---|--------|--------|
|             |                | 2014                                    | 2015   | Mean   |
| Spring      | Solo-sowing    | 2377                                    | 5933   | 4155   |
|             | Mixed-sowing   | 7087                                    | 6307   | 6697   |
| Mean        |                | 4731                                    | 6120   | 5426 A |
| Summer      | Solo-sowing    | 1523                                    | 5387   | 3455   |
|             | Mixed-sowing   | 3870                                    | 5653   | 4762   |
| Mean        |                | 2697                                    | 5520   | 4108 B |
| Mean        | Solo-sowing    | 1950                                    | 5660   | 3805 B |
|             | Mixed-sowing   | 5478                                    | 5980   | 5729 A |
| Mean        |                | 3714 B                                  | 5820 A | 4767   |

*F* test (LSD Values)

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
| Year                     | ** (764)  |
| S. Time                  | ** (764)  |
| Year x S. Time           | * (779)   |
| C. Crop                  | ** (764)  |
| Year x C. Crop           | ** (1081) |
| S. Time x C. Crop        | * (779)   |
| Year x S. Time x C. Crop | * (1102)  |

Means in the same columns and lines followed by the same letters are not significantly different

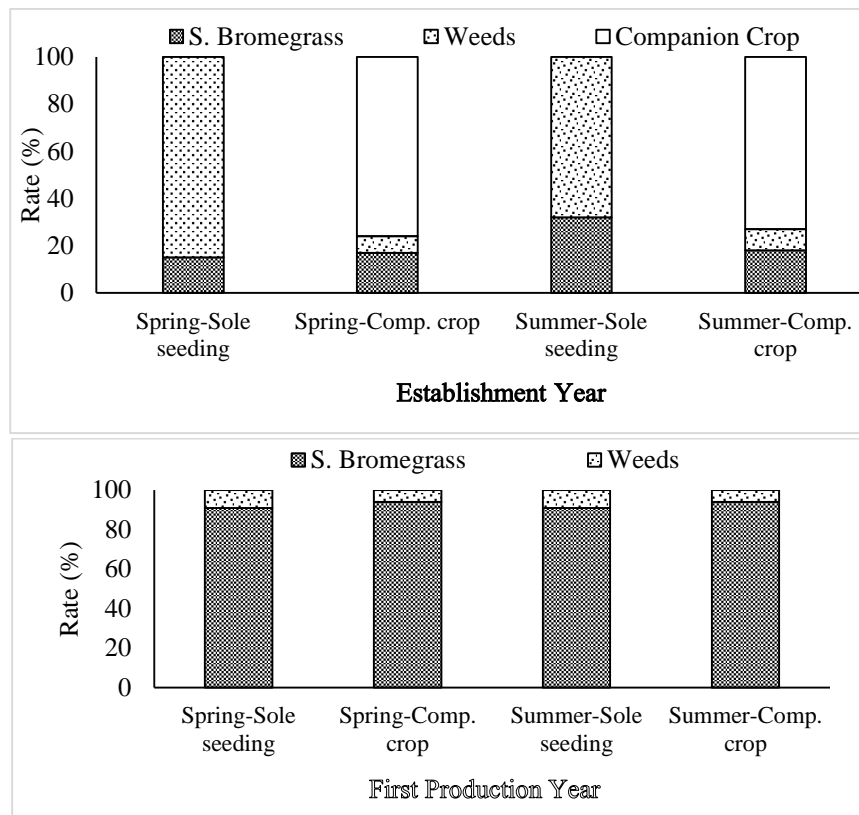
\*: P<0.05, \*\*: P<0.01

In the establishment year, weeds rate was found as 68.3-85.0% in pure sowings and it was lower in summer plantings (Table 2). The rate of weeds in mixed sowing was 6.7-9.0%. In the second year, the rate of weeds in mixed sowing was lower than the pure sowing in the first year. It is quite clear that the use of companion crop prevents weeds. The effect of the companion crop was observed especially in the establishment year and continued in the second year (year x c. crop). For perennial forage establishments, higher weed infestation is observed in the first year, for there is not a strong plant cover on the field. Other studies have shown that the companion crop reduces the development of weeds (Sheaffer et al., 1988; Lanini et al., 1991). In this study, weed rates of summer sowings were lower than spring sowings. Already Cupina et al. (2010) reported that weeds are more problems in spring planting. Weed problems are usually less with late-summer seeding than with seedings done in spring (Hall and Collins, 2017). Vough et al. (1995) also explained that autumn-seeded forages experience less weed competition than spring-seeded stands.

In the experiment area, 16 and 12 weeds species were identified in the sowing year and second year, respectively (Figure 3). *Centaurea solstitialis*, *Capsella bursa-pastoris*, *Polygonum belardii* and *Papaver dubium*, which were seen in the first year, disappeared in the second year. The most common weeds in the first year were *Amaranthus retroflexus* (9.3 units m<sup>-2</sup>) and *Convolvulus arvensis* (8.5 units m<sup>-2</sup>). *A. retroflexus* decreased to 1.5 units m<sup>-2</sup> with a significant decrease and *C. arvensis* was found to be 8.2 units m<sup>-2</sup> with a slight decrease in the second year.

In the present study, the crude protein content of hay did not change according to the sowing time, but significant changes were observed depending on years and companion crop use (Table 3). In the first year and pure sown plots, the crude protein content of the hay was higher. In the first year, the dry matter content of pure sown smooth brome grass is low and the crude protein content is high (Klebasedel, 1993). Depending on the properties of the companion crop, the crude protein content of the mixture varies (Tan and Serin, 2004). In the second year, crude protein ratios decreased with increasing dry matter yield of smooth brome grass. In the research, companion crop x sowing time interaction was found to be significant on crude protein content (P<0.05). The highest crude protein content (14.01%) was determined in summer time and pure sowings in the first year. In the second year, the ratios of crude

protein were similar among all treatments. Similarly, Cupina et al., (2010) determined the low variation in protein content of red clover after clipping companion crop.



**Figure 2.** Smooth bromegrass, companion crop and weed proportions of hay in establishment and second year

**Table 2.** Effect of companion crop and sowing time on weed rate of hay in the establishment and second year

| Sowing Time | Companion Crop | Weed Rate (%) |       |        |
|-------------|----------------|---------------|-------|--------|
|             |                | 2014          | 2015  | Mean   |
| Spring      | Solo-sowing    | 85.0          | 8.7   | 46.8   |
|             | Mixed-sowing   | 6.7           | 5.7   | 6.2    |
| Mean        |                | 45.8          | 7.2   | 26.5 A |
| Summer      | Solo-sowing    | 68.3          | 9.3   | 38.8   |
|             | Mixed-sowing   | 9.0           | 5.7   | 7.3    |
| Mean        |                | 38.7          | 7.5   | 23.1 B |
| Mean        | Solo-sowing    | 76.7          | 9.0   | 42.8 A |
|             | Mixed-sowing   | 7.8           | 5.7   | 6.8 B  |
| Mean        |                | 42.3 A        | 7.3 B | 24.8   |

*F test (LSD Values)*

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| Year                     | ** (4.7) |
| S. Time                  | * (3.4)  |
| Year x S. Time           | * (4.8)  |
| C. Crop                  | ** (4.7) |
| Year x C. Crop           | ** (6.6) |
| S. Time x C. Crop        | * (4.8)  |
| Year x S. Time x C. Crop | ** (6.8) |

Means in the same columns and lines followed by the same letters are not significantly different

\*: P<0.05, \*\*: P<0.01

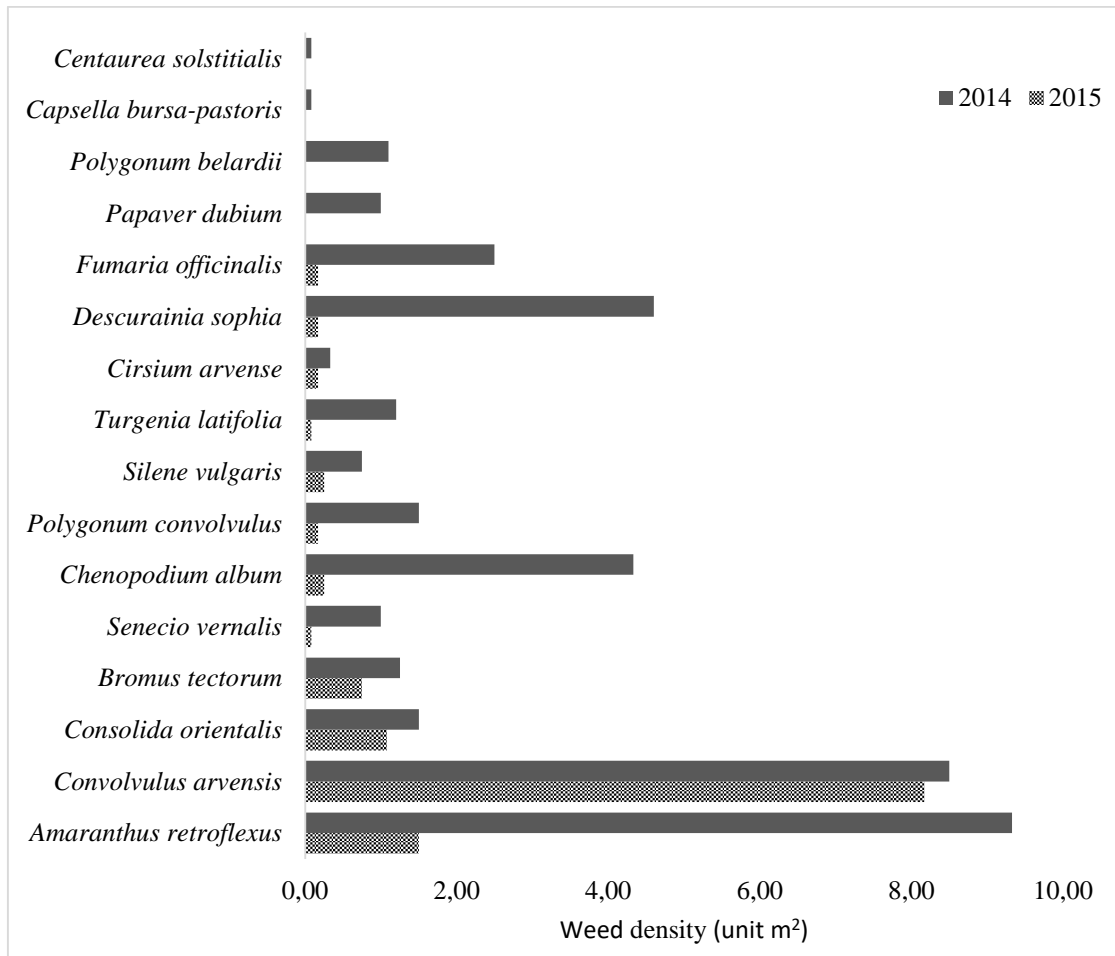


Figure 3. Weed density in the establishment and subsequent year

Table 3. Effect of companion crop and sowing time on crude protein ratio of hay in the establishment and second year

| Sowing Time                | Companion Crop | Crude Protein Ratio (%) |         |         |
|----------------------------|----------------|-------------------------|---------|---------|
|                            |                | 2014                    | 2015    | Mean    |
| Spring                     | Solo-sowing    | 13.24                   | 12.36   | 12.80   |
|                            | Mixed-sowing   | 13.20                   | 12.20   | 12.70   |
| Mean                       |                | 13.22                   | 12.28   | 12.75   |
| Summer                     | Solo-sowing    | 14.01                   | 12.38   | 13.19   |
|                            | Mixed-sowing   | 12.22                   | 12.75   | 12.49   |
| Mean                       |                | 13.12                   | 12.56   | 12.84   |
| Mean                       | Solo-sowing    | 13.62                   | 12.37   | 13.00 A |
|                            | Mixed-sowing   | 12.71                   | 12.48   | 12.59 B |
| Mean                       |                | 13.17 A                 | 12.42 B | 12.80   |
| <i>F test (LSD Values)</i> |                |                         |         |         |
| Year                       |                | ** (0.34)               |         |         |
| S. Time                    |                | ns                      |         |         |
| Year x S. Time             |                | ns                      |         |         |
| C. Crop                    |                | ** (0.35)               |         |         |
| Year x C. Crop             |                | ** (0.49)               |         |         |
| S. Time x C. Crop          |                | * (0.35)                |         |         |
| Year x P. Time x C. Crop   |                | ** (0.69)               |         |         |

Means in the same columns and lines followed by the same letters are not significantly different

\*: P<0.05, \*\*: P<0.01, ns: non-significant

The rates of ADF and NDF showed significant changes due to years and companion crop use (Table 4). The second year the ADF and NDF rates of the hay were higher. Because in the second year,

smooth bromegrass grew more strongly, and the ratio of the stem inside the hay increased and structural materials in the tissues increased. Hunt et al. (2016) demonstrated that nutritive values of forages, established in this case without herbicides are improved in the second year after seeding compared with the first year after seeding. Glover et al. (2004) have also identified that the ADF and NDF ratios of smooth bromegrass changed according to years. The rates of ADF and NDF in the plots mixed with the companion crop are higher than the pure sown plots. This is especially due to the first year because there is wheat as a companion crop in mixtures. In general, the high structural materials of wheat hay produced this result (Beck et al., 2009). Already in this study, the companion rate of hay was high in the mixed plots in the establishment year (Figure 2).

**Table 4.** Effect of companion crop and sowing time on acid detergent fiber (ADF) and neutral detergent fiber (NDF) ratio of hay in the establishment and second year

| Sowing Time                | Companion Crop | ADF (%)   |         |       | NDF (%) |           |       |
|----------------------------|----------------|-----------|---------|-------|---------|-----------|-------|
|                            |                | 2014      | 2015    | Mean  | 2014    | 2015      | Mean  |
| Spring                     | Solo-sowing    | 35.15     | 37.54   | 36.34 | 40.16   | 47.17     | 43.67 |
|                            | Mixed-sowing   | 38.48     | 37.79   | 38.14 | 47.22   | 45.80     | 46.76 |
|                            | Mean           | 36.82     | 37.67   | 37.24 | 43.94   | 46.49     | 45.21 |
| Summer                     | Solo-sowing    | 32.72     | 37.78   | 35.25 | 35.26   | 47.27     | 41.26 |
|                            | Mixed-sowing   | 37.90     | 38.72   | 38.31 | 48.12   | 47.77     | 47.95 |
|                            | Mean           | 35.31     | 38.25   | 36.77 | 41.69   | 47.52     | 44.61 |
| Mean                       | Solo-sowing    | 33.94     | 37.66   | 35.80 | 37.71   | 47.22     | 42.47 |
|                            | Mixed-sowing   | 38.19     | 38.26   | 38.22 | 47.92   | 46.79     | 47.35 |
|                            | Mean           | 36.06 B   | 37.96 A | 37.01 | 42.82 B | 47.00 A   | 44.91 |
| <i>F test (LSD Values)</i> |                |           |         |       |         |           |       |
| Year                       |                | ** (1.04) |         |       |         | ** (1.11) |       |
| S. Time                    |                | ns        |         |       |         | ns        |       |
| Year x S. Time             |                | ** (1.47) |         |       |         | ** (1.57) |       |
| C. Crop                    |                | ** (1.04) |         |       |         | ** (1.11) |       |
| Year x C. Crop             |                | ** (1.47) |         |       |         | ** (1.57) |       |
| S. Time x C. Crop          |                | ns        |         |       |         | ** (1.57) |       |
| Year x S. Time x C. Crop   |                | ns        |         |       |         | * (1.61)  |       |

Means in the same columns and lines followed by the same letters are not significantly different

\*: P<0.05, \*\*: P<0.01, ns: non-significant

## CONCLUSION

In the high altitude areas, such as Eastern Anatolia, the smooth bromegrass cannot grow sufficiently in the establishment year. Therefore, low forage yield is obtained and weeds are invading the field. Some weeds may have a high feed value for animal, but generally weeds in farmland are not desirable (Khan et al., 2013). Mixing with a companion crop such as wheat increases both forage yield and the prevention of weed infestation. This application, which is made by reducing the sowing rate in irrigated conditions, has no negative effect on the yield of the following year; on the contrary, in the second year, the yield was higher and the weed ratio was lower. Forage quality was directly related to the smooth bromegrass, weed and companion crop contents of the harvested forage. The use of companion crop reduced the crude protein content of the hay taken in the establishment year and increased the ADF and NDF ratios. However, these negative effects on hay quality in the second year were lower. Dry matter yields were higher in spring-sown, but weed ratio was also high in this sowing time. There was no significant effect of sowing time on herbage quality. According to the results of this study, the mixed sowing of smooth bromegrass with wheat companion crop in the spring sowing time can be recommended.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Research Foundation of Atatürk University under Grant Number BAP-2013/382.

## Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

## Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

## REFERENCES

- Acar Z, Onal Asci O, Başaran U, Ayan I, Mut H, 2011. Can Triticale be used as a Companion Crop with Red Clover? *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35: 235-245.
- AOAC, 1997. Association of Official Analytical Chemists International Official Methods of Analysis. 16th Edition, AOAC, Arlington.
- Bean EW, 1978. Principles of Herbage Seed Production. Welsh Plant Breeding Station, Technical Bul. No: 1, Second Edition, 149 p.
- Beck PA, Stewart CB, Gray HC, Smith JL, Gunter SA, 2009. Effect of Wheat Forage Maturity and Preservation Method on Forage Chemical Composition and Performance of Growing Calves Fed Mixed Diets. *Journal of Animal Science*, 87: 4133-4142.
- Buglass E, 1964. Seed Production of Crested Wheatgrass as Influenced by Various Management Practices. *Canadian Journal of Plant Science*, 44: 66-74.
- Canevari M, Vargas RN, Orloff SB, 2007. Weed Management in Alfalfa. University of California Division of Agriculture and Natural Resources, Pub. No: 8294, 12/2007, 18 p.
- Chastain TG, Grabe DF, 1989. Spring Establishment of Turf-Type Tall Fescue Seed Crops with Cereal Companion Crops. *Agronomy Journal*, 81: 488-493.
- Cinar S, Karadag Y, Tasyurek T, Gokalp S, Ozkurt M, 2016. The Determination of Yield and Quality of Some Perennial Forage Cultivars under Sivas Ecological Conditions. *Journal of Central Research Institute Field Crops*, 25: 213-218.
- Cupina B, Krstic D, Mikic A, Eric P, Vuckovic S, Pejic B, 2010. The effect of Field Pea (*Pisum sativum* L.) Companion Crop Management on Red Clover (*Trifolium pratense* L.) Establishment and Productivity. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 34: 275-283.
- Coruh I, Tan M, 2016. The Effects on Seeding Time and Companion Crop on Yield of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) and Weed Growth. *Turkish Journal of Field Crops*, 21: 184-189.
- Coulman B, Kleinhout A, Bligetu B, 2019. Annual Ryegrass and Festulolium as Companion Crops in the Establishment of Perennial Forage Crops. *Canadian Journal of Plant Science*, 99: 611-623.
- Dumlu Gul Z, Yolcu H, Tan M, Serin Y, Gul I, 2013. Yield, Quality, and other Characteristics of Selected Lines of Crested Wheatgrass. *Journal of Plant Registry*, 7: 1-5.
- Elliott CR, 1972. Grass Seed Production: Effect of Seeding Date and Companion Crops. Agri-Science Field Crops Agdex 120.20. Northern Research Group, Ag. Canada, Beaverlodge, AB.
- Ezeaku IE, Mbah BN, Baiyeri KP, 2017. Response of Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) Genotypes to Sowing Dates and Insecticide Spray in South Eastern Nigeria. *The Journal of Animal and Plant Science*, 27(1): 239-245.
- Glover DE, Kielly GA, Jefferson PG, Cohen RDH, 2004. Agronomic Characteristics and Nutritive Value of 11 Grasses Grown with Irrigation on a Saline Soil in Southwestern Saskatchewan. 2004. *Canadian Journal of Plant Science*, 84: 1037-1050.
- Hall MH, Collins M, 2017. Forage Establishment. In: M Collins, CJ Nelson, KJ Moore, RF Barnes (Eds.) *An Introduction to Grassland Agriculture*, Seventh Edition, John Wiley and Sons, Inc, p. 221-233.



- Hunt SR, McAdam JW, Griggs, TC, 2016. Seeding Rate, Oat Companion Crop, and Planting Season Effects on Irrigated Organic Birdsfoot Trefoil Stands in the Mountain West United States. *Crop Science*, 56: 463-473.
- Kacar B, 2012. Soil Analysis. Nobel Publications, No: 484, Ankara. (in Turkish)
- Khan R, Khan MA, Sultan S, Marwat KB, Khan I, Hassan G, Shah HU, 2013. Nutritional Quality of Sixteen Terrestrial Weeds for the Formulation of Cost-Effective Animal Feed. *Journal of Animal and Plant Science*, 23(1 Suppl.): 75-79.
- Klebesadel LJ, 1993. Bromegrass in Alaska. III. Effects of Planting Dates, and Time of Seeding-Year Harvest, on Seeding-Year Forage Yields and Quality, Winter Survival, and Second-Year Spring Forage Yield. *Agricultural and Forestry Experiment Station School of Agriculture and Land Resources Management Bul.* 96 December 1993.
- Langer RHM, 1973. Pastures and Pastures Plants. New Zealand Consolidated Press Ltd., Auckland, 429 p.
- Lanini WT, Orlof SB, Vargas RN, Orr JP, Marble VL, Grattan, SR, 1991. Oat Companion Crop Seeding Rate Effect on Alfalfa Establishment, Yield And Weed Control. *Agronomy Journal*, 83: 330-333.
- Miller DA, 1984. Forage Crops. Mc Graw-Hill Book Company, USA, 530.
- Saritas Y, Akça Pelen M, Sahin M, Unal S, Efe B, Tezel, M, 2017. Determination of Some Types of Yield and Quality Values Smooth Bromegrass (*Bromus inermis* Leyss.) Grown in Different Ecological Conditions Turkey. 12. Field Crops Congress, September 12-15, Kahramanmaraş, Turkey (in Turkish).
- Sheaffer CC, Barnes DK, Marten GC, 1988. Companion Crop vs. Solo Seeding: Effect on Alfalfa Seeding Year Forage and N Yields. *Journal of Production Agriculture*, 1: 270-274.
- Tan M, 2018. Legume and Grass Forage Crops. Atatürk University Faculty of Agriculture Text Book No: 256, Erzurum, Turkey, 356 p.
- Tan M, Serin Y, 2004. Is the Companion Crop Harmless to Alfalfa Establishment in the Highlands of East Anatolia? *Journal of Agronomy and Crop Science*, 190: 1-5.
- Tan M, Erkovan HI, 2004. Using a Companion Crop of Barley to Improve White Clover Production in the Highlands of Turkey. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 47: 219-224.
- Tan M, Erkovan, HI Temel S, 2009. The Effects of Seeding Times and Rates on Forage Yield of Alfalfa. National VIII. Field Crops Congress, October 22, 2009, Hatay, Turkey.
- Unal S, Mutlu Z, 2015. A Study in Smooth Bromegrass (*Bromus inermis* Leyss.) in the Semi-Arid of Turkey. *Journal of Central Research Institute Field Crops*, 24: 47-55.
- Van Soest PL, Robertson JB, Lewis BA, 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74: 3583-3597.
- Vough LR, Decker AM, Taylor TH, 1995. Forage Establishment and Renovation. In: RF Barnes, DA Miller, CJ Nelson, (Eds.), Forages, volume II: The Science of Grassland Agriculture. 5th ed. Iowa State Univ. Press, Des Moines. p. 29-43.
- Waddington J, Bittman S, 1983. Bromegrass and Alfalfa Establishment with a Wheat Companion Crop in Northeastern Saskatchewan. *Canadian Journal of Plant Science*, 63: 659-668.
- Wiersma DW, Hoffman PC, Mlynarek MJ, 1999. Companion Crops for Legume Establishment: Forage Yield, Quality, and Establishment Success. *Journal of Production Agriculture*, 12: 116-122.
- Yildiz N, Bircan H, 2003. Research and Trial Methods. Atatürk University Pub. No: 697. Faculty of Agriculture Pub. No: 305, Textbook Series No: 57, Erzurum, Turkey. (in Turkish).

**Atıf İçin:** Kara N, 2021. Solucan Gübresinin *Satureja hortensis* L.'nin Herba Verimi ve Uçucu Yağ Oranına Etkisi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1635-1642.

**To cite:** Kara N, 2021. Effect of Vermicompost on Herb Yield and Essential Oil Content of *Satureja hortensis*. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1635-1642.

## Solucan Gübresinin *Satureja hortensis* L.'nin Herba Verimi ve Uçucu Yağ Oranına Etkisi

Nimet KARA<sup>1\*</sup>

**ÖZET:** Araştırma, Isparta koşullarında *Satureja hortensis* L.'nin herba verimi ve uçucu yağ oranına sıvı solucan gübresi uygulamasının etkisini araştırmak amacıyla 2019 ve 2020 yıllarında yürütülmüştür. Deneme, tesadüf blokları deneme desenine göre üç tekerrürlü olarak, geleneksel üretim (kontrol-G.Ü), yalın solucan gübresi (S.G) ve G.Ü+S.G'nin birlikte uygulanması şeklinde kurulmuştur. *Satureja hortensis*'in yaş herba uçucu yağ oranı dışında birinci ve ikinci biçimleri arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli çıkmış ve birinci biçim ortalamaları önemli oranda daha yüksek olmuştur. Yalın solucan gübresi uygulamasından elde edilen bitki boyu, yaş herba, drog herba ve drog yaprak verimi ile uçucu yağ oranı, geleneksel üretim ve G.Ü+S.G'nin birlikte uygulanmasına göre daha düşük olmuştur. İncelenen karakterlerin en yüksek değerleri G.Ü+S.G'nin birlikte uygulanmasında belirlenmiştir. Geleneksel üretim+solucan gübresinin birlikte uygulamasından elde edilen drog yaprak verimi yalın solucan gübresine göre birinci yıl %62.8, ikinci yıl %35.7 ve geleneksel üretimden ise birinci yıl %30.4, ikinci yıl %21.5 oranında daha fazla olmuştur. Sonuç olarak, üretici tercihinine göre, organik ürün yetiştirmek amacıyla yalın sıvı solucan gübresi uygulanabilir olduğu, ancak daha yüksek yaş/drog herba ve drog yaprak veriminden dolayı solucan gübresinin geleneksel üretim ile birlikte uygulanması önerilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Satureja*, solucan gübresi, drog verimi, uçucu yağ oranı

### Effect of Vermicompost on Herb Yield and Essential Oil Content of *Satureja hortensis*

**ABSTRACT:** The research was carried out to investigate the effect of liquid vermicompost treatment on herb yield and essential oil content of *Satureja hortensis*' in Isparta conditions in 2019 and 2020 years. The experiment was set up in three replications according to the randomized complete block design by applying conventional production (C.P), alone vermicompost (V) and C.P+V together. The differences between the first and second harvests of *Satureja hortensis*, except for the essential oil content of fresh herb, were statistically significant, and the means of the first harvest were significantly higher. The plant height, fresh herb, dried herb, drug leaf yield and essential oil content values obtained from the application of alone vermicompost were lower than conventional production and the application of C.P+V together. The highest values of the examined characteristics were determined in the combination of C.P+V. The drug leaf yield obtained from the combined treatment of conventional production + vermicompost was 62.8% higher in the first year, 35.7% in the second year according to vermicompost fertilizer, and 30.4% in the first year and 21.5% in the second year compared to the conventional production. As a result, according to the producer preferer, alone liquid vermicompost should be applied with aim to grow organic crops, but combination of C.P+V is recommended due to higher fresh/dried herb and drug leaf yield.

**Keywords:** *Satureja*, vermicompost, drug yield, essential oil content

<sup>1</sup> Nimet KARA ([Orcid ID: 0000-0001-7069-0877](https://orcid.org/0000-0001-7069-0877)), Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Isparta, Türkiye

\*Sorumlu yazar / Corresponding author: Nimet KARA e-mail: nimetkara@isparta.edu.tr

## GİRİŞ

Dünyada tıbbi ve aromatik bitkilerin gıda, ilaç ve kozmetik sanayi gibi birçok alanda kullanımı ve tüketimi hızla artmaktadır. Anadolu'da kekik adıyla bilinen; *Origanum*, *Thymus*, *Satureja*, *Coridothymus* ve *Thymbra* cinslerinin bazı türleri doğadan toplanırken, bazılarının ise tarımı yapılmaktadır. Türkiye'de ticareti yapılan sater bitkisine ait önemli kekik türleri *S. cuneifolia*, *S. thymbra*, *S. hortensis* ve *S. spicigera*'dır (Satıl ve ark., 2008). Sater (*Satureja hortensis* L.) Türkiye'nin Karadeniz (Samsun), Akdeniz (Hatay), Doğu Anadolu (Erzurum ve Diyarbakır) ve Güney Doğu Anadolu (Kahramanmaraş) bölgeleri başta olmak üzere birçok yerinde doğal yayılış göstermektedir (Çoban, 2019). *Satureja*'nın büyük bir kısmı doğadan temin edilmekle birlikte Edirne, Balıkesir, Bursa, İzmir, Denizli, Konya, Eskişehir ve Kayseri illerinde kültürü yapılmaktadır (Aşçı, 2009).

*Satureja hortensis* baharat olarak, bitkisel çay yapımında, parfümeri ve kozmetik sanayinde kullanıldığı (Ortiz ve Fernandez, 1992) gibi halk ilacı olarak kramplar, kas ağrıları, mide bulantısı, hazımsızlık, ishal ve bulaşıcı hastalıklar gibi çeşitli rahatsızlıkları tedavi etmede kullanılmaktadır (Şahin ve ark., 2003). *Satureja* antioksidan, antimikrobiyal (Mohammed ve ark., 2019) ve antifungal (Bozhüyük ve ark., 2015) etkilere sahip olup gıdalarda bozulmayı engellemek amacı ile kullanılabilen (Özkalp ve Özcan, 2009) bildirilmektedir. Dünyada olduğu gibi Türkiye'de ticareti yapılan tıbbi ve aromatik bitkilerin bir kısmı doğadan toplanarak temin edilirken bir kısmının da kültürü yapılmaktadır. Lamiaceae familyasına ait *Satureja hortensis* Anadolu'da farklı isimlerle bilinmekle birlikte (cibreska, kekik, anık, çibriska, çubriza, geyik otu) literatürlerde yaygın ismi sater olarak geçmekte ve halk arasında daha çok kekik olarak bilinmektedir. Tek yıllık olması nedeniyle tarla tarımı ekim sisteminde kolaylıkla yer alabilmektedir. Bunun yanında kısa vejetasyon süresine sahip olması ve hızlı gelişmesi nedeniyle bir yılda iki ürün alınabilmektedir.

Türkiye'de tarımsal üretimin düşük olmasının birçok nedeni vardır. Birim alan verim düşüklüğünün önemli sebeplerinden birisi, tarım alanlarının büyük bir kısmının organik madde içeriğinin düşük olmasıdır (Eyüpoğlu, 1999). Bu nedenle özellikle kuru tarım arazilerinde, gübreleme ile birlikte modern tarım teknikleri kullanılsa dahi verim, belirli bir seviyenin üzerine çıkamamaktadır. Sulu tarım arazilerinde ise gübreleme ile birlikte verim artışları sağlansa da, organik madde eksikliğinin negatif yansıması olmaktadır. Toprakta organik madde oranını artırmak için ahır gübrelemesi, yeşil gübreleme, baklagillerin ekim nöbetine girmesi, kompost, vermikompost vb. uygulamalar yapılmaktadır (Tejada ve ark., 2008). Bitkisel üretimde verimi arttırmak için kullanılan yoğun pestisit ve gübreler önemli sağlık sorunlarına neden olabilmektedir. Ayrıca tarım topraklarının yapısında bozulmalara ve verimsizleşmesine sebep olmaktadır (Chen ve ark., 2010). İnsanların kimyasal kalıntılar nedeniyle tükettikleri ürünlerde doğal tercih etmeleri organik veya iyi tarım üretimini arttırmış ve büyük bir pazar oluşturmuştur. Vermikompost (solucan gübresi), organik materyallerin solucanlar tarafından humus benzeri materyallere dönüştürülmesi ile elde edilmektedir (Garg ve ark., 2010). Vermikompost, toprağa organik madde, bitki besin elementleri, hormonlar, enzimler, hümik maddeler kazandırmakta ve mikrobiyal aktiviteyi artırarak toprak verimliliğini ve canlılığını olumlu yönde etkilemektedir (Ceritoğlu, 2019). Tavalı ve ark. (2014) vermikompost uygulamasının toprağın organik madde içeriğini arttırdığını, Singh ve ark. (2008) ve Köksal ve ark. (2017) vermikompostun toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin iyileştirdiğini ve verime olumlu etki yaptığını bildirmişlerdir. Bu araştırma, *Satureja hortensis*'in herba verimi ve uçucu yağ oranına topraktan sıvı solucan gübresi uygulamasının etkisini araştırmak amacıyla yürütülmüştür.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Fide Yetiştirme

*Satureja hortensis* tohumları Nisan ayının ilk haftasında sera koşullarında köklendirme ortamı olarak perlit ve torf (1:1) ile doldurulmuş viollere 2-3 adet ekilmiştir. Tohumlar ekimden itibaren otomatik sisleme şeklinde düzenli sulanmış ve çıkış yaptıktan sonra tekleme yapılmıştır. Fideler sera ortamında 30 gün büyümeye bırakılmış ve yaklaşık 10 cm boyuna ulaştıklarında araziye dikilmiştir.

### İklim ve Toprak Özellikleri

Denemenin yürütüldüğü 2019 ve 2020 yıllarının vejetasyon döneminde (Mayıs-Eylül) ortalama sıcaklık sırasıyla, 20.1 ve 21.7 °C, toplam yağış miktarı sırasıyla, 108.2 ve 139.7 mm olmuştur (Çizelge 1).

**Çizelge 1.** Deneme yıllarının ve alanının bazı iklim verileri\*

| İklim verileri | Yıllar      | Aylar |         |        |         |       | Toplam veya Ort. |
|----------------|-------------|-------|---------|--------|---------|-------|------------------|
|                |             | Mayıs | Haziran | Temmuz | Ağustos | Eylül |                  |
| Ortalama       | 2019        | 17.0  | 20.6    | 23.4   | 24.4    | 18.9  | 20.1             |
| Sıcaklık (°C)  | 2020        | 18.4  | 19.8    | 23.3   | 23.2    | 19.8  | 21.7             |
|                | Uzun yıllar | 15.6  | 20.2    | 23.6   | 25.8    | 18.3  | 20.7             |
| Yağış (mm)     | 2019        | 62.9  | 29.4    | 4.1    | 10.2    | 1.6   | 108.2            |
|                | 2020        | 56.6  | 34.2    | 16.1   | 14.1    | 18.7  | 139.7            |
|                | Uzun yıllar | 51.4  | 29.8    | 14.6   | 0.3     | 15.4  | 111.5            |

\*İsparta meteoroloji istasyonu kayıtları

Deneme alanı toprağı her iki yılda da (2019 ve 2020) kumlu-tınlı bir yapıya sahip olup, hafif bazik (pH: 7.6 ve 7.8), kireç oranı yüksek (%20.7 ve %18.6) ve organik madde oranı (%1.93 ve %1.54) düşüktür (Çizelge 2). Uygulamaların hasat sonrası toprak yapısına etkisi her iki yılda da ekim öncesi değerlere yakın çıkmıştır (Çizelge 2).

**Çizelge 2.** Deneme alanı toprağının bazı özellikleri

| Ekim öncesi toprak özellikleri   |               |        |           |                   |             |
|----------------------------------|---------------|--------|-----------|-------------------|-------------|
| Yıllar                           | Derinlik (cm) | pH (%) | Kireç (%) | Organik madde (%) | Bünye       |
| 2019                             | 0-60          | 7.6    | 20.7      | 1.93              | Kumlu tınlı |
| 2020                             | 0-60          | 7.8    | 18.6      | 1.54              |             |
| Hasat sonrası toprak özellikleri |               |        |           |                   |             |
| 2019                             | 0-60          | 7.4    | 20.1      | 1.86              | Kumlu tınlı |
| 2020                             | 0-60          | 7.7    | 19.2      | 1.66              |             |

### Fidelerin Araziye Şaşırtılması ve Denemenin Kurulması

Deneme, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Araştırma ve Uygulama arazisinde her iki yılda da eşit koşullarda yürütülmesi amacıyla aralarında 100 metre olan ayrı alanlarda 2019 ve 2020 yıllarında tesadüf blokları deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Araştırma; 1. Geleneksel üretim (kontrol), 2. Yalın sıvı solucan gübresi ve 3. Geleneksel üretim + solucan gübresinin birlikte uygulanması olarak planlanmıştır.

Geleneksel üretim (Kontrol): Dekara saf olarak 10 kg azot çiçeklenme öncesi dönemde ve birinci hasat sonrasında olmak üzere ikiye bölünerek ve 5 kg fosfor dikimden önce toprağı DAP (diamonyum

fosfat-18:46) formunda uygulanmıştır. Üst azot gübrelemesi amonyum sülfat (%21 N) formunda verilmiştir (Katar ve Aytaç, 2017).

Sıvı solucan gübresi: Dekara önerilen 1L solucan gübresi her parseldeki bitkilerin kök bölgesine sulama suyu ile birlikte üç defa toprağa uygulanmıştır. Birinci uygulama; dikimden 15 gün sonra, ikinci uygulama çiçeklenme başlangıcı ve üçüncü uygulama ise bitkinin gelişmesini hızlandırmak amacıyla ilk biçimden hemen sonra yapılmıştır.

Denemede kullanılan solucan gübresinin içeriği pH 7-9, %3.0 organik madde, %2.20 toplam hümik+fluvik asit, %0.5 toplam azot ve %1 organik karbondan oluşmaktadır.

*Satureja hortensis* fideleri her iki yılda da Mayıs ayının ilk haftasında sıra arası 40 cm ve sıra üzeri 20 cm dikim sıklığında sıra uzunluğu 4 m ve her parsel 5 sıra olacak şekilde viyol toprağı ile birlikte dikim yapılmış ve can suyu verilmiştir. Fideler toprağa tutununcaya kadar iki sulama daha yapılmıştır. Tutmayan fidelerin yerine yeni fideler aşılanmıştır. Dikimden sonra deneme alanı düzenli olarak yabancı otlardan temizlenmiş ve damlama sulama şeklinde bitkinin ihtiyaç duyduğu zamanlarda sulama yapılmıştır.

*Satureja hortensis*'in bitki boyu kök boğazı ile en uzun dalın ucu arasındaki mesafe cm olarak ölçülmüştür. Bitkilerin tam çiçeklenme döneminde toprak yüzeyinden 10 cm kadar yükseklikten 2-3 sürgün bırakılarak budama makası ile birinci hasatlar sırasıyla 04.08.2019 ve 30.07.2020, ikinci hasatlar 16.10.2019 ve 13.10.2020 tarihlerinde yapılmıştır. Yaş herba ağırlıkları tartıldıktan sonra gölge ve havadar bir ortamda 10 gün raflarda kurumaya bırakılarak drog herba ağırlıkları belirlenmiştir. Kuruyan bitkilerin yaprakları saplarından elle sıyrıldıktan sonra drog yaprak ağırlıkları tartılmış ve dekara çevrilerek verimleri ( $\text{kg da}^{-1}$ ) hesaplanmıştır.

### Uçucu Yağ Oranı

Hasat sonrasında yaş herba ve drog yaprak uçucu yağ oranı, Clevenger tipi hidro- distilasyon cihazında su distilasyonu yöntemiyle, yaş herba uçucu yağ oranı için 100 gr numune üzerine 750 ml, drog yaprak için 30 gr numune üzerine 250 ml su eklenerek 2 saat süre ile distile edilmiştir. Distilasyon sonrasında ölçülü bölümde toplanan yağ miktarı ölçülerek % uçucu yağ oranı hesaplanmıştır.

Tesadüf blokları deneme desenine göre kurulan çalışmada, *Satureja hortensis* bitkisinden iki biçim yapıldığı için uygulamalara ait biçim sayılarının karşılaştırmaları faktöriyel deneme desenine göre varyans analizleri Jump 5 istatistik paket programından faydalanılarak yapılmış, elde edilen ortalamalar Duncan testine göre karşılaştırılmıştır (Steel ve Torrie, 1980).

### BULGULAR ve TARTIŞMA

*Satureja hortensis* bitkisinin toplam yaş ve drog herba verimi bakımından yıllar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli çıkarken, incelenen diğer özellikler arasında farklar önemsiz olmuştur (Çizelge 3). *Satureja hortensis*'in toplam yaş ve drog herba verimi ikinci yıl daha yüksek olmuştur. Bu farklılık; ikinci yılda yağış miktarı ve günlük sıcaklık ortalamasının daha yüksek olması nedeniyle bitkinin hızlı gelişmesi ve vejetatif aksamın artmasıyla açıklanabilir.

**Çizelge 3.** *Satureja*'nın incelenen özelliklerinin yıllara ait ortalamaları

| Yıllar                  | Toplam yaş herba verimi ( $\text{kg da}^{-1}$ ) | Toplam drog herba verimi ( $\text{kg da}^{-1}$ ) | Toplam drog yaprak verimi ( $\text{kg da}^{-1}$ ) | Bitki boyu (cm) | Yaş uçucu yağ oranı (%) | Drog yaprak U.Y.O (%) |
|-------------------------|---|--|---|-----------------|-------------------------|-----------------------|
| 2019                    | 1249.3 B  | 370.4 B  | 182.1   | 38.4            | 0.53                    | 3.03                  |
| 2020                    | 1501.5 A  | 497.6 A  | 199.2   | 37.7            | 0.49                    | 3.10                  |
| F değeri <sub>Yıl</sub> | 26.45**   | 121.4**  | ö.d   | ö.d             | ö.d                     | ö.d                   |

\*\* :  $P \leq 0.01$  düzeyinde önemli, ö.d: önemli değil

*Satureja hortensis* bitkisinin yaş herba uçucu yağ oranı hariç incelenen tüm özelliklerin birinci ve ikinci biçim ortalamaları arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli çıkmış ve birinci biçim ortalamaları daha yüksek olmuştur. *Satureja hortensis*'in bitki boyu, yaş herba, drog herba, drog yaprak verimi ve drog yaprak uçucu yağ oranı birinci biçimde sırasıyla, 41.7 cm, 765.2 kg/da, 240.3 kg/da, 125.7 kg/da ve %3.73, ikinci biçimde 35.1 cm, 483.5 kg/da, 130.1 kg/da, 56.2 kg/da ve %2.34 olurken, bu özellikler ikinci yıl birinci biçimde 40.9 cm, 954.1 kg/da, 320.1 kg/da, 140.1 kg/da ve %3.83, ikinci biçimde 34.6 cm, 547.3 kg/da, 177.5 kg/da ve 59.2 kg/da ve %2.37 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4, 5). *Satureja hortensis* bitkisinde birinci hasattan sonra bitkide odunlaşma daha fazla ve yaprak oranı daha az olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum ikinci hasatta verimin düşük olmasına neden olmuştur. Bunun yanında birinci hasatta verimin yüksek olması; bitkinin vejetasyon süresinin daha uzun ve gelişme sıcaklığının daha uygun olmasından dolayı hızlı gelişmesi ve birinci hasattan sonra bitkinin yavaş gelişmesi, dallanmanın daha az ve sürgünlerin daha kısa kalması ile açıklanabilir. Shams ve ark. (2012) kekik türlerinde bitkide sürgün sayısı ve kanopi çapının drog herba verimini önemli oranda etkilediğini bildirmişlerdir. Héjja ve ark. (2002), Dzida ve ark. (2015) ve Katar ve ark. (2017) *Satureja hortensis* bitkisinin birinci biçiminde yaş herba ve drog yaprak veriminin ikinci biçimden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Gübre uygulamalarının *Satureja hortensis* bitkisinin yaş herba uçucu yağ oranı hariç, bitki boyu, yaş herba verimi, drog herba verimi, drog yaprak verimine ve drog yaprak oranına etkisi her iki yılda istatistiksel olarak önemli olmuştur. *Satureja hortensis*'in en yüksek yaş herba verimi, drog herba verimi, drog yaprak verimi, yaş herba uçucu yağ oranı ve drog yaprak uçucu yağ oranı birinci yıl birinci biçimde 1142.2 kg da<sup>-1</sup>, 340.7 kg da<sup>-1</sup>, 183.7 kg da<sup>-1</sup>, %0.55 ve %4.13, ikinci biçimde 707.3 kg da<sup>-1</sup>, 176.5 kg da<sup>-1</sup>, 80.5 kg da<sup>-1</sup>, %0.52 ve %2.53 olarak belirlenmiştir. Bu özellikler ikinci yıl birinci biçimde 1250.5 kg da<sup>-1</sup>, 375.0 kg da<sup>-1</sup>, 170.0 kg da<sup>-1</sup>, %0.56 ve %4.26 ve ikinci biçimde 611.2 kg da<sup>-1</sup>, 207.7 kg da<sup>-1</sup> ve 76.3 kg da<sup>-1</sup>, %0.49 ve %2.59 ile G.Ü+S.G uygulamasından elde edilmiştir (Çizelge 4,5). İncelenen özelliklerin en düşük değerleri ise solucan gübresinin yalın uygulamasında belirlenmiştir. Geleneksel üretim+solucan gübresinin birlikte uygulamasından elde edilen drog toplam yaprak verimi yalın solucan gübresine göre birinci yıl %62.8, ikinci yıl %35.7 ve geleneksel üretimden ise birinci yıl %30.4, ikinci yıl %21.5 oranında daha fazla olmuştur (Çizelge 3). Yalın olarak uygulanan solucan gübresinin azot içeriğinin düşük (%0.5) olması, *satureja* bitkisinin kısa boylu ve yaprak oranının azalmasına neden olmuş (Çizelge 5), bu durum herba verimine negatif olarak yansımıştır. Azot bitkilerde vejetatif aksamın gelişmesini teşvik etmektedir, yetersizliğinde yaprak, sap ve gövde organları zayıf gelişmektedir (Kacar, 2013). En yüksek verimin tespit edildiği G.Ü+S.G uygulamasında, kimyasal azotlu gübrelemeye solucan gübresinin azot miktarı ek katkı yapmış ve bitkinin vejetatif organlarının gelişmesini ve dolayısıyla herba verimini artırmıştır. Araştırmada, birinci biçim uçucu yağ oranları ikinci biçimden daha yüksek olmuştur. Bu farklılık birinci biçimde bitkinin vejetasyon süresinin daha uzun, yaprak/sap oranının yüksek ve sıcaklığın uygun olmasından kaynaklanmaktadır. Uygulamalar; *satureja* bitkisinin yaş herba uçucu yağ oranını etkilemezken, drog yaprak uçucu yağ oranı G.Ü+S.G'nin birlikte uygulamasında daha yüksek olmuştur. Tıbbi ve aromatik bitkilerde uçucu yağlar doku, organ ve gelişme kısımlarında spesifik biyosentetik enzimler tarafından sentezlenmekte ve iklim faktörleri, gübreleme, sulama, hasat zamanı ve kurutma şekli gibi bir çok faktörün etkisi altındadır (Alaca ve Arslan, 2012). Aşçı (2009) yeşil herba verimi 790.5-1085.0 kg da<sup>-1</sup>, drog herba verimi 345.4- 455.7 kg da<sup>-1</sup>, drog yaprak verimi için 76.3-101.2 kg da<sup>-1</sup> ve uçucu yağ oranının %3.15-2.30, Katar ve ark. (2011) yaş herba verimi 216.6-297.0 kg da<sup>-1</sup>, drog yaprak veriminin 45.3-66.0 kg da<sup>-1</sup>, yaş yaprak uçucu yağ oranının %1.66-2.20 ve Çoban (2019) toplam yaş herba verimi 5745.0-1077.5 kg da<sup>-1</sup>, toplam drog herba verimi 1624.5-599.5 kg da<sup>-1</sup> ve uçucu yağ oranı %2.76-3.58 arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

**Çizelge 4.** *Satureja hortensis*'in yaş herba, drog herba ve drog yaprak verimleri

| Yıllar                | Gübre uyg./<br>Biçim zam. | Yaş herba verimi (kg da <sup>-1</sup> ) |          |          | Drog herba verimi (kg da <sup>-1</sup> ) |          |          | Drog yaprak verimi (kg da <sup>-1</sup> ) |          |         |
|-----------------------|---------------------------|---|----------|----------|--|----------|----------|---|----------|---------|
|                       |                           | 1. Biçim                                | 2. Biçim | Toplam   | 1. Biçim                                 | 2. Biçim | Toplam   | 1. Biçim                                  | 2. Biçim | Toplam  |
| 2019                  | G.Ü                       | 928.7 b                                 | 532.6 b  | 1461.3 b | 240.1 b                                  | 109.4 b  | 349.5 b  | 129.8 b                                   | 54.1 b   | 183.9 b |
|                       | S.G                       | 425.0 c                                 | 312.1 c  | 737.1 c  | 140.0 c                                  | 104.1 b  | 244.1 c  | 63.9 c                                    | 34.4 c   | 98.3 c  |
|                       | G.Ü+S.G                   | 942.2a                                  | 607.3 a  | 1549.5 a | 340.7 a                                  | 176.5 a  | 517.2 a  | 183.7 a                                   | 80.5 a   | 264.2 a |
|                       | F değeri                  | 35.16**                                 | 19.87**  | 29.78**  | 135.9**                                  | 112.1**  | 123.70** | 203.3**                                   | 119.42** | 214.3** |
| Biçim zamanı ortalama |                           | 765.2A**                                | 483.5 B  |          | 240.3 A**                                | 130.1 B  |          | 125.7A**                                  | 56.2 B   |         |
| C.V (%)               |                           | 5.47                                    | 3.14     | 2.10     | 4.58                                     | 3.98     | 2.47     | 3.81                                      | 4.09     | 2.87    |
| 2020                  | G.Ü                       | 982.3 b                                 | 549.9 b  | 1532.2 b | 317.2 b                                  | 174.1 b  | 491.3 b  | 135.9 b                                   | 57.3 b   | 193.2 b |
|                       | S.G                       | 831.5 c                                 | 481.1 c  | 1312.6 c | 268.1 c                                  | 150.7 b  | 418.8 c  | 114.4 c                                   | 43.8 c   | 158.2 c |
|                       | G.Ü+S.G                   | 1050.5 a                                | 611.2 a  | 1661.7 a | 375.0 a                                  | 207.7 a  | 582.7 a  | 170.0 a                                   | 76.3 a   | 246.3 a |
|                       | F değeri                  | 82.46**                                 | 66.58**  | 104.10** | 7.12**                                   | 9.17**   | 69.8**   | 12.72**                                   | 18.9**   | 66.89** |
| Biçim zamanı ortalama |                           | 954.1A**                                | 547.3 B  |          | 320.1 A**                                | 177.5 B  |          | 140.1A**                                  | 59.2 B   |         |
| C.V (%)               |                           | 2.41                                    | 2.54     | 3.78     | 3.61                                     | 5.14     | 3.25     | 2.98                                      | 2.47     | 5.41    |

G.Ü: Geleneksel üretim, S.G: Solucan gübresi, \*\*: P≤0.01 düzeyinde önemli

Aynı sütunda benzer harfler ile gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark yoktur

**Çizelge 5.** *Satureja hortensis*'in bitki boyu, yaş herba ve ve drog herba uçucu yağ oranları

| Yıllar                | Gübre uyg./<br>Biçim zam. | Bitki boyu (cm) |          | Yaş herba U.Y.O (%) |                    | Drog yaprak U.Y.O (%) |          |
|-----------------------|---------------------------|-----------------|----------|---------------------|--------------------|-----------------------|----------|
|                       |                           | 1. Biçim        | 2. Biçim | 1. Biçim            | 2. Biçim           | 1. Biçim              | 2. Biçim |
| 2019                  | G.Ü                       | 43.2 b          | 37.2 b   | 0.55                | 0.53               | 3.73 b                | 2.20 b   |
|                       | S.G                       | 35.8 c          | 29.7 c   | 0.51                | 0.52               | 3.33 b                | 2.26 b   |
|                       | G.Ü+S.G                   | 46.2 a          | 38.4 a   | 0.58                | 0.56               | 4.13 a                | 2.53 a   |
|                       | F değeri                  | 26.45**         | 5.88*    | 1.34 <sup>öd</sup>  | 2.19 <sup>öd</sup> | 6.08*                 | 4.08**   |
| Biçim zamanı ortalama |                           | 41.7 A**        | 35.1 B   | 0.55 <sup>öd</sup>  | 0.53               | 3.73 A**              | 2.34 B   |
| C.V (%)               |                           | 2.47            | 3.30     | 4.40                | 3.25               | 3.21                  | 2.25     |
| 2020                  | G.Ü                       | 41.5 b          | 34.2 b   | 0.54                | 0.47               | 3.40 c                | 2.53 a   |
|                       | S.G                       | 37.6 c          | 32.5 b   | 0.51                | 0.48               | 3.83 b                | 1.98 b   |
|                       | G.Ü+S.G                   | 43.6 a          | 37.3 a   | 0.56                | 0.49               | 4.26 a                | 2.59 a   |
|                       | F değeri                  | 15.60**         | 3420**   | 1.36 <sup>öd</sup>  | 1.49 <sup>öd</sup> | 6.40*                 | 76.56**  |
| Biçim zamanı ortalama |                           | 40.9 A**        | 34.6 B   | 0.54 A**            | 0.48 B             | 3.83 A**              | 2.37 B   |
| C.V (%)               |                           | 3.14            | 1.25     | 1.47                | 2.54               | 3.74                  | 3.65     |

G.Ü: Geleneksel üretim, S.G: Solucan gübresi, \*\*: P≤0.01 düzeyinde önemli, öd: önemli değil

Aynı sütunda benzer harfler ile gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark yoktur.

## SONUÇ

Yalın sıvı solucan gübrelemesinde elde edilen *Satureja hortensis*'in bitki boyu, yaş herba ve drog herba verimi ile uçucu yağ oranı değerleri, geleneksel üretim ve G.Ü+S.G'nin birlikte uygulanmasına göre daha düşük olmuştur. İncelenen karakterlerin en yüksek değerleri geleneksel üretim+solucan gübresinin birlikte uygulanmasında belirlenmiştir. Bu sonuç solucan gübresinin ek olarak uygulanmasının verime önemli oranda katkısının olduğunu göstermektedir. Birinci biçimlerde elde edilen ortalama verim değerleri ikinci biçimden önemli ölçüde daha yüksek olmuştur. Tipik bir karasal iklim özelliği gösteren Isparta ve benzeri koşullarda *Satureja hortensis* bitkisinde birinci hasattan sonra normal bakım işlemleri yapılarak ikinci biçim elde edilebilir.

*Satureja* bitkisinde kimyasal gübrelemeye ek olarak uygulanan vermikompostun yalın solucan gübresine göre %35.7-62.8 ve geleneksel üretime göre ise %21.5-30.4 oranında daha yüksek drog herba verimi elde edilmesi dikkate alındığında vermikompost uygulamasının ekonomik olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, daha yüksek yaş herba ve drog yaprak veriminden dolayı solucan gübresinin geleneksel üretim ile birlikte uygulanması önerilmektedir.

### Çıkar Çatışması

Çalışmada kullanılan solucan gübresi bir zirai ilaç bayisinden temin edilmiştir. Ticari olarak satılan bir gübre olup, üretici firma ile "istihdam, ortaklık, danışmanlıklar, hisse senedi sahipliği, hizmet karşılığı ödenen ücretler, ücretli bilirkişilik, akrabalık veya yakın kişisel ilişkiler" ve benzeri herhangi bir çıkar ilişkisi yoktur.

### Yazar Katkısı

Makalenin planlanması, yürütülmesi ve yazılması makale tek yazarı olarak tarafımca yapıldığı beyan ederim.

### KAYNAKLAR

- Acıbuca V, Budak DB, 2018. Dünya'da ve Türkiye'de tıbbi ve aromatik bitkilerin yeri ve önemi. Çukurova Tarım Gıda Bilimleri Dergisi, 33(1): 37-44.
- Alaca F, Arslan N, 2012. Sekonder metabolitlerin bitkiler açısından önemi. Ziraat Mühendisliği, 358: 48-55.
- Aşçı M, 2009. Çukurova Koşullarında *Satureja hortensis* L.'nin Çiçeklenme Döneminde Tarımsal Karakterler ve Uçucu Yağ Oranındaki Değişimlerin Araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış).
- Bozhüyük AU, Kordali Ş, Bölük G, 2015. *Satureja hortensis* L. uçucu yağının antifungal etkisi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 46(2): 107-112.
- Ceritoğlu M, Şahin S, Erman M, 2019. Vermikompost üretim tekniği ve üretimde kullanılan materyaller. Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi, 6(2): 230-236.
- Chen G, Zheng Z, Yang S, Fang C, Zou X, Luo Y, 2010. Experimental co-digestion of corn stalk and vermicompost to improve biogas production. Waste Management, 30(10): 1834-1840.
- Çoban ZD, 2019. Farklı Lokasyon ve Sıra Arası Mesafelerinin Sater (*Satureja hortensis* L.) Bitkisinin Verim ve Kalite Özelliklerine Etkileri. Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi (Basılmış).
- Dzida K, Zawislak G, Wierdak RN, Michałojć Z, Jarosz Z, Pitura K, Karczmarz K, 2015. Yield and quality of the summer savory herb (*Satureia hortensis* L.) grown for a bunch. Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus, 14(3): 141-156.
- Eyüpoğlu F, 1999. Türkiye Topraklarının Verimlilik Durumu. Köy Hizmetleri Genel Müdürlüğü-Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Yayınları. Genel Yayın No: 220 Ankara- Türkiye.
- Garg VK, Gupta R, Yadav A, 2010. Vermicomposting Technology for Solid Waste Management. [http://www.environmentalexpert.com/Files/0/articles/9047/Vermicomposting\\_article\\_for\\_the\\_biofertilizer\\_people.pdf](http://www.environmentalexpert.com/Files/0/articles/9047/Vermicomposting_article_for_the_biofertilizer_people.pdf) (Erişim Tarihi: 05.02.2021).
- Hejja M, Bernaht J, Szentgyörgyi E, 2002. Comparative investigation of *Satureja hortensis* of different orijin. Proc. Int. Conf. On MAP. (eds: J. Bernáth et al), Acta Horticulture, 576: 65-68.
- Kacar B, 2013. Temel Gübre Bilgisi. Nobel Yayıncılık No:695, Fen Bilimleri No: 063, Ankara-Türkiye.
- Katar D, Arslan Y, Subaşı İ, Bülbül A, 2011. Ankara ekolojik koşullarında sater (*Satureja hortensis* L) bitkisinde uçucu yağ ve bileşenlerinin ontogenetik varyabilitesinin belirlenmesi. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, 8(2): 29-35.
- Katar D, Kacar O, Kara N, Aytaç Z, Göksu E, Kara S, Katar N, Erbaş S, Telci İ, Elmastaş M, 2017. Ecological variation of yield and aroma components of summer savory (*Satureja hortensis* L.). Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 7: 131-135.
- Katar N, Aytaç Z, 2017. Farklı Azot Dozlarının Sater (*Satureja hortensis* L.) Bitkisinde Verim ve Kalite Özellikleri Üzerine Etkisi, 12. Tarla Bitkileri Kongresi, 12-15 Ekim 2017, Kahramanmaraş.
- Katar N, Aytaç Z, 2019. Sater (*Satureja hortensis* L.) genotiplerinin farklı lokasyonlarda agronomik ve kalite özelliklerinin belirlenmesi. Ziraat Fakültesi Dergisi, 14 (2): 253-269.
- Köksal SB, Aksu G, Altay H, 2017. Vermikompostun bazı toprak özellikleri ve pazı bitkisinde verim üzerine etkisi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 5(2): 123-128



- Mohammed FS, Dastan T, Sevindik M, Selamoğlu Z, 2019. Antioxidant, antimicrobial activity and therapeutic profile of *Satureja hortensis* from Erzincan province. *Cumhuriyet Tıp Dergisi*, 41 (3): 558-562.
- Ortiz PL, Fernandez I, 1992. Microscopic Study of Honey and Apiary Pollen from the Province of Seville. Departamento de Biología Vegetal, Ecología Facultad de Biología, Apdo. 1095, 41080 Seville, Spain.
- zkalp B, zcan M, 2009. Antibacterial activity of several concentrations of sater (*Satureja hortensis* L.) essential oil on spoilage and pathogenic food-related microorganisms. *World Applied Sciences Journal*, 6(4): 509-514.
- Satıl F, Dirmenci T, Tmen G, Turan Y, 2008. Commercial and ethnic uses of *Satureja* (Sivri Kekik) species in Turkey. *Ekoloji*, 17: 1-7.
- Shams A, Shakouri MJ, Kapourchal SA, Aslanpour M, 2012. Effect of nitrogen and phosphorus fertilizers on yield of *Thymus daenensis* in dry condition. *Indian Journal of Science and Technology*, 5: 1916-1920.
- Singh R, Sharma RR, Kumar S, Gupta RK, Patil RT, 2008. Vermicompost substitution influences growth, physiological disorders, fruit yield and quality of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch). *Bioresource Technology*, 99: 8507-8511.
- Steel, RGD., Torrie JH, 1980. Principles and Procedures of Statistics. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, USA.
- Şahin F, Karaman İ, Gllce M, ğt H, Şengül M, Adıgzel A, Öztürk S, Kotan R, 2003. Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 87: 61-65.
- Tavalı İE, Uz İ, Orman Ş, 2014. Vermikompost ve tavuk gübresinin yazlık kabağın (*Cucurbita pepo* L. cv. Sakız) verim ve kalitesi ile toprağın bazı kimyasal özellikleri üzerine etkileri. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 27(2): 119-12.
- Tejada M, Gonzalez JL, Garcia-Martinez AM, Parrado J, 2008. Effects of different green manures on soil biological properties and maize yield. *Bio Resource Technology*, 99:1758-1767.

**Atıf İçin:** Yanar KE, Aktaş MS, 2021. Ruminantlarda Karayolu Nakliyesinde Oluşan Stresin Nedenleri, Belirteçleri ve Sonuçları. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1643-1652.

**To Cite:** Yanar KE, Aktaş MS, 2021. Causes, Indicators and Consequences of Stress Caused by Road Transport in Ruminants. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1643-1652.

## **Ruminantlarda Karayolu Nakliyesinde Oluşan Stresin Nedenleri, Belirteçleri ve Sonuçları**

Kerim Emre YANAR<sup>1\*</sup>, Mustafa Sinan AKTAŞ<sup>1</sup>

**ÖZET:** Hayvanların zihinsel ve fiziksel olarak iyi olma durumu olarak tanımlanan hayvan refahı, sağlık, hastalık, yetiştirme, davranış ve sürü yönetimi gibi objektif ve subjektif ölçütlerin bir bileşkesi olarak tanımlanabilir. Günümüzde, hayvancılık faaliyetleri içerisinde kurallara uygun olarak yapılmayan canlı hayvan nakliye uygulamalarının, çiftlik hayvanları için önemli bir stres unsuru olduğu kabul edilmektedir. Söz konusu strese yol açan faktörler, stresin sonuçları ve belirteçleri ile nakliye stresinin hayvan refahı üzerine etkileri, bu çalışmada ayrıntılı bir şekilde ele alınarak değerlendirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Hayvan refahı, nakliye stresi, canlı hayvan nakliyesi, sığır, koyun.

### **Causes, Indicators and Consequences of Stress Caused by Road Transport in Ruminants**

**ABSTRACT:** Animal welfare which is defined as mental and physical well-being state of the animal is combination of objective and subjective criteria such as health, disease, rearing, behavior and herd management. Today, it is accepted that livestock transportation practices that are not carried out in accordance with the rules are an important stress factor for farm animals. In this review, effects of transport stress on animal welfare, consequences and indicators of the stress as well as factors causing the stress were evaluated in detail.

**Keywords:** Animal welfare, transportation stress, live animal transportation, cattle, sheep.

<sup>1</sup> Kerim Emre YANAR ([Orcid ID: 0000-0001-7302-7077](https://orcid.org/0000-0001-7302-7077)), Mustafa Sinan AKTAŞ ([Orcid ID: 0000-0002-7206-5757](https://orcid.org/0000-0002-7206-5757)), Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Klinik Bilimler Bölümü, Erzurum, Türkiye

**\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Kerim Emre YANAR, e-mail: emre.yanar@atauni.edu.tr

## GİRİŞ

Günümüze kadar farklı araştırmacıların, değişik açılardan yaptıkları stres tanımları bir arada değerlendirildiğinde stres, yoğun üretim sistemine bağlı kısıtlama, açlık, susuzluk, yorgunluk, yaralanma, kötü hayvan idaresi, yeniliklerle karşılaşma ya da termal etkiler vb. gibi, canlının homeostazisini tehdit eden iç veya dış faktörlere karşı anatomik, fizyolojik ve davranış değişiklikleri şeklinde verilen biyolojik bir yanıt şekli olarak ifade edilebilmektedir (Bozkurt, 2016). Tanımda da belirtildiği gibi çiftlik hayvanlarında strese neden olan bir çok faktör söz konusudur. Bu faktörlerin en önemlilerinden biri de hayvanların nakliyesidir (Minka and Ayo, 2009).

Hayvan nakliyesinin tarihçesine bakıldığında, nakliyenin ilk olarak deniz yoluyla yapıldığı görülmektedir. 1607 yılında, Jamestown'a (Virginia), Amerika'nın ilk kalıcı İngiliz sömürgecilerini taşıyan bir İngiliz gemisi olan Susan Constant ile sığır ve daha küçük hayvanlar taşınmış ve böylece tarihte kaydedilen ilk hayvan taşınması gerçekleştirilmiştir (Swanson and Morrow-Tesch, 2001). Amerika'da 1850 yılında demiryolu ağının Chicago'nun merkezinden kuzey, güney, doğu ve batıya yayılmasıyla demir yolu ulaşımı cazip hale gelmiş ve canlı sığırların Chicago'ya trenle ilk nakliyesi 5 Eylül 1867 yılında gerçekleşmiştir (Wade, 2002). Ancak demir yolu nakliyesi seyahat süresinin uzunluğu ve maliyetin yüksekliğinden dolayı çok fazla tercih edilmemiştir (Erzurum ve Yılmaz, 2016). Aynı zamanda ilerleyen süreçte karayolu ile yapılan nakliyelerin deniz ve demiryoluna göre daha az ölüm oranına sahip olması karayolu nakliyesini daha cazip hale getirmiştir (Hutchings and Martin, 1983). Önceleri deniz yolu ile başlayan daha sonra demiryolu, karayolu ve en son olarak da hava yoluyla da gerçekleştirilebilen hayvan nakliye yöntemleri içerisinde canlı hayvanların karayolu ile taşınması, Avrupa Birliği Ülkelerinde ekonomik olarak en önemli nakliye biçimi olup, yılda 4.3 milyon sığır, 33.4 milyon domuz, 3.5 milyon koyun ile kuzu ve 1 milyar kanatlının nakledildiği bildirilmektedir (Anonymous, 2020).

Hayvancılık sektörü yapısal olarak incelendiğinde, küçük ve büyükbaş hayvancılığın daha çok nüfus yoğunluğunun düşük olduğu kırsal bölgelerde yapılmasına karşın, büyük yerleşim merkezlerinin yoğunlaştığı bölgelerin besi hayvanı ihtiyacının söz konusu bölgelerde yetiştirilen hayvanlardan karşılanamaması sonucu, hayvan nakliyesinin zorunlu hale geldiği görülmektedir (Altınçekiç ve Koyuncu, 2010). Bu çalışmada, söz konusu karayolu nakliyesi sırasında oluşan strese neden olan faktörler, bu stresin klinik, hematolojik, biyokimyasal ve immünolojik belirteçleri ile sonuçları ayrıntılı olarak incelenmiştir.

### Stres Oluşum Mekanizması

Stres, tepki sürelerine ve yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Akut, kısa süreli stresin genel olarak organizma için faydalı olduğu düşünülürken, uzun süreli kronik stres zararlı sonuçlara neden olabilmektedir. Kronik stres, hipotalamik-pituitaryadrenal aksın (HPA) etkileşimi ile ilişkilidir. Kateşolaminler, yani epinefrin ve norepinefrinde eşzamanlı yükselmeler, kortizol üretiminde artışa yol açar. Bunun dışında stres süresinin uzunluğu ile birlikte, stres etkeninin yoğunluğu da önemli bir faktördür (Krizanova et al., 2016). Canlılarda yaşamın devamını sağlamak amacıyla organizmanın iç ve dış ortamlardaki olumsuzluklara karşı geliştirdiği birçok savunma mekanizması mevcuttur. Hayvanlarda homeostazisin bozulmasına ve metabolizmanın değişmesine neden olan çeşitli çevresel faktörlere maruz kalınması farklı fizyolojik değişimlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Genel olarak bu değişimler iki ana başlık altında değerlendirilebilir. Bunlardan birincisi akut stres tepkisi, diğeri ise kronik stres tepkisidir (Bobic et al., 2011). Akut stres tepkisinin sempatik sinir sistemi yoluyla kontrolü mekanizmasında, kolinerjik reseptörler aracılığıyla hedef organlarla olan ilişkilerini sağlayan otonom sinir sisteminin parasempatik iz yolunun nöronları, asetilkolini nörotransmitter olarak kullanmaktadırlar.

Sempatik nöronlar ise, hedef organlarda noradrenalin hormonunu nörotransmitter olarak kullanırlar. Söz konusu parasempatik ve sempatik iz yolları antagonistik olarak fonksiyon yapar ve aralarındaki denge ile vücut sistemlerini regüle ederler (Squires, 2010). Kalp atış hızının düşürülmesi ve sindirim gibi fizyolojik olayların gerçekleştirilmesi için gerekli olan rahatlama devresinde parasempatik iz yolu görev yapar. Tehlike durumlarında ise sempatik iz yolu devreye girer ve adrenalin hormonunun adrenal bezden salgılanmasını uyarır (Pehlivan and Dellal, 2014). Aynı zamanda Turuncus Encephali'nin Locus Coeruleus bölgesinde bulunan sinir lifleri de stres faktörleri tarafından uyarıldıklarında noradrenalin hormonu salgılamaktadırlar (Squires, 2010). Adrenalin ve noradrenalin hormonları akut stres periyodunda kas ve yağ dokularından ve karaciğerden glikoz serbest yağ asitleri ve aminoasitlerin salgılanmasını uyarmakta; glikoz ve yağ asitlerinin depolanması ile protein sentezini engellemektedir. Ayrıca sindirim, üreme, büyüme ve immun sistemin anabolik süreçleri yavaşlamakta, kalp ve iskelet kaslarına olan kan akımı yeniden düzenlenmekte ve kalp atış hızı artmaktadır. Söz konusu bu hormonal tepki çok kısa süre içerisinde görülmektedir. Kronik stres tepkisinin HPA yoluyla kontrolü hipotalamus tarafından salgılanan kortikotropin salgılatıcı hormonun (CRH) salınımı ile başlar. CRH'nin uyarımı ile hipofiz ön lobundan adreno kortikotropik hormon (ACTH) salınımı uyarılmakta, ACTH'da glikokortikoidlerin adrenal korteksten salgılanmasına neden olmaktadır. Kortizol ise CRH ve ACTH üretimini hipotalamus ve hipofiz üzerinde negatif geri bildirim yaparak azaltmaktadır (Tsigos and Chrousos, 2002; Bobic et al., 2011).

### **Ruminantlarda Nakliye Stresine Neden Olan Faktörler**

Ruminantlarda karayolu nakliyesi sırasında oluşabilecek stres kaynakları arasında yükleme ve boşaltma sırasındaki olumsuz uygulamalar, nakliye süresi, araç dizaynı, hayvanın yaşı ve cinsiyeti, genetik yapı, hayvan başına ayrılan alan miktarı, sarsıntı ve havalandırma faktörleri ön plana çıkmaktadır (Simova et al., 2016).

### **Yükleme ve boşaltma sırasındaki uygulamalar**

Yükleme ve boşaltma sırasındaki yanlış uygulamalar, hayvanların birçok vücut parametrelerinde değişimlere neden olabilmekte ve hayvan refahı açısından olumsuz durumlara yol açmaktadır. Özellikle geleneksel ekstansif koşullarda serbest olarak yetiştirilen hayvanların aniden bir araca yüklenmesi ve dar bir alanda adeta hapsedilmeleri, aşırı bağrışma sesleri altında sopa veya tekme ile müdahale edilmesi hayvanların alışık olmadıkları bir uygulama şeklidir. Bu olumsuz koşullar daha başlangıçtan itibaren hayvanların strese girmelerine neden olabilmektedir (Minka and Ayo, 2009). Tüm bu sebepler nedeniyle araştırmacıların çoğu, yükleme sırasında ve nakliyenin ilk aşamasında stresin yüksek olduğunu bildirmiştir (Hall and Bradshaw, 1998).

### **Nakliye süresi**

Yüklemenin ve nakliye anının ilk etkisinden sonra, nakliye süresinin arttırılması, yorgunluk ve dehidrasyon hayvan refahını olumsuz etkilemektedir ve strese neden olabilmektedir (Fisher et al., 2010). Yükleme sonrası ilk birkaç saat içinde, yükleme ve nakliyeye alışkın olmayan hayvanlardaki stres oldukça fazla olup ilerleyen saatlerde belli bir dereceye kadar değişen bir adaptasyon oluşmaktadır. Ancak taşıma süresi uzadıkça stres tekrar artmaktadır. Bu nedenle nakliye süresi mümkün olduğu kadar kısa olmalıdır. Aksi takdirde nakliye süresinin uzaması hayvanlarda stresin artmasına ve refahın kötüleşmesine neden olmaktadır. Bu durumdaki hayvanlarda hastalıklara duyarlılık ve yorgunluk artmaktadır (Altınçekiç ve Koyuncu, 2010). AB ülkelerindeki yasal düzenlemelerle, karayoluyla nakliye süresinin 8 saati geçmemesi gerektiği; bu süreyi geçmesi durumunda kullanılacak araçlarda yapay havalandırma, su ve yem temini vb. ilave tedbirlerin alınmasının zorunlu olduğu bildirilmektedir

(Anonymous, 2005). Nakliye süresi 8 saatten fazla olan karayolu nakliyelerinde, hayvanlar her 8 saatte en az bir saat süre ile dinlendirilmelidir (Kara ve Koyuncu, 2011).

### Araç dizaynı

Ruminantların karayolu nakliyesi sırasında refahı belirleyen ana faktörlerden birisi de bu amaçla kullanılan aracın tasarımıdır. Nakliye araçları hayvanların güvenli bir biçimde nakliyelerini sağlayacak, kapakları sağlam ve hayvanların atlama ve kaçmalarını engelleyecek özellikte olmalıdır (Fazio and Ferlazzo, 2003). Bu amaçla, özel olarak tasarlanmamış araçlarla hayvanların naklieleri strese ve yaralanmalara neden olmaktadır. Bu nedenle açık kasalı kamyon, kamyonet ve zayıf rampalı tasarıma sahip diğer araçlar ile özellikle hayvan nakliyesi için uygun olmayan çok dar kapılara sahip araçların hayvan nakilleri sırasında kullanımından kaçınılmalıdır (Minka and Ayo, 2009).

### Hayvanların yaş ve cinsiyeti

Hayvanların nakliye sırasındaki davranışları yaş ve cinsiyet gibi faktörlerden etkilenmektedir. Genç sığır veya koyunların nakliyesi, genellikle yaşlı hayvanlara göre daha zor olabilmektedir. Ayrıca erkekler nakliye sırasında dişilere göre daha fazla zorluk çıkarsalar da, bu fark yaşa bağlı da olabilmektedir. Bunun dışında yetiştirme ortamı ve daha önceki deneyimlerin etkisinin de oldukça önemli olabileceği bildirilmektedir (Fazio and Ferlazzo, 2003).

### Genetik yapı

Hayvanlar arasında nakliye ve nakliye ile ilgili çevresel etkilere diğerlerinden daha fazla dayanabilme konusunda görülen varyasyonlar, hayvanın türüyle, ırkıyla veya üretim amacıyla yapılan seleksiyonla ilişkili olabilecek genetik farklılıklardan kaynaklanabilmektedir. Büyükbaş hayvanların küçükbaş hayvanlara göre daha uzun mesafelere daha rahat nakledildiğini bildirirken, sütçü sığır ırklarının nakliye sırasında oluşan stresle başa çıkma yeteneğinin etçi ırklara göre daha iyi olduğunu belirtilmiştir (Albright, 2000; Yıldız ve Saatçı, 2009). Ayrıca, belirli çevresel koşullara ruminantların verebilecekleri tepkiler konusunda ırk faktörünün önemli etkisinin olduğu, Orkney ırkı koyunların, Clun Forest ırkına göre nakliye sırasında daha yüksek bir kalp atış hızı ve tükürük kortizol konsantrasyonuna sahip oldukları rapor edilmiştir (Hall and Bradshaw, 1998).

### Hayvan başına ayrılan alan miktarı

Nakliye sırasında hayvan refahını etkileyen en önemli faktörlerden birisi de araçlarda hayvan başına ayrılan alandır. Bu alan ( $m^2$  hayvan<sup>-1</sup>), birim alana düşen canlı ağırlık veya belli bir canlı ağırlığa ayrılan alan ( $m^2$  100<sup>-1</sup> kg) olarak ifade edilebilir. Çiftlik Hayvanları Refah Komitesi tarafından, nakliye araçlarında hayvan başına ayrılması gereken minimum alanın hesaplanmasında,  $A = 0.021 \times W^{0.67}$  eşitliğinin kullanılması önerilmektedir. Bu eşitlikte A: Her hayvana ayrılması gereken minimum zemin alanını ( $m^2$ ); W: Hayvanın canlı ağırlığını (kg) belirtmektedir. Bunun yanı sıra, söz konusu komite tarafından yapılmış kırılmamış ve nakliye süresi 4 saatten daha az olan kuzuların nakliyesinde ise, hayvan başına ayrılması gereken alanın belirlenmesinde  $A = 0.025 W^{0.67}$  eşitliğinin kullanılması önerilmiştir (Erzurum ve Yılmaz, 2016). Ayrıca, nakliye süresi, hayvanın türü, canlı ağırlığı, sığırlarda ve koyunlarda boynuzluluk durumu, cinsiyet, yaş, çevre sıcaklığı, gebelik durumu ve koyunlarda yapağı uzunluğu gibi faktörler de yükleme yoğunluğuna etkili olmaktadır.

### Havalandırma

Ruminantların nakliyesi sırasında 500 kg lık bir büyükbaş hayvan 560 watt, 30 kg lık koyun ise 78 watt ısı üretmektedir. Uzunluğu 13 m, genişliği 6 m olan ve tavsiye edilen miktarda hayvan başına alanın ayrıldığı tipik bir canlı hayvan taşıma aracında, üretilen toplam ısı miktarı sığırlarda 13400 watt, koyunlarda ise 8000 watt olmaktadır. Bu sırada hayvanlar araç içinde büyük miktarda ısı ve su kaybeder.

Sıcak koşullarda ise, hayvanlar nefes nefese kalırlar ve daha fazla terleyerek çok fazla su kaybederler. Bu durum hayvan refahı önemli oranda olumsuz yönde etkiler. Bu nedenle araç içerisinde hayvanların vücut sıcaklığına yakın değerlerde sıcaklık ve nem içeren bir ortamın oluşturulması gerekmektedir (Kettlewell et al., 2000).

## **Ruminantlarda Nakliye Stresinin Klinik, Hematolojik, Biyokimyasal ve İmmunolojik Belirteçleri**

### **Klinik belirteçler**

Nakliye stresine maruz kalan hayvanlarda klinik değişimler başlıca vücut sıcaklığı, nabız ve solunum sayısında meydana gelmektedir. Hayvanların nakliyesi sırasında adrenal korteks cevaba bağlı olarak vücut sıcaklıklarında artış şekillenmektedir (Trunkfield and Broom, 1991). Bu artış nakliye başlamadan önceki koşullara bağlı olmakla beraber ortalama 1 °C olmaktadır. Aynı zamanda artan vücut sıcaklığından araç hareketlerine bağlı olarak şekillenen fiziksel efor da sorumlu tutulmaktadır. Nakliye süresince artan vücut sıcaklığı araç hareket ettikçe dengeyi sağlayabilmek için hayvanın gösterdiği fiziksel reaksiyonu yansıtmaktadır (Broom, 2003). Bu durum “Hayvanlar alışkın olmadıkları bir nakliye olayı sırasında kamyonda daha fazla bir hareketlilik gösterirler, bu durum da vücut sıcaklığında artışa neden olur” hipoteziyle uyum içerisindedir (Wickham et al., 2012). Hayvanlarda korku anında kalp atım hızı düşebilmesine rağmen, çiftlik hayvanları üzerinde yapılan bir çok çalışmada, kalp atım hızında görülen artışın rahatsız edici durumlar ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Kalp atış hızındaki artış yararlı bir refah ölçüsüdür. Ancak bu durum yalnızca hayvanların nakliye, araçlara yükleme ve nakliyesi sırasında karşılaştıkları belirli akut etkiler gibi kısa vadeli problemler için geçerlidir. Bununla birlikte, olumsuz koşullar oldukça uzun süreler boyunca yüksek kalp atış hızına yol açabilmektedir (Broom, 2003). Hayvanların araca yüklenmesi, taşınması ve indirilmesi sırasında oluşan stresin, hayvanların bedensel işlevlerinde ciddi değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (Eniolorunda et al., 2009). Solunum hızı hayvanların sağlık durumunun ve strese karşı vücudun uyarlanabilirliğinin yerinde değerlendirilmesi için en önemli fizyolojik parametrelerden biridir (Minka and Ayo, 2007).

### **Hematolojik belirteçler**

Nakliye stresine maruz kalan hayvanlarda meydana gelen hematolojik değişiklikler özellikle nötrofil, eozinofil ve mononükleer hücrelerin artışı ile karakterize lökositoz şeklinde olmaktadır. Ayrıca nakliye stresi lenfopeniye neden olmaktadır. Hematolojik parametrelerdeki bu değişimler nakliye stresinin belirlenmesinde önemlidir (Fazio et al., 2012). Koyunlar üzerinde yapılan çalışmalarda da uzun süreli taşıma sonucunda lenfopeni ve nötrofil şekillendiği tespit edilmiştir (Fisher et al., 2010). Yapılan bir çalışmada nakliye sırasında özellikle T lenfositlerin sayısının azaldığını, B lenfositlerin sayısında ise belirgin bir değişiklik olmadığını bildirilmiştir (Murata et al., 1987). Diğer bir çalışmada da uzun süreli karayolu nakliyesi sonucunda koyunlarda, lenfopeni meydana geldiği ve T lenfositlerle pozitif korelasyon gösteren Adenozin Deaminaz Aktivitesinde azalma tespit edilmiştir (Yanar, 2020). Ayrıca karayolu ile nakliye edilen hayvanlarda eritrosit ve lökosit sayılarında da sırasıyla % 5.3 ve % 3.9 oranlarında artış olduğu, eozinofil ve lenfosit sayılarında sırasıyla % 300 ile % 6.1 oranındaki azalma ve nötrofil sayısındaki % 11.3 lük artıştan dolayı lökosit sayısı değiştiği saptanmıştır (Minka and Ayo, 2007). Koyunlar üzerinde yapılan diğer bir çalışmada, hematokrit değerinin ise nakliye öncesi en yüksek seviyede olduğu, ancak yüklemenin hemen sonrası hematokrit değerinin aniden düştüğü ve nakliyenin ilerleyen saatlerinde kademeli olarak düşüşün devam ettiğini belirtilmiştir (Broom et al., 1996). Yolculuğun farklı zamanlarında hematokrit değerlerinde dehidrasyonda dolayı artışlar olduğu Parker et al., (2007) tarafından bildirilirken, Knowles et al., (1999a) nakliye edilen bütün buzağılarda hematokrit değerinde düşüşler olduğunu rapor etmişlerdir. Tadich et al., (2005) de yaptıkları çalışmada hematokrit

değerdeki azalmanın nakliye edilen sığırların progressif bir alışma gösterdiklerinin işareti olarak değerlendirilebileceğini bildirmektedirler.

### Biyokimyasal belirteçler

Karayolu nakliye stresi adreno kortikal aktiviteyi artırmakta ve kandaki bu artış nakliye öncesinde bile hayvanların fizyolojik streslerinin bir indikatörü olarak değerlendirilmektedir. Yeni bir ortam, yükleme, motor gürültüsü, araç hareketleri vs. stres unsurları olarak ifade edilmektedir. Koyunlarda yapılan bir çalışmada, hayvanların bireysel kafeslerinden alınıp araca yüklenmesi ve daha sonra aracın hareket etmesi ile kortizol seviyesinin 3.5 kat arttığı bildirilmiştir (Werner and Gallo, 2008). Diğer bir çalışmada 31 saatlik nakliye sırasında yatan sığırların ayakta duranlara oranla daha yüksek plazma kortizol seviyesine sahip oldukları rapor edilmiştir (Knowles et al., 1999b). Japon keçilerinde de, plazma kortizol seviyesinin karayolu nakliyesi sonucunda 42 ng ml<sup>-1</sup> den 166 ng ml<sup>-1</sup> ye yükseldiği tespit edilmiştir (Nwe et al., 1996).

Özellikle sıcak günlerde nakliye sırasında ortaya çıkan stres faktörleri hayvanlarda homeostazın ve devamında metabolizmanın bozulmasına neden olmaktadır (Averos et al., 2008). Bunun sonucu olarak, kanda Aspartat aminotransferaz (AST), Alanin aminotransferaz (ALT), glutamik fosfataz, glikoz, kreatin-fosfat kinaz (CPK), kortizol, laktik asit, ürik asit ve serbest yağ asitleri artar (Parker et al., 2007). Hayvanların yakalanması, yüklenmesi ve nakliye sırasında gelişen stresin yol açtığı kas membran geçirgenliğindeki artışın bir sonucu olarak dokularda oluşan tahribat, kas dokusunun zayıf reperfüzyonu (yeniden kanlanması), azalan ısı yayılımı, hipoksi ve aşırı yorgunluğa neden olmaktadır (Guardia et al., 2009). Buzağılarda da yapılan bir çalışmada benzer sonuçlar elde edilmiş ve artan CPK seviyesinin nakliye sonrası 4. saatte yavaş yavaş düşmeye başladığı bildirilmiştir (Knowles et al., 1999b).

Stresli nakliye koşulları, uzun süreli açlık durumu ve kortizol konsantrasyonundaki artış, kaslardaki nükleik asit ve proteinlerin parçalanmalarını işaret eden plazma üre seviyesindeki artışa neden olmakta ve nakliye stresinin sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Parker et al., 2007). Sığırların kısa süreli karayoluyla taşınması sonucunda plazma üre seviyesi 1.5 mmol l<sup>-1</sup>'den 3.6 mmol l<sup>-1</sup>'e, 36 saatlik uzun yolculuk sonunda ise 4.3 mmol l<sup>-1</sup>'e çıktığı ve ancak 72 saat sonunda nakliye öncesi değerlere dönebildiği bildirilmiştir (Knowles et al., 1999b). Benzer şekilde buzağılar ve keçilerde de nakliye öncesi plazma üre seviyelerine nakliye sonrası 3 günlük dinlenme periyodunun sonunda ulaşılmıştır (Albright, 2000; Kannan et al., 2007).

Yaygın olarak kullanılan plazma glikoz seviyesi, nakliye stresinin fizyolojik indikatörlerinden birisidir (Averos et al., 2008). Stres süresince salgılanan kateşolaminler ve glukokortikoidlerin artışına bağlı olarak iskelet kaslarındaki glikojen depoları tüketilir ve karaciğerdeki glikojen parçalanarak plazma glikoz seviyesi yükselir (Tadich et al., 2005). Keçilerin 2.5 saatlik karayolu nakliyesi sonucu glikoz konsantrasyonunun yükseldiği ve nakliye sonrası 3 saat boyunca bu seviyeyi koruduğu, daha sonra düşmeye başladığı saptanmıştır (Kannan et al., 2000). Sığırların plazma glikoz seviyelerinin de 31 saatlik nakliye boyunca 4.5 mmol l<sup>-1</sup> den 5.5 mmol l<sup>-1</sup> e yükseldiği bildirilmiştir (Knowles et al., 1999b).

Albumin, total protein ve hemoglobin konsantrasyonları incelendiğinde bu parametrelerin aslında uzun süreli karayolu nakliyesinin bir sonucu olarak dehidrasyon gösteren hayvanlarda ortaya çıkan parametreler olduğu bildirilmektedir (Parker et al., 2003). Sığırlar üzerine yapılan bir çalışmada, ciddi seviyedeki dehidrasyonun bir sonucu olarak plazma total protein, albumin, hemoglobin konsantrasyonlarının arttığı ve nakliye sonrası padoklarda dinlenmeleri sonucunda söz konusu değerlerin normale döndüğü bildirilmiştir (Parker et al., 2007). Sığırların 31 saatlik karayolu nakliyesi sonucunda, yolculuğun süresinden bağımsız olarak plazma total protein seviyelerinin önemli derecede

79 g l<sup>-1</sup> den 86 g l<sup>-1</sup> ye yükseldiği, plazma albumin düzeyinde ise istatistiksel olarak önemli bir değişimin olmadığı tespit edilmiştir (Knowles et al., 1999b).

### İmmünolojik belirteçler

Nakliye sırasında oluşan strese bağlı olarak hayvanlarda enfeksiyon eşliğinin düşmesi veya enfeksiyon başlatmak için gereken patojen miktarının azalması, hayvanları enfeksiyonlara karşı daha duyarlı hale getirir. Bununla birlikte, patojenlerin iletimi alıcı hayvanda her zaman hastalığın tetiklendiği anlamına gelmemektedir. Hayvanların hastalığa duyarlılığı, vücut savunma sistemlerinin özellikle de bağışıklık sisteminin etkilendiği durumlarda artar. Zayıf refah koşulları, bu sistemlerin verimliliğini düşürür, enfeksiyonlara yatkınlık meydana gelebilir ve immunsupresyon oluşabilmektedir (Broom and Johnson, 2000). Nakliyeye maruz kalan hayvanlar, karıştırıldıkları diğer hayvanlar tarafından kontamine olmuş bir ortamdan gelen patojenlerle enfekte olabilirler. Hayvanların nakliyesinden hemen sonra oluşan bu enfeksiyonlar, hayvanların refahı hayvansal üretim maliyetleri ile ilgili olarak büyük önem taşımaktadır (Earley et al., 2012). Nakliye sonrası immunsupresyona bağlı olarak ruminantlarda bovine herpes virüs, buzağı ve koyunlarda pasteurellosis, koyunlarda ve atlarda salmonellosis gibi enfeksiyonlarda artışlar meydana gelmektedir (Brogden et al., 1998).

### Karayolu Nakliye Stresinin Sonuçları

Nakliye stresi çiftlik hayvanları ve diğer memeli hayvan türlerinin merkezi sinir sisteminin, HPA ve sempato adrenomedüller ekseninin aktivasyonuna yol açan fizyolojik tepkilere neden olmaktadır (Minton, 1994). HPA aktivasyonu sonucunda ACTH salınımı uyarılmakta ve böbreküstü bezi korteksinden ACTH'nin etkisiyle kortizol sekresyonunda artış meydana gelmektedir. HPA aktivasyonu sonucu artan kortizol; karaciğer dışında protein yapımında azalmaya, yıkımında artışa, lenfoid dokuda atrofiye neden olarak immunoglobulin miktarında azalmaya, kan basıncında artışa, eosinofil, lenfosit sayısında azalmaya, eritrosit sayısında ise artışa, glikojenolizde artışa, yağ depolarından yağ asitlerinin mobilize edilmesine, karaciğere aminoasitlerin girişini kolaylaştırmaya, lökosit diapedezini azaltarak inflamasyonun bloke edilmesine, oksidatif hasara, mental aktivitede artışlara ve gastrointestinal sistemde hipersekresyon ile hiperasiditeye neden olmaktadır. Ayrıca yüksek kortizol T lenfosit üretimini azaltarak lenfopeniye, dolayısıyla immunsupresyon şekillenmesine neden olmaktadır (Aktaş ve ark., 2011; McGregor et al., 2016).

Araştırmacılar son dönemlerde karayolu nakliye stresine maruz kalan ruminantlarda rumen florasındaki değişimlere yönelmiş bu kapsamda Li et al., (2019) yaptıkları bir çalışmada Simmental melezi, Yerli Sarı ve Yak sığırlarını karayolu ile taşıyarak hormon seviyeleri, mikrobiyal fermantasyon, mikrobiyal kompozisyon, immun sistem ve bu parametrelerin aralarındaki korelasyonları araştırmıştır. Araştırmanın sonucunda tüm gruplarda kortizol, ACTH ve proinflamatuvar sitokinlerde, yine tüm gruplarda uçucu yağ asitlerinde ve simmental melezi ile yak sığırlarında rumen polisakkaritlerinde artış tespit edilmiş ve karayolu taşıma stresine maruz kalan hayvanlarda HPA aktivasyonuna bağlı olarak rumen mikrobiyotasının hormon seviyesi ve immun sistemin etkilenebileceği bildirilmiştir (Li et al., 2019). Deng et al., (2017) karayolu nakliyesinin sığırlardaki rumen mikrobiyal değişimi üzerinde yaptıkları çalışmada, nakliye sonrası selülitik bakterilerin (*Fibrobacter succinogenes* ve *Ruminococcus flavefaciens*), *Ruminococcus amylophilus* ve *Prevotella albensis*'in 6. saatte arttığını ve nakliye sonrası 15. günde azaldığını bildirmiştir. Benzer şekilde *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Prevotella bryantii*, *Prevotella ruminicola* ve *Anaerovibrio lipolytica* sayılarının nakliye sonrası önemli bir düzeyde azaldığını, rumendeki asetik asit konsantrasyonu artarken, rumen pH'sı, propiyonik ve bütirik asit konsantrasyonlarının azaldığını bildirmiş, vücut ağırlıklarında ise nakliye sonrası 3 gün boyunca azalma, nakliye sonrası 15. gün artış olduğunu tespit etmişlerdir (Deng et al., 2017).



Uzun süreli nakliyeler aynı zamanda hayvanların et kalitesini de olumsuz etkilemektedir. Hayvanlarda kas aktivitesi için gerekli enerji, kas glikozundan (glikojen) elde edilir. Sağlıklı ve iyi dinlenmiş hayvanda kasın glikojen içeriği yüksektir. Hayvan kesildikten sonra, kastaki glikojen laktik aside dönüşür ve rigor mortis gelişir. Laktik asit kesim sonrası karkas pH'sının arzu edilen seviyeye düşmesi ve bunun sonucunda lezzetli, yumuşak, kaliteli ve arzu edilen renkte et üretimi için gereklidir. Kesim öncesinde ve sırasında hayvanlar strese girdiğinde kas glikojeni tükenmekte ve kesim sonrası ette gelişen laktik asit seviyesi azalmaktadır. Bu durum et kalitesini ciddi anlamda olumsuz yönde etkilemektedir (Chambers and Grandin, 2001). Azalan kas glikojen deposu aynı zamanda kuru, sert ve koyu et (DFD) problemine de yol açmaktadır. Ruminantlarda özellikle, sığırlarda nakliye sonucu DFD ürünlerde artışlar görülmektedir. Bu durum etin ezilmesi ve zedelenmesi yanında, nakliyeye bağlı ortaya çıkan önemli bir et kalitesi problemidir (Knowles, 1999).

## SONUÇ

Ruminantların karayolu ile nakliye sırasında oluşabilecek nakliye stresinin önemli kaynakları arasında yer alan nakliye süresi, araç dizaynı, hayvanın yaşı ve cinsiyet, yükleme ve boşaltma sırasındaki olumsuz uygulamalar, genetik yapı, hayvan başına ayrılan alan miktarı, sarsıntı ve havalandırma gibi faktörlerin etkileri dikkate alınarak söz konusu etkenlerin stres düzeyini minimum seviyeye indirecek önlemlerin alınması gereklidir. Ayrıca, hayvan refahının artırılması ve nakliye stresinin azaltılması için yükleme, taşıma ve boşaltma evrelerinde olumsuz yönde etkileyen tüm stres yapıcı faktörler bir bütün olarak ele alınmalıdır.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Aktaş MS, Ozkanlar S, Karakoç A, Akçay F, Ozkanlar Y, 2011. Efficacy of Vitamin E+ Selenium and Vitamin A+ D+ E Combinations on Oxidative Stress Induced by Long-Term Transportation in Holstein Dairy Cows. *Livestock Science*, 141: 76-79.
- Albright J, 2000. *Dairy Cattle Behaviour, Facilities, Handling and Husbandry*. CABI Publishing, pp. 127-150, Fort Collins-Colorado-USA.
- Altınçekiç ŞÖ, Koyuncu M, 2010. Nakil Koşullarının Hayvan Refahı Üzerine Etkileri. *Hayvansal Üretim*, 51: 48-56.
- Anonymous. 2005. Council Regulation 1/2005/EC on the Protection of Animals During Transport and Related Operations. ([https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/STUD/2018/621853/PRS\\_STU\(2018\)621853\\_EN.pdf](https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/STUD/2018/621853/PRS_STU(2018)621853_EN.pdf)), (Erişim tarihi: 27.11.2020).
- Anonymous. 2020. EU trade and transport of live animals. ([https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/ATAG/2020/646170/EPRS\\_ATA\(2020\)646170\\_EN.pdf](https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/ATAG/2020/646170/EPRS_ATA(2020)646170_EN.pdf)), (Erişim tarihi: 23.02.2021).
- Averos X, Martin S, Riu M, Serratosa J, Gosálvez LF, 2008. Stress Response of Extensively Reared Young Bulls Being Transported to Growing-Finishing Farms Under Spanish Summer Commercial Conditions. *Livestock Science*, 119: 174-182.
- Bobic T, Mijic P, Knezevic I, Speranda M, Antunovic B, Baban M, Sakac M, Frizon E, Koturic T, 2011. The Impact of Environmental Factors on the Milk Ejection and Stress of Dairy Cows. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 27: 919-927.
- Bozkurt Z, 2016. Çiftlik Düzeyinde Hayvan Refahı Değerlendirmesi İçin Bilimsel Yaklaşımlar. *Kocatepe Veterinary Journal*, 9: 236-246.

- Brogden KA, Lehmkuhl HD, Cutlip RC, 1998. *Pasteurella Haemolytica* Complicated Respiratory Infections in Sheep and Goats. *Veterinary Research*, 29: 233-254.
- Broom DM, Goode JA, Hall S, Lloyd DM, Parrott R, 1996. Hormonal and Physiological Effects of a 15 Hour Road Journey in Sheep: Comparison With the Responses to Loading, Handling and Penning in the Absence of Transport. *British Veterinary Journal*, 152: 593-604.
- Broom DM, Johnson KG, 2000. *Stress and Animal Welfare*. Springer Netherlands Publishers, p. 211, London-United Kingdom.
- Broom DM, 2003. Transport Stress in Cattle and Sheep with Details of Physiological, Ethological and Other Indicators. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 110: 83-88.
- Chambers F, Grandin T, 2001. *Guidelines for Humane Handling, Transport and Slaughter of Livestock*. RAP publication, pp. 3-4, Bangkok-Thailand.
- Deng L, He C, Zhou Y, Xu L, Xiong H, 2017. Ground Transport Stress Affects Bacteria in the Rumen of Beef Cattle: A Real-Time PCR Analysis. *Animal Science Journal*, 88: 790-797.
- Earley B, Murray M, Prendiville DJ, Pintado B, Borque C, Canali E, 2012. The Effect of Transport by Road and Sea on Physiology, Immunity and Behaviour of Beef Cattle. *Research in Veterinary Science*, 92: 531-541.
- Eniolorunda O, Fashina O, Aro O, 2009. Adaptive Physiological Response to Load Time Stress During Transportation of Cattle in Nigeria. *Archivos de Zootecnia*, 58: 223-230.
- Erzurum O, Yılmaz A, 2016. Sığır Nakillerinde Refah ve Davranış İlişkisi. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 9: 357-362.
- Fazio E, Ferlazzo A, 2003. Evaluation of Stress During Transport. *Veterinary Research Communications*, 27: 519-524.
- Fazio E, Medica P, Cravana C, Cavaleri S, Ferlazzo A, 2012. Effect of Temperament and Prolonged Transportation on Endocrine and Functional Variables in Young Beef Bulls. *Veterinary Record*, 171: 644-644.
- Fisher AD, Niemeyer DO, Lea JM, Lee C, Paull DR, Reed MT, Ferguson DM, 2010. The Effects of 12, 30, or 48 Hours of Road Transport on the Physiological and Behavioral Responses of Sheep. *Journal of Animal Science*, 88: 2144-2152.
- Guardia M, Estany J, Balasch S, Oliver MA, Gispert M, Diestre A, 2009. Risk Assessment of Skin Damage due to Pre-Slaughter Conditions and RYR1 Gene in Pigs. *Meat Science*, 81: 745-751.
- Hall SJ, Bradshaw RH, 1998. Welfare Aspects of the Transport by Road of Sheep and Pigs. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 1: 235-254.
- Hutchings D, Martin S, 1983. A Mail Survey of Factors Associated with Morbidity and Mortality in Feedlot Calves in Southwestern Ontario. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 47: 101.
- Kannan G, Terrill T, Kouakou B, Gazal O, Gelaye S, Amoah EA, Samake S, 2000. Transportation of Goats: Effects on Physiological Stress Responses and Live Weight Loss. *Journal of Animal Science*, 78: 1450-1457.
- Kannan G, Saker KE, Terrill TH, Kouakou B, Galipalli S, Gelaye S, 2007. Effect of Seaweed Extract Supplementation in Goats Exposed to Simulated Preslaughter Stress. *Small Ruminant Research*, 73: 221-227.
- Kara NK, Koyuncu M, 2011. Sığırlarda Taşıma Sırasında Hayvan Refahına Etki Eden Faktörler. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17: 511-516.
- Kettlewell P, Hoxey R, Mitchell M, 2000. Heat Produced by Broiler Chickens in a Commercial Transport Vehicle. *Journal of agricultural engineering research*, 75: 315-326.
- Knowles G, 1999. A Review of the Road Transport of Cattle. *Veterinary Record*, 144: 197-201.
- Knowles TG, Brown SN, Edwards JE, Phillips JE, Warriss PD, 1999a. Effect on Young Calves of a One-Hour Feeding Stop During a 19-Hour Road Journey. *Veterinary Record*, 144: 687-692.
- Knowles TG, Warriss PD, Brown SN, Edwards JE, 1999b. Effects on Cattle of Transportation by Road for up to 31 Hours. *Veterinary Record*, 145: 575-582.
- Krizanova O, Babula P, Pacak K, 2016. Stress, Catecholaminergic System and Cancer. *Stress*, 19: 419-428.

- Li F, Shah AM, Wang Z, Peng Q, Hu R, Zou H, Tan C, Zhang X, Liao Y, Wang Y, Wang X, Zeng L, Xue B, Wang L, 2019. Effects of Land Transport Stress on Variations in Ruminal Microbe Diversity and Immune Functions in Different Breeds of Cattle. *Animals (Basel)*, 9: 599.
- McGregor BA, Murphy KM, Albano DL, Ceballos RM, 2016. Stress, Cortisol, and B Lymphocytes: a Novel Approach to Understanding Academic Stress and Immune Function. *Stress*, 19: 185-191.
- Minka NS, Ayo J, 2007. Road Transportation Effect on Rectal Temperature, Respiration and Heart Rates of Ostrich (*Struthio Camelus*) Chicks. *The journal Veterinarski arhiv*, 77: 39-46.
- Minka N, Ayo J, 2009. Physiological Responses of Food Animals to Road Transportation Stress. *African Journal of Biotechnology*, 8: 7415-7427.
- Minton JE, 1994. Function of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and The Sympathetic Nervous System in Models of Acute Stress in Domestic Farm Animals. *Journal of Animal Science*, 72: 1891-1898.
- Murata H, Takahashi H, Matsumoto H, 1987. The Effects of Road Transportation on Peripheral Blood Lymphocyte Subpopulations, Lymphocyte Blastogenesis and Neutrophil Function in Calves. *British Veterinary Journal*, 143: 166-174.
- Nwe TM, Hori E, Manda M, Watanabe S, 1996. Significance of Catecholamines and Cortisol Levels in Blood During Transportation Stress in Goats. *Small Ruminant Research*, 20: 129-135.
- Parker AJ, Hamlin GP, Coleman CJ, Fitzpatrick LA, 2003. Quantitative Analysis of Acid-Base Balance in Bos Indicus Steers Subjected to Transportation of Long Duration. *Journal of Animal Science*, 81: 1434-1439.
- Parker A, Dobson G, Fitzpatrick L, 2007. Physiological and Metabolic Effects of Prophylactic Treatment with the Osmolytes Glycerol and Betaine on Bos Indicus Steers During Long Duration Transportation. *Journal of Animal Science*, 85: 2916-2923.
- Pehlivan E, Dellal G, 2014. Memeli Çiftlik Hayvanlarında Stres, Fizyoloji ve Üretim İlişkileri. *Hayvansal Üretim*, 55: 25-34.
- Simova V, Večerek V, Passantino A, Voslarova E, Pre-Transport Factors Affecting the Welfare of Cattle During Road Transport for Slaughter—A Review. *Acta Veterinaria Brno*, 85: 303-318, 2016.
- Squires E, 2010. Effects on Animal Behaviour, Health and Welfare. *Applied Animal Endocrinology*, 2: 235-272.
- Swanson J, Morrow-Tesch J, 2001. Cattle Transport: Historical, Research, and Future Perspectives. *Journal of Animal Science*, 79: E102-E109.
- Tadich N, Gallo C, Bustamante H, Schwerter M, Schaik GV, 2005. Effects of Transport and Lairage Time on Some Blood Constituents of Friesian-Cross Steers in Chile. *Livestock Production Science*, 93: 223-233.
- Trunkfield H, Broom D, 1991. The Effects of the Social Environment on Calf Responses to Handling and Transport. *Applied Animal Behaviour Science*, 30: 177.
- Tsigos C, Chrousos GP, 2002. Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis, Neuroendocrine Factors and Stress. *Journal of Psychosomatic Research*, 53: 865-871.
- Wade LC, 2002. *Chicago's Pride: The stockyards, packingtown, and environs in the nineteenth century*, University of Illinois Press, p. 47, Chicago-USA.
- Werner M, Gallo C, 2008. Effects of Transport, Lairage and Stunning on the Concentrations of Some Blood Constituents in Horses Destined for Slaughter. *Livestock Science*, 115: 94-98.
- Wickham SL, Collins T, Barnes AL, Miller DW, Beatty DT, Stockman C, Blache D, Wemelsfelder F, Fleming PA, 2012. Qualitative Behavioral Assessment of Transport-Naïve and Transport-Habituated Sheep. *Journal of Animal Science*, 90: 4523-4535.
- Yanar KE, 2020. Morkaraman Irkı Koyunlarda Uzun Süreli Transportta Oluşan Stresin Neden Olduğu Immun Supresyon Üzerine Parapoxvirus Ovis, *Corynebacterium Cutis* Lizatı ve C Vitamininin Etkisinin Araştırılması. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, (Basılmamış).
- Yıldız Ü, Saatçı M, 2009. An Evaluation of the Welfare in the Large and Small Animal Transportations Made From Sarıkamış. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15: 363-368.

**Atf İçin:** Ayaşan T, Sucu E, Ülger İ, İnci H, Hızlı H, İnan S, 2021. *In Vitro* Gaz Üretim Tekniği Kullanılarak Yer bademi (*Cyperus esculentus*) Çeşitlerinin Besin Değerinin Saptanması. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 1653-1663.

**To Cite:** Ayaşan T, Sucu E, Ülger İ, İnci H, Hızlı H, İnan S, 2021. Determination of Nutritional Values of Different Tiger nut (*Cyperus esculentes*) Types by Using *In Vitro* Gas Production Technique. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 1653-1663.

### ***In Vitro* Gaz Üretim Tekniği Kullanılarak Yer bademi (*Cyperus esculentus*) Çeşitlerinin Besin Değerinin Saptanması**

Tugay AYAŞAN<sup>1\*</sup>, Ekin SUCU<sup>2</sup>, İsmail ÜLGER<sup>3</sup>, Hakan İNCİ<sup>4</sup>, Hatice HIZLI<sup>5</sup>, Sevda İNAN<sup>6</sup>

**ÖZET:** Bu çalışmada, farklı yer bademi çeşitlerinin (Sarı şeker, İntrodüksiyon 1, Bal yumru) besin madde değerlerinin ve koçlarda sindirilebilirliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Farklı yer bademi çeşitlerinin ortalama gaz üretimi, 96 saatlik inkübasyondan sonra *in vitro* gaz üretim kinetiği ve *in vitro* inkübasyon süreleri belirlenmiştir. Yetiştirilen farklı yer bademi çeşitlerinin *in vitro* gaz üretim tekniği kullanılarak a, b, c, a + b'nin pearson korelasyon katsayıları ve pearson korelasyon katsayıları bulunmuştur. Çalışmada farklı yer bademi çeşitlerinin değişik zamanlardaki ortalama gaz üretimleri sadece 3. saatte önemli bulunmuş; 96 saatlik inkübasyondan sonraki *in vitro* gaz üretim kinetikleri, çeşitler arasında farklılık yaratmamış; *in vitro* inkübasyon zamanları ile pearson korelasyon katsayıları arasındaki ilişki önemli tespit edilmiştir. Yer bademi çeşitlerinin ortalama ham proteini (HP) %4.39; kuru maddesi (KM) %94.08; ham yağı (HY) %24.85; ham külü (HK) %2.53; asit deterjanda çözünmeyen lif (ADF) %15.04, nötr deterjanda çözünmeyen lif (NDF) %24.03; lif olmayan karbonhidrat (LOK) %44.20 olarak bulunmuştur. Yer bademi çeşitlerinin ortalama toplam sindirilebilir besin maddesi %72.78; metabolik enerjisi 2.63 Mcal/kg KM, sindirilebilir enerjisi 3.21 Mcal/kg KM ve de net enerji laktasyon değeri 1.66 Mcal/kg KM olarak tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Besin madde, çeşit, *in vitro* gaz üretimi, koç, sindirilebilirlik, yer bademi

### **Determination of Nutritional Values of Different Tiger nut (*Cyperus esculentus*) Types by Using *In Vitro* Gas Production Technique**

**ABSTRACT:** In this study, it was aimed to determine the nutritive values and digestibility (in ram) of different tiger nut varieties (Sarı şeker, İntrodüksiyon 1, Bal yumru). The average gas production at different times of tiger nut varieties, the *in vitro* gas production kinetics after 96 hours of incubation and the *in vitro* incubation times were determined. Pearson correlation coefficients and pearson correlation coefficients of a, b, c, a + b of different tiger nut varieties by using *in vitro* gas production technique were found. The tiger nut varieties used in the study are Sarı şeker, İntrodüksiyon 1 and Bal yumru. In the study, average gas production of tiger nut varieties at different times was found important only at 3<sup>rd</sup> hour; *in vitro* gas production kinetics after 96 hours of incubation did not differ between cultivars; the relationship between *in vitro* incubation times and pearson correlation coefficients was determined significantly. The average crude protein, dry matter, ether extract, crude ash, neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and non-fiber carbohydrates (NFC) of the tiger nut varieties were found 4.39; 94.08; 24.85; 2.53; 24.03; 15.04; 44.20%. In this study, average total digestibility nutrients, digestible energy, metabolizable energy and net energy lactation of tiger nut varieties were found as 72.78%, 3.21 Mcal/kg DM, 2.63 Mcal/kg DM and 1.66 Mcal/kg DM.

**Keywords:** Nutrient composition, variety, *in vitro* gas production, ram, digestibility, tiger nut

<sup>1</sup> Tugay AYAŞAN ([Orcid ID: 0000-0001-7397-6483](https://orcid.org/0000-0001-7397-6483)), Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Kadırlı Uygulamalı Bilimler Yüksekokulu, Osmaniye, Türkiye.

<sup>2</sup> Ekin SUCU ([Orcid ID: 0000-0003-1470-2751](https://orcid.org/0000-0003-1470-2751)), Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fak. Zootekni Bölümü, Bursa, Türkiye

<sup>3</sup> İsmail ÜLGER ([Orcid ID: 0000-0002-9400-6459](https://orcid.org/0000-0002-9400-6459)) Erciyes Üniversitesi Seyrani Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü, Kayseri, Türkiye

<sup>4</sup> Hakan İNCİ ([Orcid ID: 0000-0002-9791-0435](https://orcid.org/0000-0002-9791-0435)), Bingöl Üniversitesi Ziraat Fak. Zootekni Bölümü, Bingöl, Türkiye

<sup>5</sup> Hatice HIZLI ([Orcid ID: 0000-0002-5451-1397](https://orcid.org/0000-0002-5451-1397)), Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Adana, Türkiye

<sup>6</sup> Sevda İNAN ([Orcid ID: 0000-0001-8138-5851](https://orcid.org/0000-0001-8138-5851)), Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Tekirdağ, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Tugay AYAŞAN, e-mail: tayasan@gmail.com

## GİRİŞ

Yer bademi (*Cyperus esculentus* L.) tropikal ve ılıman bölgelerde yetişen ve aynı zamanda doğada da bulunan bir bitki olup; çufa, habbüllezi, sarı topalak gibi isimlerle de ifade edilmektedir (Sidohoune ve ark., 2014; Bilgili ve ark., 2018; Anonim, 2019a; Anonim, 2019b; Yılmaz, 2019). Yer bademinin toprak altı yumrusuna çufa ismi verilmektedir. Yer bademinin tüketilme şekilleri taze olarak, suda ıslatılarak, kavurma ya da kurutma şeklindedir.

Ülkemizde Adana'da Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde çok az miktarda ekimi yapılan yer bademinin, İspanya'da yumruları insan gıdası olarak tüketilirken; ilaç, parfümeri sektöründe, balık yemi, hindi ve piliç yemi yapımında kullanıldığına dair bilgiler de bulunmaktadır (Nazlıcan, 2007).

Emurotu (2017), yer bademindeki KM içeriğinin çeşitlere göre farklılık arz ettiğini, sarı yer bademinde %88 olan KM içeriğinin, kahverengi çeşitte %89.98 olduğunu ifade ederken; İnce ve ark., (2017), yer bademinin besin madde kompozisyonu ile ilgili çalışmaların bulunduğunu, fakat fiziksel özellikleri hakkında yapılan çalışmaların az olduğunu bildirmiştir. Bu konuda yapılan bir başka çalışmada farklı işleme yöntemlerinin yer bademinin besin madde içeriği üzerine etkisi araştırılmıştır (Aduwamai ve ark., 2018). Araştırmacılar işlem görmemiş yer bademi ile ıslatılmış yer bademinin benzer şekilde KM (%90.63), HP (%17.33) ve HY içerdiğini (%10.17); buna karşılık kül içeriğinin işlem görmemiş yer bademinde daha fazla olduğu (%7.17'ye %7.12); karbonhidrat içeriğinin ise ıslatılmış yer bademinde daha fazla bulunduğu tespit edilmiştir. Kurutulmuş yer bademinde KM %93.67; HP %13.73, yağ %8.00, kül %5.47 olarak bulunmuştur. Madaki ve ark., (2018), işlem görmüş ve görmemiş yer bademini karşılaştırdıkları çalışmalarında, %7.24-8.39 HP, %25.53-28.61 HY, %22.34-24.94 HS ve %90.33-92.14 KM tespit edildiğini, işlem görmemiş yer bademinin daha fazla HP, HY, HS içerdiğini bildirmiştir. Suleiman ve ark., (2018)'da, yer bademinin yapısında %42.4 nem, %17.82 karbonhidrat, %13.1 HS, %17 HY, %8.51 HP olduğunu ifade etmiştir.

Yemlerde besinsel özellikler bakımından farklılıkların belirlenmesinde, yemlerin kimyasal kompozisyonu, metabolik enerji ve sindirilebilir besin maddelerinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır (Ülger ve Kaplan, 2016; Ayaşan ve ark., 2018). Yemlerin enerji ve sindirilebilir besin maddelerinin belirlenmesinde genellikle *in vivo* yöntemler kullanılmasına rağmen bu yöntemlerin zaman alıcı ve pahalı olmasından dolayı son zamanlarda *in vitro* gaz üretim tekniği ve kimyasal kompozisyonu ile yemlerin potansiyel besleme değerleri ortaya konulmaya çalışılmaktadır (Kamalak ve ark., 2011; Kara, 2020).

Son yıllarda bir çok araştırmacı alternatif yem kaynakları hakkında araştırmalar yapmaktadır (Kaya ve ark., 2016; Turan ve Soyca Öneç, 2018; He ve ark., 2019; Eseceli ve ark., 2020; Gutierrez ve Boyd, 2020; Ortiz ve Roa Vega, 2020; Türel ve Buğdaycı, 2020; Ülger ve ark., 2020a; Ülger ve ark., 2020b).

Ayaşan ve ark. (2020), yer bademinin enerjice yoğun bir yem olduğunu, bununla birlikte, rasyonda yüksek seviyede bulunan yağlarının rumendeki mikroplar için toksik olabileceğini ve lif sindirilebilirliğini etkileyebileceğini ifade ederken; yer bademi ile beslenen geviş getiren hayvanlar için rasyonların formüle edilmesinde yer bademinin yağ içeriğinin dikkate alınması gerektiğini bildirmişlerdir.

Yapılan literatür çalışmalarında yer bademine ait *in vitro* sindirilebilirlik çalışmalarının çok az olduğu görülmüştür. Bu nedenle, yapılan bu çalışma ile 3 farklı yer bademi çeşidinin besin değerinin *in vitro* gaz üretim tekniği ile saptanması amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Hayvan ve Yem Materyali

Bu çalışmada Adana Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Doğan kent lokasyonunda yetiştirilen yer bademi çeşitleri kullanılmıştır. Araştırma enstitüsü, 36°49'00" Kuzey (K) enlemi ve 35°16'00" Doğu (D) boylamı koordinatlarında yer almaktadır. Yer bademinin ekimi Nisan 2018'de

yapılmış olup; yetiştirme süresi 5-6 ay sürmüştür. Tüm örnekleri temsil edecek şekilde yer bademinden her bir çeşit bazında 3 tekerrür alınarak analizler için hazırlanmıştır.

Çalışmada, çeşitli yer bademlerinin *in vitro* gaz üretim tekniği ile besin madde içeriklerini belirlemek amacıyla yaklaşık 70 kg canlı ağırlığa sahip iki baş Kıvrıcık ırkı koç kullanılmıştır.

Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde barındırılan deneme hayvanları araştırmaya başlamadan bir hafta önce seçilmiş olup; hayvanlar bundan sonra işletmede hazırlanmış olan kırık buğday, ayçiçeği tohumu küspesi ile vitamin-mineral karması ve mermer tozundan oluşan yoğun yem karmasıyla birlikte, mısır silajıyla beslenmişlerdir. Her bir hayvanın tüketeceği günlük yem miktarı iki eşit parçaya ayrılarak, sabah ve akşam olmak üzere iki öğünde verilmiştir. Hayvanlar bireysel olarak barındırılmış ve önlerinde sürekli temiz içme suyu bulundurulmuştur. Hayvanlara yapısında %18 ham protein ve 2750 kcal/kg metabolik enerji içeren yem verilmiştir. Rumen sıvısı, özafagustan rumene indirilen yumuşak bir hortum ve pompa yardımıyla vakum yaptırılarak alınmıştır. Daha sonra rumen sıvısı bir termos içerisinde (39 °C'ye ayarlı) laboratuvara getirilip, sıcaklığını kaybetmeden 2 kat tülbent bezinden süzülmüştür.

### Yem Analizleri

Araştırmada yem analizleri Erciyes Üniversitesi Seyrani Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü yem laboratuvarında yapılmıştır. Söz konusu kuru yem örnekleri 1 mm elek çapına sahip değirmende öğütülmüş; KM içeriği için öğütülmüş örnekler 24 saat süreyle 70 °C sıcaklıktaki etüvde bekletilerek, etüvden sonraki örnek ağırlığı ile ilk ağırlık arasındaki fark bulunup, yüzde olarak hesaplanması ile analiz sonucu tespit edilmiştir. Ham kül içeriği için örnekler 550°C'de 4 saat kül fırınında yakılmıştır. Ham protein içeriği hesaplanırken; Kjeldahl metodundan yararlanılırken (AOAC, 1990); HY analizi AOAC (1990) tarafından bildirilen yönteme göre SER148 Soxhlet (Velp Scientifica, Milano, İtalya) cihazı ile yapılmıştır. Nötr deterjanda çözünmeyen lif (NDF), asit deterjan solüsyonunda çözünmeyen lif (ADF) ve asitte çözünmeyen lignin (ADL) içerikleri Van Soest ve ark. (1991) tarafından bildirilen yönteme göre ANKOM 200 fiber analizör (ANKOM Teknoloji, NY, ABD) ile saptanmıştır. Hemiselüloz (HES) değerlerinin hesaplanmasında bir eşitlikten (%Hemiselüloz=%NDF-%ADF) yararlanılmıştır (Van Soest ve Wine, 1967). Lifsiz karbonhidrat (LOK) içeriği ise bir başka eşitlik ile hesaplanmıştır (Weiss ve ark. 1992). Toplam sindirilebilir besin maddesi (TSBM), SE, ME ve NEL değerleri aşağıda gösterilen eşitlikler ile hesaplanmıştır (MAFF, 1984):

$$\text{TSBM (\%)} = 27.66 \times \text{ME (Mcal/kg KM)}$$

$$\text{SE (Mcal/kg KM)} = 0.04409 \times \text{TSBM (\%)}$$

$$\text{ME (Mcal/kg KM)} = [3227 - \{35.85 \times \text{ADF (\%)} + 33.46 \times \text{HP (\%)} - 35.85 \times \text{HK (\%)}\} / 1000]$$

$$\text{NEL (Mcal/kg KM)} = \{0.0245 \times \text{TSBM (\%)}\} - 0.12$$

(TSBM: toplam sindirilebilir besin maddesi, ME: metabolize olabilir enerji, SE: sindirilebilir enerji, KM: kuru madde, ADF: asit deterjan çözültisinde çözünmeyen lif, HP: ham protein, HK: ham kül, NEL: net enerji laktasyon)

### *In vitro* Gaz Üretim Tekniği

Yer bademlerinin, *in vitro* koşullarda gaz üretim parametreleri Menke ve Steingass (1988) tarafından tanımlanan “Gaz Üretim Tekniği” kullanılarak Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü laboratuvarında belirlenmiştir. Yöntemde yemlerin gaz üretimini saptayabilmek için 100 mL hacimli özel cam şırıngalar (Model Fortuna, Häberle Labortechnik, Lonsee-Ettlenschief, Germany) kullanılmıştır. Yöntemin uygulanması sırasında cam şırıngalara üç paralel olarak, yaklaşık 200 mg yem örneği tartılıp, gaz oluşumunu sağlamak için şırıngaların içerisine 40 ml rumen sıvısı, makro element, iz element, tampon, rezazurin ve redüksiyon çözültileri karışımı eklenmiştir.

Araştırmada kullanılan rumen sıvısı karışımı; 620 ml saf su + 310 ml makro element çözeltisi + 0.16 ml iz element çözeltisi + 310 ml tampon çözelti + 1.6 ml resazurin ve redüksiyon çözeltilerinden oluşmuştur. Bu işlemten sonra tüpler 39°C' deki su banyosunda tutulmuş ve şırıngalarda oluşan gaz hacmi 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlik inkübasyon süreleri sonunda kaydedilmiş ve elde edilen veriler Ørskov ve McDonald (1979) tarafından geliştirilen  $P=a+b(1-e^{-ct})$  eksponansiyel denkleminde uyarlanmış olan  $GP=a+b(1-e^{-ct})$  eksponansiyel denklem kullanılarak Neway bilgisayar programında (Chen 1994) hesaplanmıştır. Bu denklemde;

GP: Süreye (t) bağlı olarak substrattan elde edilen gaz üretimini (mL)

a: Kolay parçalanana kısım (mL)

b: Zor parçalanana kısım (mL)

a+b: Toplam (potansiyel) gaz üretimini (mL)

c: Gaz üretim hız sabitini (saat-1 veya %)

t: Gaz üretim süresini (saat), göstermektedir.

### İstatistiksel Analizler

Araştırmadan elde edilen verilerin istatistikî olarak değerlendirilmesinde SPSS (1999) istatistikî paket programı kullanılarak varyans analizi (General Linear Model) yapılmış ortaya çıkan farklılıkların önem seviyelerinin tespitinde Duncan çoklu karşılaştırma testinden faydalanılmıştır. Araştırma sonucunda elde edilen veriler (SPSS, 1999) istatistikî paket programında GLM prosedürü kullanılarak yerbademi genotiplerinin 3., 6., 12., 24., 48., 72. ve 96. Saatlerde sindirilebilirlikleri ile a, b, c ve a+b özelliklerinin varyans analizleri yapılmıştır. Yapılan varyans analizi sonucu istatistikî bakımdan önemli bulunan özelliklerin ortalamaları Tukey (%5) çoklu karşılaştırma testi uygulanarak ele alınan özelliklerin grupları belirlenmiştir. Yer bademinin rumen sıvısında 3., 6., 12., 24., 48., 72. ve 96. saatlerde sindirilebilirlikleri ile a, b, c ve a+b özelliklerinin korelasyon testleri yapılarak istatistikî olarak ilişkilerin önemi ve derecesi tespit edilmiştir.

### BULGULAR VE TARTIŞMA

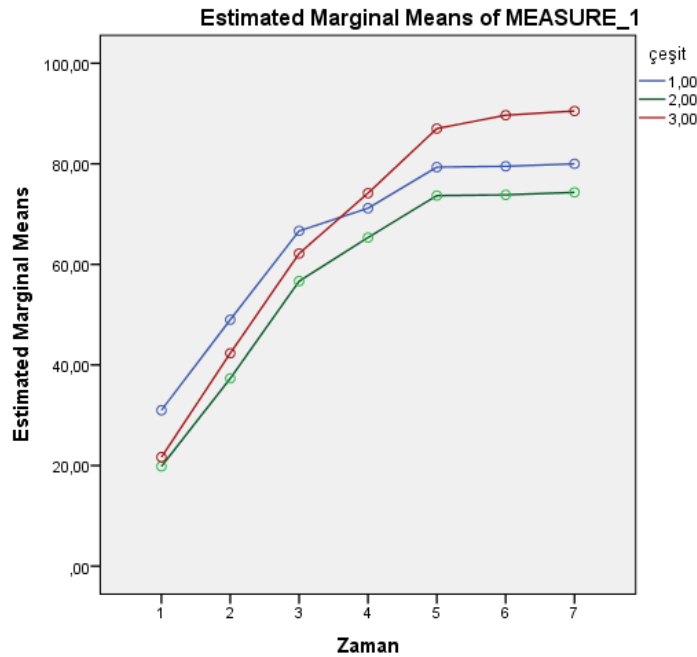
Yer bademi çeşitlerine ait besin madde analiz sonuçları Çizelge 1'de verilmiştir. Farklı yer bademi çeşitlerine ait değişik zamanlardaki ortalama gaz üretimleri Çizelge 2'de; 96 saatlik inkübasyonundan sonraki *in vitro* gaz üretim kinetikleri Çizelge 3'de; *in vitro* inkübasyon zamanları ile pearson korelasyon katsayıları Çizelge 4'te; a, b, c, a+b'nin pearson korelasyon katsayıları Çizelge 5'te; farklı yer bademi çeşitlerinin gaz üretimine etkisi Şekil 1'de gösterilmiştir.

Denemede kullanılan 3 farklı yer bademi çeşitinin KM içerikleri arasında istatistikî bir farklılık görülmektedir. Kuru madde içeriklerinin çeşit bazında sıralanışı Sarı şeker (%94.62), İntrodüksiyon 1 (%93.86) ve Bal yumru (%93.75) şeklindedir. Literatür çalışmalarında işleme tekniğinin yer bademinin KM'si üzerine etkisinin olduğuna dair çalışmalara rastlanılmıştır. Bu çalışmalardan birisinde yer bademinin KM içeriğinin, yüksek KM içeriğinden düşüğe doğru; kurutulmuş yer bademi (%93.67), işlem görmemiş yer bademi (%90.63) ve ıslatılmış yer bademi (%90.63) şeklinde sıralandığı ifade edilmiştir (Aduwamai ve ark., 2018). Madaki ve ark., (2018) ise KM içeriğinin, işlem görmüş yer bademi (%92.11), işlem görmemiş yer bademi (%90.33) şeklinde sıralandığını bildirmiştir. Yine Monago ve Uwakwe (2009), KM içeriğini %90.26; Chinma ve ark., (2011), %89.80 olarak bulmuştur. Yer bademinin KM içeriği bölge ve ülkelere göre değişiklik gösterir. Bu konudaki bir çalışmada İspanyadaki çeşitlerde KM içeriği %91.3-92.9 bulunurken; diğer çeşitlerde %93.1-93.4 arasında bulunmuştur (Thomas, 2014). Imo ve ark., (2019) ise KM değerini %95.70 olarak tespit etmiştir.

Çizelge 1. Yer bademi çeşitlerine ait besin madde analiz sonuçları

| Özellikler      | Sarı şeker | İntrodüksiyon 1 | Bal yumru | OSH   | P      |
|-----------------|------------|-----------------|-----------|-------|--------|
| KM, %           | 94.62a     | 93.86b          | 93.75b    | 0.172 | <0.001 |
| HP, % KM        | 4.45a      | 4.41a           | 4.32a     | 0.127 | 0.942  |
| HY, % KM        | 28.43a     | 25.84b          | 20.28c    | 1.523 | <0.001 |
| HK, %KM         | 2.65a      | 2.52b           | 2.42c     | 0.044 | 0.005  |
| NDF, % KM       | 23.86b     | 21.72c          | 26.51a    | 0.882 | 0.001  |
| ADF, %KM        | 14.91a     | 14.01a          | 16.21a    | 0.484 | 0.168  |
| ADL, %KM        | 5.64a      | 5.77a           | 5.74a     | 0.140 | 0.960  |
| LOK, %KM        | 40.61b     | 45.51a          | 46.47a    | 1.152 | 0.001  |
| HES, %KM        | 8.94a      | 7.71a           | 10.30a    | 0.537 | 0.103  |
| HS, %KM         | 9.26a      | 8.24a           | 10.47a    | 0.516 | 0.229  |
| ME, Mcal/kg KM  | 2.64a      | 2.67a           | 2.59a     | 0.017 | 0.123  |
| NEL, Mcal/kg KM | 1.67a      | 1.69a           | 1.63a     | 0.011 | 0.123  |
| SE, Mcal/kg KM  | 3.22a      | 3.25a           | 3.16a     | 0.020 | 0.123  |
| TSBM, %KM       | 72.98a     | 73.78a          | 71.59a    | 0.468 | 0.077  |

KM: Kuru madde; HK: Ham kül; HP: Ham protein; HY: Ham yağ; NDF: Nötr deterjan çözeltisinde çözünmeyen lif; ADF: Asit deterjan çözeltisinde çözünmeyen lif; ADL: Asit deterjan lignin; HS: Ham selüloz; HES: Hemiselüloz; LOK: Lifsiz karbonhidrat; TSBM: Toplam sindirilebilir besin maddesi; SE: Sindirilebilir enerji; ME: Metabolize olabilir enerji; NEL: Net enerji laktasyon; OSH: Ortalamalara ait standart hata; P: Olasılık değeri; <sup>a-d</sup>: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemlidir (P<0.05).



Şekil 1. Farklı yer bademi çeşitlerinin gaz üretimine etkisi

Yer bademi çeşitlerinin HP oranları, çalışmamızda çeşit bazında istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur (P>0.05). HP oranlarının sıralanışı Sarı şeker (%4.45), İntrodüksiyon 1 (%4.41), Bal yumru (%4.32) şeklinde olmuştur. Yapılan bir çalışmada HP ortalaması 7.94 olarak bulunurken (Monago ve Uwakwe, 2009); Ozcan ve ark., (2010) %8.11; Chinma ve ark., (2011), %10.1; Gambo ve Da'u (2014)'da, %7.15-9.70 aralığında tespit etmiştir. Maduka ve Ire (2018), yer bademi çeşitlerinin HP



değerlerini ıslak veya kuru olmasına bağlı olarak %3.65-4.82; 3.94-7.94 olarak saptamışlardır. Yapılan çalışmalar incelendiğinde HP içeriklerinde farklılıklar görülmüştür. Bunun sebebi işleme teknikleri, hasat zamanının farklı olması, kullanılan çeşit veya hatların farklı olması, analiz metotlarının farklı olması ile bölgelerin değişik olması sayılabilir.

Çalışmamızda yer bademinin HY oranları çeşitlerde istatistiki bir farklılık yaratmıştır ( $P<0.05$ ). Ham yağ oranı, işleme teknolojisine, çeşit, kurutmaya göre farklılık arz etmekle beraber, HY düzeyini Monago ve Uwakwe (2009), %19.67-27.54; Chinma ve ark., (2011), %13.2; Bado ve ark., (2015) %24.91-28.94; Achoribo ve Ong (2017), %30; Emurotu (2017), %22.4; Zommara ve Imaizumi (2017), %25; Madaki ve ark., (2018), %25.53-%28.61; Maduka ve Ire (2018)'de %24.49 olarak saptamışlardır. Maduka ve Ire (2018), ayrıca yer bademi çeşitlerinin HY değerlerini ıslak veya kuru olmasına bağlı olarak %11.50-14.10; 19.67-27.54 arasında tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda HK değeri Sarı şeker çeşidinde %2.65; İntrodüksiyon 1 çeşidinde %2.52, Bal yumru çeşidinde de %2.42 olarak tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ). Karababa ve ark., (2004), yer bademindeki HK içeriğinin %1.90-6.70 arasında değişim gösterdiğini ifade etmiştir. Yapılan bir çalışmada yer bademinin HK içeriğinin %3.1 olduğu tespit edilmiştir (Chinma ve ark., 2011). Maduka ve Ire (2018), yer bademi çeşitlerinin HK değerlerini ıslak veya kuru olmasına bağlı olarak %1.75-1.80; %1.79-2.68 olarak saptamışlardır. Imo ve ark., (2019) ise HK değerini %1.90 olarak tespit etmiştir.

Yer bademine ait ADF ve ADL içerikleri, çeşitler bazında istatistiki olarak önemli bulunmazken; NDF içerikleri önemli bulunmuştur ( $P<0.05$ ). ADF oranı %14.01-16.21; ADL oranı da %5.64-5.77 arasında bulunurken; NDF oranı çeşitlerde %21.72-26.51 arasında tespit edilmiştir. NDF oranlarının sıralanışı Bal yumru (%26.51), Sarı şeker (%23.86), İntrodüksiyon 1 (%21.72) şeklinde olmuştur.

Çalışmamızda HS, Bal yumru çeşidinde %10.47 ile en yüksek değeri alırken; İntrodüksiyon 1 çeşidinde %8.24 ile en düşük değeri almış, Sarı şeker çeşidi de %9.26 değerini alırken; ortalama HS oranı da %9.32 olarak bulunmuştur ( $P>0.05$ ). Bu konuda yapılan çalışmalarda HS oranının bölgelere, ülkelere göre farklı değerler aldığı ifade edilmiş, ülkemizdeki çeşitlerde %8.7 olan HS oranının, İspanyadaki çeşitlerde %9.8-11.0 arasında olduğu gözlemlenmiştir (Thomas, 2014). Karababa ve ark., (2004), yer bademindeki HS içeriklerinin geniş bir dağılım izlediğini bildirerek, HS oranının %4.8-13.0 arasında değişim gösterdiğini ifade etmiştir. Monago ve Uwakwe (2009), HS düzeyini %15.60-21.36 olarak bulurken; Chinma ve ark., (2011), HS düzeyini, denemede elde ettiğimiz değerden düşük bulmuştur (%4.3). Bunun nedeni kullanılan çeşitler ile yetiştirme yerlerinin, bölgelerin ve analiz metotlarının farklı olmasıdır. Zommara ve Imaizumi (2017), HS düzeyini %8; Bobreneva ve Baioumy (2018), %15.37; Madaki ve ark., (2018), %22.34-24.94; Maduka ve Ire (2018)'de %8.91 olarak tespit etmiştir. Ayrıca Maduka ve Ire (2018), yer bademi çeşitlerinin HS değerlerini ıslak veya kuru olmasına bağlı olarak %15.27-18.0; %15.60-21.36 olarak saptamışlardır. Imo ve ark., (2019) ise HS değerini %10.12 olarak tespit etmişlerdir.

Hemiselüloz değerleri (HES), denememizde %7.71-10.30 arasında değişim göstermiştir. HES oranlarının sıralanışı Bal yumru (%10.30), Sarı şeker (%8.94) ve İntrodüksiyon 1 (%7.71) şeklinde olmuştur. Lifsiz karbonhidrat (LOK) içeriği, çeşitler arasında bir farklılık yaratmış ( $P<0.05$ ); Bal yumru çeşidi %46.47 ile en yüksek LOK'a sahip iken; İntrodüksiyon 1 çeşidi %45.51; Sarı şeker çeşidi de %40.61 değerini almışlardır. Ortalama LOK içeriği de %44.20 olarak saptanmıştır.

Yer bademi çeşitlerine ait TSBM, SE, ME ve NEL değerleri istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Çeşitlere ait TSBM, SE, ME ve NEL değerleri ortalama %72.78, 3.21 Mcal/kg, 2.63 Mcal/kg ve 1.66 Mcal/kg bulunmuştur. TSBM, en fazla İntrodüksiyon 1 çeşidinde, en az da Bal yumru çeşidinde tespit edilmiştir. Maduka ve Ire (2018), yer bademi çeşitlerinin enerji değerlerini ıslak veya kuru olmasına bağlı olarak 183.50-213.90; 317.61-326.02 olarak saptamışlardır. Sindirilebilir enerji

değeri ile ME değeri, en fazla İntrodüksiyon 1 çeşidinde görülmüştür. NEL değeri de 1.69 Mcal/kg ile İntrodüksiyon 1 çeşidinde en yüksek bulunurken, 1.63 Mcal/kg ile Balmumu çeşidinde en düşük saptanmıştır.

Çalışmada kullandığımız yer bademi çeşitlerine ait farklı zamanlardaki ortalama gaz üretimleri Çizelge 2’de gösterilmiştir. Çeşitlerin ortalama gaz üretimleri sadece 3.saatte bir farklılık yaratırken; diğer farklı zamanlarda istatistiki bir farklılık oluşmamıştır. 3.saatteki gaz üretimi İntrodüksiyon 1, Bal yumru, Sarı şeker şeklindedir. Toplam gaz üretimine bakıldığında Bal yumru çeşidinde 88.51 ml/200 mg bulunan ortalama gaz üretimi, İntrodüksiyon 1 çeşidinde 74.84; Sarı şeker çeşidinde de 69.34 ml/200 mg olarak saptanmıştır.

Ayaşan ve ark., (2020), en yüksek gaz üretimini 96.saatte 56.44 ml/200 mg ile İntrodüksiyon 1 çeşidinden elde ederken; Bal yumru çeşidinde bu değer 39.10 ml/200 mg; Sarı şeker çeşidinde de 36.60 ml/200 mg olarak tespit edilmiştir.

**Çizelge 2.** Farklı yer bademi çeşitlerinin değişik zamanlardaki ortalama gaz üretimleri

| Çeşitler        | 3.saat   | 6.Saat | 12.Saat | 24.Saat | 48.Saat | 72.Saat | 96.Saat |
|-----------------|----------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
| İntrodüksiyon 1 | 31.00 a* | 49.00  | 66.67   | 71.17   | 79.34   | 79.50   | 80.00   |
| Sarı şeker      | 19.83b   | 37.34  | 56.67   | 65.34   | 73.67   | 73.83   | 74.33   |
| Bal yumru       | 21.67b   | 42.34  | 62.17   | 74.17   | 87.01   | 89.68   | 90.50   |
| OSH             | 2.02     | 2.38   | 2.78    | 3.70    | 4.62    | 4.71    | 4.75    |
| P               | .020     | .123   | .387    | .674    | .562    | .435    | .423    |

\*P<0.05, OSH: Ortalamalara ait standart hata

Yer bademi çeşitlerinin 96 saatlik inkübasyondan sonraki *in vitro* gaz üretim kinetikleri Çizelge 3’de verilmiştir. Burada yemin yapay rumene konulduğu ilk anda oluşan gaz hacmi (a), süreye bağlı olarak oluşan gaz hacmi (b) ve toplam (potansiyel) gaz üretimi (a+b) bakımından çeşitler arasında bir farklılık görülmemiştir.

**Çizelge 3.** Yer bademi çeşitlerinin 96 saatlik inkübasyonundan sonraki *in vitro* gaz üretim kinetikleri

| Çeşitler        | a     | b     | c    | a + b |
|-----------------|-------|-------|------|-------|
| İntrodüksiyon 1 | 5.57  | 73.13 | 0.15 | 78.70 |
| Sarı şeker      | -2.41 | 75.69 | 0.12 | 73.28 |
| Bal yumru       | 3.81  | 85.02 | 0.09 | 88.83 |
| OSH             | 2.15  | 10.43 | 0.01 | 4.76  |
| P*              | .317  | .492  | .245 | .458  |

\*P>0.05, OSH: Ortalamalara ait standart hata

Bu konuda yapılan az sayıdaki bir çalışmada, yer bademi çeşitlerinin 96 saatlik inkübasyonundan sonraki *in vitro* gaz üretim kinetikleri araştırılmış, toplam (potansiyel) gaz üretimi (a+b) bakımından çeşitler arasında bir farklılık görülmüştür (Ayaşan ve ark., 2020). Bu çalışma ile denemede elde edilen çalışma arasındaki farklılığın, kullanılan hayvanların farklı (inek ve koç) olması olduğu düşünülmektedir.

Yer bademinin rumen sıvısında *in vitro* inkübasyon zamanı ile pearson korelasyon katsayıları pozitif yönde değerler almıştır (Çizelge 4). Korelasyon katsayısının pozitif çıkması, iki değişkenin aynı yönde bir ilişkide olduğunu ifade ederken, negatif (-) çıkması iki değişkenin arasında ters yönde bir ilişki olduğunu göstermektedir. 2 değişken arasındaki ilişkinin derecesini saptamada ölçüt olan korelasyon

katsayısı, çalışmada 3.saat ile 6.saat arasında 0.01 düzeyinde pozitif bir ilişki içerisinde bulunurken; 3.saat ile 12.saat arasında 0.05 düzeyindeki korelasyon önemli bulunmuştur. Pearson korelasyon katsayısı, iki değişkenin de sürekli olmasını ve değişkenlerin birlikte normal dağılım göstermesini gerektirmektedir. Değişkenler arasında korelasyon katsayısının 1 olması, aralarında mükemmel bir ilişkinin olduğunu göstergesi olarak kabul edilir. Korelasyon katsayısının 0.70-1.00 arasında olması, korelasyonun yüksek olduğunu tarif eder. Ayaşan ve ark., (2020), *in vitro* inkübasyonu ile üretilen yer bademine ait gaz miktarlarının, zaman içinde oldukça korelasyonlu olduğunu, bu nedenle, 96 saatlik *in vitro* inkübasyonun gerekenden daha uzun olabildiğini ifade etmiştir. Çalışmamızda da *in vitro* inkübasyon zamanları ile pearson korelasyon katsayıları arasında pozitif bir ilişki saptanmıştır.

**Çizelge 4.** *In vitro* inkübasyon zamanları ile pearson korelasyon katsayıları

| Pearson Korelasyon | 3.saat | 6.Saat | 12.Saat | 24.Saat | 48.Saat | 72.Saat | 96.Saat | Toplam |
|--------------------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|
| 3.saat             | 1      | .927** | .792*   | .521    | .419    | .358    | .348    | .286   |
| 6.Saat             |        | 1      | .956**  | .769*   | .700*   | .652    | .644    | .591   |
| 12.Saat            |        |        | 1       | .901**  | .851**  | .810**  | .803**  | .758*  |
| 24.Saat            |        |        |         | 1       | .983**  | .962**  | .957**  | .929** |
| 48.Saat            |        |        |         |         | 1       | .994**  | .991**  | .976** |
| 72.Saat            |        |        |         |         |         | 1       | 1.000** | .994** |
| 96.Saat            |        |        |         |         |         |         | 1       | .996** |

\*\* . Korelasyon  $P < 0.01$ 'de önemlidir (2-tailed).

**Çizelge 5.** a, b, c, a+b'nin pearson korelasyon katsayıları

| Pearson Katsayıları | a | b      | c      | a+b     |
|---------------------|---|--------|--------|---------|
| a                   | 1 | -0.040 | -0.355 | 0.098   |
| b                   |   | 1      | -0.107 | 0.991** |
| c                   |   |        | 1      | -0.155  |

\*\* . Korelasyon  $P < 0.01$ 'de önemlidir (2-tailed).

Çizelge 5'e bakıldığında süreye bağlı olarak oluşan gaz hacmi (b) (mL) ile toplam (potansiyel) gaz üretimi (a+b) arasındaki korelasyonun istatistiki olarak 0.01 düzeyinde önemli olduğu görülmüştür ( $P < 0.01$ ). Korelasyonun eksi olması, ters bir ilişkiyi ifade etmektedir. Yani yemin yapay rumene konulduğu ilk anda oluşan gaz hacmi (a), süreye bağlı olarak oluşan gaz hacmi (b) ve c arasında ters bir ilişki vardır. Yine c ile a+b arasında da benzer durum bulunmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmaların az olması nedeniyle, bazı parametrelerde tartışma yeterince yapılamamıştır.

## SONUÇ

Denemede elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde yer bademine ait *in vitro* inkübasyon zamanları ile pearson katsayıları arasında önemli bir ilişki bulunmuş, yer bademi çeşitlerinin KM, HK, HY, NDF, HS düzeyleri istatistiki olarak çeşitler bazında önemli bulunmuştur. Yer bademine ait *in vitro* gaz üretimine ait literatür bilgisi bulunamadığından, bundan sonraki çalışmalarda bu konu ile ilgili daha farklı çalışmalara gereksinim olduğu düşüncesindeyiz. Yer bademinin bazı nedenlerden dolayı kısıtlı bir alanda ekiminin yapılması nedeniyle, bu konuda yeni çalışmalar yapılarak, ekiminin artırılması yönünde çalışmalar yanında, mekanizasyon kaynaklı problemlerin bir an önce giderilmesi de gerekmektedir.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

**Yazar Katkısı**

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

**KAYNAKLAR**

- Achoribo ES, Ong MT, 2017. Tiger nut (*Cyperus Esculentus*): Source of natural anticancer drug? Brief review of existing literature. *Euromediterranean Biomedical Journal*, 12(19): 091-094.
- Aduwamai UH, John UI, Aminu A, Isaac UK, 2018. Influence of different processing methods on proximate and anti-nutritional value of tigernuts (*Cyperus esculentus L.*). *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 03(03): 029-034.
- Anonim, 2019a. Tigernuts /Chufas. <https://www.tigernuts.com/pdf/tigernuts.profile.pdf>
- Anonim, 2019b. Yerbade mi. <https://www.tunaproject.com.tr/urunler-321269/tarimsal-urunler/super-foods/detay/417425/yer-bademi--tiger-nuts->
- Association of Official Analytical Chemists, AOAC, 1990. Official Method of Analysis. 15th. ed. Washington, DC. USA.
- Ayaşan T, Ülger İ, Kaliber M, Ergül Ş, İnci H, Mart D, Türkeri M, 2018. Comparison of *in vitro* gas production, nutritive value, metabolizable energy and organic matter digestibility of some chickpea varieties. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 8(1):131-136.
- Ayaşan T, Sucu E, Ülger İ, Hızlı H, Cubukcu P, Özcan BD, 2020. Determination of *in vitro* rumen digestibility and potential feed value of tiger nut varieties. *South African Journal of Animal Science*, 50(5): 738-744.
- Bado S, Bazongo P, Son G, Kyaw MT, Forster BP, Nielen S, Lykke AM, Ouédraogo A, Bassolé IHN, 2015. Physicochemical characteristics and composition of three morphotypes of cyperus esculentus tubers and tuber oils. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, Article ID 673547, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/673547>.
- Bilgili ME, Çubukcu P, Vurarak Y, 2018. Yerbade minin tarımı ve mekanizasyonunun değerlendirilmesi. *Uluslararası Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 1(2): 20-33.
- Bobreneva IV, Baioumy AA, 2018. Effect of using tiger nuts (*Cyperus esculentus L.*) on nutritional and organoleptic characteristics of beef burger. *Bioscience Research*, 15(3): 1424-1432.
- Chen XB, 1994. Neway excel. an excel application programme for processing feed degradability data. User Manual. Int. Feed Resources Unit. Rowrett Research Institute. Scotland (Unpublished).
- Chinma CE, James S, Imam H, Ocheme OB, Anuonye JC, Yakubu CM, 2011. Physicochemical and sensory properties, and *in vitro* digestibility of biscuits made from blends of tigernut (*Cyperus esculentus*) and pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Nigerian Journal of Nutritional Sciences*, 32(1): 55-62.
- Emurotu JE, 2017. Comparison of the nutritive value of the yellow and brown varieties of tigernut. *IOSR Journal of Applied Chemistry*, 10(9): 29-32.
- Eseceli H, Ayaşan T, Esen VK, Esen S, 2020. Nutrient and mineral contents and *in vitro* digestibility of kermes oak (*Quercus coccifera L.*) and mock privet (*Phillyrea latifolia L.*). *Alinteri Ziraat Bilimler Dergisi*, 35(2): 100-106.
- Gambo A, Da'u A, 2014. Tigernut (*Cyperus esculentus L.*): Composition, products, uses and health benefits-A review. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 7(1): 56-61.

- Gutierrez N, Boyd JA, 2020. Effects of *in vitro* digestibility in cannulated steers when supplemented different levels of glycerol. *Journal of Animal Science*, 98(2): 55-56.
- He Y, Cone JW, Hendriks WH, Dijkstra J, 2019. Relationships between chemical composition and *in vitro* gas production parameters of maize leaves and stems. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 104(1): 12-21.
- Imo C, Uhegbu FO, Arowora KA, Ezeonu CS, Opara IJ, Nwaogwugwu CJ, Anigbo CJ, 2019. Chemical composition of *Cyperus esculentus* nut and phoenix *dactylifera* fruit. *African Journal of Biotechnology*, 18(19): 408-415.
- İnce A, Vursavuş KK, Vurarak Y, Çubukcu P, Çevik MY, 2017. Selected engineering properties of tiger nut as a function of moisture content and variety. *Turkish Journal of Agriculture Forestry*, 41: 263-271.
- Kamalak A, Atalay AI, Ozkan CO, Kaya K, Tatlıyer A, 2011. Determination of nutritive value of *Trigonella kotschi* Fenzl hay harvested at three different maturity stages. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Dergisi*, 17: 635-640.
- Kara K, 2020. Determination of the *in vitro* digestibility and nutrient content of commercial premium extruded foods with different types of protein content for adult dogs. *Veterinari Medicina*, 65(6): 233-249.
- Karababa E, Coşkun Y, Nazlıcan A, 2001. Çufa yumrusunun kimyasal bileşimi ve teknolojik değerlendirilmesi. *Gıda*, 26(4): 243-246.
- Kaya E, Canbolat O, Atalay AI, Kurt O, Kamalak A, 2016. Potential nutritive value and methane production of pods, seed and senescent leaves of *Gleditsia triacanthos* trees. *Livestock Research for Rural Development*, 28(7): 123.
- Madaki FM, Kabiru AY, Muhammad HL, Abubakar AN, Bello A, 2018. Comparative nutritional compositions of raw and processed tiger nuts (*Cyperus esculentus* L.). *IJABR*, 9(2): 32-40.
- Maduka N, Ire FS, 2018. Tigernut plant and useful application of tigernut tubers (*Cyperus esculentus*)- A review. [http://www.sdiarticle2.org/prh/CJAST\\_68/2018/Revised-ms\\_CJAST\\_43551\\_v4.pdf](http://www.sdiarticle2.org/prh/CJAST_68/2018/Revised-ms_CJAST_43551_v4.pdf)
- MAFF, 1984. Energy allowances and feeding systems for ruminants. Her Majesty's Stationary Office London, UK.
- Menke KH, Steingass H, 1988. Estimation of the energetic feed values obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen liquid. *Anim. Res. Dev.* 28: 7-55.
- Monago CC, Uwakwe AA, 2009. Proximate composition and *in vitro* anti sickling property of Nigerian *Cyperus esculentus* (tiger nut sedge). *Trees for Life Journal*, 1-6.
- Nazlıcan AN, 2007. Yağ, nişasta ve şeker üretiminde yeni bir alternatif: Yerbade mi. *Agroskop Tarım Gıda Hayvancılık Dergisi*, 1(1): 54-55.
- Ortis CAN, Roa Vega MG, 2020. Determination of *in vitro* digestibility of forage species used in ruminant feeding. *Tropical Animal Health and Production*, 52: 3045-3059.
- Ozcan MM, Gumuscu A, Er F, Arslan D, Ozkalp B, 2010. Chemical and fatty acid composition of *Cyperus esculentus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 46(2): 276-277.
- Ørskov ER, McDonald I, 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. *J. Agric. Sci.* 92: 499-503.
- Sidohoude A, Nonviho G, Djenontin ST, Agbangnan P, Paris C, Sohounhloué DCK, 2014. Physico-chemical characterization of vegetable oil and defatted meal from two varieties of *Cyperus esculentus* from Benin. *Chemistry Journal*, 4(1): 1-7.
- SPSS Statistical Package for the Social Sciences for Windows, 1999. Spps Inc., Chicago, Illinois, USA.

- Suleiman MS, Olajide JE, Omale JA, Abbah OC, Ejembi DO, 2018. Proximate composition, mineral and some vitamin contents of tigernut (*Cyperus esculentus*). Clin. Invest. (Lond.), 8(4): 161-165.
- Thomas AD, 2014. Physical, chemical and functional properties of tiger nuts (*Cyperus esculentus*) selected from Ghana, Cameroon and UK Market (Spain). University of Plymouth Research Theses, Doctoral Thesis, p:254.
- Turan A, Soycan Önenç S, 2018. Effect of cumin essential oil usage on fermentation quality, aerobic stability and *in vitro* digestibility of alfalfa silage, Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 31: 1252-1258.
- Türel AO, Buğdaycı KE, 2020. Nutrient content and *in vitro* digestibility of kermes oak (*Quercus coccifera L.*) growing in the provincial borders of Burdur. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 67(1): 95-100.
- Ülger İ, Kaliber M, Büyükkılıç Beyzi S, Konca Y. 2020a. Possible ensiling of pumpkin (*Cucurbita pepo*) residues. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences, 44(4): 853-859.
- Ülger I, Büyükkılıç Beyzi S, Kaliber M, Konca Y. 2020b. Chemical, nutritive, fermentation profile and gas production of citrus pulp silages, alone or combined with maize silage. South African Journal of Animal Science, 50(1): 161-169.
- Van Soest PJ, Wine RH, 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 50: 50-55.
- Van Soest PJ, Robertson JD, Lewis BA, 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science, 74: 3583-3597.
- Weiss WP, Conrad HR, St Pierre NR, 1992. A theoretically-based model for predicting total digestible, nutrient values of forages and concentrates. Animal Feed Science and Technology, 39(1-2): 95-110.
- Yılmaz Y, 2019. Yerbade mi sütü (*Horchata*) yan ürünlerinin ekmek üretiminde değerlendirilmesi üzerine bir çalışma. Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yüksek Lisans Tezi, s:140, Ankara.
- Zommara M, Imaizumi K, 2017. *In vitro* antioxidant activity of chufa tubers (*Cyperus esculentus l.*) extracts in liposome peroxidation systems. Journal of Sustainable Agricultural Sciences, 43(2): 69-76.