



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ DERGİSİ

Journal of Natural and Applied Sciences

nisan



Cilt: 24 Sayı: 01 Volume: 24 Issue: 01 e-ISSN: 1308 6529

2020
ISPARTA



SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi

Cilt 24, Sayı 1, Yıl 2020

SÜLEYMAN DEMİREL UNIVERSITY Journal of Natural and Applied Sciences

Volume 24, Issue 1, Year 2020

e-ISSN: 1308-6529 | DOI: 10.19113/sdufenbed

Bu dergi, aşağıda listelenen veri tabanları tarafından taranmaktadır / This journal is indexed by the following abstracting and indexing databases
BASE, CAB Abstracts, CAS (Chemical Abstracts Service), CNKI Scholar, DOAJ, EBSCO Discovery Service (EDS), Google Scholar, Index
Copernicus, InfoBase Index, JournalTOCs, ResearchBib, Ulakbim TR Dizin (Mühendislik ve Temel Bilimler), WorldCat (OCLC),
Zentralblatt MATH

DERGİ HAKKINDA

Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi (SDÜ Fen Bil Enst Der), 1995 yılında kurulmuş bir bilimsel araştırma dergisidir. SDÜ Fen Bil Enst Der, 2001 yılından itibaren mühendislik ve mimarlık bilimleri, tarım ve orman bilimleri ve temel bilimler alanlarında düzenli olarak Nisan, Ağustos ve Aralık aylarında yılda üç sayı yayımlanan ulusal ve uluslararası hakemli-indeksli bir dergidir. Yayımlanmak üzere gönderilen bütün makaleler; hakemler ve editörler tarafından değerlendirilir. Makaleleri değerlendiren hakemlerin isimleri yazarlara bildirilmez. Dergide, Türkçe veya İngilizce dillerinde yazılmış orijinal araştırma makaleleri yayımlanmakta olup; teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve derleme türünde bilimsel çalışmalar yayımlanmamaktadır. İngilizce dilinde yazılmış orijinal araştırma makaleleri yayımlanma önceliğine sahiptir. Dergiye yayımlanmak için gönderilen makalelerden herhangi bir değerlendirme ve başvuru ücreti alınmamaktadır.

ABOUT THE JOURNAL

Süleyman Demirel University Journal of Natural and Applied Sciences (SDU J Nat Appl Sci) is a scientific research journal founded in 1995. SDU J Nat Appl Sci is a national and international indexed journal with referees, which has been published in the areas of engineering and architecture sciences, agriculture and forestry sciences and fundamental sciences three times in a year including in April, August and December, regularly since 2001. Articles submitted to the journal for publication are evaluated by referees, editorial board and editor. Names of referees evaluating the articles aren't informed to the authors (Blind peer review). The full-length original research articles written in Turkish or English language are published, but technical notes, letters to the editors, expositions and surveys are not published in the journal. The full-length original scientific research articles written in English language have the priority of publication. The Journal of Natural and Applied Sciences does not charge any publication or processing fee.



SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ DERGİSİ

İMTİYAZ SAHİBİ

İlker Hüseyin ÇARIKÇI, Prof. Dr.
Süleyman Demirel Üniversitesi Adına (Rektör)

BAS EDİTÖR

Şule Sultan UĞUR, Doç. Dr.
Süleyman Demirel Üniversitesi (Enstitü Müdürü)

EDİTÖRLER

Zehra ÜSTÜN, Dr. Öğr. Üyesi
Süleyman Demirel Üniversitesi
Ebru ÇUBUK DEMİRALAY, Prof. Dr.
Süleyman Demirel Üniversitesi
(Enstitü Müdür Yardımcısı)
Hasan KÖSEOĞLU, Doç. Dr.
Süleyman Demirel Üniversitesi
(Enstitü Müdür Yardımcısı)
Yasemin COŞKUN, Doç. Dr.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Ayşenur TUNCUK, Öğr. Gör. Dr.
Süleyman Demirel Üniversitesi

Banu ESENCAN TÜRKASLAN,
Dr. Öğr. Üyesi
Süleyman Demirel Üniversitesi
Cengiz GAZELOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi
Süleyman Demirel Üniversitesi
Faruk Süleyman BERBER,
Öğr. Gör. Dr.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Hakan OĞUZ, Doç. Dr.
Kahramanmaraş Sütçü İmam
Üniversitesi
Oğuz YAYLA, Doç. Dr.
Hacettepe Üniversitesi

Rağbet Ezgi DURAN, Doç. Dr.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Sedat AKLEYLEK, Doç. Dr.
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Tunhan DEMİRCİ, Dr. Öğr. Üyesi
Süleyman Demirel Üniversitesi
Utku KÖSE, Dr. Öğr. Üyesi
Süleyman Demirel Üniversitesi
Yalçın ERZURUMLU, Dr. Öğr. Üyesi
Süleyman Demirel Üniversitesi

DANIŞMA KURULU

Abdullah ÖZSOY, Prof. Dr.
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniv.
Ahmet Ali İŞILDAR, Prof. Dr.
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniv.
Ayşegül ÖKSÜZ, Prof. Dr.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Bahri KARLI, Prof. Dr.
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniv.
Erdoğan KÜÇÜKÖNER, Prof. Dr.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Ersan AKYILDIZ, Prof. Dr.
Orta Doğu Teknik Üniversitesi
Ersin YÜCEL, Prof. Dr.
Anadolu Üniversitesi

Gerhard-Wilhelm WEBER, Prof. Dr.
Poznan Teknoloji Üniversitesi
Güven ÖNBİLGİN, Prof. Dr.
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Mehmet POLAT, Prof. Dr.
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
Metin AYDOĞDU, Prof. Dr.
Trakya Üniversitesi
Muhsin KONUK, Prof. Dr.
Üsküdar Üniversitesi
M. Zakir KANBUR, Doç. Dr.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Osman ÇETİNKAYA, Prof. Dr.
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniv.

Serdar CARUS, Prof. Dr.
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniv.
Serpil PEHLİVAN, Prof. Dr.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Şeref SAĞIROĞLU, Prof. Dr.
Gazi Üniversitesi
Tolga TAŞDİZEN, Doç. Dr.
Utah Üniversitesi
Urfat NURİYEV, Prof. Dr.
Ege Üniversitesi

TEKNİK EDİTÖRLER

Mert ŞEKERCİ, Dr. Öğr. Üyesi
Süleyman Demirel Üniversitesi
Sercan ÖNDER, Arş. Gör.
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniv.

Damla GÜVERCİN, Dr. Öğr. Üyesi
Süleyman Demirel Üniversitesi
Ekinhan ERİŞKİN, Arş. Gör. Dr.
Süleyman Demirel Üniversitesi

Niyazi Erdem DELİKANLI,
Arş. Gör. Dr.
Bartın Üniversitesi

BÜRO İŞLERİ

Uğur KARATEPE, Memur
Süleyman Demirel Üniversitesi

KAPAK TASARIM

Mehmet ÖZKARTAL, Doç. Dr.
Süleyman Demirel Üniversitesi

Mehmet Nuri KIVRAK

PRIVILEGE OWNER

İlker Hüseyin ÇARIKÇI, Prof. Dr.
On Behalf of Süleyman Demirel University (President)

EDITOR IN CHIEF

Şule Sultan UĞUR, Assoc. Prof. Dr.
Süleyman Demirel University (Director of the Institute)

EDITORS

Zehra ÜSTÜN, Asst. Prof. Dr.
Süleyman Demirel University
Ebru ÇUBUK DEMİRALAY, Prof. Dr.
Süleyman Demirel University
(Associate Director of the Institute)
Hasan KÖSEOĞLU, Assoc. Prof. Dr.
Süleyman Demirel University
(Associate Director of the Institute)
Yasemin COŞKUN, Assoc. Prof. Dr.
Süleyman Demirel University
Ayşenur TUNCUK, Teach. Asst. Dr.
Süleyman Demirel University

Banu ESENCAN TÜRKASLAN,
Asst. Prof. Dr.
Süleyman Demirel University
Cengiz GAZELOĞLU, Asst. Prof. Dr.
Süleyman Demirel University
Faruk Süleyman BERBER,
Teach. Asst. Dr.
Süleyman Demirel University
Hakan OĞUZ, Assoc. Prof. Dr.
Kahramanmaraş Sütçü İmam University
Oğuz YAYLA, Assoc. Prof. Dr.
Hacettepe University

Rağbet Ezgi DURAN, Assoc. Prof. Dr.
Süleyman Demirel University
Sedat AKLEYLEK, Assoc. Prof. Dr.
Ondokuz Mayıs University
Tunhan DEMİRCİ, Asst. Prof. Dr.
Süleyman Demirel University
Utku KÖSE, Asst. Prof. Dr.
Süleyman Demirel University
Yalçın ERZURUMLU, Asst. Prof. Dr.
Süleyman Demirel University

ADVISORY BOARD

Abdullah ÖZSOY, Prof. Dr.
Isparta University of Applied Sciences
Ahmet Ali İŞILDAR, Prof. Dr.
Isparta University of Applied Sciences
Ayşegül ÖKSÜZ, Prof. Dr.
Süleyman Demirel University
Bahri KARLI, Prof. Dr.
Isparta University of Applied Sciences
Erdoğan KÜÇÜKÖNER, Prof. Dr.
Süleyman Demirel University
Ersan AKYILDIZ, Prof. Dr.
Middle East Technical University
Ersin YÜCEL, Prof. Dr.
Anadolu University

Gerhard-Wilhelm WEBER, Prof. Dr.
Poznan University of Technology
Güven ÖNBİLGİN, Prof. Dr.
Ondokuz Mayıs University
Mehmet POLAT, Prof. Dr.
İzmir Institute of Technology
Metin AYDOĞDU, Prof. Dr.
Trakya University
Muhsin KONUK, Prof. Dr.
Üsküdar University
M. Zakir KANBUR, Assoc. Prof. Dr.
Süleyman Demirel University
Osman ÇETİNKAYA, Prof. Dr.
Isparta University of Applied Sciences

Serdar CARUS, Prof. Dr.
Isparta University of Applied
Sciences
Serpil PEHLİVAN, Prof. Dr.
Süleyman Demirel University
Şeref SAĞIROĞLU, Prof. Dr.
Gazi University
Tolga TAŞDİZEN, Assoc. Prof. Dr.
University of Utah
Urfat NURİYEV, Prof. Dr.
Ege University

TECHNICAL EDITORS

Mert ŞEKERCİ, Asst. Prof. Dr.
Süleyman Demirel University
Sercan ÖNDER, Res. Asst.
Isparta University of Applied Sciences

Damla GÜVERCİN, Asst. Prof. Dr.
Süleyman Demirel University
Ekinhan ERİŞKİN, Res. Asst. Dr.
Süleyman Demirel University

Niyazi Erdem DELİKANLI,
Res. Asst. Dr.
Bartın University

OFFICE WORK

Uğur KARATEPE, Staff
Süleyman Demirel University

COVER DESIGN

Mehmet ÖZKARTAL, Assoc. Prof. Dr.
Süleyman Demirel University
Mehmet Nuri KIVRAK

Effect of Oxidation Time on Wear Behaviour of Thermally Oxidized CoCrMo Alloy.....	1-4
<i>Termal Olarak Oksitlenmiş CoCrMo Alaşımının Aşınma Davranışı Üzerine Oksidasyon Süresinin Etkisi</i>	
Onur ÇOMAKLI	
İplik Düzgünsüzlük Analizi için Kapasitif Ölçüm Devresi Tasarımı: Matematiksel Yaklaşım ve Gerçekleme.....	5-11
<i>Capacitive Measurement Circuit Design for Yarn Unevenness Analysis: Mathematical Approach and Realization</i>	
Koray GÜRKAN	
<i>Aspergillus niger</i> Katalazının Üretimi, Üçlü-Faz Ayırma ile Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakterizasyon..	12-24
<i>Production, Purification of Aspergillus niger Catalase by Three-Phase Partitioning and Its Biochemical Characterization</i>	
Eda BAYKAL SARI, Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ	
İpek Fibroin/Polivinil Alkol Esaslı İlaç Taşıyıcı Yara Örtüleri	25-34
<i>Silk Fibroin/Polyvinyl alcohol Based Drug Carrier Wound Dressings</i>	
Ayça BAL ÖZTÜRK, Zeynep Püren AKGÜNER	
Biochar Reinforced Polyvinyl Alcohol /Corn Starch Biocomposites.....	35-42
<i>Biyokömür Takviyeli Polivinil Alkol /Mısır Nişastası Biyokompozitler</i>	
Pınar TERZİOĞLU, Fatma Nur PARIN	
Burdur İlinde Yetiştirilen Fasulye Bitkilerinde Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV)'ünün Araştırılması	43-47
<i>Determination of Bean yellow mosaic virus (BYMV) in Common Bean Plants from Burdur Province</i>	
Merve ULUM, Handan ÇULAL KILIÇ, Nejla YARDIMCI	
Kırmızı Soğandan Karbon Kuantum Noktaların Sentezi ve Fotoluminesans Özelliklerinin İncelenmesi	48-56
<i>Synthesis of Carbon Quantum Dots from Red Onions and Analysis of Photoluminescence Properties</i>	
Abdullah BİÇER, Kübra BİLMİŞOĞLU BİÇER	
Tunçbilek Linyitinin Sorgum Biyokütlesi ve Biyokütle Hidrolizatı ile Birlikte Gazlaştırılması	57-63
<i>Co-gasification of Tunçbilek Lignite with Sorghum Biomass and Sorghum Biomass Hydrolysate</i>	
Açelya SEÇER, Arif HASANOĞLU	
New Bootstrap Methods for the Hypothesis Tests of the Population Mean in Ranked Set Sampling.....	64-71
<i>Sıralı Küme Örneklemesinde Yığın Ortalamasına İlişkin Hipotez Testi İçin Yeni Bootstrap Metotları</i>	
Nurdan YENİAY KOÇER, Yaprak Arzu ÖZDEMİR, Fikri GÖKPINAR	
Robotik Uygulamalar İçin Titreşime Dayalı Hareket Eden Amfibik İlerleme Mekanizması	72-79
<i>Vibration Based Amphibious Locomotion Mechanism for Robotic Applications</i>	
Ahmed Burak TAPAN, Murat REİS	
Clay-Protein Nanocomposite Based Electrochemical Sensor for the Determination of Ascorbic Acid.....	80-89
<i>Askorbik Asit Tayini için Kil-Protein Nanokompozit Bazlı Elektrokimyasal Sensör</i>	
Oznur AKBAL, Gulcin BOLAT, Serdar ABACI	
Afyonkarahisar İli Patates Alanlarında Patates Böceği (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>) (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae)'nin Yayılışı.....	90-95
<i>Dispersal of Colorado Potato Beetle (Leptinotarsa decemlineata) (Say) (Coleoptera:Chrysomelidae) in Afyonkarahisar Province</i>	
Ezgi DOĞAN, İsmail KARACA	
Arpada Farklı Gama Radyasyon Dozu Uygulamalarının M2 Generasyonunda Bazı Tarımsal Özellikler Üzerine Mutagenik Etkilerinin Belirlenmesi	96-104
<i>Determination of the Mutagenic Effect of Different Gamma Radiation Doses Applications on Some Agricultural Characteristics of Barley in M2 Generation</i>	
Tuğçe Ayşe KARAKOCA, İlknur AKGÜN	
Merkezi Kompozit Dizayn Kullanılarak Kapesitabin Tayini için RPLC Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu.....	105-112
<i>Development and Validation of a RPLC Method for the Determination of Capecitabine using Central Composite Design</i>	
Yaşar Doğan DALDAL, Ebru ÇUBUK DEMİRALAY	
Effect of Silicon Carbide Nanotube (SiCNT) on the Mechanical Properties and Moisture Susceptibility of Hot Mix Asphalt.....	113-119
<i>Silikon Karbür Nanotüplerin (SiCNT) Sıcak Karışım Asfaltın Suya Duyarlılığına ve Mekanik Özelliklerine Etkisi</i>	
Şebnem KARAHANÇER	

A Locally Searched Binary Artificial Bee Colony Algorithm Based on Hamming Distance for Binary Optimization	120-131
<i>Hamming Mesafesi ile Lokal Arama Tabanlı İkili Yapay Arı Kolonisi Algoritması</i> Zeynep Banu ÖZGER, Bülent BOLAT, Banu DİRİ	
Investigating The Effect of Acrylic Latex on Moisture Susceptibility of Hot Mix Asphalt	132-137
<i>Akrilik Lateksin Bitümlü Sıcak Karışımların Nem Hassasiyeti Üzerindeki Etkisinin Araştırılması</i> Şebnem KARAHANÇER	
⁵⁵ Mn İzotopunun Fotonükleer Tesir Kesitleri Üzerinde Kolektif Nükleer Seviye Yoğunluğunun Etkisi.....	138-142
<i>Collective Nuclear Level Density Effect On Photonuclear Cross Section of ⁵⁵Mn Isotope</i> Bora CANBULA	
Tek Tohum Nesli Seleksiyon Yöntemi ile Geliştirilen Aspir (<i>Carthamus tinctorius</i> L.) Hatlarının Tarımsal ve Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	143-151
<i>Determination of Agricultural and Technological Characters of Safflower (Carthamus tinctorius L.) Lines Developed by Single Seed Descent Selection Methods</i> Ali ŞENATEŞ, Sabri ERBAŞ	
Karbon Katı Asit Katalizör ile Atık Biyokütle Kaynaklarından 5-Hidroksimetilfurfural Eldesi	152-157
<i>Synthesis of 5-Hydroxymethylfurfural from Waste Biomass Feedstocks Using Carbon Solid Acid Catalyst</i> Burçak KAYA ÖZSEL	
Usage of Waste Plastics in Road Pavements.....	158-163
<i>Atık Plastiklerin Karayolunda Kullanımı</i> Mehmet SALTAN, Nimet İNKAYA	
Kütahya İli Üretici Depolarından Alınan Buğday Örneklerinde Bulunan Zararlı Böcek Türleri ve Doğal Düşmanları	164-168
<i>Harmful Insects and Their Natural Enemies on Wheat Samples taken from Producer Warehouses in Kütahya Province</i> Erdal ZENGİN, İsmail KARACA	
Sericin-Montmorillonite Composite Nanoparticles as Drug Delivery System in Human Liver Cancer: Development, Drug Release, Cellular Uptake and Cytotoxicity.....	169-177
<i>İnsan Karaciğer Kanseri İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Sericin-Montmorillonit Kompozit Nanopartiküller: Geliştirilmesi, İlaç salımı, Hücresel Alım ve Sitotoksosite</i> Öznur AKBAL VURAL	
The Improvement Photoresponsivity of ZnO Based Photodiode with Indium Doping.....	178-187
<i>İndyum Katkısı ile ZnO Tabanlı Fotodiyotun Fototepki Özelliğinin Geliştirilmesi</i> Serif RUZGAR	
Çanakkale Şehitler Abidesi Şevi Dikey Bahçe Tasarım Önerisi.....	188-195
<i>Design Proposal of Vertical Garden on the Slope of Canakkale Martyrs Monument</i> Yavuz ALKAN	
Investigation of Antimicrobial and Antitubercular Activities of Some Hydrazone Derived Compounds	196-200
<i>Bazı Hidrazon Türevi Bileşiklerin Antimikrobiyal ve Antitüberküler Etkilerinin Araştırılması</i> Begüm EVRANOS AKSÖZ, Fatma KAYNAK ONURDAĞ, Erkan AKSÖZ, Selda ÖZGEN ÖZGACAR	
Su Kabağı Lifi (<i>Luffa cylindrica</i>)-Epoksi Kompozitinde Sesin Yutulma Performansını Etkileyen Parametreler.....	201-208
<i>Parameters Affecting the Sound Absorption Performance of Luffa cylindrica Fibers-Epoxy Composite</i> Oya KESKİN, Sevtap YILMAZ	
Yağ Gülü (<i>Rosa damascena</i> Mill.)'nün Mikroçoğaltımında En Uygun Sürgün ve Köklenme Ortamlarının Belirlenmesi	209-216
<i>Determination of the Most Appropriate Shoot and Rooting Media in the Micro-propagation of Oil Rose (Rosa damascena)</i> Ramazan DİLMEN, Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR	
Ayçiçeği (<i>Helianthus annuus</i> L.)'nde Azot ve Kükürt Gübrelemesinin Verim ve Kaliteye Etkileri.....	217-225
<i>Effects of Nitrogen and Sulfur Fertilization on Yield and Quality in Sunflower (Helianthus annuus L.)</i> Sabri ERBAŞ, Ali ŞENATEŞ	
Pure Elements and Dual Notions of Prime Elements in Lattice Modules.....	226-229
<i>Latis Modüllerindeki Pür Elemanlar ve Asal Elemanların Dual Kavramları</i> Emel ASLANKARAYİĞİT UĞURLU	

Lucas Polynomial Approach for Second Order Nonlinear Differential Equations..... 230-236
İkinci Mertebeden Doğrusal Olmayan Diferansiyel Denklemler için Lucas Polinom Yaklaşımı
Sevin GÜMGÜM, Nurcan BAYKUŞ, SAVAŞANERİL, Ömür Kıvanç KÜRKÇÜ, Mehmet SEZER

Koyun (*Ovis aries*) Solunum Sistemindeki Bronkus, Bronkulus ve Alveoler Hücrelerdeki AIA (*Artocarpus integrifolia*) ve PSA (*Pisum sativum*) Lektinlerinin Dağılımı 237-243
Distributaion of AIA(Artocarpus integrifolia) and PSA (Pisum sativum) Lectins in Bronchus, Bronchulus and Alveolar Cells in Sheep (Ovis aries) Respiratory System
Kenan ÇINAR, Gülsüm MANAV, Rovshan JABBAROV

Effect of Oxidation Time on Wear Behaviour of Thermally Oxidized CoCrMo Alloy

Onur ÇOMAKLI *

¹Erzurum Technical University, Faculty of Faculty of Engineering and Architecture, Department of Mechanical Engineering, 25050, Erzurum

(Alınış / Received: 03.01.2019, Kabul / Accepted: 10.12.2019, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Keywords

CoCrMo alloy,
Wear properties,
Thermal oxidation,
Process time

Abstract: CoCrMo alloy has been oxidized for 3 and 5h at the temperature of 850°C with 100% O₂ gas by thermal oxidation. The XRD, SEM, microhardness and ball-on-disc wear test devices were used to find out the structure, mechanical and wear properties of untreated and treated specimens. Outcomes showed wear resistance of oxidized specimens were became better than untreated CoCrMo alloy. Also, wear resistance of oxidized specimens improved with increased processing time (from 3h to 5h) increased.

Termal Olarak Oksitlenmiş CoCrMo Alaşımının Aşınma Davranışı Üzerine Oksidasyon Süresinin Etkisi

Anahtar Kelimeler

CoCrMo alloy,
Aşınma özellikleri,
Termal oksidasyon,
İşlem süresi

Özet: CoCrMo alaşımı, %100 O₂ gazı ortamında, 850°C'de, 3 ve 5 saat süre ile termal oksitlenmiştir. İşlemsiz ve işlem görmüş numunelerin yapısal, mekanik ve aşınma özelliklerin tespit edilmesi için XRD, SEM, mikro sertlik ve pim-disk aşınma test cihazları kullanılmıştır. Sonuçlar, oksitlenmiş numunelerin aşınma dirençlerinin, işlem görmemiş CoCrMo alaşımından daha iyi olduğunu göstermiştir. Ayrıca, oksitlenmiş numunelerin aşınma dirençleri, işlem süresi arttıkça (3 saatten 5 saate kadar) artmıştır.

1. Introduction

Biomaterials are used for various applications in a numerous of areas of the human body. Particularly, CoCrMo alloys are generally preferred for joint prosthesis [1, 2]. However, wear and corrosion in body fluid will create metal debris and ion release for CoCrMo alloy implants. This case can cause to some problems such as, inflammation, poisoning etc. Therefore, there are many surface treatments to minimize this effect. Thermal oxidation is one of these techniques and it has some advantages such as, require less expensive equipment and not need high skills person to operate this process [3, 4]. Therefore, the favourable advantages of thermal oxidation on wear and electrochemical feature of metallic biomaterials in the scientific literature was seen. Çimenoğlu et al. [5] indicated that thermal oxidation may considerably improve tribological properties of Ti alloys. Kumar et al. [6] pointed out that thermal oxidation is useful method to improve corrosion resistance of titanium. Arslan et al. [7] demonstrated that tribological features of pure titanium increased as an oxide layer was created with thermal oxidation Shih et al. [8] investigated that influence of thermal oxidation method on corrosion properties of 316L

stainless steel. They found that the treatments improved the corrosion resistance of specimens. Ayu et al. [9] reported that thermal oxidation method improved corrosion resistance in cobalt chromium molybdenum alloys. However, there are no enough works dealing influence of oxidation time on tribological features of CoCrMo Alloy in scientific literature. Hence, in our study we observed the effect of process time on wear behaviour of thermally oxidized CoCrMo alloy. The structural of untreated and oxidized CoCrMo Alloys were analyzed by X-ray diffractometer and Scanning Electron Microscopy. Tribological behaviour of untreated and oxidized specimens were carried out using pin on disk type tribo-tester.

2. Methodology

The materials used in this study were forged low carbon (LC) CoCrMo alloy. Its nominal chemical composition is 27.4 % Cr, 5.7% Mo, 0.62% Mn, 0.67% Si, 0.1% Ni, 0.17% Fe, 0.05 %C and balance (wt.%) Co. Specimens with 14-mm diameter and 6 mm thick were cut from this alloy bar. First, specimens were polished using SiC abrasive papers with 80-1000 followed by mirror polishing. Second, their surfaces

were cleaned in ethanol. Thermal oxidation of the specimens was performed at the temperature of 850°C for 3h and 5h with 100% O₂ in a muffle furnace at normal atmospheric condition. X-ray diffractometer was operated with CuK α radiation for phase analysis. Thickness of oxide layers was observed by scanning electron microscope (SEM). The tribological experiments were examined on a ball-on-disc tester (Bruker UMT). 6 mm diameter Al₂O₃ balls were utilized as pin. Wear tests were investigated with a sliding distance of 141 m at 25°C and at normal load of 2 N. The wear volume values of specimens were calculated using Bruker Contour GT-K1 3D profilometer. Furthermore, afterwards the wear experiments the wear tracks were observed by SEM.

3. Results and Discussion

Figure 1 displays phase structures of untreated and oxidized CoCrMo alloys as detected by XRD. Diffraction pattern of untreated specimens exhibits f_{cc} α -(CoCrMo) peaks.

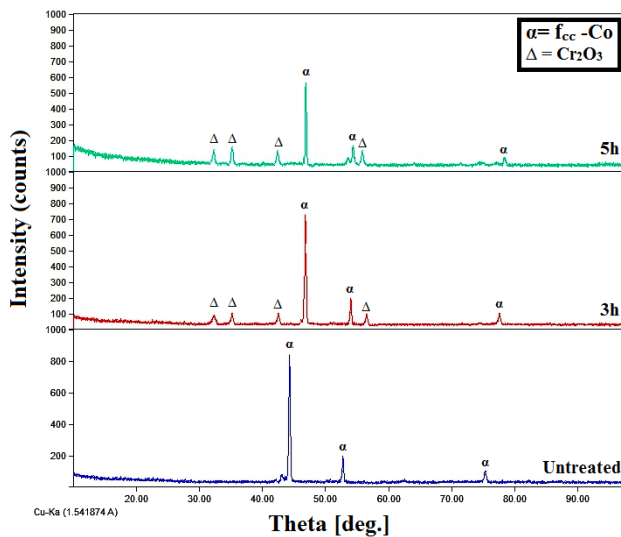


Figure 1. The XRD patterns of untreated and oxidized surfaces

After the oxidizing process, it was seen that the chromium oxide phases were dominant in the microstructure of specimens owing of the fact that chromium atoms have higher affinity to oxygen atoms than to cobalt atoms. At high time (5 hour), the required activation energy of atoms to form oxide is more than that at low time. Therefore, the intensity of oxide phases increased at the specimens that were treated for 5 hour. SEM micrograph of cross-section of oxidized CoCrMo alloys are illustrated in Figure 2.

According to Figure 2, while the lowest oxide layer thickness was obtained from the oxidized samples for 3h, the highest surface layer thickness was obtained from the oxidized samples for 5h. When the process time increased, film thickness also increased with increasing diffusion process (Table 1). The surface hardness values measured from the untreated and

oxidized samples are given in Table 1. The microhardness of untreated CoCrMo alloy was measured as 430HV_{0.1}, while the highest hardness value was obtained from the samples oxidized for 5h as 1690 HV_{0.1}.

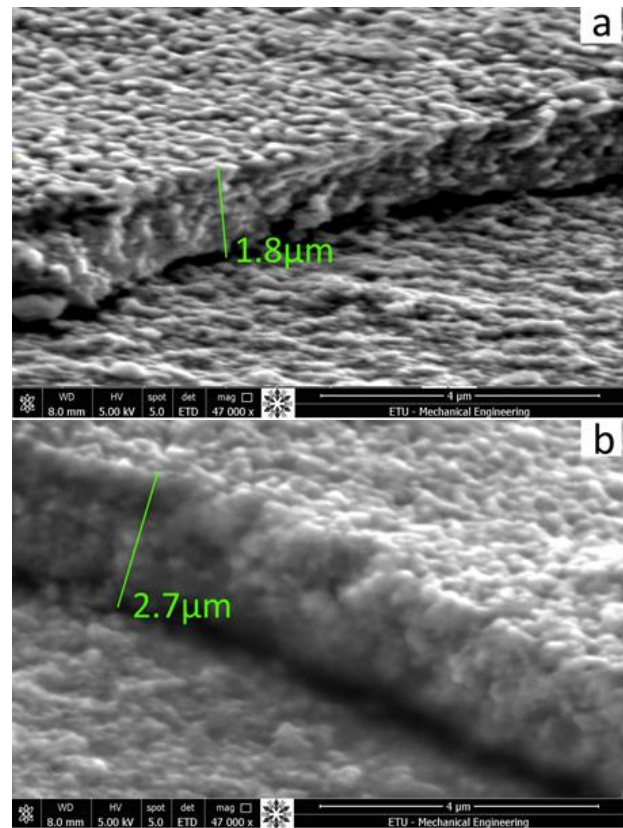


Figure 2. Cross-section SEM images of oxidized surfaces (a) 3h and (5)

Table 1. Surface hardness and layer thickness of untreated and thermally oxidized CoCrMo alloys

Treatment time (hour)	Layer thickness (μm)	Surface hardness HV _{0.1}
3	1.8	1250
5	2.1	1690
untreated	-	430

The increment in surface hardness was owing to formed Cr₂O₃ phase on the surface of CoCrMo alloys after thermal oxidation process. It was also seen that when the treatment time increased, the microhardness values increased due to more oxide phase intensity and thicker oxide layer thickness. The coefficients of friction (COF) of untreated and oxidized specimens are illustrated in Figure 3 for dry conditions.

According to Figure 3, the increment in COF values was observed at the initiation of the wear tests because of Hertzian contact, afterwards, these values were more balanced owing to reduction of roughness for all of specimens. It is seen that the COF value is about 0.71 for the untreated specimen in Figure 3. After thermal oxidation treatment under different process times, the COF of CoCrMo alloys diminished. This decrease is associated with hard oxide layer and

oxide layer thickness. Because thick and hard oxide layer ensure preferable load bearing cases for preventive tools and the existence of hard oxide layer lead to increasing the abrasion resistance of surface and reducing plastic deformation in contact between two surfaces [10].

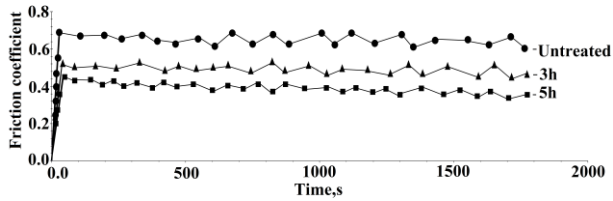


Figure 3. The coefficients of friction of untreated and of oxidized surfaces

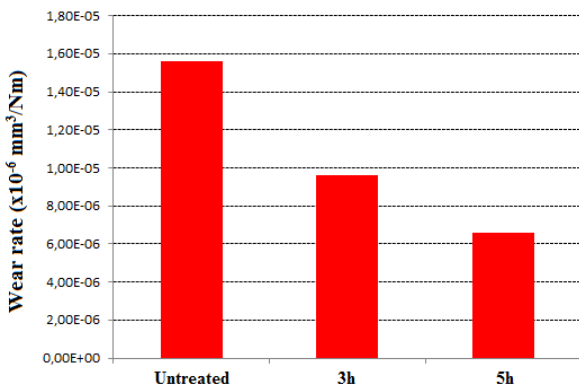


Figure 4 Wear rate of untreated and of oxidized surfaces

Figure 4 shows wear rates of untreated and oxidized specimens. According to results, the thermal oxidation process decreased the wear rate of CoCrMo alloy. Low wear rate of the all oxidized specimens can be ascribed to hard Cr_2O_3 phase, high surface hardness and low friction coefficients compared to untreated specimen. When the treatment time increased, growth of Cr_2O_3 peaks and increment in surface microhardness were observed and the wear rate of oxidized CoCrMo alloy diminished. In Figure 5 the SEM images of wear tracks of specimens are displayed. In Figure 5a, plate-like debris and excessive plastic deformation in the wear scars have been clearly approved that the untreated specimen have exhibited adhesive wear under dry condition. As the wear tracks of untreated and oxidized specimen are investigated, it may be seen that the width of wear tracks diminished after thermal oxidizing process. Also, the narrowest wear tracks were formed on oxidized specimens for 5h (Figure 5c). It is seen that width of the wear track decreased with increasing treatment time. Excellent wear resistance of the treated oxidized samples for 5h may be attributed to its hard Cr_2O_3 layer, film thickness and low coefficients of friction.

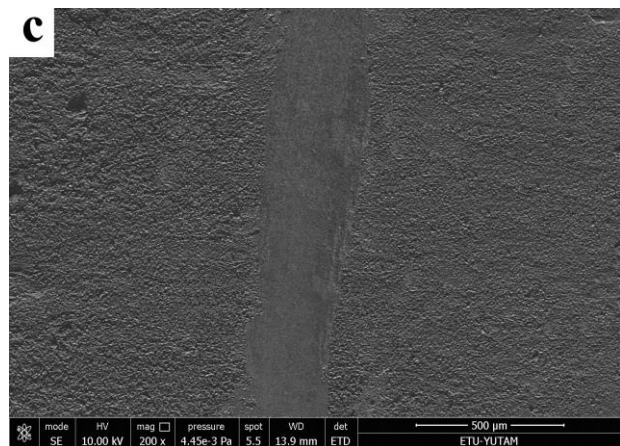
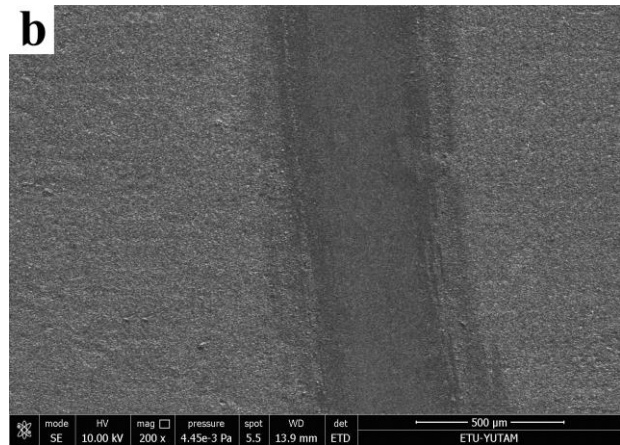
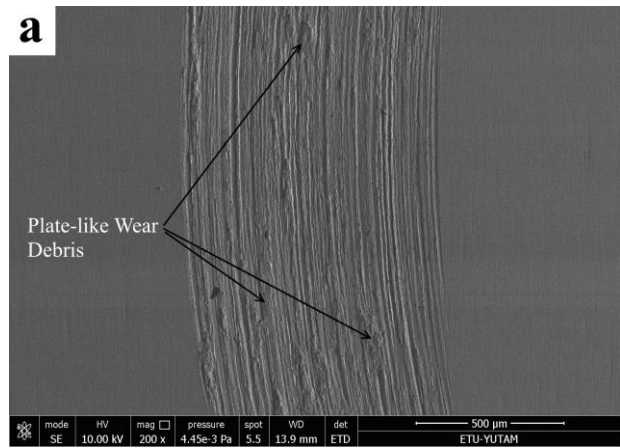


Figure 5 SEM images of wear tracks of (a) untreated and of oxidized surfaces (b) 3h and (c) 5h

4. Conclusion

Thermal oxidation was successfully performed to CoCrMo alloy substrates at 850°C for 3h and 5h. The XRD results indicates that the Cr_2O_3 phases were observed from oxidized specimens. Also, intensity of the phases increased with increasing the treatment times. The applied surface process improved the surface microhardness of CoCrMo alloy. It was concluded the thickness and surface hardness of oxide films increased by increasing treatment time. Wear test results under dry conditions showed the improvement in wear resistance of thermal oxidated specimens in comparison with untreated specimens. Moreover, wear resistance of thermal oxidated

CoCrMo alloy specimens increased with increment of the treatment time.

References

- [1] Aslan, M., Çomaklı, O., Yazıcı, M., Yetim, A.F., Bayrak, Ö., Çelik, A., 2018. The Effect of Plasma Oxidation and Nitridation on Corrosion Behavior of CoCrMo Alloy in SBF Solution. *Surface Review and Letters*, 25(08), 1950024.
- [2] Çelik, A., Aslan, M., Yetim, A.F., Bayrak, Ö., 2014. Wear behavior of plasma oxidized CoCrMo alloy under dry and simulated body fluid conditions. *Journal of Bionic Engineering*, 11(2), 303-310.
- [3] Dong, H., Bell, T., 2000. Enhanced wear resistance of titanium surfaces by a new thermal oxidation treatment. *Wear*, 238(2), 131-137.
- [4] Kumar, S., Narayanan, T.S., Raman, S.G.S., Seshadri, S.K., 2009. Thermal oxidation of CP-Ti: Evaluation of characteristics and corrosion resistance as a function of treatment time. *Materials Science and Engineering: C*, 29(6), 1942-1949.
- [5] Güteryüz, H., Çimenoğlu, H., 2004. Effect of thermal oxidation on corrosion and corrosion-wear behaviour of a Ti-6Al-4V alloy. *Biomaterials*, 25(16), 3325-3333.
- [6] Kumar, S., Narayanan, T.S., Raman, S.G.S., Seshadri, S.K., 2010. Thermal oxidation of CP Ti—An electrochemical and structural characterization. *Materials Characterization*, 61(6), 589-597.
- [7] Arslan, E., Totik, Y., Demirci, E., Alsaran, A., 2010. Influence of surface roughness on corrosion and tribological behavior of CP-Ti after thermal oxidation treatment. *Journal of Materials Engineering and Performance*, 19(3), 428-433.
- [8] Shih, C.C., Shih, C.M., Su, Y.Y., Su, L.H.J., Chang, M.S., Lin, S.J., 2004. Effect of surface oxide properties on corrosion resistance of 316L stainless steel for biomedical applications. *Corrosion Science*, 46(2), 427-441.
- [9] Ayu, H.M., Daud, R., Shah, A., Faiz, M.M., Hazwan, H.M., Salwani, M.S., Tomadi, S.H., Reza, M.S., 2017. Thermal oxidation process improved corrosion in cobalt chromium molybdenum alloys. *International Journal of Advanced and Applied Sciences*, 4(9), 144-149.
- [10] Çomaklı, O., Yazıcı, M., Yetim, T., Yetim, A.F., Çelik, A., 2018. Effect of Ti amount on wear and corrosion properties of Ti-doped Al₂O₃ nanocomposite ceramic coated CP titanium implant material. *Ceramics International*, 44(7), 7421-7428.

İplik Düzgünsüzlük Analizi için Kapasitif Ölçüm Devresi Tasarımı: Matematiksel Yaklaşım ve Gerçekleme

Koray GÜRKAN*¹ 

¹İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Mühendislik Fakültesi, Elektrik-Elektronik Müh. Bölümü, 34320, İstanbul, Türkiye

(Alınış / Received: 17.03.2019, Kabul / Accepted: 27.02.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Anahtar Kelimeler

Analog devre tasarımı,
Kapasitif ölçüm,
Sensör,
İplik düzgünsüzlük

Özet: Tekstil sektörü, hızla gelişen ve Türkiye ihracatının büyük kısmını oluşturan bir sektör haline gelmiştir. Tekstil ürünlerinin dış piyasa ile rekabet edebilmesi için ürün kalitesinin artması gerekmektedir. Ürün kalitesi ise iplik kalitesine bağlı olarak değişebilmektedir. Bu çalışmada iplik kalitesini belirleyen parametrelerden biri olan iplik düzgünsüzlüğünün kapasitif olarak ölçümü için farksal paralel plaka yöntemine dayanan yeni bir ölçüm devresi önerisi yapılmış ve matematiksel olarak analiz edilmiştir. Paralel plakaların ve analog devrenin tasarım adımları, gerçekleştirilmesi, deney düzeneği anlatılmış ve ölçüm sonuçları irdelenmiştir. Tasarlanan devre ile düzgünsüzlük ölçümü oldukça hassas şekilde gerçekleştirilmiştir.

Capacitive Measurement Circuit Design for Yarn Unevenness Analysis: Mathematical Approach and Realization

Keywords

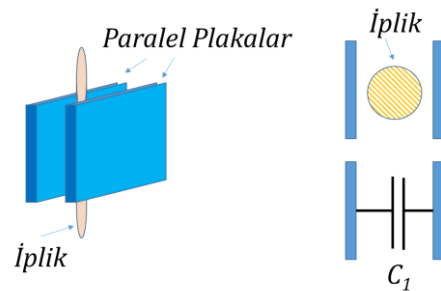
Analog circuit design,
Capacitive measurement,
Sensor,
Yarn unevenness

Abstract: Textile sector has become a rapidly growing export sector constitutes a large part of Turkey. In order to compete with the foreign market, product quality needs to be increased. Product quality may vary depending on yarn quality. In this study, a new measurement circuit based on the differential parallel plate method was proposed and analyzed mathematically for the capacitive measurement of yarn unevenness, which is one of the parameters that determine the yarn quality. The design steps of the parallel plates and the analog circuit, their implementation, the experimental setup are explained and the measurement results are given. With the designed circuit, the yarn unevenness measurement was carried out very precisely.

1. Giriş

Düzgünsüzlük, iplik üretiminde iplik kalitesini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Kesikli liflerden yapılan ipliklerde lif uzunluk farkı, incelik farkı, bitkisel liflerde olgunluk farkı, hayvansal liflerde liflerin alındığı yer farkı gibi sebeplerden dolayı, ipliklerin birim uzunluklarında ağırlık, mukavemet, çap vb. varyasyonlar meydana gelmektedir [1]. İplikteki düzgünsüzlükleri iplik mukavemetinin düşmesine ince ya da kalın noktaların oluşmasına ve bu iplikle oluşan kumaşların boyanmasında lekeli ve bozuk görüntüye sebep olmaktadır. Üretilen ipliğin kalitesinin belirlenmesi ve standartların üzerinde olan düzgünsüzlüğün anında tespit edilebilmesi için en yaygın ölçüm yöntemi kapasitif ölçümdür. Kapasitif yöntemde iplik paralel plakalar arasından belirli bir

hızda geçerken kesit alanı ya da kütlesiyle orantılı olarak kapasite değişimine yol açar. Bu değişimin doğrusal olması beklenir (Şekil 1).



Şekil 1. İplik düzgünsüzlüğünün kapasitif ölçümü

Aynı şartlar altında bu kapasitenin zamana göre değişimi ölçülürse ipliğin kütle değişimine ait iki önemli parametre olan düzgünsüzlük (% U) ve

*İlgili yazar: kgurkan@istanbul.edu.tr

değişim katsayısı (% CV) elde edilir. U ve CV aşağıdaki şekilde bulunur;

$$U = \frac{100}{\bar{x}T} \int_0^T |x_i - \bar{x}| dt \quad (1)$$

$$CV = \frac{100}{\bar{x}} \sqrt{\frac{1}{T} \int_0^T (x_i - \bar{x})^2 dt} \quad (2)$$

Bu eşitliklerde T ölçüm süresi, x_i ipliğin anlık kütle değeri, \bar{x} ölçüm süresi içerisindeki ortalama kütlelerdir. Kütle değişimindeki hata da üç tür olarak sınıflandırılır. Kütle az olduğu alanlar ince yer, % 100'den daha düşük olmak üzere kütle arttığı noktalar kalın yer ve % 100 oranındaki kütle artışları olan noktalar Neps olarak adlandırılır [2].

Düzgünsüzlüğün analizi ve hatalı noktaların yakalanabilmesi için kapasitif yöntemde kapasitenin ölçümü titiz bir çalışma gerektirmektedir. Ölçülen kapasitenin seviyesi oldukça düşük seviyelerde olduğundan paralel plakaların ve analog devrenin tasarımında ekranlama, düşük gürültülü aktif elemanların kullanımı, nem ve sıcaklık gibi çevresel şartlara duyarlı ölçüm önemlidir. Tasarım iyi yapılmazsa hem kaçak kapasitelerden hem de değişen çevre şartlarından dolayı ölçüm devresi tutarsız sonuçlar verebilir ya da doyuma gidebilir.

Clive ve Slater [3], düzgünsüzlük ölçüm kapasitelerindeki elektrik alanın benzetimini yaparak paralel plaka etrafına yerleştirilecek koruma elektrodunun elektrik alan doğrusallığını arttırdığını ve koruma elektrodu olmadan alınan ölçümlerdeki hataların yok olduğunu göstermişlerdir.

Carvalho vd. [4], yaptıkları çalışmada 4 mm genişliğindeki plakalarla oluşturdukları kapasitenin ölçümünü 100 kHz'de hazır bir tümleşik devre (Microsensors, MS3110) kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Devre kapasite değeriyle orantılı analog çıkış verdiği için kapasite değişimini PCI-6024E veri toplama kartı ile 200 kHz'de alıp LabView programıyla analiz etmişlerdir. Tümleşik devre 10 pF'a kadar ölçüm yapabilmektedir.

Bir diğer çalışmada Pinto vd. [5], paralel plakaları bu kez 1 mm genişliğinde tasarlamış ve farksal ölçüm yöntemini uygulamışlardır. Bu yöntemde göre sistemde iki farklı kapasite bulunmaktadır. Birincisi sadece havanın kapasitesini ölçerken diğeri ipliğin ve havanın kapasitesini ölçtüğünden diferansiyel ölçüm sağlamışlardır. Bu şekilde çevresel koşulların ölçüme etkisi azaltılmıştır.

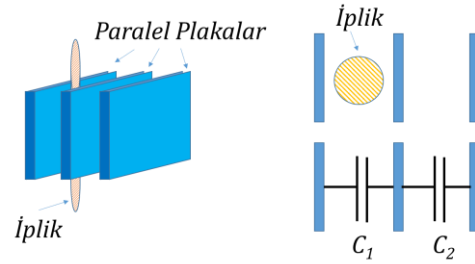
Gang vd. [6] yaptıkları çalışmada kapasitif sensör için paralel plaka ile silindirik yapıdaki elektrot yapısının karşılaştırmalı olarak sonlu elemanlar yöntemi ile analiz etmişlerdir. Ayrıca hassas olarak kapasite

değişimini gerilime çeviren ve otomatik olarak doyumu engelleyen bir devre önermişlerdir.

Bu çalışmalara ek olarak Zellweger Uster firmasının kapasitif elektrot tasarımına ilişkin patentleri bulunmaktadır [7-11]. Bu patentlerde de kapasite plakalarının nasıl olması gerektiği, üretim yöntemleri ve algılama elektronuğu önerilmiştir. Kapasite farkının aşırı artması sonucu meydana gelebilecek doyumu engellemek amacıyla otomatik dengeleyici eklenmiştir.

Kapasitif yöntemde ek olarak düzgünsüzlüğün optik olarak ölçümüne yönelik çalışmalar da bulunmaktadır [12-18]. Bu yöntemler tamamen farklı bir prensipte çalıştığından bu makale kapsamında detaylarına girilmeyecektir.

Bu makalede iplik düzgünsüzlüğünün kapasitif olarak ölçümü için farksal paralel plaka yöntemine dayanan yeni bir ölçüm devresi önerisi yapılmış ve matematiksel olarak analiz edilmiştir. Paralel plakaların ve analog devrenin tasarım adımları, gerçekleşmesi, deney düzeneği ve ölçüm sonuçları irdelenmiştir.

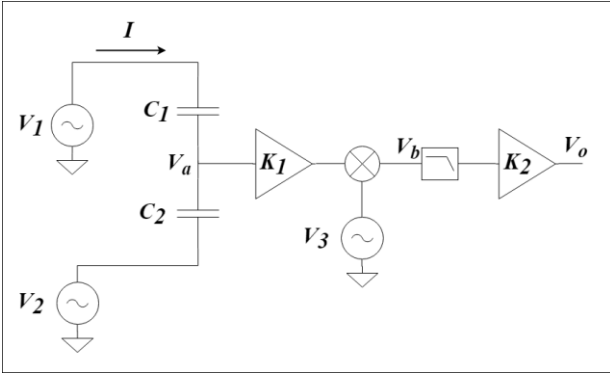


Şekil 2. İplik düzgünsüzlüğünün farksal ölçümü

2. Materyal ve Metot

2.1. Ölçüm devresinin tasarımı ve teorisi

İplik düzgünsüzlüğünün kapasitif olarak ölçümü için önerilen devrenin blok şeması Şekil 3'te verilmiştir. C_1 ve C_2 Şekil 2'de belirtilen kapasitörleri ifade etmektedir. Bu kapasiteler farksal yapıda olan sensör yapısını oluşturmaktadır. Plaka mesafeleri farklı yapılarak iki ayrı farklı kalınlıkta ipin geçebileceği ölçüm ortamı yaratılmıştır. Ölçüm ortamındaki havanın dielektrik değişiminden kaynaklı etki iki kapasiteye aynı anda etkiyeceğinden bu ortak mod etki tasarlanan devre ile kompanze edilecektir. Burada C_1 içerisinde ip geçerken C_2 boşta. Tam tersi durumda C_2 içerisinde ip geçerken C_1 de boşta bırakılabilir. Prensip olarak mutlaka bir plakanın boşta olması gerekmektedir. V_1 , V_2 ve V_3 sinüzoidal kaynaklardır. V_a kapasite bölücünün orta noktasındaki gerilim olup K_1 ile kuvvetlendirildikten sonra analog çarpıcıda V_3 ile çarpılarak V_b gerilimini oluşturmaktadır. Yüksek frekanslı bileşenler alçak geçiren süzgeç ile süzülükten sonra K_2 ile kuvvetlendirilerek V_o çıkışı oluşturulmaktadır.



Şekil 3. Önerilen ölçüm yönteminin blok şeması

Şekil 3'teki devrede I akımı aşağıdaki şekilde yazılabilir;

$$I = Y_{es}(V_1 - V_2) \quad (3)$$

Burada Y_{es} ; seri bağlı C_1 ve C_2 kapasitelerinin oluşturduğu eşdeğer admittanstır.

$$Y_{es} = s \frac{C_1 C_2}{C_1 + C_2} \quad (4)$$

V_a gerilimi;

$$V_a = V_1 - Y_{es}(V_1 - V_2)Z_{C_1} \quad (5)$$

denklemleri ile elde edilir. (3), (4) ve (5) yoluyla;

$$V_a = V_1 \frac{C_1}{C_1 + C_2} + V_2 \frac{C_2}{C_1 + C_2} \quad (6)$$

şeklinde düzlenebilir. V_1 ile V_2 kaynakları arasında 180° , V_1 ile V_3 kaynakları arasında θ kadar faz farkı olduğunu varsayarsak;

$$V_1 = A \cos(\omega t) \quad (7)$$

$$V_2 = A \cos(\omega t + \pi) \quad (8)$$

$$V_3 = A \cos(\omega t + \theta) \quad (9)$$

V_b gerilimi;

$$V_b = K_1 V_a V_3 \quad (10)$$

$$V_b = K_1 \left[V_1 V_3 \frac{C_1}{C_1 + C_2} + V_2 V_3 \frac{C_2}{C_1 + C_2} \right] \quad (11)$$

$$\begin{aligned} V_b &= K_1 \frac{A^2}{2} \left[\frac{C_1}{C_1 + C_2} [\cos(\theta) + \cos(2\omega t + \theta)] \right. \\ &\quad \left. + \frac{C_2}{C_1 + C_2} [\cos(\pi - \theta) + \cos(2\omega t + \theta + \pi)] \right] \quad (12) \end{aligned}$$

Görüldüğü gibi çarpıcı çıkışındaki V_b gerilimi kaynak frekanslarının iki katı frekansında titreşen sinüzoidal işaretten ve DC işaretten meydana gelmektedir. Yüksek frekanslı işaret alçak geçiren süzgece girip K_2 ile kuvvetlendirildiğinde V_o çıkışı elde edilir;

$$V_o = K_1 K_2 \frac{A^2}{2} \left[\frac{C_1}{C_1 + C_2} \cos(\theta) + \frac{C_2}{C_1 + C_2} \cos(\pi - \theta) \right] \quad (13)$$

Bu durumda faz farkına göre çıkışın maksimum değerleri aşağıdaki şekilde bulunur;

$$V_o = \begin{cases} K_1 K_2 \frac{A^2}{2} \left[\frac{C_1 - C_2}{C_1 + C_2} \right], & \theta = 0 \\ K_1 K_2 \frac{A^2}{2} \left[\frac{C_2 - C_1}{C_1 + C_2} \right], & \theta = \pi \end{cases} \quad (14)$$

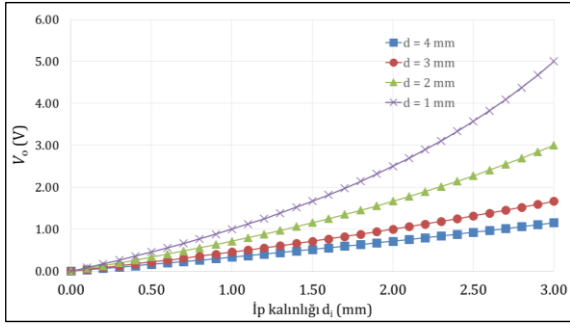
Eşitlik 14'e göre $\theta = 0$ için $C_1 > C_2$ durumunda çıkış pozitif, aksi durumda negatif olacaktır. Şekil 2'deki paralel plakalar için C_1 ve C_2 kapasitelerini oluşturan levhaların yüzey alanları S_1 ve S_2 , birbirine uzaklıkları d_1 ve d_2 ve ip kalınlığı d_i olsun. ϵ_0 vakumun dielektrik sabiti (8.85×10^{-12} F/m), ϵ_i ipin bağlı dielektrik sabiti olmak üzere oluşan C_1 ve C_2 kapasiteleri aşağıdaki şekilde hesaplanabilir [6];

$$C_1 = \epsilon_0 \frac{S_1}{d_1 - d_i + \frac{d_i}{\epsilon_i}} \quad C_2 = \epsilon_0 \frac{S_2}{d_2} \quad (15)$$

Pratik olarak düzgünsüzlük miktarının %100 değerine çıkabileceği düşünülürse ipin levhalar arasından sürtünmeden geçebilmesi için d_1 mesafesinin, d_i değerinin iki katından daha büyük olması gerekir. Plakaların boyutlarında ipin hareketine paralel olan doğrultudaki yüzeyin uzunluğu düzgünsüzlük ölçümünün çözünürlüğünü belirler. İpin hareket doğrultusuna dik olan plaka yüzeyinin uzunluğu ise yine ip kalınlığına göre belirlenir ve ölçülmesi düşünülen ip kalınlığının en az iki katı olmalıdır. Plakaların yüzey alanı ve plaka mesafeleri için $S_1 = S_2 = S$ ve $d_1 = d_2 = d$ kabulü yapıp $\theta = 0$ için V_o çıkışı hesaplanırsa;

$$V_o = K_1 K_2 \frac{A^2}{2} \left[\frac{d_i \left(1 - \frac{1}{\epsilon_i}\right)}{2d - d_i \left(1 - \frac{1}{\epsilon_i}\right)} \right] \quad (16)$$

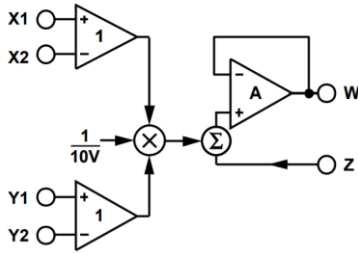
eşitliği elde edilir. Farklı plaka mesafesinin ve iplik kalınlığının V_o çıkışına etkisini görselleştirebilmek adına keyfi olarak seçilen $K_1 = K_2 = 1$, $A = 10$, $\epsilon_i = 2$ durumu için dört farklı plaka mesafesinde iplik kalınlığına göre V_o değişimi Şekil 4'te verilmiştir. Görüldüğü gibi plakalar yaklaştıkça hassaslık artmasına rağmen iplik kalınlığı ile V_o çıkışı arasındaki doğrusal ilişki bozulmaktadır.



Şekil 4. Farklı plaka mesafeleri ve ip kalınlıkları için V_o değişimi

2.2. Gerçekleme

Ölçüm yöntemi olarak önerilen Şekil 3'deki devrenin V_1 , V_2 ve V_3 işaretleri tek bir sinüzoidal kaynaktan elde edilmiştir. Fonksiyon üreticiden alınan, sinüzoidal işaret sırasıyla hem evirmeyen hem de eviren devre topolojisi ile uygun işlemsel yükselticilerle (Analog Devices, AD843) 20 dB kuvvetlendirilerek zıt fazdaki V_1 ve V_2 gerilimleri elde edilmiştir. $\theta = 0$ için $V_3=V_1$ olacağından V_3 kaynağı da sağlanmıştır. V_a gerilimi ise 23 dB kuvvetlendirilerek analog çarpıcıya bağlanmıştır.



Şekil 5. Kullanılan analog çarpıcının blok şeması [19]

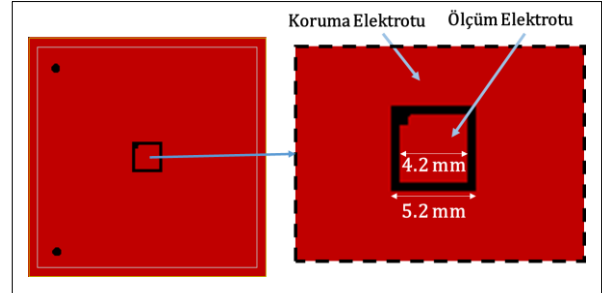
Kullanılan analog çarpıcının (Analog Devices, AD633) blok şeması Şekil 5'te görülmektedir. Çarpıcının transfer fonksiyonu $W=(X1-X2).(Y1-Y2)/10+Z$ şeklindedir. $X2$, $Y2$ ve Z girişleri toprak seviyesine çekildiğinde W çıkışı $X1$ ve $Y1$ çarpımının 10'da biri olmaktadır. Böylelikle V_b çıkışı da elde edilmiştir. V_b çıkışındaki işaret kesim frekansı 50 Hz olan alçak geçiren süzgeç ile süzüldükten sonra kazancı ayarlanabilir bir evirmeyen yükseltici ile kuvvetlendirilerek (ST, TL081) V_o çıkışı elde edilmiştir. Devredeki tüm işlemsel yükselticiler ve analog çarpıcı +/- 12V DC ile beslenmiştir.

2.3. Paralel plakaların tasarımı ve üretimi

Kapasitörü oluşturan paralel plakalar iki ayrı grup şeklinde tasarlanmıştır. Ortadaki plakalar uç plakalardan farklı olarak koruma elektrotu ve algılama elektrotundan oluşmaktadır. Algılama elektrotu ile koruma elektrotu ölçüm devresinde elektriksel olarak aynı potansiyele getirilerek kaçak kapasitenin oluşması engellenmiştir. Algılama elektrotunun boyutu kapasitenin alanını belirlemektedir ve denemeler için 4.2 mm x 4.2 mm olacak şekilde tasarlanmıştır (Şekil 6). Uç plakaların

sınırı ise koruma elektrotu ile aynı boyuttur. Paralel plakalar arasındaki mesafe 3 mm olacak şekilde tasarım yapılmıştır. Bu parametrelere göre C_1 (iplik yokken) ve C_2 kapasiteleri hesaplandığında teorik olarak 0.052 pF'lık kapasite değeri elde edilmektedir.

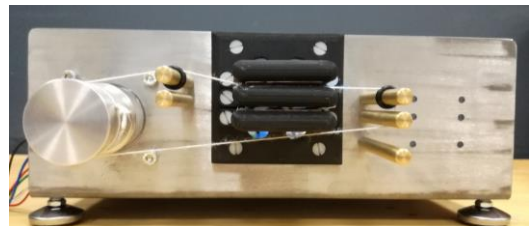
Tüm plakalar PCB prototipleme makinesi (MITS Electronics, ElevenLab) ile kazıma yoluyla 1.6 mm kalınlığında 30 μ m bakır yüzeyi olan FR4 malzemeden üretilmiştir.



Şekil 6. Orta bölümdeki paralel plakaların yapısı

2.4. Testler

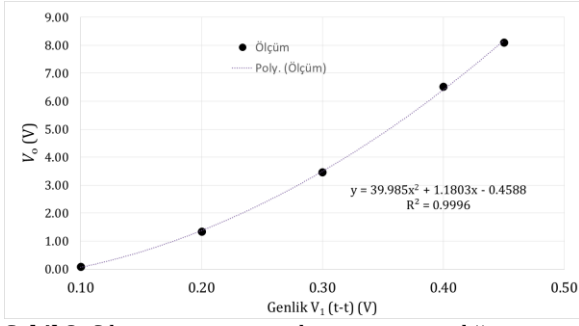
İplik düzgünsüzlük ölçümü için kurulan devrenin statik testi için fonksiyon üreticiden (Rigol, DG1062) alınan frekansı 200 kHz ve tepe değeri 500 mV olan sinüzoidal işaret devreye uygulanmıştır. İp sabitken frekansın ve genliğin çıkış işaretine etkisi, çarpıcı çıkışı ve devre çıkışı incelenmiş bu amaçla V_o ve V_b çıkışı sayısal osiloskop (Rigol, MSO1074) ekranında görüntülenmiştir. Dinamik test için ipliğin ileri ve geri yönde ölçüm plakalarını ortalayacak şekilde hareket edebilmesini sağlayan düzenek ve kapasitif plakaları sabitleyen kaide Pro-Ser Tekstil Test Cihazları Ltd. Şti. desteğiyle üretilmiştir (Şekil 7). Mekanik hareketi sağlayan adım motorunun devri ayarlanarak iplik hareketi istenilen hıza getirilmiş ve devrenin dinamik tepkisi incelenmiştir.



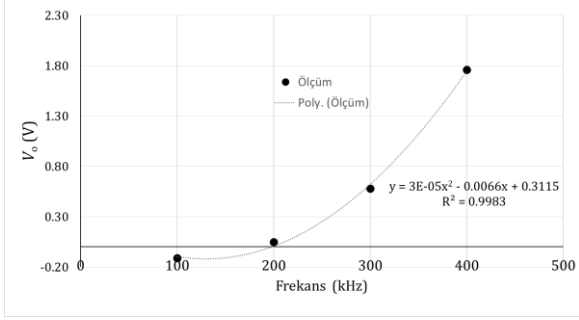
Şekil 7. Gerçeklenen ölçüm sisteminin önden görünümü

3. Bulgular

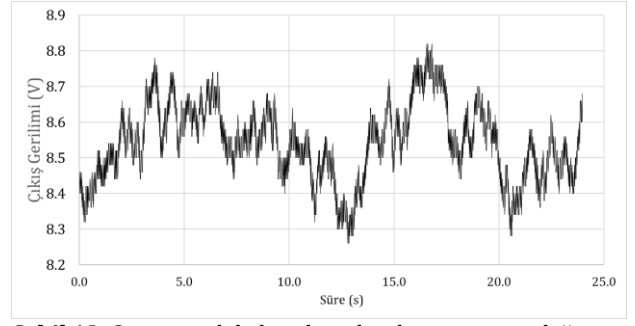
Devrenin statik testinde ortalama kalınlığı 0.4 mm olan iplik kullanıldığında işaret frekansı 200 kHz için işaret genliği arttıkça çıkıştaki DC kayıklığın arttığı gözlemlenmiştir. Ölçülen değerlere göre eğri uydurulduğunda değişimin karesel olduğu görülmektedir (Şekil 8). Frekans artışı da aynı etkiyi yapmıştır (Şekil 9). Uygulanan işaret frekansı 200 kHz için çıkış işareti ip yokken 6.44 V, ip plakalar arasına girdiğinde 8.54 V ölçülmüştür.



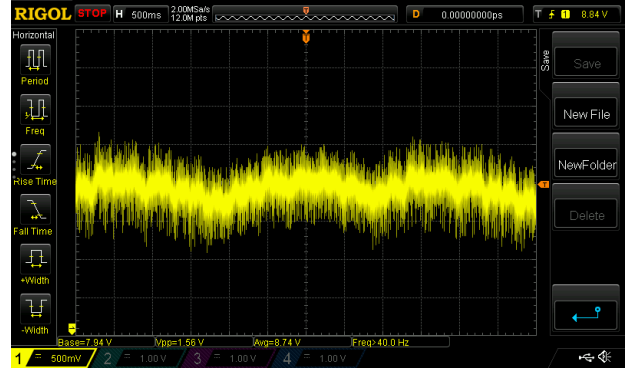
Şekil 8. Çıkış işaretinin uygulanan işaret genliğine göre değişimi



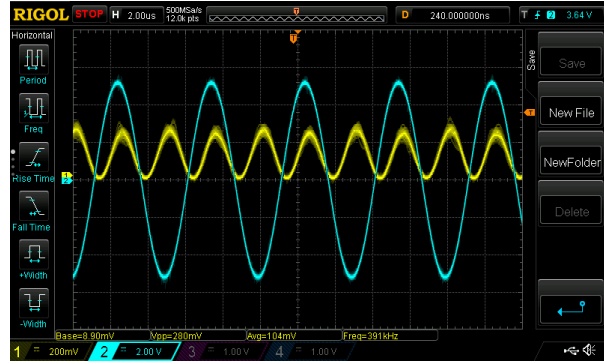
Şekil 9. Çıkış işaretinin uygulanan işaret frekansına göre değişimi



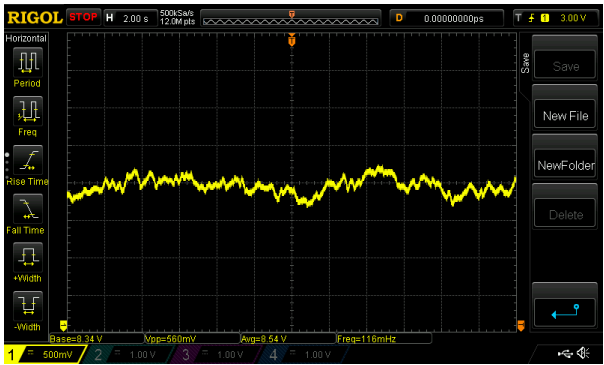
Şekil 12. Sistemin el ile hareketiyle çıkış işaretinin değişimi



Şekil 13. Otomatik hareketi ile çıkış işaretinin değişimi

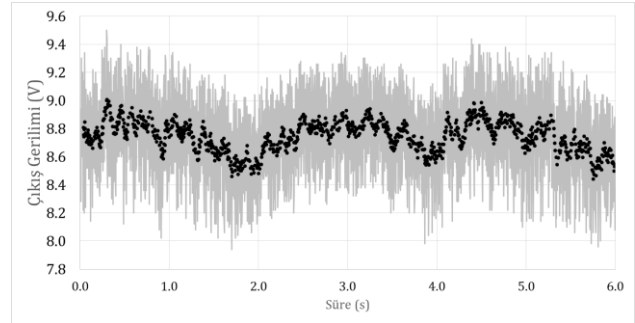


Şekil 10. V_1 işaret kaynağı (mavi) ve çarpıcı çıkışında ölçülen işaret (sarı)



Şekil 11. Sistemin el ile hareketiyle çıkış işaretinin osiloskoptan alınan değişimi

Şekil 3'teki prensip devredeki V_1 işaret kaynağı ile çarpıcının çıkışı olan V_b noktasındaki işaretin gerçekleşen devreden ölçülen osiloskop görüntüsü Şekil 10'da verilmiştir. Çarpıcı çıkışında belirli bir kayıklıkta V_1 frekansının iki katı frekansında (400 kHz) sinüzoidal işaret görülmektedir.



Şekil 14. Gürültüsü giderilmiş çıkış işareti

Sistemin elle tek yönde döndürülmesi ile ip kalınlığındaki değişimden dolayı çıkışın etkilenmesi Şekil 11'de görülmektedir.

Osiloskop verilerinin bilgisayara alınarak detaylı çizdirilmesi sonucu elde edilen grafik Şekil 12'de verilmiştir. Durağan halde 8.54 V okunan değerin geçişleriyle ± 280 mV'lık değişim göstermiştir. Standart sapma 110 mV olarak hesaplanmıştır.

Adım motoru çalıştırılarak belirli bir süre ileri ve daha sonra geri yönde 0.145 m/s hızda iplik hareketi verildiğinde alınan çıkış gerilimi Şekil 13'te verilmiştir. Motor sargılarından kaynaklanan elektromanyetik akım darbelerinin sistem çıkışını etkilediği görülmektedir.

Gürültünün giderilmesi amacıyla, osiloskoptan alınan veriler Excel ortamına aktarılmıştır. Ham durum için standart sapma 374 mV'dir. Kayan ortalama süzgeci ile süzülen verinin istatistik analiz için kullanılabilir hale gelebildiği görülmüştür (Şekil 14).

Şekil 14'te ipin hareket yönü 3. saniyede değişmektedir. Eğriye dikkatle bakıldığında 3. saniyeye göre simetriktir. Bu da ölçülen gerilimdeki değişimin önce ileri daha sonra geri yönde ilerleyen ip kütlesindeki değişimden kaynaklandığını doğrulamaktadır. Gerilim değerinin standart sapma değeri ipin kütle değişiminden kaynaklanan standart sapma değeri ile orantılı olacaktır. Bu nedenle düzgünsüzlük ve değişim katsayısı belirli bir ölçek farkıyla hesaplanabilir.

4. Tartışma ve Sonuç

İplik düzgünsüzlüğünü kapasitif olarak ölçmek üzere önerilen devre teorik ve pratik olarak doğrulanmıştır. Devre çıkışının, uygulanan sinüzoidal işaret genliği ile karesel olarak değişmesi analiz sonucu ulaşılan çıkış denklemi ile uyumaktadır. Devre çıkışının iplik yokken sıfır değerine gelmemiş olması paralel plakaların oluşturduğu C_1 ve C_2 kapasite değerlerinin eşit olmadığını göstermektedir. Devrede ölçülmesi hedeflenen ve femto Farad seviyelerindeki kapasiteler kaçak kapasitelerin etkisiyle dengesizleştikten devrenin yüksek kazançlı ile beraber çıkışı yüksek bir kayıplık seviyesine getirmektedir. Devrenin çıkışında iplik varken ve yokken ölçülen DC değerler devrenin oldukça hassas çalıştığını göstermektedir. İpliğin hareket ettiği durumda da çıkış işaretindeki değişimin net görülmesi bu sonucu doğrulamaktadır. Önerilen devre ile iplik düzgünsüzlüğü net olarak gözlenmiştir. Düzgünsüzlük analizi için daha uzun ip geçişi sağlayan düzenek ile daha uzun süreli kayıt alınması planlanmaktadır. Yapılacak yeni çalışmalarla hareket mekanizmasındaki gürültünün etkisi azaltılacak, sıcaklık ve nemin çıkışa olan etkisi farklı iplikler için incelenecektir.

Teşekkür

Bu çalışma Pro-Ser Tekstil Test Cihazları Ltd. Şti. tarafından desteklenmiştir.

Kaynakça

- [1] Goswami, B.C., Martindale, J.G., Scardino, F.L. 1977. Textile Yarns: Technology, Structure and Applications. John Wiley and Sons. New York, 482s.
- [2] Gries, T. and Veit, D. Wulforst, B. 2015. Textile Technology: An Introduction. Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG, 457s.
- [3] Nancy K. Clive, K. Slater. 1974. Simulation of the Electric Field in Evenness-Testing Capacitors, The Journal of The Textile Institute, 65(8), 397-401.
- [4] Carvalho, V., Pinto, J. G., Monteiro, J., Vasconcelos, R. M., Soares, F. O. 2003. On-line measurement of yarn evenness. IEEE

- International Symposium on Industrial Electronics, 9-11 Haziran, Brezilya, 1059-1064.
- [5] Pinto, J. G., Carvalho, V., Monteiro, J. L., Vasconcelos, R. M., Soares, F. O. 2007. Yarn-mass Measurement with 1-mm-length Samples. IEEE Transactions on Industrial Electronics, 54(2), 1177-1183.
- [6] Gang, Y., Entao, Y., Shencun, H., Ning, J. 2016. The research on High Sensitivity and Anti-saturation of Capacitance Sensors for Measuring Yarn Evenness. 10th International Conference on Sensing Technology (ICST), 11-13 Kasım, Çin, 1-6.
- [7] Hoffmann, D. 1973. Measuring Capacitor. United States Patent, US3754172A, 1-4.
- [8] Geiter, P., Rolf, J. 1999. Methode and Device for Measuring the Solid Proportion of a Material Under Test. European Patent Office, EP0924513A1, 1-10.
- [9] Ott, P., Schmid, P. 2008. Device and Method for Examining a Solid, Elongate Product to be Tested. United States Patent, US20080111563A1, 1-11.
- [10] Gehrig, R., Phillipp, O., Rolf, J. 2014. Capacitive Measuring Circuit for Yarn Inspection. United States Patent, 8698510, 1-10.
- [11] Peters, G., Vries, L. D., Storz, R. 2016. Electrode Assembly for Capacitively Testing an Elongated Textile Material. World Intellectual Property Organization, WO2016149842A1, 1-21.
- [12] Carvalho, V., Cardoso, P., Belsley, M., Vasconcelos, R. M., Soares, F. O. 2006. Development of a Yarn Evenness Measurement and Hairiness Analysis System. 32nd Annual Conference on IEEE Industrial Electronics, 6-10 Kasım, Fransa, 3621-3626.
- [13] Carvalho, V. H., Belsley, M. S., Vasconcelos, R. M., Soares, F. O. 2009. Automatic Yarn Characterization System: Design of a Prototype. IEEE Sensors Journal, 9(8), 987-993.
- [14] Carvalho, V., Belsley, M., Vasconcelos, R., Soares, F. 2011. A comparison of Mass Parameters Determination Using Capacitive and Optical Sensors. Sensors and Actuators A: Physical, 167(2), 327-331.
- [15] Sparavigna, A., Broglia, E., Lugli, S. 2004. Beyond Capacitive Systems with Optical Measurements for Yarn Evenness Evaluation. Mechatronics, 14(10), 1183-1196.

- [16] Ozkaya, Y. A., Acar, M., Jackson, M. 2005. Digital Image Processing and Illumination Techniques for Yarn Characterization. *Journal of Electronic Imaging*, 14(2), 023001, 1-13.
- [17] Sengupta, A., Roy, S., & Sengupta, S. 2015. Development of a Low Cost Yarn Parameterisation Unit by Image Processing. *Measurement*, 59, 96-109.
- [18] Li, G., Akankwasa, N. T., Zhao, Q., & Wang, J. 2019. A Novel System for Yarn Cross-Section Analysis Based on Dual Orthogonal CCD Sensors. *Journal of Natural Fibers*, 16(1), 114-125.
- [19] Analog Devices. 2019. <http://www.analog.com> (Erişim Tarihi: 28.02.2019).

***Aspergillus niger* Katalazının Üretimi, Üçlü-Faz Ayırma ile Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu**

Eda BAYKAL SARI¹ , Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ*² 

¹Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, 41001, Kocaeli, Türkiye

²Kocaeli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 41001, Kocaeli, Türkiye

(Alınış / Received: 02.05.2019, Kabul / Accepted: 23.12.2019, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Anahtar Kelimeler

Aspergillus niger,
Katalaz,
Üçlü-faz ayırma sistemi,
Oksidaz,
Peroksidaz

Özet: Bu çalışmada *Aspergillus niger* katalazının üretimi, saflaştırılması ve karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Buna göre 1 litrelik YpSs sıvı büyüme ortamında 37°C ve 155 rpm çalkalama hızında büyütülen *A. niger*'den 7. günde ham enzim ekstraktı elde edilmiştir. Katalaz enzimi üçlü-faz ayırma (TPP) tekniği ile saflaştırılmıştır. Bunun için %80 (w/w) amonyum sülfat içeren ve ham ekstrakt:t-butanol oranı 1:1.5 olacak şekilde pH 7.0'da hazırlanan sistemden enzim %263 verim ile 7.9 kat saflaştırılmıştır. K_m değeri (21.4 mM), optimum reaksiyon sıcaklığı (50°C) ve optimum reaksiyon pH'sı (6.0) belirlenmiştir. Kararlılık testleri, enzimin geniş pH (4.0-9.0) aralığında dayanıklı kalabildiğini göstermiştir. Ayrıca katalaz aktivitesinin %7.5'lik (v/v) etanol varlığında yaklaşık %77'sinin korunduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, esas fonksiyonunun yanında 4-metil katekol ve katekol gibi fenolik bileşikleri peroksitten bağımsız olarak okside edebilmiştir. Sonuç olarak, *A. niger*'den katalaz enziminin geleneksel kromatografi yöntemi yerine zamandan tasarruf sağlayan, maliyeti ucuz ve kullanımı oldukça kolay olan üçlü faz sistemleri ile saflaştırılabildiği görülmektedir. Enzimin sahip olduğu biyokimyasal özellikleri (pH ve etanol kararlılığı ve ikincil oksidaz aktivite varlığı), çeşitli endüstriyel uygulama alanlarında avantaj sağlayabilir.

Production, Purification of *Aspergillus niger* Catalase by Three-Phase Partitioning and Its Biochemical Characterization

Keywords

Aspergillus niger,
Catalase,
Three-phase partitioning,
Oxidase,
Peroxidase

Abstract: In this study, it was aimed to produce, purify and characterize catalase enzyme from *Aspergillus niger*. For that purpose, the cells of *A. niger* were grown at 37°C and 155 rpm in 1 liter YpSs broth media and on the 7th day of cultivation the crude enzyme extract was obtained from the growth media. Catalase enzyme was purified by three-phase partitioning method. Accordingly, the system prepared by 80% (w/w) ammonium sulfate saturation at pH 7.0 with 1:1.5 (v/v) ratio of crude extract to t-butanol gave 7.9-fold purification with 263% activity recovery. The K_m value (21.4 mM), the optimum reaction temperature (50°C) and the optimum reaction pH (6.0) were determined. Stability tests indicated that the enzyme can remain its activity in a broad pH (4.0-9.0) range. Additionally, it was observed that about 77% of initial catalase activity was maintained in the presence of 7.5% (v/v) ethanol. Besides its main function, it can also oxidase some phenolic compounds like 4-methyl catechol and pyrocatechol in a peroxide-independent way. As a consequence, it was seen that the catalase enzyme can be purified from *A. niger* by a three-phase partitioning system known as a time-effective and inexpensive system and very easy to use rather than a conventional chromatography. Its biochemical properties (pH and ethanol stabilities and presence of a secondary oxidase activity) can provide advantages in various industrial applications.

*İlgili yazar: yyuzugullu@yahoo.com

1. Giriş

Katalazlar (E.C. 1.11.1.6) antioksidan etkilerini hücredeki fazla hidrojen peroksidin (H_2O_2) moleküler oksijen ve suya parçalanmasını sağlayarak gösterirler. Genel olarak katalazları üç gruba ayırabiliriz: Monofonksiyonel "hem" grubu içeren katalazlar, Katalaz-peroksidazlar ve Demir/hem içermeyip Mn içeren katalazlar [1]. *Aspergillus* türlerinde farklı sayıda ve çeşitte katalaz enzimi üretilmektedir. Genel olarak *Aspergillus*'larda bir adet katalaz-peroksidaz enzimi (miselyumda) bulunur. Diğer yandan monofonksiyonel katalazlar (miselyum ve konidyada bulunan) bir veya daha fazla sayıda olabilir [2-4].

A. niger ticari katalaz enzim kaynaklarından biri olmakla birlikte bu küfte en az dört farklı katalaz enziminin üretildiği bulunmuştur. Bunlardan ikisinin glukoz oksidaz enziminin varlığına bağlı olarak üretildiği rapor edilirken diğer iki katalazın *Neurospora crassa* katalazı (monofonksiyonel) ile genetik benzerlik taşıdığı belirtilmiştir [5]. Ancak *A. niger*'de gözlenen katalaz enzimlerinin kinetik özellikleri henüz araştırılmamıştır.

Bu çalışmada, *A. niger* katalazının üretimi, Üçlü-Faz Ayırma Sistemi (Three-Phase Partitioning-TPP) ile saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonu hedeflenmiştir. TPP proteinlerin bozulmadan sıvı fazda kalması için uygun bir ortam sağlamanın yanı sıra işlem süresinin kısa olması, enzimin yüksek geri kazanımla ve düşük maliyette saflaştırılması gibi ayrıcalıklara sahiptir. Sistem, ham enzim ekstraktına amonyum sülfat (tuz) ve t-butanol (organik çözücü) eklenmesinden oluşur. Sonuçta iki ayrı sıvı faz (üstte alkol içeren faz ve altta tuzlu sulu faz) meydana gelir. Amonyum sülfat, proteinlerin "salting-out" etkisiyle dereceli olarak çökmelerini sağlayan bir tuzdur. Butanol ise istenmeyen bileşiklerin (düşük molekül ağırlığına sahip lipid ve fenolik maddeler) biyomoleküllerden seçici olarak uzaklaştırılmasını sağlar. Düşük hızda uygulanan santrifüj ile proteinler pellete (ara faza) geçer. Ara fazın tamponda tekrar çözünmesiyle spesifik ve toplam aktivite geri kazanılır, bazen de artar. TPP'nin en önemli avantajı büyük ve küçük ölçekli bütün çalışmalara uygulanabilmesidir. Diğer saflaştırma yöntemleri ile kıyaslandığında; harcanan amonyum sülfat miktarı, protein saflaştırmada ara işlemlerden biri olan tuzla çöktürme işlemine göre çok düşük olacağından ve geri kazanımının da mümkün olduğu düşünülürse, maddi açıdan oldukça makul bir maliyet tablosu ortaya çıkmaktadır [6]. TPP, günümüzde birçok biyomolekülün saflaştırılmasında kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak invertaz (*Solanum tuberosum*) [7], pektinaz (*Lycopersicon esculentum*) [8], β -galaktozidaz (*Cicer arietinum*) [9], proteaz inhibitörü (*Eleusine coracana*) [10], tripsin inhibitörü (*Glycine max*) [11], α -galaktozidaz (*Solanum muricatum*) [12] ve ksilinaz (*A. niger*) [13] verilebilir.

Literatürde katalazların farklı mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılmasına yönelik raporlar mevcuttur; ancak küflerden katalaz eldesi üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır [14]. Bu çalışmalar incelendiğinde çoğunlukla kromatografik yöntemlerin kullanıldığı görülmektedir [15-17]. Dolayısıyla, katalazların küflerden TPP ile saflaştırılmasına yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Mikroorganizma ve kültür hazırlanması

Küfe ait spor süspansiyonlarını hazırlamak amacıyla örnek PDA'da (Patates Dekstroz Agar, Potato Dextrose Agar) 30°C sıcaklıkta 7 gün süreyle büyütülmüştür. Agar üzerinde gelişen sporlar 30 ml'lik steril %0.01 (v/v) Tween 80 içeren çözelti içine alınarak spor sayımı Petroff - Hausser Lamı kullanılarak gerçekleştirilmiştir [18]. Daha sonra spor süspansiyonları steril Tween 80 içeren çözelti ile ml'sinde 1 milyon spor içerecek şekilde seyreltilmiş ve %80 (v/v) gliserol eklenerek -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Küfün büyütülmesi için örneğe ait 100 μ l'lik spor süspansiyonu (10^6 spor/ml) 20 ml'lik öncü büyüme ortamında canlandırıldıktan sonra 2000 ml'lik erlenler içerisinde 1000 ml hazırlanan besiyerine (10 g/l glukoz, 0.5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g/l K_2HPO_4 ve 4 g/l maya ekstraktı) aktarılmış ve 10 gün boyunca 155 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır [19]. Katalaz üretiminin optimizasyonu için ısı şoku ile oksidatif stres uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Isı şoku yaratmak amacıyla kültürler 37, 42, 45, 50 ve 55°C sıcaklık derecelerinde büyütülmüştür [20]. Oksidatif stres için ise ön kültürün aktarıldığı ana büyüme ortamına H_2O_2 , 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM ve 2 mM derişimlerinde katalaz aktivitesinin optimum üretildiği günde (7. gün) her 30 dakikada bir eklenerek 2 ila 6 saat (2, 3, 4, 5 ve 6 saat) inkübe edilmiştir [21].

2.2. Biyokütle tayini

Biyokütle tayini için 24 saatte bir 50'er ml örnek kültür ortamından toplanarak hücreler Whatman filtre kağıdından (No:1) filtrasyon yolu ile uzaklaştırılmıştır. Süzölmüş ortam sıvısı (süpernatant), enzim aktivite ve protein miktar tayinlerinde kullanılmıştır. Filtre kağıdında bulunan hücreler ise distile su ile yıkandıktan sonra kuru ağırlığının belirlenmesi üzerine 100°C'de sabit bir ağırlığa ulaşınca kadar bekletilmiş ve biyokütle tayininde kullanılmıştır [22]. Biyokütleden ayrılan ortam sıvısı, ham enzim ekstraktı olarak isimlendirilmiş, saflaştırma ve katalitik aktivite tayininde kullanılmıştır.

2.3. Enzim aktivite tayini

Katalaz aktivitesi spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. 1 ml'lik reaksiyon sıvısı, 10 mM H₂O₂ solüsyonundan 2.9 ml ve enzim solüsyonundan 0.1 ml (pH 7.0) konularak hazırlanmıştır. Reaksiyon sıcaklığı 25°C'ye ayarlandıktan sonra hidrojen peroksidin kaybolma hızı 240 nm'de ölçülerek hesaplanmıştır. 1 Ünite aktivite, 1 µmol H₂O₂'i 1 dakikada parçalayabilen enzime karşılık gelmektedir [15]. Enzim aktivite analizlerinde "kontrol" olarak reaksiyon ortamına enzim yerine tampon çözelti eklenerek aktivite ölçümleri yapılmıştır.

2.4. Protein miktar tayini

Protein konsantrasyonu Bradford Metoduna göre belirlenmiş; standart grafiğin çizilmesinde protein olarak siğir serum albümini kullanılmıştır [23].

2.5. Üçlü-faz ayırma sistemi

Çalışmada, 2 ml ham enzim ekstraktı, farklı amonyum sülfat doygunluklarına (%40, %50, %60, %70, %80 ve %90, w/w) getirilmiş ve karışıma farklı ham enzim ekstrakt/t-bütanol oranları (1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5 ve 1.0:2.0) sağlanacak şekilde t-bütanol eklenmiştir. Sistem pH'sı farklı pH'larda (4.0-9.0) hazırlanmıştır. Karışım oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra 4500 rpm'de 10 dak santrifüjlenerek faz ayrımları gözlenmiştir [7, 24]. Proteinin bulunmasının beklenmediği butanolce zengin üst faz dikkatlice pipetlenerek ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra orta ve alt fazlar toplanarak 100 mM sodyum fosfat tampon çözeltisine (pH 7.0) karşı bir gece diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonrası orta ve alt fazlarda aktivite ve protein değerleri yukarıda anlatılan şekilde spektrofotometrik yöntemle tespit edilmiştir.

Spesifik bir enzimin TPP ile ayrımının analizi aşağıda verilen parametrelerin değerlendirilmesi ile mümkündür [25]:

Spesifik aktivite (**SA**), 1 mg protein başına düşen enzim ünitesidir. Her bir basamaktaki enzim aktivitenin (U/ml) yine her basamaktaki protein konsantrasyonuna (mg/ml) bölünmesiyle hesaplanır. Saflaştırma katsayısı (**PF**), herhangi bir fazda ölçülen enzime ait spesifik aktivitenin ham enzim ekstraktında ölçülen enzim aktivitesine oranıdır. Protein geri kazanım değeri (**%R**) ise herhangi bir fazdaki enzim aktivite değerinin sisteme eklenen enzimin başlangıçtaki aktivitesine oranıdır.

2.6. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Katalaz enzim saflığının kontrolü SDS-PAGE analizi ile yapılmıştır. Buna göre elektroforez, Bio-Rad Mini-Protean sistemi kullanılarak; %5 (v/v) yükleme jeli

ve %15 (v/v) ayırma jeli hazırlanarak gerçekleştirilmiştir [26]. Protein markör'ü olarak BioRad Low Range (14-97 kDa) kullanılmıştır. Elektroforez 200 V'da yaklaşık 50 dak yürütülerek gerçekleştirilmiş ve yürütülen jeller elde edilen protein konsantrasyonuna göre gümüş boyama [27] ile boyanmıştır.

2.7. Sıcaklık ve pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi

Sıcaklığın enzim üzerine etkisini incelemeye 30°C - 70°C sıcaklık aralığında aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesi (% Bağlı Aktivite) ve reaksiyon sıcaklık değerleri arasında çizilen grafik ile enzimin optimum reaksiyon sıcaklık değeri belirlenmiştir. Termal kararlılık tayini için ise aynı miktarda protein ihtiva eden enzim örnekleri 60 dak boyunca farklı sıcaklıklarda (30, 40, 50, 60 ve 70°C) inkübe edilip ardından standart aktivite ölçüm değerinde (25°C'de) aktivite tayinleri yapılmıştır.

Farklı pH değerlerinin katalitik aktivite üzerindeki etkilerini belirlemek için 4.0 ile 9.0 arasında değişen farklı pH'larda (4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) standart koşullar altında spektrofotometrede (Cary60, Agilent) enzim aktivite ölçümü alınmıştır. pH 4.0 - 5.0 arasındaki reaksiyonlar için 100 mM sitrat tampon çözeltisi, pH 6.0 ile 7.0 için 100 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi, pH 8.0 için 100 mM tris tampon çözeltisi ve pH 9.0 için 100 mM glisin sodyum hidroksit tampon çözeltileri kullanılmıştır. pH'nın enzim dayanıklılığı üzerine etkisini test etmek için ise aynı pH aralığı arasında hazırlanmış tampon çözeltilerde enzim örnekleri 1 saat inkübe edildikten sonra katalaz aktivite ölçümleri yapılmıştır [28].

2.8. Organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerine etkisi

Organik çözücülere karşı katalaz enziminin dayanıklılık derecesini incelemek amacıyla, aseton, etanol, dimetil sülfoksit (DMSO) ve metanol son konsantrasyonları % 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20 ve 25 (v/v) olacak şekilde reaksiyon karışımına direk eklenmiş [22] ve katalaz aktivite tayini yukarıda açıklanan şekilde gerçekleştirilmiştir.

2.9. Kinetik parametrelerin belirlenmesi

A. niger'den saflaştırılan katalaz örneği 0.1-70 mM arasındaki farklı konsantrasyonlarda hidrojen peroksit substrat olarak kullanılarak aktiviteleri ölçülmüş; K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk Plot ile hesaplanmıştır [29].

2.10. Oksidaz/peroksidaz substrat özgüllüğü

Katalaz enziminin olası ikincil oksidatif/peroksidatif aktivite özelliği spektrofotometrik yöntemle test edilmiştir. Buna göre (saf) enzim aktivitesi farklı

oksidaz/peroksidaz substratları varlığında analiz edilmiştir. Kullanılan substratlar arasında pirogallol (430 nm), hidrokinnon (440 nm), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid, 420 nm), guaiakol (465 nm) ve L-tirozin (475 nm) yer almaktadır [22, 30].

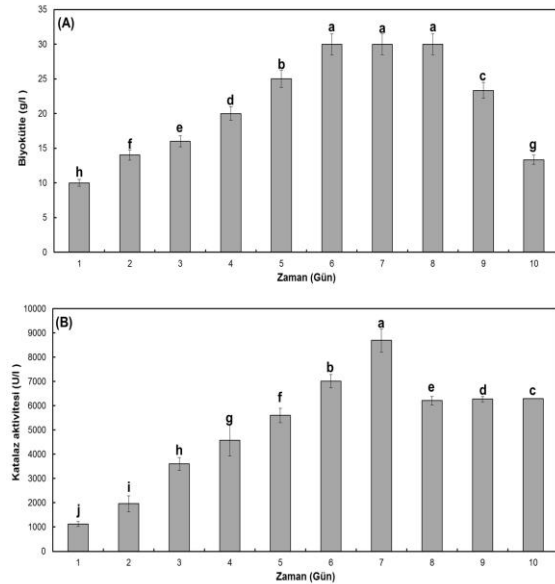
2.11. İstatistiksel analiz

Denemeler farklı zaman dilimlerinde üç kez tekrar edilmiştir. Veriler arasındaki istatistiksel farklılığın derecesi ($p < 0.05$) veri setine göre Duncan veya Tukey HSD çoklu karşılaştırma testine göre belirlenmiştir. İstatistiksel analiz IBM SPSS Statistics 19 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3. Bulgular

3.1. Zamana bağlı katalaz üretimi

%1 (w/v) glukoz içeren besi ortamında 10 gün boyunca büyütülen *A. niger*'de ölçülen hücre dışı katalaz üretimi ve biyokütle tayin sonuçları Şekil 1'de gösterilmektedir. Buna göre, küfün büyümesi sırasında gözlenen Logaritmik faz altıncı güne kadar sürmüştür. Diğer yandan küf 6. güne durağan faza girmiş ve 8. güne kadar bu fazda kalmıştır. Katalaz aktivitesi ise küf büyümesine paralel olarak artış göstermiş; en yüksek değerine küf durağan fazda (7. gün) iken ulaşmıştır.



Şekil 1. *A. niger*'e ait (A) biyokütle (g/l) ve (B) katalaz (U/l) aktivite grafiği. *A. niger*, karbon kaynağı olarak %1 (w/v) glukoz içeren 1 litrelik YpSs büyüme ortamında büyütülmüştür. Hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı harfleri taşıyan değerler arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel önemli fark yoktur ($p < 0.05$).

3.2. Katalaz üretiminin optimizasyonu

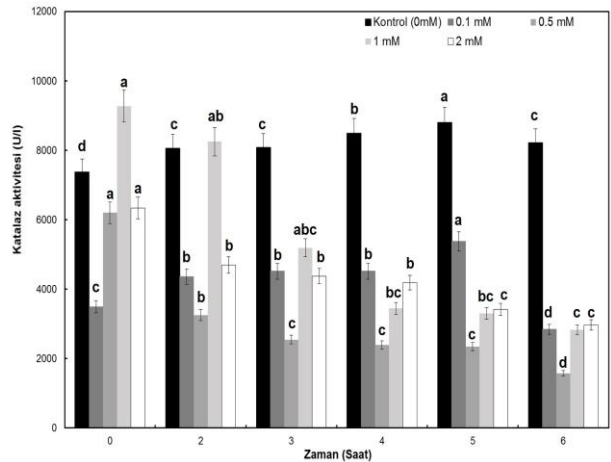
Katalaz enzim üretiminin optimizasyonunda eşit miktarda spordan canlandırma yapılarak büyütülen *A.*

niger'de sıcaklığın ve H_2O_2 'nin katalaz üretimine olumlu/olumsuz etkileri araştırılmıştır. Buna göre, katalaz aktivitesinin en yüksek bulunduğu değer küfün $37^\circ C$ sıcaklıkta (Tablo 1) büyütüldüğü ve H_2O_2 'nin büyüme ortamına eklenmediği (Şekil 2) koşullarda ölçülmüştür.

Tablo 1. Sıcaklığın katalaz üretimine etkisi

Sıcaklık ($^\circ C$)	Katalaz aktivitesi (U/l)
30	8688±480b
37	9128±148a
45	6269±937c
47	-d
50	-d
55	-d

Bir kritere ait kolondaki farklı harfler, Duncan çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel olarak ortalamalar arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ($p < 0.05$). Standart sapma ($\pm SS$).



Şekil 2. Hidrojen peroksit (H_2O_2) konsantrasyonunun katalaz aktivite üzerine etkisi. *A. niger*, karbon kaynağı olarak %1 (w/v) glukoz içeren 1 litrelik YpSs sıvı büyüme ortamında büyütülmüştür. H_2O_2 , büyüme ortamına enzim üretiminin optimum olduğu yedinci gününde 30'ar dakika arayla eklenmiştir. Hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı harfleri taşıyan değerler arasında Tukey HSD çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel önemli fark yoktur ($p < 0.05$).

3.3. Katalaz enziminin üçlü-faz ayırma sistemi ile kısmi saflaştırılması

A. niger'den elde edilen süpernatandan (1 mg protein; 79 U/mg) katalaz enziminin saflaştırılmasında kullanılan TPP sistemi Bölüm 2.5'te açıklandığı şekilde uygulanmıştır. Bu amaçla, farklı derişimlerde hazırlanan amonyum sülfat ve t-butanol çözeltileri kullanılmıştır. Öncelikle optimum amonyum sülfat konsantrasyonunu belirlemek için ham ekstrakt/t-butanol oranı 1:1 olan farklı amonyum sülfat konsantrasyonları ile hazırlanan sulu üçlü faz sistemlerinde *A. niger* katalazının dağılımı gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir. Buna göre *A. niger* katalazı hazırlanan faz kompozisyonlarının çoğunda dağılıma göstermiştir. En yüksek saflaştırma katsayısı (7.0) ve aktivite geri kazanım değerleri (%206), %80 (w/w) amonyum sülfat ile hazırlanan sistemin ara fazında ölçülmüştür.

Tablo 2. Amonyum sülfat (AS) konsantrasyonunun TPP sisteminde katalaz ayırımına etkisi

	SA (U/mg)	Toplam aktivite (U)	Toplam protein miktarı (mg)	PF	%R	
Ham ekstrakt	79	79	1.0	1.0	100	
%40 (w/w) AS	Üst faz*	-	-	-	-	
	Ara faz	-	0.1	-	-	
	Alt faz	316	151	0.5	4.0	191
%50 (w/w) AS	Üst faz*	-	-	-	-	
	Ara faz	24	13.4	0.6	0.3	17
	Alt faz	71	40	0.6	0.9	51
%60 (w/w) AS	Üst faz*	-	-	-	-	
	Ara faz	103	104	0.9	1.3	132
	Alt faz	270	27	0.1	3.4	34
%70 (w/w) AS	Üst faz	97	67	0.7	1.2	85
	Ara faz	75	13	0.2	3.0	160
	Alt faz*	-	-	-	-	-
%80 (w/w) AS	Üst faz	-	0.3	-	-	
	Ara faz	540	162	0.3	7.0	206
	Alt faz	79	32	0.4	1.0	40
%90 (w/w) AS	Üst faz*	-	-	-	-	
	Ara faz	383	115	0.3	5.0	146
	Alt faz*	-	-	-	-	-

*Bu fazlarda enzim aktivite ve protein miktar tayinleri negatif sonuç vermiştir. SA: spesifik aktivite, PF: Saflaştırma katsayısı, %R: Enzim aktivite geri kazanımı. Sistem pH'sı 6.0, sıcaklığı ise 25°C'dir.

Daha sonra amonyum sülfat konsantrasyonu (80%, w/w) sabit tutularak farklı ham ekstrakt/t-butanol oranlarında hazırlanmış sistemlerde spektrofotometrik analizler gerçekleştirilmiştir. Bir önceki basamakta enzimin seçici olarak ara fazda toplandığı belirlendiğinden sadece ara faz sonuçları değerlendirilmiştir. Tablo 3'de belirtildiği üzere enzimin saflık derecesi 1:1, 1:1.5 ve 1:2 sistemlerinde 1:0.5'e göre daha iyi çıkmıştır. 1:1.5 oranında hazırlanan sistemde maksimum saflaştırma katsayısı (7.7) ve aktivite geri kazanımı (%212) elde edilmiştir. Bu sebeple, ileriki denemeler ham ekstrakt:t-butanol oranının 1:1.5 olduğu sistemlerde yapılmıştır.

Tablo 3. Ham ekstrakt/t-butanol oranının TPP sisteminde katalaz ayırımına etkisi

	SA (U/mg)	Toplam aktivite (U)	Toplam protein miktarı (mg)	PF	%R
HE	79	79	1.0	1.0	100
HE: t-but 1.0:0.5	158	96	0.6	2.0	121
HE: t-but 1.0:1.0	540	162	0.3	7.0	206
HE: t-but 1.0:1.5	611	168	0.3	7.7	212
HE: t-but 1.0:2.0	466	161	0.3	5.9	204

HE: Ham ekstrakt, t-but: t-butanol, SA: spesifik aktivite, PF: Saflaştırma katsayısı, %R: Enzim aktivite geri kazanımı. Sistem pH'sı 6.0, sıcaklığı ise 25°C'dir.

Optimum sistem pH'sını tayin etmek için ham ekstrakt %80 (w/w) amonyum sülfatla doyurulduktan sonra sistem pH'sı ayarlanmıştır. Tablo 4, farklı pH'larda hazırlanan sistemlerde ölçülen enzim aktivite ve miktar bulgularını göstermektedir. En yüksek saflaştırma katsayısı (7.9)

ve aktivite geri kazanım değerleri (%263), pH'sı 7.0 olan sistemde ölçülmüştür.

Tablo 4. TPP sistem pH'sının katalaz ayırımına etkisi

	SA (U/mg)	Toplam aktivite (U)	Toplam protein miktarı (mg)	PF	%R
HE	79	79	1.0	1.0	100
pH 3.0	142	16	0.1	1.8	20
pH 4.0	158	28	0.2	2.0	35
pH 5.0	198	36	0.2	2.5	45
pH 6.0	611	168	0.3	7.7	212
pH 7.0	624	208	0.3	7.9	263
pH 8.0	174	28	0.2	2.2	36
pH 9.0	150	19	0.1	1.9	24

HE: Ham ekstrakt, t-but: t-butanol, SA: spesifik aktivite, PF: Saflaştırma katsayısı, %R: Enzim aktivite geri kazanımı. Sistem sıcaklığı 25°C'dir.

3.4. SDS-PAGE analizi

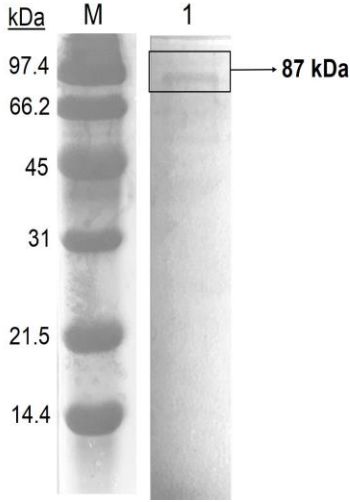
TPP sistemi ile saflaştırılan katalaz enziminin saflığının kontrolü %15'lik SDS-PAGE ile gerçekleştirilmiştir. Elektroferez sonrası jel, gümüş boyama metodu ile boyanmıştır. Şekil 3'de görüldüğü üzere örneğe ait yaklaşık 87 kDa civarında tek bir bant gözlenmiştir.

3.5. *A. niger* katalazının biyokimyasal karakterizasyonu

3.5.1. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi

Sıcaklığın enzim aktivitesi ve dayanıklılığı üzerine etkisinin incelenmesi denemelerinde TPP sistemi ile kısmen saflaştırılmış enzim kullanılmıştır. Optimum reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi için enzim aktivite

ölçümleri 30 ila 70°C arasında değişen sıcaklıklarda yapılmıştır. En yüksek aktiviteler 50-60°C arasında ölçülmüş olup maksimum aktivite değerine 50°C'de ulaşılmıştır (Şekil 4A).



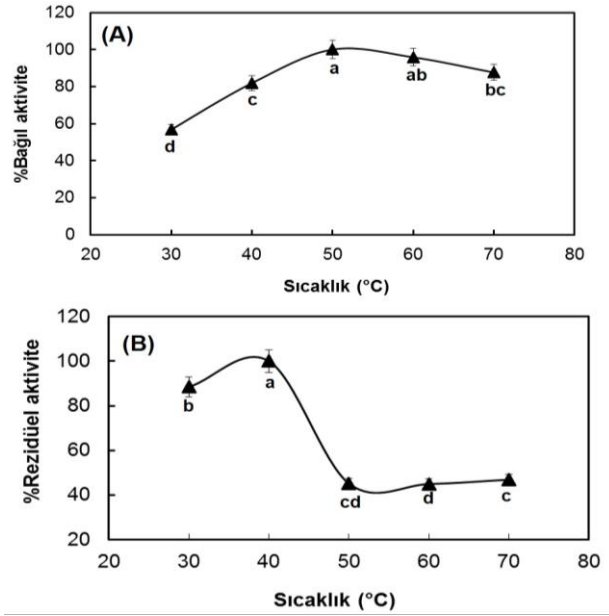
Şekil 3. *A. niger*'den TPP ile saflaştırılan katalazın SDS-PAGE jel görüntüsü. M, protein markör (marker) (Bio-Rad Unstained SDS-PAGE Standards, Amerika); 1, %80 (w/w) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konsantrasyonunda, 1:1.5 ham ekstrakt/t-butanol oranında ve pH 7.0'da hazırlanmış sistemden izole edilen katalaz örneği.

Termal kararlılık testlerinde ise enzim yukarıda belirtilen sıcaklık aralığında yaklaşık 60 dak inkübe edildikten sonra örnekler 25°C'ye (aktivite ölçüm sıcaklığı) soğutulmuş ve aktivite ölçümleri standart koşullarda (pH 7.0, 25°C) gerçekleştirilmiştir. Şekil 4B'de görüldüğü üzere enzim 40°C'de aktivitesini korumaktadır. Ancak 40°C'den sonra aktivitede %53-55 oranında kayıp gözlenmiştir.

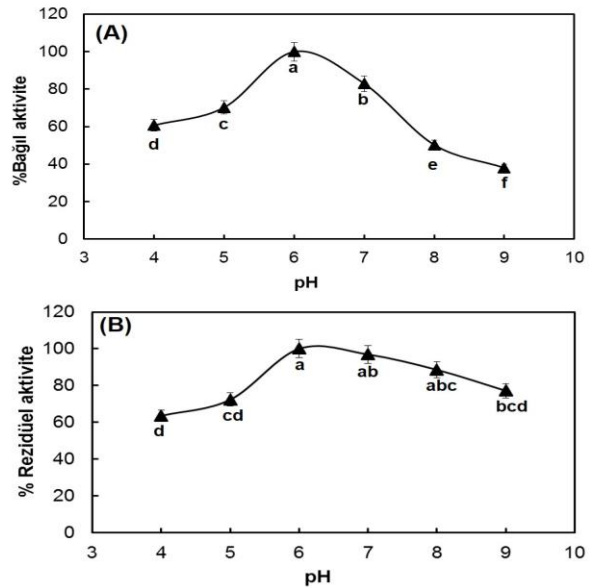
3.5.2. Ortam pH'sının enzim aktivitesi üzerine etkisi

Katalaz enzimi için optimum reaksiyon pH değeri 6.0 olarak belirlenmiştir (Şekil 5A). Diğer yandan pH 7.0'da, pH 6.0'da ölçülen aktiviteye göre yaklaşık %82'sinin, pH 5.0'da ise %70'inin korunduğu gözlenirken 8.0 ve üzerindeki pH değerlerinde ise aktivitede hızlı bir düşüş olduğu görülmüştür.

Enzimin pH kararlılığını tayin etmek için saflaştırılmış örnek pH'sı 4.0'dan 9.0'a kadar değişen farklı tampon çözeltilerde yaklaşık 60 dak bekletildikten sonra standart koşullarda (pH 7.0, 25°C) aktivite analizleri yapılmıştır. Buna göre, katalaz enziminin aktivitesini en iyi koruduğu pH değeri 6.0'dır (Şekil 5B). Bu değer üzerinde rezidüel aktivitede pH artışına bağlı olarak kademeli bir düşüş gözlenirse de bu düşüş en fazla %77-97 arasındadır. Benzer şekilde düşük pH değerlerinde de aktivitenin %63'ünden fazlasının korunduğu görülmektedir.



Şekil 4. Sıcaklığın *A. niger* katalaz (0.022 mg protein/ml) aktivitesi ve kararlılığına etkisi. Enzim aktivite ölçümlerinde 10 mM H_2O_2 ve 100 mM Sodyum fosfat tampon çözeltisinden (pH 7.0) oluşan karışım kullanılmıştır. (A) Farklı reaksiyon sıcaklığı değerlerinde ölçülen bağlı aktivite grafiği (B) Farklı sıcaklıklarda enzimin 60 dak inkübasyon sonrası standart aktivite (pH 7.0, 25°C) ölçümlerine dayalı rezidüel aktivite grafiği. Hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı harfleri taşıyan değerler arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel önemli fark yoktur ($p < 0.05$).



Şekil 5. Ortam pH'sının *A. niger* katalaz (0.022 mg protein/ml) aktivitesi ve kararlılığına etkisi. Enzim aktivite ölçümlerinde 10 mM H_2O_2 ve 100 mM Sodyum fosfat tampon çözeltisinden (pH 7.0) oluşan karışım kullanılmıştır. (A) Farklı reaksiyon pH değerlerinde ölçülen bağlı aktivite grafiği (B) Farklı pH değerlerinde hazırlanan tampon çözeltilerde enzimin 60 dak inkübasyon sonrası standart aktivite (pH 7.0, 25°C) ölçümlerine dayalı rezidüel aktivite grafiği. Hata çubukları standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı harfleri taşıyan değerler arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel önemli fark yoktur ($p < 0.05$).

3.5.3. Organik çözücülerin etkisi

Biyotransformasyon uygulamalarında çoğunlukla organik çözücüler kullanılmaktadır [31]. Bu nedenle, biyokatalizör olarak katalazın bazı organik çözücüler varlığında aktivitesinde meydana gelebilecek olası değişiklikleri analiz etmek üzere enzim aktivite ölçümleri etanol, metanol, aseton ve DMSO varlığında yapılmıştır. Bulgular Tablo 5'de gösterilmektedir.

Organik çözücülerin eklendiği reaksiyon ortamlarında genel olarak çözücü konsantrasyonunun artışına bağlı olarak aktivitede kademeli olarak azalma gözlenmiştir. Kullanılan çözücüler içinde katalaz enzimini olumsuz yönde en fazla etkileyen asetonudur. %5 (v/v) ve üzeri konsantrasyonlarda aktivite tamamen inhibe olmuştur (Tablo 5). Diğer yandan etanol enzim aktivitesi üzerinde %7.5'e (v/v) kadar önemli düzeyde bir azalmaya sebep olmamıştır. Fakat, %10 (v/v) derişiminde reaksiyon ortamına eklendiğinde kontrole göre (çözücü eklenmemiş ortam) aktivitenin yaklaşık %56 kadarı kaybolmuştur. Metanol ve DMSO eklenmesi ise %2.5'lük (v/v) derişimlerinde aktivitenin yaklaşık yarısının kaybolmasına sebep olurken %10'da (v/v) metanol enzimi tamamen inhibe etmiştir.

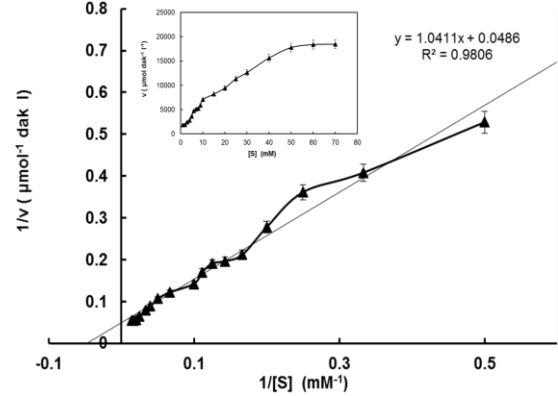
3.5.4. K_m ve V_{max} tayini

A. niger katalazına ait K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanması için oluşturulan Lineweaver-Burk diyagramı Şekil 6'da verilmiştir. Enzimin hızını ve substratına olan afinitesini belirten bu değerlerin hesaplanması amacıyla katalaz enziminin substratı olan H_2O_2 'nin 0.1 - 70 mM aralığındaki konsantrasyonlarında aktivite tayini yapıldı. Lineweaver-Burk diyagramından ($1/S$ 'ye karşı $1/V$) K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 21.4 mM ve 20.000 $\mu\text{mol/dak/l}$ olarak belirlendi.

3.5.5. Oksidatif/Peroksidatif substratların belirlenmesi

A. niger katalazında diğer katalazlarda [15, 28, 30, 32, 33, 34, 35] olduğu gibi peroksitten bağımsız ikincil aktivitenin varlığını araştırmak üzere farklı peroksidaz ve oksidaz substratlarına karşı aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular

Tablo 6'da gösterilmiştir. Buna göre *A. niger*'den izole edilen katalazın polifenol oksidaz (substrat ilgisi: 4-metil katekol>katekol) aktivitesi gösterdiği bulunmuştur.



Şekil 6. Katalaz enziminin Lineweaver-Burk diyagramı (Substrat [S]: Hidrojen peroksit, H_2O_2) [29]. Ekli küçük resim, H_2O_2 konsantrasyonunun katalaz aktivitesine etkisini gösteren Michaelis-Menten grafiğini göstermektedir. Hata çubukları, *Sigmaplot* 14.0 (Systat Software Inc.) kullanılarak hesaplanmış olup her bir verinin ortalamaya göre ne kadar uzaklıkta olduğunu göstermektedir.

Tablo 6. *A. niger* katalazının farklı oksidatif/peroksidatif substratlarına ilgisi ve *T. versicolor* lakkazı ile turp peroksidazıyla karşılaştırılması

Substrat (mM*)	%Bağıl Oksidatif/Peroksidatif aktivite		
	<i>A. niger</i> katalazı	<i>T. versicolor</i> lakkazı	Turp peroksidazı
4-Metil Katekol (100 mM)	100	3.4	-
Katekol (100 mM)	1.8	0.02	-
Pirogallol (285 mM)	-	-	100
Guaicol (2 mM)	-	28.4	-
Guaicol (5 mM)	-	41.5	-
ABTS (5 mM)	-	100	-
Hidrokinon (100 mM)	-	-	-
L-Tirozin (5 mM)	-	-	-

*Substratlar için kullanılan konsantrasyon değerleri literatürden [22, 53] seçilmiştir.

Tablo 5. Organik çözücülerin katalaz aktivite üzerine etkisi

Organik çözücü	% v/v	Bağıl katalaz aktivitesi (%)	Organik çözücü	% v/v	Bağıl katalaz aktivitesi (%)
Negatif kontrol (organik çözücü yok)		100	Negatif kontrol (organik çözücü yok)		100
	2.5	98		2.5	59
	5	87		5	-
Etanol	7.5	81	Aseton	7.5	-
	10	44		10	-
	2.5	45		2.5	49
Metanol	5	25	DMSO	5	45
	7.5	29		7.5	33
	10	-		10	31

4. Tartışma ve Sonuç

Küfler doğada hava, toprak, su ve organik maddeler üzerinde yaygın olarak bulunan çok hücreli ökaryotik mikroorganizmalardır. Bunlardan *Aspergillus*, nem içeren hemen her ortamda kolaylıkla gelişebilen ve yaklaşık 340 mantar türünden oluşmuş bir cinstir [36]. Doğadaki esas işlevi karbon ve nitrojen çevrimiyle ilgilidir, biyodegradasyonda da rol alır. *Aspergillus*'lar ekonomik, ekolojik ve tıbbi yönden önemlidirler [37]. Bunlardan *A. niger* ağırlıklı olarak büyük ölçekli enzim, organik asit ve biyoaktif bileşiklerin üretiminde kullanılmaktadır [36]. Bu nedenle *A. niger*, endüstriyel açıdan önemli bir suştur.

Genel olarak mantarlar tarafından üretilen katalazların kinetik ve biyokimyasal özellikleri hakkında literatürdeki bilgiler sınırlıdır. Son zamanlarda hidrojen peroksitin endüstride kullanımının artması, H_2O_2 'nin su ve oksijene dönüştürülmesini sağlayan ekonomik ve kararlı katalaz enziminin üretilmeye çalışılmasını gerekli kılmıştır [38]. Yakın bir geçmişte termofilik bir mantar olan *Scytalidium thermophilum* tarafından büyümeye paralel olarak üretilen ve monofonksiyonel katalaz ailesine dahil olduğu kristal yapısı belirlenerek bulunan enzimin hidrojen peroksit yokluğunda çeşitli *orto-* ve *para-*difenolik bileşikler okside ettiği rapor edilmiştir [15, 39]. *Scytalidium* katalazında gözlenen bu ikincil aktivitenin varlığı memeli katalazı [30] başta olmak üzere, *Bacillus pumilus* [32], *Thermobifida fusca* [33] ve *Amaranthus cruentus* [34-35] gibi mikrobiyal ve bitkisel kaynaklı katalazlarda da vurgulanmıştır. Ayrıca *Corynebacterium glutamicum* ve insan eritrositleri gibi çeşitli kaynaklardan izole edilen ticari katalazlarda benzer oksidaz aktivite gözlenmiştir [15]. Buradan, ikincil aktiviteye sahip katalaz türü enzimlerin çok daha yaygın olabileceği, hatta insanda da olabileceği anlaşılmaktadır.

Bu çalışmada, mezofilik bir ökaryot olan *A. niger*'de üretilen katalazın saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Buna göre öncelikle enzim kaynağı olarak kullanılan *A. niger*'in zamana bağlı katalaz üretimi analiz edildi. Elde edilen bulgular, *A. niger*'de büyümeye paralel olarak katalaz aktivitesinin arttığını; en yüksek değerine küfün durağan faza geçmesi ile ulaştığını göstermiştir (Şekil 1). Bu durum şaşırtıcı değildir; çünkü bilindiği gibi kesikli kültürlerde mikroorganizmalar substrat ve besin kaynakları ile oksijenin tüketilmesi sonucu durağan faza girerler. Bu sırada oksidatif stres varlığında çok sayıda reaktif oksijen türleri (ROS) oluşur [40, 41]. Katalazlar ise antioksidan enzimler olup esas işlevleri stres varlığında hücrede meydana gelen bu ROS'ları ortamdan uzaklaştırmaktır [3]. Bu nedenle hücre büyümesi sırasında radikal üretiminin artmasına bağlı olarak baş edebildiği sürece katalaz aktivitesinin artması beklenir [42]. Ayrıca *Escherichia coli* tarafından üretilen monofonksiyonel katalaz HPII

(Hidroperoksidaz II) enzim sentezinin durağan fazda arttığını gösteren rapor, çalışma bulgularımızı destekler niteliktedir [43].

A. niger'de katalaz üretimini arttırmak için ısı şoku ve oksidatif stres denemeleri gerçekleştirildi. Çünkü enzim üretiminin bazı *Aspergillus*'larda oksidatif stres veya ısı şokuna bağlı olarak hücrede artan H_2O_2 'ye karşı savunma amacıyla arttığına dair raporlar bulunmaktadır [44, 45]. Çalışmada elde edilen bulgular, en yüksek katalaz aktivitesinin $37^\circ C$ 'de büyütülen küfte ölçüldüğünü göstermektedir (Tablo 1). Bu sıcaklığın üzerinde aktivitede anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. $45^\circ C$ 'de aktivite optimum değere göre sadece %31 oranında azalırken $50^\circ C$ ve üzerinde gelişme olmamasına bağlı olarak aktivite tamamen gelişmemiştir (Tablo 1). Mezofilik bir canlı olarak *A. niger*'in $50^\circ C$ ve üzerinde büyümesinin durması beklenen bir durumdur. Literatürde katalaz kaynağı olarak kullanılan çeşitli *Aspergillus* suşlarıyla yapılan çalışmalarda sıcaklık olarak genellikle $30^\circ C$ tercih edilirken [14], bu çalışmada daha yüksek sıcaklıklarda ($37-45^\circ C$) katalaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Yüksek sıcaklıklarda gelişen mikroorganizmalardan sıcaklığa dayanıklı enzimler üretilir [40]. Bu nedenle literatürde katalaz üreticisi olarak kullanılan *Aspergillus*'lara kıyasla daha yüksek sıcaklıkta büyütülebilen *A. niger*'in kullanılmasının ticari enzim uygulamalarında bir avantaj oluşturacağı önerilebilir.

Katalaz üretimi için oksidatif stres yaratmak üzere büyüme ortamına Bölüm 2.1'de belirtilen şekilde H_2O_2 eklendi. ROS olarak bilinen H_2O_2 'nin test edilen hemen hemen tüm derişimlerinde negatif kontrole (H_2O_2 'siz ortam) göre daha düşük katalaz aktivitesi gözlemlendi (Şekil 2). Sadece 1 mM H_2O_2 'nin eklendiği an ($t=0$) katalaz üretiminde negatif kontrole göre %5'lik bir artış görüldü; ancak bu artış inkübasyonun ilerleyen zamanlarında kademeli olarak kayboldu. 1 mM derişimde diğer konsantrasyonlara göre aktivite daha yüksek ölçülmesine rağmen gözlenen bu artış negatif kontrolden daha düşük seviyededir. Bulgular, *A. nidulans* katalazı için rapor edilenden [45] farklı olarak, oksidatif stresin olumlu etkisinin olmadığını göstermektedir. Genel olarak peroksidaz aktivitesi gösteren katalazların oksidatif stres varlığında sentezinin tetiklendiği, diğer yandan monofonksiyonel katalazların H_2O_2 'den etkilenmediği bilinmektedir [43]. Bu durum çalışmada kullanılan *A. niger* katalazının monofonksiyonel katalaz ailesine dahil olabileceğine işaret etmektedir.

Katalaz enziminin *A. niger*'den saflaştırılmasında düşük maliyette ve yüksek verimle çalışan bir izolasyon yöntemi olarak tanımlanan TPP sistemi [6] kullanıldı. Bu sistemin tercih edilmesinin başlıca sebebi, enzimin ham örnekten tek basamakta saflaştırılmasını mümkün kılmasıdır. Literatürde katalaz enziminin saflaştırılması üzerine çok sayıda rapor mevcuttur. Ancak hepsinin ortak özelliği birden

fazla aşamadan oluşmasıdır ki bu durum verimi azaltırken maliyeti yükseltir. Örneğin, *Nerospora crassa* katalazı asetonla çöktürme, ardından amonyum sülfatla çöktürme ve hidrofobik etkileşim kromatografisi (Fenil Sefaroz Kolonu ile) olmak üzere üç basamakta saflaştırılmıştır. Benzer şekilde, *Septoria tritici* katalazı diyaliz işlemi takiben iyon değişim kromatografisi (DEAE-C, DietylAminoEtil Selüloz) ve ardından hidrofobik etkileşim kromatografisi (Fenil Sefaroz Kolonu ile) kullanarak saflaştırılmıştır. *S. thermophilum* katalazının da yine üç basamakta (amonyum sülfatla çöktürme, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografileri) saflaştırıldığı rapor edilmiştir [14].

TPP sistemini etkileyen çok sayıda faktör bulunduğundan, proteinlerin karışık bir ortamdan etkili bir şekilde ayrılması için saflaştırma işlemi etkileyen her bir parametrenin ayrı ayrı incelenmesi gerekir [6]. Bu sebeple, katalaz enziminin ayrımını etkileyen parametreler (amonyum sülfat konsantrasyonu, ham ekstrakt:t-butanol oranı ve sistem pH'sı) sırayla incelendi. Hazırlanan sistemlerin hepsinde başlangıçta kullanılan örnekteki toplam protein miktarı 1 mg (79 U katalaz aktivitesi içeren) olarak belirlendi ve enzimin işlem sonunda seçici bir şekilde ara fazda dağıldığı görüldü. Sistem parametrelerinin saflaştırma katsayısı ve aktivite geri kazanıma olan etkileri sırasıyla Tablo 2-4'de gösterilmektedir. Tablolardan görüldüğü üzere, tüm parametreler katalaz enziminin *A. niger*'den saflaştırılmasında etkin rol oynamaktadır.

Amonyum sülfat konsantrasyonu, TPP sisteminde kritik bir öneme sahiptir. Dolayısıyla karışımdan katalaz enziminin yeterli miktarda ayrımı için optimize edilmesi gerekir. Bunun için genellikle %20 (w/w) gibi minimum konsantrasyonda örnek çözeltilisinin hazırlanmasıyla başlanır ve yavaş yavaş konsantrasyon artırılarak istenilen protein ara fazda çöktürülmesi için optimizasyonu yapılır [6]. Tablo 2, farklı amonyum sülfat doyumluklarında hazırlanmış çözeltilerden (ham enzim ekstraktına eşit hacimde t-butanol eklenerek) ara faza ayrılmış olan katalaz enziminin saflaştırma analiz sonuçlarını göstermektedir. Buna göre, en yüksek saflaştırma katsayı (7.0) ve aktivite geri kazanım değeri (206) %80 amonyum sülfat doyumluğunda hazırlanmış sistemden elde edilmiştir. TPP sistemlerinde enzim aktivasyonuna sıklıkla karşılaşılmaktadır. Örneğin, pektinaz [8], peroksidaz [46], proteinaz K [47] ve tripsin inhibitör [48] gibi proteinlerin sulu üçlü-faz sistemlerinden saflaştırılmaları sırasında katalitik aktivitelerinde artış gözlenmiştir. Bu durumun saflaştırma sırasında enzim molekülünün esnekliğinde meydana gelen artışla bağlantılı olabileceği açıklanmıştır. Düşük sulu çözeltilerde enzimin yapısında meydana gelen değişiklikler enzimin aktivasyonuna neden olabilmektedir [6].

Sisteme eklenen t-butanol miktarının da TPP'de önemli bir diğer faktör olması sebebiyle karışımdaki ham ekstrakt:t-butanol oranı optimize edildi. En iyi sonuçlar %80 (w/w) amonyum sülfat doyumluğunda hazırlanan ve ham ekstrakt:t-butanol oranı 1.0:1.5 olan sistemden ölçüldü (Tablo 3). %80 (w/w) amonyum sülfat içeren ve ham ekstrakt:t-butanol oranı 1.0:0.5, 1.0:1.0 ve 1.0:2.0 olacak şekilde hazırlanan sistemlerinden ise sırasıyla 2.0, 7.0 ve 5.9 kat enzim saflaştırılırken aktivite geri kazanım değerleri sırasıyla %121, %206 ve %204 şeklinde belirlendi. Enzimi saflaştırmak amacıyla kullanılan TPP sistemlerinde, t-butanol ayırmada en iyi sonucu verdiği için genelde yardımcı organik çözücü olarak seçilmektedir. Ayrıca, t-butanolun büyük ve dallanmış bir yapıya sahip olması sebebiyle katlanmış proteinin içine kolaylıkla giremeyeceği, dolayısıyla protein denatürasyonuna sebep olmayacağı düşünülmektedir [6]. Nitekim bu çalışmada t-butanolün katalaz aktivitesi üzerine herhangi bir olumsuz etkisi gözlenmemiştir.

Proteinlerin TPP sistemlerinde etkin bir şekilde çöktürülmesi sülfat konsantrasyonuna bağlı olduğu gibi proteinlerin net yüküne de bağlıdır. TPP sistemlerinde ham ekstrakt olarak farklı izoionik noktalara sahip bir protein karışımının kullanılması durumunda, pH'nın protein ayırımına etkisini tayin etmede pH'sı 3.0'den 7.0'ye kadar değişen sistemler hazırlanabilir [6]. Katalaz enziminin TPP sistemlerinde ayrımına pH'nın etkisi Tablo 4'te gösterilmiştir. Buna göre, pH 7.0'de hazırlanan sistemde katalaz karışımdaki diğer proteinlerden seçici bir şekilde ayrılarak ara faza geçmiştir. Diğer yandan, düşük ve yüksek pH'larda saflaştırma etkinliğinin oldukça düşük olduğu görülmektedir. Bu durum, H⁺ (asidik koşullarda) veya OH⁻ (bazik koşullarda) iyonlarının aşırı miktarlarda bulunması ile açıklanabilir. Bu iyonlar ortamda yüksek seviyede bulunduğu karışımdaki katalaz enzimi ile yarışarak enzimin çözücü ile etkileşimini engelleyebilir ve sonuçta katalazın çözücünden uzaklaşarak orta faza geçmesini engellemiş olabilir [46].

Saflaştırılan katalaz enzim örneği SDS-PAGE ile analiz edildiğinde jel üzerinde tek bir bant gözlenmiş olup bu bant yaklaşık 87 kDa'ya denk gelmektedir (Şekil 3). Bu bulgu, çalışılan enzimin tipik bir monofonksiyonel katalaz olduğunu doğrular niteliktedir. Çünkü bu büyüklük değeri (87 kDa), büyük alt üniteli monofonksiyonel katalazlar için rapor edilen değer (>75 kDa) aralığında yer almaktadır [49].

Saflaştırılmış enzimin karakterizasyonu için enzim aktivitesini ve dayanıklılığını etkileyen bazı parametreler seçilerek bunların etkileri analiz edildi. Karakterizasyon sonuçları Şekil 4-6 ve Tablo 5-6'da verilmektedir.

Katalaz aktivitesine sıcaklığın etkisi 30-70°C sıcaklık aralığında incelenmiş olup enzimin optimum reaksiyon sıcaklığı 50°C olarak belirlendi (Şekil 4A). Ayrıca 40 ila 70°C gibi geniş sıcaklık aralığında aktivitenin %80'den fazlasının korunmuş olduğu gözlemlendi. Elde edilen bulgular literatürde katalaz için rapor edilen sıcaklık değerleri ile uyumludur. Genel olarak, farklı küf ve mayalardan izole edilen katalazlar için optimum reaksiyon sıcaklık aralığı 30 ila 85°C arasında değişmektedir [14].

Enzimin termal kararlılığı, substratı bulunmayan bir ortamda enzimin sıcaklığa karşı yapısının bozulmadan kalması için gösterdiği direnci yansıtmaktadır. Katalaz enziminin termal kararlılığını test etmek üzere enzim 30-70°C sıcaklık aralığında 60 dak süreyle inkübasyona maruz bırakıldıktan sonra rezidüel aktivitesi ölçüldü. Sonuçta, katalazın yüksek düzeyde kararlı kaldığı sıcaklık değerinin 40°C olduğu gözlemlendi. Bu sıcaklık değerinin üzerinde ise aktivite hızlı bir şekilde optimum aktivite değerinin %45'ine kadar düşüş gösterdi. Diğer yandan 50-70°C sıcaklık aralığında aktivitede önemli bir değişiklik olmamakla birlikte belirtilen sıcaklık aralığında 40°C'de ölçülen aktivitenin %55'inin hala korunmuş durumda olduğu bulundu (Şekil 4B). Bulgular, literatürle daha önceden yayınlanan raporlar ile uyumludur [14].

Katalaz aktivitesine pH'nın nasıl etki ettiğini gözlemlemek üzere ise saf enzim örneğinin pH'sı 4.0 ila 9.0 arasında değişen reaksiyon ortamlarında bağlı aktiviteleri ölçüldü (Şekil 5A). Buna göre katalaz için optimum reaksiyon pH değerinin 6.0 olduğu belirlendi. Ayrıca 4.0-7.0 pH aralığında enzimin oldukça aktif olduğu görüldü; bu aralıkta enzimin başlangıç aktivitesinin %50'sinden fazlası korunmuştur. *A. niger* katalazı için bulunan optimum pH değeri (6.0), bakterilerden *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonad* EF'den, mantarlardan ise *Septoria tritici*'den izole edilen katalazlarla benzerlik göstermektedir [14].

Enzimin pH kararlılığı analizi için saf enzim örneği pH'sı 4.0 ila 9.0 arasında değişen tampon çözeltilerde yaklaşık 60 dak inkübasyon bırakıldı ve akabinde bağlı aktiviteleri ölçüldü (Şekil 5B). Buna göre enzimin 6.0-7.0 pH aralığında oldukça aktif olduğu gözlemlendi. Belirtilen bu aralıkta başlangıç aktivitesinin %96'dan fazlası korunmuştur. Ayrıca, pH 9.0'da başlangıçtaki aktivitenin %77'si, pH 4.0 ve 5.0'te ise sırasıyla %64 ve %72'si korunmuştur. Buradan enzim aktivitesinin test edilen tüm pH'larda %60'dan fazlasının korunduğu, dolayısıyla oldukça geniş bir pH aralığında enzimin bozulmadan kalabildiği görülmektedir. Enzimin farklı pH'larda kararlı özellik göstermesi endüstriyel uygulamalar açısından önemlidir. Süreçlerin uzamasından kaynaklı olarak ortam pH'sına uzun süre maruz kalabilecek bir enzim için bu parametre önem arz etmektedir [47].

Organik çözücüler proteinlerin fizikokimyasal özelliklerini değiştirme yeteneğine sahip bileşiklerdir. Genelde proteindeki kovalent olmayan bağlar, iyonik gruplar ve dipoller, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler gibi özellikleri değiştirirler. *A. niger* katalazının organik çözücülere olan dayanıklılığı Etanol>DMSO>Metanol>Aseton şeklindedir (Tablo 5). Etanol, %7.5'lük (v/v) derişime kadar reaksiyon ortamına konulabilirken diğer çözücüler aktivitede daha büyük kayıplara sebep olmaktadır.

Enzimin K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 21.4 mM ve 20,000 $\mu\text{mol/dak/l}$ (Şekil 6) olarak hesaplandı. Benzer K_m değeri *Neurospora crassa*'dan (maya, 21.7 mM) izole edilen katalazda da ölçülmüştür [50]. Ayrıca bakterilerden *Methanosarcina barkeri* ve *Oceanobacillus oncorhynchi* katalazlarında K_m değerleri sırasıyla 25 ve 24 mM olarak bulunmuştur [51, 52]. Katalaz enziminin çeşitli oksidaz/peroksidaz substratlarına olan ilgisini araştırmak amacıyla gerçekleştirilen spektrofotometri analizlerinde hidrojen peroksit yokluğunda 4-metil katekol ve katekolü okside edebildiği görüldü (Tablo 6). Diğer yandan guaiakol, hidrokinon, pirogallol, ABTS ve L-tirozin üzerinde herhangi bir etki gözlenmedi. Bu durum *A. niger* katalazının özellikle *orto*-difenolik bileşikler üzerinde etkili olduğuna işaret etmektedir [22, 28, 39].

Basit, hızlı ve ekonomik bir yöntem olarak tanımlanan TPP sisteminin çeşitli endüstriyel uygulamalarda protein geri kazanımı açısından faydalı bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır. Bu çalışmada, TPP sistemi kullanılarak ilk kez katalaz enzimi *A. niger*'den tek basamakta başarılı bir şekilde saflaştırılmıştır. Sistemden elde edilen katalaz enziminin geniş pH aralığında kararlı olması, etanole karşı göstermiş olduğu dayanıklılık ve ikincil oksidaz aktivite yetenekleri endüstriyel uygulamalarda iyi bir biyokatalizör olarak işlev görebileceği sinyalini vermektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No:2017/90) tarafından desteklenmiştir. İstatistiksel analiz bulgularına katkılarından dolayı Dr. Arda Acemi'ye teşekkürlerimizi sunarız.

Kaynakça

- [1] Switala, J., Loewen, P. C. 2002. Diversity of properties among catalases. Archives of Biochemistry and Biophysics, 401, 145-154.
- [2] Calera, J. A., Sánchez-Weatherby, J., López-Medrano, R., Leal, F. 2000. Distinctive properties of the catalase B of *Aspergillus nidulans*. FEBS Letters, 475, 117-120.

- [3] Hansberg, W., Salas-Lizana, R., Domínguez, L. 2012. Fungal catalases: function, phylogenetic origin and structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525, 170–180.
- [4] Paris, S., Wyson, D., Debeaupuis, J-P., Shibuya, K., Philippe, B., Diamond, R. D., Latge, J-P. 2003. Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity*, 71, 3551–3562.
- [5] Witteveen, C. F. B., Veenhuis, M., Visser, J. 1992. Localization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1190–1194.
- [6] Dennison, C., Lovrien, R. 1997. Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Protein Expression and Purification*, 11, 149–161.
- [7] Duman, Y., Kaya, E. 2014. Purification and recovery of invertase from potato tubers by three phase partitioning and determination of kinetic properties of purified enzyme. *Turkish Journal of Biochemistry*, 39, 443–448.
- [8] Sharma, A., Gupta, M. N. 2001. Purification of pectinases by three-phase partitioning. *Biotechnology Letters*, 23, 1625–1627.
- [9] Duman, Y., Kaya, E. 2013. Purification, recovery, and characterization of chick pea β -galactosidase in single step by three phase partitioning as a rapid and easy technique. *Protein Expression and Purification*, 91, 155–160.
- [10] Saxena, L., Iyer, B. K., Ananthanarayan, L. 2007. Three phase partitioning as a novel method for purification of ragi (*Eleusine coracana*) bifunctional amylase/protease inhibitor. *Process Biochemistry*, 42, 491–495.
- [11] Roy, I., Gupta, M. N. 2002. Three-phase affinity partitioning of proteins. *Analytical Biochemistry*, 300, 11–14.
- [12] Şen, A., Eryılmaz, M., Bayraktar, H., Önal, S. 2011. Purification of α -galactosidase from pepino (*Solanum muricatum*) by three-phase partitioning. *Separation and Purification Technology*, 83, 130–136.
- [13] Roy, I., Sharma, A., Gupta, M. N. 2004. Three-phase partitioning for simultaneous renaturation and partial purification of *Aspergillus niger* xylanase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1698, 107–110.
- [14] Sooch, B. S., Kauldhar, B. S., Puri, M. 2014. Recent insights into microbial catalases: isolation, production and purification. *Biotechnology Advances*, 32, 1429–1447.
- [15] Yuzugullu, Y., Trinh, C. H., Smith, M. A., Pearson, A. R., Phillips, S. E. V., Sutay Kocabas, D., Bakir, U., Ogel, Z. B., McPherson, M. J. 2013. Structure, recombinant expression and mutagenesis studies of the catalase with oxidase activity from *Scytalidium thermophilum*. *Acta Crystallographica Section D*, 69, 398–408.
- [16] Kacem-Chaouche, N., Destain, J., Meraihi, Z., Dehimat, L., Haddoum, T., Wathelet, J. P., Thonart, P. 2013. Optimization of extracellular catalase production from *Aspergillus phoenicis* K30 by a linear regression method using date flour as single carbon source and purification of the enzyme. *African Journal of Biotechnology*, 12, 2646–2653.
- [17] Tian, Y. S., Xu, H., Peng, R. H., Yao, Q. H. 2013. Heterologous expression and initial characterization of the peroxisomal catalase from the methylotropic yeast *Hansenula polymorpha* in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49, 507–513.
- [18] Garay-Flores, R. V., Segura-Ceniceros, E. P., De Leon-Gamez, R., Balvantin-Garcia, C., Martinez-Hernandez, J. L., Betancourt-Galindo, R., Ramirez, A. R. P., Aguilar, C. N., Ilyina, A. 2014. Production of glucose oxidase and catalase by *Aspergillus niger* free and immobilized in alginate-polyvinyl alcohol beads. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 60, 262–269.
- [19] Söyler, B. 2012. Characterization and analysis of the antioxidant capacity of functional phenolics oxidized by *Scytalidium thermophilum* catalase phenol oxidase (CATPO). Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- [20] Chang, Y. C., Tsai, H-F., Karos, M., Kwon-Chung, K. J. 2004. THTA, a thermotolerance gene of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology*, 41, 888–896.
- [21] Kawasaki, L., Aguirre, J. 2001. Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 183, 1434–1440.
- [22] Ögel, Z. B., Yüzügülü, Y., Mete, S., Bakir, U., Kaptan, Y., Sutay, D., Demir, A. S. 2006. Production, properties and application to biocatalysis of a novel extracellular alkaline phenol oxidase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 853–862.
- [23] Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- [24] Alici, E. H., Arabaci, G., 2016. Purification of polyphenol oxidase from borage (*Trachystemon orientalis* L.) by using three-phase partitioning and investigation of kinetic properties.

- International Journal of Biological Macromolecules, 93, 1051–1056.
- [25] Yuzugullu Karakus, Y., Isik, S. 2019. Partial characterization of *Bacillus pumilus* catalase partitioned in poly(ethylene glycol)/sodium sulfate aqueous two-phase systems. *Preparative Biochemistry and Purification*, 49, 391–399.
- [26] Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- [27] Blum, H., Beier, H., Gross, H. J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8, 93–99.
- [28] Kocabas, D. S., Bakir, U., Phillips, S. E. V., McPherson, M. J., Ogel, Z. B. 2008. Purification, characterization, and identification of a novel bifunctional catalase-phenol oxidase from *Scytalidium thermophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, 407–415.
- [29] Lineweaver, H., Burk, D. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of American Chemical Society*, 56, 658–66.
- [30] Vetrano, A. M., Heck, D. E., Mariano, T. M., Mishin, V., Laskin, D. L., Laskin, J. D. 2005. Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 35372–35381.
- [31] Carrea, G., Riva, S. 2000 Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. *Angewandte Chemie International ed. in English*, 39, 2226–2254.
- [32] Sangar, S., Pal, M., Moon, L. S., Jolly, R. S. 2012. A catalase-peroxidase for oxidation of β -lactams to their (R)-sulfoxides. *Bioresource Technology*, 115, 102–110.
- [33] Loncar, N., Fraaije, M. W. 2015. Not so monofunctional—a case of the thermostable *Thermobifida fusca* catalase with peroxidase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 2225–2232.
- [34] Chen, N., Teng, X.-L., Xiao, X.-G. 2017. Subcellular localization of a plant catalase-phenol oxidase, AcCATPO, from *Amaranthus* and identification of a non-canonical peroxisome targeting signal. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1–11.
- [35] Teng, X.-L., Chen, N., Xiao, X.-G. 2016. Identification of a catalase-phenol oxidase in betalain biosynthesis in red amaranth (*Amaranthus cruentus*). *Frontiers in Plant Science*, 6, 1228.
- [36] Park, H.-S., Jun, S.-C., Han, K.-H., Hong, S.-B., Yu, J.-H. 2017. Chapter Three - Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi. *Advances in Applied Microbiology*, 100, 161–202.
- [37] Asan, A. 2004. *Aspergillus*, *Penicillium* and related species reported from Turkey. *Mycotaxon*, 89, 155–157.
- [38] Wang, H., Tokusige, Y., Shinoyama, H., Fujii, T., Urakami, T. 1998. Purification and characterization of a thermostable catalase from culture broth of *Thermoascus auratiacus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 85, 169–173.
- [39] Koclar Avci, G., Coruh, N., Bolukbasi, U., Ogel, Z. B. 2013. Oxidation of phenolic compounds by the bifunctional catalase–phenol oxidase (CATPO) from *Scytalidium thermophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 661–672.
- [40] Bender, K. S. Buckley, D. H., Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A. 2017. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi. Çeviri Editörü: Çökmüş, C. Ondördüncü baskıdan çeviri, Palme Yayınevi, Ankara, ISBN: 9786053555964.
- [41] Lushchak, V. I. 2011. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 153, 175–190.
- [42] Yüzüğüllü, Y., Ögel, Z. B., Bakır Bölükbaşı, U., Çoruh, N., Karakaş, G. 2011. Production of a novel bifunctional catalase-phenol oxidase of *Scytalidium thermophilum* in the presence of phenolic compounds. *Turkish Journal of Biology*, 35, 697–704.
- [43] Mulvey, M. R., Switala, J., Borys, A., Loewen, P. C. 1990. Regulation of transcription of *katE* and *katF* in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 172, 6713–6720.
- [44] Noventa-Jordão, M. A., Couto, R. M., Goldman, M. H. S., Aguirre, J., Iyer, S., Caplan, A., Terenzi, H. F., Goldman, G. H. 1999. Catalase activity is necessary for heat-shock recovery in *Aspergillus nidulans* germlings. *Microbiology*, 145, 3229–3234.
- [45] Kawasaki, L., Wysong, D., Diamond, R., Aguirre, J. 1997. Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *Journal of Bacteriology*, 179, 3284–3292.
- [46] Yuzugullu Karakus, Y., Acemi, A., Işık, S., Duman, Y. 2018. Purification of peroxidase from *Amsonia orientalis* by three-phase partitioning and its biochemical characterization. *Separation Science and Technology*, 53, 756–766.
- [47] Singh, R. K., Gourinath, S., Sharma, S., Roy, I., Gupta, M. N., Betzel, C., Srinivasan, A., Singh, T.P. 2001. Enhancement of enzyme activity through three-phase partitioning: crystal structure of a

- modified serine proteinase at 1.5 Å resolution. *Protein Engineering*, 14, 307–313.
- [48] Wati, R. K., Theppakorn, T., Benjakul, S. Rawdkuen, S. 2009. Three-phase partitioning of trypsin inhibitor from legume seeds. *Process Biochemistry*, 44, 1307–1314.
- [49] Chelikani, P., Fita I., Loewen, P. C. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 192–208.
- [50] Diaz, A., Rangel, P., Oca, Y. M., Lledias, F., Hansberg, W. 2001. Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 1323–1333.
- [51] Calandrelli, V., Gambacorta, R. I., Carratore, V., Lama, L. 2008. A novel thermo-alkali stable catalase–peroxidase from *Oceanobacillus oncorhynchi* subsp. *incaldaniensis*: purification and characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2269–2275.
- [52] Shima, S., Netrusov, A., Sordel, M., Wicke, M., Hartmann, G.C., Thauer, R. K. 1999. Purification, characterization and primary structure of a monofunctional catalase from *Methanosarcina barkeri*. *Archives of Microbiology*, 171, 317–323.
- [53] Tauber, H. 1953. Oxidation of pyrogallol to purpurogallin by crystalline catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 205, 395–400.

İpek Fibroin/Polivinil Alkol Esaslı İlaç Taşıyıcı Yara Örtüleri

Ayça BAL ÖZTÜRK*^{1,2}, Zeynep Püren AKGÜNER²

¹İstinye Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Bölümü, 34010, İstanbul, Türkiye

²İstinye Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Bölümü, 34010, İstanbul, Türkiye

(Alınış / Received: 07.05.2019, Kabul / Accepted: 23.12.2019, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Anahtar Kelimeler

İpek fibroin,
Polivinil alkol,
Yara örtüsü,
Hidrojel film,
Kontrollü salım

Özet: Bu çalışmanın amacı, potansiyel yara örtüsü olarak ilaç taşıyıcı-yeni bir karboksil modifiyeli poli(vinil alkol)-çapraz bağlı ipek fibroin esaslı hidrojel filmi (İF/PVA) geliştirmektir. Çapraz bağlı hidrojellerin hazırlanması için poli(vinil alkol) (PVA), karboksil modifiye poli(vinil alkol) (PVA-COOH) verecek şekilde süksinik anhidrit (SA) ile modifiye edilmiş, FTIR ve ¹H NMR analizleri ile karakterize edilmiştir. Takiben çözücü döküm yöntemi ile 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) ve n-hidroksisüksinimid (NHS) varlığında farklı konsantrasyonlarda PVA-COOH ve ipek fibroin (İF) esaslı bir seri hidrojel filmler hazırlanmıştır. Elde edilen filmlerin yapıları FTIR ve XRD analizleri ile karakterize edilmiş, yüzey morfolojileri optik mikroskop altında incelenmiş, şişme davranışları ve mekaniksel dayanım özellikleri belirlenmiştir. Gerçekleştirilen sitotoksisite testleri ile sentezlenen İF/PVA membran yara örtülerinin toksik olmadığı bulunmuştur. Optimum özelliklere sahip İF/PVA hidrojel filmine model ilaç olarak kuersetin yüklenmiş, etken madde yüklü filmlerin fosfat tamponu ortamında (pH:7,4) salım davranış profili incelenmiştir. Gerçekleştirilen *in vitro* yara modeli (çizik testi) sonuçları, 10 güne kadar kontrollü kuersetin salım profili gösteren İF/PVA filminin potansiyel ilaç taşıyıcı bir yara örtüsü olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Silk Fibroin/Polyvinyl alcohol Based Drug Carrier Wound Dressings

Keywords

Silk fibroin,
Polyvinyl alcohol,
Wound dressing,
Hydrogel film,
Controlled release

Abstract: The aim of this study was to develop a novel carboxyl modified poly(vinyl alcohol) - crosslinked silk fibroin based hydrogel film (IF/PVA) as a potential drug carrier wound dressing. For the preparation of crosslinked hydrogels, poly(vinyl alcohol) (PVA) was modified with succinic anhydride (SA) to give carboxyl modified poly(vinyl alcohol) (PVA-COOH) and characterized by FTIR and ¹H NMR analyzes. Subsequently, a series of hydrogel films based on different concentrations of PVA-COOH and silk fibroin (IF) were prepared in the presence of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and n-hydroxysuccinimide (NHS) by solvent casting method. The structures of the synthesized films were characterized by FTIR and XRD analyzes and their surface morphology was examined under optical microscope and their swelling behavior and mechanical strength properties were determined. According to the performed cytotoxicity tests, it was found that the synthesized IF/ PVA membrane dressings were not toxic. The selected IF/PVA hydrogel film with optimum properties was loaded with quercetin as a model drug and their release profile was investigated in phosphate buffered media (pH: 7.4). The results of the *in vitro* wound model (scratch test) have shown that IF/PVA film showing a controlled quercetin release profile over 10 days can be used as a potential drug-carrier wound dressing.

*İlgili yazar: aozturk@istinye.edu.tr

1. Giriş

Deri dokusu; organları, enfeksiyonlara ve çevresel faktörlere karşı koruyarak bariyer görevi yapmaktadır. Bu nedenle; çeşitli kimyasal, mekanik, termal ve mikrobik ajanlardan doğrudan etkilenir. Yara örtüleri, cilt yaralanmalarının onarımı için potansiyel malzemelerdir. İdeal bir yara örtüsü, yara arayüzünde nemli bir ortam sağlamalı, hemostazı korumak için iyi bir sıvı tutma kapasitesine sahip olmalı, gaz değişimini sağlamalı ve mikroorganizmalara karşı koruyucu bir bariyer görevi görmelidir [1]. Hidrojeller, ideal yara örtüleri için gerekli özelliklere sahip olmaları nedeniyle diğer malzeme formlarına kıyasla en etkili seçimidir.

İpek, tekstil endüstrilerinde yüzyıllardır kullanılmaktadır. İpekböceği *Bombyx mori*'den elde edilen ipek proteini, serisin adı verilen yapılandırıcı benzeri bir protein ile bir arada tutulan iki fibroin proteinini içermektedir. Serisin proteini vücuda verildiğinde, T hücreleri tarafından antijenik bir faktör olarak algılanır ve immünolojik reaksiyonlara neden olmaktadır. Bu nedenle serisin proteini, zank giderme (degumming) denilen bir prosesle koza liflerinden uzaklaştırılmalıdır. İpek fibroin, iyi derecede biyouyumluluk, geçirgenlik, kontrol edilebilir biyodegradasyon hızı, sulu çözeltilerde işlenebilirlik (böylelikle film, jel, toz gibi farklı formlarda kolaylıkla hazırlanabilme) gibi özelliklerinden dolayı ideal yara örtü materyallerinden biridir [2, 3]. Ayrıca epidermal hücrelerin ve fibroblastların yapışmasını, yayılmasını ve çoğalmasını artırmakta ve yara iyileşmesini hızlandırmaktadır [1]. İpek fibroin esaslı doku mühendisliği iskeleleri (scaffoldları), kontrollü ilaç taşıyıcı sistem matrisleri, yapay deri substitentleri ve yumuşak kontakt lensler gibi biyomateryallerin geliştirilmesinde de uygulama alanı bulmaktadır [4].

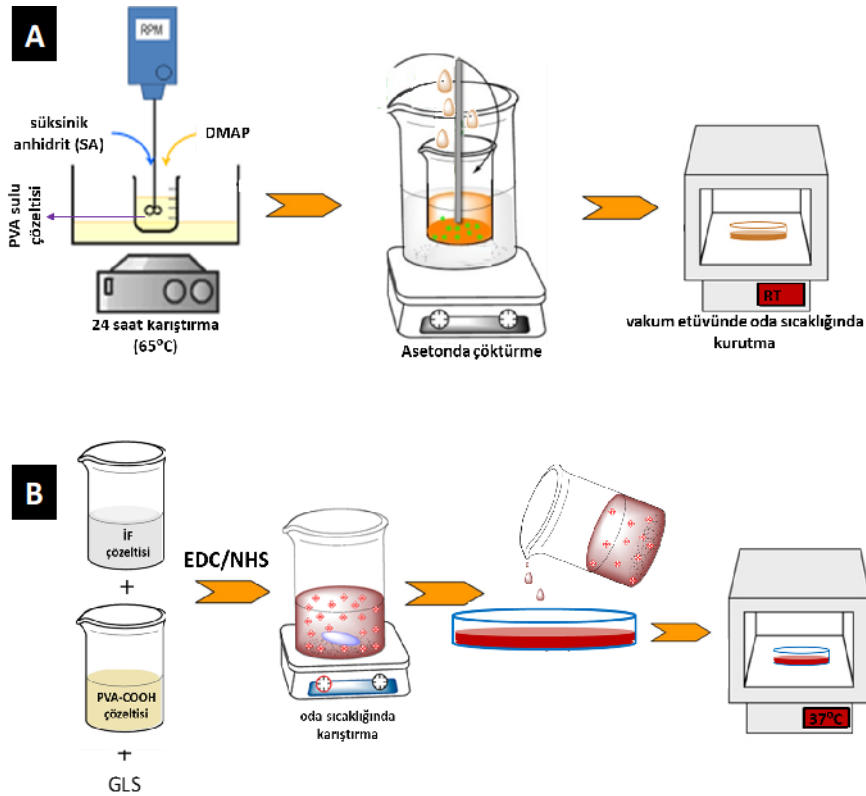
İpek fibroinin yukarıda sayılan avantajlarının yanı sıra, filmleri kuru formda zayıf ve kırılmandır. Isıtma, metanol içine daldırma, kesme, sodyum aljinat, selüloz ve kitosan gibi doğal polimerler ile veya poli(akrilamid), poli(vinil alkol), poli(etilen glikol) ve poli(etilen oksit) gibi sentetik polimerler ile harmanlama veya kimyasal olarak çapraz bağlama gibi çeşitli işlemlerle kolaylıkla modifiye edilerek özellikleri ayarlanabilmektedir [4,5]. Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar; glutaraldehit ve formaldehitler gibi aldehitler veya disikloheksil karbodiimid (DDC) ve 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) gibi karbodiimidlerdir. Literatürde, biyouyumlu çapraz bağlayıcılar olarak bilinen karbodiimidler; proteinler ve/veya polisakkaridlerden yapılan filmlerin özelliklerini iyileştirmek için kullanılmaktadır. Araştırmacılar genellikle hazırlanan filmlerin film oluşturma özelliklerini, esnekliklerini ve gerilme mukavemetlerini çapraz bağlandıktan

sonra iyileştirdiğini rapor etmişlerdir [4]. Karbodiimidler ile çapraz bağlama yöntemi, yapıda bulunan primer aminleri karboksilik asitlerle reaksiyona sokarak bir amid bağı oluşumuyla sonuçlanan standart bir yöntemdir. Bu yöntem (karbodiimid kimyası) özellikle protein kimyasında geniş bir kullanım alanına sahiptir [6].

İpek fibroin filmleri özellikle, kristalizasyondan sonra, sert ve kırılğan formdadırlar. Bu özellikleri yara iyileştirme uygulamaları için yetersizdir [7,8]. PVA polimeri, mükemmel biyouyumluluk, ayarlanabilen fiziksel özellikler ve sulu çözeltilerde yüksek derecede şişme özellikleri nedeniyle çok tercih edilen bir materyaldir. Yara örtüsü, ilaç taşıyıcı sistemler ve yapay organlar gibi çeşitli ileri biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır [9]. Bu çalışmada ipek fibroin filmlerinin özelliklerini iyileştirmek için, süksinik anhidrit (SA) ile modifiye edilen PVA polimeri (PVA-COOH) kullanılmıştır. İpek fibroinin mekaniksel dayanımını ve sudaki stabilitesini iyileştirmek için çapraz bağlanması gerekmektedir [5]. Bu nedenle literatürde ilk defa ipek fibroin ve PVA-COOH; çapraz bağlayıcı ajan olarak 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) ve n-hidroksisüksinimid (NHS) varlığında çapraz bağlanmış (ipek fibroinin amin grupları ile PVA-COOH polimerinin karboksil grupları) ve geliştirilen hidrojel filmlerinin model ilaç varlığında yara örtüsü olarak kullanım potansiyelleri araştırılmıştır.

Etkili bir yara örtüsü, sargının sık değişmesini önlemek ve iyileşme sürecini hızlandırmak için kontrollü ilaç salımını uzun süre sürdürmelidir [9]. Bu kapsamda yara iyileştirme hızını artırmak için bir takım etken maddeler kullanılmaktadır. Flavonoidler, iyileştirme potansiyeli olan çok sayıda bitki özünde bulunan ana bileşenlerdir [10]. Kuersetin; anti-kanser, anti-ülser, anti-enflamatuvar, anti-alerjik, anti-bakteriyel ve anti-viral özellikler gösteren tipik bir flavonoiddir. Fibroblast proliferasyonunu artırdığı, immün hücre infiltrasyonunu azalttığı bilinmektedir. Yapılan araştırmalar kuersetinin *in vivo* ve *in vitro* olarak yara iyileşmesinde fibrozis ve skar oluşumunu azalttığını göstermektedir [11,12].

Bu çalışmada; çözücü döküm yöntemi ile EDC/NHS varlığında farklı konsantrasyonlarda PVA-COOH ve ipek fibroin (İF) esaslı bir seri hidrojel filmler (İF/PVA) sentezlenmiş ve FTIR, XRD, şişme testleri, mekaniksel dayanım, *in vitro* sitotoksikite ve çizik testi analizleri ile karakterize edilmiştir. Optimum özelliklere sahip İF/PVA hidrojeline model ilaç olarak kuersetin yüklenmiş ve salım profili incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, geliştirilen uzun süreli ilaç salım profili gösteren İF/PVA filminin potansiyel ilaç taşıyıcı bir yara örtüsü olarak kullanılabileceğini göstermiştir.



Şekil 1. (A) PVA-COOH polimerinin sentez aşamaları ve (B) İpek fibroin /PVA-COOH hidrojel filmlerinin üretim aşamaları

2. Materyal ve Metot

2.1. İpek fibroin ekstraksiyonu

Çalışmada kullanılan ipek böceği kozaları Bursa Koza Tarım Satış Kooperatifleri Birliği'nden (Kozabirlik) temin edilmiştir. İpek böceği kozaları bir makas yardımıyla küçük parçalara kesilerek yaklaşık 5 gram tartılmıştır. 0,02 M 2L NaCO₃ çözeltisinde yarım saat kaynatılmış, deiyonize su ile yıkandıktan sonra fazla suyu sıkılarak uzaklaştırılmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurumuş üründen yaklaşık 1 g tartıldıktan sonra üzerine 4 mL 9,3 M LiBr çözeltisi ilave edilerek 4 saat süre ile bekletilmek üzere ön ısıtılmış 60°C etüve konmuştur. Bu süresinin sonunda elde edilen sarı renkli çözelti diyaliz membranına (MWCO=12000-14000 Da) alınarak distile suya karşı diyaliz edilmiştir. Elde edilen ürün santrifüj edilmiş ve 4°C de saklanmıştır [13]. Bu işlem sonrasında ağırlıkça %7,5'lük İF çözeltisi elde edilmiştir.

2.2. Karboksil sonlu PVA polimerinin sentezi (PVA-COOH)

Ağırlıkça %10'luk 100 mL PVA sulu çözeltisi hazırlanmış ve çözelti 65°C 'ye ısıtılmıştır. Çözeltiye, bu sıcaklıkta sürekli karıştırma altında 2,77 g 4-dimetilaminopiridin (DMAP) ve 22,72 g süksinik anhidrit (SA) yavaş yavaş eklenmiş ve reaksiyona 24 saat devam edilmiştir. Takiben elde edilen ürün oda sıcaklığına soğuduktan sonra asetonda çöktürülerek vakum etüvünde kurutulmuştur (Şekil 1A). Beyaz renkli ürün elde edilmiştir. PVA-COOH yapısı ATR-

FTIR (Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi) ve ¹H NMR (Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi) analizleri ile karakterize edilerek doğrulanmıştır. FTIR analizi 4000-500 cm⁻¹ spektral aralığında Bruker marka Tensor II model ATR ünitesine sahip FTIR cihazı ile yapılmıştır. ¹H-NMR analizleri çözücü olarak D₂O kullanılarak Varian UNITY INOVA cihazı ile (500 MHz) gerçekleştirilmiştir.

2.3. Hidrojel yara örtü filmlerinin hazırlanması

Hidrojel yara örtüleri çözücü döküm tekniği kullanılarak hazırlanmıştır [14]. %3'lük ipek fibroin ve %5'lik PVA-COOH çözeltileri ve gliserin (GLS) belirli oranlarda karıştırılarak (Tablo 1) bir seri harman çözeltileri hazırlanmış, takiben belirli miktarlarda EDC ve NHS, çok kısa bir süre karıştırıldıktan sonra teflon petrilere dökülmüştür. 37°C de etüvde kurutulmuştur (Şekil 1B).

Tablo 1. İpek fibroin /PVA-COOH hidrojel filmlerinin bileşimi ve adlandırılması

Örnek Kodu	İpek fibroin çözeltisi (mL)	PVA-COOH çözeltisi (mL)	GLS (mL)	EDC (µg)	NHS (µg)
0İF	0,00	10,0	1,0	10,0	10,0
10İF	1,00	9,00	1,0	10,0	10,0
20İF	2,00	8,00	1,0	10,0	10,0
30İF	3,00	7,00	1,0	10,0	10,0
50İF	5,00	5,00	1,0	10,0	10,0
70İF	7,00	3,00	1,0	10,0	10,0
100İF	10,00	0,00	1,0	10,0	10,0

2.4. Hidrojel yara örtü filmlerinin karakterizasyonu

Hazırlanan hidrojel yara örtü filmlerinin yapısı ATR-FTIR analizi ile yapıları karakterize edilmiştir. Analiz Bölüm 2.2'de belirtildiği şekilde Bruker marka Tensor II model ATR ünitesine sahip FTIR cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Yara örtü filmlerinin XRD analizleri, Rigaku marka XRD cihazında gerçekleştirilmiştir. Her filminden 2 cm²'lik parçalar kesilmiş ve 2θ= 10-40° aralığında tarama yapılmıştır. X-ışını kaynağı olarak Cu Kα (λ=1.54 Å) kullanılmıştır. Filmlerin yüzey özellikleri ışık mikroskobu (Zeiss Stemi 5008) ile incelenmiştir. Hidrojel filmlerinin şişme davranışlarını belirlemek için gravimetrik yöntem kullanılmıştır [14]. Belirli tartımlardaki hidrojel filmleri pH 7,4 fosfat tampon çözeltisine daldırılmış, 48 saatin sonunda filmlerin yüzeyindeki fazla su filtre kâğıdı ile uzaklaştırıldıktan sonra tekrar tartılmıştır. Filmlerin şişme özellikleri;

$$\text{Şişme oranı (\%)} = (W_t - W_0 / W_0) \times 100 \quad (1)$$

eşitliği ile belirlenmiştir. Bu eşitlikteki W₀ ürünün kuru haldeki ağırlığı W_t 48 saat sonundaki ağırlığıdır. Filmlerin mekanik özellikleri, çekme-uzama testi Instron marka (Model: 3366 K 1630) Universal Test Cihazı kullanılarak incelenmiştir. Film örnekleri literatürde belirtildiği şekilde [8]. 10mmx150 mm ebatlarında kesilerek cihazın çeneleri arasına tutturulmuş ve 10 mm/dakika hız ile çekilmiştir. Filmlerin çekme-uzama eğrileri, kopma anındaki uzama miktarları ve kopma anındaki gerilim değerleri belirlenmiştir.

2.5. İlaç yükleme ve salım çalışmaları

Gerçekleştirilen karakterizasyon sonuçlarına göre optimum özelliklere sahip (yüzey, şişme, mekaniksel dayanım) yara örtüsü formülasyonu belirlenmiştir. Bölüm 2.3.'de belirtilen prosedür kullanılarak (EDC/NHS ilavesinden önce polimer çözeltisine 2 mg kuersetin ilave edilerek) kuersetin yüklü yara örtüsü hazırlanmış ve elde edilen kuersetin yüklü yara örtüleri 30İF-K kodu ile isimlendirilmiştir. Kuersetin yüklü yara örtülerinin salım davranışları, belirli miktarda tartılan filmlerin *in vitro* şartlarda PBS çözeltisine (pH 7,4) daldırılarak belirli zaman aralıklarında salım ortamından alınan çözeltilerin UV-vis spektrofotometre cihazı (Genesys™ 10S UV-Vis, Thermo Scientific) ile 375 nm de absorbans değerleri ölçülerek belirlenmiştir [14-15].

2.6. Sitotoksikite testi

Bu çalışmada indirekt MTT yöntemi kullanılmıştır [16]. Bu yöntem ISO10993-5 standart test yönteminden uyarlanarak geliştirilen bir yöntemdir [16]. Çalışma kapsamında göbek kordonundan elde edilen Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) kullanılmıştır. MKH'lar Liv Hospital'dan (Ulus, İstanbul) temin edilmiş olup, çalışmada kullanılan

MKH'ların pasaj numaraları 4-6'dır. MKH kültür ortamı olarak; %10 Fetal Sığır Serum (FBS), %1 Penisilin-Streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ortamında 37°C'de %5 CO₂'li ortamda 75 cm²'lik kültür kabında inkübe edilmiştir. Kültür ortamı iki günde bir değiştirilmiştir. MKH'lar %80 yoğunluğa ulaştığında %0.05 Trypsin/0.02 EDTA solüsyonu ile kültür kabından ayrılmış, takiben DMEM ile süspansiyon edilerek 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Besiyeri, pipet yardımıyla atıldıktan sonra hücreler DMEM ile süspansiyon edilmiş ve thoma lamı ile hücre sayımı yapılmıştır. MTT analizi için örneklerin her iki tarafı 30 dakika UV ışığı altında sterilize edilmiştir. Steril örneklerin üzerine 1 cm²/mL oranı ile MKH kültür ortamı ilave edilerek 24 saat 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir [16]. İnkübasyon periyodundan sonra örneklerin bulunduğu MKH kültür ortamı aynı miktarda DMEM ile seyreltilmiştir. MKH'lar, 96 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 5x10³ hücre olacak şekilde ekilmiş, üzerine 200µl MKH kültür ortamı eklenmiş ve 1 gece 37°C'da %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. Sonrasında kuyucuklardaki besiyeri, örneklerin inkübe edildiği besiyeri ile değiştirilerek 6 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kuyucuk başına 200µl DMEM ve 20µl MTT solüsyonu (20µg/ml, PBS ile seyreltilerek) eklenmiş ve 4 saat daha inkübe edilmiştir. İşlemin devamında, ortamdaki hücre kültür besiyeri 200µl DMSO ile değiştirilmiş ve 20 dakikalık bir inkübasyondan sonra mikropilaka okuyucu kullanılarak 570 nm'de okunmuştur.

2.7. In Vitro yara iyileştirme etkinliği testi

Örneklerin yara iyileştirme etkinlikleri "*in vitro* çizik testi" ile belirlenmiştir [4]. Yaklaşık 2x10⁴ hücre bulunan 24 kuyucuklu plakalar konfluent duruma geldiğinde steril 200µl mikropipet ucu ile hafifçe çizilmiş (yarayı simüle etmek için) ve tüm hücresel artıklar PBS ile yıkama yapılarak uzaklaştırılmıştır. Örnekler MTT analizi ile aynı şekilde (Bölüm 2.3.) hazırlanmıştır. DMEM ile aynı şekilde inkübe edilerek hazırlanan steril örnek çözeltileri, hazırlanan 24 kuyucuklu plakalara ilave edilmiş 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında (0, 24 ve 48 saat) yara modelindeki kapanma miktarı (yaralı bölgeye hücrelerin çoğalma oranı) invert mikroskop (Nikon Eclipse TS2-Tokyo, Japonya) altında fotoğrafları çekilerek değerlendirilmiştir.

3. Bulgular

3.1. PVA-COOH sentezi

Karboksillenmiş PVA polimeri (PVA-COOH) eldesi için, PVA polimeri esterifikasyon reaksiyonu yoluyla SA ile modifye edilmiştir. PVA-COOH polimerinin yapısı, Şekil 2'de gösterildiği gibi FTIR ve ¹H NMR spektrumu ile doğrulanmıştır. PVA ve PVA-COOH polimerlerinin FTIR spektrumu, Şekil 2A 'da

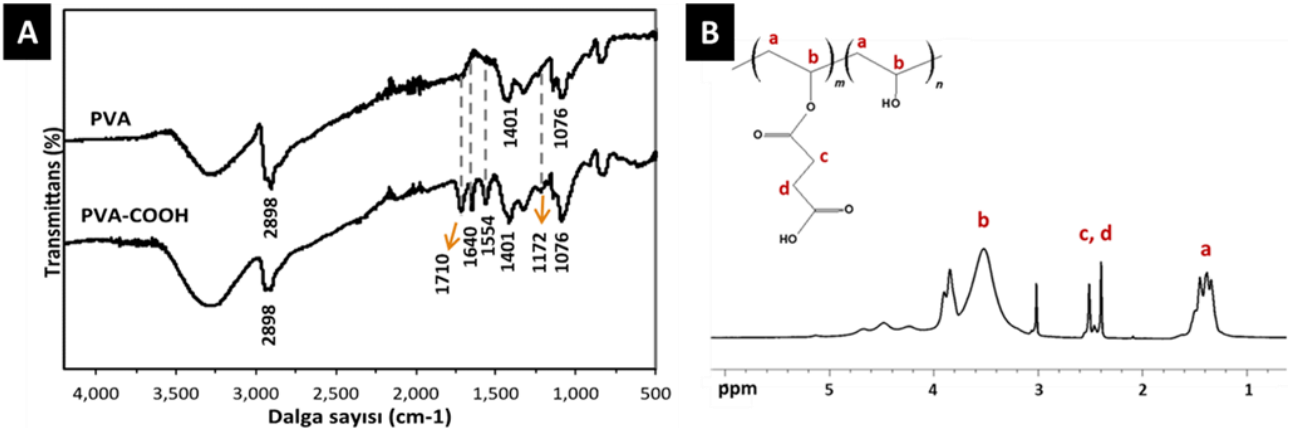
görülmektedir. PVA ve PVA-COOH polimerlerinin FTIR spektrası karşılaştırıldığında, her iki spektrumda da serbest -OH gruplarının gerilme titreşiminden ileri gelen 3000-3400 cm^{-1} bölgesinde geniş bir absorpsiyon bandı, CH gruplarının gerilme ve deformasyon titreşimlerinden ileri gelen 2898 cm^{-1} ve 1401 cm^{-1} de keskin pikler görülmektedir. PVA-COOH polimerinin FTIR spektrumunda belirtilen absorpsiyon bantlarının dışında maksimumu 1710 cm^{-1} 1172 cm^{-1} ve 1640 cm^{-1} bulunan yeni piklerin ortaya çıktığı görülmektedir. Bu absorpsiyon pikleri sırasıyla ester bağlarındaki C=O ve -CO gruplarının gerilme titreşimleri ve karboksilik asit gruplarındaki C=O gerilme titreşiminden ileri gelmektedir. Bu durum esterifikasyon reaksiyonunun istenildiği şekilde meydana geldiğini doğrulamaktadır [9]. PVA-COOH polimerinin ^1H NMR spektrumu, Şekil 2B 'de görülmektedir. SA'nın asidin metilen protonlarına atanan yaklaşık 2,4-2,6 ppm aralığındaki yeni iki pik (c ve d) SA'nın PVA 'ya aşılandığını teyit etmektedir [9, 17].

3.2. Hidrojel yara örtü filmlerinin hazırlanması ve karakterizasyonu

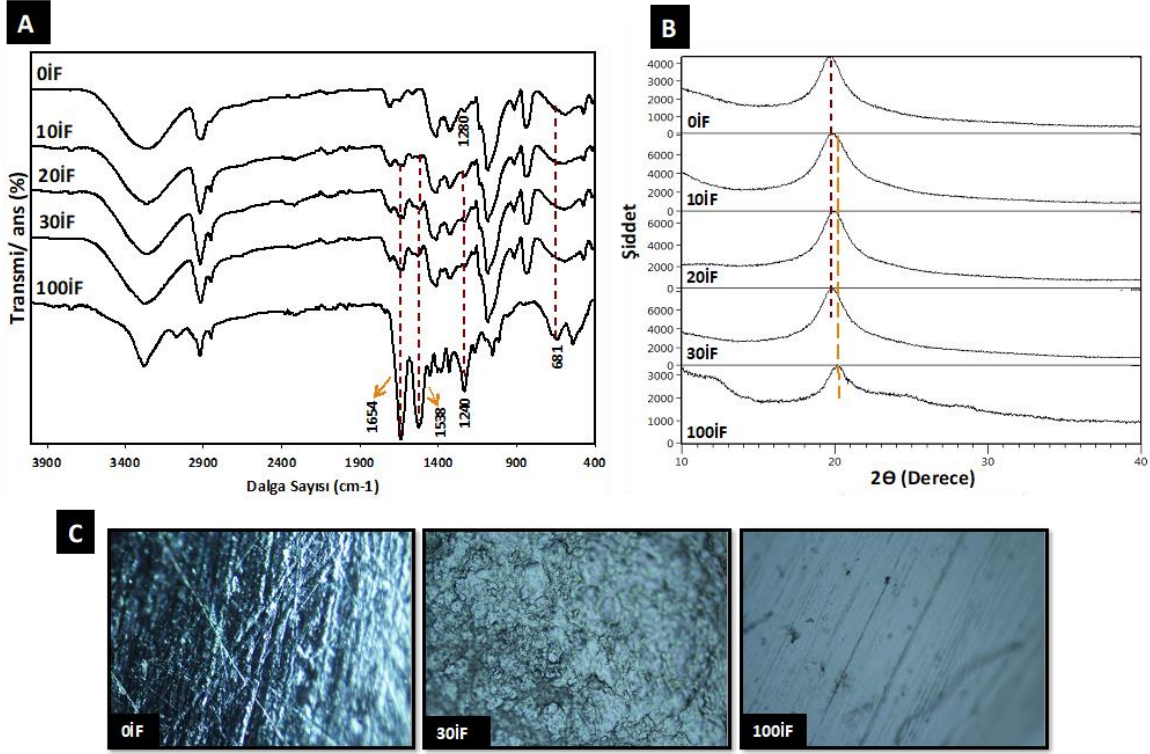
Çözücü döküm tekniği kullanılarak bir seri (0İF, 10İF, 20İF, 30İF, 50İF, 70İF ve 100İF) İF/ PVA-COOH içeren hidrojel filmleri hazırlanmıştır. İF oranı %30'un üzerinde kullanıldığında homojen görünümlü filmler elde edilememiştir (50İF ve 70İF filmleri). Yapılan literatür araştırmasına göre bunun en büyük nedeni PVA'nın artan polimerizasyon derecesi (DP) ile düşük çözünürlüğe sahip olmasına ve İF molekülünün β -formundaki konformasyonuna atfedilmektedir [18, 19]. Tanaka ve arkadaşları farklı kompozisyonlardaki İF/PVA filmlerinin yapısını incelemiş, PVA ve İF polimerlerinin birbirleriyle uyumsuz (incompatible) olduklarını rapor etmiştir [18]. Daha sonraki yıllarda Dai ve arkadaşları İF/PVA filmlerinde katkı olarak kullanılan GLS 'nin filmlerin yapısal davranışlarına etkisini incelemişlerdir. Yaptıkları araştırma filmlerinin yapısının belirli miktarda GLS ilavesi ile bir dereceye kadar değişebileceğini göstermiştir [19]. Ortamdaki GLS varlığı, iki polimer arasında etkileşimin meydana gelmesine neden olmaktadır. Bu etkileşimler; İF'in amid grupları-gliserinin hidroksil

grupları-PVA'nın hidroksil grupları arasında oluşan hidrojen bağlarıdır. Bu çalışmada hazırlanan İF/PVA filmlerinden 10İF, 20İF ve 30İF filmlerinde faz ayrımı gözlenmemiştir. Bunun nedeni sentez sırasında kullanılan GLS molekülü İF ve PVA filmleri arasında uyumlaştırıcı görevi görmesinden kaynaklanmaktadır. Şekil 3A'da 0İF, 10İF, 20İF, 30İF ve 100İF filmlerinin FTIR spektrası görülmektedir. İpek fibroinin yapısında, alpha heliks ve beta konformasyonu olmak üzere iki olası bileşim bulunmaktadır. Her iki konformasyon da belirgin karakteristik pikler vermektedir. β -konformasyonu; 1630 cm^{-1} (amit I), 1530 cm^{-1} (amit II), 1265 cm^{-1} (amit III) ve 700 cm^{-1} (amit V) bölgelerinde; alpha heliks-konformasyonu ise 1660 cm^{-1} (amit I), 1235 cm^{-1} (amit III) ve 650 cm^{-1} (amit V) bölgelerinde absorpsiyon pikleri vermektedir [20, 21]. 100İF filminde %100 oranında yer alan ipek fibroin β -konformasyonundan kaynaklanan pikler 1538 cm^{-1} (amit II) ve 681 cm^{-1} (amit V) bölgelerinde; alpha heliks-konformasyondan kaynaklanan pikler ise 1654 cm^{-1} (amit I) ve 1240 cm^{-1} (amit III) bölgelerinde gözlenmiştir. 100İF filminde 1538 cm^{-1} ve 1240 cm^{-1} de gözlenen keskin piklerin İF/PVA filmlerinde şiddetlerinin oldukça azaldığı görülmektedir. Bu durum İF ve PVA-COOH polimerleri arasında EDC/NHS ile kimyasal çapraz-bağlanmanın gerçekleştiğine atfedilmiştir.

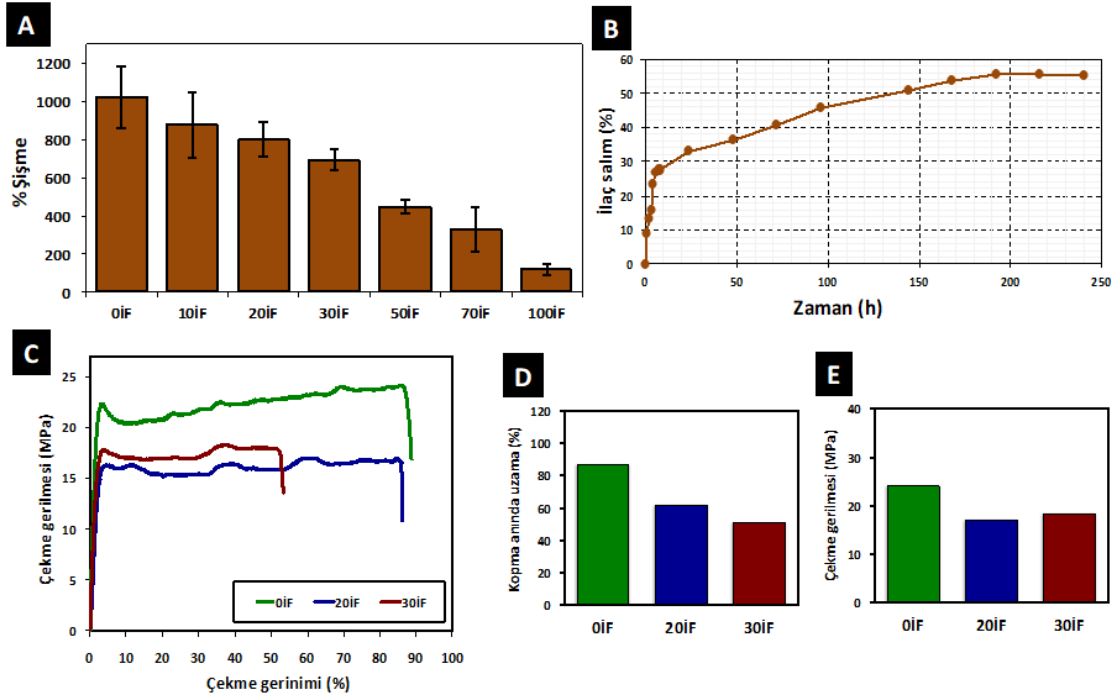
X-ışını difraksiyonu, numunenin kristalinite derecesi hakkında bilgi almak için kullanılır [9]. İF/PVA membran yara örtülerinin X-ışını paternleri Şekil 3B 'de görülmektedir. PVA $2\theta = 19,8^\circ$ de bir adet difraksiyon piki vermektedir. İpek fibroininin ana kırınım pikleri ise sırasıyla $2\theta = 12,88^\circ$ (ipek-I yapısını gösterir) ve $20,11^\circ$ (ipek-II yapısını temsil eder) olarak ortaya çıkmaktadır [19, 20]. İF/PVA filmlerinin XRD paternlerinin, saf ipek fibroin (100İF) ve saf PVA (0İF) filmlerine kıyasla bazı farklılıklar gösterdiği görülmüştür. İF ve PVA'nın yapısından kaynaklanan ana kırınım piklerinin birbiriyle örtüştüğü, filmlerde artan İF miktarı ile kırınım piklerinin tepe noktasının sağ tarafa doğru kaydığı görülmektedir. Sonuçlar, İF/PVA filmlerinin kırınım desenlerinde, her iki bileşenin eğrilerinin birbiri ile üst üste çakıştığını göstermiştir.



Şekil 2. (A) PVA ve PVA-COOH ürününün FTIR grafiği ve (B) PVA-COOH ürününün ^1H NMR grafiği



Şekil 3. İF/PVA membran yara örtülerinin (A) FTIR grafiği (B) XRD grafiği ve (C) optik mikroskop görüntüleri



Şekil 4. (A) İF/PVA membran yara örtülerinin şişme sonuçları, (B) ilaç salım sonuçları, (C-E) mekaniksel dayanım sonuçları

Şekil 3C'de; 0İF, 30İF ve 100İF filmlerinin optik mikroskop altındaki görüntüleri görülmektedir. 30İF filminde herhangi bir faz ayrımı gözlenmemektedir. Yukarıda da açıklandığı üzere bunun temel nedeni sentez sırasında kullanılan GLS molekülünün uyumlaştırıcı görevi görmesinden kaynaklanmaktadır. Optik mikroskop görüntü sonuçları; PVA/İF filmlerinde yüksek İF oranlarında (>30İF) meydana gelen faz ayrışmasının GLS katkısıyla bir dereceye kadar geliştirilebildiğini

doğrulamıştır [19]. Buna ek olarak; iki polimerin karıştırılmasıyla indüklenen kristalizasyon nedeniyle 30İF filminin üst yüzeyinin morfolojisinde pürüzler meydana gelmiştir [20].

Hazırlanan İF/PVA membran yara örtülerinin % şişme değerlerini belirlemek için şişme deneyleri yapılmıştır. Şekil 4A'daki % şişme değeri sonuçları, İF/PVA membran yara örtülerinin denge % şişme değerlerinin %1025-116 aralığında olduğunu

göstermektedir. Tüm test edilen filmler arasında en yüksek % şişme değerine sahip olan 0İF (%1025); en düşük % şişme değerine sahip olan filmi ise 100İF (%116) olduğu bulunmuştur. Yapıda PVA miktarının artmasıyla birlikte filmlerin % şişme değerlerinde artış gözlenmiştir. Bu durum yapıda bulunan PVA'nın İF/PVA filmlerinin higroskopisitesini artırdığını göstermektedir. Tüm bu sonuçlar literatür ile uyumlu olup; İF/PVA filmlerindeki hidrofilik grupların sayısının artışıyla birlikte polimer-içi ve polimerler-arası zincir reaksiyonlarıyla oluşan esnek ağ yapıya atfedilebilir [22, 23].

Saf ipek fibroin filmlerinin (100İF) mekanik gücü zayıftır, kuru koşullarda kırılma yapıdadırlar. Bu nedenle yara örtüleri olarak tek başlarına kullanımları uygun değildir. Daha iyi yara örtü performansı için mekanik özelliklerinin iyileştirilmesi gerekmektedir [24]. Bu dezavantajı ortadan kaldırmak için diğer polimerlerle birlikte kullanımları araştırılmaktadır. Bu çalışmada; yara iyileşme sürecini hızlandıran İF filmlerinin mekaniksel dayanımlarını iyileştirmek için PVA-COOH polimeri ile birlikte kullanımları araştırılmıştır. Farklı formülasyonlardaki İF/PVA filmlerinin (0İF, 20İF ve 30İF) gerilme mukavemeti ve kırılma noktasındaki uzamasını karakterize etmek için çekme testi uygulanarak gerilme-gerinim eğrileri çizilmiştir. Şekil 4C'de 0İF 20İF ve 30İF örneklerine ait gerilme-gerinim eğrileri görülmektedir. 100İF filminin kırılma bir yapıda olması nedeniyle mekaniksel dayanım testi uygulanmamıştır. Beklendiği gibi, 0İF filminin kırılma anındaki %86,5'lik uzama değeri ile diğer karışım filmlerinden (20İF için %61,75 ve 30İF için 51,27) daha esnek yapıda olduğu görülmektedir. (Şekil 4D). İF/PVA filmlerindeki İF miktarı arttıkça kırılma anındaki uzama değerinde düşüş gözlenmiştir. İF içeren ürünler (20İF ve 30İF) benzer gerilme dayanımları sergilerken, içermeyen örneklere kıyasla bir miktar düşüş söz konusu olup 30İF ürününün yara örtüsü olarak kullanımının (10İF ve 20İF filmlerine göre daha yüksek oranda ipek fibroin içermesi nedeniyle) daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Yüksek oranda PVA içeren İF/PVA membran yara örtüleri, daha fazla sıvı absorbe edeceğinden yara yatağını eksudanın birikmesinden koruyarak yara örtüsünün değişim sıklığını azaltacaktır [9]. Bunun yanında yapının ipek fibroin içermesi yaranın iyileşme hızını artıracaktır [25-28]. Tüm sonuçlar göz önüne alındığında en optimum formülasyonun 30İF ürünü olduğu sonucuna varılmış ve ilaç yükleme ve salım çalışmaları için 30İF ürünü kullanılmıştır.

Etkili bir ideal yara örtüsü, sargının sık değişmesini önlemek ve iyileşme sürecini hızlandırmak için kontrollü ilaç salımını uzun süre sürdürmelidir [10]. Bu çalışmada; İF/PVA membran yara örtülerinin ilaç salım davranışlarını incelemek için model bir ilaç olarak kuersetin, kullanılmıştır. Kuersetin, Bölüm 2.5 'de belirtildiği şekilde 30İF filmlerine sentez sırasında yüklenmiştir. Filmlerin salım davranışı fosfat

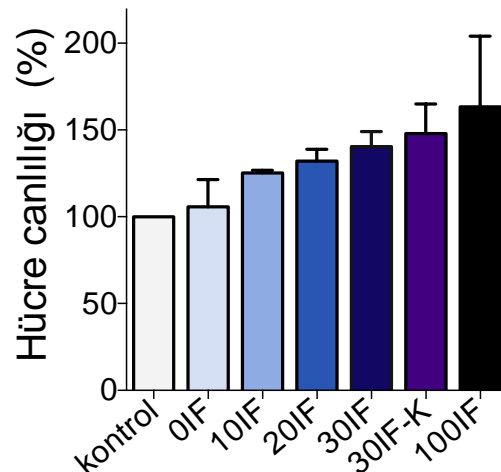
tamponunda (pH 7,4) incelenmiştir. Kuersetin yüklü 30İF filmlerinden (30İF-K) zamana bağlı kuersetin salımı Şekil 4B'de verilmiştir. Sonuçlardan da anlaşılacağı üzere, 30İF-K filmi tipik bir bifazik ilaç salım davranışı sergilemiştir. Salımın birinci fazında patlama etkisi ile ilk 4 saatte kuersetinin yaklaşık %23'ü salınırken (salınan toplam kuersetin miktarının yaklaşık %50'si), patlama etkisini takiben uzatılmış bir salım gerçekleşmiştir. Kuersetin salımı yavaşlamış ve 8 gün içerisinde kuersetinin yaklaşık %55 'si salınmıştır. Sonuçlar, uzun süreli ilaç salım profili gösteren 30İF filminin potansiyel bir yara örtüsü olarak kullanılabilirliğini göstermiştir.

Klasik yara örtülerinin kullanım süreleri 1-3 gün arasında değişmektedir. Uzun süreli ilaç salım profili gösteren yara örtüleri ise yara bölgesinde etken maddenin salımını uzun sürede ve sürekli şekilde gerçekleştirdiklerinden sık sık yara örtüsünün değiştirilmesine olan ihtiyacı azaltmaktadır. Böylece yara bölgesinin ihtiyacından fazla ilaç ve malzeme kullanılmasının önüne geçilmiş olmaktadır [29]. Bu çalışmada geliştirilen uzun süreli ilaç salımı yapabilen yara örtüsü ile bir haftaya kadar değişim yapılmadan kullanılabilir bir ürün geliştirilmiştir.

3.3. Membran yara örtülerinin sitotoksikite testi sonuçları

İF temelli malzemelerin biyoyumlu malzemeler oldukları hem *in vitro* hem *in vivo* hücre çoğalmasını ve büyümesini artırdıkları bilinmektedir [30-34].

Çapraz bağlanmış İF/PVA membran yara örtülerinin biyoyumluluğu; MTT testi ile MKH'lar üzerinde Bölüm 2.6'da açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. İF/PVA membran yara örtülerinin sırasıyla (0İF, 10İF, 20İF, 30İF ve 100İF) %106, %125, %132, %140 ve %163; kuersetin yüklü 30İF-K filminin ise %148 canlılık gösterdiği bulunmuştur. Sonuçlardan anlaşılacağı üzere, yapıdaki İF miktarı arttıkça % hücre canlılığı artmaktadır (Şekil 5). Dolayısıyla yapıdaki İF miktarının artması kontrol gruplarına göre hücrelerin çoğalma hızlarını artırmaktadır.



Şekil 5. İF/PVA membran yara örtülerinin hücre canlılığı sonuçları

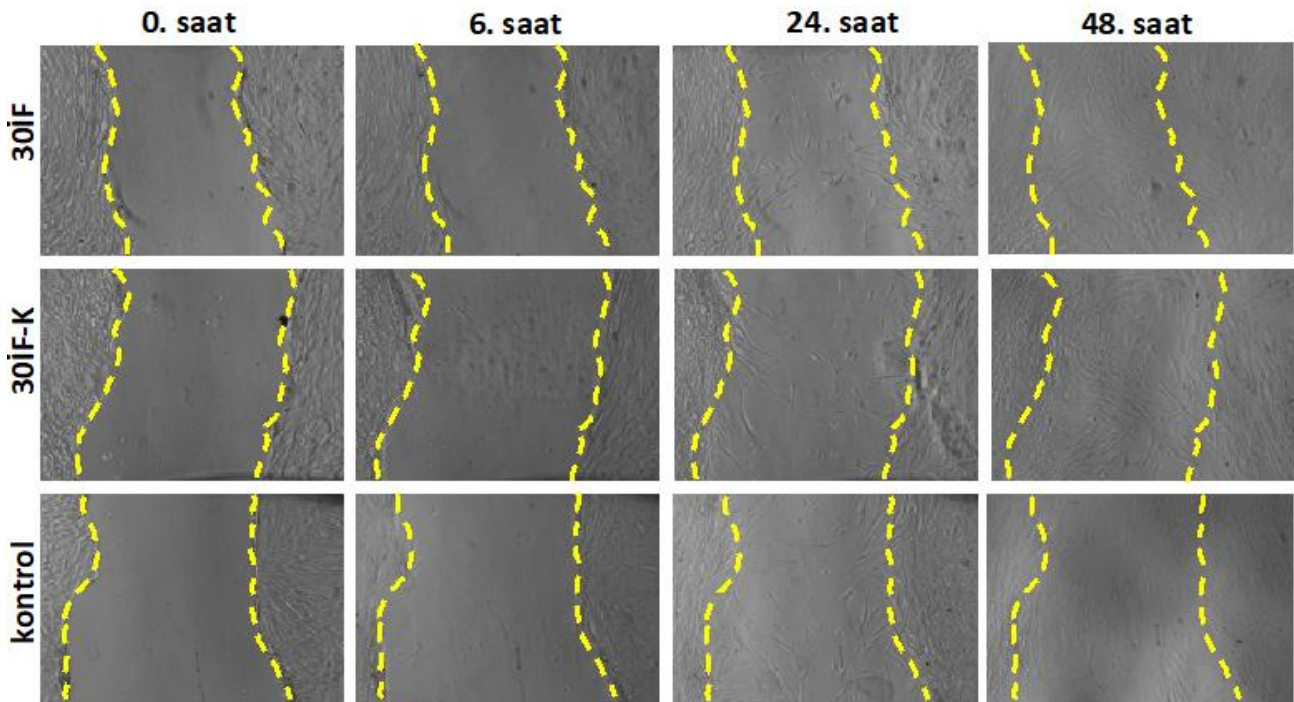
Kuersetin fibroblast proliferasyonunu artırır, immün hücre infiltrasyonunu azaltır ve fibrozis ile ilişkili sinyalleme yollarında sinyallemede değişiklik yapmaktadır. Buna ek olarak, *in vivo* ve *in vitro* olarak yara iyileşmesinde fibrozis ve skar oluşumunu azalttığı bilinmektedir [11]. Bu bilgiler ışığında; 30İF ve kuersetin yüklü 30İF filminin (30İF-K) sitotoksitesite sonuçları karşılaştırıldığında, model ilaç olarak kullanılan kuersetinin hücrelerin çoğalma hızlarına 30İF filmine kıyasla çok daha fazla oranda artırdığı görülmekte olup sonuçlar literatür ile uyumludur. Sonuç olarak, hazırlanan tüm filmlerin biyoyumlu olduğu ve başta yara örtüsü olmak üzere, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp dahil birçok alanda kullanılabileceği düşünülmektedir.

3.4. Membran yara örtü *In Vitro* yara iyileştirme etkinlikleri

Geliştirilen İF/PVA membran yara örtülerinin mükemmel biyoyumluluğu, hidrojellerinin *in vitro* yara iyileştirme etkinliklerini araştırılmasına neden olmuştur. Yara modeli için steril 200 µl pipet ucu kullanılmış ve MKH'ların konfluent tabakası üzerinde düz bir çizik oluşturulmuştur. Sonuçlar işlem sonrası yara modelindeki kapanma bakımından değerlendirilmiştir. Şekil 6'da 30İF ve 30İF-K filmlerine ait yara iyileştirme etkinliği (çizik testi) sonuçları görülmektedir. Sonuçlar, 30İF ve 30İF-K filmlerinin varlığında kontrol grubuna karşı yara modelinin daha hızlı kapandığını göstermekte ve bu durum hücre göçü üzerinde olumsuz etkilerinin olmadığına işaret etmektedir. Geliştirilen 30İF filminin potansiyel ilaç taşıyıcı bir yara örtüsü olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada; uzun süreli ilaç salımı yapabilen kuersetin yüklü İF/PVA membran yara örtüsü geliştirilmiştir. Çözücü döküm yöntemi ile EDC/NHS varlığında PVA/İF esaslı bir seri hidrojel filmler sentezlenmiş potansiyel ilaç taşıyıcı bir yara örtüsü olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Filmlerin FTIR sonuçları, İF ve PVA-COOH polimerleri arasında EDC/NHS ile kimyasal çapraz-bağlanmanın gerçekleştiğini göstermiştir. Yapıda beklediği gibi PVA miktarının artmasıyla birlikte % şişme değerlerinde artış, İF miktarı arttıkça kırılma anındaki uzama değerinde düşüş gözlenmiştir. Sitotoksitesite analizlerinde, yapıdaki artan İF miktarının % hücre canlılığını olumlu yönde etkilediği görülmüştür. Bu sonuç, yapıdaki İF miktarındaki artışın kontrol gruplarına kıyasla hücrelerin çoğalma hızlarını artırdığı anlamına gelmektedir. Elde edilen sonuçlar ışığında, 30İF ürününün yara örtüsü olarak kullanımının (10İF ve 20İF filmlerine göre daha yüksek oranda ipek fibroin içermesi nedeniyle) daha uygun olduğu bulunmuştur. Takiben 30İF ürününe model ilaç olarak kuersetin yüklenmiş ve salım profili incelenmiştir. 30İF-K filmi tipik bir bifazik ilaç salım davranışı sergileyerek ilk 4 saatte yapısında sonrasında uzatılmış bir salım ile 8 gün içerisinde yaklaşık %55 'sini salmıştır. Sonuçlar, kuersetin yüklü 30İF filminin uzun süreli ilaç salım profil davranışına sahip olduğunu göstermiştir. 30İF ürününe ve 30İF-K ürününe gerçekleştirilen *in vitro* yara modeli testi (çizik testi) sonuçları, geliştirilen ürünün potansiyel ilaç taşıyıcı bir yara örtüsü olarak kullanılabileceğini göstermiştir.



Şekil 6. İF/PVA membran yara örtülerinin (30İF ve 30İF-K) yara iyileştirme etkinliği (çizik testi) sonuçları

Kaynakça

- [1] Farokhi, M., Mottaghitalab, F., Fatahi, Y., Khademhosseini, A., Kaplan, D. L. 2018. Overview of silk fibroin use in wound dressings. *Trends in biotechnology*, 36(9), 907-922.
- [2] Çalamak, S., Erdoğan, C., Özalp, M., Ulubayram, K. 2014. Silk fibroin based antibacterial bionanotextiles as wound dressing materials. *Materials Science and Engineering: C*, 43, 11-20.
- [3] Guziewicz, N., Best, A., Perez-Ramirez, B., & Kaplan, D. L. 2011. Lyophilized silk fibroin hydrogels for the sustained local delivery of therapeutic monoclonal antibodies. *Biomaterials*, 32(10), 2642-2650.
- [4] Bayraktar, O., Malay, Ö., Özgari, Y., Batıgün, A. 2005. Silk fibroin as a novel coating material for controlled release of theophylline. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(3), 373-381.
- [5] Wang, Y. X., Qin, Y. P., Kong, Z. J., Wang, Y. J., Ma, L. 2014. Glutaraldehyde Cross-Linked Silk Fibroin Films for Controlled Release. In *Advanced Materials Research*, 887, 541-546.
- [6] Murphy, A. R., Kaplan, D. L. 2009. Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin. *Journal of materials chemistry*, 19(36), 6443-6450.
- [7] Panico, A., Paladini, F., Pollini, M. 2019. Development of regenerative and flexible fibroin-based wound dressings. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 107(1), 7-18.
- [8] Kundu, J., Mohapatra, R., Kundu, S. C. 2011. Silk fibroin/sodium carboxymethylcellulose blended films for biotechnological applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 22(4-6), 519-539.
- [9] Zhang, D., Zhou, W., Wei, B., Wang, X., Tang, R., Nie, J., Wang, J. 2015. Carboxyl-modified poly (vinyl alcohol)-crosslinked chitosan hydrogel films for potential wound dressing. *Carbohydrate polymers*, 125, 189-199.
- [10] Kant, V., Jangir, B. L., Nigam, A., Kumar, V., Sharma, S. 2017. Dose regulated cutaneous wound healing potential of quercetin in male rats. *Wound Medicine*, 19, 82-87.
- [11] Vedakumari, W. S., Ayaz, N., Karthick, A. S., Senthil, R., Sastry, T. P. 2017. Quercetin impregnated chitosan-fibrin composite scaffolds as potential wound dressing materials—Fabrication, characterization and in vivo analysis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97, 106-112.
- [12] Jangde, R., Srivastava, S., Singh, M. R., Singh, D. 2018. In vitro and In vivo characterization of quercetin loaded multiphase hydrogel for wound healing application. *International journal of biological macromolecules*, 115, 1211-1217.
- [13] Rockwood, D. N., Preda, R. C., Yücel, T., Wang, X., Lovett, M. L., Kaplan, D. L. 2011. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nature protocols*, 6(10), 1612-1631.
- [14] Bashir, S., Teo, Y. Y., Ramesh, S., Ramesh, K. 2018. Synthesis and characterization of karaya gum-g-poly (acrylic acid) hydrogels and in vitro release of hydrophobic quercetin. *Polymer*, 147, 108-120.
- [15] Monjezi, J., Jamaledin, R., Ghaemy, M., Moeini, A., Makvandi, P. 2018. A Performance Comparison of Graft Copolymer Hydrogels Based on Functionalized-Tragacanth Gum/Polyacrylic Acid and Polyacrylamide as Antibacterial and Antifungal Drug Release Vehicles. *American Journal of Nanotechnology & Nanomedicine Research*, 1(1), 010-015.
- [16] Alavarse, A. C., de Oliveira Silva, F. W., Colque, J. T., da Silva, V. M., Prieto, T., Venancio, E. C., Bonvent, J. J. 2017. Tetracycline hydrochloride-loaded electrospun nanofibers mats based on PVA and chitosan for wound dressing. *Materials Science and Engineering: C*, 77, 271-281.
- [17] Zhou, Z. F., Xu, W. B., He, D., Fan, J. X., Yu, F., Ren, F. M. 2007. Solid-state grafting of succinic anhydride onto poly (vinyl alcohol). *Journal of applied polymer science*, 103(2), 848-852.
- [18] Tanaka, T., Tanigami, T., Yamaura, K. 1998. Phase separation structure in poly (vinyl alcohol)/silk fibroin blend films. *Polymer international*, 45(2), 175-184.
- [19] Dai, L., Li, J., Yamada, E. 2002. Effect of glycerin on structure transition of PVA/SF blends. *Journal of applied polymer science*, 86(9), 2342-2347.
- [20] Kundu, J., Mohapatra, R., Kundu, S. C. 2011. Silk fibroin/sodium carboxymethylcellulose blended films for biotechnological applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 22(4-6), 519-539.
- [21] Kuzuhara, A., Asakura, T., Tomoda, R., Matsunaga, T. 1987. Use of silk fibroin for enzyme membrane. *Journal of biotechnology*, 5(3), 199-207.
- [22] He, H., Cai, R., Wang, Y., Tao, G., Guo, P., Zuo, H., Xia, Q. 2017. Preparation and characterization of silk sericin/PVA blend film with silver nanoparticles for potential antimicrobial application. *International journal of biological macromolecules*, 104, 457-464.

- [23] Zhang, C. H., Yang, F. L., Wang, W. J., Chen, B. 2008. Preparation and characterization of hydrophilic modification of polypropylene non-woven fabric by dip-coating PVA (polyvinyl alcohol). *Separation and Purification Technology*, 61(3), 276-286.
- [24] Lee, K. H., Baek, D. H., Ki, C. S., Park, Y. H. 2007. Preparation and characterization of wet spun silk fibroin/poly (vinyl alcohol) blend filaments. *International journal of biological macromolecules*, 41(2), 168-172.
- [25] Gil, E. S., Panilaitis, B., Bellas, E., Kaplan, D. L. 2013. Functionalized silk biomaterials for wound healing. *Advanced healthcare materials*, 2(1), 206-217.
- [26] Vasconcelos, A., Gomes, A. C., Cavaco-Paulo, A. 2012. Novel silk fibroin/elastin wound dressings. *Acta biomaterialia*, 8(8), 3049-3060.
- [27] Roh, D. H., Kang, S. Y., Kim, J. Y., Kwon, Y. B., Kweon, H. Y., Lee, K. G., Lee, J. H. 2006. Wound healing effect of silk fibroin/alginate-blended sponge in full thickness skin defect of rat. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(6), 547-552.
- [28] Liu, T. L., Miao, J. C., Sheng, W. H., Xie, Y. F., Huang, Q., Shan, Y. B., Yang, J. C. 2010. Cytocompatibility of regenerated silk fibroin film: a medical biomaterial applicable to wound healing. *Journal of Zhejiang University Science B*, 11(1), 10-16.
- [29] Kurtoğlu, A. H., Karataş, A. 2009. Yara tedavisinde güncel yaklaşımlar: modern yara örtüleri. *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 38 (3), 211-232.
- [30] Park, Y. R., Sultan, M. T., Park, H. J., Lee, J. M., Ju, H. W., Lee, O. J., Park, C. H. 2018. NF-κB signaling is key in the wound healing processes of silk fibroin. *Acta biomaterialia*, 67, 183-195.
- [31] Park, Y. R., Ju, H. W., Lee, J. M., Kim, D. K., Lee, O. J., Moon, B. M., Park, C. H. 2016. Three-dimensional electrospun silk-fibroin nanofiber for skin tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, 93, 1567-1574.
- [32] Park, H. J., Lee, O. J., Lee, M. C., Moon, B. M., Ju, H. W., min Lee, J., Park, C. H. 2015. Fabrication of 3D porous silk scaffolds by particulate (salt/sucrose) leaching for bone tissue reconstruction. *International journal of biological macromolecules*, 78, 215-223.
- [33] Lee, D. H., Tripathy, N., Shin, J. H., Song, J. E., Cha, J. G., Min, K. D., Khang, G. 2017. Enhanced osteogenesis of β-tricalcium phosphate reinforced silk fibroin scaffold for bone tissue biofabrication. *International journal of biological macromolecules*, 95, 14-23.
- [34] Lee, M. C., Kim, D. K., Lee, O. J., Kim, J. H., Ju, H. W., Lee, J. M., Park, C. H. 2016. Fabrication of silk fibroin film using centrifugal casting technique for corneal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 104(3), 508-514.

Biochar Reinforced Polyvinyl Alcohol /Corn Starch Biocomposites

Pınar TERZİOĞLU*¹, Fatma Nur PARİN²

^{1,2}Bursa Technical University, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Department of Fiber and Polymer Engineering, 16310, Bursa, Turkey

(Alınış / Received: 21.05.2019, Kabul / Accepted: 23.12.2019, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Keywords

Biochar,
Cross-linked composite,
Polyvinylalcohol,
Starch

Abstract: The utilization of biochar in polymer composites can be considered as a sustainable approach that provide valorization of a waste to a value-added material and at the same time diminish biowaste in a smart way. This study is focused on the evaluation of biochar as a filler in polyvinyl alcohol /corn starch composites. The composites were prepared via solution mixing and casting method using citric acid as a plasticizer and glutaraldehyde as a cross-linker. Distribution of biochar in the PVA/starch matrix was evaluated by optical microscopy. The structural features of composites were characterized using FTIR spectroscopy. Effects of biochar loading ratio (0-12 wt%) on the thermal stability of the PVA/starch blends were determined by differential scanning calorimetry and thermogravimetric analyses. The decomposition temperatures of the PVA/starch/biochar composites decreased in comparison to PVA/starch composites.

Biyokömür Takviyeli Polivinil Alkol /Mısır Nişastasası Biyokompozitler

Anahtar Kelimeler

Biyokömür,
Çapraz bağlı kompozit,
Polivinil alkol,
Nişasta

Özet: Biyokömürün polimer kompozitlerde kullanılması, atığın katma değerli bir malzeme olarak değerlendirilmesini sağlayan ve aynı zamanda biyo-atığı akıllıca azaltan sürdürülebilir bir yaklaşım olarak düşünülebilir. Bu çalışma, polivinil alkol /mısır nişastasası kompozitlerinde biyokömürün dolgu maddesi olarak değerlendirilmesine odaklanmıştır. Kompozitler, plastikleştirici olarak sitrik asit ve çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılarak çözelti karıştırma ve döküm yöntemi ile hazırlandı. PVA / nişasta matrisindeki biyokömür dağılımı optik mikroskop ile değerlendirildi. Kompozitlerin yapısal özellikleri FTIR spektroskopisi kullanılarak karakterize edildi. Biyokömür oranının (ağırlıkça %0-12) PVA/nişasta karışımının ısıl kararlılığı üzerindeki etkileri diferansiyel taramalı kalorimetre ve termogravimetrik analizle belirlendi. PVA/nişasta /biyokömür kompozitlerin bozunma sıcaklıkları, PVA/nişasta kompozitlerine kıyasla azaldı.

1. Introduction

Recently, there has been a growing interest in composite materials, with a particular focus on polymer based ones due to their superior and unique properties. At the same time, the replacement of traditional petroleum based plastics by eco-friendly polymers become attractive in scientific and technological communities with respect to environmental concerns [1, 2]. Therefore, extensive researches on polymer biocomposites are going on around the world.

Polymer biocomposites can be defined as materials formed by a biodegradable polymer matrix and a filler derived from natural biomass [3, 4]. Among the

various polymer biocomposites, polyvinyl alcohol (PVA) and starch based composites have been considered as one of the most promising biodegradable materials [5]. However, widespread applications of the blends of PVA and starch are limited because of their water sensitivity, poor thermal and mechanical properties. Earlier studies showed that incorporation of suitable reinforcement fillers is a way to overcome these drawbacks [6-8]. Over the last few years, the evaluation of carbon based fillers as carbon nanotubes [9, 10], graphene [11, 12] and graphene oxide[13] has become a hot research for enhancement of the properties of PVA/starch composites. Jose et al. [9] prepared carbon nanotube reinforced PVA/starch composites by solution casting method. Two carbon nanotube

addition ratios were used as 0.5 and 2 wt% of polymer blend. It was reported that the 2 wt% carbon nanotube addition improved the thermal stability due to increased compatibility of the blends. In the study of Massoumi et al. [10], poly(ethylene glycol)-functionalized multiwalled carbon nanotubes were used as filler for poly(vinyl alcohol)/starch nanocomposites. It was shown that the incorporation of functionalized multiwalled carbon nanotubes enhanced the mechanical properties of the composites which was related to the formation of strong interfacial forces and hydrogen bonds between the carbon nanotubes and the PVA/starch matrix. Bin-Dahman et al. [11] studied the electrical and dielectric features of PVA/starch/graphene nanocomposites. The results demonstrated that graphene addition increased the DC and AC conductivity of composites. Wu et al. [13] added graphene oxide to the PVA/starch composite films and found that increase in the graphene oxide concentration resulted in the enhancement of film's moisture resistance and slight improvement of the thermal stability. This has been attributed to the chemical interaction between nano-graphene oxide and PVA/starch composite film.

Biochar is also a carbonaceous renewable material which can be obtained through pyrolysis of several wastes [14]. Biochar presents very attractive properties such as low cost, high chemical stability, high porosity and renewability [15]. It is primarily evaluated in soil amendment applications as fertilizer and carbon sequestration agent [16]. Another widespread usage area of biochar is adsorption of contaminants [17, 18]. In recent years, biochar has received significant attention as an effective filler to improve properties of various polymer materials including epoxy [19, 20], polyethylene [21, 22], polypropylene [23-26], polylactic acid [27], PVA [28-30] and nylon [31]. The biochar incorporation to the polymer matrix provides multiple advantages. Generally, the electrical and mechanical features of the resulting composite materials were finer compared with the neat polymers [4].

It is important to take into consideration that both PVA and starch have a polar nature [28]. Especially, the biochar addition to the PVA/starch blends can enhance the interaction between PVA and starch due to containing surface functional groups such as hydroxyl, aliphatic, etc. [28, 32, 33].

To the best of the authors' knowledge, no research has been reported yet in order to evaluate biochar incorporated PVA/starch biocomposites. The present study aims to investigate the effect of biochar addition on the thermal stability of PVA/starch biocomposites.

2. Material and Method

2.1. Materials

Biochar (particle size <500 μm) was a kind gift from Synpet Technologies (Istanbul, TURKEY). Poly (vinyl alcohol) (Mw 30,000, purity 95.4%, degree of hydrolysis 87.16%, viscosity 24.9 mPa.S) was purchased from Zag Kimya, TURKEY. Corn starch was obtained from Güneş Company, TURKEY. Citric acid was purchased from Aksu Company, TURKEY. Glutaraldehyde was purchased from Alfosol.

2.2. Preparation of biocomposites

PVA/starch biocomposites with different biochar concentrations (0, 3, 6, 9, 12 wt% of total polymer) was prepared in several steps. The blend ratio of PVA and starch was 80:20 (Table 1). The used total distilled water was 100 mL. First, an adequate amount of PVA was dissolved in water for at 90°C overnight. Separately, corn starch was gelatinized for 10 minutes at 100°C under continuous stirring. Afterward, gelatinized starch was added to the PVA solution and continuously stirred for 30 minutes at 70°C. Then, biochar dispersion in distilled water was ultrasonicated for 30 minutes using an ultrasonic probe (Bandelin Sonorex) and poured onto the PVA/starch mixture. The PVA/starch/biochar mixture was stirred for 30 min to obtain homogeneous solution in a 600 mL beaker. Citric acid (25 wt % of total polymer) was added to the solution and stirred for 10 minutes at 50°C. Finally, glutaraldehyde (500 μL) was added to the mixture with holding at 100°C for 5 minutes and the dried at 50°C in a vacuum oven (JEIO TECH/OV-11) for 16 hours. The composites were kept in zip lock polyethylene bags.

Table 1. The preparation formulation of polyvinyl alcohol /corn starch/biochar composites

Sample Code	PVA (wt %)	Starch (wt %)	Biochar (wt % of total polymer)	Citric acid (wt % of total polymer)
PSB0	80	20	0	25
PSB3	80	20	3	25
PSB6	80	20	6	25
PSB9	80	20	9	25
PSB12	80	20	12	25

2.3. Characterization of starting materials

The moisture, ash and volatile matter content of biochar were determined according to the European Biochar Certificate - Guidelines for a Sustainable Production of Biochar [34]. The moisture content of biochar and corn starch were determined by oven drying at 105°C, while the ash content was determined by combusting the samples at 550°C in an oven (Nabertherm LHT 08/18, Germany). The volatile matter of biochar was examined by heating at 950°C for 7 min in an oven. The results were calculated according to mass loss of samples.

2.4. Characterization of biocomposites

All of the samples were characterized using an optical microscope (Nikon Eclipse LV150N) with 20X magnification.

Thermogravimetric analyses were carried out on a TGA Q500 thermogravimetric analyzer (TA SDT 650 Instruments, USA) to assess the relative thermal stabilities of the composites.

Differential scanning calorimetry (DSC) was also performed to determine the glass-transition and melting behavior of the biocomposites using a TA DSC 25 Instrument (USA). Samples (6-8 mg) were weighted into standard aluminum pans and then heated from 20°C to 300°C at a heating rate of 10°C/min under nitrogen atmosphere.

3. Results

The properties of starting materials have great influence on the final properties of produced materials. The proximate analyses of biochar and corn starch were summarized in Table 2. The moisture, ash and volatile matter of biochar were found to be 2.75, 1.00 and 25.12%, respectively. Moreover, the corn starch had 0.15 and 6.04% moisture and ash content, respectively.

Table 2. Moisture, volatile matter, and ash contents of biochar and corn starch

Sample	Moisture (%)	Ash (%)	Volatile matter (%)
Biochar	2.75	1.00	25.12
Corn starch	0.15	6.04	-

The digital photographs of the neat PVA/starch composite and PVA/starch/biochar (PSB6) composite are given in Figure 1a and 1b, respectively.

The IR spectra were measured with a Thermo scientific Nicolet i550 spectrophotometer at a resolution of 4 cm⁻¹ in the range of 4000-500 cm⁻¹. The other PSB composites had an appearance like PSB6 sample (not given). After the biochar addition, the color of the PVA/starch composite was changed from white to black. In addition, the thickness of neat PVA/starch and PSB3 sample were found to be similar (~5 mm). Further, the thickness of composites increased with the increment of biochar addition ratio. The thickness of PSB6 was 5.75 mm while the thickness was 6.10 and 6.25 mm for PSB9 and PSB12, respectively.

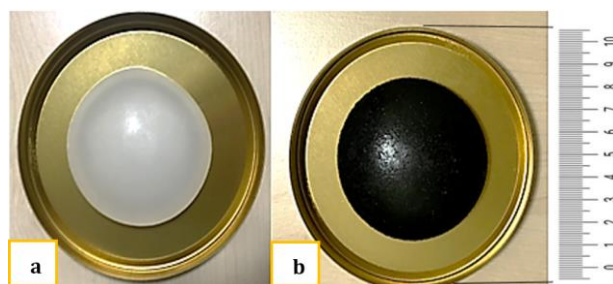


Figure 1. Digital image of (a) neat PVA/starch composite (b) PVA/starch/biochar (PSB6) composite

Figure 2 presents the optical micrographs of neat PVA/starch composite and PVA/starch/biochar composites with different addition levels. The neat PVA/starch composite had a relatively smooth surface containing small bubbles (Figure 2 a). There was an apparent change in the surface appearance and topography of the biochar added composites compared with the neat PVA/starch composite. The biochar can be clearly specified in the composites with bright particles which showed a tiny flake-like appearance. Additionally, the shapes of biochar particles were irregular with an average particle size distribution in the range of 70 to 150 µm. Optical micrographs of the PVA/starch/biochar composites showed that biochar particles are uniformly distributed throughout the surface (Fig. 2 b-e).

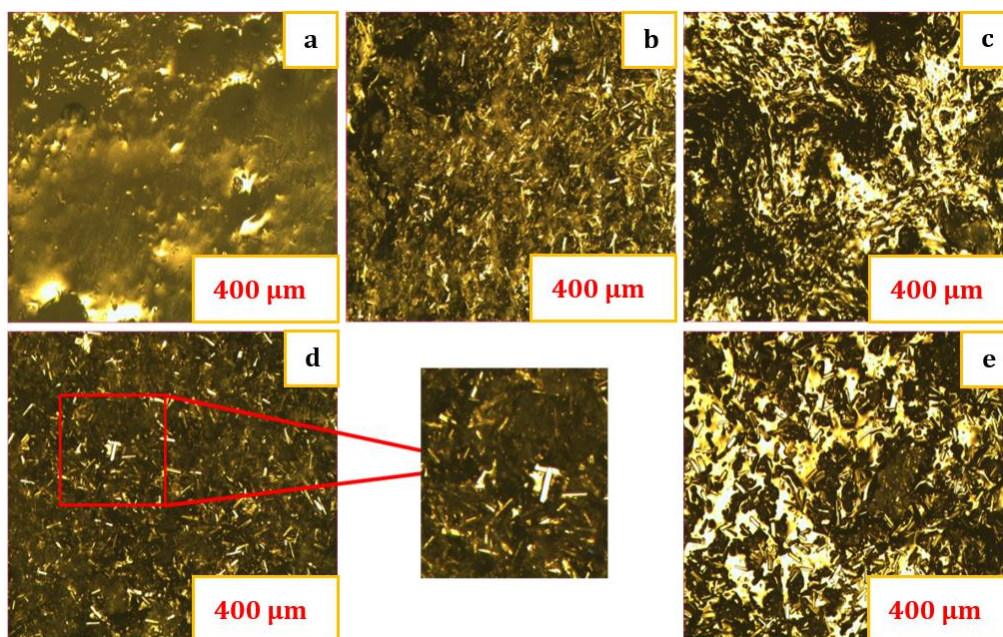


Figure 2. Optical micrographs of the surfaces of (a) neat PVA/starch composite and PVA/starch/biochar composites (b)PSB3 (c) PSB6 (d)PSB9 (e)PSB12 (20x)

The FTIR spectra of the initial components (PVA, starch and biochar) and composites are illustrated in Figure 3 and the functional groups of composites are listed in Table 3. The changes in the functional groups were the evidence of the chemical modifications in the blends.

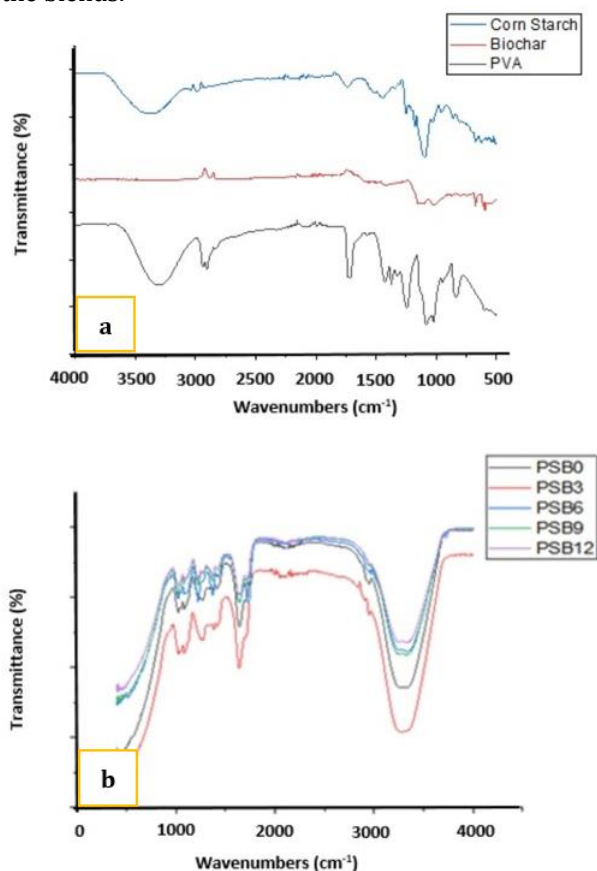


Figure 3. FT-IR spectrum of (a) PVA, starch, and biochar; (b) PVA/corn starch and PVA/corn starch/biochar composites

In the spectra of biochar, the $-OH$ peak centered at 3330 cm^{-1} was missing indicating that the biochar had lower moisture than PVA and starch. The peaks at 2920 and 2850 cm^{-1} represent the $-CH_2$ groups [35].

There was an increased intensity decrease for hydroxyl band ($3100\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$) with the increment of biochar ratio. The band also became narrower. This phenomenon is attributed to the good compatibility of PVA, starch and biochar, as shown in their increased hydrogen bonding [36]. The other shifts and slight intensity changes (1645 and 1250 cm^{-1}) were possibly resulting from intramolecular and intermolecular bonding between starting materials. Compared the PSB0 in the spectrum with the PSB3-PSB12, a new peak (1217 cm^{-1}) appeared with the incorporation of biochar at 6, 9 and 12 wt %, while the 3 wt % biochar incorporated sample (PSB3) had a similar band pattern with PSB0. The peak at 1700 cm^{-1} was due to $C=O$ functional group and the peak moved to the low frequency region with the incorporation of biochar (PSB6-PSB12).

The results revealed that there was a strong interaction between PVA/starch with biochar because of the formation of hydrogen bond between the oxygen-containing groups in biochar and $-OH$ groups available in either starch or PVA. A similar result was encountered by other researchers during the incorporation of graphene to the PVA/starch blends [9].

Thermal degradation behavior is taken into consideration as a significant and simple tool to determine thermal stability of polymer-composites during thermal processing [43]. TGA analysis curves of PVA/starch and PVA/starch/biochar composites are represented in Figure 4. Moreover, 10% weight

loss temperature (T_{d10}), 50% weight loss temperature (T_{d50}) and 90% weight loss temperature (T_{d90}) are presented in Table 4. As expected, the weight loss of PVA/starch composite was higher than the biochar reinforced composites. Neat PVA/starch decomposed without solid residue formation while PSB3-PSB12 biocomposites produced around 4.0-10.7 and 0.7-1.9% solid residue at 500°C and 900°C, respectively (Table 4). This consequence indicating that the biochar may display a condensed phase flame retardant mechanism [39]. There is an increase in the residue with increased biochar incorporation ratio.

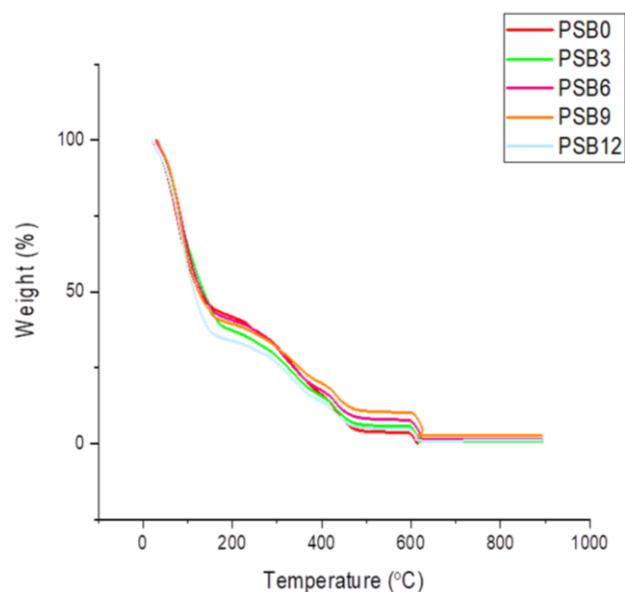


Figure 4. TGA curves of PVA/starch and PVA/starch/biochar composites

Table 3. Assignment of FT-IR bands for PVA/starch, and PVA/starch/biochar composites

Frequency (cm ⁻¹)		Assignment
PSB0-PSB3	PSB6-PSB12	
1022	1022	C-O stretching of the glucose ring [2, 37]
1080	1080	C-O-H stretching vibration [38]
-	1217	C-H stretching vibration [39]
1250	1250	CH ₂ wagging vibration [40]
1374	1374	CH ₂ bending vibration[40]
1420	1420	CH ₂ bending vibrations [40,41]
1645	1645	O-H bending vibration, C=O asymmetric stretching [40]
1700	1690	C=O functional group [42]
2985	2985	CH ₂ symmetric stretching [29]
2940	2940	CH ₂ asymmetric stretching [30]
3100-3400	3100-3400	O-H stretching vibration, free hydroxyl [42]

Table 4. Degradation temperature of PVA/starch, and PVA/starch/biochar composites at residual weight 90% (T_{d90}), 50% (T_{d50}) and 10% (T_{d10})

Sample ID	Biochar Content (%)	T_{d10} (°C)	T_{d50} (°C)	T_{d90} (°C)	V_{max} at T_{max} (min % at °C)	Char at 500 °C (wt %)	Char at 900 °C (wt %)
PSB0	0	75.7	296.7	455.3	3.07 at 424.61	4.07	0
PSB3	3	58.9	136.4	440.2	2.08 at 428.85	6.14	0.68
PSB6	6	59.5	131.4	457.8	1.76 at 431.8	8.31	1.47
PSB9	9	59.9	124.2	499.8	1.81 at 427.24	10.72	1.78
PSB12	12	51.8	114.4	431.8	1.63 at 431.38	9.95	1.92

Under gradually increased temperature, the TGA curves demonstrated that all the biochar reinforced biocomposites decomposed in a four-step weight loss process, while PVA/starch composite showed three-stage degradation. It was observed that higher moisture adsorption was found in all biochar incorporated composites. The biochar reinforced PVA/starch composites decomposed earlier than neat PVA/starch composite.

Similar results were obtained for bamboo charcoal loaded polylactic acid composites [29] and sewage sludge biochar loaded wood/polypropylene biocomposites [14].

For PSB3-PSB12, the first region at a temperature of 80–150°C is due to the evaporation of water. The other two steps above 150°C were due to the melting and degradation of the side chains and main backbone cleavage of polymer matrix. The final stage was the thermo-oxidation of carbonized residue. The starting temperatures of the different decomposition steps for biochar reinforced biocomposites were lower than the neat PVA/starch composite.

These findings indicated that the incorporation of biochar to the PVA/starch matrix can lower the thermal stability of the biocomposites. This can be explained by the slight outgassing of CO, CO₂, and H₂O from inside due to biochar reduction may finally lead to a quick breakdown of the PVA/starch matrix [44]. The result was in accordance with the previous findings reported by Wang et al. [44] on the graphene oxide loaded poly(vinyl alcohol) composites.

The results of the DSC analyses are summarized in Table 5. The PSB3 sample showed approximately similar behavior with the PSB0 sample, which was also realized in the FT-IR spectrum. Merely, the addition of 3 wt% biochar increased the glass-transition temperature (T_g) from 157.81°C to 165.49°C. T_g is highly related to the flexibility of polymeric segments and thus segmental chain motion [45]. The increased T_g represents new hydrogen bond interactions between the polymer matrix and biochar which may result in the limited mobility of polymer chains with the incorporation of biochar. This consequence had an agreement with the study of Sedaghat et al. [46] for the 2.5 wt% of graphene oxide incorporated poly (vinyl alcohol)/starch nanocomposites. As the amount of biochar in the blend increased from 3 wt% to 6-12 wt% the T_g decreased. This is probably related to the weakening of the hydrogen bonding between starch and PVA as a consequence of addition of higher amount of biochar as mentioned in the literature for poly(vinyl alcohol)/starch/graphene nanocomposites [11]. Moreover, the melting temperature of PSB0 and PSB3 samples were found to be 197°C which were slightly higher than the other biochar incorporated composites. Similarly, it was reported that there were decrease in the T_m of biochar incorporated PVA composites [28]. Higher values of melting enthalpies were determined for the 6-12 wt% biochar incorporated biocomposites as compared to the pure and 3wt% biochar incorporated samples.

Table 5. DSC results of PVA/starch blend and its biocomposites containing different amounts of biochar

Sample Code	T _g (°C)	T _m (°C)	Heat of melting, ΔH _m (J/g)
PSB0	157.81	197.40	118.33
PSB3	165.49	197.64	84.14
PSB6	141.08	172.12	412.24
PSB9	143.72	177.75	323.83
PSB12	143.07	182.43	366.86

4. Discussion and Conclusion

PVA/starch/biochar composites were successfully prepared with a simple method in the presence of citric acid and glutaraldehyde. The thermal behavior of the biocomposites was investigated using TGA and DSC. The biochar incorporation significantly affected the degradation pattern of PVA/starch composite. The thermal stability of PVA/starch/biochar composites was lower compared to that of PVA/starch composite. It is worth noting that the glass-transition and melting temperature did not increase in the composites with biochar content higher than 3 wt%. Therefore, further studies should focus on the effect biochar incorporation with lower ratio and biochar particle size on the properties of PVA/starch composites.

Acknowledgment

Synpet Technologies is thanked for supplying the biochar.

References

- [1] Yurdakul, H., Durukan, O., Seyhan, A.T., Celebi, H., Oksuzoglu, M., Turan, S. 2013. Microstructural characterization of corn starch-based porous thermoplastic composites filled with multiwalled carbon nanotubes. *Journal of Applied Polymer Science*, 127(1), 812-820.
- [2] Zanela, J., Casagrande, M., Reis, M.O., Grossmann, M.V.E., Yamashita, F. 2019. Biodegradable Sheets of Starch/Polyvinyl Alcohol (PVA): Effects of PVA Molecular Weight and Hydrolysis Degree. *Waste and Biomass Valorization*, 10(2), 319-326.
- [3] Singha, A.S., 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.
- [4] Giorcelli, M., Savi, P., Khan, A., Tagliaferro, A. 2019. Analysis of biochar with different pyrolysis temperatures used as filler in epoxy resin composites. *Biomass & Bioenergy*, 122, 466-471.
- [5] Srivastava, K.R., Singh, M.K., Mishra, P.K., Srivastava P. 2019. Pretreatment of banana pseudostem fibre for green composite packaging film preparation with polyvinyl alcohol. *Journal of Polymer Research*, 26(4),95.
- [6] Sreekumar, P.A., Al-Harhi, M.A., De S.K. 2012. Reinforcement of starch/polyvinyl alcohol blend using nano-titanium dioxide. *Journal of Composite Materials*, 46(25), 3181-3187.
- [7] Noshirvani, N., Ghanbarzadeh, B., Fasihi, H., Almasi, H. 2016. Starch-PVA Nanocomposite

- Film Incorporated with Cellulose Nanocrystals and MMT: A Comparative Study. *International Journal of Food Engineering*, 12(1), 37-48.
- [8] Guimaraes, M., Botaro, V.R., Novack, K.M., Teixeira, F.G., Tonoli G.H.D. 2015. Starch/PVA-based nanocomposites reinforced with bamboo nanofibrils. *Industrial Crops and Products*, 70, 72-83.
- [9] Jose, J., De, S.K., AlMa'adeed, M.A.A., Dakua, J.B., Sreekumar, P.A., Sougrat, R., Al-Harhi M.A. 2015. Compatibilizing role of carbon nanotubes in poly(vinyl alcohol)/starch blend. *Starch-Starke*, 67(1-2), 147-153.
- [10] Massoumi, B., Jafarpour, P., Jaymand, M., Entezami A.A. 2015. Functionalized multiwalled carbon nanotubes as reinforcing agents for poly(vinyl alcohol) and poly(vinyl alcohol)/starch nanocomposites: synthesis, characterization and properties. *Polymer International*, 64(5), 689-695.
- [11] Bin-Dahman, O.A., Rahaman, M., Khastgir, D., Al-Harhi M.A. 2018. Electrical and Dielectric Properties of Poly(Vinyl Alcohol)/Starch/Graphene Nanocomposites. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 96(4), 903-911.
- [12] Bin-Dahman, O.A., Shehzad, F., Al-Harhi M.A. 2017. Influence of graphene on the non-isothermal crystallization kinetics of poly(vinyl alcohol)/starch composite. *Journal of Polymer Research*, 25(5), 1-10.
- [13] Wu, Z.J., Huang, Y.C., Xiao, L.J., Lin, D.R., Yang, Y.M., Wang, H.W., Yang, Y.Q., Wu, D.T., Chen, H., Zhang, Q., Qin, W., Pu S.Y. 2019. Physical properties and structural characterization of starch/polyvinyl alcohol/graphene oxide composite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 569-575.
- [14] Das, O., Sarmah, A.K., Bhattacharyya D. 2015. A novel approach in organic waste utilization through biochar addition in wood/polypropylene composites. *Waste Management*, 38, 132-140.
- [15] Zhang, J., Tahmasebi, A., Omoriyekomwan, J.E., Yu, J.L. 2019. Production of carbon nanotubes on bio-char at low temperature via microwave-assisted CVD using Ni catalyst. *Diamond and Related Materials*, 91, 98-106.
- [16] Amin, F.R., Huang, Y., He, Y.F., Zhang, R.H., Liu, G.Q., Chen, C. 2016. Biochar applications and modern techniques for characterization. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 18(5), 1457-1473.
- [17] Kaya, N., Yildiz, Z., Ceylan, S. 2018. Preparation and Characterisation of Biochar from Hazelnut Shell and Its Adsorption Properties for Methylene Blue Dye. *Journal of Polytechnic-Politeknik Dergisi*, 21(4), 765-776.
- [18] Elibol, P.S. 2019. Effect of Biochar on Phytoextraction of Persistent Organic Pollutants. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(3), 516-522.
- [19] Ahmetli, G., Kocaman, S., Ozaytekin, I., Bozkurt, P. 2013. Epoxy composites based on inexpensive char filler obtained from plastic waste and natural resources. *Polymer Composites*, 34(4), 500-509.
- [20] Khan, A., Savi, P., Quaranta, S., Rovere, M., Giorcelli, M., Tagliaferro, A., Rosso, C., Jia, C. 2017. Low-cost carbon fillers to improve mechanical properties and conductivity of epoxy composites. *Polymers*, 9(12), 642.
- [21] Li, S., Huang, A., Chen, Y.J., Li, D., Turng, L.S. 2018. Highly filled biochar/ultra-high molecularweight polyethylene/linear low density polyethylene composites for high-performance electromagnetic interference shielding. *Composites Part B: Engineering*, 153, 277-284.
- [22] Zhang, Q., Yi, W., Li, Z., Wang, L., Cai, H. 2018. Mechanical properties of rice husk biochar reinforced high density polyethylene composites. *Polymers*, 10(3), 286.
- [23] Das, O., Bhattacharyya, D., Hui, D., Lau K.T. 2016. Mechanical and flammability characterisations of biochar/polypropylene biocomposites. *Composites Part B: Engineering*, 106, 120-128.
- [24] DeVallance D.B., Oporto, G.S., Quigley, P. 2016. Investigation of hardwood biochar as a replacement for wood flour in wood-polypropylene composites. *Journal of Elastomers & Plastics*, 48(6), 510-522.
- [25] Ikram, S., Das, O., Bhattacharyya, D. 2016. A parametric study of mechanical and flammability properties of biochar reinforced polypropylene composites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 91, 177-188.
- [26] Poulouse, A.M., Elnour, A.Y., Anis, A., Shaikh, H., Al-Zahrani, S., George, J., Al-Wabel, M.I., Usman, A.R., Ok, Y.S., Tsang D.C. 2018. Date palm biochar-polymer composites: An investigation of electrical, mechanical, thermal and rheological characteristics. *Science of the total environment*, 619, 311-318.
- [27] Ho, M.P., Lau, K. T., Wang, H., Hui D. 2015. Improvement on the properties of polylactic acid (PLA) using bamboo charcoal particles. *Composites Part B: Engineering*, 81, 14-25.
- [28] Nan, N., DeVallance, D.B., Xie, X.F., Wang J.X. 2016. The effect of bio-carbon addition on the electrical, mechanical, and thermal properties of polyvinyl alcohol/biochar composites. *Journal of Composite Materials*, 50(9), 1161-1168.

- [29] Mousa, M., Dong, Y. 2018. Strong Poly(Vinyl Alcohol) (PVA)/Bamboo Charcoal (BC) Nanocomposite Films with Particle Size Effect. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(1), 467-479.
- [30] Mousa, M., Dong, Y., Davies I.J. 2018. Eco-friendly polyvinyl alcohol (PVA)/bamboo charcoal (BC) nanocomposites with superior mechanical and thermal properties. *Advanced Composite Materials*, 27(5), 499-509.
- [31] Ogunsona, E.O., Misra, M., Mohanty A.K. 2017. Accelerated hydrothermal aging of biocarbon reinforced nylon biocomposites. *Polymer Degradation and Stability*, 139, 76-88.
- [32] Taneli, V., Oisik, D., Laura, T. 2017. A review on new bio-based constituents for natural fiber-polymer composites, *Journal of Cleaner Production*, 149, 582-596.
- [33] Das, O., Sarmah, A.K. 2015. Mechanism of waste biomass pyrolysis: effect of physical and chemical pre-treatments, *Science of the Total Environment*, 537, 323-334.
- [34] Schmidt, H.P., Bucheli, T., Kammann, C., Glaser, B., Abiven, S., Leifeld, J. 2012. European Biochar Certificate - Guidelines for a Sustainable Production of Biochar, European Biochar Foundation (EBC), Arbaz, Switzerland. <http://www.europeanbiochar.org/en/download> (Erişim Tarihi: 31.03.2019).
- [35] Cui, X., Dai, X., Khan, K.Y., Li, T., Yang, X., He Z. 2016. Removal of phosphate from aqueous solution using magnesium-alginate/chitosan modified biochar microspheres derived from *Thalia dealbata*. *Bioresource technology*, 218, 1123-1132.
- [36] Abdullah, Z.W., Dong Y. 2018. Preparation and characterisation of poly (vinyl) alcohol (PVA)/starch (ST)/halloysite nanotube (HNT) nanocomposite films as renewable materials. *Journal of materials science*, 53(5), 3455-3469.
- [37] Priya, B., Gupta, V.K., Pathania, D., Singha, A.S. 2014. Synthesis, characterization and antibacterial activity of biodegradable starch/PVA composite films reinforced with cellulosic fibre. *Carbohydrate polymers*, 109, 171-179.
- [38] Chen, Y., Cao, X., Chang, P. R., Huneault, M.A. 2008. Comparative study on the films of poly(vinyl alcohol)/pea starch nanocrystals and poly(vinyl alcohol)/native pea starch, *Carbohydrate Polymers*, 738-717.
- [39] Bhattacharjee, N., Biswas A.B. 2019. Pyrolysis of orange bagasse: Comparative study and parametric influence on the product yield and their characterization. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(1), 102903.
- [40] Gomes, A.M., Da Silva, P.L., Moura C.D.L., Da Silva, C.E., Ricardo, N.M., Study of the mechanical and biodegradable properties of cassava starch/chitosan/PVA blends, *Macromolecular Symposia*, Wiley Online Library, 2011, 220-226.
- [41] Jose, J., De, S.K., AlMa'adeed, M.A.A., Dakua, J.B., Sreekumar, P.A., Sougrat, R., Al-Harathi M.A. 2015. Compatibilizing role of carbon nanotubes in poly(vinyl alcohol)/starch blend. *Starch - Stärke*, 67(1-2), 147-153.
- [42] Jose, J., Al-Harathi M.A. 2017. Citric acid crosslinking of poly (vinyl alcohol)/starch/graphene nanocomposites for superior properties. *Iranian Polymer Journal*, 26(8), 579-587.
- [43] Nizamuddin, S., Jadhav, A., Qureshi, S.S., Baloch, H.A., Siddiqui, M., Mubarak, N., Griffin, G., Madapusi, S., Tanksale, A., Ahamed, M.I. 2019.
- [44] Synthesis and characterization of polylactide/ rice husk hydrochar composite. *Scientific Reports*, 9(1), 5445.
- [45] Wang, C., Li, Y., Ding, G., Xie, X., Jiang, M. 2013. Preparation and characterization of graphene oxide/poly (vinyl alcohol) composite nanofibers via electrospinning. *Journal of Applied Polymer Science*, 127(4), 3026-3032.
- [46] Wu, Y., Tang, Q., Yang, F., Xu, L., Wang, X., Zhang, J. 2019. Mechanical and thermal properties of rice straw cellulose nanofibrils-enhanced polyvinyl alcohol films using freezing and-thawing cycle method, *Cellulose*, 26, 3193-3204.
- [47] Sedaghat, E., Rostami, A. A., Ghaemy, M., Rostami, A. 2019. Characterization, thermal degradation kinetics, and morphological properties of a graphene oxide/poly (vinyl alcohol)/starch nanocomposite, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 136, 759-769.

Burdur İlinde Yetiştirilen Fasulye Bitkilerinde *Bean Yellow Mosaic Virus* (BYMV)'ünün Araştırılması

Merve ULUM¹, Handan ÇULAL KILIÇ^{*2}, Nejla YARDIMCI³

^{1,2,3}Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Isparta, Türkiye

(Alınış / Received: 22.05.2019, Kabul / Accepted: 02.01.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Anahtar Kelimeler

Fasulye,
Bean yellow mosaic virus,
Teşhis

Özet: Bu çalışmada Türkiye'deki fasulye yetiştiriciliğinde önemli bir paya sahip olan Burdur ilinde BYMV (*Bean yellow mosaic virus*)'ün varlığı araştırılmıştır. Öncelikli olarak bu bölgedeki fasulye üretim alanlarına sürveyler yapılarak virüs semptomu sergileyen fasulye yaprak örnekleri alınmıştır. Toplanan fasulye yaprak örneklerinde BYMV'nin varlığı biyolojik ve serolojik olarak araştırılmıştır. Arazi çalışmaları sonucunda; 443 örnek toplanmış ve bütün örnekler BYMV'ne spesifik antiserumlar kullanılarak double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) yöntemiyle testlenmiştir. DAS-ELISA testi sonucunda 443 örnekten 97'sinde (% 21.89) BYMV belirlenmiştir. DAS-ELISA testi sonucunda pozitif reaksiyon veren yaprak örnekleri, test bitkilerine inokule edilmiş ve oluşan belirtiler değerlendirilmiştir. Çalışmaların sonucunda Burdur fasulye üretim alanlarından alınan yaprak örneklerinde BYMV enfeksiyonları saptanmıştır.

Determination of *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) in Common Bean Plants from Burdur Province

Keywords

Bean,
Bean yellow mosaic virus,
Detection

Abstract: In this study, the infection of *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) was investigated in Burdur province which has a significant contribution bean production of Turkey. Firstly, surveys were conducted in bean production areas and leaf samples showing virus like symptoms were collected in the region. The presence of BYMV in the collected bean leaves was analyzed by biological and serological methods. A total 443 samples were collected from field and all samples were tested for BYMV using specific antiserum in a double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA). As a result of DAS-ELISA, 97 out of 443 samples (21.89%) were infected with BYMV. DAS-ELISA positive samples were later inoculated into indicator plants and their symptoms observed. As a result of the study, BYMV infections were detected in the leaf samples in bean growing areas in Burdur province.

1. Giriş

Dünyada baklagil türleri içerisinde fasulyenin (*Phaseolus vulgaris* L.) en fazla yetiştirilen tür olduğu ve yetiştirilen baklagillerin %75'ini kapsadığı bildirilmektedir [1]. Fasulye dünya genelinde ve özellikle subtropik kuşakta üretilmektedir.

Dünya taze fasulye üretiminden aldığı % 78.41'lik pay ile Çin, ilk sırada yer almaktadır. Bunu sırasıyla Endonezya (% 3.94), Türkiye (% 2.94), Hindistan (% 2.93), Tayland (% 1.40) ve Mısır (% 1.66) takip etmektedir [2].

Türkiye ekonomisinde çok önemli bir yeri olan fasulye, yetiştirildiği bölgelerde çiftçinin önemli gelir kaynaklarından birisini oluşturmaktadır. Tüm bölgelerimizde üretimi yapılmakla beraber fasulye ekim alanları en çok İç Anadolu bölgesinde yaygın olup, bunu Karadeniz bölgesi (Samsun, Gümüşhane) ve Ege bölgesi (Kütahya, Balıkesir, Bursa) izlemektedir [3]. Bu çalışmanın yürütüldüğü Burdur ili, Akdeniz ılıman iklimi ile İç Anadolu karasal iklimi arasındaki geçiş bölgesinde yer almaktadır. İl, iklim ve toprak yapısı açısından birçok sebzenin yetiştirilebildiği bir ekolojiye sahiptir. İlin bitkisel üretiminin büyük bir kısmını hububat, baklagiller ve yem bitkileri oluşturmaktadır.

*İlgili yazar: handankilic@isparta.edu.tr

Fasulye, Burdur tarımı için son derece önemli ve ekonomik değer taşıyan en önemli ürünlerden biridir. Fasulye üretimi yaklaşık 30 yıldır bölgede yetiştirilmektedir. Son yıllarda oldukça ivme kazanan fasulye yetiştiriciliği hem açık alanlarda hem de örtü altında yapılmaktadır. Yörede hem taze hem de kuru fasulye üretimi yapılmaktadır.

Fasulye bitkisinde verim ve kalite kayıplarına neden olan en önemli nedenler arasında hastalıklar gelmektedir. Dünyada ve Türkiye'de fasulye alanlarında üretimi sınırlayan çok sayıda fungal, bakteriyel ve viral etmen bulunmaktadır. Virüslere karşı etkin bir mücadelenin olmayışı bu hastalıkların önemini günden güne daha da artırmaktadır [4].

Baklagil bitkilerini etkileyen 140 tan fazla virüsün bulunduğu ve en fazla enfekte edilen türün *P. vulgaris* L. olduğu bildirilmiştir [5]. Dünyada baklagil bitkilerini etkileyen virüs türleri arasında *Bean common mosaic virus* (BCMV), *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Clover yellow vein virus* (CYVV), *Tobacco ve Tomato ringspot virus* (TRSV ve TmRSV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Soybean mosaic virus* (SMV) ve *Watermelon mosaic virus 2* (WMV-2)'nin yaygın olarak görüldüğü bildirilmiştir [6].

Fasulye sarı mozaik virüsü (*Bean yellow mosaic potyvirus*-BYMV) dünyada baklagil yetiştiriciliği yapılan her yerde yaygındır. *Potyviridae* familyasına bağlı ve *Potyvirus* cinsine dahil olan BYMV, 750 nm uzunluğunda 12-15 nm genişliğinde esnek çubuk şeklinde partikül yapısına sahiptir. Linear tek sarmal RNA genomu içeren virüsün çok sayıda ırkı bulunmaktadır. BYMV, yaprak bitleri ile non-persistent yolla taşınmaktadır. Ayrıca mekanik olarak bitki özsuyu ile, tarımsal ekipmanlarla ve bazı baklagillerde ise düşük oranda (% 3) tohumla taşınmaktadır [7].

Fasulye üretiminde nitelikli olmanın yanı sıra dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi ve bu çeşitlerin üretim alanlarında yer alabilmesi için gerekli stratejilerin belirlenmesinde öncelikle yörelerin bitkilerinin hastalık profilinin belirlenmesine gereksinim vardır.

Burdur ili İnsuyu bölgesindeki fasulye üretim alanlarına daha önce yapılan surveylerde fasulye bitkilerinde gözlemlenen belirtiler ve yoğun yaprakbiti popülasyonu daha önce tespit edilen [8,9] diğer virüslerin yanı sıra BYMV'nin de bulunabileceği düşüncesini doğurmuştur. Bu nedenle virüs enfekteli olduğundan şüphelenilen fasulye bitkilerinden örnekler alınmış ve BYMV enfeksiyonlarının varlığı bu çalışmada araştırılmıştır.

BYMV'nin varlığının araştırılması için serolojik test yöntemi olarak ELISA kullanılmıştır. Bu amaçla

fasulye üretiminin yoğun olarak yapıldığı alanlarda surveyler yapılarak BYMV'nin tipik simptomlarını sergileyen yaprak örnekleri alınmıştır. Virüs şüpheli yaprak örneklerinde BYMV'nün varlığı, yaygın kullanılan ve rutin testlemelerde tavsiye edilen ELISA ile ortaya konulmuştur. Ayrıca indikatör bitkilerle simptomatolojik çalışmalar yürütülmüştür.

2. Materyal ve Metot

Bu çalışmada 2017-2018 yıllarında fasulye yetiştirme sezonu boyunca Burdur ilinin 9 ilçesinde (Merkez, Bucak, Yeşilova, Tefenni, Çavdır, Çeltikçi, Karamanlı, Dirmil, Kemer) ve bu ilçelere bağlı köylerdeki fasulye üretim alanlarında survey çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Surveyler sırasında mozaik, lekelenme, yaprak deformasyonu, büyüme geriliği, yaprakta kıvrılma, bükülme, kabarcıklanma, klorotik ve nekrotik lekeler şeklinde virüs benzeri simptomlar sergileyen bitkilerden 443 yaprak örneği alınmıştır. Alınan yaprak örnekleri polietilen torbalara içerisine örneğin alındığı yer, örnek alınma tarihi yazılarak etiketlenmiş ve virüs konsantrasyonunda herhangi bir kayıp yaşanmaması için buz kutularına konulmuştur.

Örnekler serolojik ve biyolojik çalışmaların gerçekleştirileceği zamana kadar Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Viroloji laboratuvarında bulunan derin dondurucuda -20 C° de muhafaza edilmiştir. DAS-ELISA testleri Clark ve Adams [10]'ın önerdiği şekilde yürütülmüştür. Serolojik çalışmalarda Loewe firmasından (Loewe, Almanya) temin edilen BYMV'ne spesifik ELISA kitleri kullanılmıştır.

Fasulye üretilen alanlardan alınan ve sergilediği belirtilere göre virüsle enfekteli olduğu tahmin edilen 443 yaprak örneğinin tamamı DAS ELISA ile testlenmiştir. Yapılan testlerde örnekleri karşılaştırmada ELISA kiti içerisinde bulunan negatif ve pozitif kontroller kullanılmıştır. Reaksiyonu takiben ilk 30 ve 60 dakikadan sonra örnekler 405 nm dalga boyundaki ELISA okuyucuda (Versamax) okunmuştur. Negatif absorbans değerinin iki katı ve daha fazlası absorbans değerine sahip olan örneklerde enfeksiyon pozitif olarak değerlendirilmiştir [11].

BYMV'nün test bitkilerindeki simptomlarını belirlemek amacıyla mekaniksel inokulasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. ELISA testlerinde BYMV pozitif olduğu belirlenen bitkilerin taze bitki dokuları mekaniksel inokulasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Yapılan inokulasyon çalışmalarında steril havan ve havan eli, fosfat tampon çözeltisi (250 ml için 0.01 M KH₂PO₄ ve 0.01 M NA₂PO₄-12H₂O, pH; 7.2) %0.1 mercaptoethanol, karborandum tozu, tülbent bezi ve çeşme suyu kullanılmıştır.

DAS-ELISA Testi şu şekilde uygulanmıştır.

1. ELISA pleytinin kuyucukları virüse spesifik antikor ile kaplanarak bir gece +4 C°de buzdolabında bekletilmiştir.
2. Kuyucuklar yıkama tamponu (PBS-Tween 20 Buffer) ile 3 kez yıkanmıştır.
3. Daha önceden ezilen ve ependorf tüplerinde bekleyen örnekler her çukura 200' er µl olacak şekilde ilave edilmiş ve +4 C°de bir gece bekletilmiştir.
4. Pleytler hızlı bir şekilde ters çevrilerek örnekler boşaltılmıştır. 3 kez yıkama tamponu ile yıkanmıştır.
5. Yıkama işleminin ardından çukurlara Konjugat Buffer (1:5 oranında seyreltilmiş ECL Buffer) içerisinde 1:100 oranında sulandırılarak hazırlanan konjugat (alkalen fosfataz) ELISA pleytinin her çukuruna 100 µl ilave edildikten sonra 37 °C de) 4-5 saat inkübasyona bırakılmıştır.
6. İnkübasyonun ardından pleytler ters çevrilerek boşaltılmıştır. Daha önce olduğu gibi 3 kez yıkanmıştır.
7. Yıkama işleminin ardından çukurlara Substrat (4-nitrophenylphosphate) eklenerek oda sıcaklığında 15-20 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
8. İnkübasyon süresinin ardından ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda değerlendirilmiştir. 405 nm dalga boyunda okunan değerlere göre sağlıklı kontrol değerinin iki katı ve daha fazlası değer veren örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir [9].

3. Bulgular

Fasulye üretim alanlarına yapılan sürveyler sırasında bitkilerde yaygın olarak yapraklarda mozayik, sararma, şekil bozukluğu, bodurlaşma gibi virüs benzeri semptomlar gözlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Klorotik beneklenme, mozayik ve şekil bozukluğu belirtileri

Ayrıca kolorimetrik değerlendirmede pozitif reaksiyon veren örneklerin bulunduğu çukurlarda sarı renk oluşumu gözlenmiştir.

DAS ELISA testi sonuçlarına göre; 443 şüpheli yaprak örneğinin 97'si (%21.89) BYMV ile enfekteli olarak belirlenmiştir.

Örnek alınan farklı lokasyonlardaki BYMV enfeksiyon oranları göz önüne alındığında, Yeşilova ilçesinin test edilen örneklerdeki % 77.77'lik bulaşıklık oranıyla ilk sırada yer aldığı görülmektedir. Bunu % 61.53'lük oranla Karamanlı, % 60'la Kemer, % 35.71'le Bucak, % 20 ile Çavdır, % 17.85'le Çeltikçi, % 16.88'le Burdur merkez ve % 13.04 ile Tefenni ilçesinden alınan örnekler izlemektedir. Dirmil ilçesinden alınan fasulye yaprak örneklerinde ise BYMV enfeksiyonu saptanmamıştır (Tablo 1).

DAS- ELISA testleri sonucunda BYMV ile bulaşık olduğu saptanan ve yüksek absorbans değerine sahip yaprak dokuları ile mekaniksel inokulasyon çalışmaları yürütülmüştür. Bu çalışmalarda bazı test bitkilerinde gelişen belirtiler Tablo 2.'de verilmiştir. Test bitkilerinde gözlenen bazı belirtiler fotoğraflanmıştır (Şekil 2).



Şekil 2. BYMV ile inokule edilen tütün ve fasulye bitkisinde gelişen mozayik belirtileri

Tablo 1. Fasulye yaprak örneklerinin alındığı yerler ve BYMV ile bulaşıklık oranları

Örnek Alınan Yer	Test Edilen Örnek Sayısı	BYMV	Bulaşıklık Oranı (%)
Burdur Merkez	308	52	16.88
Bucak	14	5	35.71
Yeşilova	18	14	77.77
Tefenni	23	3	13.04
Çavdır	20	4	20.00
Çeltikçi	28	5	17.85
Karamanlı	13	8	61.53
Dirmil	9	-	-
Kemer	10	6	60.00
Toplam	443	97	21.89

Tablo 2. Mekaniksel inokulasyon çalışmalarında gözlemlenen belirtiler

Türkçe Adı	Bilimsel Adı	BYMV
Tütün	<i>Nicotiana rustica</i>	Mo
Fasulye	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Mo,Def,KL
Acı Bakla	<i>Lupinus sp</i>	Mo,Def,
Soya fasulyesi	<i>Glycine max</i>	Mo,Def,
Kazayağı	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	-

Mo: Mozayik, Def: Deformasyon, K: Kloroz, N: Nekroz, Kab: Kabarcık oluşumu, KL: Kloroz.

4. Tartışma ve Sonuç

Tarımsal üretim için uygun iklim ve sulama koşullarına sahip olan Burdur yöresinde sebze çeşitliliği oldukça fazladır. Bu durum birçok hastalık ve zararlı etmenin görülmesini kaçınılmaz kılmaktadır.

Tüm kültür bitkilerinde olduğu gibi sebze üretim alanlarında da sorun olan ve ekonomik kayıplara yol açan etmenlerden biri de virüslerdir. Viral etmenlerle kimyasal bir mücadele yolunun bulunmayışı, vektörler vasıtasıyla uzak ve geniş alanlara yayılma potansiyelinin yüksek oluşu ve yetersiz ve etkisiz vektör mücadelesi nedeniyle virüs hastalıkları tarım ürünlerinde giderek artan bir önem kazanmaktadır.

Ülkemizde insan beslenmesinde tahıllardan sonraki en büyük paya sahip olan fasulye yetiştiriciliğinde sorun olan virüs enfeksiyonlarının bir kısmı belirlenmiştir [12, 13, 14]. Fasulye yetiştiriciliği açısından önemli bir paya sahip olan Burdur yöresinde fasulye üretimine etki eden bazı viral etmenlerin saptanmasına yönelik çalışmalar mevcuttur [8, 9]. Ancak dünyadaki fasulye üretim alanlarını tehdit eden ve ekonomik anlamda büyük kayıplara neden olan BYMV ülkemizde fazlaca ele alınmamıştır. Yaprak bitleri ile etkili bir şekilde çok geniş alanlara kolayca taşınabilen bir virüs olması BYMV'nün önemini daha da arttırmaktadır.

Bu çalışmada Burdur merkez ve Bucak, Yeşilova, Tefenni, Çavdır, Çeltikçi, Karamanlı, Dirmil ve Kemer ilçelerindeki fasulye üretimi yapılan alanlarda mozayik, sarama, şekil bozuklukları, bodurlaşma gibi virüs belirtileri gözlenmiş ve yaprak örnekleri bu tarz belirtilere sahip olan bitkilerden alınmıştır [12, 15, 16, 17]. Yaprak örneklerinde BYMV'nün tanınması biyolojik ve serolojik yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Simptomlu 443 yaprak örneği DAS-ELISA yöntemiyle testlenmiş ve örneklerin 97'sinin (% 21.89) bu virüs ile bulaşık olduğu belirlenmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda da DAS ELISA yöntemi kullanılmış ve değişen oranlarda bulaşıklık değerleri belirlenmiştir [6, 11, 18, 19].

Mekaniksel inokulasyon çalışmalarında BYMV, tütün türlerinden sadece *Nicotiana rustica*'da hafif mozayığe yol açarken fasulye, acı bakla ve soya fasulyesinde mozayığe ilaveten, yapraklarda şekil bozukluğu meydana gelmiştir. *Chenopodium amaranticolor* bitkisinde herhangi bir belirti elde edilememiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda fasulye virüslerinin bitkide genellikle karışık enfeksiyonlar halinde bulunduğu ve semptomatolojik çalışmalarda farklı belirtiler olabileceği bildirilmiştir [20].

Sharma ve ark. [11] BYMV'nün mekaniksel inokulasyonu sonucunda fasulye bitkisinde sarı mozayik, deformasyon ve daha sonra bodurluğa yol açtığını ifade etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen semptomlar daha önce yapılmış çalışmalarla paralellik arz etmektedir. Enfekteli bitkilerde ortaya çıkan belirtiler virüslerin irkına, fasulye çeşidine, ortam koşullarına ve bitkinin enfekte olduğu döneme göre değişmektedir. Kullanılan fasulye türlerinin tolerant ya da hassas olması semptoma etki etmektedir. Bazen de kullanılan bitki semptomsuz taşıyıcı olabilmektedir. Bu nedenle mekaniksel inokulasyon yönteminin tek başına kullanımı yanılığa yol açabileceğinden tanılama çalışmaları daha duyarlı bir yöntem olan DAS ELISA testleri ile desteklenmiştir.

BYMV'nin varlığı hem serolojik hem de biyolojik yöntemlerle ortaya konarak, fasulye yetiştiriciliğini sınırlayan ve etkin mücadele yöntemi bulunmayan BYMV'nin Burdur bölgesindeki üretim alanlarında varlığı saptanmıştır. Bundan sonra yürütülecek çalışmalarda, BYMV'nin karakterize edilmesi ve irklarının ortaya konularak aralarındaki farklılıkların saptanması gerekmektedir. Ayrıca, bu virüsün vektörü olan yaprak bitlerinin ve yöredeki populasyon durumlarının belirlenerek bunlara karşı kullanılacak uygulamaların da ortaya konulması gerekmektedir.

Burdur'da yetiştirilen fasulye üretim alanlarında BYMV'nün varlığının ilk kez ortaya konulduğu bu araştırma sonuçları daha sonraki çalışmalara ışık tutacaktır. Fasulye bitkilerini virüs hastalıklarından korumada etkili bir strateji olan dayanıklılık çalışmalarına ağırlık verilmelidir. Böylece kimyasal mücadelesi yapılamayan ve fasulye bitkisinde zararlı olan BYMV'nin daha etkili bir şekilde kontrol altına alınabilmesi söz konusu olabilecektir.

Kaynakça

- [1] Singh, S. P. 1999. Integrated Genetic Improvement. In: Common Bean Improvement in The Twenty-First Century. Kluwer Academic

- Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 133-165s.
- [2] FAO, 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat> (Erişim Tarihi: 14.02.2018).
- [3] Aydoğan M., Demiryürek, K., Abacı, N. İ. 2015. Türkiye'de Kuru Fasulye Üretimini Mevcut Durumu ve Gelecek Dönemler Üretimini Tahmin Edilmesi. Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 3(12), 962-968.
- [4] Agrios, G. N. 1997. Plant Diseases Caused by Viruses. Plant Pathology, 479-556s.
- [5] Loebenstein, G., Carr, J. P. 2006. Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses. Springer, the Netherlands, 367-382.
- [6] Hosseini, A., Hosseini, S. 2014. Occurrence and Distribution of Bean Common Mosaic Virus and Bean Yellow Mosaic Virus from Common Bean Fields of Kerman Province, Iran. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences, 4(2), 528-535.
- [7] Al-Ani, R. A., Adhab, M. A. 2013. *Bean Yellow mosaic virus* (BYMV) on Broadbean; Characterization and Resistance Induced by *Rhizobium Leguminarum*. Journal of Pure and Applied Microbiology, 7(1), 135-142.
- [8] Çulal-Kılıç, H., Yardımcı, N. 2012. Burdur Çine Ovası Fasulye Alanlarında Hıyar Mozaik Virüsü. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 3(2), 12-15.
- [9] Çulal-Kılıç, H., Yardımcı, N. 2014. Burdur İli Fasulye Üretim Alanlarında Fasulye Adı Mozayik Virüsü'nün Serolojik Ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi 1(2), 289-294.
- [10] Clark, M. F., Adams, A. N. 1977. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34, 475-483.
- [11] Sharma P. N., Sharma, V., Sharma, A., Rajput, K., Sharma, S. K. 2015. Identification and Molecular Characterization of Bean Yellow Mosaic Virus Infecting French Bean in Himachal Pradesh. Virus disease, 26(4), 315-8.
- [12] Kutluk Yılmaz, N. D., Gümüş, M., Erkan, S. 2002. Tokat İlinde Fasulye Tohumlarındaki Viral Etmenlerin Saptanması Üzerinde Araştırmalar. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 39(3), 49-55.
- [13] Güzel, Ö., Arlı-Sökmen, M. 2003. Determination of Some Viruses Infecting Common Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) and their Incidences in Seed Lots in Samsun Province. Journal of Turkish Phytopathology, 32(2), 99-106.
- [14] Çulal-Kılıç, H., Yardımcı, N., Açıkyürek, S., Uzal, A. 2015. Detection of BCMV, AMV and CMV By DAS-ELISA and Immunocapture-RT-PCR in Bean-Growing Areas in The West Mediterranean Region, Turkey. Fresenius Environmental Bulletin, 24(5), 1752-1756.
- [15] Melgarejo T. A., Lehtonen, M. T. , Fribourg, C., E. , Rannali, M., Valkonen, J. P. T. 2007. Strains of BCMV and BCMNV Characterized from Lima Bean Plants Affected by Deforming Mosaic Disease in Peru. Archives of Virology, 152, 1941-1949.
- [16] Abtahi, F. S., Habibi, M. K., Motlagh, M. K. 2009. Some Biological and Molecular Characterization of Bean Common Mosaic Necrosis Virus Isolated from Soybean in Tahran Province, Iran. World Academy of Science, Engineering and Technology, 49, 126-129.
- [17] Pudashini, B. J., Shahid, M. S., Natsuaki, K. T. 2013. First Report of Bean Common Mosaic Necrosis Virus (BCMNV) Infecting Sweet Bean in Nepal. Plant Disease, 97(2), 290-290.
- [18] Duraisamy, G. S., Pokorný, R., Holková, L. 2011. Possibility of Bean Yellow Mosaic Virus Detection in Gladiolus Plants by Different Methods. Journal of Plant Diseases and Protection, 118(1), 2-6.
- [19] Campos, R. E., Bejerman, N., Nome, C., Laguna, I. G. Rodriguez, P. P. 2013. Bean Yellow Mosaic Virus in Soybean from Argentina. Journal of Phytopathology, 162, 322-325.
- [20] Ghorbani S. G. M., Shahraena, N., Elahinia S. A. 2010. Distribution and impact of virus associated diseases of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Northern Iran. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 43(12), 1183-1189.

Kırmızı Soğandan Karbon Kuantum Noktaların Sentezi ve Fotolüminesans Özelliklerinin İncelenmesi

Abdullah BİÇER*¹ , Kübra BİLMİŞOĞLU BİÇER² 

¹Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 07058, Antalya, Türkiye

²Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 25240, Erzurum, Türkiye

(Alınış / Received: 26.05.2019, Kabul / Accepted: 21.01.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Anahtar Kelimeler

Karbon kuantum noktalar,
Fotolüminesans,
Absorpsiyon,
Floresans

Özet: Bu çalışmada doğal materyal olan kırmızı soğandan karbon kuantum noktaları sentezlendi. Karbon kuantum noktaların yapısı XRD ve FTIR spektrumları ile belirlendi. Boyut ve yüzey yükü analizleri yapıldı. Karakterizasyonu yapılan karbon kuantum noktaların fotofiziksel özellikleri araştırıldı. Daha sonra fotofiziksel özellikleri üzerine konsantrasyon, pH ve sıcaklığın etkisi incelendi. Konsantrasyon çalışmaları ile uygun çözeltinin 250 µl/4950 µl saf su karışımı olduğu belirlendi. Bu konsantrasyonda yapılan pH çalışması ile karbon kuantum noktanın pH değeri ve sıcaklık arttıkça floresans özelliğinin azaldığı ve uzun zaman aralığında (3 ay) kararlılığını koruduğu gözlemlendi.

Synthesis of Carbon Quantum Dots from Red Onions and Analysis of Photoluminescence Properties

Keywords

Karbon quantum dots,
Photoluminescence,
Absorption,
Fluorescence

Abstract: In this study, carbon quantum dots were synthesized from a natural material which is red onion. Structure of carbon quantum dots was determined by XRD and FTIR spectra. Analysis of size and surface load was performed. The photophysical properties of characterized carbon quantum dots were investigated. Then, the effect of concentration, pH and temperature on the photophysical properties of the carbon quantum dots sample was investigated. Concentration studies indicated that the appropriate solution was a mixture of 250 µl / 4950 µl pure water. With the pH study performed at this concentration, it was observed that fluorescence feature decrease as pH value and temperature increases of the carbon quantum dots and it maintained its stability over a long period of time (3 months).

1. Giriş

Karbon nano noktalar, floresans nanopartiküllerin en yeni sınıfını oluşturmakta olup kuantum nokta ailesinin yeni üyesi olarak görülmektedir [1]. Karbon nanonoktalar ilk defa preparatif elektroforez ile tek duvarlı karbon nanotüplerin saflaştırılmasıyla [2] ve daha sonra grafitin lazer ablasyonu ile elde edilmiştir [3]. Karbon kuantum noktalar yüzeyinde çok fazla fonksiyonel gruplar bulunan, karbonizasyon derecesi değiştirilebilen karbon materyalidir. Karbon noktalar optik ve kimyasal özelliklerinden dolayı çok büyük ilgi görmekte ve elektrokataliz, biyo-görüntüleme, kimyasal-sensör, biyo-sensör, nanomedikal, biyomolekül/ilaç salınımı, ışık saçan diyetler, fotokatalizör olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir [4-7]. Ayrıca lazerler, optoelektronik araç uygulamaları gibi alanlarda da umut verici uygulamaları bulunmaktadır [8,9].

Karbon kuantum noktaların sentezinde farklı çıkış bileşikleri ve yöntemlerle yapılabilmektedir. Son zamanlarda karbon nokta yapılarının sentezinde doğal materyallerin kullanımı yaygındır. Doğal karbon kaynağı olarak pek çok bitki, meyve ve farklı organik materyaller kullanılabilir. Bu organik materyallerden elde edilen kuantum verimleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Karbon kuantum noktalar, geleneksel yarı iletken kuantum noktaların yerine aday gösterilmekte ve düşük toksisite, kimyasal inertlik, suda çözünebilme, biyoyoumluluk, kolay fonksiyonelleştirme ve çeşitli fotolüminesans özelliklerinden dolayı gelecekte nano-araç uygulamalarında kullanım alanına sahip olacağı düşünülmektedir [10,11].

Tablo 1. Doğal materyallerden elde edilen karbon noktaların kuantum verim karşılaştırması

Karbon Kaynağı	Kuantum verimi	Referans
İnek Gübresi	65	[19]
Jinhua Bergamot	50,78	[19]
İpek Kozası	38	[19]
Atık Portakal Kabuğu	36	[27]
Jelâtin	31,6	[21]
Elma Suyu	26	[19]
Portakal Suyu	26	[17]
Bal	19,8	[19]
Karides Yumurtası	18,5	[19]
Sarımsak	17,5	[19]
Lahana	16,5	[19]
Yumurta Kabuğu	14	[19]
İpek Böceğinden Elde Edilen İpek	13,9	[13]
Konjak Unu	13	[19]
Soya Fasülyesi	13	[19]
Arı Polenleri	12,8	[19]
Süt	12	[23]
Saç	11,1	[28]
Aloe Yaprağı	10,37	[14]
Liçi (Lychee) Tohumu	10,6	[19]
Fıstık Kabuğu	9,91	[20]
Yumurta	8	[28]
Kış Kavunu	7,51	[12]
Karpuz Kabuğu	7,1	[19]
Pomela Kabuğu	6,9	[5]
Çilek Suyu	6,3	[7]
Çimen	6,2	[29]
Patates	6,14	[19]
Söğüt Ağacı Kabuğu	6	[26]
Şeker Kamışı Suyu	5,76	[28]
Nescafe Kahvesi	5,5	[19]
Un	5,4	[26]
Ekmek	4,5	[19]
Muz Suyu	4,27	[19]
Mango	3,92	[19]
Kahve Telvesi	3,8	[19]
Tütün	3,2	[19]
Üzüm Yaprağı	3,1	[19]
Tatlı Patetes	2,8	[19]
Soya Sütü	2,6	[24]
Arap Sakızı (Gam arabic)	0,9	[18]
Mum Kurumu	0,51	[25]
Kandil İsi	0,019	[15]

2. Materyal ve Metot

Deneysel çalışmalarda kullanılan kırmızı kuru soğan yerel marketten temin edilmiştir. Sentezlenen karbon kuantum noktaların yapısal özellikleri PANalytical Empyrean X-Ray Difraktometresi ile, yüzeyindeki fonksiyonel gruplar Mattson 1000 FTIR Spektrometresi ile, partikül boyutu ve yüzey yükü Zetasizer Nano Series cihazı ile belirlendi.

Absorpsiyon ölçüleri Perkin Elmer Lambda 35 UV/VIS Spektrometre ile, floresans yaşam ömrü PTI TM3 Time Master Spektrofluorimetre ile ve floresans

kuantum verimi Shimadzu RF-5301 PC Spektrofluorimetresi ile elde edildi.

2.1. Karbon kuantum noktaların sentezi

Sentez için yerel pazardan temin edilen kırmızı renkli soğanlar kabuklarıyla birlikte rondodan geçirildi. 50 gram kırmızı soğan sıvı azot ile birlikte dövüldü ve 50 ml su ilavesi ile 8 saat 133 °C otoklavda bekletildi, sonrasında otoklavdan alınan madde süzülerek, 0.22 µm inceliğindeki membrandan geçirilerek stok çözeltileri hazırlandı[29,30].

Hazırlanan karbon kuantum noktaların, floresans kuantum verimleri (Φ_f) Parker-Rees metoduyla belirlendi. Bu metodun en önemli özelliği, fotofiziksel özelliği iyi belirlenmiş bir floresans bileşiğe göre kuantum verimlerinin belirlenmesidir. Parker-Rees denklemi (1) de gösterilmiştir.

$$\Phi_s = \Phi_r \left(\frac{D_s}{D_r} \right) \left(\frac{n_s^2}{n_r^2} \right) \left[\frac{1 - 10^{-OD_r}}{1 - 10^{-OD_s}} \right] \quad (1)$$

Burada Φ_s ve Φ_r sırasıyla, numune ve referansın floresans kuantum verimi; D_s ve D_r , sırasıyla numune ve referansın düzeltilmiş floresans spektrumu altındaki alanları; n_s ve n_r sırasıyla numune ve referansın çözücüsünün kırılma indisi; OD_s ve OD_r , sırasıyla numune ve referansın uyarılma dalga boyunda ölçülen optik yoğunluğudur [31].

Karbon kuantum nokta numunelerinin floresans yaşam ömrü, stroboskopik dedektörle çalışan Time Master Laser sistemi ile belirlenmiştir. Floresans yaşam ömrü, bir bileşiğin veya ilgilenilen türün uyarılmış elektronik hallerde harcadığı zaman şeklinde tanımlanır. Floresans yaşam ömrü denklem (2) de gösterilmiştir.

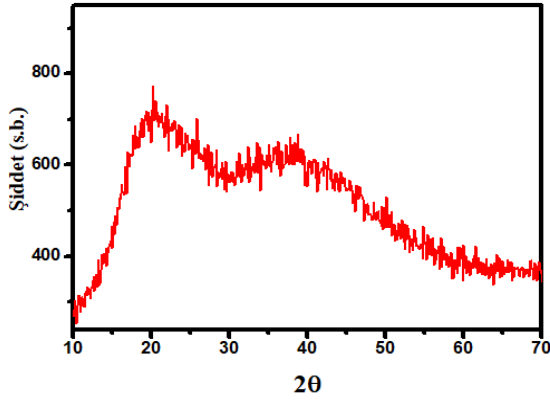
$$\tau_f = \frac{1}{k_{IC} + k_{ISC} + k_r} \quad (2)$$

Burada; τ_f floresans yaşam ömrü, k_{IC} iç dönüşüm olayının hız sabiti, k_{ISC} sistemler arası geçiş olayının hız sabiti ve k_r radyasyonlu geçişler için hız sabitidir. Karbon kuantum noktaların partikül boyutu için hacme dayalı hesaplanan sonuçlar kullanılarak partikülün şekli küre kabul edilip tane boyutu hidrodinamik çap olarak verilmiştir. Ölçümler Zetasizer cihazında 25°C sıcaklıkta, üç kez tekrarlanmıştır. Sonuçlar ölçümlerin ortalaması şeklinde verilmiştir [32].

3. Bulgular

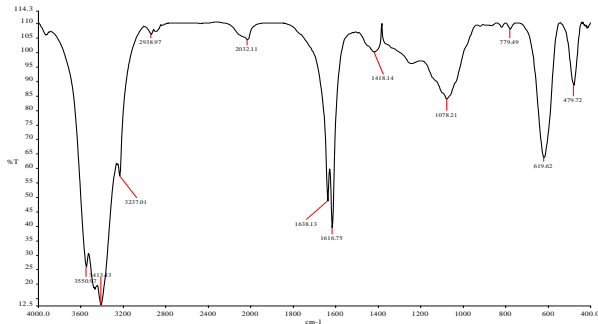
Kırmızı renkli soğandan elde edilen numunelerde, karbon kuantum noktaların varlığını kanıtlamak amacıyla XRD spektrumu alındı (Şekil 1). XRD spektrumunda oldukça sıradan biçimde amorf karbon dizilimiyle ilgili olarak ~20° ve ~38° de iki

geniş pik bulunmaktadır. Merkezi geniş bir pikin görülmesi karbon kuantum nokta yapısının varlığını göstermektedir. Karbon kuantum noktalarının zayıf kristal yapısı, daha fazla oksijen içeren fonksiyonel grupların varlığını göstermektedir.



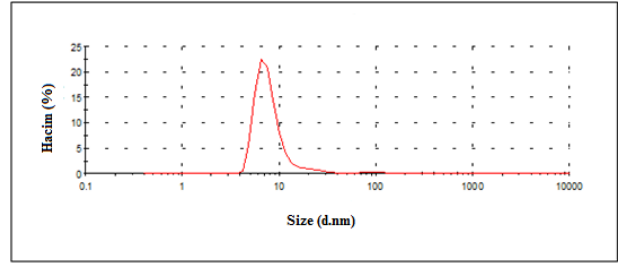
Şekil 1. Karbon kuantum nokta yapısının XRD spektrumu

Karbon kuantum nokta yüzeyindeki fonksiyonel grupları belirlenmek için FTIR analizi yapıldı. Bu amaçla hazırlanan karbon kuantum nokta numunesi etüvde 4 gün bekletilerek tamamen kurutuldu ve KBr ile peleti hazırlanarak ölçümü alındı (Şekil 2). FTIR spektrumunda 3237-3550 cm^{-1} arasında O-H ve N-H, 3237 cm^{-1} 'de aromatik C-H, 1638 cm^{-1} 'de C-O-N, 1616 cm^{-1} 'de C=C, 1078 cm^{-1} 'de C-O-C ve 619 cm^{-1} 'de ise C-X gerilme titreşimleri gözlenmiştir. Bu gerilme titreşimlerinden, karbon kuantum noktalarının yüzeyinde -OH, -NH ve C-X gruplarının olduğu görülmekte olup su içerisinde çözünürlüğünün de yüksek olması ile biyomolekülleri bağlanması için bağlayıcı (linker) olarak kullanılabilmesi belirlenmiştir.

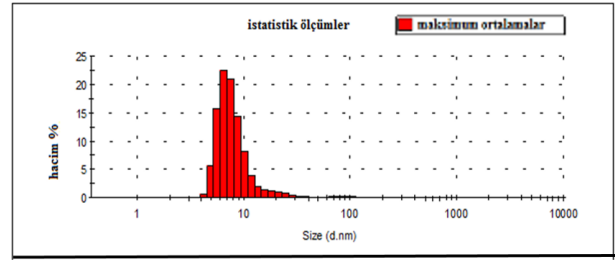


Şekil 2. Karbon kuantum nokta yapısının FTIR spektrumu

250 μl karbon nokta/4950 μl saf su olacak şekilde hazırlanan ve pH değeri 4,85 olarak ölçülen karbon kuantum nokta numunelerinin ortalama partikül boyut ölçümleri oda sıcaklığında üç kez tekrarlanmıştır. Sonuçlar ölçümlerin ortalaması şeklinde Şekil 3 ve Şekil 4'te verilmiştir. Parafilm referans alınarak (karbon içeriği en fazla olan referans olduğu için seçilmiştir) yapılan ölçümde partikül boyutu 8,21 nm olarak belirlenmiştir. Partikül boyutu genellikle 10 nm altında olduğundan bulunan bu değer literatürle oldukça uyumludur [4].



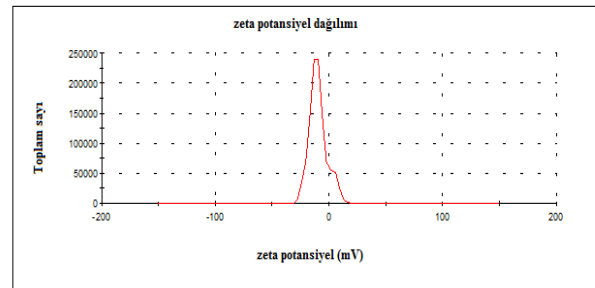
Şekil 3. Karbon kuantum nokta yapılarının partikül boyut grafiği



Şekil 4. Karbon kuantum nokta yapılarının partikül ölçümü istatistikleri

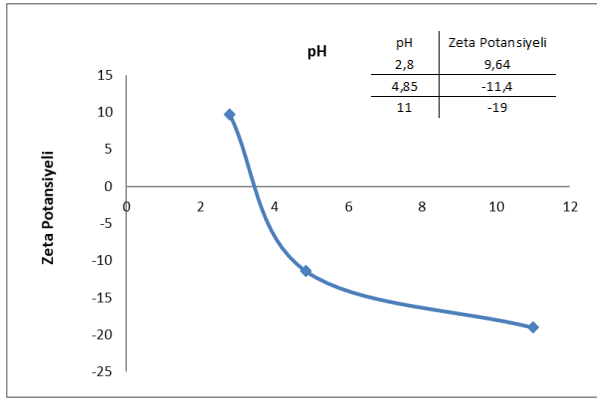
Zeta potansiyeli, molekülün etrafındaki elektriksel çift tabaka sonucu oluşan yüklerden meydana gelmektedir. Elektriksel çift tabaka taneciklerin birbirini itmesine sebep olur ve böylece taneciklerin bir araya gelerek çökmesini önler. Böylece zeta potansiyelinin yüksek olması sistemin kararlılığına önemli katkı sağlamaktadır [32].

Sentezlenen karbon noktalarının yüzey yüklerinin belirlenmesi zeta potansiyelinin hesaplanması ile gerçekleştirilmiştir. Zeta potansiyel değeri kararlı emülsiyon ve süspansiyon ölçümü için önem taşımaktadır. Zeta potansiyelinin +25 mV'un üstünde veya -25 mV'un altında bulunduğu değerler emülsiyon ve süspansiyonların kararlı olduğu bölgeyi göstermektedir. Eğer bu değerler arasında değil ise kararsızdır ve böylelikle koloidal sistemler topaklaşarak çökme eğilimindedir [33]. Karbon nokta yapının zeta potansiyel değerleri Şekil 5'de verilmiştir. Karbon nokta yapının yüzey yükü Parafilm referans alınarak yapılan ölçümde -9,66 mV olarak bulunmuştur. Bu değer, +25 mV(-25 mV) aralığında olup sentezlenen karbon nokta yapılarının kararlı olduğunu göstermektedir. Karbon nokta yapılarının yüzeyindeki NH_2 ve OH gruplarından dolayı negatif yük oluşmaktadır [5].



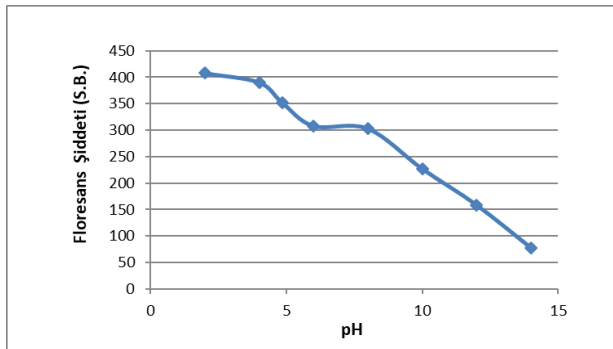
Şekil 5. Karbon kuantum nokta yapılarının zeta potansiyeli dağılım grafiği

Karbon kuantum nokta yapısının (250 µl karbon kuantum nokta/4950 µl saf su) zeta potansiyeline pH'nın etkisi incelenmiştir (Şekil 6). pH 2,80-11,00 aralığında değiştirildiğinde zeta potansiyel yükünün 9,64 mV'tan -19 mV'a indiği gözlenmiştir. Karbon kuantum nokta numunesinin izoelektronik pH değerinin 3,76 olduğu görülmektedir. pH=3,76'dan daha düşük değerlerde karbon kuantum nokta yüzeyinin pozitif, pH=3,76'dan daha büyük değerlerde ise yüzeyinin negatif yüklü olduğu tespit edilmiştir. Bu durum zeta potansiyeli değişimi ile karbon kuantum nokta yapısında protonlama ve deprotonlama mekanizmasının var olduğunu göstermektedir [13].



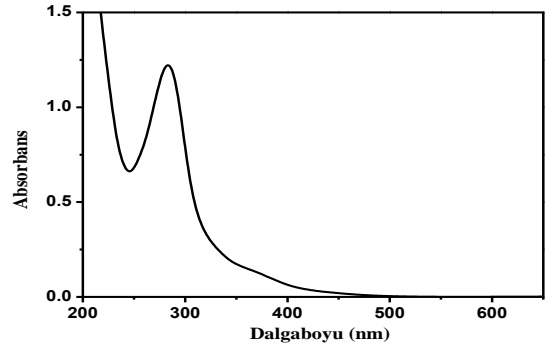
Şekil 6. Zeta potansiyeli ile pH arasındaki ilişki

Karbon kuantum nokta yapısının (250 µl karbon kuantum nokta/4950 µl saf su) pH (2.0-14.0) değerlerine karşı floresans şiddeti değişimi incelendiğinde pH 'ya bağlı olarak floresans şiddetinin azaldığı görülmektedir (Şekil 7). Bu durum karbon kuantum nokta yapısının yüzeyindeki fonksiyonel grupların deprotonlanmasından kaynaklanmaktadır [13].



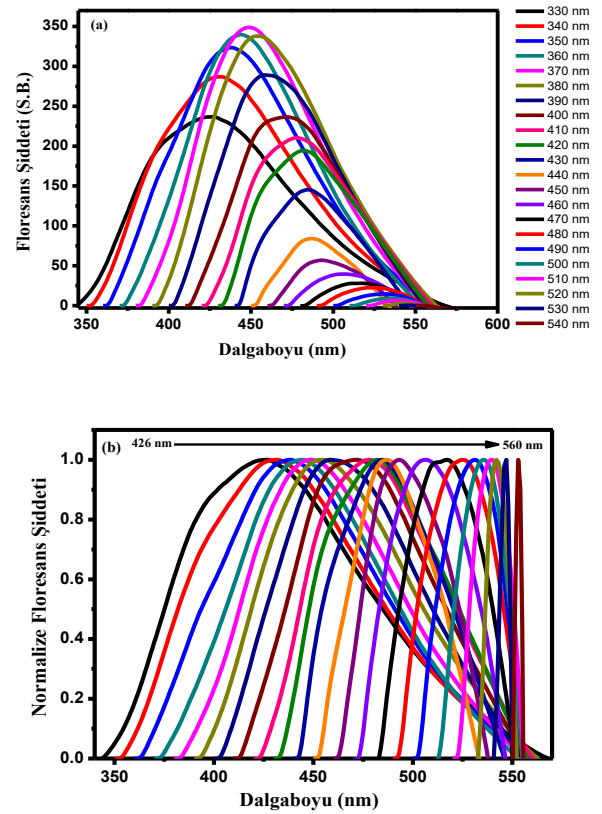
Şekil 7. Karbon kuantum noktanın floresans şiddetiyle pH ilişkisi

XRD ve FTIR ölçümleri ile yapısı aydınlatılan ve zeta potansiyeli ile boyutları ve yüzey yükü belirlenen karbon kuantum nokta numunesinin optiksel karakterizasyonu için oda sıcaklığında absorpsiyon spektrumları alınmıştır (Şekil 8). 280 nm'de π - π geçişlerinden kaynaklanan karakteristik karbon kuantum nokta piki gözlenmiştir. Bu durum elde edilen numunelerde karbon kuantum noktanın varlığını desteklemektedir [34].



Şekil 8. Sentezlenen karbon kuantum nokta yapısının saf su içerisindeki absorpsiyon spektrumu

Absorpsiyon spektrumu belirlenen karbon kuantum nokta örneği için oda sıcaklığında farklı uyarma dalgaboylarında floresans ölçümleri alınmıştır (Şekil 9).

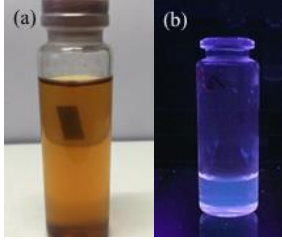


Şekil 9. Karbon kuantum nokta yapısının saf suda farklı dalga boylarındaki floresans spektrumları (a) ham ve (b) normalize.

Karbon kuantum noktaların su içerisinde farklı dalga boylarındaki floresans spektrumunu Şekil 9'da gösterilmiştir. Uyarma dalgaboyunun 330 nm'den 540 nm'ye (10'ar nm) kademeli olarak artırılmasıyla, floresans bant maksimumlarında 426 nm'den 560 nm'ye kırmızıya kaymalar gözlenmiştir (Şekil 9b). Uyarma dalgaboyları 340 nm'den 370 nm'ye artırıldığında floresans şiddetinde sürekli olarak bir artış, 380 nm ve sonrasında ise floresans şiddetinde bir azalma olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, elde edilen

karbon kuantum nokta için en şiddetli floresans pikinin 370 nm'de olduğu görülmektedir. Uyarma dalgaboyu değiştirilerek floresans özelliğinin ayarlanabilir olması, partiküllerin yüzeydeki kusurları ve farklı boyutlardaki partiküllerin optik seçiminden kaynaklanabildiği bilinmektedir [35].

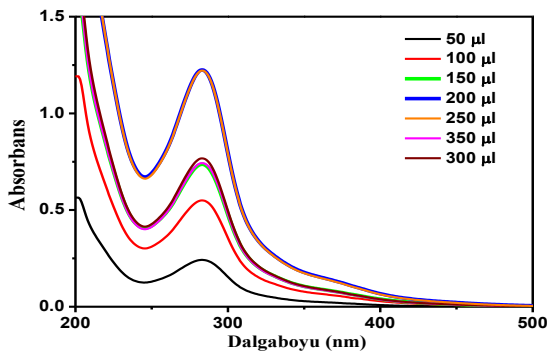
Elde edilen karbon kuantum noktaların sulu çözeltilerinin gün ışığı altında ve UV ışık altındaki görüntüleri Şekil 10'da verilmiştir. Karbon kuantum noktaların gün ışığında solgun sarı renkte ve UV ışığı altında parlak mavi floresans yaydığı, ayrıca karbon kuantum noktaların gün ışığında saydam olduğu görülmektedir.



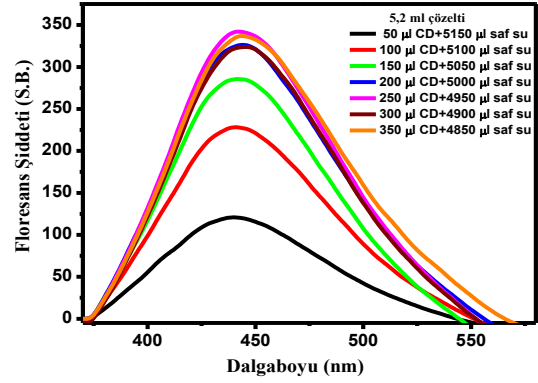
Şekil 10. Karbon kuantum nokta yapısının saf sudaki (a) gün ışığı (b) UV ışık altındaki görüntüsü.

Absorpsiyon ve floresans ölçümleri alınan kuantum nokta numunesi için fotofiziksel parametreler de hesaplandı. 350 nm uyarma dalgaboyunda alınan floresans spektrumuna ait alan kullanılarak (1) eşitliği yardımıyla kuantum nokta numunesinin floresans kuantum verimi (Φ) 23 ve floresans yaşam ömrü (τ) 2,582 ns olarak belirlenmiştir. Hesaplanan kuantum verimi, Tablo 1'de belirtilen farklı kaynaklardan elde edilen karbon kuantum nokta yapılarının kuantum verimleriyle kıyaslandığında kuantum veriminin oldukça iyi olduğu görülmektedir.

Absorpsiyon ve floresans spektrumları ile optik özellikleri belirlenen karbon kuantum nokta numunesi için spektral özellikler üzerine konsantrasyonun etkisi incelenmiştir. Bu amaçla hazırlanan stok çözeltilerden 50-300 μ l arasında değişen miktarlarda alınarak elde edilen yeni konsantrasyonlardaki çözeltilerin oda sıcaklığında absorpsiyon ve floresans ölçümleri alınmıştır (Şekil 11 ve Şekil 12).



Şekil 11. Farklı konsantrasyonlardaki karbon kuantum nokta yapısının saf sudaki absorpsiyon spektrumları.

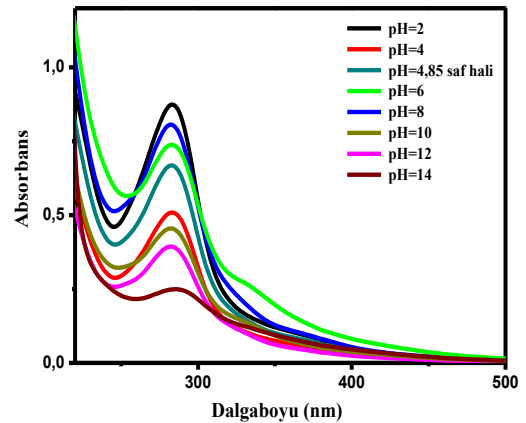


Şekil 12. Farklı konsantrasyonlardaki karbon kuantum nokta yapısının saf sudaki floresans spektrumları ($\lambda_{exc} = 360$ nm).

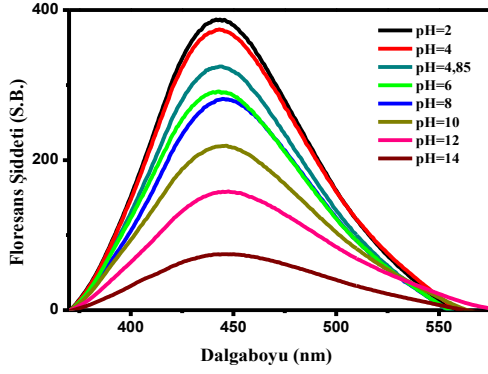
Şekil 12'de görüldüğü gibi tüm karbon nokta çözeltileri yaklaşık 440 nm emisyon dalga boyu civarında floresans göstermektedir. Ayrıca, karbon nokta miktarı arttıkça genel olarak floresans şiddetinin de arttığı gözlenmiştir.

Konsantrasyon çalışması sonucunda en iyi floresans özellik gösteren çözeltinin 250 μ l karbon kuantum nokta/4950 μ l saf su karışımı olduğu belirlendikten sonra sistem üzerine pH'nın etkisi tartışılmıştır.

Asidik pH değerleri 0,1 M HCl çözeltisi ve bazik pH değerleri ise 0,1 M NaOH çözeltisi ile ayarlanmıştır. Bu ayarlamalar yapılmadan önce çözeltinin pH sı 4,85 olarak ölçülmüştür. Farklı pH aralıklarında (pH=2-14) çözelti için absorpsiyon ve floresans ölçümleri alınmıştır (Şekil 13 ve Şekil 14). Bu spektrumlarda görüldüğü gibi kırmızı soğandan elde edilen karbon nokta yapısıyla hazırlanan çözeltilerin asidik pH değerlerinde (pH=2-6) hem absorpsiyon hem de floresans şiddeti yüksekken bazik pH'lara doğru gidildikçe şiddetlerde azalmalar gözlenmiştir.



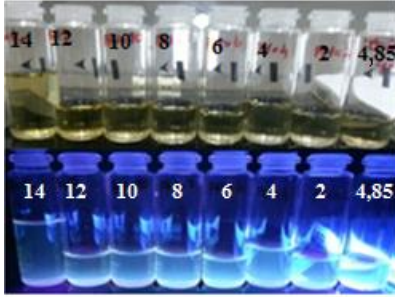
Şekil 13. 250 μ l karbon kuantum nokta/4950 μ l saf su çözeltisinin farklı pH değerlerindeki absorpsiyon spektrumları.



Şekil 14. 250 µl karbon kuantum nokta/4950 µl saf su çözeltisinin farklı pH değerlerindeki floresans spektrumları ($\lambda_{exc}=360$ nm).

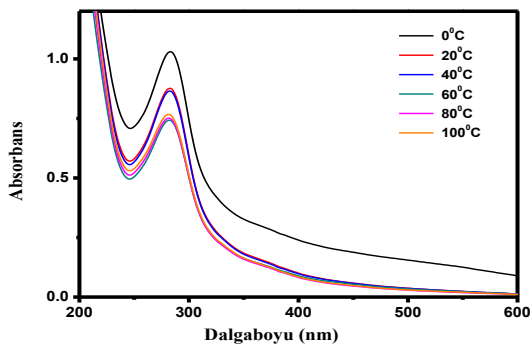
Karbon nokta numunesinin fizyolojik pH'ya yakın değerlerde (pH=6) iyi bir foto stabiliteye sahip olması ve yüksek floresans emisyon göstermesi biyo-görüntüleme uygulamalarında kullanılabilirliğini göstermektedir [35].

Farklı pH aralıklarında (pH=2-14) hazırlanan çözeltilerin gün ışığı ve UV ışık altındaki görüntüleri Şekil 15'de verilmiştir.

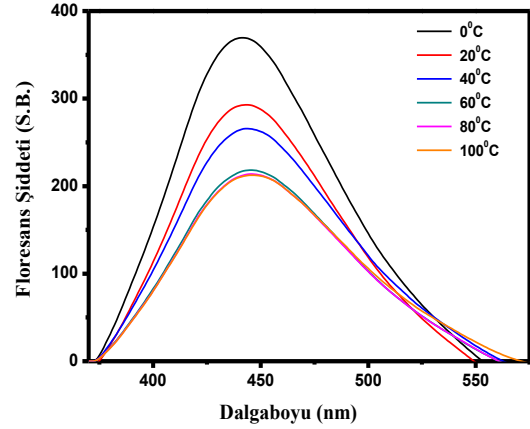


Şekil 15. 250 µl karbon kuantum nokta/4950 µl saf su çözeltisinin farklı pH değerlerinde günışığı (üstte) ve UV ışık (altta) altındaki görünümüleri

En iyi floresans özellik gösteren 250 µl karbon kuantum nokta/4950 µl saf su karışımı üzerine sıcaklığın etkisi de incelenmiştir. Bu amaçla farklı sıcaklık aralıklarında (0-100°C) çözelti için absorpsiyon ve floresans ölçümleri alınmıştır (Şekil 16 ve Şekil 17).



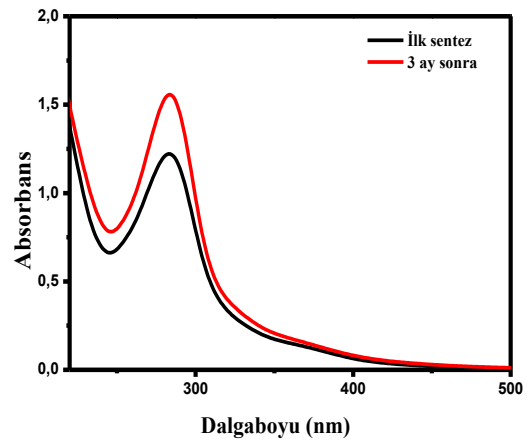
Şekil 16. 250 µl karbon kuantum nokta/4950 µl saf su çözeltisinin farklı sıcaklıklardaki absorpsiyon spektrumları



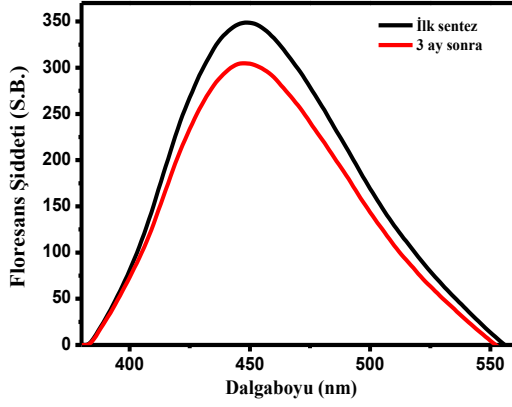
Şekil 17. 250 µl karbon kuantum nokta/4950 µl saf su çözeltisinin farklı sıcaklıklardaki floresans spektrumları ($\lambda_{exc}=360$ nm)

Şekil 16'da görüldüğü gibi karbon kuantum nokta çözeltisinin absorpsiyon spektrumu sıcaklık değişiminden oldukça az oranda etkilenmiştir. Bu durum karbon kuantum noktanın geniş bir sıcaklık aralığında dayanıklılığını göstermektedir. Tam tersi, karbon kuantum nokta çözeltisinin floresans şiddeti sıcaklığın artmasıyla azalmaktadır (Şekil 17). Bu durumun, sıcaklığın artmasıyla ışısız geçişlerin artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir [34].

Elde edilen karbon kuantum noktanın kararlılığını belirlemek amacıyla 18°C sıcaklıkta üç ay bekletilen numune için absorpsiyon ve floresans ölçümleri alındı (Şekil 18 ve Şekil 19). Absorpsiyon ve floresans spektrumlarında, kırmızı soğandan elde edilen karbon kuantum nokta numuneleri 3 ay gibi uzun bir süre bekletilmesine rağmen çok büyük bir değişim olmadığı görülmüştür. Bu durum ile elde edilen kuantum noktaların oldukça kararlı olduğu ve bu özellikleri ile uzun sürede gerçekleştirilmesi gereken çalışmalara büyük fayda sağlayacağı belirlenmiştir.



Şekil 18. Karbon kuantum nokta yapısının ilk ve 3 ay sonraki absorpsiyon spektrumu.



Şekil 19. Karbon kuantum nokta yapısının ilk ve 3 ay sonraki floresans spektrumu ($\lambda_{exc}=370$ nm).

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, doğal bir bitki olan kırmızı soğandan oldukça ekonomik ve pratik bir yolla karbon kuantum nokta numuneleri elde edilmiştir. Elde edilen bu numunelerin kuantum nokta yapısını kanıtlamak için XRD ve FTIR spektrumları alınmış ve bu spektrumlardan numunelerin karbon kuantum noktalar olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca, bu numunelerin yüzey yükleri ve ortalama parçacık boyutları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarla, karbon kuantum nokta numunelerinin ortalama parçacık boyutlarının 8,21 nm ve yüzey yüklerinin ise -9,66 mV olduğu bulunmuştur.

Yapısı kanıtlanan bu numunelerin fotofiziksel özellikleri UV-görünür bölge absorpsiyon, durgun-hal ve zamana bağlı floresans spektroskopisi teknikleri kullanılarak belirlenmiştir. Absorpsiyon spektrumunda literatürde belirtilen dalga boyunda (280 nm) pik gözlenmiştir. Farklı dalga boylarında uyarma yapılarak floresans ölçümleri alınmış ve numunenin floresans bant maksimumunun ve şiddetinin uyarma dalga boyuna bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir. Karbon kuantum nokta numunesi için floresans kuantum verimi ve yaşam ömrü gibi fotofiziksel parametreler de hesaplanmıştır. Daha sonra kuantum nokta numunelerinin absorpsiyon ve floresans spektrumlarına konsantrasyonun etkisi incelenmiştir. En iyi çözelti konsantrasyonunun 250 μ l karbon nokta/4950 μ l saf su karışımı olduğu bulunmuştur.

Bu konsantrasyon kullanılarak numunenin fotofiziksel özellikleri üzerine pH ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir. pH=2-14 aralığında ölçümler alınmış ve pH değeri arttıkça kuantum nokta çözeltisinin hem absorpsiyon hem de floresans şiddetinin düştüğü belirlenmiştir. Fizyolojik pH'ya yakın değerlerde yüksek floresans özellik göstermesi, elde edilen bu kuantum noktanın biyo-görüntüleme alanında kullanılabileceğinin göstergesi olmuştur. Ayrıca ortam sıcaklığı arttıkça absorpsiyon spektrumunda

çok az değişimlerin olması bu numunenin oldukça geniş sıcaklık aralıklarında kullanılabilirliğini göstermiştir. Elde edilen kuantum noktaların kararlılığını belirlemek amacıyla örnekler 3 ay süreyle soğuk ortamda bekletilmiş ve sürenin sonunda absorpsiyon ve floresans ölçümleri alınmıştır. Ölçüm sonuçları, ilk elde edildiği zaman alınan sonuçlarla kıyaslandığında değişimin çok az olması bu numunelerin oldukça uzun süre kararlılığını koruduğunu kanıtlamıştır. Tüm sonuçlar, kırmızı soğandan elde edilen bu yeni karbon kuantum nokta örneklerinin biyokimyasal, optoelektronik, nanoteknoloji gibi birçok çalışma alanına önemli katkılar sağlayacağı düşüncesi oluşturmıştır.

Kaynakça

- [1] Gonçaves, H. M. R. 2013. Analytical Applications of Fluorescent Carbon Dots. Doktora Tezi, Faculdade De Ciencias Da Universidade Do Porto, Maio.
- [2] Xu, X., Ray, R., Gu, Y., Ploehn, H. J., Gearheart, L., Raker, K., Scrivens, W. A. 2004. Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments, *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (40), 12736-12737.
- [3] Sun, Y. P., Zhou, B., Lin, Y., Wang, W., Fernando, K. A., Pathak, P., Meziani, M. J., Harruff, B. A., Wang, X., Wang, H., Luo, P. G., Yang, H., Kose, M. E., Chen, B., Veca, L. M., Xie, S. Y. 2006. Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence, *J. Am. Chem. Soc.*, 128 (24), 7756-7757.
- [4] Wang, Y., Hu, A. 2014. Carbon quantum dots: synthesis, properties and applications, *J. Mater. Chem. C* 2 (34), 6921-6139.
- [5] Lu, W., Qin, X., Liu, S., Chang, G., Zhang, Y., Luo, Y., Asiri, A. M., Al-Youbi, A. O., Sun, X. 2012. Economical, Green Synthesis of Fluorescent Carbon Nanoparticles and Their Use as Probes for Sensitive and Selective Detection of Mercury(II) Ions, *Anal. Chem.*, 84 (12), 5351-5357.
- [6] Wang, L., Zhu, S. J., Wang, H. Y., Qu, S. N., Zhang, Y. L., Zhang, J. H., Chen, Q. D., Xu, H. L., Han, W., Yang, B. Sun, H. B., 2014. Common Origin of Green Luminescence in Carbon Nanodots and Graphene Quantum Dots, *ACS Nano*, 8 (3), 2541-2547.
- [7] Huang, H., Lv, J. J., Zhou, D. L., Bao, N., Xu, Y., Wang, A. J., Feng, J. J., 2013. One-pot green synthesis of nitrogen-doped carbon nanoparticles as fluorescent probes for mercury ions, *RSC Adv.*, 3 (44), 21691-21696.
- [8] Luo, P., Li, C., Shi, G. 2012. Synthesis of gold@carbon dots composite nanoparticles for surface enhanced Raman scattering, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 14 (20), 7360-7366.

- [9] Qu, S. N., Wang, X. Y., Lu, Q. P., Liu, X. Y., Wang, L. J. 2012. A Biocompatible Fluorescent Ink Based on Water-Soluble Luminescent Carbon Nanodots, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 51 (49), 12215-12218.
- [10] Wang, F., Chen, Y. H., Liu, C. Y., Ma, D. G. 2011. White Light- Emitting Devices Based on Carbon Dots' Electroluminescence, *Chem. Commun.*, 47 (12), 3502-3504.
- [11] Gu, N., Li, Y., Wang, M., Cao, M. 2013. Nano-opto-electronics for biomedicine. *ChinSci Bull.*, 58 (21), 2521-2529.
- [12] Feng, X., Jiang, Y., Zhao, J., Miao, M., Cao, S., Fang, J., Shi, L. 2015. Easy synthesis of photoluminescent N-doped carbon dots from winter melon for bio-imaging, *RSC Adv.*, 5 (40), 31250-31254.
- [13] Wu, Z. L., Zhang, P., Gao, M. X., Liu, C. F., Wang, W., Leng, F., Huang, C. Z. 2013. One-pot hydrothermal synthesis of highly luminescent nitrogen-doped amphoteric carbon dots for bioimaging from *Bombyx mori* silk-natural proteins, *J. Mater. Chem. B* 1 (22), 2868-2873.
- [14] Xu, H., Yang, X., Li, G., Zhao, C., Liao, X., 2015. Green Synthesis of Fluorescent Carbon Dots for Selective Detection of Tartrazine in Food Samples, *J. Agric. Food Chem.*, 63 (30), 6707-6714.
- [15] Liu, H., Ye, T., Mao, C. 2007. Fluorescent carbon nanoparticles derived from candle soot, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46 (34), 6473-6475.
- [16] Sahu, S., Behera, B., Maiti, T. K., Mohapatra, S. 2012. Simple one-step synthesis of highly luminescent carbon dots from orange juice: application as excellent bio-imaging agents, *Chem. Commun.*, 48 (70), 8835-8837.
- [17] Thakur, M., Pandey, S., Mewada, A., Patil, V., Khade, M., Goshi, E., Sharon M. 2014. Antibiotic Conjugated Fluorescent Carbon Dots as a Theranostic Agent for Controlled Drug Release, Bioimaging, and Enhanced Antimicrobial Activity, *J. Drug Deliv.*, 2014, Article ID 282193.
- [18] Feng, J., Wang, W. J., Hai, X., Yu, Y. L., Wang, J. H., 2016. Green preparation of nitrogen-doped carbon dots derived from silkworm chrysalis for cell imaging, *J. Mater. Chem. B* 4 (3), 387-393.
- [19] Xue, M., Zhan, Z., Zou, M., Zhang, L., Zhao, S. 2016. Green synthesis of stable and biocompatible fluorescent carbon dots from peanut shells for multicolor living cell imaging, *New J. Chem.*, 40 (2), 1698-1703.
- [20] Liang, Q., Ma, W., Shi, Y., Li, Z., Yang, X. 2013. Easy synthesis of highly fluorescent carbon quantum dots from gelatin and their luminescent properties and applications, *Carbon*, 60, 421-428.
- [21] Yang, X., Zhou, Y., Zhu, S.H., Luo, Y., Feng, Y., Dou, Y. 2014. Novel and green synthesis of high-fluorescent carbon dots originated from honey for sensing and imaging, *Biosensors and Bioelectronics*, 60, 292-298.
- [22] Zhou, H. S., Wang, L. 2014. Green Synthesis of Luminescent Nitrogen-Doped Carbon Dots from Milk and Its Imaging Application, *Anal. Chem.*, dx.doi.org/10.1021/ac502646x.
- [23] Zhu, C., Zhai, J., Dong, S. 2012. Bifunctional fluorescent carbon nanodots: green synthesis via soy milk and application as metal-free electrocatalysts for oxygen reduction, *Chem. Commun.*, 48 (75), 9367-9369.
- [24] Zheng, H., Wang, Q., Long, Y., Zhang, L., Gao, M., Bai, W. 2011. Microwave-hydrothermal synthesis of fluorescent carbon dots from graphite oxide, *Carbon*, 49, 3134-3140.
- [25] Yang, Z., Li, Z., Xu, M., Ma, Y., Zhang, J., Su, Y., Gao, F., Wei, H., Zhang, L. 2013. Controllable Synthesis of Fluorescent Carbon Dots and Their Detection Application as Nanoprobes. *Nano-Micro Lett.* 5 (4), 247-259.
- [26] Prasannan, A., Imae, T. 2013. One-Pot Synthesis of Fluorescent Carbon Dots from Orange Waste Peels, *Ind. Eng. Chem. Res.* 2013, 52 (44), 15673-15678.
- [27] Lim, S. Y., Shen, W., Gao, Z. 2015. Carbon quantum dots and their applications, *Chem. Soc. Rev.*, 44 (1), 362-381.
- [28] Liu, S., Tian, J., Wang, L., Zhang, Y., Qin, X., Luo, Y., Asiri A.M., Al-Youbi A.O., Sun, X. 2012. Hydrothermal treatment of grass: a low-cost, green route to nitrogen-doped, carbon-rich, photoluminescent polymer nanodots as an effective fluorescent sensing platform for label-free detection of Cu(II) ions. *Adv Mater.*, 24 (15), 2037-2041.
- [29] Biçer, K. B. 2017. Karbon Kuantum Noktaların Sentezine Fotoluminesans Özelliklerinin İncelenmesi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 41 s, Erzurum.
- [30] Melis Özge Alaş, Rükan Genç, 2016, "Floresans Karbon Nanoparçacıkların Yeşil Sentezi ve Pasivasyon Ajanının Molekül Ağırlığının Nanoparçacık Özellikleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi", Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi (Sinop Uni J Nat Sci), 1 (2), 123-134.
- [31] Bozkurt, E. 2013. Kumarin 120 Boya Bileşiğinin Ters Misellerde Moleküler Davranışının Spektroskopik Tekniklerle İncelenmesi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 118 s, Erzurum.

- [32] Terzi, P. 2013. Elektro döndürme Yöntemiyle Elde Edilen Jelatin Nanoliflerin Gıdalarda Kıvam Verici Olarak Kullanılması, İstanbul Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 143 s, İstanbul.
- [33] Hsiao Wei, T., 2009. Rheology And Stability of Olive Oil Cream Emulsion Stabilized by Sucrose Fatty Acid Esters Nanionic Surfactants, Malaya Kuala Lumpur Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 62s, Malezya.
- [34] Yu, S. J., Kang, M. W., Chang, H. C., Chen, K. M., Yu, Y. C., 2005. Bright fluorescent nanodiamonds: No photobleaching and low cytotoxicity, J. Am. Chem. Soc., 127, 17604-17605.
- [35] Aslandaş, A. M., Balcı, N., Arık, M., Şakiroğlu, H., Onganer, Y., Meral, K. 2015. Liquid nitrogen-assisted synthesis of fluorescent carbon dots from Blueberry and their performance in Fe³⁺ detection, Applied Surface Science, 356, 747-752.

Tunçbilek Linyitinin Sorgum Biyokütlesi ve Biyokütle Hidrolizatı ile Birlikte Gazlaştırılması

Açelya SEÇER*¹, Arif HASANOĞLU²

^{1,2}Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 01330, Adana, Türkiye

(Alınış / Received: 12.09.2019, Kabul / Accepted: 24.02.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Anahtar Kelimeler

Kömür,
Biyokütle,
Gazlaştırma,
Birlikte gazlaştırma,
Hidrojen

Özet: Bu çalışmada, yüksek oranda kükürt (%1,2) ve kül (%20,6) içeren Tunçbilek linyiti, öğütülmüş katı sorgum (green go) ve sub-kritik su koşullarında hidroliz edilmiş sorgum hidrolizatı ile birlikte gazlaştırılarak gaz ürün dağılımı ve birlikte gazlaştırma işlemine sorgumun sinerjik etkisi incelenmiştir. Öğütülmüş katı sorgum ve sorgum hidrolizatı ile yapılan birlikte gazlaştırma deneylerinden elde edilen gaz hacimleri, Tunçbilek linyitinin tek başına gazlaştırılmasından elde edilenden daha fazla olduğu görülmüştür. En yüksek toplam gaz hacmi (2810 mL) ve hidrojen verimi (%70,1) 900 °C sıcaklıkta sorgum hidrolizatı ile yapılan birlikte gazlaştırma deneylerinden elde edilmiştir.

Co-gasification of Tunçbilek Lignite with Sorghum Biomass and Sorghum Biomass Hydrolysate

Keywords

Coal,
Biomass,
Gasification,
Co-gasification,
Hydrogen

Abstract: In this study, high sulphur (1.2%) and ash (20.6%) containing Tunçbilek lignite was co-gasified with raw sorghum (green go) biomass and sorghum hydrolysate, which was hydrolyzed under sub-critical conditions, and synergetic effects of sorghum on co-gasification process were investigated as well as product distributions. The total gas volume obtained from individual gasification of Tunçbilek lignite was less than those obtained from both co-gasification with raw Sorghum and Sorghum hydrolysate. The highest total gas (2810 mL) and hydrogen yield (70.1%) was obtained from co-gasification with sorghum hydrolysate.

1. Giriş

Dünya enerji ihtiyacının yaklaşık %29'u hala kömür tarafından karşılanmakta ve elektriğin %40'ı da kömür kullanılarak üretilmektedir [1]. Bu nedenden ötürü, kömür hala dünyanın ana enerji kaynağı olarak kullanılmaya devam etmektedir. Kullanımı sonucu yarattığı çevresel sorunlar ve daha temiz enerji formlarına geçiş çalışmaları kömür kullanımı açısından zorluklar ve rekabet doğuruyor olsa da mevcut kömür rezervlerinin miktarları, diğer kaynaklardan üretilen enerjilerin üretim maliyetleri, enerji kaynaklarının kullanım miktarları ve bu istatistiklerin geleceğe yönelik ekstrapolasyonları, kömürün bir süre daha ana enerji kaynakları arasında yerini koruyacağını göstermektedir [2]. Bu noktada doğru soru, bu dezavantajları azaltarak kömürden nasıl daha temiz enerji elde edilebileceğidir. Dolayısıyla, kömür alandaki araştırmalar özellikle mevcut işleme teknolojilerinde daha temiz yöntemler geliştirmeye odaklanmaktadır. Gazlaştırma, kömürün daha temiz bir şekilde

işlenebileceği alternatif bir teknolojidir. Bu yöntemde kömür, 800 °C'nin üzerindeki reaksiyon sıcaklıklarında buhar, hava ve / veya oksijen, karbon dioksit veya bu gazların bir karışımı ile reaksiyona sokularak, öncelikle hidrojen, karbon monoksit, karbon dioksit ve metan içeren bir sentez gazı karışımına dönüştürülür [3]. Kömür çarının düşük oksidasyon kinetiği nedeniyle tamamlanamayan dönüşümü, kömür gazlaştırma sistemlerinde enerji verimliliği düşmesine neden olmaktadır. Bu nedenle kömür oksidasyon reaksiyonlarının hızlandırılmaları için birtakım katalizörlerin kullanılması gerekir [4]. Alkali ve toprak alkali metal tuzları, geçiş metalleri ve bunların kompozitleri gibi farklı katalizörler katalitik kömür gazlaştırma proseslerinde kullanılmaktadır [5]. Geleceğin yakıtı olarak hidrojen, su buharı gazlaştırma tekniği ile kömürden üretilebilir [6, 7]. Alkali metal tuzları (özellikle potasyum), 1970'lerden bu yana karbondan hidrojen üretiminde yaygın katalizörler olarak kullanılmaktadır [8]. Biyokütle, yapısında doğal olarak alkali ve alkali toprak metal tuzları bulundurur. Biyokütle ve kömür birlikte

*İlgili yazar: acsecer@cu.edu.tr

gazlaştırılması, biyokütlenin içerdiği minerallerin yarattığı sinerjik etkilerden kaynaklı, kömür gazlaşma reaksiyonlarını hızlandırmak ve kömürden hidrojen üretimini artırmak için umut verici bir teknolojidir [9, 10]. Kömürün metal karbonatlarla su buharı varlığında gazlaştırılması sırasında gerçekleşen olası kataliz reaksiyonları çeşitli yazarlar tarafından önerilmiş [11, 12] ve basit bir birlikte gazlaştırma reaksiyon şeması da Pan ve arkadaşları tarafından ortaya konmuştur [13]. Farklı türde kömürlerin biyokütle ile birlikte gazlaştırılmasında gözlenen sinerjik etkiler çeşitli çalışmalarla incelenmiştir [13–20]. Bu etkiler, proses enerji verimliliğini, gazlaştırma verimlerini ve elde edilen sentez gazının kompozisyonunu etkileyen çeşitli faktörlere bağlıdır [21]. Biyokütle türü, operasyon sıcaklığı, gazlaştırıcı tipi, kömür/biyokütle bileşim oranı ve buhar ve / veya hava oranı gibi çeşitli faktörlerin birlikte gazlaştırmaya yaptığı etkilerin incelendiği çalışmalar literatürde mevcuttur [19–38].

Lignoselülozik biyokütle, doğada bulunma sıklığı, düşük üretim maliyetleri ve yüksek enerji üretilebilir içeriği nedeni ile enerji üretiminde kullanılması umut verici bir materyaldir. Ancak, kimyasal yapısı oldukça karmaşıktır ve bu yapının parçalanması için bazı ek ön işlemler uygulanması gerekir. Bu yöntemlerden biri, yalnızca su ortamında gerçekleştiği için oldukça çevre dostu bir yöntem olan sub-kritik su ortamında hidrolizdir. Sub-kritik su ortamında, 250 °C sıcaklıkta, lignoselülozik biyokütle materyalinin % 70–75 oranında çözündüğü önceki çalışmalarda bildirilmiştir [39]. Hidroliz edilmiş biyokütle ile kömürün birlikte gazlaştırılması, biyokütle içeriğindeki gazlaşabilir ürün içeriğinin çözündürme yoluyla artırılması ve katalizör etkisi yaratacak çözünür inorganik tuzların da halen çözelti içinde kalması nedeni ile birlikte gazlaştırma prosesinin performansını arttırabilir.

Dünya linyit rezervlerinin yaklaşık %1,6'sı Türkiye'de bulunmaktadır. Ancak bu linyitlerin çoğu düşük kalorifik değerlere sahiptir ve bazıları yüksek miktarda kükürt içerir. Bu linyitlerin sentez gazı ve özellikle hidrojen üretimi için gazlaştırılması, bu kömürlerin çevre dostu ve verimli bir şekilde kullanılmasına alternatif bir yaklaşım olabilir. Bu çalışmada kükürt içeriği % 1,2 (a/a) , kül içeriği %20,6 olan ve daha önce benzer bir çalışmada kullanılmayan Tunçbilek linyiti, sorgum biyokütlesi ve sorgum biyokütle hidrolizati ile birlikte gazlaştırılmıştır ve gazlaştırma sonuçları başta hidrojen verimi olmak üzere elde edilen toplam gaz hacimleri ve gazların içerikleri açısından değerlendirilmiştir. Geleneksel su buharı gazlaştırma yöntemlerinde, su buharı ek bir buhar üretici ünite kullanılarak gazlaştırma sistemine gönderilir. Bu çalışmada, su buharı, buhar üretici jeneratör ile üretilmek yerine, gazlaştırma sisteme doğrudan gönderilmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Materyal

Bu çalışmada Tunçbilek linyiti ve sorgum (Green go) biyokütlesi kullanılmıştır. Tunçbilek linyitine ve sorgum biyokütlesine ait kısa analiz sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. Çalışmada katalizör olarak susuz sodyum karbonat (Na_2CO_3 , Merck, $\geq 99,9\%$), demir (III) oksit (Fe_2O_3 , Alfa Aesar, 20–40nm APS powder), Nikel (II) klörür (NiCl_2 , Alfa Aesar, 98%), kullanılmıştır. Gazlaştırma deneylerinde kullanılan katalizör miktarı, metal içeriği bakımından kuru külsüz bazdaki kömürün %3'ü olacak şekilde belirlenmiştir.

Tablo 1. Tunçbilek linyiti ve sorgum biyokütlesinin kısa analiz değerleri.

	Tunçbilek	Sorgum
C (a %, kkb*)	56,0	39,8
H (a %, kkb)	5,2	0,8
N (a, %, kkb)	2,3	5,2
S (a %, kkb)	1,2	–
O (a %)	35,3	54,2
Nem (a %)	4,1	8,1
Kül (a %)	20,6	8,4

*Kuru külsüz baz

2.2. Metot

2.2.1. Biyokütlenin Hidrolizi

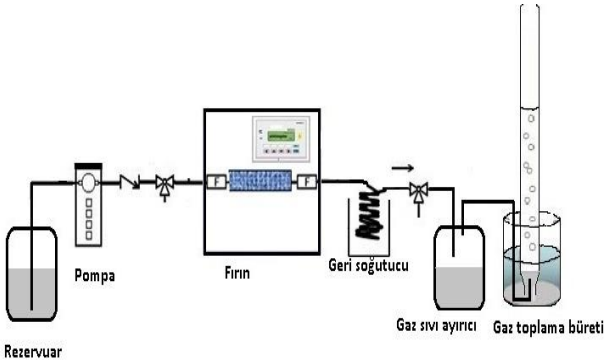
Biyokütlenin hidrolizi karbondioksit basıncı altındaki sub-kritik su ortamında gerçekleştirilmiştir. Öğütülmüş 10 g sorgum, 500 mL'lik reaktör (Parr 4575 HP/TP) içinde 350 mL su ile 250 °C ve 4060 psi basınçta hidroliz edilmiştir. Hidroliz işleminin ayrıntılarına önceki çalışmalarda yer verilmektedir [39].

2.2.2. Gazlaştırma ve birlikte gazlaştırma deneyleri

Tüm gazlaştırma deneyleri sabit yataklı reaktörde gerçekleştirilmiştir. Kömür, sorgum veya 3:1 (a/a) oranında karıştırılan kömür/sorgum karışımı, toplam gazlaşan madde miktarı kuru külsüz bazda 1,0 g olacak şekilde hazırlanarak çelik reaktöre (iç çap 0,56", dış çap 1,4") yerleştirilmiştir. Paslanmaz çelik reaktör bir yüksek sıcaklık fırını içerisinde dakikada 30 °C artışlarla 900 °C ye kadar ısıtılırken gazlaştırıcı ajan olarak su 0,5 mL dk⁻¹ akış hızında reaktöre gönderilmiştir. Hidroliz çözeltisi kullanılarak yapılan gazlaştırma deneylerinde sisteme su yerine 0,5 mL dk⁻¹ akış hızında hidroliz çözeltisi gönderilmiştir. Kolondan çıkan su gaz karışımı bir ön soğutucudan geçirilerek gaz-sıvı ayırıcı rezervuara giriş yapmıştır. Sıvı kısım bu rezervuarda toplandıktan sonra, gaz karışımı kadmiyum asetat çözeltisi içinden geçirilmiş ve oluşan H₂S, CdS şeklinde çöktürülmüştür. H₂S haricindeki diğer gazlar bir gaz büretinde toplanmış ve hacmi ölçüldükten sonra oluşan gazın kompozisyonu gaz kromatografisi cihazında analiz

edilerek saptanmıştır. Gazlaştırma sisteminin şematik gösterimi Şekil 1’de verilmiştir.

Gazlaştırma deneyleri sonunda oluşan gaz karışımlarının bir büret içerisinde toplanarak hacimleri belirlenmiş ve analizleri gerçekleştirilmiştir. Gaz karışımının kalitatif ve kantitatif analizleri, iki kanallı termal elektrik iletkenlik dedektörlü (TCD) Varian-450 gaz kromatografi cihazı ile yapılmıştır. Hidrojen gazı Argon taşıyıcı gazının kullanıldığı kanalda, Varian Restek Molsieve 5A 1m×1/8” kolon ile analiz edilmiştir. Hidrojen gazı hariç diğer gazların analizi, Helyum taşıyıcı gazının kullanıldığı diğer kanalda, Varian Restek Shincarbon 100/120 mesh 2m×1/16”×1mm kolonda gerçekleştirilmiştir. Kolon fırın sıcaklık programı, 40°C’de 3 dk bekleme, 8 °C dk⁻¹ ile 230 °C’ye yükselme ve bu sıcaklıkta 5 dk bekleme şeklinde toplam 31,75 dk sürede gerçekleştirilmiştir. Dedektör sıcaklığı 230 °C, filament sıcaklığı ise 300 °C olarak çalışılmıştır. Standart gaz karışımı olarak Elite Gaz Teknolojileri İnş. Tur. San. Tic. Ltd. Şti.’den (İstanbul, Türkiye) sağlanan içerisinde % mol olarak sırasıyla 1,8±0,04 asetilen, 4,0±0,1 etilen, 3,9±0,1 etan, 4,9±0,1 metan, 16,0±0,3 karbonmonoksit, 22,0±0,4 karbondioksit ve balans sağlayacak miktarda hidrojen (47,4±0,5) bulunan gaz karışımı kullanılmıştır.



Şekil 1. Gazlaştırma sistemi

2.2.3. Sıvı ürün analizleri

Gazlaşma deneyleri sonrasında oluşan sıvı ürünler bir rezervuar kabında toplanarak hacimleri belirlenmiştir. Daha sonra bu sıvı, diklorometan çözücüsü ile ekstrakte edilmiş ve Thermo TR-5MS kapiler kolon (60m × 0,25 mm ID × 0,25 µm) kullanılarak, Thermo Finnigan GC-MS gaz kromatografisi-kütle spektrometresi cihazında analizleri gerçekleştirilmiştir. GC-MS sıcaklık programı: 40 °C’de 5 dakika bekledikten sonra 280 °C’ye 5 °C dk⁻¹ lık artışlarla yükselerek bu sıcaklıkta 10 dk bekleme şeklindedir. Ürünlerin içerikleri NIST (National Institute of Standards and Technology) kütle spektral kütüphanesi ile belirlenmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Sorgum katı biyokütlesi ile birlikte gazlaştırma

Çalışmada Tunçbilek linyiti ve sorgum biyokütlesi katalizörlü ve katalizörsüz ortamda tek başına ve birlikte gazlaştırılarak, toplam gaz hacimleri ve gazların bileşimleri açısından değerlendirilmiştir. Gazlaştırma deneyleri, önceki kömür gazlaştırma çalışmalarında etkin değerler olarak belirlenen 0,5 mL dk⁻¹ su akış hızı, 900 °C sıcaklıkta ve 3:1 (g/g) oranında kömür/biyokütle karışımı kullanılarak [40] gerçekleştirilmiştir. Tüm deneylerden elde edilen gazların içeriği başlıca H₂ olmak üzere, CO₂, CO ve CH₄ gazlarından oluşmaktadır. Sonuçlar Tablo 2’de özetlenmiştir. Tablo 2’de bileşenlerin karışımdaki miktarlarının tek başlarına gazlaştırıldığında edilen gaz miktarları ve gazların bileşimleri verilmiştir.

Tablo 2. Tunçbilek linyiti ve sorgum biyokütlesinin, 900°C ve 0,5 mL dk⁻¹ akış hızında, tek başlarına ve birlikte gazlaştırılmaları sonucu elde edilen gazların toplam hacimleri ve bileşimleri.

Gaz	Toplam Gaz Hacmi	Gaz Kompozisyonu			
		%H ₂	%CO	%CH ₄	%CO ₂
T*	1770±36	68,0±1,0	19,2±0,9	3,8±0,1	9,0±0,8
S**	360±10	71,4±1,2	16,0±1,1	2,8±0,3	9,8±0,1
T/S	2730±26	68,0±1,7	18,3±1,0	3,3±0,6	10,7±0,9

*Tunçbilek

**Sorgum

Sorgum biyokütlesinin karışımda yer alan miktarı tek başına gazlaştırıldığında 360 mL gaz elde edilirken kömürün karışımdaki miktarı tek başına gazlaştırıldığında elde edilen gazın hacmi 1770 mL’dir. Bu bileşenlerin birlikte gazlaştırılmasından elde edilen gaz hacmi ise 2730 mL olup, bu sıcaklıkta bileşenlerin tek başlarına gazlaştırıldığında elde edilen gazların hacimsel toplamından 600 mL fazladır.

Bu farkı yaratan pozitif etkinin, birlikte gazlaştırma prosesinin yarattığı sinerjiden kaynaklandığı düşünülmektedir. Sonuçlar hidrojen verimi açısından değerlendirildiğinde, birlikte gazlaştırma sonucu gaz bileşimindeki H₂ gazı oranının (%68,0) Tunçbilek linyitinin tek başına gazlaştırılması sonucu elde edilenden (%68,0) farklı olmadığı görülmektedir. Ancak, birlikte gazlaştırmanın toplam gaz hacmindeki pozitif etkisi göz önünde bulundurulduğunda, proseten elde edilen H₂ gazı miktarının birlikte gazlaştırma sonucu arttığı söylenebilir. Birlikte gazlaştırma ile Tunçbilek kömürünün tek başına gazlaşması sonucu oluşan CO oranının yaklaşık %1’i kadar daha az CO oluşmuştur. Tek başına kömür gazlaştırmada oluşan CO₂’nin ürün gazı karışımındaki oranı %9,0 iken birlikte gazlaştırmada oluşan CO₂’nin gaz karışımındaki oranı %10,7 olmuştur.

Gaz bileşimlerinde CH₄ gazı açısından anlamlı bir değişikliğe rastlanmamıştır. Sonuç olarak sorgum biyokütlesi ile birlikte gazlaştırma işlemi Tunçbilek kömürünün gazlaştırılmasında oluşan gaz bileşiminde herhangi belirgin bir değişikliğe sebebiyet vermemekle beraber elde gazın miktarında artış meydana getirerek pozitif etki yaratmıştır. Kömür / biyokütle karışımının biyokütle oranı, hem toplam gaz hacminde hem de karbon dönüşüm verimlerinde. Biyokütlenin yüksek reaktivitesinin bir sonucu olarak uçucu bileşenler hızla serbest radikallere dönüşür ve bu radikaller ayrışma, oksidasyon ve gazlaşma reaksiyonlarını artırır [41]. Bu nedenle gazlaşan kömür/biyokütle karışımındaki karbon dönüşümleri biyokütle ile birlikte gazlaştırma prosesinde artma eğilimindedir ve toplam gaz hacminde artış görülmesi bu duruma ithaf edilir. Tek başına kömürü gazlaştırmak yerine birlikte gazlaştırmanın avantajı, kömürün hidrojen üretim reaksiyonlarında katalizör görevi gören biyokütlenin inorganik bileşenlerinden gelir. Dolayısı ile gazlaşan karışım içinde yer alan biyokütlenin varlığı, hidrojen üretiminde yer alan reaksiyonlardan olan su-gaz ve su gaz değişim reaksiyonlarında katalitik etki göstererek üretilen gaz karışımında hidrojen miktarının artmasına neden olmaktadır.

Tek başına kömür için, katalitik kömür gazlaştırma prosesi yüksek karbon dönüşümleri ve kok kömürü aglomerasyonunun engellenmesi açısından avantajlıdır. Biyokütle yapısında var olan inorganik içerikten kaynaklı, birlikte gazlaştırma prosesinde katalizör kullanılmaksızın da bu etkileri gözlemlemek mümkündür. Ancak prosesin iyileştirilebilmesinde herhangi bir katkı sağlanıp sağlanmayacağına değerlendirilmesi açısından, çalışmanın bu bölümünde ekstra katalizör kullanımının birlikte gazlaşmaya etkisi incelenmiştir. 0,5 mL dk⁻¹ su akış hızı ve 900 °C sıcaklıkta yapılan deneylerde, Na₂CO₃, Fe₂O₃ ve NiCl₂ katalizörlerinin Tunçbilek/sorgum karışımının birlikte gazlaştırması üzerine etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar Tablo 3'de özetlenmiştir.

Tablo 3. 0,5 mL dk⁻¹ su akış hızı ve 900 °C sıcaklıkta, katalizör kullanılarak yapılan birlikte gazlaştırma deneylerinden elde edilen gazların toplam hacimleri ve bileşimleri

Katalizör	Toplam Gaz Hacmi (mL)	Gaz Kompozisyonu			
		%H ₂	%CO	%CH ₄	%CO ₂
-	2730±36	68,0±1,1	18,3±0,9	3,3±0,2	10,7±0,7
Fe ₂ O ₃	2810±41	70,0±0,9	16,9±0,7	4,1±0,6	9,3±0,6
Na ₂ CO ₃	2945±23	71,1±0,8	10,4±0,6	2,9±0,3	15,6±1,0
NiCl ₂	2976±44	70,8±0,9	16,8±1,7	2,1±0,1	10,3±0,9

3.1.1. Katalizör etkisi

Tek başına kömür için, katalitik kömür gazlaştırma prosesi yüksek karbon dönüşümleri ve kok kömürü aglomerasyonunun engellenmesi açısından avantajlıdır. Biyokütle yapısında var olan inorganik içerikten kaynaklı, birlikte gazlaştırma prosesinde katalizör kullanılmaksızın da bu etkileri gözlemlemek

mümkündür. Ancak prosesin iyileştirilebilmesinde herhangi bir katkı sağlanıp sağlanmayacağına değerlendirilmesi açısından, çalışmanın bu bölümünde ekstra katalizör kullanımının birlikte gazlaşmaya etkisi incelenmiştir. 0,5 mL dk⁻¹ su akış hızı ve 900 °C sıcaklıkta yapılan deneylerde, Na₂CO₃, Fe₂O₃ ve NiCl₂ katalizörlerinin Tunçbilek/sorgum karışımının birlikte gazlaştırması üzerine etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar Tablo 3'de özetlenmiştir.

Birlikte gazlaştırmanın kömür gazlaştırma prosesinde yarattığı pozitif etki oldukça belirgindir. Katalizör kullanımı ise bu pozitif etkiyi bir miktar daha arttırarak gazlaşma prosesini daha verimli hale getirmiştir. Ayrıca kullanılan tüm katalizörler ürün gazı içeriğindeki H₂ yüzdesini arttırmıştır (%2-%3). En yüksek gaz hacmi Na₂CO₃ ve NiCl₂ katalizörünün kullanıldığı deneylerden elde edilmiştir. Bu durum 700 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda elde edilen ürün gazı içeriğinin CO ve H₂ yönünden zengin olmasına neden olmuştur. NiCl₂ varlığında H₂ gazında %2,8'lik artış gözlenmiştir.

Karışımındaki %CO oranı, katalizör kullanılmaksızın yapılan gazlaştırmaya kıyasla az olmakla birlikte, diğer katalizörler eşliğinde yapılan gazlaştırmalara nazaran daha yüksektir. Na₂CO₃ eşliğinde yapılan gazlaştırmada ürün gazındaki %H₂ değeri %71,1 ile en yüksek değerde iken, %CO oranının katalizörsüz gazlaştırmaya oranla gazın yaklaşık %8 azaldığı ve %CO₂ oranının ise yaklaşık %5 arttığı gözlemlenmektedir. Sodyum gibi alkali metaller, gazlaşma esnasında büyük aromatik halka oluşumlarının ve yüksek molekül ağırlıklı uçucu hidrokarbonların oluşumunu engeller. Dolayısı ile bu ürünlerin düşük molekül ağırlıklı gazlaşma ürünlerine dönüşür. Bu durum gazlaşma verimine toplam gaz hacmi açısından pozitif etki sağlar [42]. Fe₂O₃ eşliğinde yapılan gazlaştırma sonrası ürün içeriğindeki H₂ gazı katalizörsüz gazlaştırmaya oranla %2 daha fazladır. Kömür pirolizi esnasında açığa çıkan hidrokarbonların buhar reformlama reaksiyonlarının hızları uygun bir oksijen verici varlığında artabilmektedir. FeO-Fe₂O₃ dönüşümü için yapılan termodinamik analizler, bu dönüşümün sentez gazının H₂ gazına dönüşümünde etkin olan su gaz değişim reaksiyonunu destekleyecek ideal entalpiye sahip olduğunu göstermiştir [43]. Ancak, H₂ gazı da bu koşullarda Fe₂O₃ tarafından eş zamanlı olarak oksitlenmektedir ve dolayısı ile hidrokarbon dönüşümleri ile artan gaz miktarı içeriğindeki H₂ gazının bir kısmı Fe₂O₃ tarafından oksitlenerek hem hidrojen gazının gaz karışımındaki oranının azalmış olması hem de oluşan toplam gaz hacminin diğer katalizörlere kıyasla düşük olması muhtemeldir. Fe₂O₃ katalizörü ayrıca CO-CO₂ dönüşümlerini de destekleyecek reaksiyonlarda yer alarak gaz karışımı içerisindeki CO oranının azalmasına ve CO₂ oranının ise artmasına neden olmuştur.

3.2. Sorgum hidrolizati ile birlikte gazlaştırma

Çalışmanın bu bölümünde Tunçbilek linyiti katı sorgum biyokütlesi yerine sub-kritik su ortamında hidrolizi gerçekleştirilmiş sorgum hidrolizati ile birlikte gazlaştırılmıştır. Deneyler gazlaştırma sıcaklığına ulaşmış sisteme, işlenmemiş biyokütle içeriğinde eş değer organik karbon içeren hidroliz çözeltisinin, 0,5 mL dk⁻¹ akış hızında gönderilmesi yoluyla gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar elde edilen toplam gaz hacmi ve gazın içeriği açısından değerlendirilerek işlenmemiş biyokütle ile yapılan birlikte gazlaştırma deneyleri sonuçları ile kıyaslanmıştır (Tablo 4).

Tablo 4. Tunçbilek linyitinin sorgum hidrolizati ile 0,5 mL dk⁻¹ hidrolizat akış hızı ve 900°C sıcaklıkta birlikte gazlaştırmasından elde edilen gaz ürünlere ait sonuçlar

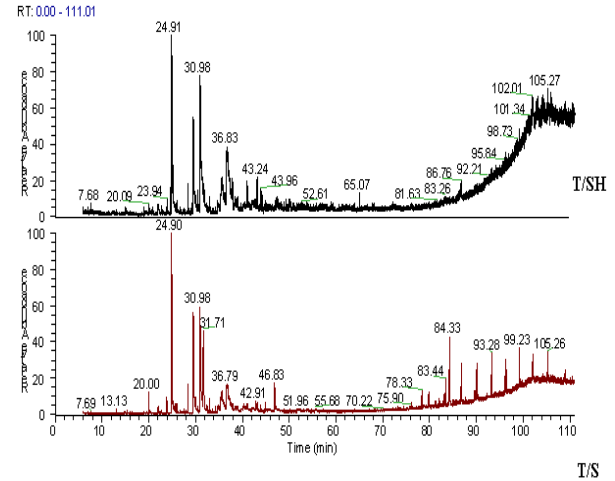
Katalizör	Toplam Gaz Hacmi (mL)	Gaz Kompozisyonu			
		%H ₂	%CO	%CO ₂	%CH ₄
T	1770±36	68,0±1,0	9,0±0,6	19,2±0,9	3,8±0,1
T/S	2430± 28	68,0±1,3	10,7±0,8	18,3±0,6	3,0±1,1
T/SH*	2810±35	70,0±1,1	9,3±0,5	16,6±0,7	4,1±0,1

*Sorgum hidrolizati

Sorgum hidrolizati ile yapılan gazlaştırmada toplam gaz hacmi (2810 mL) , Tunçbilek linyitinin hem tek başına (1770 mL), hem de öğütülmüş katı sorgum biyokütlesi ile birlikte gazlaştırılmasından elde edilen (2430 mL) toplam gaz hacimlerinden belirgin bir şekilde daha fazladır. Ayrıca, sorgum biyokütle hidrolizati ile yapılan birlikte gazlaştırmada gaz bileşimindeki % CO ve % CO₂ oranı (sırasıyla % 9,3 ve % 16,6) katı biyokütle ile yapılan birlikte gazlaştırmadan elde edilen % CO ve % CO₂ oranlarına nazaran (sırasıyla %10,7 ve % 18,3) azalmıştır ve H₂ oranı ise % 2'lik bir artış göstermiştir. Lignoselülozik materyallerde selüloz, hemiselüloz ve lignin olmak üzere üç ana bileşen mevcuttur. Bu bileşenlerden selüloz yüksek derecede düzenli (% 60) kristal yapı özelliği gösterir ve suda çözünmez. Hemiselüloz ise polimerizasyon derecesi selüloza göre daha düşük dallanmış bir yapıya sahiptir. Lignin ise üç boyutlu aromatik amorf yapıya sahiptir ve lignoselülozik madde yapısının en hidrofobik bileşenidir. Biyokütlenin bu karmaşık kimyasal yapısı, hidroliz işlemi parçalanarak ile suda çözünebilir oksijenli bileşiklere (şekerler, şeker alkoller ve gliserol vb.) dönüştürülür. Bu çözündürme ön işlemi sonucu oluşan nispeten daha küçük yapılara sahip moleküllerin gaz ürünlere dönüşümü, biyokütlenin işlenmemiş karmaşık yapısına nazaran daha kolay bir hale gelebilmektedir. Tunçbilek linyitinin sorgum hidrolizati ile yapılan gazlaştırmada elde edilen gaz ürün miktarının daha fazla olması bu duruma atfedilmiştir.

Gazlaştırma işlemleri sonrasında toplanan sıvı ürünlerin GC/MS analizleri gerçekleştirilerek ürün dağılımları incelenmiştir. Ortak olarak tüm gazlaştırma deneylerinden sonra edilen sıvı ürünler yüksek konsantrasyonlarda fenol ve türevleri ile

alifatik hidrokarbonlar içermektedir. Sorgum hidrolizatının birlikte gazlaştırma öncesi yapılan GC-MS analizleri sonucu içeriğinde özellikle ligninden kaynaklanan parçalanma ürünleri olan, fenol, 4-methoxy fenol, 3-etil fenol, 4-asetil-1,3,5-trimetilpirazol, 2,6-dimetoksi-fenol, vanilin, p-hidroasetofenon, bütilfitalat bileşiklerine rastlanmıştır. İşlenmemiş sorgum ve sorgum hidrolizati ile yapılan birlikte gazlaştırma deneyleri sonrası sıvıların GC-MS spektrumlarının karşılaştırılması Şekil 2'de verilmektedir.



Şekil 2. Tunçbilek linyitinin sorgum biyokütlesi ve sorgum biyokütle hidrolizati ile yapılan birlikte gazlaştırma deneylerinden sonra rezervuarda toplanan sıvıların GC/MS analizlerinin karşılaştırılması.

İşlenmemiş sorgum ile yapılan gazlaştırma sonrası sıvı içeriğinde fenol ve türevi bileşenlerin yanı sıra 2-izopropil-10-metil fenantren (dk 84,33), 3-hekzilheptadekan (dk 86,86), 3-Etil-5(2-etilbütil)oktadekan (dk 90,13), 9-hekzil heptadekan (93,23) gibi karmaşık yapıya büyük moleküllere rastlanırken, hidrolizat ile yapılan deneylerden toplanan sıvı içeriğinin yalnızca fenol ve türevlerinden oluştuğu görülmektedir (dk. 24,90 fenol; dk. 30,98 3-metil fenol; dk. 31,71 4-etilfenol) (Şekil 2). Bu durum, işlenmemiş katı biyokütle yerine çözüldürülmüş biyokütle kullanılarak yapılan gazlaştırma deneylerinde gaz ürünlere dönüşmeden kondense olan büyük moleküllü karmaşık yapıya hidrokarbonlar yerine gaz ürüne dönüşebilen nispeten küçük moleküllü yapıların gazlaşma reaksiyonlarında yer aldığı savını desteklemektedir.

4. Sonuç

Bu çalışmada Tunçbilek linyiti öğütülmüş katı sorgum biyokütlesi ve sub-kritik su koşullarında hidroliz edilmiş sorgum hidrolizati ile birlikte gazlaştırılmıştır. Birlikte gazlaştırma deneylerinden elde edilen toplam gaz miktarı, Tunçbilek linyitinin ve sorgum biyokütlesinin aynı koşullarda tek başlarına gazlaştırılmalarından elde edilenden daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Sorgum ile yapılan birlikte gazlaştırma deneylerinde katalizör kullanımı hem

elde edilen toplam gaz hacimlerinde hem de gazların bileşimindeki hidrojen gazı oranlarında artışa neden olmuştur ve gazlaştırmada gaz miktarları açısından en etkin katalizörler Na_2CO_3 ve NiCl_2 olarak belirlenmiştir. Sorgum hidrolizati ile yapılan birlikte gazlaştırma deneylerinde elde edilen toplam gaz hacmi (2810 mL), öğütülmüş katı sorgum biyokütlesi ile yapılan birlikte gazlaştırmadan elde edilen toplam gaz hacminden (2430 mL) daha fazla olmuştur. Bu durum biyokütlenin suda çözündürülmesi sonucu elde edilen hidrolizatın daha kolay gazlaşabilen içeriğe sahip olduğunu göstermiştir. Kömürle birlikte yapılan gazlaştırma deneylerinde sorgumun sinerjik etki yaptığı gözlemlenmiştir.

Teşekkür

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Birimi (BAP) tarafından FDK-2015-3741 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Kaynakça

- [1] World Energy Resources 2016. World Energy Council <https://www.worldenergy.org/wp-content/uploads/2016/10/World-Energy-Resources-Full-report-2016.10.03.pdf> (Erişim tarihi 10.10.2018).
- [2] World Energy Outlook, 2016. https://www.iea.org/media/publications/weo/WEO2016_Chapter1.pdf (Erişim tarihi: 10.04.2017).
- [3] Minchener, J.A. 2005. Coal gasification for advanced power generation. *Fuel*, 17, 2222-35.
- [4] Mallick, D., Mahanta, P., Moholkar, V.S. 2017. Co-gasification of coal and biomass blends: Chemistry and engineering. *Fuel*, 204, 106-28.
- [5] Veraa, M.J., Bell, A.T. 1978. Effect of alkali metal catalysts on gasification of coal char. *Fuel*, 57(4), 194-200.
- [6] Moore, T.A., Pearce, S. 2006. Hydrogen from coal. *International Journal of Coal Geology*, 65 (3-4), 171-2.
- [7] Stiegel, G.J., Ramezan, M. 2006. Hydrogen from coal Gasification: An economical pathway to a sustainable future. *International journal of coal geology*, 65 (3-4), 173-190.
- [8] Veraa, M.J., Bell, A.T. 1978. Effect of alkali metal catalysts on gasification of coal char. *Fuel*, 57 (4), 194-200.
- [9] Masnadi, M.S., Grace, J.R., Bi, X.T., Lim, C.J., Ellis, N., Li, Y.H., Watkinson, A.P. 2015. From coal towards renewables: catalytic/synergistic effects during steam co-gasification of switchgrass and coal in a pilot-scale bubbling fluidized bed. *Renew Energy*, 83, 918-930.
- [10] Masnadi, M.S., Grace, J.R., Bi, X.T., Lim, C.J., Ellis, N. 2015. From fossil fuels towards renewables: inhibitory and catalytic effects on carbon thermochemical conversion during co-gasification of biomass with fossil fuels *Appl. Energy*, 140, 196-209.
- [11] Mckee, D.W. 1983. Mechanisms of alkali metal catalysed gasification of carbon. *Fuel*, 62, 170-175.
- [12] Mckee, D.W., Chatterji, D. 1975. The catalytic behavior of alkali metal carbonates and oxides in graphite oxidation reactions. *Carbon*, 13, 381-390.
- [13] Pan, Y.G., Velo, E., Roca, X., Manya, J.J., Puigjaner, L. 2000. Fluidized-bed co-gasification of residual biomass/poor coal blends for fuel gas production. *Fuel*, 79(11), 1317-1326.
- [14] Sjöström, K., Chen, G., Yu, Q., Brage, C., Rosen, C. 1999. Promoted reactivity of char in co-gasification of biomass and coal: synergies in the thermochemical process. *Fuel*, 78 (10), 1189-1194.
- [15] Brown, C.R., Liu, K., Norton, G. 2000. Catalytic effects observed during the co-gasification of coal and switchgrass. *Biomass Bioenergy*, 18 (6), 499-506.
- [16] Howaniec, N., Smolinski, A., Stanczyk, K., Pichlak, M. 2011. Steam co-gasification of coal and biomass derived chars with synergy effects as an innovative way of hydrogen-rich gas production. *Int J Hydrogen Energy*, 36(22), 14455-14463.
- [17] Ren, H.J., Zhang, Y.Q., Fang, Y.T., Wang, Y. 2012. Co-gasification properties of coal char and biomass char. *Journal of Fuel Chemistry and technol*, 40 (2), 143-148.
- [18] Howaniec, N., Smolinski, A. 2013. Steam co-gasification of coal and biomass- synergy in reactivity of fuel blends char. *Int J Hydrogen energy*, 38(36), 16152-16160.
- [19] Rizkiana, J., Guan, G., Widayatno, W.B., Hao, X., Huang, W., Tsutsumi, A., Abudula, A. 2014. Effect of biomass type on the performance of cogasification of low rank coal with biomass at relatively low temperatures. *Fuel*, 134, 414-419.
- [20] Ellis, N., Masnadi, S.M., Roberts, D.G., Kochanek, M.A., Ilyushechkin, A.Y. 2015. Mineral matter interactions during co-pyrolysis of coal and biomass and their impact on intrinsic char co-gasification reactivity. *Chemical Engineering Journal*, 279, 402-408.
- [21] Brar, J.S., Singh, K., Wang, J., Kumar, S. 2012. Gasification of Coal and Biomass: A review. *Int J Forestry Research*, 363058:10.

- [22] Kezhong, L., Zhang, R., Bi, J. 2010. Experimental study on syngas production by cogasification of coal and biomass in a fluidized bed. *Int J Hydrogen Energy*, 35, 2722–2726.
- [23] Velez, F.J., Chejne, F., Valdes, C.F., Emery, E.J., Londono, C.A. 2009. Co-gasification of Colombian coal and biomass in fluidized bed: An experimental study. *Fuel*, 88(3), 424–430.
- [24] Wang, L.Q., Chen, Z.S. 2013. Gas Generation by co-gasification of biomass and coal in an autothermal fluidized bed. *Applied Thermal Engineering*, 59, 278–282.
- [25] Xu, Q., Pang, S., Levi, T. 2015. Cogasification of blended coal-biomass in an air/steam BFB gasifier: Experimental investigation and model validation. *AIChE Journal*, 61(5), 1639–1647.
- [26] Jeong, H.J., Hwang, I.S., Hwang, J. 2015. Co-gasification of bituminous coal-pine sawdust blended char with H₂O at temperatures of 750–850 °C. *Fuel*, 156, 26–29.
- [27] Song, Y.C., Ji, M.S., Feng, J., Li, W.Y. 2015. Product distribution from co-gasification of coal and biomass in a fluidized-bed reactor. *Energy sources, Part A: Recovery, utilization and Environmental Effects*, 37 (23), 2550–2558.
- [28] Pinto, F., Franco, C., Andre', R.N., Tavares, C., Dias, M., Gulyurtlu, I., Cabriata, I. 2003. Effect of experimental conditions on CO gasification of coal, biomass and plastics wastes with air/steam mixtures in a fluidized bed system. *Fuel*, 82, 1967-1976.
- [29] Wang, L.Q., Chen, Z.S. 2013. Experimental studies on H₂-rich gas production by co-gasification of coal and biomass in an intermittent fluidized bed reactor. *Advance materials research*, 724–725, 1127–1131.
- [30] Tursun, Y., Xu, S., Wang, G., Wang, C., Xiao, Y. 2015. Tar formation during co-gasification of biomass and coal under different gasification condition. *Journal of analytical and applied Pyrolysis*, 111, 191–199.
- [31] Kumabe, K., Hanaoka, T., Fujimoto, S., Minowa, T., Sakanishi, K. 2007. Co-gasification of woody biomass and coal with air and steam. *Fuel*, 86 (5–6), 684–689.
- [32] Collot, A.G., Zhuo, Y., Dugwell, D.R., Kandiyoti, R. 2003. Co-pyrolysis and co-gasification of coal and biomass in bench scale fixed-bed and fluidized bed system. *Fuel*, 82(15-17), 1967-1976.
- [33] Valdés, C.F., Marrugo, G., Chejne, F., Montoya, J.I., Gomez, C.A. 2015. Pilot-scale fluidized-bed co-gasification of palm kernel shell with sub-bituminous coal. *Energy Fuels*, 29(9), 5894-5901.
- [34] Che, D., Sun, Y., Li, S. 2016. Exergy analysis of co-gasification process of pine sawdust and lignite in fluidized bed. *Taiyangneng Xuebao/Acta Energiae Solaris Sinica*, 37(4), 968–973.
- [35] Feroso, J., Arias, B., Plaza, M.G., Pevida, C., Rubiera, F., Pis, J.J. 2009. High-pressure CO-gasification of coal with biomass and petroleum coke. *Fuel Process Technol*, 90, 926–958.
- [36] Howainec, N., Smolinski, A. 2014. Effect of fuel blend composition on the efficiency of hydrogen-rich gas production in co-gasification of coal and biomass. *Fuel*, 128, 442–450.
- [37] Lapuerta, M., Hernandez, J.J., Pazo, A., Lopez, J. 2008. Gasification and co-gasification of biomass wastes; effect of the biomass origin and the gasifier operating conditions. *Fuel Process Technol*, 89, 828–837.
- [38] Li, K., Zhang, R., Bi, J. 2010. Experimental study on syngas production by co-gasification of coal and biomass in a fluidized bed. *Int J Hydrogen energy*, 35, 2722–2726.
- [39] Meryemođlu, B., Hesenov, A., Irmak, S., Atanur, O., Erbatur, O. 2010. Aqueous phase reforming of biomass using various types of supported precious metal and raney-nickel catalysts for hydrogen production. *Int J Hydrogen Energy*, 35, 12580–12587.
- [40] Seer, A., Küet, N., Faki, E., Hasanoğlu, A. 2018. Comparison of co-gasification efficiencies of coal, lignocellulosic biomass and biomass hydrolysate for high yield hydrogen production. *Int J Hydrogen energy*, 43, 21269–21278.
- [41] Huang, J., Yitian, F., Chen, H., Wang, Y. 2003. Coal gasification characteristic in a pressurized fluidized bed, *Energy Fuels*, 17, 1474–1479.
- [42] Ding, L., Zhou, Z., Guo, Q., Yu, G. 2015. Catalytic effects of Na₂CO₃ additive on coal pyrolysis and gasification. *Fuel*, 142, 134–144.
- [43] Mondal, K., Piotrowski, K., Dasgupta, D., Hippo, E., Wiltowski, T. 2005. Hydrogen from coal in a single step. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 44(15), 5508–5517.

New Bootstrap Methods for the Hypothesis Tests of the Population Mean in Ranked Set Sampling

Nurdan YENİAY KOÇER*¹, Yaprak Arzu ÖZDEMİR², Fikri GÖKPINAR³

^{1,2,3}Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, İstatistik Bölümü, 06500, Ankara, Türkiye

(Alınış / Received: 17.04.2019, Kabul / Accepted: 31.10.2019, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Keywords

Ranked set sampling,
Bootstrap,
Powers of test,
Monte Carlo simulation

Abstract: Ranked Set Sampling is an efficient technique when it is difficult to measure sampling units in respect to cost or time. Although this technique can be used for every sample sizes, the small sample sizes are preferred for better ranking. However, when the sample sizes are small, it is very difficult to obtain distribution of the statistic for the statistical inference such as hypothesis test. In this case, resampling techniques like bootstrap can be used to construct pseudo distribution of the statistics. In this study, the bootstrap methods for hypothesis test about population mean under ranked set sampling is given. A simulation study is also performed to examine the performance of these methods.

Sıralı Küme Örneklemesinde Yığın Ortalamasına İlişkin Hipotez Testi İçin Yeni Bootstrap Metotları

Anahtar Kelimeler

Sıralı küme örneklemesi,
Bootstrap,
Testin gücü,
Monte Carlo simülasyonu

Özet: Sıralı küme örnekleme, örnekleme birimlerini ölçmenin maliyet ve zaman bakımından zor olduğu durumda kullanılan etkin bir örnekleme tekniğidir. Bu teknik, her çapta örnek için kullanılabilir olmasına rağmen sıralama hatasını minimuma indirmek için küçük örnek çaplarında daha çok tercih edilir. Ancak, hipotez testi gibi istatistiksel çıkarımla yaparken küçük örnek çapı durumunda, istatistiğin kesin ya da asimptotik dağılımını elde etmek oldukça zordur. Bu durumda, istatistiğin yapay dağılımını elde etmek için Bootstrap gibi yeniden örnekleme teknikleri kullanılabilir. Bu çalışmada, sıralı küme örnekleme altında yığın ortalamasına ilişkin hipotez testi için Bootstrap metotları verilmiştir. Ayrıca, verilen metotların performansını değerlendirmek için simülasyon çalışması yapılmıştır.

1. Introduction

Ranked Set Sampling (RSS) is a sampling technique when it is difficult to measure sampling units but it is easy to rank them by means of techniques that do not require high cost and/or time. RSS was proposed by McIntyre [1] to estimate pasture yields. Takahasi and Wakimoto [2] studied mathematical theory of this technique. They demonstrated that when ranking is perfect, the ranked set sample mean is an unbiased estimator of the population mean and the variance of the ranked set sample mean is always smaller than the variance of simple random sampling on the same sample size.

Dell and Clutter [3] studied imperfect ranking case. As long as ranking is not random, the estimator obtained by RSS is more efficient than Simple Random Sampling (SRS). Besides, it is possible to

obtain effective estimators of the population parameters under RSS. For example, Shen [4] examined the estimation of the population mean for the log-normal distribution under RSS. Bhoj and Absanullah [5] estimated the population parameters of generalized geometric distribution under RSS. They obtained the best linear estimators of and parameters when the sample selection was made according to RSS. Abu-Dayyeh, Assrhani and Ibrahim [6] estimated the shape and scale parameters of pareto distribution using RSS. In this study, in which SRS was also used, the estimators were compared in terms of their biases and mean square errors. Furthermore, Albatineh et al. [7] studied the confidence interval estimation for the population coefficient of variation under RSS. They compared SRS to RSS using confidence interval width and coverage probabilities. Some recent studies about RSS were given by Öztürk [8], Öztürk and Demirel [9].

* Corresponding author: nurdanyeniay@gmail.com

Additionally, hypothesis testing for population parameters under RSS were performed in some other papers. Muttalak and Abu-Dayyeh [10] studied hypothesis testing for the population parameters using RSS. They compared RSS with SRS according to the powers of test for the population mean and variance. Özdemir and Gökpınar [11] studied hypothesis testing for the population mean under different RSS designs. They observed that the powers of test values for all RSS designs are higher than those of SRS. Moreover, Özdemir, Ebegil and Gökpınar [12] derived a test statistic for the difference of two population means using RSS. The type I error rates and the powers of the test were examined by the Monte Carlo simulation study under normality and non-normality. It was shown that the powers of test obtained by RSS were higher than obtained by the SRS.

Most of the statistical inference procedures about parameters require the distributional information of the statistic. In many cases, the exact distribution of this statistic cannot be determined. Asymptotic methods are alternatives for these situations. However, using asymptotic methods may not be feasible in practice because these methods do not work very well in small sample sizes. In small sample cases, resampling techniques such as Bootstrap can be preferred to asymptotic techniques. The Bootstrap technique is one of the most popular methods of resampling methods if the distributions of the statistic could not be obtained analytically, this method would be preferred in practice. Bootstrap was first introduced by Bradley Efron [13]. This method is an alternative way to obtain empirical sampling distribution of the statistic. Since the basic bootstrap method does not require any distributional assumption, it is very useful for statistical inference. In the bootstrap method, B bootstrap samples are generated with n sample size resamples from the original sample by replacing. The Bootstrap method is a widely used method of constructing the confidence intervals, the standard error of the estimator, and testing hypothesis.

In RSS, small set sizes are preferred to achieve minimum ranking error. For this reason, Hui, Modarres and Zheng [14] used the Bootstrap method to construct the confidence interval for the regression estimator of the population mean under RSS. Moreover, they showed that the performance of the proposed method under the assumption of linearity is very well. In this study, we interested in testing against given in Eq.(1)

$$\begin{aligned} H_0: \mu &= \mu_0 \\ H_0: \mu &> \mu_0 \end{aligned} \tag{1}$$

In statistical theory, for testing against given in Eq.(1) classical t test is used. Even when underlying distribution is not normal, this method can be used for large sample sizes according to central limit

theory. This method can also be applied to hypothesis tests under RSS for large samples. However, in practice, it is a well-known fact that RSS is appropriate especially for small sample cases. Thus, the approximation cannot be valid for hypothesis tests using RSS in many cases. For this reason, in this study, the resampling procedures given by Modarres, Hui and Zheng [15] were adapted to the hypothesis test about the population mean which was given in Eq.(1). Modarres, Hui and Zheng [15] suggested three different resampling techniques with Bootstrap for the confidence interval of population mean under RSS. They studied coverage probabilities and confidence interval widths of the population mean under RSS using three different Bootstrap resampling techniques.

The sample selection procedure and properties of the estimator for the population mean under RSS was explained and three different Bootstrap resampling method was introduced in section 2. Then, type I error rates and powers of tests were investigated under different distributions using Bootstrap methods with a simulation study in Section 3. Finally, in Section 4, conclusions were presented.

2. Bootstrap Hypothesis Testing for the Population Mean

In this section, the sample selection process in the RSS was considered as follows:

Firstly, m set with size m are selected with r cycle. Thus, we have m^2r units which was given in Table 1.

X_{ikj} denotes the value of k^{th} sample unit in i^{th} set and j^{th} cycle (Step 1 in Table 1). In i^{th} set and j^{th} cycle sampe units are ordered using auxiliary information or visual ranking methods without actual measurement as $X_{i(1)j} \leq X_{i(2)j} \leq \dots \leq X_{i(m)j}$, $i=1, 2, \dots, m$; $j=1, 2, \dots, r$ (Step 2 in Table 1). In j^{th} cycle, i^{th} unit are selected from i^{th} set. This selected unit is measured and the measurement is denoted as $X_{(i)j}$ (Step 3 in Table 1).

Finally, the ranked set sample with size $n=mr$ are obtained as illustreted in Table 2. Here $X_{(i)j}$ represents i . order statistics of i . set in cycle j ($i=1, 2, \dots, m$; $j=1, 2, \dots, r$) under the assumption of perfect ranking.

Remark: In SRS, the random sample X_1, X_2, \dots, X_n drawn from an unknown distribution F with population mean μ and variance σ^2 and all sample units are independent and identically distributed.

However, a ranked set sample has more complex structure. In RSS, the random sample $X_{(i)1}, X_{(i)2}, \dots, X_{(i)r} \sim F_i$, ($i=1, 2, \dots, m$) where $F_{(i)}$ denotes the distribution function of the i^{th} order statistic. The sample units are independent but not-identically distributed.

Table 1. Sample selection procedure in RSS with sample size $n=mr$

Cycle	Step 1	Step 2	Step 3
1	$X_{111}, X_{121}, \dots, X_{1m1}$	$X_{1(1)1} \leq X_{1(2)1} \leq \dots \leq X_{1(m)1}$	$X_{(1)1}$
	$X_{211}, X_{221}, \dots, X_{2m1}$	$X_{2(1)1} \leq X_{2(2)1} \leq \dots \leq X_{2(m)1}$	$X_{(2)}$
	$\vdots \quad \vdots \quad \vdots$	$\vdots \quad \vdots \quad \vdots$	\vdots
	$X_{m11}, X_{m21}, \dots, X_{mm1}$	$X_{m(1)1} \leq X_{m(2)1} \leq \dots \leq X_{m(m)1}$	$X_{(m)1}$
2	$X_{112}, X_{122}, \dots, X_{1m2}$	$X_{1(1)2} \leq X_{1(2)2} \leq \dots \leq X_{1(m)2}$	$X_{(1)2}$
	$X_{212}, X_{222}, \dots, X_{2m2}$	$X_{2(1)2} \leq X_{2(2)2} \leq \dots \leq X_{2(m)2}$	$X_{(2)2}$
	$\vdots \quad \vdots \quad \vdots$	$\vdots \quad \vdots \quad \vdots$	\vdots
	$X_{m12}, X_{m22}, \dots, X_{mm2}$	$X_{m(1)2} \leq X_{m(2)2} \leq \dots \leq X_{m(m)2}$	$X_{(m)2}$
j	$X_{11j}, X_{12j}, \dots, X_{1mj}$	$X_{1(1)j} \leq X_{1(2)j} \leq \dots \leq X_{1(m)j}$	$X_{(1)j}$
	$X_{21j}, X_{22j}, \dots, X_{2mj}$	$X_{2(1)j} \leq X_{2(2)j} \leq \dots \leq X_{2(m)j}$	$X_{(2)j}$
	$\vdots \quad \vdots \quad \vdots$	$\vdots \quad \vdots \quad \vdots$	\vdots
	$X_{m1j}, X_{m2j}, \dots, X_{mmj}$	$X_{m(1)j} \leq X_{m(2)j} \leq \dots \leq X_{m(m)j}$	$X_{(m)j}$
\vdots	
r	$X_{11r}, X_{12r}, \dots, X_{1mr}$	$X_{1(1)r} \leq X_{1(2)r} \leq \dots \leq X_{1(m)r}$	$X_{(1)r}$
	$X_{21r}, X_{22r}, \dots, X_{2mr}$	$X_{2(1)r} \leq X_{2(2)r} \leq \dots \leq X_{2(m)r}$	$X_{(2)r}$
	$\vdots \quad \vdots \quad \vdots$	$\vdots \quad \vdots \quad \vdots$	\vdots
	$X_{m1r}, X_{m2r}, \dots, X_{mmr}$	$X_{m(1)r} \leq X_{m(2)r} \leq \dots \leq X_{m(m)r}$	$X_{(m)r}$

Table 2. Ranked set sample with size n

Order statistics	Cycle			
	1	2	...	r
1	$X_{(1)1}$	$X_{(1)2}$...	$X_{(1)r}$
2	$X_{(2)1}$	$X_{(2)2}$...	$X_{(2)r}$
\vdots	\vdots	\vdots	...	\vdots
m	$X_{(m)1}$	$X_{(m)2}$...	$X_{(m)r}$

Estimator of the population mean obtained from ranked set sample is defined as follows;

$$\bar{X}_{RSS} = \frac{1}{mr} \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^r X_{(i)j} \quad (2)$$

In RSS, the sample units are generally ranked with visually ranking or using personal judgements. Thus,

small set sizes are preferred to achieve minimum ranking error. However, the exact or asymptotic distribution of the statistic is quite hard to obtain in small sample sizes. In this case, bootstrap technique is a good alternative to these methods.

Before proceeding to the bootstrap resampling methods, we need to give the test statistics for testing the H_0 against H_1 in Eq.(1).

The test statistic is

$$T_{RSS} = \frac{\bar{X}_{RSS} - \mu_0}{\sqrt{\hat{V}(\bar{X}_{RSS})}} \quad (3)$$

where

$$\hat{V}(\bar{X}_{RSS}) = \frac{\hat{\sigma}_{RSS}^2}{mr} \quad (4)$$

$\hat{\sigma}_{RSS}^2$ is the unbiased estimator of σ^2 under RSS and it can be defined as follows:

$$\hat{\sigma}_{RSS}^2 = \frac{1}{mr} \{(m-1)MST + (mr-m+1)MSE\} \quad (5)$$

where MSE and MST are the mean-square error and mean-square treatment, respectively [16].

MSE and MST can be defined as follows:

$$MST = \frac{1}{m-1} \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^r (X_{(i)j} - \bar{X}_{RSS})^2 - \frac{1}{m-1} \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^r (X_{(i)j} - \bar{X}_{(i)})^2 \quad (6)$$

$$MSE = \frac{1}{m(r-1)} \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^r (X_{(i)j} - \bar{X}_{(i)})^2 \quad (7)$$

where $\bar{X}_{(i)} = \frac{1}{r} \sum_{j=1}^r X_{(i)j}$

Using these definitions, the modified methods for testing H_0 against H_1 in Eq. (1) are given as follows.

2.1. Method 1. Bootstrap RSS by rows (BRSSR)

1. Compute T_{RSS} using Eq.(4) for obtained ranked set sample.
2. Assign to each element of the i^{th} row in Table 2, a probability of $\frac{1}{r}$ and select r elements randomly with replacement to obtain $X_{(i)1}^*, \dots, X_{(i)r}^*$.
3. Perform step 2, for $i=1,2,\dots,m$, to obtain a bootstrap ranked set sample $\{X_{(i)j}^*\}$
4. Generate B bootstrap sample $\{X_{(i)j}^*, i = 1,2, \dots, m, j = 1,2, \dots, r\}$ and from these samples obtain T_i^* using Eq. (4).
5. p value is estimated as follows

$$\hat{p} = \frac{\#(T_i^* > T_{RSS})}{B}$$

6. If $\hat{p} < \alpha$ then H_0 is rejected.

2.2. Method 2. Bootstrap RSS (BRSS)

1. Assign to each element of the ranked set sample a probability of $\frac{1}{mr}$.
2. Randomly draw m elements in Table 2, $y_1, y_2, \dots, y_m \sim F_n$ sort them in ascending order $y_{(1)} \leq y_2 \leq \dots \leq y_{(m)}$ and retain $X_{(i)1}^* = y_{(i)}$. Where $y_{(1)} \leq y_2 \leq \dots \leq y_{(m)}$ denote ordered statistics.

3. Perform step 2 for $i=1,2,\dots,m$.

4. Repeat step 2 and step 3 r times to obtain $\{X_{(i)j}^*\}$.

5. B bootstrap samples are generated and $T_1^*, T_2^*, \dots, T_B^*$ are calculated.

6. p value is estimated as follows

$$\hat{p} = \frac{\#(T_i^* > T_{RSS})}{B}$$

7. If $\hat{p} < \alpha$ then H_0 is rejected

2.3. Method 3. Mixed row bootstrap RSS (MRBRSS)

1. Assign to each element of the i^{th} row in Table 2, a probability of $\frac{1}{r}$ for $i=1, 2, \dots, m$
2. Order $y_1^*, y_2^*, \dots, y_m^*$ in ascending order to get $y_1^* \leq y_2^* \leq \dots \leq y_m^*$ and retain $X_{(i)1}^* = y_{(i)}^*$
3. Perform step 1 and step 2 for $i=1, 2, \dots, m$ to obtain $X_{(1)1}^*, X_{(2)1}^*, \dots, X_{(m)1}^*$.
4. Repeat step 1 to step 3 r times to obtain $\{X_{(i)j}^*\}$
5. B bootstrap samples are generated and $T_1^*, T_2^*, \dots, T_B^*$ are calculated.
6. p value is estimated as follows

$$\hat{p} = \frac{\#(T_i^* > T_{RSS})}{B}$$

7. If $\hat{p} < \alpha$ then H_0 is rejected.

3. Simulation Study

In this section, the hypothesis given in Eq. (1) was considered based on RSS with Bootstrap methods. We generate random numbers using different distributions with shift parameter μ^0 (i.e. the mean of the distribution is as $\mu_1 = \mu_0 + \mu^0$) to obtain type I error rates and powers of test. When $\mu^* = 0$ (i.e. H_0 is true), the reject rate of H_0 corresponds the type I error rates. The reject rates in the other cases of μ^* correspond to the power rates of the tests. The distributions using in simulation study are as Standard Normal (0, 1), Uniform (0, 1), Exponential (1) and Gamma (4, 1). The value of μ_0 is well known that $\mu_0 = 0$ for Standard Normal distribution, $\mu_0 = 0.5$ for Uniform distribution, $\mu_0 = 1$ for Exponential distribution and $\mu_0 = 4$ for Gamma distribution. The distributions and values of the shift parameters were given in Table 3.

Table 3. Distributions and μ^* values

	Standard Normal (0, 1)	Uniform (0, 1)	Exponential (1)	Gamma (4, 1)
	0	0	0	0
	0.1	0.1	0.1	0.2
μ^*	0.2	0.13	0.17	0.4
	0.3	0.16	0.23	0.6
	0.4	0.2	0.3	0.8

We use the nominal level $\alpha = 0.05$. Monte Carlo simulation was performed using MATLAB R2017a. To estimate the p value of the test, $B=2000$ bootstrap iteration was utilized. Besides, $T=2000$ repetition was used to obtain Type I error and powers of the test.

To compare the type I error and powers of the tests of the methods, m was taken as 2,3,4,5,6 and r was taken as 2,4,6,8,10.

The power of the tests were ignored and indicated with (*), when the type I error rates of these tests were greater than %6. Results are given in Tables 4-7. Tables 4-7 in Appendix A.

As far as the results in Table 4 is concerned, type I error rates of method 3 are far from its nominal level for all the cases. On the other hand, type I error rates of method 2 are close to its nominal level in all the cases. Nevertheless, type I error rates of method 1 have a great variation according to cycle sizes and set sizes. However, in small set sizes (*e.g.* $m=2$) type I error rates of method 1 is getting closer to its nominal level when cycle sizes are equal or greater than 6. When set sizes are getting larger, even great cycle sizes are not sufficient to make type I error rates of method 1 getting closer to its nominal level. Besides, power rates of method 1 is greater than powers of method 2 in all the cases when type I error rates are close to its nominal level. Thus, under normality, when set sizes are small and cycle sizes are moderate, method 1 is preferable than method 2. As expected, as μ^* increases, the powers of the test increase for method 1 and method 2.

The type I error rates and powers of the test under the uniform distribution were shown in Table 5. As it is evident in this table, type I error rates and powers of the test results are quite similar to those of standard normal distribution in Table 4. However, the type I error rates of method 1 is getting closer its nominal level faster than those of the standard normal distribution. For example; when $m=2$, type I error rates of method 1 is close to its nominal level even in small cycle sizes ($r=4$). The remaining results are similar to the standard normal distribution.

The type I error rates and powers of the test under the exponential distribution were shown in Table 6.

Based on the results presented in this table, type I error rates of method 1 are similar to those of the standard normal distribution. However, type I error rates of the test under the exponential distribution are getting slower to its nominal level than those of the standard normal distribution. For example, type I error rates of the test under standard normal distribution is close to its nominal level when $m=4$ or 5 and $r=10$. However, type I error rates of the test under exponential distribution never gets close to its nominal level when $m>3$.

The type I error rates and powers of test under the gamma distribution were pointed out in Table 7. As seen from this table, type I error rates of method 1 is getting close to its nominal level faster than the exponential distribution. However, the difference between type I error rates and its nominal level under gamma distribution is not as small as those of under uniform distribution.

Generally, for all the distributions, the powers of method 1 is greater than the power of method 2 when type I error rates are close to its nominal level.

4. Discussion and Conclusion

In this study, the hypothesis testing was examined for the population mean under ranked set sampling using different bootstrap resample selection methods. A simulation study was performed under some symmetric and non-symmetric distributions. In the light of the simulation study, type I error rates of method 2 are close to its nominal level in all of the considered cases and distributions. Unlike the previous method, method 3 is far from its nominal level in all the cases and distributions. However, type 1 error rates of method 1 are close to its nominal level when set sizes are small and cycle sizes are large. Moreover, in these cases, the powers of method 1 are greater than those of method 2. Further study could be carried out on the hypothesis testing for the difference of two population means under RSS using bootstrap resample selection methods.

References

- [1] McIntyre, G. A. 1952. A method of unbiased selective sampling using ranked sets. Australian Journal of Agricultural Research, vol. 3: 385-390.
- [2] Takahasi, K. and Wakimoto, K. 1968. On Unbiased estimates of the population mean based on the sample stratified by means of ordering. Annals of The Institute of Statistical Mathematics, 2: 249-255.
- [3] Dell, D. R. and Clutter, J. L. 1972. Ranked set sampling theory with order statistics background. Biometrics, vol. 28: 545-555.
- [4] Shen, W. H. 1994. On estimation of a log-normal mean using a ranked set sample. Sankhya, 54(B): 323-333.
- [5] Bhoj, D. S. and Ahsanullah, M. 1996. Estimation of parameters of the generalized geometric distribution using ranked set sampling. Biometrics, 52: 685-694.
- [6] Abu-Dayyeh, W., Assrhani, A. and Ibrahim, K. 2011. Estimation of the shape and scale parameters of Pareto distribution using ranked set sampling. Statistical Papers, 54(1): 1-19.

- [7] Albatineh, A. N., Kibria, B. M. G., Wilcox, M. L. and Zogheib, B. 2014. Confidence interval estimation for the population coefficient of variation using ranked set sampling: a simulation study. *Journal of Applied Statistics*, 41: 733-751.
- [8] Öztürk, Ö. 2015. Estimation of a finite population mean and total using population ranks of sample units. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics*, 21(1): 181-202.
- [9] Öztürk, Ö. and Demirel, N. 2016. Estimation of population variance from multiranker ranked set sampling designs. *Communications in Statistics - Simulation and Computation*, 45(10): 3568-3583.
- [10] Muttlak, H. A. and Abu-Dayyeh, W. 1998. Testing some hypotheses about the normal distribution using ranked set samples: a more powerful test. *Journal of Information & Optimization Sciences*, 19(1): 1-11.
- [11] Özdemir, Y. A. and Gökpinar, F. 2006. Hypothesis testing for the population mean using unbiased ranked set sampling designs. *International Journal of Pure and Applied Mathematics*, 31: 501-513.
- [12] Özdemir, Y. A., Ebegil, M. and Gökpinar, F. 2016. A test statistic based on ranked set sampling for two normal means. *Journal Communications in Statistics - Simulation and Computation*, 46(10): 8077-8085.
- [13] Efron, B. 1979. Bootstrap methods: Another look at Jackknife. *Institute Of Mathematical Statistics*, 7: 1-26.
- [14] Hui, T. P., Modarres, R. and Zheng, G. 2005. Bootstrap confidence interval estimation of mean via ranked set sampling linear regression. *Journal of the Statistical Computation and Simulation*. vol. 75 Issue: 7 Pages:543-553.
- [15] Modarres, R., Hui, T.P. and Zheng, G. 2006. Resampling methods for ranked set samples. *Computational Statistics and Data Analysis*, 51: 1039-1050.
- [16] MacEachern, S. N., Öztürk, Ö., Wolfe, D.A. and Stark, G. V. 2002. A new ranked set sample estimator of variance. *Journal of the Royal Statistical Society Statistical Methodology. Series B*. vol.64 Issue:2 Pages: 177-188.

Appendices

Appendix A. Tables 4-7

Table 4: Type I error rates and powers of the test under standard normal (0,1) distribution

	Method	$\mu^* = 0$			$\mu^* = 0.1$			$\mu^* = 0.2$			$\mu^* = 0.3$			$\mu^* = 0.4$		
		Method			Method			Method			Method			Method		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
m=2	r=2	0.1330	0.0525	0.1550	*	0.0910	*	*	0.1405	*	*	0.1870	*	*	0.2160	*
	r=4	0.0800	0.0570	0.0980	*	0.0970	*	*	0.1520	*	*	0.2195	*	*	0.3415	*
	r=6	0.0595	0.0490	0.0775	0.1255	0.1045	*	0.2305	0.1955	*	0.3600	0.3140	*	0.5000	0.4450	*
	r=8	0.0590	0.0505	0.0790	0.1255	0.1110	*	0.2665	0.2345	*	0.4185	0.3830	*	0.5975	0.5530	*
	r=10	0.0530	0.0490	0.0740	0.1565	0.1440	*	0.3020	0.2730	*	0.5125	0.4800	*	0.6870	0.6610	*
m=3	r=2	0.1310	0.0465	0.1665	*	0.1035	*	*	0.1545	*	*	0.2460	*	*	0.3350	*
	r=4	0.0815	0.0560	0.1105	*	0.1240	*	*	0.2305	*	*	0.3675	*	*	0.5740	*
	r=6	0.0710	0.0560	0.0975	*	0.1390	*	*	0.2940	*	*	0.5155	*	*	0.7360	*
	r=8	0.0580	0.0510	0.0985	0.1880	0.1515	*	0.4295	0.3780	*	0.6565	0.6215	*	0.8470	0.8215	*
	r=10	0.0555	0.0435	0.0900	0.2075	0.1820	*	0.4585	0.4345	*	0.7310	0.7040	*	0.9095	0.8945	*
m=4	r=2	0.1325	0.0430	0.1600	*	0.1100	*	*	0.0905	*	*	0.3280	*	*	0.1825	*
	r=4	0.0845	0.0530	0.1275	*	0.1655	*	*	0.1455	*	*	0.5330	*	*	0.3315	*
	r=6	0.0705	0.0515	0.1105	*	0.1680	*	*	0.1970	*	*	0.6880	*	*	0.4750	*
	r=8	0.0700	0.0495	0.1080	*	0.2035	*	*	0.2120	*	*	0.8045	*	*	0.5840	*
	r=10	0.0540	0.0475	0.0905	0.2880	0.2595	*	0.2780	0.2470	*	0.8930	0.8765	*	0.6485	0.6155	*
m=5	r=2	0.1275	0.0495	0.1725	*	0.1265	*	*	0.2620	*	*	0.4545	*	*	0.6230	*
	r=4	0.0890	0.0540	0.1350	*	0.1770	*	*	0.4385	*	*	0.7025	*	*	0.8840	*
	r=6	0.0690	0.0500	0.1180	*	0.2405	*	*	0.5535	*	*	0.8355	*	*	0.9715	*
	r=8	0.0725	0.0545	0.1215	*	0.2660	*	*	0.6580	*	*	0.9155	*	*	0.9925	*
	r=10	0.0550	0.0435	0.1065	0.3480	0.3170	*	0.7745	0.7435	*	0.9690	0.9610	*	0.9970	0.9965	*
m=6	r=2	0.1325	0.0500	0.1810	*	0.1520	*	*	0.3280	*	*	0.5470	*	*	0.7265	*
	r=4	0.0780	0.0470	0.1395	*	0.2015	*	*	0.5330	*	*	0.8115	*	*	0.9505	*
	r=6	0.0790	0.0555	0.1375	*	0.2665	*	*	0.6750	*	*	0.9280	*	*	0.9925	*
	r=8	0.0605	0.0480	0.1140	*	0.3360	*	*	0.7730	*	*	0.9735	*	*	0.9990	*
	r=10	0.0665	0.0550	0.1265	*	0.4065	*	*	0.8550	*	*	0.9935	*	*	1	*

Table 5: Type I error rates and powers of the test under uniform (0,1) distribution

	Method	$\mu^* = 0$			$\mu^* = 0.1$			$\mu^* = 0.13$			$\mu^* = 0.16$			$\mu^* = 0.2$		
		Method			Method			Method			Method			Method		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
m=2	r=2	0.0995	0.0555	0.1180	*	0.0810	*	*	0.1070	*	*	0.1105	*	*	0.1385	*
	r=4	0.0525	0.0335	0.0620	0.1350	0.0735	*	0.1685	0.1150	*	0.2155	0.1315	*	0.2855	0.1775	*
	r=6	0.0500	0.0340	0.0675	0.1720	0.1200	*	0.2275	0.1650	*	0.3030	0.2350	*	0.4130	0.3225	*
	r=8	0.0450	0.0345	0.0605	0.2005	0.1625	*	0.2770	0.2360	*	0.3710	0.3150	*	0.5070	0.4515	*
	r=10	0.0500	0.0380	0.0690	0.2435	0.2080	*	0.3340	0.2940	*	0.4415	0.4045	*	0.5855	0.5485	*
m=3	r=2	0.1205	0.0340	0.1405	*	0.0750	*	*	0.1140	*	*	0.1375	*	*	0.1660	*
	r=4	0.0595	0.0335	0.0970	*	0.1595	*	*	0.2220	*	*	0.2975	*	*	0.4565	*
	r=6	0.0565	0.0380	0.0900	0.2915	0.2195	*	0.4190	0.3385	*	0.5360	0.4770	*	0.6933	0.6270	*
	r=8	0.0525	0.0365	0.0910	0.3480	0.2965	*	0.4715	0.4190	*	0.6305	0.5755	*	0.7913	0.7610	*
	r=10	0.0565	0.0405	0.0975	0.4030	0.3630	*	0.5530	0.5135	*	0.7110	0.6835	*	0.8610	0.8385	*
m=4	r=2	0.1410	0.0285	0.1835	*	0.1200	*	*	0.1470	*	*	0.2290	*	*	0.3430	*
	r=4	0.0585	0.0320	0.1025	*	0.2440	*	*	0.3560	*	*	0.4915	*	*	0.6825	*
	r=6	0.0575	0.0415	0.1115	0.4035	0.3380	*	0.5665	0.4965	*	0.7240	0.6695	*	0.8705	0.8330	*
	r=8	0.0575	0.0435	0.1115	0.4880	0.4180	*	0.6705	0.6245	*	0.8125	0.7815	*	0.9390	0.9235	*
	r=10	0.0515	0.0416	0.1045	0.5480	0.5120	*	0.7495	0.7210	*	0.8760	0.8500	*	0.9705	0.9680	*
m=5	r=2	0.1440	0.0340	0.1995	*	0.1720	*	*	0.2525	*	*	0.5140	*	*	0.5140	*
	r=4	0.0545	0.0445	0.1475	*	0.3365	*	*	0.5055	*	*	0.8270	*	*	0.8270	*
	r=6	0.0585	0.0430	0.1285	*	0.4630	*	*	0.6570	*	*	0.9525	*	*	0.9525	*
	r=8	0.0590	0.0435	0.1300	*	0.5795	*	*	0.7670	*	*	0.9880	*	*	0.9880	*
	r=10	0.0540	0.0460	0.1170	0.7190	0.6885	*	0.8975	0.8740	*	0.9925	0.9925	*	0.9925	0.9925	*
m=6	r=2	0.1375	0.0385	0.2000	*	0.2410	*	*	0.3485	*	*	0.7870	*	*	0.6685	*
	r=4	0.0875	0.0410	0.1545	*	0.4545	*	*	0.6360	*	*	0.7945	*	*	0.9340	*
	r=6	0.0600	0.0450	0.1435	*	0.5950	*	*	0.7970	*	*	0.9200	*	*	0.9885	*
	r=8	0.0610	0.0390	0.1260	*	0.7090	*	*	0.8975	*	*	0.9725	*	*	0.9985	*
	r=10	0.0535	0.0390	0.1355	0.8340	0.8120	*	0.9510	0.9435	*	0.9950	0.9950	*	1	1	*

Table 6: Type I error rates and powers of the test under exp (1) distribution

		$\mu^* = 0$			$\mu^* = 0.1$			$\mu^* = 0.17$			$\mu^* = 0.23$			$\mu^* = 0.3$		
		Method			Method			Method			Method			Method		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
m=2	r=2	0.1300	0.0260	0.1385	*	0.0355	*	*	0.0545	*	*	0.0770	*	*	0.1150	*
	r=4	0.0710	0.0285	0.0820	*	0.0680	*	*	0.1040	*	*	0.1625	*	*	0.2525	*
	r=6	0.0490	0.0265	0.0630	0.1210	0.0900	*	0.2040	0.1560	*	0.2895	0.2470	*	0.4380	0.3840	*
	r=8	0.0560	0.0360	0.0730	0.1275	0.1045	*	0.2410	0.2075	*	0.3570	0.3220	*	0.5205	0.4855	*
	r=10	0.0550	0.0415	0.0700	0.1510	0.1215	*	0.2665	0.2345	*	0.4015	0.3795	*	0.5905	0.5715	*
m=3	r=2	0.1490	0.0280	0.1720	*	0.0585	*	*	0.0935	*	*	0.1510	*	*	0.2440	*
	r=4	0.0755	0.0355	0.1000	*	0.0950	*	*	0.1820	*	*	0.2940	*	*	0.4570	*
	r=6	0.0720	0.0410	0.0910	*	0.1345	*	*	0.2680	*	*	0.4305	*	*	0.6275	*
	r=8	0.0710	0.0525	0.0940	*	0.1730	*	*	0.3345	*	*	0.5100	*	*	0.7370	*
	r=10	0.0535	0.0405	0.0735	0.2120	0.1860	*	0.4150	0.3785	*	0.6080	0.5930	*	0.8080	0.8055	*
m=4	r=2	0.1340	0.0270	0.1725	*	0.0825	*	*	0.1645	*	*	0.220	*	*	0.3795	*
	r=4	0.0845	0.0395	0.1115	*	0.1295	*	*	0.2705	*	*	0.4375	*	*	0.6435	*
	r=6	0.0700	0.0480	0.1055	*	0.1905	*	*	0.3800	*	*	0.5980	*	*	0.8265	*
	r=8	0.0735	0.0570	0.1060	*	0.2360	*	*	0.4730	*	*	0.6935	*	*	0.8910	*
	r=10	0.0665	0.0485	0.0905	*	0.2395	*	*	0.5220	*	*	0.7720	*	*	0.9435	*
m=5	r=2	0.1375	0.0360	0.1730	*	0.1075	*	*	0.2180	*	*	0.3415	*	*	0.5320	*
	r=4	0.0930	0.0475	0.1280	*	0.1760	*	*	0.3610	*	*	0.5790	*	*	0.8045	*
	r=6	0.0765	0.0425	0.1165	*	0.2380	*	*	0.5010	*	*	0.7335	*	*	0.9295	*
	r=8	0.0665	0.0515	0.0980	*	0.2635	*	*	0.5870	*	*	0.8205	*	*	0.9625	*
	r=10	0.0725	0.0580	0.1120	*	0.3310	*	*	0.6780	*	*	0.8950	*	*	0.9865	*
m=6	r=2	0.1475	0.0395	0.1880	*	0.1355	*	*	0.2800	*	*	0.4255	*	*	0.6595	*
	r=4	0.0900	0.0450	0.1220	*	0.2105	*	*	0.4460	*	*	0.6865	*	*	0.9000	*
	r=6	0.0690	0.0460	0.1045	*	0.2755	*	*	0.5720	*	*	0.8315	*	*	0.9630	*
	r=8	0.0705	0.0550	0.1130	*	0.3355	*	*	0.7045	*	*	0.9055	*	*	0.9900	*
	r=10	0.0690	0.0490	0.1005	*	0.3970	*	*	0.7615	*	*	0.9535	*	*	0.9960	*

Table 7: Type I error rates and powers of the test under gamma (4,1) distribution

		$\mu^* = 0$			$\mu^* = 0.2$			$\mu^* = 0.4$			$\mu^* = 0.6$			$\mu^* = 0.8$		
		Method			Method			Method			Method			Method		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
m=2	r=2	0.1065	0.0345	0.1200	*	0.0685	*	*	0.1125	*	*	0.1495	*	*	0.1985	*
	r=4	0.0695	0.0335	0.0900	*	0.0895	*	*	0.1615	*	*	0.2530	*	*	0.3575	*
	r=6	0.0590	0.0375	0.0735	0.1355	0.0940	*	0.2495	0.2065	*	0.4020	0.3520	*	0.5775	0.5395	*
	r=8	0.0593	0.0420	0.0790	0.1380	0.1195	*	0.2885	0.2540	*	0.4885	0.4500	*	0.6990	0.6700	*
	r=10	0.0595	0.0475	0.0790	0.1465	0.1275	*	0.3135	0.2915	*	0.5490	0.5200	*	0.7580	0.7435	*
m=3	r=2	0.1210	0.0330	0.1480	*	0.0745	*	*	0.1240	*	*	0.2140	*	*	0.3325	*
	r=4	0.0940	0.0530	0.1215	*	0.1110	*	*	0.2410	*	*	0.4445	*	*	0.6480	*
	r=6	0.0670	0.0400	0.0885	*	0.1410	*	*	0.3450	*	*	0.5865	*	*	0.8045	*
	r=8	0.0578	0.0450	0.0980	0.2005	0.1655	*	0.4750	0.4310	*	0.7460	0.7170	*	0.9170	0.9010	*
	r=10	0.0530	0.0425	0.0770	0.2140	0.1860	*	0.4890	0.4545	*	0.7805	0.7590	*	0.9600	0.9545	*
m=4	r=2	0.1375	0.0345	0.1705	*	0.0905	*	*	0.1995	*	*	0.3605	*	*	0.5590	*
	r=4	0.0870	0.0445	0.1220	*	0.1455	*	*	0.3545	*	*	0.6325	*	*	0.8380	*
	r=6	0.0810	0.0555	0.1220	*	0.1970	*	*	0.4705	*	*	0.7810	*	*	0.9525	*
	r=8	0.0590	0.0450	0.1110	0.2630	0.2120	*	0.6260	0.5785	*	0.8940	0.8800	*	0.9905	0.9850	*
	r=10	0.0585	0.0545	0.0955	0.2780	0.2470	*	0.6740	0.6520	*	0.9285	0.9240	*	0.9980	0.9955	*
m=5	r=2	0.1540	0.0450	0.2065	*	0.1095	*	*	0.2860	*	*	0.5105	*	*	0.7155	*
	r=4	0.0795	0.0440	0.1240	*	0.1830	*	*	0.4355	*	*	0.7575	*	*	0.9470	*
	r=6	0.0780	0.0490	0.1185	*	0.2415	*	*	0.6060	*	*	0.8980	*	*	0.9920	*
	r=8	0.0590	0.0385	0.0975	0.3280	0.2825	*	0.7300	0.7010	*	0.9560	0.9535	*	0.9990	0.9985	*
	r=10	0.0597	0.0445	0.1025	0.3640	0.3265	*	0.8180	0.8015	*	0.9840	0.9815	*	1	1	*
m=6	r=2	0.1365	0.0385	0.1790	*	0.1405	*	*	0.3210	*	*	0.6105	*	*	0.8295	*
	r=4	0.0765	0.0445	0.1270	*	0.2030	*	*	0.5600	*	*	0.8800	*	*	0.9860	*
	r=6	0.0690	0.0470	0.1200	*	0.2780	*	*	0.7340	*	*	0.9675	*	*	0.9980	*
	r=8	0.0725	0.0530	0.1170	*	0.3390	*	*	0.8230	*	*	0.9895	*	*	1	*
	r=10	0.0587	0.0480	0.1085	0.4210	0.3985	*	0.9115	0.9005	*	0.9990	0.9985	*	1	1	*

Robotik Uygulamalar İçin Titreşime Dayalı Hareket Eden Amfibik İlerleme Mekanizması

Ahmed Burak TAPAN*¹, Murat REİS²

^{1,2}Bursa Uludağ Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Makine Mühendisliği Bölümü, 16059, Bursa, Türkiye

(Alınış / Received: 26.04.2019, Kabul / Accepted: 17.11.2019, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Anahtar Kelimeler

Amfibik robot,
Titreşim,
İlerleme,
Elastik

Özet: Bu çalışma, robotik uygulamaları için, titreşime dayalı olarak hem karada hem de su üzerinde hareket edebilen, yenilikçi bir ilerleme mekanizmasını tanıtmaktadır. İlerleme mekanizması, su üzerinde batmadan durmasını sağlayan düşük yoğunluklu dikey kanat profiline sahip iki ayaktan ve U şeklinde yay çeliğinden üretilmiş elastik bir çubuktan oluşmaktadır. U şekilli çubuğun ortasına yerleştirilen basit bir sarkaç vasıtası ile sistem titreşime zorlanarak ilerleme gerçekleştirilmektedir. Su içerisinde dikey konumlandırılmış ayaklar salınım yaptıkça ön ve arka yüzeyler arasında oluşan basınç farkı ile robot ileri yönde hareket etmektedir. Karadaki hareketi ise elastik kirişin doğal titreşim modlarına bağlı olarak gerçekleşmektedir. Çalışmada farklı titreşim frekanslarının ilerleme hızına ve yer değiştirme maliyetine etkisi deneyler ile incelenmiş ve sonuçlar yorumlanmıştır. Buna ek olarak ön modelin yer değiştirme maliyeti (CoT) literatürdeki bazı robotlar ve canlılar ile karşılaştırılmıştır.

Vibration Based Amphibious Locomotion Mechanism for Robotic Applications

Keywords

Amphibious robot,
Vibration,
Locomotion,
Elastic

Abstract: This work presents an innovative locomotion mechanism both on land and water surface based on vibration, for robotic applications. The locomotion mechanism consists of two legs with a low-density vertical wing profile that allows them to stand on water and a U-shaped elastic beam made of spring steel. The locomotion is generated by forcing the system to vibrate by means of a simple pendulum placed in the middle of the U-shaped bar. As the vertically positioned feet in the water oscillate, the robot moves in the forward direction with the pressure difference between the front and rear surfaces. The movement on the land is realized depending on the natural vibration modes of the elastic beam. In this work, the effect of different vibration frequencies on the locomotion velocity and the Cost of Transport (CoT) were investigated experimentally and the results were interpreted and discussed. In addition to these, the Cost of Transport of the preliminary model was compared with that of some robots and creatures in the literature.

1. Giriş

Tekerleğin icadı ile insanoğlu yeryüzündeki kara parçaları üzerinde ilerlemenin en verimli yolunu bulmuştur. Ancak, tekerlekli araçların ulaşamadığı farklı ortamlarda ilerleme ihtiyacı, bilim insanlarını canlıları taklit eden ilerleme mekanizmaları geliştirmeye zorlamaktadır. Zira dünya yüzeyinin çok küçük bir bölümü tekerlekli araçların ulaşımına uygun iken, bacak fizyolojisine bağlı olarak canlılar dünya yüzeyinin neredeyse tamamına ulaşabilmektedir. Günümüzde robotlar canlıları taklit eden yürüme, koşma, sıçrama ve yüzme gibi farklı yer değiştirme hareketlerini yapabilmektedirler. Ancak günümüz robotları bu yer değiştirme hareketlerini

yüksek enerji tüketerek gerçekleştirebilirken, canlılar çok daha az kontrol girdisi ve enerji kullanarak daha karmaşık fakat kararlı yer değiştirme hareketleri yapabilmektedir. Bu nedenle, düşük enerji tüketim değerlerine sahip robotlar geliştirmek için hayvan hareketinin prensiplerini anlamak oldukça önemlidir. Bu konuda yapılan çalışmalar, özellikle hayvanların yürüyüş biçimlerine bağlı olarak yer değiştirme esnasında tükettikleri enerjiye odaklanmıştır [1-5]. Robotların ilerleme hareketleri üzerine yapılan çalışmalar esas olarak hayvanların hareketlerinin detaylı bir şekilde incelenmesi ve bu hareketlerin fiziksel modellerinin ortaya konulması şeklinde olmuştur [6]. Farklı ilerleme modelleri ve bu

*İlgili yazar: ahmedburaktapan@gmail.com

modellere ait robot örnekleri Calisti ve arkadaşları tarafından ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir [7]. Pasif dinamik yürüme veya koşma hareketi yapabilen robotlar, diğerlerine göre daha az kontrol girdisine ihtiyaç duyarlar ve daha az enerji tüketimi ile hareketlerini gerçekleştirirler. Bu tür robotlar, herhangi bir hareket sağlayıcı motor veya kontrol birimi olmaksızın daha doğal yürüme yapabildikleri için insan ve hayvanların ilerlemeleri için kullanışlı bir model olarak gösterilebilirler [8-10]. Zıplayarak koşma hareketi hayvanlar tarafından özellikle yüksek hızlarda oldukça sık kullanılır. Hayvanlar ayrıca hareket kabiliyetlerini arttırabilmek için vücut uzuvlarının sertliğini ve şeklini değiştirmektedirler. Zıplayan robotlar üzerine yapılan çalışmalarda, özellikle ilerleme hareketi esnasında sertlik ve şekil değiştirme yetenekleri üzerine araştırmalar yapılmıştır [11]. Zıplayan robotlar ile ilgili ilk araştırmalar 1980 'lerde MIT Bacak Laboratuvarı'nda (Leg Laboratory) yapılmıştır [12]. Bu çalışmalar sonucunda iki ve üç boyutlu hareketler yapabilen robot mekanizmaları geliştirilmiş, ancak bu mekanizmalar karmaşık yapıları ve aşırı enerji tüketim değerleri nedeniyle kendilerine kullanım alanı bulamamıştır. Buna karşın, uygun şekilde tasarlanmış elastik uzuvlu mekanizmalar, doğal titreşim davranışları manipüle edilerek daha düşük yer değiştirme maliyetine sahip bacaklı robotların geliştirilmesine imkân sağlamaktadır [13-14].

Robotlarda elastik uzuv kullanımı enerji verimliliği beraberinde bir dizi kontrol güçlüğü problemi getirmektedir. Bu güçlük elastik uzuvların doğal frekansı ile robotun periyodik ilerleme hareketinin frekansları örtüştürülerek giderilebilmektedir. Reis ve arkadaşları doğal titreşim modlarını kontrol girdisi olarak kullanarak yürüme, koşma, sürünme, zıplama hareketlerinin her birini gerçekleştirebilen ve oldukça düşük enerji tüketimine sahip elastik bir ilerleme mekanizması geliştirilmiştir [15-17]. Son yıllarda elastik uzuvlu pek çok robotik sistem geliştirilmiştir. Örneğin Bhatti ve arkadaşları tek ayaklı bir hidrolik robot için sıçrama yüksekliği, adım uzunluğu ve dolayısı ile uçuş süresini değiştirebilecek basit ama etkili bir kontrol ünitesi geliştirmiştir [18].

Mikro boyutlarda hem karada ve hem de suda ilerleyebilme özelliğine sahip robotlar oldukça popüler bir araştırma alanı olarak ortaya çıkmıştır. Amfibik özelliğe sahip ve hacimleri birkaç santimetre küp civarında olan bu robotlar daha çok çevre ve tıp alanlarında uygulama potansiyeline sahiptir. Bu robotlar suyun kaldırma kuvvetinin yanında yüzey gerilimini kullanarak ta su yüzeyinde hareket edebilmektedir. Tahrik sistemi piezo-elektrik malzeme kullanılarak yapılan amfibik mikro robotlar, piezo-mikro robotlar olarak isimlendirilmektedir [19]. Tahrik sisteminin oluşturduğu titreşim ile, düz sert zeminlerde ve su yüzeyinde ilerleyebilen piezo-mikro robotlar, yüksek enerji verimine sahiptirler. Piezo-elektrik sistemde elektrik enerjisinin yaklaşık %90' ı mekanik enerjiye dönüştürülebilmektedir [20]. Yakın

zamanda, karada ve su üzerinde yürüyebilen ve bu yüzeyler arasındaki geçişi sağlayabilen dört ayaklı piezo-amfibik mikro robotlar geliştirilmiştir [21]. Bu amfibik mikro robotlar, ileriye doğru yüzmek ve dönebilmek için ayaklarının üzerine yerleştirilmiş pasif kanatları kullanmaktadır. Bu robotların diğer bir özelliği, ayaklarında bulunan elektro ıslanma sistemi vasıtasıyla su üzerinde iken kontrollü bir dalış yaparak suyun altında inebilmeleri ve suyun içerisinde de ilerleyebilmeleridir. Ancak mikro-robotlar hafif olmaları nedeni ile oldukça sınırlı uygulama alanına sahiptirler. Bu çalışmalara paralel olarak, esas amacı mikro robotları görev alanına taşımak olan, yük taşıma kapasitesine sahip, daha büyük küresel amfibik robotlar da geliştirilmiştir [22]. Bu robotlar, iki çeyrek küresel kabuk ve plastik bir dairesel plakadan oluşan yarım küre biçimindeki amfibik robotlardır. Güncel çalışmalarda bu yapının hız performansını eğimli ve nispeten pürüzsüz yüzeylerde arttırmak amacı ile küresel robotun her ayağına pasif bir tekerlek takılarak paten-kayma hareketi yapması sağlanmıştır [23]. Son olarak bir su jeti eklenerek su altında ileriye itilmesi ve yönlendirilmesi sağlanan bu karma yapı, bir hibrit amfibik küresel robot halini almıştır [24].

Son zamanlarda dikkatleri üzerine çeken amfibik robotlar; altı bacaklı bir amfibik robot olan AmphiHex-II [25] ve bir vatoz gibi silikon yüzgeçlerini kullanarak hareket edebilen Velox' dur [26]. AmphiHex-II, farklı ortamlara adaptasyon sağlayabilmek için tasarlanmış ayarlanabilir ayak sertlikleri ile yüksek ilerleme performansına sahiptir. Velox ise, esnek yapıdaki dalgalı tahrik sistemi ile buzlu ya da karlı zeminde bile rahatlıkla ilerleyebilmekte ve aynı zamanda yüzgeçleri sayesinde etkin bir yüzme performansı göstermektedir.

Amfibik robotların birçoğunun hareket ve ilerleme mekanizmaları, canlıların hareketlerinden ilham alınarak geliştirilmiştir. Amfibik hayvanların sinir sistemleri incelenmiş ve sinir sistemleri merkezi model jeneratörü ile taklit edilmiştir. Bu şekilde yürüme, solunum ve yüzme gibi hareket modellerini kontrol edebilen bir robot hareket kontrol sistemi geliştirilmiş ve çok ayaklı bir amfibik robota uygulanmıştır [27]. Bunun yanında, amfibik kaplumbağalardan ilham alınarak, amfibik küresel bir robot geliştirilmiş [28] ve bu robot yapısı üzerine yukarıda belirtilen geliştirmeler [22-24] yapılarak, robotun hareket ve ilerleme performansı arttırılmıştır. Suyun üzerinde koşabilme yeteneği ile tanınan basilisk kertenkelesinden ilham alınarak tasarlanan, altı pedallı amfibik robot [29], suda yürüyebilen ve yüzebilen bir tür kuyruklu kurbağa cinsi semenderden ilham alınarak tasarlanan, dört bacaklı Salamandra robotu [30] ve son olarak, hamamböceğinden ilham alınarak tasarlanan, karma ilerleme mekanizmasına sahip altı bacaklı amfibik robot (AmphiHex-I) [31] doğayı taklit eden robot örneklerinin en bilinenleridir.

Bu çalışmada, basit bir sarkaç tarafından titreşime zorlanan elastik bir mekanizmanın karadaki ve su üzerindeki ilerleme hareketi incelenmektedir. İlerlemeye etki eden tasarım değişkenlerini ve etkilerini belirlemek için kara ve su için iki farklı fiziksel model geliştirilmiştir. Karasal ilerleme modelinde, robotun omurga ile bacakları birbirlerine elastik dönme yayları ile bağlı olup, bacaklardaki boylamasına titreşimler doğrusal yaylar ile modellenmiştir. Mekanizmanın yaylı kütlesi, üç adet noktasal kütleyle indirgenmiştir. Gövdenin merkezine yerleştirilen sarkacın salınım frekansı, bu yayların doğal frekanslarına ayarlandığında robotun çok düşük enerji tüketim değeri ile oldukça kararlı bir ilerleme hareketi ortaya koyduğu görülmüştür. Bu mekanizmanın kendi kendisini organize ederek gerçekleştirdiği ilerleme, herhangi bir merkezi otoriteye, algısal geri bildirim veya planlanmış bir harekete neden olan harici bir elemana ihtiyaç duymamaktadır [16].

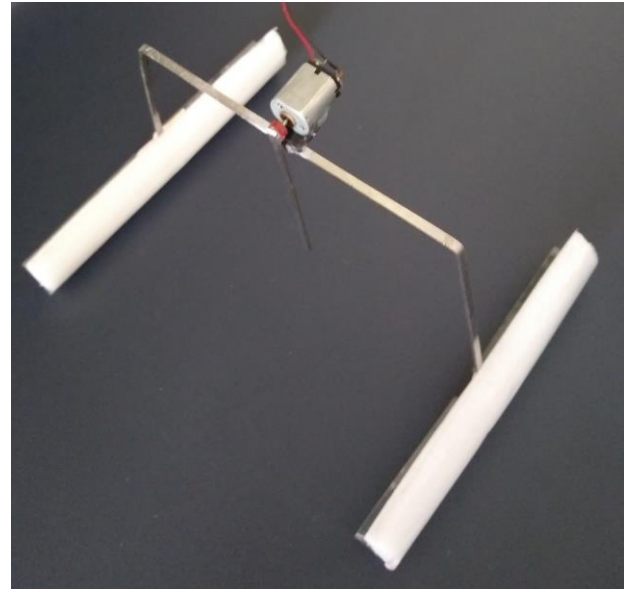
Sucul ilerleme modelinde ise, robot su üzerinde rijit bir cisim gibi davranmakta ve kayda değer bir şekil değişimi ve dönme hareketi yapmamaktadır. Bu sayede robot gövdesinin tamamı bir noktasal kütle, sarkaç ise bu kütle etrafında salınım yapan ikinci bir noktasal kütle olarak modellenebilmektedir. Omurganın merkezine yerleştirilmiş sarkaç harekete geçirildiğinde, robot gövdesi ile birlikte kanat şeklindeki ayaklar su içerisinde dikey yönde salınım hareketi yapmaktadır. Bu hareket nedeniyle ön ve arka yüzeyler arasında oluşan basınç farkı ve sarkacın oluşturduğu merkezkaç kuvvetinin etkisiyle elastik mekanizma su üzerinde planlanan yönde ilerleme hareketi yapabilmektedir. Bu sayede aynı mekanizmanın hem karada hem de su üzerinde ilerleyebilmesi sağlanarak, robotik uygulamalar için bacaklı amfibik bir ilerleme mekanizması geliştirilmiştir. Mekanizma katı yüzeylerde elastik gövdenin farklı rezonans modları tahrik edilerek yürüme, koşma, zıplama ve sürünme benzeri karasal ilerleme hareketleri yapabilirken, geliştirilen ayak yapısı sayesinde su üzerinde de ilerleyebilmektedir.

Çalışmanın ilk bölümünde mekanizmanın genel tanıtımı, karasal ve sucul ilerleme modelleri, tasarım parametreleri ile mekanizmanın karasal ilerlemesinde etkili olan rezonans frekansları ve sucul hareketi idare eden denklemler verilmektedir. Sonrasında deney sonuçları verilmekte ve bu sonuçların değerlendirilmesi yapılmaktadır. Sonuç bölümünde genel değerlendirmeler ve mevcut çalışmanın sonuçlarından yola çıkarak gelecekte yapılabilecek çalışmalardan bahsedilmektedir.

2. Materyal ve Metot

Amfibik ilerleme mekanizmasının temel ilerleme dinamiklerini karakterize edebilmek için karasal ve sucul ilerleme hareketleri için basitleştirilmiş iki farklı fiziksel model geliştirilmiştir. Bu sayede elastik mekanizmanın karada ve sudaki dinamik davranışına

etki eden temel tasarım değişkenleri ve etkileri anlaşılabilir. Mekanizma, basit bir mikro DC motor, batmaya karşı poliüretan köpükten yapılmış kanat şeklindeki iki duba ayak ve U şekli verilerek bükülmüş elastik bir çubuktan oluşmaktadır. Yay çeliğinden üretilmiş, et kalınlığı $a = 0.8$ mm ve genişliği $b = 2$ mm lama kesite sahip E elastisite modülü 200 GPa olan elastik çubuk, robotun bacaklarını ve omurgasını oluşturmaktadır. Omurganın merkezine monte edilmiş mikro DC motora küçük bir sarkaç bağlanmıştır. Sarkaç, robotun tahrik sistemi olup, sarkacı tahrik eden mikro motor, 1/90 çevrim oranına sahip plastik bir dişli kutusuna sahiptir. Robotun karada ve su yüzeyinde hareketini sağlayabilmek için çok düşük yoğunluklu malzemeden üretilmiş iki ayak tarafından desteklenmektedir. Yarım elips kesitine sahip poliüretan ayaklar %50 oranında suya batmak suretiyle robotun 11 gr'lık toplam M kütlesini statik olarak taşımaktadır. Deneyler için geliştirilen amfibik ilerleme mekanizmasının fotoğrafı Şekil 1' de, boyutları ve kütleler Tablo 1' de verilmektedir.



Şekil 1. Amfibik ilerleme mekanizmasının fotoğrafı

Tablo 1. Robot ön modelinin boyutları

Değişken	Boyut
m_{motor}	3 gr
m_f, m_h	0,4 gr - 0,4 gr
m_R	0,7 gr
M	11 gr
L_v	75 mm
L_h	85 mm
R	25 mm
E	200 GPa
r_1	10 mm
r_2	7 mm
l_p	90 mm
a	0.8 mm
b	2 mm

2.1. Karasal ilerleme modeli

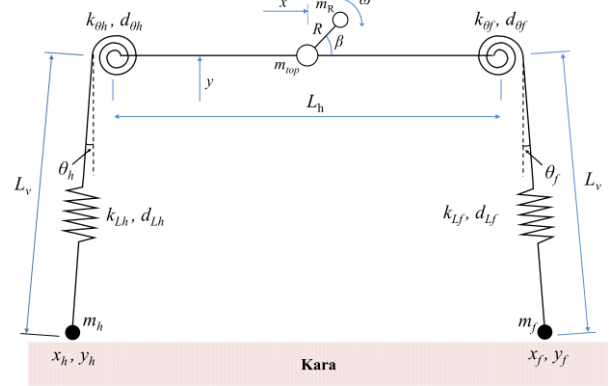
Amfibik mekanizmanın karada ilerlemesinin sistematik bir analizini yapabilmek ve karasal hareket için fiziksel bir model oluşturabilmek için şu varsayımlar yapılmıştır [16];

- Robotun davranışı sagittal düzlemde analiz edilebilir ve ayakların her birinin zemin ile teması bir noktasal temas olarak değerlendirilebilir.
- Robotun omurgası ve bacakları birbirlerine elastik dönme yayları ve sönümleyiciler ile bağlı elemanlar olarak kabul edilebilir.
- Bacaklardaki boylamasına titreşim doğrusal yay ve sönümleyiciler ile modellenilebilir.
- Omurga ve DC motorun kütleleri omurganın merkezinde birleşik bir nokta kütle olarak alınabilir.
- Bacakların kütleleri ihmal edilebilir ve ayakların her biri birer noktasal kütle olarak alınabilir.
- Titreşimi esnasında robotun gövde yapısında kalıcı şekil değişimlerinin olmadığı kabul edilmektedir.

Bu varsayımlara dayanarak, karasal ilerleme hareketi için oluşturulan basitleştirilmiş fiziksel model, Şekil 2' de gösterilmektedir. Karasal model, yay-sönümleyici elemanlar ile birbirine bağlı üç farklı yapıdan oluşmaktadır. Bu elemanların yayılı kütleleri Şekil 2' de gösterildiği gibi noktasal kütlelere indirgenmiştir. Bu noktasal kütlelerden ilki eyleyici ve omurga kütlelerini temsil eder ve omurganın merkezinde yer almaktadır (m_{top}). Diğer iki kütle ise ön ve arka ayak kütlelerini temsil eden m_f ve m_h ' dir. Omurganın uzunluğu L_h ile, ön ve arka bacakların uzunlukları L_v ile ve bacak ile omurgaya dik olan çizgi arasındaki açılar θ_f ve θ_h ile ifade edilmektedir. Elastik çubuğun herhangi bir sıkışma veya uzama etkisinde kalmadığı durumda, simetrik haldeki robotun bacaklarının doğal uzunlukları ile açılar L_0 ve θ_0 ile gösterilir. Omurga ve bacaklar, burulma sertliği k_θ ve sönümleme katsayısı d_θ olan elastik dönme yayları ile bağlanır. Robotun bacakları, sertliği k_L ve sönümleme katsayısı d_L olan doğrusal yaylar olarak modellenmiştir. Omurganın merkezine sabitlenmiş kütlesi m_{motor} ile verilen motor, ucuna m_R kütlesi bağlanmış R uzunluğundaki bir çubuğu ω açısal hızı ile döndürmekte olup, çubuğun omurga ile yaptığı açı β ile verilmektedir. Sonuç olarak, bu basit model 13 mekanik tasarım parametresinden ($k_\theta, d_\theta, k_L, d_L, \theta_0, \theta_{h0}, L_h, L_v, m_f, m_h, m_{top}, R$ ve m_R), bir kontrol parametresinden (ω) ve 16 durum değişkeninden ($x_f, y_f, x_h, y_h, L_v, \theta_f, \theta_h, \beta$ ve bunların zamana göre birinci türevleri) oluşmaktadır. Burada x_f ve y_f ön ayakların yatay ve düşey konumlarını, x_h ve y_h arka ayakların yatay ve düşey konumlarını göstermektedir.

Robotun karasal hareketi rezonans frekanslarına bağlı olarak ortaya çıkan yüksek genlikteki şekil değişimleri ile oluşmaktadır. İki boyutlu bu yapıda, ayakların çarpılması ve boylamasına sıkışıp uzaması şeklinde iki baskın titreşim hareketi ortaya

çıkılmaktadır ve basit fiziksel model bu iki harekete izin verecek şekilde özel olarak seçilmiştir. İlk titreşim modu daha düşük bir salınım frekansında (ω_θ) ortaya çıkmaktadır ve robotun ters sarkaç hareketi sonucu robot yürüme hareketi yapmaktadır. İkinci titreşim modu daha yüksek bir salınım frekansında (ω_L) gerçekleşir ve bacakların boyuna titreşimleri sonucu robot zıplayarak ilerler. Farklı gövde oranları için ara frekans değerlerinde robot sürünerek ve koşarak ilerleme yapabilmektedir [16].



Şekil 2. Basitleştirilmiş karasal ilerleme modeli [16]

Robot ön modelinin ω_θ ve ω_L rezonans frekansları hem deneysel hem de analitik olarak elde edilmiştir. Sarkacın açısal hızı elastik gövdenin doğal frekanslarına ayarlanarak serbest titreşim modları görsel olarak kolayca belirlenebilmektedir. Bu değerler doğrusal ve dönme yaylarının sertlik değerleri ölçülerek te hesaplanabilmektedir. Burada, kullanılan elastik yay çeliğinde sönüm katsayısının çok küçük olduğu, her iki bacağın başlangıç boylarının L_0 , başlangıç açılarının ise sifıra eşit olduğu varsayılmaktadır ($\theta_0 = 0$ (rad)).

Basitleştirilmiş modelde çarpılma (torsiyonel) rezonans frekansı için en basit analitik çözümlerden biri, elastik robotu birbirine dönme yayları ile bağlı paralel çubuk mekanizması olarak kabul edilerek hesaplanabilir ($\theta_f = \theta_h = \theta$ ve $L_v = L$). Bu durumda, U-şeklindeki elastik çubuğun çarpılma rezonans frekansı (ω_θ)

$$\omega_\theta = \sqrt{\frac{2k_\theta - m_{top}g/L}{m_{top}L^2}} \quad (1)$$

ve elastik kirişin boyuna rezonans frekansı (ω_L)

$$\omega_L = \sqrt{\frac{2k_L}{m_{top}}} \quad (2)$$

olarak basitçe ifade edilebilir [16]. Burada k_θ ve k_L sırası ile Şekil 2' de gösterildiği gibi omurga ile bacaklar arasındaki birleşme noktasında çubuğun burulma sertliğini (k_θ) ve bacakların boyuna sertliğini (k_L) temsil etmektedir.

Robotu titreşime zorlayarak ilerlemesini sağlayan tahrik sistemi herhangi bir algısal geri bildirimle sahip olmayan basit bir DC motor ve sarkaçtan ibarettir. Sarkacın açısal hızı, motora uygulanan gerilim ile değiştirilebilir. Dönen kütle için açısal hızının sabit olduğu varsayılarak $F(t)$ merkezci kuvveti, açısal hız ω , dönen kütle m_R ve dönme yarıçapı R cinsinden aşağıdaki gibi ifade edilebilir:

$$F(t) = m_R \omega^2 R \quad (3)$$

Bu ifadeden, robotun titreşiminde açısal hızın yanında dönen kütle ve dönme yarıçapı gibi diğer tasarım parametrelerinin de etkili olduğunu anlaşılmaktadır.

2.2. Sucul ilerleme modeli

Amfibik mekanizmanın su üzerindeki ilerlemesini ifade eden, basit bir fiziksel model kurmak için aşağıdaki kabuller yapılmaktadır;

- Robot su içerisinde rijit bir cisim gibi davranmakta, elastik gövde kayda değer bir şekil değişimi göstermemektedir.
- Robotun su içerisinde dönme hareketi yapmadığı x ve y eksenlerinde ötelenme hareketi yaptığı kabul edilmektedir ki, deneyler bu kabulü doğrulamaktadır. Böylece robot gövdesinin tamamı bir noktasal kütle, sarkaç ise ana gövdeye bağlı ikinci bir noktasal kütleyle indirgenebilmektedir.

Bu varsayımlara dayanarak oluşturulan robotun fiziksel modeli Şekil 3' de gösterilmektedir. Sucul ilerleme modelinde robot rijit cisim olarak ele alınmakta olup, robotun gövdesinin tamamı bir noktasal kütle, m_{top} , sarkaç ikinci bir noktasal kütle m_R olarak temsil edilmektedir. Omurga uzunluğu L_h , rijit bacakların uzunlukları L_v , ayakların uzunlukları L_p , eliptik ayak kesit yüzeyinin dikey ve yatay yarıçapları sırası ile r_1 ve r_2 ile ifade edilmektedir. Ön ve arka ayakların kütleleri m_f ve m_h , hacimleri ise V_f ve V_h ile verilmektedir. Özet olarak, sucul ilerleme modeli 12 mekanik tasarım parametresinden ($L_h, L_v, L_p, r_1, r_2, V_f, V_h, m_f, m_h, m_{top}, R$ ve m_R) oluşmaktadır.

Yukarıda tanımlanan ve Şekil 4'de gösterilen iki noktasal A ve B kütleleri ele alınarak, su üzerinde dönmeden ötelenen robotun ve sarkacın için ivme ifadeleri aşağıdaki gibi elde edilir.

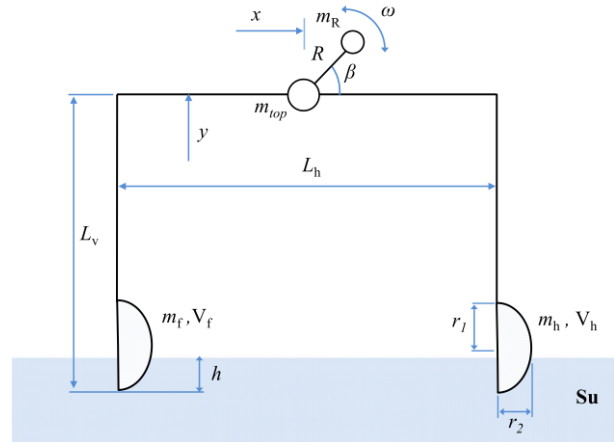
$$a_A = \ddot{x}i + \ddot{y}j \quad (4)$$

$$a_B = [\ddot{x} - R\omega^2 \cos\beta]i + [\ddot{y} - R\omega^2 \sin\beta]j, \quad (5)$$

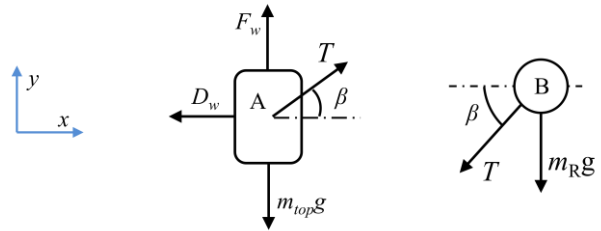
$$\dot{\beta} = \omega, \quad \ddot{\beta} = 0 \quad (6)$$

Şekil 4' de gösterilen iki noktasal kütle için serbest cisim diyagramları yardımı ve 4-6 nolu denklemlerde verilen ivme ifadelerinin kullanılması ile, sucul ilerleme için hareket denklemleri (7-13 nolu denklemler) elde edilmiştir. Bu denklemler bir adet

bağımsız değişken (zaman; t), bir adet kontrol parametresi ($\dot{\beta} = \omega$), altı adet bağımlı değişken (x, y, T, F_w, D_w, β) ve türevlerini ihtiva etmektedir.



Şekil 3. Basitleştirilmiş sucul ilerleme modeli



Şekil 4. Sucul ilerleme modeli için serbest cisim diyagramları

$$D_w + T \cos \beta = m_{top} \ddot{x} \quad (7)$$

$$F_w + T \sin \beta = m_{top} \ddot{y} \quad (8)$$

$$-T \cos \beta = m_R [\ddot{x} - R\omega^2 \cos \beta] \quad (9)$$

$$-T \sin \beta - m_R g = m_R [\ddot{y} - R\omega^2 \sin \beta] \quad (10)$$

$$\beta = \beta_0 + \omega t \quad (11)$$

$$F_w = k \cdot y^n \quad (12)$$

$$D_w = d_f \cdot \frac{|\dot{x}|^m}{2} \cdot \frac{|\dot{x}|}{\dot{x}} \cdot (-1) \cdot \left[\frac{|\dot{x}|}{\dot{x}} + 1 \right] + d_h \cdot \frac{|\dot{x}|^m}{2} \cdot \frac{|\dot{x}|}{\dot{x}} \cdot \left[\frac{|\dot{x}|}{\dot{x}} - 1 \right] \quad (13)$$

Burada, \ddot{x} ve \ddot{y} ivmenin yatay ve dikey bileşenlerini, g yer çekim ivmesini, β_0 sarkacın başlangıçta yer ile yaptığı açısı, T sarkaç kuvvetini, F_w suyun kaldırma kuvvetini, D_w ise suyun direncini ifade etmektedir.

3. Bulgular

Amfibik ilerleme mekanizması, titreşime dayalı hareket eden karasal bir ilerleme mekanizması [15-17] geliştirilerek, su üzerinde de hareketini sağlamak sureti ile elde edilmiştir. Bu amaçla robotun boyutları yeniden belirlenerek, yarı eliptik bir kanat profilli ayaklara sahip bir ön model üretilmiş ve deneylerde kullanılmıştır. Yapılan ölçümler esnasında, sarkacın açısal hızı DC motora uygulanan V gerilimi ile kontrol edilmiş ve aynı zamanda motor tarafından çekilen I

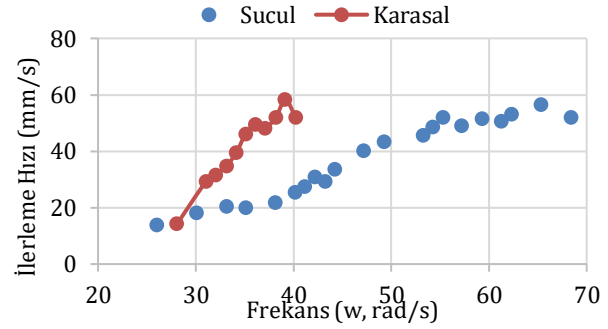
akımı, enerji tüketimini hesaplamak için kaydedilmiştir. Robotun hareketi hem karada hem de su dolu 70x150 cm boyunda bir akvaryum içerisinde hızlı kamera ile kayıt edilmiş ve sarkacın frekansı hızlı kamera kayıtlarından ölçülmüştür. DC motor gerilimi, 1.2 Volt ile 2.1 Volt aralığında 0.1 Volt adımlarla artırılarak ölçümler yapılmıştır.

Şekil 5' de robotun karasal ve sucul ilerleme hızlarının sarkacın açısal hızı ile değişimi görülmektedir. Robot karasal zeminde 38 rad/s ve su üzerinde ise 65 rad/s açısal hız değerinde en yüksek yer değiştirme hızına ulaşmaktadır. Deneysel verilerin alındığı frekans değerleri dışında kalan bölgelerde ise robot kayda değer bir yer değiştirme hareketi yapmamaktadır.

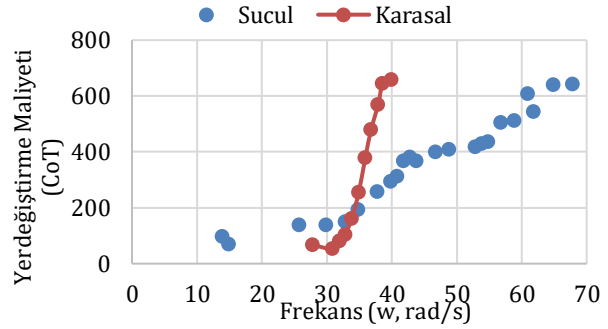
Şekil 6' da robotun karasal ve sucul yer değiştirme maliyetinin (Cost of Transport- CoT) sarkacın açısal hızı ile değişimi görülmektedir. Benzer şekilde robot en düşük yer değiştirme enerjisi değerlerine karasal zeminde 31 rad/s ve su üzerinde ise 16 rad/s açısal hız değerlerinde ulaşmaktadır. Burada, ilerleme hızındaki çok küçük artış ile birlikte, DC motora uygulanan gerilimin de yakın oranlarda artması belli bir aralıkta birim kütle başına enerji tüketimini sabit tutmaktadır.

Şekil 7' de çeşitli mekanizmalar ve biyolojik organizmalar için vücut kütlelerine göre taşıma maliyetinin değişimi gösterilmektedir. Tucker diyagramı [32] olarak bilinen bu grafikte çeşitli canlılar ve makinelerin birim kütle başına yer değiştirme maliyetleri boyutsuz birer sayı ile gösterilmektedir. Tüm değerlerin tek bir eğri üzerinde gösterilebilmesi logaritmik bir eğri kullanımını zorunlu kılmaktadır. Diyagramdaki kırmızı yıldız sembolü çalışmada tanıtılan mekanizmanın karasal zemindeki ilerleme maliyetini, mavi yıldız sembolü ise su üzerindeki ilerleme

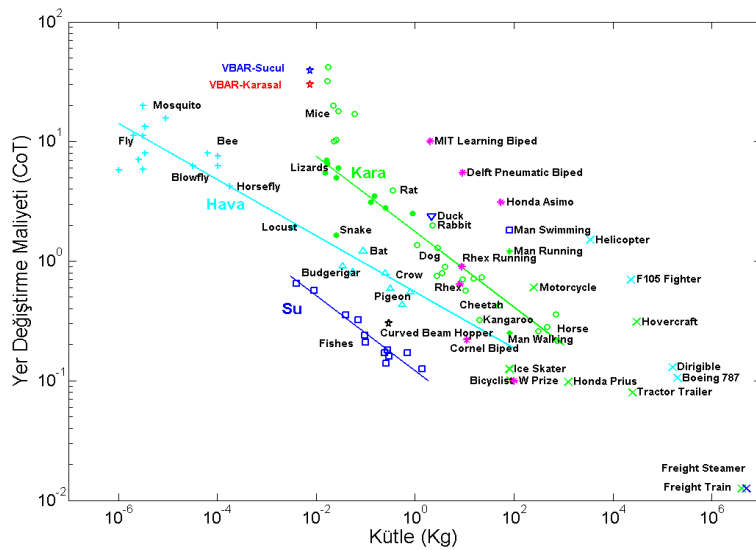
maliyetini göstermektedir. Grafikten anlaşılacağı üzere su canlıları yer değiştirmek için en az enerjiye ihtiyaç duyan türdür. Buna karşılık mevcut ilerleme mekanizmasının enerji tüketim değeri oldukça yüksek gözükmektedir. Ancak eğride dikkat edilmesi gereken bir diğer nokta, canlı organizmalar dâhil olmak üzere, tüm türlerde kütle azaldıkça birim kütle başına yer değiştirme enerjisi ihtiyacının hızla arttığıdır. Mevcut robotun daha büyük kütleli versiyonlarında birim kütle başına yer değiştirme enerjisi ihtiyacı logaritmik olarak azalacak ve literatürdeki robotların seviyesine inecektir.



Şekil 5. Karasal ve sucul ilerleme hızlarının sarkacın açısal hızı ile değişimi



Şekil 6. Karasal ve sucul yer değiştirme maliyetlerinin (CoT) sarkacın açısal hızı ile değişimi



Şekil 7. Çeşitli mekanizmalar ve biyolojik organizmalar için vücut kütlelerine göre taşıma maliyeti (Tucker diyagramı [32]). Mavi ve kırmızı yıldız sembolleri, çalışmada tanıtılan mekanizmanın karasal ve sucul ilerlemeleri için diyagramdaki yerlerini göstermektedir.

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, titreşime zorlanan bir basit bir elastik çubuğun uygun geometri ve ayak yapısı ile bir amfibik ilerleme mekanizması olarak kullanılabilmesi gösterilmiştir. Daha önceki çalışmalarımızda aynı prensipler kullanılarak karada ilerleyen, oldukça düşük enerji tüketimi olan ve farklı salınım frekanslarında farklı ilerleme şekilleri gösteren mekanizmalar tanıtılmıştı. Bacaklı robotlar yüksek enerji tüketim değerleri nedeniyle pratikte çok kullanışlı değildir. Ancak elastik elemanların ve farklı ilerleme yöntemlerinin geliştirilmesi ile birlikte bu tüketim değerleri biyolojik organizmaların seviyesine yaklaşabilmektedir.

Bu çalışmanın sonuçlarından faydalanarak, ilerleyen dönemlerde suda daha hızlı ilerlemeyi sağlayacak bir ayak yapısının geliştirilmesi hedeflenmektedir. Bu sayede yer değiştirme maliyetinin düşürülmesi ve su canlılarının ilerleme maliyetine daha yakın değerlere ulaşılması amaçlanmaktadır. Geliştirilecek ayak yapısı aynı zamanda robotun karadan-suya ve sudan karaya kolaylıkla geçişini sağlayabilecek şekilde olmalıdır. Her ne kadar mevcut ayak yapısı ile bu geçiş sağlanmışsa da mekanizmanın farklı yüzeyler arasındaki geçiş performansını arttırmaya yönelik çalışmalar devam etmektedir. Mevcut ilerleme mekanizması hem karada hem de suda ilerleyebilme yeteneğinin yanı sıra ölçeklenebilirliği sayesinde çok küçük ve çok büyük boyutlarda üretilebilme özelliğine sahiptir. Öyle ki, hidro-statik yüzey gerilmelerinin yardımı ile su yüzeyinde kalabilecek kadar küçük boyutlu robotların üretimi mümkün olmaktadır. Ancak suya batmayan bir robotun titreşim ile ilerlemesi için yine farklı bir ayak yapısının geliştirilmesini gerekmektedir. Bunların yanında, miligram mertebesinde kütleyle sahip bir robotun elektrik enerjisinin iletilmesi de oldukça problemli ve zor bir iştir. Zira, çok ince kablolar kullanılmasına rağmen kablolarda oluşan gerilmeler robotun hareketini etkilemekte ve kısıtlamaktadır. Bu problem ayrıca üzerinde çalışılması gereken konulardan bir tanesi olarak durmaktadır.

Kaynakça

[1] Kar, D.C., Kurien, I.K., Jayarajan, K. 2003. Gaits and energetics in terrestrial legged locomotion. *Mechanism and Machine Theory*, 38, 355-366.

[2] Armour, R., Paskins, K., Bowyer, A., Vincent, J., McGill, W. 2007. Jumping robots: a biomimetic solution to locomotion across rough terrain. *Bioinspiration & Biomimetics*, 2, 565-582.

[3] Zhang, Z., Chen, D., Chen, K., Chen, H. 2016. Analysis and comparison of two jumping leg models for bioinspired locust robot. *Journal of Bionic Engineering*, 13, 558-571.

[4] Hanan, U. B., Weiss, A., Zaitsev, V. 2018. Jumping efficiency of small creatures and its applicability

in robotics. *Procedia Manufacturing*, 21, 243-250.

[5] Kelasidi, E., Jesmani, M., Pettersen, K. Y., Gravdahl, J. T. 2018. Locomotion efficiency optimization of biologically inspired snake robots. *Applied Science*, 8, 1-23.

[6] Alexander, R. N. 2006. *Principles of animal locomotion*. Princeton University Press. Princeton, NJ, 384s

[7] Calisti, M., Picardi, G., Laschi, C. 2017. Fundamentals of soft robot locomotion. *Journal of Royal Society Interface*, 14, 1-16.

[8] McGeer, T. 1990. Passive dynamic walking. *The International Journal of Robotics Research*, 9(2), 62-82.

[9] Collins, S., Ruina, A., Tedrake, R., Wisse, M. 2005. Efficient bipedal robots based on passive dynamic walkers. *Science*, 307, 1082-1085.

[10] Owaki, D., Koyama, M., Yamaguchi, S., Kubo, S., Ishiguro, A. 2010. A two-dimensional passive dynamic running biped with knees. *IEEE International Conference on Robotics and Automation*, Mayıs 3-8, Alaska, 5237-5242.

[11] Kühnel, D.T., Helps, T., Rossiter, J. 2016. Kinematic Analysis of VibroBot: A Soft, Hopping Robot with Stiffness and Shape-Changing Abilities. *Frontiers in Robotics AI*, 3(60), 1-11.

[12] Raibert, M.H. 1986. Legged robots. *Communications of the ACM*, 29, 499-514.

[13] Yu, X., Iida F. 2014. Minimalistic models of an energy-efficient vertical-hopping robot. *IEEE Transactions and Industrial Electronics*, 61(2), 1053-1062

[14] Geyer, H., Blickhan, R., Seyfarth, A. 2005. Spring-mass running: simple approximate solution and application. *Journal of Theoretical Biology*, 232, 315-328.

[15] Reis, M., Iida, F. 2011. Vibration based under-actuated bounding mechanism *IEEE/ASME International Conference on Advanced Intelligent Mechatronics*, 892-897.

[16] Reis, M., Yu, X., Maheshwari, N., Iida, F. 2013. Morphological computation of multi-gaited robot locomotion based on free vibration. *Artificial Life*, 19, 97-114.

[17] Reis, M., Iida, F. 2014. An energy-efficient hopping robot based on free vibration of a curved beam. *IEEE/ASME Trans. Mechatronics*, 19, 300-311.

[18] Bhatti, J., Hale, M., Iravani, P., Plummer, A., Sahinkaya, N. 2017. Adaptive height controller for an agile hopping robot. *Robotics and Autonomous Systems*, 98, 126-134.

[19] Steltz, E., Seeman, M., Avadhanula, S., Fearing, R. S. 2006. Power Electronics Design Choice for

- Piezoelectric Microrobots. IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems, 9-15 Ekim, Pekin, Çin, 1322-1328.
- [20] Becker, F., Zimmermann, K., Volkova, T., Minchenya, V.T. 2013. An Amphibious Vibration-driven Microrobot with a Piezoelectric Actuator: 7. Regular and Chaotic Dynamics, 18(1-2), 63-74.
- [21] Chen, Y., Doshi, N., Goldberg, B., Wang, H., Wood, R.J. 2018. Controllable water surface to underwater transition through electro wetting in a hybrid terrestrial aquatic microrobot. Nature Communications 9(2495), 1-11.
- [22] Li, M., Guo, S., Hirata, H., Ishihara, H. 2015. Design and performance evaluation of an amphibious spherical robot. Robotics and Autonomous Systems, 64, 21-34.
- [23] Li, M., Guo, S., Hirata, H., Ishihara, H. 2017. A roller-skating/walking mode-based amphibious robot. Robotics and Computer-Integrated Manufacturing, 44, 17-29.
- [24] Xing, H., Guo, S., Shi, L., He, Y., Su, S., Chen, Z. Hou, X. 2018. Hybrid Locomotion Evaluation for a Novel Amphibious Spherical Robot. Applied Science, 8(156), 1- 24.
- [25] Zhong, B., Zhang, S., Xu, M., Zhou, Y., Fang, T., Li, W. 2018. On a CPG-Based Hexapod Robot: AmphiHex-II With Variable Stiffness Legs. IEEE/ASME Transactions on Mechatronics, 23(2), 542-551
- [26] Pliant Enerji Sistemleri, 2019. Velox tanıtım sayfası. <https://www.pliantenergy.com/home-1> (Erişim Tarihi: 07.02.2019).
- [27] Matsuo, T., Yokoyama, T., Ueno, D., Ishii, K. 2008. Biomimetic Motion Control System Based on a CPG for an Amphibious Multi-Link Mobile Robot. Journal of Bionic Engineering Suppl., 91-97.
- [28] Shi, L., Guo, S., Mao, S., Yue, C., Li, M., Asaka, K. 2013. Development of an Amphibious Turtle-Inspired Spherical Mother Robot. Journal of Bionic Engineering, 10, 446-455.
- [29] Kim, H.G., Lee, D.G., Liu, Y., Jeong, K., Seo, T.W. Hexapedal Robotic Platform for Amphibious Locomotion on Ground and Water Surface. Journal of Bionic Engineering, 13, 39-47.
- [30] Crespi, A., Karakasiliotis, K., Guignard, A., Ijspeert, A.J. 2013. Salamandra Robotica II: An Amphibious Robot to Study Salamander-Like Swimming and Walking Gaits. IEEE Transactions on Robotics, 29(2), 308-320.
- [31] Zhang, S., Liang, X., Xu, L., Xu, M. 2013. Initial Development of a Novel Amphibious Robot with Transformable Fin-Leg Composite Propulsion Mechanisms. Journal of Bionic Engineering, 10, 434-445.
- [32] Tucker, V.A. 1975. The Energetic Cost of Moving About: Walking and running are extremely inefficient forms of locomotion. Much greater efficiency is achieved by birds, fish and bicyclists. American Scientist, 63(4), 413-419.

Clay-Protein Nanocomposite Based Electrochemical Sensor for the Determination of Ascorbic Acid

Oznur AKBAL¹, Gulcin BOLAT², Serdar ABACI^{1,2*}

¹ Hacettepe University, Advanced Technologies Application and Research Center, 06800, Ankara, Turkey

² Hacettepe University, Department of Chemistry, Faculty of Science, 06800, Ankara, Turkey

(Alınış / Received: 08.05.2019, Kabul / Accepted: 23.12.2019, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Keywords

Ascorbic acid,
Electrochemical sensor,
Montmorillonite-sericin nanocomposite,
Pencil graphite electrodes

Abstract: This paper describes sensitive ascorbic acid (AA) determination on montmorillonite clay and silk protein sericin nanocomposite (MMT-Ser NC) modified pencil graphite electrode (PGE) for the first time. Nanocomposite structures were synthesized by desolvation technique and cross-linked with glutaraldehyde (GA). The synthesized MMT-Ser NC was evaluated by various methods. As a result of the characterization studies, it was determined that the sericin was successfully converged with the montmorillonite structure, and that the MMT-Ser NCs were homogeneous and uniform, with the size of 150 nm and zeta potentials of approximately -27.6 mV. MMT-Ser NC modified electrodes were evaluated by cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and scanning electron microscopy (SEM). Under the optimized conditions, working linear range for the modified sensor was found as 10-1000 µM with square wave voltammetry and the limit of detection (LOD) was found as 8 µM. The relative standard deviation for reproducibility was calculated as % 4.82 (n=6). Real sample analysis was performed with drug samples and the recovery values ranged from 94.64% to 111.2%.

Askorbik Asit Tayini için Kil-Protein Nanokompozit Bazlı Elektrokimyasal Sensör

Anahtar Kelimeler

Askorbik asit,
Elektrokimyasal sensör,
Montmorillonit-serisin nanokompozit,
Kalem grafit elektrot.

Özet: Bu makalede, montmorillonit-serisin nanokompozit (MMT-Ser NC) ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrot (PGE) ile askorbik asit (AA) tayini ilk defa ifade edilmiştir. Nanokompozit yapılar desolvasyon tekniği ile sentezlenmiş ve glutaraldehit (GA) ile çapraz bağlanmıştır. Sentezlenen MMT-Ser NC çeşitli metotlar ile değerlendirilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları sonucunda serisinin montmorillonit yapısı ile başarılı bir şekilde bir araya geldiği, MMT-Ser NC'lerin homojen ve eş dağılımlı olup boyutlarının 150 nm ve zeta potansiyellerinin de yaklaşık olarak -27,6 mV olduğu tespit edilmiştir. MMT-Ser NC ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyleri dönüşümlü voltametri (CV), elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ve taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile karakterize edilmiştir. Modifiye sensörün optimize koşullar altında kare dalga voltametri (SWV) ile doğrusal çalışma aralığı 10-1000 µM ve gözlenebilirlik sınırı (LOD) 8 µM olarak bulunmuştur. Tekrar üretilebilirlik için bağıl standart sapma ise % 4,82 (n=6) olarak hesaplanmıştır. İlaç örneği ile gerçek örnek analizi gerçekleştirilmiş ve geri kazanım değerleri % 94,64 ile % 111,2 aralığında elde edilmiştir.

1. Introduction

Vitamin C, is an essential water-soluble nutritious vitamin which plays indispensable roles in various chemical and biological systems as a powerful antioxidant and free radical scavenger [1]. L-Ascorbic

acid, (AA) represents the biochemically active form of vitamin C, with readily two dissociable protons and physiologically appears as an ascorbate anion [2]. AA performs specific metabolic activities by maintaining natural barrier against oxidative stress due to its reductive characteristics by reacting with free

radicals and reactive oxygen species thus involvement in the defense system, as well as biosynthesis of various enzymes, aminoacids etc. [3,4]. These nutritional and physiologically essential compounds are widely distributed in plant cells and cannot be synthesized in human body, therefore, the best dietary sources of this vitamin are fruits and vegetables from nature and recommended by physicians as tablet forms to support health. [1,5,6]. Deficiency of AA can associate with many diseases in human body such as cardiovascular disease, type II diabetes mellitus, atherosclerosis, stroke, cancer, scurvy [1]. Given the considerable health prominence as an antioxidant, AA analysis is particularly significant in biological matrix especially in serum, blood or urine. AA is also employed for medical purposes in pharmaceutical formulations due to its beneficial antioxidant effects [7]. Moreover, AA is widely used in commercial foodstuff as stabilizers and for prolonging the shelf-life of the products, so, they are well-known indicators for food quality processes [8]. Due to all these critical prominence in both biochemistry and industry, reliable monitoring of AA content in biological media, drugs and foods still presents as attractive research area.

Various techniques have been documented for accurate and specific detection of ascorbic acid which include titrimetry with an oxidizing agent [9], capillary electrophoresis [10], spectrophotometry [11], fluorimetry [12], chromatography [13,14], electrochemistry [2,15] which were commonly focused on the analysis of AA in pharmaceuticals and food products. Amongst, electrochemical techniques have extensively been preferred due to its simplicity with respect to time consuming sample pre-treatments involving techniques, and their low-cost instrumentation, portability, rapid response, high sensitivity and suitability for *in-situ* detection in real samples [2]. Nevertheless, accurate sensing of AA using bare electrodes has been hindered by the high over-potentials required or by the interference reasoned by coexisting biomolecules and the electrode fouling problems by side products. Therefore, it is necessary to minimize these challenges by modification of working electrode surfaces with active materials or implying various composites [16]. Up to now various modifications based on polymers, nanomaterials and their composites have been employed for AA detection [17–27], but there is still a need for new sensitive attempts.

Naturally occurring clay minerals have attracted great attention for the electrode modifications as they offer advantages such as wide availability and low-cost as well as formation of controllable surface structures with high chemical stability, high ion exchange capacity and large surface area. Mousty [28] summarized clearly the electrodes modified with clay for biosensing applications in a review and electrochemical sensors based on the electrodes with

clay minerals modification have extensively been developed at present. Montmorillonite (MMT), is a hydrophilic smectite 2:1 phyllosilicates clay, with unique structural and physicochemical characteristics such as high cation exchange capacity, good sorption and catalytic activity, as well as, intercalation, swelling, porosity, non-toxic properties [29,30]. They can function as matrices for electro-active ions for surface modification applications by easily manipulating the properties by forming stable and high surface area structures on the electrodes.

Sericin is a natural watersoluble protein with molecular mass between 10kDa to 300 kDa, which is derived from silkworm (*Bombyxmori*) [31]. Sericin, as a silk protein, has huge area in biomedical applications due to its superb oxygen permeability, biocompatibility, cell-protective and antioxidant effect, moisture-modulating, anticancer and anticoagulant properties. It is also well known that amine, hydroxyl, carbonyl, aromatic or sulfhydryl of the protein provides biofunctionality to be readily bonded to the surfaces [32,33].

Considering the excellent characteristics presented by montmorillonite clay and sericin protein, in the proposed work we intended to synthesize and explore the use of their combination in a nanocomposite structure on a pencil graphite electrode (PGE) for the application of sensitive AA detection. The nanostructured MMT-sericin nanocomposite modification on the sensor has led to high physical and mechanical strength and the proposed sensor was shown to be potentially useful for sensitive AA detection between 10-1000 μM with square wave voltammetry (SWV) with a limit of detection (LOD) of 8 μM . The sensor has advantageous and was applicable for pharmaceutical vitamin C specimen.

2. Material and Method

2.1. Chemicals and Reagents

Montmorillonite (MMT-K10), gluteraldehyde, ascorbic acid, potassium chloride (KCl), ethanol, L-ascorbic acid (>99.5%), dopamine ($\geq 98.5\%$), uric acid (>99.5%) and phosphate buffer saline were collected from Sigma-Aldrich. Stock solution of ascorbic acid was prepared freshly in phosphate buffer solution (PBS) of pH 7.0 before the measurements. Bevitin C (Abfar Drug) was purchased from a local pharmacy and dissolved in PBS of pH 7.0. The aforementioned materials were of analytical class and employed as collected with no purification process.

2.2. Apparatus

Electrochemical analyses were recorded using CH Instruments CHI660C model potentiostat/galvanostat and Gamry Interface 1000 model potentiostat with three electrode system. A

pencil graphite electrode (PGE) in which a pencil was employed as a bearer for graphite leads (Tombo, HB, 0.5 mm diameter, Japan) and the electrical contact with the lead was received by soldering a metallic wire to the metallic part was employed as the working electrode. A platinum (Pt) wire was used as the auxiliary electrode and a silver/silver chloride (Ag/AgCl, 3 M KCl) as the reference electrode.

The obtained MMT-Ser NCs were evaluated by attenuated total reflectance fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR), dynamic light scattering (DLS), zeta measurement and scanning electron microscopy (SEM). The structural and chemical characterization and differentiation of MMT, sericin and MMT-Ser NCs were performed by ATR-FTIR analysis with Nicolet TM ISTM 50 spectrometer (Thermo Fisher Scientific, USA). The SEM images were used to evaluate in terms of shape and size distribution. Therefore, the morphology of nanocomposites and modified electrodes was examined by FIB-SEM (Tescan GAIA 3, Czech Republic). The specimens were manufactured by dropping 5 μL of composite nanostructure suspension on plates and desiccated under nitrogen gas. It is then covered with gold using the Precision Surface Abrasion and Coating System (Leica EM ACE600, Germany). DLS analyses of the nanocomposites were recorded by a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern Instruments, UK). For this, the electrophoretic mobility of the nanocomposite solution was analyzed, and the obtained data was modified to ζ -potential and size values with the Helmholtz-Smoluchowski equation.

2.3. Electroanalytical measurements

Electrochemical measurements were gathered in a three electrode cell system at room temperature and the solutions were treated with nitrogen for 5 min before the analyses. Cyclic voltammograms of electrodes in 5.0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ /0.1 M KCl solution were run between - 0.4 V and 0.9 V using scan rate as 100 mVs^{-1} and electrochemical impedance was applied at 0.2 V frequency range between 100,000-0.1 Hz vs. Ag/AgCl. Square wave voltammetric (SWV) measurements were performed in the potential range between -0.30 V and 0.6 V in phosphate buffer at pH 7.0 following instrumental parameters as: frequency: 50 Hz; Puls width: 50 mV; Amplitude: 4 mV.

2.4. Synthesis of MMT-Ser Nanocomposite

The MMT suspension was prepared at a concentration of 3%, followed by an *ex-situ* nanocomposite and subsequent desolvation method respectively for obtaining montmorillonite-sericin nanocomposite (MMT-Ser NC). For this purpose, 1 mL of MMT suspension was mixed with 30 mg mL^{-1} sericin solution. Afterwards, 4 mL of ethanol was added to the suspension to convert it to composite structures, until the solution appeared in white

cloudy color. Next, 8 % glutaraldehyde (GA) solution was added to crosslink the composite nanostructures under constant stirring (500 rpm) for 4 hours at room temperature and then washed by centrifugation and incubated at 4 ° C for further studies.

2.5. Preparation of MMT-Ser NCs modified PGEs

PGEs were dipped in the MMT-Ser NCs solution for several time durations between 10-120 minutes and the nanocomposites were accumulated on PGE by passive adsorption method. The modified graphite electrodes were incubated for drying at room temperature (30 min.) and gently washed with double distilled water to get rid of the loosely bonded NCs. The obtained modified electrodes were named as MMT-Ser NC/PGE.

2.6. Pharmaceutical vitamin C sample preparation

The proposed nanocomposite based biosensor was applied in commercial pharmaceutical vitamin C ampules containing 100 mg mL^{-1} of AA. For this purpose, known amount of vitamin C were added into the 0.1 M PBS (pH 7.0) and % recoveries were estimated for two different additions of the sample.

3. Results

3.1. Characterization of MTT-Ser NCs

The protein-clay nanocomposites may be constructed by straight adding of two solutions together comprising the protein and the clay suspension. The emerged nanostructure is named as *ex-situ* composite nanostructure or nanocomposite because the majority of the protein is located in external ranges of the clay [34]. Herein, Sericin doped MMT nanocomposites (MMT-Ser NCs) were prepared by the addition of glutaraldehyde (GA) as crosslinking agent for the first time on the literature. The GA acts on the amine group of proteins at neutral pH, is a linear dialdehyde. The aldehyde fragments of GA are bonded with the amine ends of proteins through the formation of Schiff base ($-\text{C} = \text{N}-$) which made the nanostructure stable under cross-linking conditions [35,36].

As a result of the characterization studies, the particle size of the composite nanostructures were approximately 150 ± 15.20 nm with a good polydispersity index (PDI) about 0.083 ± 0.014 (Figure 1.B). The zeta potential of the NCs was obtained as -27.60 ± -3.02 mV (Figure 1.C). The DLS results were supported by SEM analyses by displaying a very homogeneous and uniform structure (Figure 1.D).

ATR-FTIR analyses were demonstrated in the Figure 1.A. According to the results, Sericin NP spectra exhibited characteristic absorption at 1680 cm^{-1} and

1500 cm^{-1} , for the C-O in the amide-I and for N-H bending of the amide-II of the proteins, respectively. In the spectrum of MMT which was also seen in MMT-Ser NCs with a slight shift at 1030 cm^{-1} of the Si-O-Si due to GA crosslinking supported the presence of MMT. The characteristic peak of the sericin was also seen in the same spectrum which proved the nanocomposite construction [37,38].

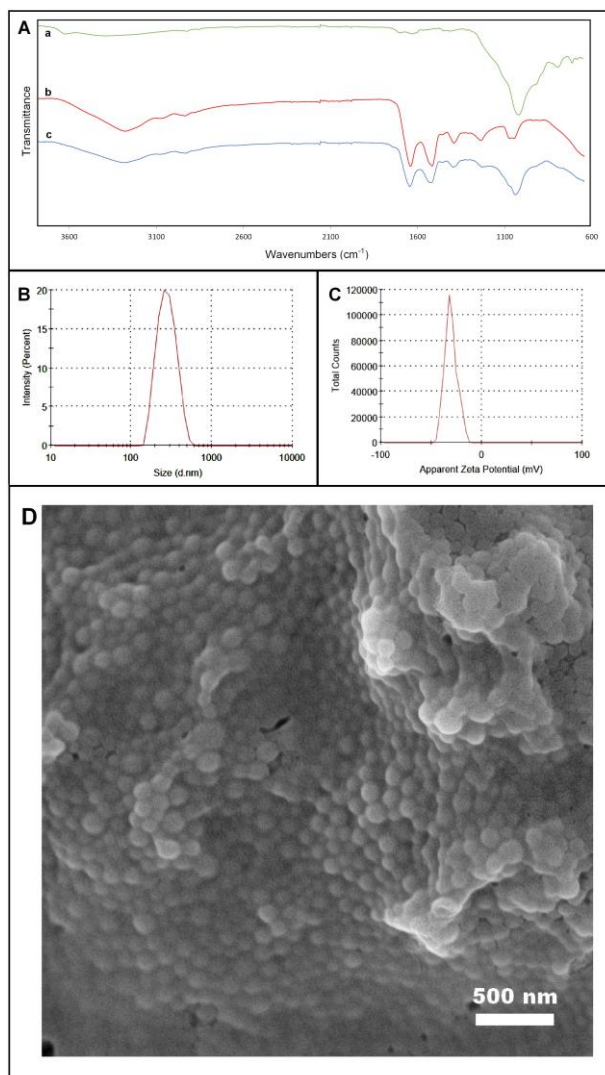


Figure 1. A) ATR-FTIR spectrum of a) MMT, b) Sericin NP, c) MMT-Ser NCs, B) The size distribution of MMT-Ser NCs, C) The zeta potential of MMT-Ser NCs, D) SEM image of MMT-Ser NCs, scale bar: 500 nm

3.2. Surface Morphology analysis of MMT-Ser NC/PGE

After it was shown that the synthesis of uniform MMT-Ser NCs were obtained successfully, the nanocomposites were further transferred on PGE surfaces for use as electrochemical sensor. The change in the topography and the microscopic structure of PGEs before and after the modification with MMT-Ser NCs were examined by using SEM for low and high magnifications, respectively (Figure 2). Bare PGE displayed fragmental graphite flakes piled up untedly (Figure 2.a and 2.b). After MMT-Ser NCs

modification on PGE via physical passive adsorption, a coverage of homogeneous layer and agglomeration of globular nanocomposite were observed. Also, the nanocomposites preserved its original spherical shape with a size of approximately 170 nm (Figure 2.c and 2.d).

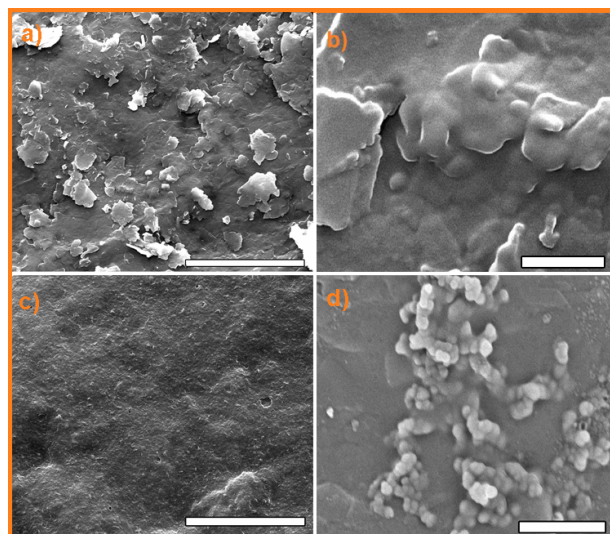


Figure 2. SEM images before and after modification; a) Bare PGE (10 μM), b) BarePGE (1 μM), c) MMT-Ser NC modified PGE (10 μM) ve d) MMT-Ser NC modified PGE (1 μM).

3.3. Electrochemical Studies of MMT-Ser NC/PGE

The effect of MMT-Ser NC modification on the electrochemical feedback of PGE and the electron transfer process was examined by cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) measurements in 0.1 M KCl containing 5.0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redox pair (Figure 3). Figure 3A showed that MMT-Ser NC modification on the sensor (curve b) has led to a raise in the cathodic and anodic peak currents and a decline in peak to peak separation of redox pair (ΔE_p) indicating easier electron separation than bare PGE (curve a) because of better electron pathway between the electrode and the solution. The anodic and cathodic peak currents, peak potentials and peak potential separation values obtained for $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ system were summarized in Table 1. It can also be considered that the porous nanocomposite structure exhibited higher electroactive surface area than PGE according to the Randles-Sevcik equation [39].

The interfacial feature of the bare and modified PGE by EIS was shown in Figure 3.B a and b, respectively. Nyquist plots exhibited a semicircle described by the charge transfer resistance (R_{ct}) equal to the semicircle diameter of the plot at high frequencies and the linear portion corresponding to the diffusion process at low frequencies. It was observed that the R_{ct} value of the electrode/solution interface (R_{ct} : 450 Ω) decreased after modification of PGE (R_{ct} : 280 Ω) by nanocomposite as an indication of the increase of the electron transfer rate at the electrode/solution

interface. This result was also consistent with CV results.

Table 1. Behavior of bare and modified PGE in redox probe solution.

Electrode	PGE	MMT-Ser NC/PGE
I _{pa} (μA)	191.5±33.14	233.6±9.06
E _{pa} (V)	0.120±0.219	0.327±0.013
I _{pc} (μA)	178.4±33.05	245.3±1.95
E _{pc} (V)	0.329±0.22	0.150±0.002
ΔE _p (V)	0.209±0.115	0.177±0.013

N=3, %95 confidence level.

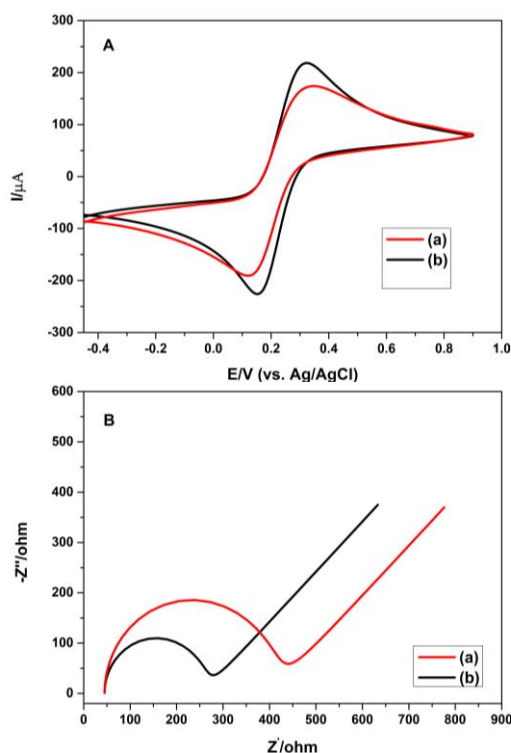


Figure 3. A) Cyclic voltammograms of a) PGE, b) MMT-Ser NC/PGE in 5.0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ in 0.1 M KCl. (E_i : -0.4 V, E_f : 0.9 V vs. Ag/AgCl). Scan rate: 100 mVs^{-1} , B) Nyquist plots (E : 0.2 V, Frequency range: 100,000-0.1 Hz).

3.4. Investigation of electrochemical behavior of AA

To assess the effect of electron transfer kinetics of AA on the electrode surface properties of the sensor, cyclic voltammetry was performed to examine the electrochemical potential of AA on bare (Figure 4.A) and the modified PGE (Figure 4.B) in the N_2 saturated 0.1 M pH 6.0 PBS in the absence (curves a) and presence of 0.5 mM L-AA (curves b). CVs for each electrode showed a single oxidation peak at about +0.3 V vs Ag/AgCl and no reduction peak was observed in the reverse scan as an indicator of the irreversible character of the electrode reaction, and this result is consistent with the literature [20]. This irreversible oxidation of AA was proved to proceed by the release of two electrons and two protons, leading to formation of dehydroascorbic acid [26]. According to the results, coating of MMT-Ser NCs on PGE improved the adsorption of AA to the electrode surface and increased the peak current values significantly (about

3.5 times). This was an indication that the obtained sensor surface could be successfully used for the electrochemical analysis of AA. Compared to the voltammogram obtained with bare electrode, the modification showed accelerated electrooxidation process of AA on the electrode. Thus, MMT-Ser NC modified PGE was used as the working electrode in all subsequent experiments. In addition, 4 cycles of alternating voltammograms with the modified surface demonstrated that the oxidation peak of AA decreased with the increase in the number of cycles indicated the adsorption of AA on the electrode surface (Figure 4.C). Furthermore, scan rate experiment was conducted in order to prove that the oxidation mechanism of AA is adsorption controlled.

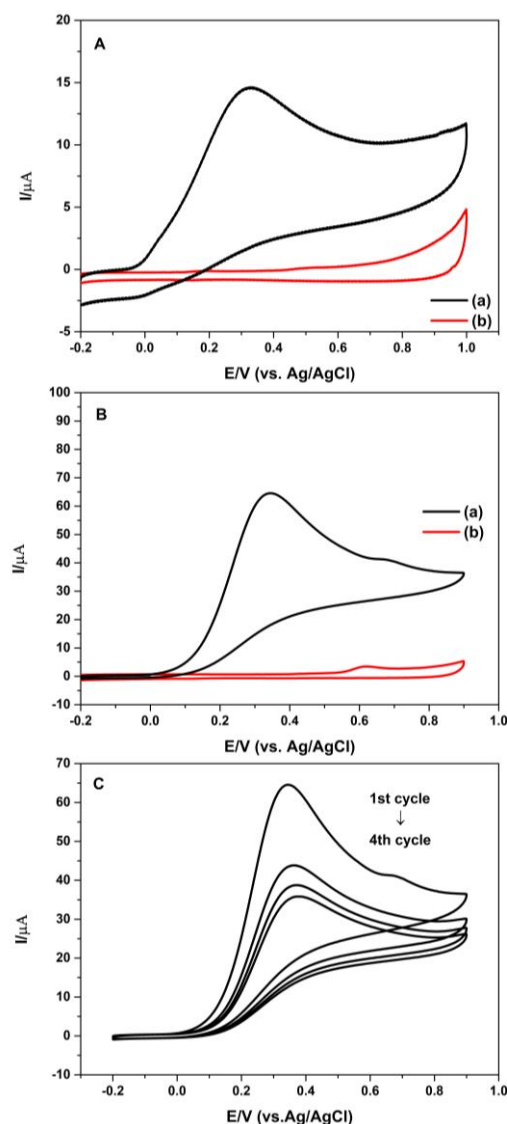


Figure 4. Cyclic voltammograms of A) Bare PGE, B) MMT-Ser NC modified PGE; a) in the absence, b) in the presence of 0.5 mM of AA in PBS pH 6.0. (scan rate: 100 mVs^{-1}), C) MMT-Ser NC modified PGE, 4 alternating cycles in 0.5 mM of AA in PBS pH 6.0.

3.5. Scan rate study

Scan rate experiment provides useful information about the oxidation/reduction mechanism of

electroactive species in electrochemical sensor development studies so that oxidation mechanism of L-AA on MMT-Ser NC/PGE in pH 6.0 PBS was studied in the range of 10-100 mVs⁻¹. The effect of the scan rate (SR) on the peak current (I_p) of L-AA was plotted as illustrated in Figure 5. Anodic peak currents increased linearly as the scan rate increased showing that L-AA oxidation was adsorption-controlled on the sensor. This typical behavior of L-AA was found to be consistent with the literature [40].

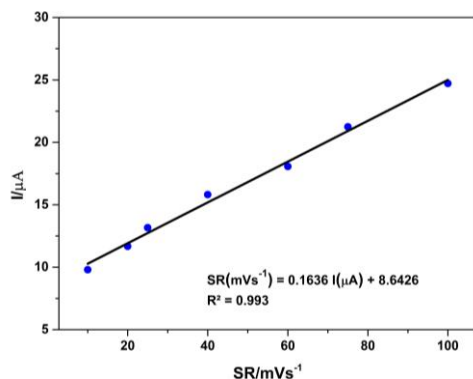


Figure 5. Scan rate study for MMT-Ser NC/PGE. The linear graph corresponding peak currents vs. scan rates between 10-100 mVs⁻¹ in pH 6.0 PBS containing 0.5 mM AA.

3.6. Optimization Studies

The analytical performance of the MMT-Ser NC modified sensor was analyzed by using a sensitive technique, square wave voltammetry (SWV) and optimization of the parameters were summarized in Table 2.

Table 2. The results for optimization of SWV parameters.

Parameter	Studied Range	Optimum Value
Frequency (Hz)	10-70	50
Amplitude (mV)	10-70	50
Puls width (mV)	3-7	4

As the nanocomposite modification of the surface was carried out by physical adsorption, the most important parameter in this method was the adsorption time in the NC solution. The PGEs were

immersed in MMT-Ser NC solution for different durations (15, 30, 45, 60, 90 minutes) and the maximum peak currents were observed for 45 minutes (Figure 6.A). When the adsorption time was increased, the peak current started to decrease due to saturation of the surface. For this reason, the physical adsorption time of the nanocomposite structure was determined as 45 min in all the experimental studies.

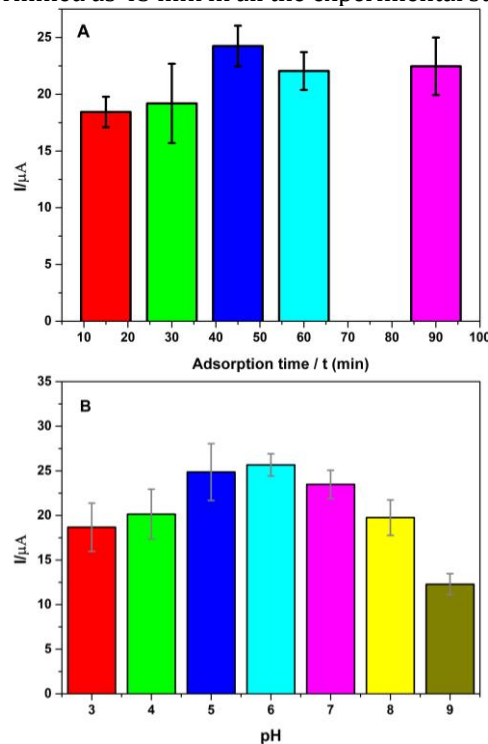


Figure 6. A) The effect of physical adsorption time of MMT-Ser NC on PGE surface on AA response. **B)** The effect of supporting electrolyte pH on the oxidation of AA.

The effect of the supporting electrolyte pH on the oxidation peak of AA was examined and the maximum peak current was obtained at pH 6.0 solution, also this pH was the most convenient medium for the adsorption of the AA on MMT-Ser NC/PGE (Figure 6.B). According to the literature, it was also reported that the electrooxidation of AA is widely accepted below pH 8 [2]. Further experiments were employed under optimized conditions by SWV.

Table 3. Analytical performance of different electrochemical AA sensors based on nanomaterials/composites.

Modified electrode	Linear Range / μM	LOD / μM	Reference
AuNPs/P(PDA)-GO/GCE	6.0-2400	1.764	[17]
RGO-Ag/PANI/GCE	50-1000	0.5	[18]
MoS ₂ /PEDOT/GCE	20-140	5.83	[41]
AuNPs@MoS ₂ /GCE	1000-70000	100	[20]
Au/RGO/GCE	240-1500	0.002	[21]
RGO-ZnO/GCE	50-2350	3.71	[22]
GF@NiCo ₂ O ₄	200-750	50	[23]
3D-MoS ₂ /rGO/Au@GCE	2-5400	0.93	[24]
PANI/HNTs hierarchical nanotubes	5 - 5500	0.21	[25]
Zn-NiAl LDH/rGO superlattice	0.5-11	13.5	[42]
MWCNTs/Cu ₂ O/Ag ₂ O	0.05-1628.5	0.011	[43]
AgNPs-PSi	20-60	0.83	[44]
ZnNi NPs@f-MWCNT	300-1100	0.51	[19]
MMT-Ser NC/PGE	10-1000	8	This work

AuNP: Gold nanoparticle, P(PDA): Poly(2,6-pyridinedicarboxylic acid), GO: Graphene oxide, GCE: Glassy carbon electrode, RGO: Reduced graphene oxide, PANI: polyaniline, MoS₂: Molybdenum disulphide, PEDOT: poly(3,4-ethylenedioxythiophene), ZnO: Zinc oxide, GF: graphene fiber, NiCo₂O₄: Nickel cobaltite, Au: Gold, HNT: Halloysite nanotubler, Ag: silver, LDH: Double layer hydroxide, AgNR: Silver nanorod, P(Arg): poli(l-arginine), MWCNTs: Multiwalled carbon nanotubes, Cu₂O: Copper dioxide, Ag₂O: Silverdioxide, AgNPs-Psi: Silver nanoparticle decorated stain-etched mesoporous silicon. ZnNi NPs@f-MWCNT: Zinc Nickel nanoparticles-multiwalled carbon nanotubes.

3.7. The analytical performance of MMT-Ser NC/PGE for AA detection

The sensitivity for the determination of AA with MMT-Ser NC/PGE nano-biosensor was analysed by SWV to examine peak current dependence on the concentration of AA. As can be seen in Figure 7.A, after successive additions of AA, the oxidation peak currents increased linearly with increase of the concentration between 10 μM and 1000 μM of AA. From the calibration graph (Figure 7.B), the relationship between the oxidation peak currents and the concentration of AA was estimated given by the equation;

$$I(\mu\text{A}) = 0.0612 C(\mu\text{M}) - 0.4697 \quad R^2 = 0.993 \quad (1)$$

The limit of detection, LOD, (based on $S/N=3$) was found to be 8 μM . The wide linear range and the moderately low LOD values of the proposed sensor were compared to other electrochemical AA sensors comprising various modified sensors (Table 3). MMT-Ser NC/PGE sensor system has not been previously used to detect any analyte in the literature. Considering the other studies in the literature, it has been observed that the sensor system developed has a competitive performance with other sensor systems.

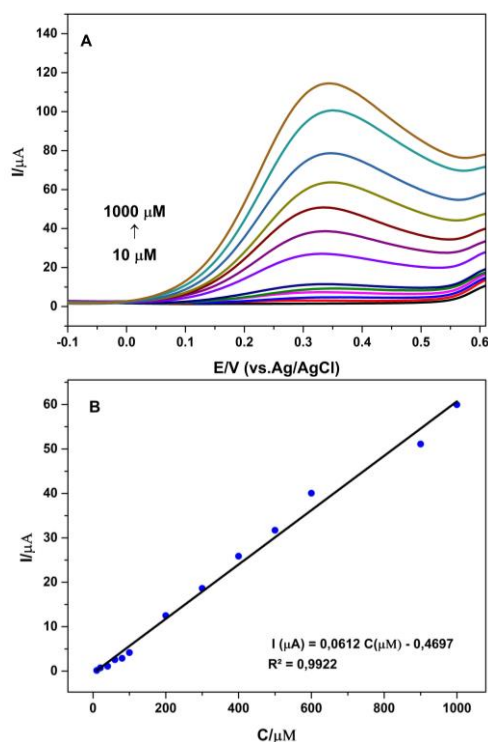


Figure 7. A) Linear detection range by SWVs recorded at MMT-Ser NC/PGE in pH 6.0 PBS between 10-1000 mM (from bottom to top) of AA (E_i : -0.1 V, E_f : 0.6 V, Frequency: 50 Hz; Puls width: 50 mV; Amplitude: 4 mV, equilibrium time: 10 s). **B)** Calibration graph of peak current vs. the AA concentration.

3.8. Reproducibility, selectivity investigation and AA assay in real sample

Reproducibility investigation of MMT-Ser NC/PGE sensors prepared independently under the same applicability of the sensor was tested for the determination of AA in Vitamin C tablets by the standard addition method with known concentrations of the analyte. The recoveries were between 94.6% and 111.2% for two different additions of samples which proved that the electrochemical sensor can practically be applied for vitamin analysis (Table 4).

Table 4. Results for detecting of AA in pharmaceutical vitamin C sample using MMT-Ser NC/PGE sensor.

Sample	Added (μM)	Found (μM)	Recovery (%)	RSD (%) n=3
Pharmaceutical Vitamin C	200.0	189.3	94.6	4.54
Pharmaceutical Vitamin C	150.0	166.0	111.2	5.10

4. Discussion and Conclusion

Nanocomposite materials based on clay and silk protein were used together in the presented study in which superior properties of the two different materials were blended to provide a functional material for the modification of transducer surface. The montmorillonite-sericin nanocomposite were synthesized by desolvation method following glutaraldehyde crosslinking by acting amine groups of sericin to make the nanocomposites stable. The results of the characterization studies revealed that the synthesis of MMT-Ser composite nanostructures were prepared successfully; homogeneous and uniform nanocomposites were obtained and supported with both morphological and chemical analysis results. The synthesized montmorillonite-sericin composite nanostructures were characterized and investigated as electrode modifier as they can act as matrixes for electro-active ions as well as their versatility, ease of manipulation, high adsorption ability, biocompatibility and low cost of production. MMT-Ser NC were first time applied for the nanostructuring of electrode surfaces and showed good sorption properties for the substrate and the analyte as well as sensitive electroanalysis of ascorbic acid in standards and pharmaceuticals with satisfactory results in comparison with the other electrochemical nanostructured sensors reported in the literature. The sensor also can be potentially useful for biomedical applications and determination of other bioanalytes.

Acknowledgements

Authors would like to acknowledge the financial support of this research, ID number FHD-2018-17045, from Research Council of Hacettepe University, Turkey. Also authors thank to Yesim

Tugce Yaman for her assistant with experimental design.

References

- [1] Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K., Levine, M. 2003. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1), 18–35.
- [2] Pisoschi, A.M., Pop, A., Serban, A.I., Fafaneata, C. 2014. Electrochemical methods for ascorbic acid determination. *Electrochimica Acta*, 121, 443–460.
- [3] Arrigoni, O., De Tullio, M.C. 2002. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1569(2), 1–9.
- [4] Bradshaw, M.P., Barril, C., Clark, A.C., Prenzler, P.D., Scollary, G.R. 2011. Ascorbic acid: A review of its chemistry and reactivity in relation to a wine environment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(6), 479–98.
- [5] Erdurak-Kiliç, C.S., Uslu, B., Dogan, B., Ozgen, U., Ozkan, S.A., Coskun, M. 2006. Anodic voltammetric behavior of ascorbic acid and its selective determination in pharmaceutical dosage forms and some Rosa species of Turkey. *Journal of Analytical Chemistry*, 61(11), 1113–20.
- [6] Levine, M., Rumsey, S.C., Daruwala, R., Park, J.B., Wang Y. 1999. Criteria and Recommendations for Vitamin C Intake. *JAMA*, 281(15), 1415.
- [7] Kumar, S.A., Lo, P.H., Chen, S.M. 2008. Electrochemical selective determination of ascorbic acid at redox active polymer modified electrode derived from direct blue 71. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(4), 518–23.
- [8] Pisoschi, A.M., Cheregi, M.C., Danet, A.F. 2009. Total antioxidant capacity of some commercial fruit juices: Electrochemical and spectrophotometrical approaches. *Molecules*, 14(1), 480–93.
- [9] Kabasakalis, V., Siopidou, D., Moshatou, E. 2000. Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. *Food Chemistry*, 70(3), 325–28.
- [10] Versari, A., Mattioli, A., Parpinello, G.P., Galassi, S. 2004. Rapid analysis of ascorbic and isoascorbic acids in fruit juice by capillary electrophoresis. *Food Control*, 15(5), 355–58.
- [11] Koncki, R., Lenarczuk, T., Głab, S. 1999. Disposable integrated cuvette test for quantitative determination of vitamin C in pharmaceutical products. *Analytica Chimica Acta*, 379(1–2), 69–74.
- [12] Arya, S.P., Mahajan, M., Jain, P. 2000. Non-spectrophotometric methods for the determination of Vitamin C. *Analytica Chimica Acta*, 417(1), 1–14.
- [13] Lykkesfeldt, J. 2000. Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in biological samples by high-performance liquid chromatography using subtraction methods: Reliable reduction with tris[2-carboxyethyl]phosphine hydrochloride. *Analytical Biochemistry*, 282(1), 89–93.
- [14] Oliveira, E.J., Watson, D.G. 2001. Chromatographic techniques for the determination of putative dietary anticancer compounds in biological fluids. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 764(1–2), 3–25.
- [15] Thangamuthu, R., Senthil Kumar, S.M., Chandrasekara Pillai, K. 2007. Direct amperometric determination of l-ascorbic acid (Vitamin C) at octacyanomolybdate-doped-poly(4-vinylpyridine) modified electrode in fruit juice and pharmaceuticals. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 120(2), 745–53.
- [16] Raof, J.B., Ojani, R., Kiani, A. 2003. Ferrocene spiked carbon paste electrode and its application to electrocatalytic determination of ascorbic acid. *Bulletin of Electrochemistry*, 19(1), 17–22.
- [17] Aydoğdu Tığ, G., Günendi, G., Pekyardımcı, Ş. A selective sensor based on Au nanoparticles-graphene oxide-poly(2,6-pyridinedicarboxylic acid) composite for simultaneous electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid. *Journal of Applied Electrochemistry*, 47(5), 607–18.
- [18] Guo, Z., Luo, X., Li, Y., Li, D., Zhao, Q., Li, M., Ma, C., Zhao, Y. 2017. Simultaneous electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid based on reduced graphene oxide-Ag/PANI modified glassy carbon electrode. *Chemical Research in Chinese Universities*, 33(3), 507–12.
- [19] Savk, A., Özdil, B., Demirkan, B., Nas, M.S., Calimli, M.H., Alma, M.H., Inamuddin, Asiri, A.M., Şen, F. 2019. Multiwalled carbon nanotube-based nanosensor for ultrasensitive detection of uric acid, dopamine, and ascorbic acid. *Materials Science and Engineering C*, 99(January), 248–54.
- [20] Sun, H., Chao, J., Zuo, X., Su, S., Liu, X., Yuwen, L., Fan, C., Wang, L. 2014. Gold nanoparticle-decorated MoS₂ nanosheets for simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid. *RSC Advances*, 4(52), 27625–29.
- [21] Zhang, Y., Zhou, Q., Zhao, W., Chu, W., Zheng, J. 2016. Array of recessed gold nanoelectrodes formed with polymethylmethacrylate for individual detection of ascorbic acid, dopamine

- and uric acid. *Electrochimica Acta*, 212, 25–31.
- [22] Zhang, X., Zhang, Y.C., Ma, L.X.. 2016. One-pot facile fabrication of graphene-zinc oxide composite and its enhanced sensitivity for simultaneous electrochemical detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 227, 488–96.
- [23] Cai, W., Lai, J., Lai, T., Xie, H., Ye, J. 2016. Controlled functionalization of flexible graphene fibers for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 224, 225–32.
- [24] Zhao, Y., Zhou, J., Jia, Z., Huo, D., Liu, Q., Zhong, D., Hu, Y., Yang, M., Bian, M., Hou, C. 2019. In-situ growth of gold nanoparticles on a 3D-network consisting of a MoS₂/rGO nanocomposite for simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. *Microchimica Acta*, 186(2), 92.
- [25] Shao, L., Wang, X., Yang, B., Wang, Q., Tian, Q., Ji, Z., Zhang, J. 2017. A Highly Sensitive Ascorbic Acid Sensor Based on Hierarchical Polyaniline Coated Halloysite Nanotubes Prepared by Electrophoretic Deposition. *Electrochimica Acta*, 255, 286–97.
- [26] Puangjan, A., Chaiyasith, S., Wichitpanya, S., Daengduang, S., Puttota, S. 2016. Electrochemical sensor based on PANI/MnO₂-Sb₂O₃ nanocomposite for selective simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid and acetylsalicylic acid. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 782, 192–201.
- [27] Harraz, F.A., Faisal, M., Al-Salami, A.E., El-Toni, A.M., Almadiy, A.A., Al-Sayari, S.A., Al-Assiri, M.S. 2019. Silver nanoparticles decorated stain-etched mesoporous silicon for sensitive, selective detection of ascorbic acid. *Materials Letters*, 234, 96–100.
- [28] Mousty, C. 2010. Biosensing applications of clay-modified electrodes: A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(1), 315–25.
- [29] Moraes, J.D.D., Bertolino, S.R.A., Cuffini, S.L., Ducart, D.F., Bretzke, P.E., Leonardi, G.R. 2017. Clay minerals: Properties and applications to dermocosmetic products and perspectives of natural raw materials for therapeutic purposes—A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 534(1–2), 213–19.
- [30] Mousty, C. 2004. Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes - New trends. *Applied Clay Science*, 27(3–4), 159–77.
- [31] Wu, J.H., Wang, Z., Xu, S.Y. 2007. Preparation and characterization of sericin powder extracted from silk industry wastewater. *Food Chemistry*, 103(4), 1255–62.
- [32] Qian, P., Ai, S., Yin, H., Li, J. 2010. Evaluation of DNA damage and antioxidant capacity of sericin by a DNA electrochemical biosensor based on dendrimer-encapsulated Au-Pd/chitosan composite. *Microchimica Acta*, 168(3), 347–54.
- [33] Yin, H., Ai, S., Shi, W., Zhu, L. 2009. A novel hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized on gold nanoparticles-silk fibroin modified glassy carbon electrode and direct electrochemistry of horseradish peroxidase. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 137(2), 747–53.
- [34] Velde, B. 1977. Clays and clay minerals in natural and synthetic systems. *Developments in Sedimentology*, 21. Elsevier.
- [35] Akbal, Ö., Erdal, E., Vural, T., Kavaz, D., Denkbaş, E.B. 2017. Comparison of protein-and polysaccharide-based nanoparticles for cancer therapy: synthesis, characterization, drug release, and interaction with a breast cancer cell line. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(2), 193–203.
- [36] Langer, K., Anhorn, M.G., Steinhäuser, I., Dreis, S., Celebi, D., Schrickel, N., Faust, S., Vogel, V. 2008. Human serum albumin (HSA) nanoparticles: Reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation. *International Journal of Pharmaceutics*, 347(1–2), 109–117.
- [37] Hernández, K.A.H. 2016. Polymer-Clay Nanocomposites and Composites: Structures, Characteristics, and their Applications in the Removal of Organic Compounds of Environmental Interest. *Medicinal Chemistry. (Los Angeles)*, 6, 201–210.
- [38] Cho, K.Y., Moon, J.Y., Lee, Y.W., Lee, K.G., Yeo, J.H., Kweon, H.Y., Kim, K.H., Cho, C.S. 2003. Preparation of self-assembled silk sericin nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 32(1–2), 36–42.
- [39] Gau, V., Ma, S.C., Wang, H., Tsukuda, J., Kibler, J., Haake, D.A. 2005. Electrochemical molecular analysis without nucleic acid amplification. *Methods*, 37(1), 73–78.
- [40] Feng, L., Gao, G., Zhang, C., Ma, J., Cui, D. 2014. Electrochemical ascorbic acid/hydroquinone detection on graphene electrode and the electroactive site study. *Journal of Experimental Nanoscience*, 9(5), 452–62.
- [41] Li, Y., Lin, H., Peng, H., Qi, R., Luo, C. 2016. A glassy carbon electrode modified with MoS₂ nanosheets and poly(3,4 ethylenedioxythiophene) for simultaneous electrochemical detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid. *Microchimica Acta*, 183(9), 2517–23.
- [42] Asif, M., Aziz, A., Wang, H., Wang, Z., Wang, W., Ajmal, M., Xiao, F., Chen, X., Liu, H. 2019. Superlattice stacking by hybridizing layered double hydroxide nanosheets with layers of



reduced graphene oxide for electrochemical simultaneous determination of dopamine, uric acid and ascorbic acid, *Microchimica Acta*, 186(2), 61.

- [43] Puangjan, A., Chaiyasith, S., Taweeporngitgul, W., Keawtep J. 2017. Application of functionalized multi-walled carbon nanotubes supporting cuprous oxide and silver oxide composite catalyst on copper substrate for simultaneous

detection of vitamin B2, vitamin B6 and ascorbic acid. *Materials Science and Engineering: C*, 76, 383–97.

- [44] Harraz, F.A., Faisal, M., Al-Salami, A.E., El-Toni, A.M., Almadiy, A.A., Al-Sayari, S.A., Al-Assiri, M.S., 2019. Silver nanoparticles decorated stain-etched mesoporous silicon for sensitive, selective detection of ascorbic acid. *Materials Letters*, 234, 96–100.

Afyonkarahisar İli Patates Alanlarında Patates Böceği (*Leptinotarsa decemlineata*) (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae)'nin Yayılışı

Ezgi DOĞAN¹, İsmail KARACA*²

^{1,2}Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 32260, Isparta, Türkiye

(Alınış / Received: 02.06.2019, Kabul / Accepted: 24.03.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Anahtar Kelimeler

Leptinotarsa decemlineata,
Patates,
Afyonkarahisar

Özet: Çalışmada Afyonkarahisar ili patates alanlarında patates böceği (*Leptinotarsa decemlineata*) (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae)'nin yayılışı araştırılmıştır. Patates böceği üzerine yapılan bu çalışmanın amacı ülkemizde çokça yetiştiriciliği yapılan patatesin en önemli zararlılarından birisi olmasıdır. Bu nedenle, Afyonkarahisar ili; Merkez, Sandıklı, Emirdağ, Şuhut, Dinar, Çobanlar ilçelerinde her ilçeye dört kez gidilerek tarlalardan patates böceği bireyleri toplanmıştır. Buna ek olarak Afyonkarahisar ilinde patates böceğinin popülasyon değişiminin belirlenmesi amacıyla, Afyonkarahisar ili Bolvadin İlçesi merkezinde, aralarında 4 km bulunan iki patates tarlası (Erkmen ve Şihlar mahalleleri) örneklem alanı olarak seçilmiştir. Her hafta bu tarlalardan patates böceği bireyleri (yumurta, larva, ergin) toplanarak kayıt altına alınmıştır. Afyonkarahisar ili merkez ilçesinde kimyasal mücadelenin yoğun olarak uygulandığı patates alanlarında patates böceği bireylerine az miktarda rastlanmıştır. Erkmen mahallesindeki parselde toplamda 1165 yumurta bulunurken Şihlar mahallesinde ise 556 yumurta elde edilmiştir. Bu iki patates tarlasında yapılan çalışma sonucu patates böceğinin popülasyon dalgalanmaları grafikler ile ifade edilmiştir.

Dispersal of Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) (Say) (Coleoptera:Chrysomelidae) in Afyonkarahisar Province

Keywords

Leptinotarsa Decemlineata,
Potato,
Afyonkarahisar

Abstract: In study, the dispersal of Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) in the province of Afyonkarahisar has been investigated. The aim of this study is that, it is one of the most important pests of potatoes which are grown in Turkey. Because of this, certain districts in Afyonkarahisar -the central district, Sandıklı, Şuhut, Dinar, Emirdağ, Çobanlar - were visited four times, and the potato beetles were collected from the fields. Additionally, two potato fields (Erkmen and Şihlar neighborhoods), which have 4 kilometers' distance between, in the district of Bolvadin were settled as the sampling area so as to determine the population change of potato beetles in Afyonkarahisar. Every week, potato beetles (eggs, larvae, pupa) were collected from these fields and recorded. In the central district of Afyonkarahisar, less potato beetles were detected in the potato fields where chemicals were intensively used. Egg numbers of the fields in Erkmen and Şihlar neighborhoods were 1165 and 556, respectively. Fluctuations of potato beetles for both fields were drawn.

1. Giriş

Dünya genelinde insan nüfusu hızla artmaktadır. Hızla artan insan nüfusuna kıyasla üretilen ürünlerin miktarındaki artış hızının yeterli olmamasının önümüzdeki dönemlerde açlık problemine yol açacağı araştırmacılar tarafından ileri sürülmektedir [1, 2]. Bu ihtiyacı karşılamanın başlıca yollarından biri

de birim alana düşen verimin artırılması ve zararlılara karşı yapılacak etkin bir mücadeledir [3].

Tek yıllık bir kültür bitkisi olan patates; alınan verimin fazlalığı, içeriğinde bulunan besin değerinin ve farklı ekolojilere adaptasyonunun yüksek oluşu gibi özellikleri nedeniyle, dünyanın birçok yerinde başarı ile yetiştirebilmekte ve önemli bir besin kaynağı olarak kullanılmaktadır [4].

*İlgili yazar: ismailkaraca@isparta.edu.tr

Türkiye’de 1970’li yıllarda Ülkesel Patates Projesinin başlatılması ve 1984 yılından itibaren özel tohumculuk şirketlerine destek verilmesi ülkemizde yapılan patates üretiminin artmasının nedenlerinden birisi olmuştur.

Beslenmemizde önemli bir yeri olan patatesin, her alım gücüne hitap etmesi, veriminin yüksek oluşu, içeriğinde bulunan kaliteli karbonhidratlar ile günlük beslenmedeki önemi ve çeşitli iklim özelliklerine sahip bölgelerde de yetiştirilebiliyor olması birçok ülkede yetiştirilmesini ve tüketilmesini sağlamıştır [5].

Mısır, çeltik ve buğday üretiminden sonra dünya geneli üretimdeki payı %80 olan patates 368 milyon ton üretim miktarı ile üretim bazında dördüncü sırada yer almaktadır [4].

Dünya genelinde en fazla patates ekim alanına sahip 10 ülke Çin, Rusya, Hindistan, Ukrayna, Bangladeş, ABD, Polonya, Belarus, Peru ve Nijerya’dır. Türkiye 18 hektar ekim alanı ile dünyada ilk 30 ülke arasında yer almaktadır. En fazla patates üreten ülkelerin ise; Çin, Hindistan, Rusya, Ukrayna, ABD, Almanya, Polonya, Bangladeş, Belarus, Hollanda olduğu; Türkiye’nin ise üretim bazında 14. sırada yer aldığı görülmektedir. 2018 yılı patates üretimi 4 milyon 550 bin ton üretim miktarı ile bir önceki yıla göre %0,2 oranında gerilemiştir [6].

Ülkemizde yapılan patates üretimi incelendiğinde üretimin en çok olarak yapıldığı iller sırası ile; Niğde, Nevşehir, İzmir, Bolu ve Afyonkarahisar illeri olarak görülmektedir. Patates yetiştiriciliğimizin yüzde 57,9’u bu illerimizde gerçekleşmektedir. Topraklarımızda yapılan üretimin %13’ü tohumluk açısından değerlendirilirken, %16’lık kısmının üreticilerin aile içi tüketimini kapsadığı, %3’ünün hayvan beslenmesinde kullanıldığı ve kalan %68’lik kısmının ise pazara sunulduğu belirtilmiştir [7].

Patates üretiminde verimde düşüklüğe neden olan birçok hastalık ve zararlı etmeni bulunmaktadır. Bu zararlılar arasında patates böceği, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) önemli bir yer tutmaktadır. Patates böceği, patates yetiştiriciliğinin yapıldığı tüm bölgelerde zarar yapmaktadır [8, 9].

Patates böceği 10-12 mm uzunluğunda kubbeli yapılı bir böcektir. Erginlerinde bir çift sarıkanat bulunur. Kanatların üzerinde ise 5’er tane siyah çizgi vardır. Baş ve göğüs kısmının üzerinde küçük siyah noktalar bulunmaktadır. Patates böceği kışı toprakta ergin olarak geçirir ve bulunduğu iklim koşullarına bağlı olarak yılda 1-3 döl verir [10].

Bu çalışmada, patates böceğinin Afyonkarahisar ili patates yetiştiricilik alanlarındaki dağılımı ve Bolvadin ilçesinde seçilen iki tarlada popülasyon değişimi ele alınmıştır.

2. Materyal ve Metot

Afyonkarahisar ili patates üretim alanlarından toplanan Chrysomelidae familyasına ait *Leptinotarsa decemlineata*’nın tüm bireyleri, yapılan çalışmanın esas materyalini oluşturmaktadır. 2017 yılı üretim sezonunda çalışmanın yapıldığı her ilçe dört kez ziyaret edilmiştir. Bolvadin ilçesinde popülasyon takibinin yapıldığı iki tarladan ise her hafta periyodik olarak örnekler toplanmıştır.

Çalışmalar Afyonkarahisar ili ve çevresinde patates böceğinin yayılışını belirlemek amacı ile yapılmış ve iki aşamalı olacak şekilde yürütülmüştür.

2.1. Afyonkarahisar ili ve ilçelerinde patates böceğinin yayılışı

Çalışmada patates böceğinin Afyonkarahisar ili ve ilçelerindeki yayılışını belirlemek amacıyla arazi çıkışları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar atrap, elle toplama ve gözle kontrol yöntemleri kullanılarak altı ilçe ziyaret edilmek sureti ile yapılmıştır. Arazi çıkışları Afyonkarahisar ilinin Sandıklı, Şuhut, Dinar, Emirdağ, Çobanlar ve Afyonkarahisar merkez ilçelerinde gerçekleşmiş, patates üretiminin yüzde bazında daha az olduğu ilçelerde (İhsaniye, İscehisar, Bayat, Bolvadin, Sultandağı, Çay, Sinanpaşa, Hocalar, Kızılören, Evciler, Dazkırı, Başmakçı) ise örneklemeye çalışmaları yapılmamıştır. Tablo 1’de görülen ilçelerde yapılan örneklemeler 2017 yılı üretim sezonu boyunca devam etmiştir.

Tablo 1. Çalışmaların yapıldığı patates tarlalarının koordinatları ve parsellerin yükseklik değerleri

İlçe Adı	Koordinatları	Yükseklik
Sandıklı	38°26'56.83"K 30°15'27.50"D	1054m
Şuhut	38°31'53.23"K 30°31'27.04"D	1148m
Dinar	38°03'02.29"K 30°09'24.97" D	872m
Merkez	38°43'11.21"K 30°35'06.21"D	1007m
Emirdağ	39°01'28.46"K 31°10'21.82"D	956m
Çobanlar	38°42'32.86"K 30° 45'59.47"D	994m

Üretim alanlarındaki bitkilerde öncelikle gözle kontrol yöntemi kullanılmış ve patates böceğinin parsellerde bulunan tüm dönemleri elle toplanarak kayıt altına alınmıştır. Toplanan tüm örnekler ayrı ayrı kese kağıtlarına yerleştirilerek buz kutusu içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Söz konusu alanlarda her bir tarlada 100 kez atrap sallanmıştır. Farklı biyolojik dönemlere ait olan böcekler parazitoit çıkarma kavanozlarına yerleştirilmiştir. Ancak parazitoite rastlanmamıştır.

2.2. Patates böceğinin Bolvadin ilçesindeki yayılışının belirlenmesi

Afyonkarahisar ili merkezi ve ilçelerinde patates böceğinin yayılışını araştırmak için yetiştiriciliğin en çok olduğu altı ilçede yapılan dört örnekleme çalışması ile beraber, Bolvadin ilçesinin biri Erkmeh mahallesi, diğeri ise Şıhlar mahallesinde bulunan, her biri 30 Da'lık iki parsel patates böceğinin popülasyon takibi için belirlenmiştir. Bu iki parselde yapılan çalışmalar haftada bir gün olacak şekilde planlanmıştır. Her arazi çıkışında her bir patates tarlasında, tarlalar çapraz köşeleri doğrultusunda yürünerek 100 kez atrap sallanarak örnekleme yapılmıştır [11].

Bu çalışmalara ilave olarak 2017 yılı Afyonkarahisar ili Bolvadin ilçesine ait yıllık iklim verileri, termal konstant değerleri ve patates böceğinin gelişme eşiği verileri kullanılarak döl sayısı hesaplanmıştır. Söz konusu iklim verileri, 2017 yılı için T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Meteoroloji Genel Müdürlüğüne bağlı Bolvadin istasyonundan (No: 17796) alınmıştır. Çalışmanın bu kısmında Gürkan ve Boşgelmez [10]'in Atak [12]'a atfen kullandığı verilerden yararlanılmıştır. Hesaplamalarda patates böceğinin gelişme eşiği için 12,8 °C ve termal konstant değeri için 336 gün-derece kullanılmıştır.

3. Araştırma Bulguları ve Tartışma

3.1. Patates böceğinin Afyonkarahisar ili ve ilçelerindeki dağılımı

Afyonkarahisar'ın ilçelerinde gerçekleştirilen dört sörvey çalışması neticesinde elde edilen patates böceğinin yumurta, larva (tüm larva dönemleri bir arada alınmıştır) ve ergin birey sayıları ile yumurtaların açılma oranları Tablo 2, 3, 4, 5 ve Şekil 1'de verilmiştir.

Tablo 2. Afyonkarahisar ili ve ilçelerinde 04.06.2017 tarihinde yapılan birinci örnekleme çalışmasında toplanan patates böceği verileri

Araziye çıkış 1	Yumurta sayısı	Yumurta açılma oranı (%)	Larva sayısı	Pupa sayısı	Ergin sayısı
Sandıklı	108	44,44	27	14	82
Şuhut	174	16,09	25	17	85
Dinar	75	20	20	20	10
Merkez	10	10	2	9	5
Emirdağ	864	37,50	145	79	450
Çobanlar	74	16,21	17	25	24

Yapılan ilk örnekleme çalışmasında en çok yumurta Emirdağ ilçesinde bulunurken açılma oranı %37,50 olmuştur. Afyon merkezinde bulunan örnekleme parselinde ise toplanan 10 yumurtadan yalnızca 1 tanesi açılmıştır.

Şuhut, Dinar ve Emirdağ ilçelerinde yapılan çalışmada ilk örnekleme göre yumurta açılma oranlarında azalma görülmüştür. Bunun nedeni olarak haziran ayının ortalarından itibaren kimyasal

uygulamaların daha yoğun şekilde yapılması gösterilebilir (Tablo 3).

Tablo 3. Afyonkarahisar ili ve ilçelerinde 25.06.2017 tarihinde yapılan birinci örnekleme çalışmasında toplanan patates böceği verileri

Araziye çıkış 2	Yumurta sayısı	Yumurta açılma oranı (%)	Larva sayısı	Pupa sayısı	Ergin sayısı
Sandıklı	87	12,64	29	16	291
Şuhut	110	9,09	31	57	189
Dinar	56	7,14	12	19	103
Merkez	19	10,52	10	13	31
Emirdağ	89	7,86	24	22	97
Çobanlar	72	31,94	12	32	61

Tablo 4. Afyonkarahisar ili ve ilçelerinde 16.07.2017 tarihinde yapılan birinci örnekleme çalışmasında toplanan patates böceği verileri

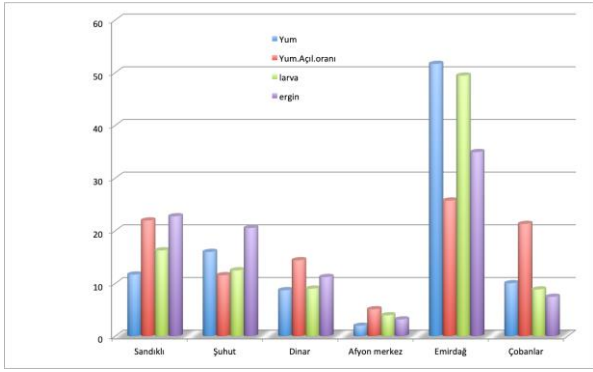
Araziye çıkış 3	Yumurta sayısı	Yumurta açılma oranı (%)	Larva sayısı	Pupa sayısı	Ergin sayısı
Sandıklı	27	14,81	38	7	26
Şuhut	14	14,28	12	4	96
Dinar	18	16,66	12	9	70
Merkez	5	0	6	3	12
Emirdağ	47	36,17	142	27	63
Çobanlar	38	21,05	17	26	41

Tablo 5. Afyonkarahisar ili ve ilçelerinde 06.08.2017 tarihinde yapılan dördüncü örnekleme çalışmasında toplanan patates böceği verileri

Araziye çıkış 4	Yumurta sayısı	Yumurta açılma oranı (%)	Larva sayısı	Pupa sayısı	Ergin sayısı
Sandıklı	6	16,66	9	4	19
Şuhut	14	7,14	11	3	7
Dinar	21	14,28	13	4	23
Merkez	4	0	7	1	10
Emirdağ	9	22,22	2	1	32
Çobanlar	12	16,66	10	3	11

Tablo 2, 3, 4 ve 5'de görüldüğü üzere ilçelere ve yapılan örnekleme çalışmaları göre yumurta açılma oranları birbirinden farklı olup bu oran %0 ile %44,44 değerleri arasında belirlenmiştir. Maksimum yumurta açılma oranı ortalaması Sandıklı ilçesinde, minimum açılma oranı ortalaması ise Afyonkarahisar merkez ilçesi örnekleme parselinde saptanmıştır. Tablo 1'de verilen parsellere ait yükseklik değerleri açısından durum değerlendirildiğinde yumurta açılma oranlarının yükseklik değerleri ile ilişkili olmadığı anlaşılmıştır. Açılma oranlarının farklı oluşunun sebebi olarak örnekleme yapılan altı ilçede yapılan ilaçlama uygulamaları olabileceği düşünülmüştür. Afyonkarahisar merkezde bulunan parselde ilaçlama uygulamasının düzenli periyotlarla yapıldığı, buna bağlı olarak örnekleme çalışmalarında en az yumurta sayısı ve yumurta açılma oranı burada yapılan örnekleme sonucunda bulunmuştur. Gürkan ve Boşgelmez [5]'in Ankara'da yaptıkları çalışmada patates üretimi yapılan parsellerden topladıkları tüm yumurtaların açılma oranı ortalaması %87,3 olarak saptanmıştır. Ürgüp (Nevşehir)'te yapılan diğeri bir çalışmada ise yumurta açılma oranı %47,8 olarak bulunmuştur [13]. Bu çalışmada da belirtildiği gibi laboratuvara getirilen yaprakların tazeliğini

kaybetmesi yumurta açılma oranlarının düşük olmasına neden olabilir.



Şekil 1. Afyonkarahisar ili ilçelerinde elde edilen patates böceği verileri

Sandıklı ilçesinde yapılan tüm örnekleme çalışmalarında 228 yumurta toplanmıştır.

Şuhut ilçesinde yapılan örnekleme çalışmalarında patates tarlalarından 312 adet yumurta bulunsa da toplanan yumurtaların açılma oranı ortalaması %11,65 olarak bulunmuştur. Ergin birey sayıları ise Sandıklı ilçesi ile yakın değerler olarak tespit edilmiştir.

Dinar ilçesinde yapılan çalışmalarda 170 yumurta, 57 larva ve 206 ergin toplanmıştır. Yumurtaların açılma oranları ortalamaları, toplanan 170 yumurtada %14,52'dir.

Afyon merkezde yapılan dört örnekleme çalışmasında 38 adet yumurta, 25 larva, 58 ergin elde edilmiştir. Bu parselde yapılan çalışmalar sonucu elde edilen veriler diğer parseller ile kıyaslandığında oransal olarak oldukça az sayıda tespit edilmiştir. Örnekleme yapıldığı altı ilçe arasında toplanan yumurta sayısı, elde edilen yumurtaların açılma oranları, larva ve ergin sayısı açısından en düşük değerler bu parselden alınmıştır. Üçüncü ve dördüncü örnekleme çalışmalarında toplanan toplam 9 yumurtada açılma gözlenmemiştir.

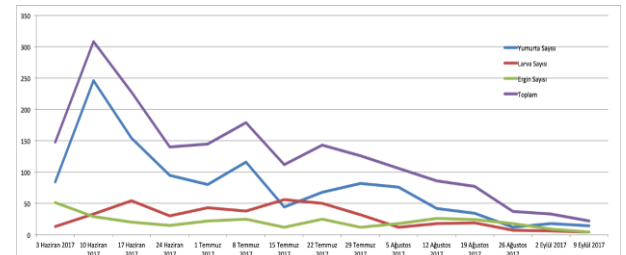
Emirdağ ilçesinde yapılan çalışmalardaki veriler 1009 yumurta, 313 larva, 642 ergin olarak tespit edilmiştir. Afyon merkezdeki parselin aksine bu parselde yapılan çalışmalarda yumurta sayısı, yumurta açılma oranları, larva sayısı ve ergin sayısı açısından en yüksek değerlere sahiptir. Parselden dört örneklemede toplanan 1009 yumurtanın %25,94'ü açılmıştır. Emirdağ ilçesinde yapılan ilk örneklemede yumurta açılma oranı %37,50 iken parselde haziran ayının üçüncü haftası yapılan kimyasal uygulaması ile yumurta, larva ve ergin popülasyonunda ciddi bir düşüş yaşanmıştır. İkinci örnekleme sonucu toplanan 89 yumurtanın yalnızca 7 tanesi açılmıştır.

Çobanlar ilçesindeki patates tarlasında tüm örnekleme çalışmalarında toplam 196 adet yumurta

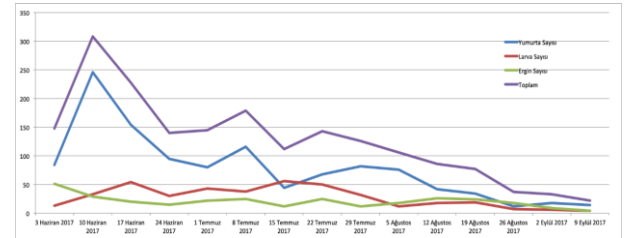
bulunmuştur. Yumurtaların açılma yüzdeleri ortalaması %21,47 olarak hesaplanmıştır. Dört örneklemede de yumurta açılma oranları haziran sonunda hafif artış göstermekle beraber ciddi bir dalgalanma göstermemiştir.

3.2. Patates böceğinin Bolvadin ilçesindeki popülasyon değişimi

Çalışmanın ikinci aşamasında, Afyonkarahisar iline bağlı Bolvadin ilçesinin merkezinde iki patates tarlasında *L. decemlineata*'nın yayılışı ele alınmıştır. Arazi çalışmaları Bolvadin ilçesinin Erkmen ve Şihlar mahallelerinde yer alan patates üretim alanlarında sürdürülmüştür. Her hafta bir kez ziyaret olacak şekilde gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen patates böceğinin tüm dönemlerine ait bireylerinin sayıları (Tablo 6 ve 7)'de ve bu sayısal değerlere göre çizilen popülasyon değişimi ise (Şekil 2 ve 3)'de grafikler şeklinde gösterilmiştir.



Şekil 2. Erkmen mahallesindeki *L. decemlineata* popülasyon değişimi



Şekil 3. Şihlar mahallesindeki *L. decemlineata* popülasyon değişimi

Şekil 2 incelendiğinde patates böceği yumurta sayısının 10.06.2017 tarihinde yapılan 2. arazi çalışmasında en üst seviyeye ulaştığı, genel popülasyon yoğunluklarının başlangıçta yüksek olduğu, 24.06.2017 tarihinden sonra zararlı popülasyonunun dalgalanmalar göstermeye başlaması ve 19.08.2017 tarihi itibarı ile düzenli bir şekilde azalarak, hasat dönemine kadar devam ettiği görülmektedir.

Her iki şekil bir arada incelendiğinde zararlının parsellerdeki popülasyon dalgalanmalarının benzerlik gösterdiği anlaşılmaktadır. Erkmen ve Şihlar mahallesinde böcek çıkışları aynı döneme denk gelmiştir. Parseller arasında fazla uzaklık bulunmaması (4 km), benzer çevre koşulları, yükseklik farkının olmayışı gibi nedenlerden dolayı dalgalanmalar benzerlik göstermiştir. Ancak Şihlar mahallesinde yer alan tarladaki popülasyon düzeyi

Erkmen mahallesindeki tarlaya göre daha düşük düzeyde seyretmiştir. Bunun nedeni olarak çevrede daha fazla sayıda patates üretimi yapılan tarla bulunması ve o tarlalarda yapılan kimyasal uygulamaların örnekleme parselindeki popülasyon seviyesini bir miktar etkilemiş olması olarak düşünülmektedir.

Tablo 6. Bolvadin ilçesinin Erkmen mahallesindeki patates tarlasından elde edilen *L. decemlineata* sayıları

Tarih	Yumurta Sayısı	Larva Sayısı	Pupa sayısı	Ergin Sayısı	Toplam
03.06.2017	84	13	11	51	159
10.06.2017	246	33	17	29	325
17.06.2017	154	54	16	20	244
24.06.2017	95	30	13	15	153
01.07.2017	80	43	9	22	154
08.07.2017	116	38	11	25	190
15.07.2017	44	56	6	12	118
22.07.2017	68	50	11	25	154
29.07.2017	82	32	16	12	142
05.08.2017	76	12	11	18	117
12.08.2017	42	18	19	26	105
19.08.2017	34	19	11	24	88
26.08.2017	12	7	5	18	42
02.09.2017	18	6	2	9	35
09.09.2017	14	4	0	4	22

Tablo 7. Bolvadin ilçesinin Şihlar mahallesindeki patates tarlasından elde edilen *L. decemlineata* sayıları

Tarih	Yumurta sayısı	Larva Sayısı	Pupa sayısı	Ergin Sayısı	Toplam
03.06.2017	56	20	14	19	109
10.06.2017	45	6	12	12	75
17.06.2017	42	17	6	18	83
24.06.2017	60	43	19	25	147
01.07.2017	38	24	8	14	84
08.07.2017	66	15	10	27	118
15.07.2017	45	19	18	19	101
22.07.2017	25	12	7	13	57
29.07.2017	60	17	6	8	91
05.08.2017	31	19	10	12	72
12.08.2017	23	6	6	5	40
19.08.2017	10	8	5	9	32
26.08.2017	25	14	6	10	55
02.09.2017	14	5	4	8	31
09.09.2017	16	14	5	9	44

4. Tartışma ve Sonuç

Afyonkarahisar il merkezi ve ilçeleri genelinde haziran ayı başından, hasadın yapıldığı eylül ayı başına kadar patates böceğinin yayılışı dalgalanmalar göstererek devam etmiştir. Bolvadin ilçesinde patates böceği için etkili sıcaklıklar toplamı 1125,61 günde derece olarak bulunmuştur. Bu değerden yola çıkılarak bu bölgede patates böceğinin yılda 3.35 döl verebileceği hesaplanmıştır. Uygun [14]'ün Tokat ili Reşadiye ilçesinde yaptığı çalışmada, patates böceğinin Reşadiye koşullarında bir yılda verebileceği döl sayısının 1.1 olduğu bildirilmektedir. Gürkan ve Boşgelmez [10], patates böceğinin Orta Anadolu Bölgesi'nde yılda 1.5, Marmara Bölgesi'nde 3 ile 4 döl arasında verdiği bildirilmiştir. Tüm sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde patates böceğinin

bölgelere bağlı olarak farklı döl sayılarına sahip olduğu söylenebilir. Bu durumun bölgelerin iklim koşullarının birbirinden farklı oluşundan kaynaklanabileceği söylenebilir. Sonuç olarak çalışmadan elde edilen verilere göre Afyonkarahisar ili Bolvadin ilçesinde nisan-mayıs aylarında ekilişi yapılan patates bitkisinde haziran ayının ikinci haftasından itibaren patates böceğinin çıkışları başlamakta ve hasadın yapıldığı eylül ayına kadar parsellerde böcek gözlemlenmektedir. Ürün kaybı, verim düşüklüğü endişesi yaşayan üreticiler ekonomik zarar eşiği değerini gözetmeksizin zaman zaman bilinçsiz kimyasal mücadele yöntemlerine başvurmuşlardır. Nouri-Ganbalani vd. [15], İran'ın Ardabil bölgesinde yaptıkları çalışma sonucunda patates böceğinin ekonomik zarar eşiğinin bitki başına 5-6 larva olduğunu vurgulamaktadırlar. Bölgede yürütülen bu çalışmada zararlıın söz konusu Ekonomik zarar eşiğine ulaşmadığı gözlenmiştir. Buna rağmen yoğun şekilde yapılan kimyasal uygulamalarının doğal düşmanlar üzerine olumsuz etki yaptığı ve doğal dengeyi bozduğu düşünülmektedir. Bu sebeplerle ülkemizin patates üretiminde 5. Sırada yer alan Afyonkarahisar ilinde yapılan bu çalışma, bölgede yapılabilecek diğer çalışmalara ışık tutması açısından önem kazanmaktadır.

Teşekkür

Araştırmanın yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen Bolvadin Tarım ve Orman İlçe Müdürlüğü personeline teşekkür ederim.

Kaynakça

- [1] Yağdı, K., Çiftçi, E.A., Kurt Polat, P.Ö., 2015. Tarla Bitkileri Tohumluğu Üretimi, Kullanımında Değişimler ve Yeni Arayışlar. TMMOB Ziraat Mühendisleri VIII. Teknik Kongresi, Bildiriler Kitabı 2, 12-16 Ocak, Ankara, 971-984.
- [2] Şenköylü, N., 2015. Türkiyede ve Dünyada Yem Sektörüne Genel Bakış, Beklentiler. TMMOB Ziraat Mühendisleri VIII. Teknik Kongresi, Bildiriler Kitabı 2, 12-16 Ocak, Ankara, 1053-1068.
- [3] Dursun, E., Urkan, E., Pekitkan, F.G., Caner, Ö., Tozan, M., Güler, H., 2015. Pestisit Uygulama Teknolojilerindeki Gelişmeler. TMMOB Ziraat Mühendisleri VIII. Teknik Kongresi, Bildiriler Kitabı 1, 12-16 Ocak, Ankara, 321-349.
- [4] Arıoğlu, H., Onaran, H., 2002. Niğde Koşulları Patates Yetiştiriciliğinde; Farklı Yumru İriliği ve Bitki Sıklığının, Yumru Verimi ve Yumru Kalibrasyonu Üzerine Etkileri. 3. Ulusal Patates Kongresi Bildiriler Kitabı, 125-135, İzmir.
- [5] Köse, E., Seyrani, S., 2005. Marfona ve Granola Patates Çeşitlerinde (*Solanum tuberosum*) in Vitro Mikro Yumru Üretimi. Türkiye II.

- Tohumculuk Kongresi, 9-11 Kasım, Adana, 171-178.
- [6] TAGEM, 2018. Tarım Ürünleri Piyasası: Patates. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/PDF%20Tar%C4%B1m%20%C3%9Cr%C3%BCnleri%20Piyasalar%C4%B1/2018-Ocak%20Tar%C4%B1m%20%C3%9Cr%C3%BCnleri%20Raporu/2018-Ocak%20Patates.pdf> (Erişim Tarihi: 31.03.2020).
- [7] FAO, 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Agriculture Department Databases and Statics. <http://www.fao.org/statistics/en/> (Erişim Tarihi:31.03.2020)
- [8] Worner, S.P., 1988. Ecoclimatic Assessment of Potential Establishment of Exotic Pests. *Journal of Economic Entomology*, 81(4), 973-983.
- [9] Atlıhan R., Yardım, E.N., Özgökçe, M.S., Kaydan, M.B., 2002. Van İli Çevresinde Patates Ekiliş Alanlarındaki Zararlı Böcek Türleri ve Doğal Düşmanları. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 9(3), 291-295.
- [10] Gürkan, B., Boşgelmez, A., 1984. Patatesböceği (*Leptinotarsa decemlineata* Say.)'nin Popülasyon Dinamiği. *Bitki Koruma Bülteni*, 24(3), 119-136.
- [11] Karaca, İ., S. Özgökçe ve D. Şenal, 2002. Entomolojide popülasyon takibi ve örnekleme yöntemleri. Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları: 16, Ders notu: 3, 68 s.
- [12] Atak, U., 1973. Trakya Bölgesinde Patatesböceği (*Leptinotarsa decemlineata* Say.)'nin Morfolojisi, Biyokolojisi ve Savaş Metotları Üzerinde Araştırmalar. T.C. Tarım Bakanlığı Zirai Karantina Genel Müdürlüğü Teknik Bülteni, 6, 63s.
- [13] Kekilioğlu, A., Yılmaz, M., 2018. Patates Böceği [*Leptinotarsa decemlineata* Say. (Coleoptera: Chrysomelidae)]'nin Nevşehir İlinde Yaşamsal Etkileşim ve Çeşitliliği Üzerine Bir Ön Çalışma. *ANADOLU, Journal of Aegean Agricultural Research*, 28(1), 100–107.
- [14] Uygun, Z., Karaca, İ., 2015. Tokat İli Patates ve Patlıcan Üretimi Yapılan Alanlarda Patatesböceği (*Leptinotarsa decemlineata* (Say, 1824)) (Coleoptera: Chrysomelidae)'nin Yayılışı, Doğal Düşmanları ve Popülasyon Değişimi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 19(2):184-189.
- [15] Nouri- Ganbalani, G., Fathi, A., Nouri-Ganbalani, A., 2010. Economic injury level for Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) on 'Agria' potatoes in Ardabil, Iran. *Munis Entomology and Zoology*, 5(2), 764-771.

Arpada Farklı Gama Radyasyon Dozu Uygulamalarının M₂ Generasyonunda Bazı Tarımsal Özellikler Üzerine Mutagenik Etkilerinin Belirlenmesi

Tuğçe Ayşe KARAKOCA¹ , İlknur AKGÜN*² 

^{1,2}Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 32000, Isparta, Türkiye

(Alınış / Received: 26.06.2019, Kabul / Accepted: 13.12.2019, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Anahtar Kelimeler

Arpa,
Gama-ışını,
Bitki boyu,
Başak özellikleri

Özet: Bu çalışma, Tarm-92 iki sıralı arpa çeşidi tohumlarına uygulanan farklı dozlarda gama ışınının (200, 300, 400 ve 500 Gy) M₂ bitkilerinde bazı tarımsal özellikler üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Araştırma Isparta koşullarında 2016-2017 vejetasyon döneminde yürütülmüştür. Araştırmada kontrol (ışın uygulanmamış), 200, 200 A, 300, 300 A, 400, 400 A, 400 A (Ç.B.) 500 ve 500 A gray dozları olmak üzere toplam 10 parsel yer almıştır. Parsellere dekara 10 kg/da azot ve 6 kg/da fosfor (P₂O₅) hesabıyla gübre uygulanmıştır. Araştırmada gama ışınlarının bitki boyu, başak uzunluğu, başakta tane sayısı ve başakta tane ağırlığı üzerine etkileri incelenmiştir. Araştırma sonucunda; ortalama bitki boyu kontrolde 72.10 cm, M₂ generasyonunda 55.19-70.22 cm; başak uzunluğu kontrolde 8.71 cm, M₂ generasyonunda 7.43-9.13 cm; başakta tane sayısı kontrolde 23.49 adet, M₂ generasyonunda 20.36-23.42 adet, başakta tane ağırlığı kontrolde 2.73 g iken M₂ generasyonunda 1.25-2.46 g arasında değişim göstermiştir. İncelenen özelliklerden bitki boyu, başakta tane sayısı, başakta tane ağırlığında kontrol grubuna göre gama radyasyon uygulaması ile genel olarak azalma, başak uzunluğunda artış gözlemlenmiştir. Araştırma sonucunda; 300 ve 400 Gy uygulamalarında incelenen özellikler yönünden daha fazla varyasyonun meydana geldiği belirlenmiştir.

Determination of the Mutagenic Effect of Different Gamma Radiation Doses Applications on Some Agricultural Characteristics of Barley in M₂ Generation

Keywords

Barley,
Gamma-rays,
Plant length,
Spike characters

Abstract: This study was aimed to determine the effects of different doses of gamma radiation (200, 300, 400 and 500 Gy) on some agricultural properties of M₂ generation of 'Tarm-92' barley variety. The research was conducted in 2016-2017 vegetation period under Isparta conditions. Total 10 plots were taken in the study as control (non-irradiated), 200, 200 A, 300, 300 A, 400, 400 A, 400 A (Ç.B.) 500 and 500 A gray doses. The plots were fertilized with 10 kg/da nitrogen and 6 kg/da phosphorus (P₂O₅). During the study the data on plant height, spike length, number of grain per spike and weight of grain per spike were collected. Results showed that average plant height was 72.10 cm in the control and ranged from 55.19 to 70.22 cm in M₂ generation. Spike length ranged from 7.43 to 9.13 cm in M₂ generation and was 8.71 cm in the control plants. The number of seed per spike was 23.49 in control, whereas it ranged from 20.36 to 23.42 in M₂ generation. The seed weight per spike was 2.73 g in control and ranged from 1.25 to 2.46 g in M₂ generation. While gamma radiation reduced plant height, number of seed per spike, weight of seed per spike it increased spike length compared to control plants in 'Tarm-92' barley variety. The results indicated that 300 and 400 Gy applications produced more variations in terms of examined agricultural characteristic.

*İlgili yazar: ilknurakgun@isparta.edu.tr

1. Giriş

Hayvan beslenmesinde önemli yere sahip olan arpa tanesinin bünyesi, yaklaşık olarak % 67 karbonhidrat, % 10 protein, % 2 yağ, % 5 selüloz içermekte olup, kalsiyum, fosfor, potasyum gibi mineraller ile A, E ve B vitaminlerince de zengindir [1]. Ayrıca içerisindeki yüksek sindirilebilir lif oranı ve yüksek β -glukan oranından dolayı arpa, insan beslenmesinde önem kazanmaya başlamış ve bazı ülkelerde buğday ununa katkı maddesi olarak kullanıldığı bildirilmiştir [2]. Günümüzde dünyada üretimi yapılan arpanın kullanım alanları içerisinde, hayvan yemi (% 68), sanayi amaçlı (% 21) ve gıda endüstrisi (% 5) sayılmaktadır. Türkiye’de ise hayvan yemi (% 90) ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır [3].

Bitkisel üretimde istenilen miktarda üretim artışı sağlayabilmek amacıyla yapılacak çalışmaların başında, yüksek verim potansiyeli olan, yetiştirme şartlarına uyum gösteren, kalite özellikleri yönünden iyi, hastalık ve zararlılara karşı dayanıklı yeni çeşitlerin elde edilmesi, üretimdeki çeşitlerin geliştirilmesi ve yaygınlaştırılması gelmektedir [4]. Yeni çeşitlerin geliştirilmesinde kullanılacak yöntemlerden birisi de kolay ve kısa sürede sonuç veren mutasyon ıslahıdır. Mutasyon; kromozomlardaki sayı ve yapı değişiklikleri ile genlerdeki değişimler olarak ifade edilmektedir [5]. FAO/IAEA mutant çeşit listesine göre 2000 yılından önce 2252 adet çeşit, mutasyon yolu ile elde edilmiştir. Mutasyonla geliştirilen çeşit sayısı 1995 yılında 154 iken, 2000 yılında 175 olarak kaydedilmiştir. Geliştirilen çeşitlerin büyük bir çoğunluğu tahıllar (1072) grubundadır. Bu mutasyonların büyük bir çoğunluğu (% 64) Gama ıslahı sonucu elde edilmiştir [6].

Bu konuda yapılan bir çalışmada, tritikale (cv T77) ve arpa (cv C4) üzerine 5, 10, 20, 30 ve 40 krad (kR) gama ışınlarını uygulanmış ve M₃ generasyonundaki bitki boyu, başak uzunluğu ve başakta tane sayısını incelenmiştir. Araştırma sonucunda, uygulanan gama dozlarıyla oluşturulan varyasyonun çeşide, radyasyon dozuna ve çeşitle doz arasındaki etkileşime bağlı olduğu ve ayrıca, yüksek radyasyon dozlarının çok daha zararlı etki yaptığı bildirilmiştir [7]. Diğer bir çalışmada, buğday genotiplerine farklı gama dozlarının (0, 15, 25, 35 ve 45 kR) M₁ bitkilerindeki etkilerini araştırmışlar ve çalışma sonucunda 25 kR’tan yüksek dozlarda başaklanmanın geciktiği ve 15 kR’lık dozda en hızlı başaklanmanın olduğu belirlenmiştir [8].

Arpada mutasyon çalışmalarında farklı fiziksel ve kimyasal mutagen kaynakları kullanılmaktadır. Gamma ışını olarak en fazla kullanılan doz 150-400 Gray arasındadır. FAO/ IAEA listelerinde resmi olarak kayıtlı 269 mutant arpa çeşidi yer

almaktadır. Bunlardan 53 tanesi doğrudan çeşit olarak kullanıldığı, 216 tanesinin ise melezlemelerde ebeveyn olarak yer aldığı tespit edilmiştir. Özellikle yarı bodurluk sağlayan genler birçok çeşide aktarılmıştır. Yine sağlam saplı, yüksek verimli, malt kalitesi geliştirilmiş Golden Promise çeşidi Avrupa’da yaygın olarak yetiştirilmekte olduğu bildirilmiştir [9]. Bu veriler günümüz uygulamalarında mutasyonun, bitki ıslahında kullanıldığını göstermektedir.

Ülkemizde arpa üzerinde çeşit geliştirme ve yetiştirme tekniği çalışmalarına Cumhuriyetin ilk yıllarında Eskişehir, Ankara ve Yeşilköy Araştırma İstasyonları ve 1933’de Yüksek Ziraat Enstitüsünün kurulmasıyla başlanılmış ve giderek hız kazanmıştır [10]. Bu çalışmada arpada mutasyon ıslahı ile kalite ve verimin artırılması hedeflenmiştir. Çalışmada amaç, iki sıralı arpa çeşidi ‘Tarım-92’ üzerinde farklı gama dozu ışınlarının M₂ generasyonundaki bazı tarımsal özellikler üzerine etkileri incelenmiştir.

2. Materyal ve Metot

Bu çalışmada Tarm-92 arpa çeşidi tohumlarına 2016 yılında Türkiye Atom Enerjisi Kurumu’nda mutagen olarak 0.6 megarad/saat gücündeki kobalt-60 kaynağından elde edilen gama ışınları kullanılmıştır. Araştırmada tohumlara 200, 300, 400, 500 ve 600 Gray doz gama radyasyonu uygulanmış ve her uygulamada 2500 tohum radyasyona tabi tutulmuş ve o yıl sera şartlarında ekimi yapılmıştır. Hasat sonucu elde edilen tohumları, her dozdan başak ve bitki görünümüne göre normal görünümlü ve anormal görünümlü olarak gruplandırılıp (Örneğin 200 Gy kontrol grubunun başak yapısına, 200 (A) Gy anormal başak yapısı küçük, tohum tutmamış ya da büyük) farklı parsellere bir sonraki generasyonu oluşturmak üzere ekilmiştir. 2016 yılı vejetasyon döneminde 600 Gy dozunda çıkış olmadığından, bu doz denemeye alınmamıştır. Ayrıca 400 Gy dozu uygulamasında çift başak oluşumu ve başakta dallanma eğilimi gösteren bitkilere (ÇB) rastlanmış, 400 (A) Gy anormal grubuna dahil edilmemiş, ayrı bir sıra olarak ekilmiştir.

Araştırmada kontrol (ışın uygulanmamış), 200, 200 A, 300, 300 A, 400, 400 A, 400 A (ÇB) 500 ve 500 A gray dozları olmak üzere toplam 10 parsel yer almıştır. Denemede her gruptan elde edilen tohum miktarına bağlı olarak parsellerde sıra sayısı değişmiştir. Kontrol 5 sıra, 200 Gy 5 sıra, 200A Gy 8 sıra, 300 Gy 7 sıra, 300A Gy 4 sıra, 400 Gy 4 sıra, 400A Gy 5 sıra, 400A (Ç.B.) Gy 1 sıra, 500 Gy 6 sıra, 500A Gy 1 sıra olacak şekilde ekim yapılmıştır. Araştırmada parseller sıra uzunluğu 4 m, sıra arası mesafe 30 cm olacak şekilde düzenlenmiştir. Parseller arasında ilave bir mesafe bırakılmamıştır.

Çalışmada tüm parsellere 10 kg/da azot ve 6 kg/da fosfor (P₂O₅) hesabıyla gübreleme yapılmıştır. Azotlu gübrenin yarısı ekimle birlikte amonyum sülfat formunda, diğer yarısı ise sapa kalkma devresinde amonyum nitrat formunda, fosforlu gübrenin tamamı ise ekimle birlikte triple süper fosfat gübresi kullanılarak verilmiştir. Olgunlaşma tamamlandıktan (tam olum döneminde) sonra kontrol bitkilerde başlangıç sırası kenar tesiri olarak atıldıktan sonra kalan (4 sıra) sıra ve radyasyon uygulamasına tabi tutulan tüm bitkileri toprak yüzeyinden el ile hasat edilmiştir. Her bitki ayrı ayrı ölçümler yapılarak harmanı yapılmıştır. Ayrıca, 500 A Gy grubunda çıkış olmadığından bu uygulama deneme dışı bırakılmıştır.

Denemenin yürütüldüğü dönemde ortalama sıcaklık (9.8°C) ve toplam yıllık yağış miktarının (467.2 mm) aynı döneme ait uzun yıllar ortalamasından (ortalama sıcaklık 10.1 °C; toplam yağış 500.5 mm) daha düşük olduğu belirlenmiştir (Tablo 1).

Deneme alanından 0-30 cm derinliğinde alınan toprak örneklerinin analiz sonuçlarına göre; toprağın strüktürü killi-tınlı bir yapıya sahip olup, hafif alkali (pH 7.9), organik madde (0.85), kireç oranı % 29.48 ve fosfor içeriği yetersiz (7.20 kg/da), potasyum (176.24 kg/da) bakımından ise yeterli seviyeye sahiptir.

Çalışmada hasat edilen tüm bitkilerde (ana sap ve kardeşler) bitki boyu (cm), başak boyu (cm), başakta tane sayısı (adet) ve başakta tane ağırlığı (g) özelliklerine ait veriler tek bitki üzerinden elde edilmiştir. Kontrol grubunda 100 bitki üzerinden değerlendirmeler yapılmış, diğer uygulama gruplarında ise başak oluşturan tüm bitkiler değerlendirmeye alınmıştır. Araştırmada tüm uygulamalarda kardeşler tam olarak ayrılamadığı için ana sapın yanında kardeşlerin başaklarında da ölçüm yapılmıştır. Elde edilen bu verilerde MINITAB istatistik paket programında önce ortalama, minimum, maksimum ve standart sapma değerleri

belirlenmiş daha sonra discriminant (ayırma) analizi yapılmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Bitki boyu

Kobalt 60 (⁶⁰Co) gama dozu uygulanan iki sıralı Tarm-92 arpa çeşidinin M₂ generasyonunda bitki boyu ortalamasına ait değerler Tablo 2'de verilmiştir. Araştırmada sıralardaki tüm hasat edilen bitkilerin boyları ölçülerek bitki boyu değerleri elde edilmiştir. Bu nedenle kontrol grubu bitki boyunda (55-86 cm) geniş varyasyon meydana gelmiştir.

Araştırmada M₁ generasyonunda oluşturulan farklı dozlardaki gama gruplarının döllerinde (M₂ generasyonu) en yüksek ortalama bitki boyu 72.10 cm ile kontrol grubunda belirlenmiştir. Gama uygulaması bitki boyunda azalmaya neden olmuş ve en düşük ortalama bitki boyu 55.19 cm ile M₁ generasyonunda 300 anormal (A) grup olarak ayrılan örneklerden elde edilmiştir. Yine 200 anormal grupta ortalama bitki boyu 58.35 cm ile bazı gruplardan daha düşük bulunmuştur. Gama uygulamasından sonra M₁ generasyonunda, kontrole benzeyen başaklarda herhangi bir anormallik bulunmayan örnek gruplarında (200 Gy, 300 Gy, 400 Gy, 500 Gy) ortalama bitki boyu kontrol grubundan daha düşük bulunmuş ve sırasıyla 61.21 cm, 60.99 cm, 59.31 cm ve 65.48 cm olmuştur. Çift başaklı olarak ayrı sıraya ekilmiş örnek grubunda ise ortalama bitki boyu 70.22 cm ile kontrole en yakın grubu oluşturmuştur. Ancak diğer gama dozu gruplarında olduğu gibi, bu grup içerisinde de kontrole göre daha kısa (33.00 cm) ve daha uzun bitkiler (92.00 cm) belirlenmiştir. Araştırmada her uygulamadaki maksimum ve minimum değerler incelendiğinde 400 A ve 500 gray doz uygulamalarında en uzun (96.00 cm) ve 300 A gray doz uygulamasında ise en kısa (21.00 cm) bitkiler elde edilmiştir (Tablo 2).

Tablo 1. Isparta ili denemenin yürütüldüğü yıl ve uzun yıllara ait iklim verileri*

Aylar	Ortalama Sıcaklık (°C)		Toplam Yağış (mm)		Ortalama Nispi Nem (%)	
	2016-2017	Uzun Yıllar Ortalaması**	2016-2017	Uzun Yıllar Ortalaması	2016-2017	Uzun Yıllar Ortalaması
Kasım	7.2	7.8	48.8	45.2	64.7	70.0
Aralık	0.3	3.5	33.5	87.5	69.5	75.8
Ocak	0.8	1.8	87.8	80.8	77.9	75.2
Şubat	3.0	2.9	3.6	68.1	68.5	71.6
Mart	7.3	5.9	74.4	59.1	64.1	66.0
Nisan	10.6	10.7	25.6	52.9	59.6	61.5
Mayıs	14.9	15.4	149.5	56.7	63.7	59.2
Haziran	20.1	19.8	30.9	33.6	58.9	52.5
Temmuz	25.2	23.4	13.1	16.3	41.9	45.7
Ort./Top.	9.8	10.1	467.2	500.5	63.20	64.17

*:Kaynak: Meteoroloji Genel Müdürlüğü

** : Uzun yıllar 1929 ile 2018 yılları arasındaki iklim verileridir

Tablo 2. Farklı gama dozu uygulanan Tarm-92 arpa çeşidinin M₂ generasyonuna ait bitki boyu (cm)

Uygulama Dozu (Gy)	N	Ortalama± std	Minimum Değer	Maksimum Değer
Kontrol	100	72.10 ± 6.87	55.00	86.00
200	140	61.21 ± 17.74	23.00	91.20
200 A	175	58.35 ± 13.93	30.00	88.00
300	193	60.99 ± 15.75	29.00	91.50
300A	256	55.19 ± 18.19	21.00	92.00
400	149	59.31 ± 15.32	23.00	86.30
400A	170	64.19 ± 17.61	24.50	96.00
400 A (Ç.B.)	77	70.22 ± 13.36	33.00	92.00
500	180	65.48 ± 14.99	29.00	96.00

N:Örnek sayısı

Çalışmada ortalama bitki boyu değerleri incelendiğinde, gama ışını uygulaması kontrole göre bitki boyunu azaltmıştır. Ancak kontrole göre farklı gama dozlarında daha uzun bitkiler de belirlenmiştir. Arpa için önemli kayıplara neden olan problemlerin başında yatma sorunu gelmektedir. Yatma, hem başak kırılmasına hem de makinalı hasadın yapılmasını engelleyen ve verim kayıplarına yol açan önemli bir problemdir. Bu durumu ortadan kaldırmak amacıyla bitki boyunun kısaltılması ve sap sağlamlığının artırılması gerekmektedir [11].

Arpada başakların tane dolum dönemine girdiğinde bitkinin yatmasındaki ana etmenin uzun boyluluk olduğu ve bitki boyunun eklemeli gen ile yönetildiği bildirilmiştir. Yine uzun boylu bitkilerin, fotosentez ürünü olan asimilatları bitki boyu uzaması için kullandığı, kısa boylu bitkilerin ise, bu ürünleri fertil kardeş oluşturmada kullanmakta ve bu durumda dolaylı olarak tane verimine etki etmektedir [12, 13].

Bilge ve Ersoy [14], arpada 20 Gy gibi düşük dozun bitki boyunda artışa sebep olduğunu ve artan dozlarla birlikte (40, 80 ve 120 Gy) bitki boyunda azalmaların meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Başer vd. [15], makarnalık buğdayda; Katipoğlu [16], Kaya adlı iki sıralı ve Gem adlı altı sıralı arpa çeşitlerinde farklı gama dozları (0, 10, 20 ve 30 kR) uygulamışlar ve sonuç olarak, kontrole göre bitki boyunda önemli azalmalar meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bouma ve Ohnoutka [17] ise, Valticky arpa çeşidinde gama ışınması uyguladıklarında kontrole göre 15 cm daha kısa bitkiler elde etmişlerdir. Yapılan pek çok çalışmada mutagen uygulamalarının bitki boyunda önemli kısalmaya neden olduğunu bildirmektedir [18,19]. Farklı araştırma sonuçları, elde ettiğimiz sonuçlar ile benzerlik göstermektedir.

3.2. Başak uzunluğu

Kobalt 60 (⁶⁰Co) gama dozu uygulanan iki sıralı Tarm-92 arpa çeşidinin M₂ generasyonunda başak uzunluğu ortalamasına ait değerler Tablo 3'te verilmiştir. M₂ generasyonunda, araştırmanın M₁

generasyonundan elde edilen çift başak veya başakta dallanma gibi anormallik gösteren başakların döllerinde bu anormalliklere rastlanmamıştır. Bu oluşumun kalıtsal olmadığı başlangıç generasyonunda mitoz bölünme anormalliklerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Çalışmada M₂ generasyonuna ait en yüksek ortalama başak uzunluğu 9.13 cm ile 400 A (Ç.B.) grubunda belirlenmiştir. Kontrol grubu 8.71 cm ortalama başak uzunluğu ile 400 A (Ç.B.) grubu bitkilerine en yakın grubu oluşturmuştur. Diğer doz uygulamaları bu iki grubun ortalamasından daha düşük çıkmakla beraber, en düşük ortalamaya ve anormal başak yapısı görünümüne sahip grup 7.43 cm ile 300 A grubudur. Bu uygulamaları sırasıyla 400 A Gy (8.42 cm), 200 ve 500 Gy (8.35 cm) dozları takip etmiştir. Uygulamada kontrole göre daha kısa (300 A Gy dozu 3.50 cm) ve daha uzun (200 A Gy dozu 13.00 cm) başak yapısına sahip bitkiler belirlenmiştir (Tablo 3).

Başak uzunluğunun artması, başaktaki fotosentetik kapasitenin yükseltilmesi bitki ıslahçıları tarafından istenen bir özelliktir. Uzun başak yapısına sahip arpalarda tane miktarı fazla olacağından, tane verimi de artacaktır. Başak uzunluğu kalıtım derecesinin yüksek olması nedeniyle, tane verimi için seleksiyonda önemli bir kriterdir [20]. Yine tane verimi ve başak uzunluğu arasında olumlu ve önemli (0.656**) bir ilişki tespit edilmiştir [21]. Yıldırım ve Budak [22], 'Kaya' arpa mutant hatları ve kontrol grup arasında başak uzunluğu ve bitki boyu yönünden önemli bir farklılığın bulunmadığını bildirmişlerdir. Çalışmadan elde edilen veriler sonucunda başak uzunluğu 400 A (Ç.B.) Gy dozunda kontrol grubundan (8.71 cm) daha yüksek olarak belirlenmiş olup, uygulamalara göre başak uzunluğu ise 7.43-9.13 cm arasında değişmiştir (Tablo 3).

Güllap [18], yazlık arpada gama uygulaması sonucunda, kontrol grubunda başak uzunluğunun 8.6 cm, mutant arpaların ise 7.9-11.8 cm arasında değişim gösterdiğini bildirmiştir. Benzer şekilde yapılan bazı çalışmalarda, uygulanan mutagen cinsine ve dozlarına bağlı olarak başak uzunluğunda artma [19,23] ve azalmalar gözlemlenmiştir [24].

Tablo 3. Farklı gama dozu uygulanan Tarm-92 arpa çeşidinin M₂ generasyonuna ait başak uzunluğu (cm)

Uygulama Dozu (Gy)	N	Ortalama± std	Minimum Değer	Maximum Değer
Kontrol	100	8.71 ± 1.00	6.50	11.50
200	140	8.35 ± 1.36	4.00	10.90
200 A	175	8.25 ± 1.64	4.00	13.00
300	193	7.88 ± 1.53	4.50	11.50
300A	256	7.43 ± 1.50	3.50	11.00
400	149	8.20 ± 1.44	4.30	11.00
400A	170	8.42 ± 1.68	4.50	12.00
400 A (Ç.B.)	77	9.13 ± 1.03	7.00	12.00
500	180	8.35 ± 1.47	4.50	12.50

N:Örnek sayısı

3.3. Başakta tane sayısı

Gama uygulaması başakta tane sayısında genel olarak azalmaya neden olmuştur. M₂ generasyonunda incelenen bitkilerin ortalama başakta tane sayısı kontrol grubu dışında 20.36-23.42 adet arasında değişmiştir. En yüksek ortalama başakta tane sayısı 23.49 adet ile kontrol grubundan elde edilmiştir. Yine 400 Gy ve 400 A Gy gruplarında ortalama başakta tane sayısını sırasıyla 23.42 ve 23.24 adet ile kontrol grubuna en yakın değerler elde edilmiştir (Tablo 4). M₂ generasyonunda 300 A Gy grubu 20.36 adet ile en düşük tane sayısı ortalamasına sahip olmuştur.

M₂ generasyonunu oluşturan farklı grupların maksimum ve minimum değerleri incelendiğinde, 200 A grubunda en yüksek (44 adet), 400 A (Ç.B.) olarak tanımladığımız grup içerisinde ise en düşük (15 adet) başakta tane sayısı olan bitkiler belirlenmiştir. 400 A (Ç.B.) grubunda başak uzunluğu diğer gruplardan fazla olmasına rağmen başakta tane sayısında artış meydana gelmemiştir. Bu durum başağın seyrek yapılı ya da başakçıklardaki çiçeklerin kısır olduğunu göstermektedir. 400 ve 400 A gruplarında ortalama başak uzunluğu başakta tane sayısı birbirine yakın bulunmuştur. Yine radyasyona maruz bırakılan her grup kendi içerisinde değerlendirildiğinde (Örneğin 200 ve 200 A gibi) anormal başak yapısına sahip bitkilerde ortalama tohum tutma azalmıştır (Tablo 4).

Mutagen dozlarına bağlı olarak kısırlığın arttığı ve başakta tane sayısının azaldığı farklı araştırmalarda belirlenmiştir. Özellikle gama radyasyonu ile metafaz I'de univalent frekansında ve anafaz I'de görülen kromozom anormalliklerinde artış meydana gelmektedir [25, 26]. Mayoz bölünme anormallikleri tohum tutmayı önemli seviyede azaltmaktadır. Çok yıllık çavdara farklı radyasyon dozlarının uygulandığı çalışmada, 25 kR gama radyasyonunda tohum tutma oranı (%9.39) kontrole göre önemli seviyede (% 82.28) azalmıştır. Buna ilaveten, başaktaki tohum sayısının da radyasyon dozundaki artışa bağlı olarak azaldığını ve en düşük başakta tohum sayısı 25 kR

gama ışınından elde edildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca başakların büyük çoğunluğunun kısır olduğunu tespit etmişlerdir [26]. Yine mutagen uygulamaları anormal başak yapısı, generatif gelişimin engellenmesi, çiçekteki dişi ve erkek organlarda bozulmalar ve anormal tohum gelişimine bağlı olarak embriyonun gelişmemesi gibi anormalliklerin ilk generasyonlarda daha sık rastlandığı farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir [26, 27, 28].

Tahıllarda verimi doğrudan etkileyen özelliklerden birisi de başaktaki tane sayısıdır. Bu nedenle verimi artırma amaçlı yapılan ıslah çalışmalarında özellikle başaktaki tane sayısı büyük önem taşımaktadır. Ayrıca Rachovska ve Dimova [29], başakta tane sayısının, gama ışını uygulanan tohumlarda en hassas özellik olduğunu bildirmiştir.

Yıldırım ve ark. [30], tarafından yapılan çalışmada iki farklı arpa çeşidine 15 ve 30 kR gama radyasyon dozu uygulamışlardır. Araştırma sonucunda başak uzunluğu, başakçık sayısı ve başakta tane sayısının kontrole göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan diğer araştırmalarda da mutagen uygulamalarına bağlı olarak bazılarında tane sayısının arttığı [19], bazılarında ise azaldığı [31] ortaya konulmuştur. Peşkirioğlu ve ark. [32], arpada farklı dozlarda (100, 150, 200, 250 Gy) gama uygulaması çalışmasında başakta tane sayısının 23.9-27.4 adet arasında değiştiğini saptamışlardır. Arpa üzerinde yapılan çalışmalarda başakta tane sayısının, Sirat ve Sezer [33], 21.0-22.6 adet; İmamoğlu ve Yılmaz [34], 20.00-28.9 adet arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

3.4. Başakta tane ağırlığı

Araştırmada gama ışını uygulanan M₂ bitkilerinin ortalama başakta tane ağırlığı 1.25-2.46 g arasında değişmiştir. Radyasyon uygulanan tüm dozlarda başakta tane ağırlığı kontrol grubu ortalamasından (2.73 g) daha düşük bulunmuştur. En düşük başakta tane ağırlığı 400 grubunda tespit edilmiştir (Tablo 5).

Tablo 4. Farklı gama dozu uygulanan Tarm-92 arpa çeşidinin M₂ generasyonuna ait başakta tane sayısı (adet)

Uygulama Dozu (Gy)	N	Ortalama± std	Minimum Değer	Maximum Değer
Kontrol	100	23.49 ± 5.26	14.00	37.00
200	140	22.84 ± 4.90	9.00	34.00
200 A	175	22.04 ± 6.46	9.00	44.00
300	193	21.21 ± 4.98	2.00	33.00
300A	256	20.36 ± 4.01	6.00	32.00
400	149	23.42 ± 4.09	8.00	32.00
400A	170	23.24 ± 5.09	9.00	33.00
400 A (Ç.B.)	77	21.06 ± 4.01	15.00	30.00
500	180	20.69 ± 4.23	10.00	31.00

N:Örnek sayısı

Tablo 5. Farklı gama dozu uygulanan Tarm-92 arpa çeşidinin M₂ generasyonuna ait başakta tane ağırlığı (g)

Uygulama Dozu (Gy)	N	Ortalama± std	Minimum Değer	Maximum Değer
Kontrol	100	2.73 ± 0.37	1.95	4.09
200	140	2.09 ± 0.44	0.90	3.05
200 A	175	2.46 ± 0.50	1.26	3.35
300	193	1.97 ± 0.81	0.06	3.26
300A	256	1.80 ± 0.96	0.05	3.57
400	149	1.25 ± 0.41	0.07	1.94
400A	170	1.90 ± 0.71	0.66	3.34
400 A (Ç.B.)	77	2.40 ± 0.26	1.89	3.12
500	180	2.39 ± 0.33	1.43	3.64

N: Örnek Sayısı

Araştırmada incelenen gruplara ait bitkilerin ortalama başakta tane sayıları, kontrol (23.49 adet), 400 (23.42 adet) ve 400 A (23.24 adet) gruplarında daha fazla bulunmuştur. Ortalama başakta tane sayıları kontrol grubuna benzerlik göstermiş olmasına rağmen, 400 ve 400 A grubuna ait bitkilerin başakta tane ağırlığı düşük bulunmuştur (Tablo 5). Bu durum gama radyasyon uygulamasına bağlı olarak anormal tohum gelişimine açıklanabilir. Tohum tutmayı azaltan mayoz bölünmedeki anormallikler gibi, döllenmeden sonra embriyo ve endosperm gelişimi sağlayan mitoz bölünmede de anormalliklerin meydana geldiğini göstermektedir.

Başakta tane ağırlığı, tane verimini oluşturan kantitatif bir özelliktir. Çeşit geliştirmeye dayalı ıslah çalışmalarında, başakta tane sayısı ile tane ağırlığı birlikte değerlendirilmektedir. Nitekim, farklı ekmeklik buğday çeşitlerinin kullanıldığı bir çalışmada 100, 200, 300, 400 ve 500 Gy gama ışını uygulanmıştır. M₂ generasyonuna ait bitkilerin ortalama başakta tane ağırlığı 1.2-1.65 g arasında değişmiş ve kontrol grubundan daha düşük tane ağırlığı bulunmuştur. Bu çalışmada Bezostaja çeşidinde yüksek (500 Gy) ve düşük (100 ve 200 Gy) radyasyon dozlarında kontrolden daha yüksek tane ağırlığı tespit edilmiştir. Genel olarak başakta tane sayısı fazla olan dozlarda, tane ağırlığı da fazla bulunmuştur. Ancak Kate A-1 çeşidinin radyasyon dozlarına tepkisi farklı olmuş, 100 Gy dozu haricinde tüm uygulamalarda başakta tane ağırlığı azalmıştır. Araştırma sonucunda bitki boyu ve başakta tane sayısının gama radyasyonuna en hassas özellik olduğunu bildirmişlerdir. 200 ile 300 Gy radyasyonunun verim ve verim öğelerini arttırmada faydalı doz olduğunu ileri sürmüşlerdir [35].

Bu konuda yapılan başka bir çalışmada makarnalık buğdaya farklı dozlarda (100, 200, 300, 400 ve 500 Gy) gama ışını uygulanmıştır. Araştırma sonucuna göre ana saptaki başakta tane ağırlığı 100 ve 300 Gy dozlarında kontrole göre daha fazla olmuş ve 300 Gy dozunda istenilen özellikler yönünden varyasyon bulunduğu ileri sürülmüştür [19]. Peşkirioğlu ve ark. [32], tarafından yapılan bir çalışmada arpaya farklı gama dozları uygulanmıştır. Araştırmada tek bitki verimi 8.1-9.5 g arasında değişmiş ve artan gama radyasyon dozu tek bitki verimini arttırmıştır. Ancak en yüksek dozda (250 Gy) tek bitki verimi kontrol ile benzer bulunmuştur (9.5 g). Diğer taraftan Khan vd. [36], arpada 10, 20 ve 30 kR gama dozlarının başakta tane sayısını çok az etkilediği veya hiç etkilemediğini, 40 kR ve üstü dozların ise arpada bazı verim öğelerine olumsuz etki yaptığını bildirmişlerdir. Farklı arpa genotiplerinin kullanıldığı çalışmalarda başakta tane ağırlığını Sırat ve Sezer [33] 1.2-2.5 g olarak bulurken, İmamoğlu ve Yılmaz [34], bu değerlerin 1.0-2.3 g arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

3.5. Diskriminant (Ayırma) analiz sonuçları

Gama ışını uygulaması sonucunda incelenen özellikler yönünden ayırmadaki toplam başarı oranı %29 olarak bulunmuştur (Tablo 6). Başarı oranının düşük olmasının M₁ generasyonunda herhangi bir seleksiyon yapılmadan tüm bitkilerin M₂ generasyonunda değerlendirmeye alınmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Mutagen grupları ayrı ayrı değerlendirildiğinde en başarılı ayırma oranı % 96.60 ile 400 grubunda belirlenmiştir. Bunu % 46.30 ile 200 A ve % 36.40 ile 400 A (Ç.B.) takip etmiştir. En zayıf ayırma oranı % 3.50 ile 400 A grubunda belirlenmiştir. Bu gruptaki bitkilerde

incelenen özellikler yönünden birçoğu birbirine benzer olmuştur.

Tablo 6. Gama dozları uygulanan Tarm-92 arpa çeşidinin M₂ generasyonuna ait diskriminant analiz sonuçları

Uygulama dozu (Gy)	Gruplar								
	Kontrol	200	200 A	300	300 A	400	400 A	400 A (Ç.B.)	500
Kontrol	53	9	24	35	53	0	21	10	40
200	0	15	7	7	5	1	8	3	2
200 A	8	23	81	26	25	0	13	20	51
300	0	10	2	14	6	0	2	1	3
300 A	0	14	9	17	50	5	39	0	7
400	0	8	1	41	67	141	65	0	0
400 A	0	42	6	7	2	1	6	4	3
400 A (Ç.B.)	26	13	28	27	23	1	13	28	46
500	13	6	17	19	25	0	3	11	28
N	100	140	175	193	256	149	170	77	180
B.O. (%)	53.0	10.7	46.3	7.3	19.5	94.6	3.5	36.4	15.6

Ayırmadaki toplam başarı oranı: 0.29

N:Örnek sayısı B.O.: Benzerlik Oranı

Tablo 7. Doğrusal ayırma fonksiyonları

Ayırma Fonk. sabiti	Kontrol	200	200 A	300	300 A	400	400 A	400 A (Ç.B.)	500
	-23.48	-2165	-20.97	-19.04	-17.22	-23.77	-22.44	-23.13	-20.26
B. B.	0.02	-0.02	-0.05	0.01	-0.01	0.02	0.01	0.01	0.00
B. U.	3.16	3.39	3.44	3.06	2.99	3.40	3.31	3.63	3.22
B. T. S.	0.63	0.77	0.62	0.70	0.70	1.03	0.84	0.56	0.55
B. T. A.	1.23	-0.69	1.20	-0.73	-0.92	-4.31	-1.77	0.60	0.94

B.B.: Bitki Boyu; B.U.: Başak Uzunluğu; B.T.S.: Başakta Tane Sayısı; B.T.A.: Başakta Tane Ağırlığı

Doğrusal ayırma fonksiyonlarını içeren katsayılar incelendiğinde en etkin özelliğin başak uzunluğu olduğu belirlenmiştir. Yine, tane sayısı ve başakta tane ağırlığından elde edilen katsayıların daha yüksek olması incelenen bitkileri ayırmada etkili olabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada en zayıf ayırma katsayısı bitki boyunda belirlenmiştir (Tablo 7).

Araştırmada M₂ generasyonunda yaşayan bitki oranı yönünden değerlendirildiğinde en yüksek 300 Gy uygulamasında elde edilmiştir. Bu durum kontrole benzeyen özelliklere sahip bitki sayısının 300 Gy grubunda daha fazla olmasına neden olmuş olabilir. Yine, 500 Gy dozu uygulamasında kontrole benzeyen bitki oranı daha fazla bulunmuştur. Yaşayan bitkilerin radyasyondan etkilenmemiş olabileceğini göstermektedir.

4. Sonuç

Araştırmada 300 ve 400 Gy uygulamalarında incelenen özellikler yönünden daha fazla varyasyon olduğu belirlenmiştir. Doğrusal ayırma fonksiyonlarını göre en etkin özelliğin başak uzunluğu, en zayıf ayırma katsayısı ise bitki boyunda belirlenmiştir. Yine, tane sayısı ve başakta tane ağırlığından elde edilen katsayıların daha yüksek olması, incelenen bitkileri ayırmada etkili olabileceğini göstermektedir. Araştırmada her uygulama grubunda incelenen başaklara ayrı numara verilmiş ve başak uzunluğu ile başakta tane sayısı yönünden istenilen özelliklere sahip olanlar seçilerek M₃ generasyonu oluşturulmuştur.

Teşekkür

Bu çalışma Tuğçe Ayşe KARAKOCA'nın yüksek lisans tezinden alınmıştır.

Kaynakça

- [1] Alkan, F. R., Kandemir, N. 2015. Tokak Yerel Arpa Çeşidi İçinden Seçilen Saf hatların Bazı Gıda, Yem ve Tarımsal Özellikler Bakımından Varyasyonları. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 24 (2), 124-139.
- [2] Sipahi, H., Sayım, İ., Ergün, N., Çetin, G. 2010. Maltlık Kalitesi Yüksek Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Çeşitlerinin Geliştirilmesi. (Biyoteknoloji iş paketi: İkiye katlanmış haploid bitkilerin üretilmesi). Tübitak Projeleri. Maltlık Arpa Geliştirme Projesi (TÜBİTAK1007-KAMAG 105 G 083) 2006-2010.
- [3] Anonim, 2019. Tarım Ürünleri Piyasası Arpa. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/PDF%20Tarim%20Urunleri%20Piyasalar%202018Ocak%20Tarim%20Urunleri%20Raporu%202018-Ocak%20Arpa.pdf> (Erişim Tarihi: 21.10.2019).
- [4] Sirat, A., Sezer, İ. 2009. Bafra Ovası Koşullarına Uygun Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Çeşitlerinin Belirlenmesi. Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi, 24(3), 167-173.
- [5] Micke, A., Donini, B., Maluszynski, M. 1987. Induced Mutations for Crop Improvement-a

- review. Tropical Agricultural (Trinidad), 64 (4), 259-278.
- [6] Maluszynski, M., Nichterlein, K., Van Zanten, L., B. S. Ahloowalia, B. S. 2000. Officially Released Mutant varieties-the FAO/IAEA Database. Mut. Breed. Rev., 12: 1-84.
- [7] Latif, A., Siddiqui, S. H., Aqeel, M., Khan, F. M., Khan, H., 1995. Variation in Genetic Parameters of Barley and Triticale After Seed Irradiation. Sarhad Journal of Agriculture, 11 (5), 627-630.
- [8] Din, R., Qasim, M., Ahmad, K., Jehan, S., 2003. Study of Days Taken to Earing Initiation and Earing Completion in M₁ Generation of Different Wheat Genotypes Irradiated with Various Doses of Gamma Radiation. Asian Journal of Plant Science, 2 (12), 894-896.
- [9] Maluszynski, M., Iwona Szarejko, I., Bhatia, C. R. Nichterlein, K. Pierre, J. L. Lagoda, P. J. L. 2009. Methodologies for generating variability. In: Ceccarelli S., Guimar E. P., Weltzien E., editors. Plant breeding and farmer participation. Rome: Food and Agriculture Organization (FAO); <http://www.fao.org/docrep/012/i1070e/i1070e00.htm> (Erişim Tarihi: 10.10.2019).
- [10] Çelebi, Y. 2016. İki Sıralı Tokak Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Çeşidi ile Bundan Elde Edilen Mutant Hatların Bazı Fenolojik ve Tarımsal Özellikler Yönünden Karşılaştırılması. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Fakültesi, Yüksek Lisans Tezi, 53s, Erzurum.
- [11] Turan, H. N., 2007. Gama ışınlanmanın makarnalık buğday bitkisinde (*Triticum durum* Desf.) haploid embriyo üretimi ve bitki regenerasyonuna etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 56s, Isparta.
- [12] McClung, A. M., Cantrell, R. G., Quick, J. S., Gregory, R. S. 1986 Influence of the Rht1 Semidwarf Gene on Yield Component and Grain Protein in Durum Wheat. Crop Science, 26, 1095-1098.
- [13] Bilgen, G. 1989. Yabani x kültür arpa melezlerinde genetik analizi ve bunlardan ıslahta yararlanma olanakları. Ege Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 82s, İzmir.
- [14] Bilge, E., Ersoy, G. 1972. Streptomycin, X ışınları ve Gamma ışınları ile Muamelenin *Hordeum vulgare* (arpa) Üzerine Etkileri. Türk Biyoloji Dergisi, 22, 42-49.
- [15] Başer, İ., Bilgin, O., Sara, E., Yorgancılar, Ö. 1997. Uzun Boylu Makarnalık Buğday Çeşitlerine Uygulanan Farklı Dozdaki Gamma Işınlarının Bitki Boyu, Tane Verimi ve Bazı Tarımsal Özellikler Üzerine Etkisi. II. Tarla Bitkileri Kongresi, 25-27 Eylül, Samsun, 26-31.
- [16] Katipoğlu, H. T. 1995. Kaya (*Hordeum distichon*) ve Gem (*Hordeum vulgare*) arpa çeşitlerinin tohumlarına uygulanan farklı dozlardaki gamma (J) ışınlarının M₁ bitkileri üzerindeki etkileri. Çukurova Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 81s., Adana.
- [17] Bouma, J., Ohnoutka, Z. 1991. Importance and Application of the Mutant 'Diamant' in Spring Barley Breeding. In: Plant Mutation Breeding for Crop Improvement. 1. IAEA, Vienna, 127-133.
- [18] Güllap, M. K. 2006. Yazlık iki sıralı arpa (*Hordeum vulgare* L.)'da mutant çeşit adaylarının belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 54 s., Erzurum.
- [19] Başer, İ., Bilgin, O., Korkut, K., Balkan, A. 2007. Makarnalık Buğdayda Mutasyon İslahı ile Bazı Kantitatif Karakterlerin Geliştirilmesi. Tarım Bilimleri Dergisi, 13 (4), 346-353.
- [20] Koç, A., Akgün, İ. 2018. Batı Akdeniz'de ICARDA-CIMMYT Ekmeklik Buğday Genotiplerinin Verim ve Kalite Yönünden Karşılaştırılması. Ziraat Mühendisliği Dergisi, 365, 22-33.
- [21] Başar, H., Tümsavaş, Z., Katkat, A., V., Özgümüş, A. 1998. Saraybosna Buğday Çeşidinin Verim ve Bazı Verim Kriterleri Üzerine Değişik Azotlu Gübrelerin ve Azot Dozlarının Etkisi. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 22, 56-63.
- [22] Yıldırım M., Budak N. 1989. Progeny Testing Results of Lines Selected from Mutant Population of Kaya Barley Cultivar. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Fakültesi Dergisi, 26, 79-86.
- [23] Kubba, A. J., Ibrahim, F. 1989. Semi Dwarf Mutants from Bread Wheat Cultivar Inia 66. Mutation Breeding Newsletter, 34, 10-12.
- [24] Butnaru, G. 1991. Mutagenesis in Triticale. National Wheat Research Center, Proceedings of the Second International Triticale Symposium Mexico DF (Mexico) CIYMMT, p. 154 156.
- [25] Singh, M., Khanna, V. K. 1988. Effect of Gamma Radiations on the Crossability of Wheat, Triticale and Rye and on Meiosis, Pollen Grain Germination and Pollen Tube Growth. Cytology, 53, 123-130.
- [26] Akgün, İ., Tosun, M. 2004. Agricultural and Cytological Characteristics of M₁ Perennial Rye (*Secale montanum* Guss.) as Effected by the Application of Different Doses of Gamma Rays. Pakistan Journal of Biological Sciences, 7 (5), 827-833.
- [27] Çiftçi, C. Y., Akbay, G., Ünver, S. 1988. Kunduru-1149 (*Triticum durum* L.) Makarnalık Buğday Çeşidine Uygulanan Farklı EMS (Ethyl Methane Sulphonate) Dozlarının M₁ Bitkilerinin Bazı Özellikleri Üzerine Etkileri, I. Ankara

- Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yıllığı, 39 (1-2) 337-342.
- [28] Tutluer, M. İ. 1993. Çok yıllık çavdar (*Secale montanum* Guss.)'dan gamma radyasyon ile yem çavdarı elde etme imkanları ve mitoz mayoz bölünmelerde görülen değişiklikler. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 144s, Ankara.
- [29] Rachovska, G., Dimova, D. 2000. Effect of Sodium Azide and Gamma Rays on M₁ Quantitative Characteristics of the Productivity and their Connection with M₂ Mutation Changes in Winter Common Wheat. Rateniev'dni Nauki, 37 (7). 413-419.
- [30] Yıldırım, M. B., Çağırğan, M. I., Turgut, I. 1987. Arpa Mutant Populasyonlarında Seleksiyon Uygulaması. Türkiye Tahıl Sempozyumu, 6-9 Ekim, Bursa, 473-481.
- [31] Eser, D., Sağel, Z., Tutluer, M. I., Peşkircioğlu, H., Atilla, A. S. 1991. The Effect of Gamma Radiation Doses on Some Characters in M₁ Generation of Large Seeded Type Green Lentil Pul-11 Cultivar. Turkish Journal of Nuclear Sciences, 18 (2), 5-15.
- [32] Peşkircioğlu, H., Tutluer, M., Sağel, Z., Şenay, A. 1996. Mutant Arpa Populasyonunda Bazı Verim Öğelerindeki Varyasyonun Saptanması. IV. Ulusal Nükleer Tarım ve Hayvancılık Kongresi, 25-27 Eylül, Bursa, 58-63.
- [33] Sirat, A., Sezer, İ. 2017. Bafra Ovasında Yetiştirilen Bazı İki Sıralı Arpa (*Hordeum vulgare* conv. distichon) Çeşitlerinin Verim, Verim Öğeleri ile Bazı Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, 14(1), 77-87.
- [34] İmamoğlu, A., Yılmaz, N. 2012. Bursa Ekolojik Koşullarında Bazı Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Genotiplerinin Verim ve Bazı Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. Anadolu Dergisi, 22 (2), 13 - 36.
- [35] Balkan, A., Bilgin, O., Başer, İ., Balaban, D. G., Demirkan, A. K., Deviren, B. 2019. Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Genotiplerinde Tane Verimi ve Verimli İlişkili Özelliklerin Gama Işını Kullanılarak Mutasyon İslahı İle Geliştirilmesi. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, 16 (1), 97-105.
- [36] Khan, K., Ilbal, M., Azim, F., Sher, H. 2003. Effect of Gamma Irradiation on Yield and Yield Components of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Pakistan Journal of Biological Sciences, 6 (19), 1695-1697.

Merkezi Kompozit Dizayn Kullanılarak Kapesitabin Tayini için RPLC Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Yaşar Doğan DALDAL^{*1}, Ebru ÇUBUK DEMİRALAY²

^{1,2}Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 32200, Isparta, Türkiye

(Alınış / Received: 27.06.2019, Kabul / Accepted: 23.10.2019, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Anahtar Kelimeler

Kapesitabin,
Rivastigmin,
Merkezi kompozit dizayn,
Metot validasyonu

Özet: Ters faz sıvı kromatografi (RPLC) yöntemi, merkezi kompozit dizayn (CCD) kullanılarak kapesitabinin analizi için geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Metot üç faktörle (mobil faz organik modifiyer derişimi, mobil faz pH'sı ve kolon sıcaklığı) Minitab programı kullanılarak optimize edilmiştir. Optimum kromatografik koşullar, Derringer'in istenebilirlik fonksiyonu kullanılarak belirlenmiştir. CCD'nin yardımıyla tayin edilen ayırmanın optimum koşulları: (1) Mobil faz: asetonitril-su ikili karışımı oranı 40:60 (%h/h), (2) kolon sıcaklığı 32°C ve mobil fazın pH'sı 7,5'dur. Çalışma, YMC triart C18 (150x4,6 mm I.D, 3µm) kolonda ve 1 mL/dakika akış hızında gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen sıvı kromatografik yöntemin ICH parametrelerine göre validasyonu gerçekleştirilmiştir.

Development and Validation of a RPLC Method for the Determination of Capecitabine using Central Composite Design

Keywords

Capecitabine,
Rivastigmine,
Central composite design,
Method validation

Abstract: A reversed phase liquid chromatographic (RPLC) method was developed and validated for analysis of capecitabine using central composite design (CCD). The method was optimized using Minitab software with three factors (mobile phase organic modifier concentration, pH of the mobile phase and column temperature). The optimum chromatographic conditions were determined using Derringer's desirability function. The optimum conditions of separation (optimum values of significant factors) determined with the aid of CCD were: (1) mobile phase: The acetonitrile:water binary mixture ratio is 40:60 (% v/v), (2) column temperature 32°C and (3) pH of the mobile phase is 7.5. The study was carried out on a YMC triart C18(150x4.6 mm I.D, 3µm) column and at a flow rate of 1 mL/min. The validation of the developed liquid chromatographic method according to ICH parameters was performed.

1. Giriş

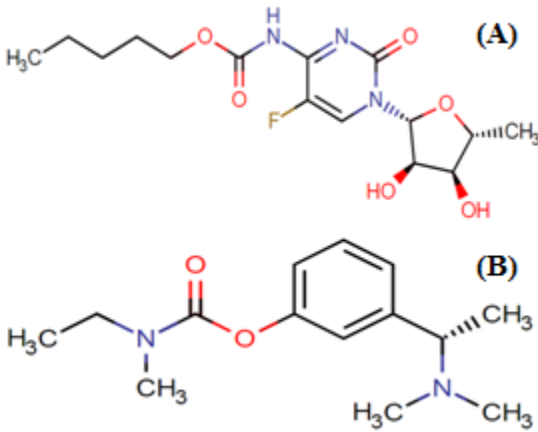
Kanser hücre büyümesini ve gelişmesini sağlayan normal genlerin, regülasyon bozukluğu veya düzenleyici mekanizmalardan sapması ile ortaya çıkan bir hastalıktır. Kanser, ilaçla tedavisi kemoterapi olarak adlandırılır. Kanser, organizmada yer alan herhangi bir hücrenin farklılaşarak, aşırı ve kontrolsüz bir şekilde çoğalması sonucu oluşan hastalık olduğu için, neoplastik hastalıklar sınıfına girmektedir. Neoplastik hastalıkların tedavisinde, antineoplastik ilaçlar kullanılır. Antineoplastik ilaçlar, hücre bölünmesini ve dolayısıyla, çoğalmasını inhibe ederler fakat, kanser hücresine karşı olan selektiflikleri azdır. Kendi içerisinde 6 alt gruba ayrılan antineoplastikler içerisinde, antimetabolitler sık tercih edilen ilaçlardır. Bu ilaçlar, DNA, RNA,

proteinler ve diğer temel hücre bileşenlerinin sentez basamaklarında substrat veya koenzim olarak rol oynayan doğal metabolitlerin analoglarıdır [1-3]. Bir antimetabolit bileşik olan pirimidin antimetaboliti kapesitabin, kanser hücresinde pirimidin sentezini durdurur ve hücrede DNA sentezi için gerekli yapı taşlarından birinin eksilmesine yol açar (Şekil 1). Ayrıca bu bileşik, 5-Fluorourasil'in analogudur. Başta meme ve kolorektal kanser olmak üzere tümör dokusunun büyümesini de yavaşlatır [3,4].

Ters faz sıvı kromatografi (RPLC) doğruluğu, kesinliği ve spesifikliğı gibi birçok avantajlardan dolayı başta ilaç analizleri olmak üzere, birçok alanda tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntemde, farklı deneysel koşullara göre, seçilen sabit fazla analitin güçlü etkileşimi daha uzun alıkonmaya sebep olurken, sabit

fazla analitin zayıf etkileşimi kısa alıkonma zamanına sebep olmaktadır [5]. RPLC metot geliştirmede, makul bir zamanda tayin edilen bileşiklerin yeterli ayrımı amaçlanmaktadır. Bu durumu sağlamak için, bileşiklerin alıkonma zamanı (t_R) ve kapasite faktörü değerleri belli kurallara göre kontrol altına alınmaya çalışılır [6]. Bileşiklerin bu değerleri üzerine etkisi olduğu bilinen deneysel değişkenlerin optimize edilmesi bazı yaklaşımlarla gerçekleştirilebilir [5,7].

Genellikle, yapılan sıvı kromatografik çalışmalarda optimum ayırma koşullarını tayin etmek için, bileşiklerin t_R değerleri üzerine etkisi olduğu bilinen parametrelerin incelenmesi temeline dayanan deneme-yanılma yaklaşımı tercih edilir. Ancak, bu yaklaşımın aşırı zaman kaybı ve maliyet sebebiyle olması yanında, çalışılan bileşiklerin birbirinden ayrılmasını sağlayan sıvı kromatografik koşula ulaşamaması gibi dezavantajları vardır. Bu gibi sorunları aşmak için, günümüzde, belirli bir istatistiksel temele dayanan, birden fazla parametrenin aynı anda incelenmesine imkân sağlayan daha sistematik yaklaşımlar olan deneysel tasarım metotlarının kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır [8-10].



Şekil 1. Çalışılan bileşiklerin kimyasal yapısı: (A) Kapesitabin, (B) rivastigmin (I.S)

Deneysel tasarım metotlarından birisi olan merkezi kompozit dizayn (CCD), seçilen deneysel değişkenler ve bu değişkenlere karşı elde edilen cevap değerleri arasındaki ilişkiyi yorumlamak için çok kullanışlı bir yöntemdir [9]. CCD bu ilişkiyi seçilen deneysel değişkenlerle belirlenen bölge içerisinde, 2. dereceden bir denklem ile ifade eder:

$$y = \begin{pmatrix} b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 \\ +b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \\ +b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 \end{pmatrix} \quad (1)$$

Eşitlik 1'de b_0 kesim değerini; x_1, x_2, x_3 seçilen değişkenlerin temel etkilerini; x_1x_2, x_1x_3, x_2x_3 seçilen değişkenlerin birbirleriyle etkileşimlerini; x_1^2, x_2^2, x_3^2 'de eşitliğin star noktalarını ifade etmektedir [11,12]. Bu denklem aracılığıyla, seçilen deneysel değişkenlerin cevap olarak belirlenen değer üzerine

etkisi olup olmadığı, varsa, ne düzeyde etkisi olduğu belirlenebildiğinden, CCD metodu sıvı kromatografik ayırmanın optimizasyon çalışmalarında çok tercih edilmektedir.

Pirimidin fonksiyonel grubu taşıyan antimetabolitlerden kapesitabin için gerçekleştirilen literatür taramasında, bileşiğin pK_a tayini [13], kararlılık çalışmaları [14-16], biyolojik sıvılarda, dokularda ve tablet tayiniyle ilgili [17-21] çalışmalar bulunmuştur. Bileşiğin sıvı kromatografik tayini için deneysel tasarım metodu kullanılarak yöntem geliştirmeyle alakalı hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmaların tamamında deneme-yanılma kullanılmış, herhangi bir optimizasyon çalışmasına rastlanmamıştır. Bunun için, bu çalışmada CCD metodu kullanılarak, kapesitabin ve iç standart (I.S) olarak seçilen rivastigminin alıkonma davranışlarıyla, analitlerin alıkonmalarına en çok etkisi olduğu bilinen mobil faz organik modifiyer derişimi, mobil faz pH'sı ve kolon sıcaklığı parametreleri arasındaki ilişkinin belirlenip, mümkün olan en iyi sıvı kromatografik ayırma koşulunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, bu çalışmada geliştirilen optimum ayırma koşullarının, ICH parametrelerine göre validasyonu gerçekleştirilmiş ve kapesitabinin insan idrarından geri kazanımına yönelik çalışmada gerçekleştirilmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kapesitabin (analit), rivastigmin (I.S), urasil (kolonda tutunmayan bileşik) ve asetonitril (mobil fazda organik modifiyer) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Amonyum klorür ve amonyak (mobil fazda tampon bileşimi), potasyum hidrojen fitalat (elektrot kalibrasyonunda referans standart madde) Merck firmasından sağlanmıştır. Deneylerde kullanılan bütün kimyasal maddeler, analitik veya HPLC safliktadır.

2.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışılan bileşiklerin sıvı kromatografik davranışlarının incelenmesinde, Shimadzu marka yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı kullanılmıştır. Sistemde, pompa (LC-20AD), UV-Visible dedektör (SPD-20A), kolon fırını (CTO-20A) ve gaz giderme ünitesi (DGU-20A₃) bulunmaktadır. HPLC mobil fazının pH ölçümlerinde, Mettler Toledo MA 235 pH/iyon analiz cihazı ve Mettler Toledo InLab 413 Ag/AgCl kombine cam elektrot kullanılmıştır. IUPAC'ın tavsiye ettiği gibi, asetonitril-su ikili karışımlarında elektrot kalibrasyonu için potasyum hidrojen fitalat, referans standart madde olarak seçilmiştir. Mobil faz pH'sının ayarlanması esnasında, sıcaklık $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ 'de sabit tutulmuştur. Deneysel çalışmalarda kullanılan ultra saf su Millipore Direct Q3-UV (Merck) saflaştırma sistemiyle elde edilmiştir. Tüm RPLC

çalışmalar, YMC Triart C18 kolonda (150 mm X 4,6 mm, 3µm) gerçekleştirilmiştir.

2.3. Yöntem

Çalışmada CCD ile belirlenen hacimce % 24,887, % 30, % 37,5, % 45 ve % 50,113 asetonyril içeren asetonyril-su ikili karışımı mobil fazlar hazırlanmıştır. pH 6,477-11,523 aralığında hazırlanan her bir mobil faza 30 mM derişimde olacak şekilde katı NH₄Cl ilave edilmiştir. Bu ortama su-asetonyril oranını bozmayacak şekilde derişik amonyak ilave edilerek, mobil fazın pH'sı çalışmada etkisi incelenmek istenen pH değerlerine getirilmiştir. Mobil fazlar ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır. Çalışılan her bir mobil fazda kapesitabin ve rivastigmin (I.S)'in t_R değerleri üç tekrarlı enjeksiyonların ortalaması olarak kullanılmıştır. Çalışılan bileşiklerin kapasite faktörü (k) değerlerinin hesaplanabilmesi için gerekli t₀ değerleri, urasil çözeltisinin 3 tekrarlı enjeksiyonlarının ortalaması olarak kullanılmıştır. Çalışma boyunca akış hızı, 1 mL/dakika'da sabit tutulmuştur. Kapesitabin ve rivastigmin (I.S) tayini için UV dedektör sırasıyla 240 ve 210 nm'ye ayarlanmıştır.

2.4. Çalışılan bileşiklerin çözeltileri

Kromatografik çalışmada kapesitabin 200 µg/mL ve rivastigmin 50 µg/mL olacak şekilde mobil fazda çözülerek hazırlanmıştır. Sonrasında kapesitabin için 50 µg/mL olacak şekilde ara stok hazırlanmıştır. Sıvı kromatografi cihazına analitler 20 µL enjekte edilmiştir. Hazırlanan çözeltiler, günlük hazırlanmış ve +4°C'de muhafaza edilmiştir.

2.5. İdrar numune çalışması

Sağlıklı bir insandan alınmış idrar numunesi 1:20 oranında seyreltilmiştir. Seyreltilmiş idrardan 2 mL alınmış, üzerine 3 mL asetonyril eklenerek numune içerisindeki proteinler çöktürülmüştür. Böylelikle proteinlerin bozucu etki oluşturması önlenmiştir. Bu 5 mL'lik idrar üzerine kapesitabinin farklı derişimleri, rivastigmin (I.S) 2,5 ppm'de sabit kalacak şekilde çözeltilere eklenerek karışım 10 mL'ye tamamlanmıştır. Bu 10 mL'lik karışım 0,45 µm'lik filtreden geçirilmiştir. Filtreden geçirilen çözeltiler yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazına enjekte edilmiştir.

3. Bulgular

3.1. Kapesitabin ve rivastigmin için RPLC ayırmasının optimizasyonu

Çalışılan bileşiklerin optimum ayırma koşullarını tayin etmek için, CCD metodu ile seçilen bağımsız parametrelerin sınırlarının belirlenmesine gerek duyulur. Bu nedenle, ilk olarak deneysel değişkenler olarak seçilen parametrelerin, alt ve üst seviyelerinin

belirlenmesi gereklidir. Bu çalışmada, bileşiklerin k değerlerine etkisi olduğu bilinen mobil fazdaki asetonyril derişimi, pH'sı ve kolon sıcaklığı çalışılacak parametreler olarak seçilmiştir. Bu parametrelerin çalışma aralığı belirlenirken, kapesitabin (pK_a:9,360) [22] ve rivastigminin (pK_a:9,019) (I.S) [23] protonasyon sabitlerinden (pK_a) ve az sayıda ön denemeden yararlanılmıştır. Parametre seviyelerinin seçiminde, k değerlerinin 0,5 ile 5 aralığında olması; mobil faz pH'larının bileşiklerin iyonik ve moleküler formlarının olduğu pH değerlerini içermesi amaçlanmıştır. Kolon sıcaklığı parametresinin seviyelerinin de vücut sıcaklığı olan 37°C'yi içine alması amaçlanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışılan bileşikler için seçilen parametrelerin alt, orta, üst ve alfa (α) seviyeleri

Bağımsız parametreler	(-α)	Alt nokta (-)	Orta nokta (0)	Üst nokta (+)	(+α)
(x ₁) asetonyril (%/h/h)	24,887	30,000	37,500	45,000	50,113
(x ₂) mobil faz pH'sı	6,477	7,500	9,000	10,500	11,523
(x ₃) sıcaklık (°C)	31,591	35,000	40,000	45,000	48,409

Seçilen üç bağımsız parametre için oluşturulan merkezi kompozit dizayn, merkez noktasında yapılan 6 tekrarlı birlikte toplamda 20 farklı deney gerektirmektedir. Merkezi kompozit dizaynda çalışılan bu her koşulda kapesitabin ve rivastigminin alıkonma zamanı değerlerinden bileşiklerin k değerleri hesaplanmıştır. Bu k değerlerini kullanarak, bileşikler için deneysel tasarımda cevap değerleri olarak belirlenen logk ve seçicilik değerleri (α) hesaplanmıştır. (Tablo 2).

Tablo 2'de merkezi kompozit tasarımda belirlenen deney koşulları, incelenecek parametrelerin ana etkilerine ve parametrelerin birbirleriyle etkileşimlerine göre elde edilen logk ve α değerlerini göstermektedir. Bu deneylerin sonuçlarından hangi parametrenin ve/veya parametre etkileşimlerinin cevap olarak seçilen değerlere etkisinin olup olmadığını yada varsa ne ölçüde etkilediğini belirlemek için elde edilen tüm cevap değerlerine göre MİNİTAB 17 programıyla çoklu regresyon analizi yapılmıştır. Bunun sonucunda, logk ve α değerine göre elde edilen eşitlikler, parametre veya etkileşimlerin önemini belirten p değerleriyle birlikte Tablo 3'de verilmiştir.

ANOVA tablosunda 0,05'den küçük p-değeri, % 95 güven seviyesinde, ait olduğu katsayının cevap değerine etkisinin önemli olduğunu ifade etmektedir. Ayrıca, ANOVA tablosundaki model uygunsuzluğu (lack of fit, LOF), CCD ile geliştirilen matematiksel modelin cevap olarak belirlenen değerleri tahmin edebilme yetisindeki hatayı ifade etmektedir. Eğer, LOF değeri 0,05'den büyükse, matematiksel modelin

cevap değerlerini tahmin edebilme yetisindeki hata önemsizdir.

Tablo 2. Kodlanmış parametre seviyeleri ve bu seviyelerde elde edilen logk ve α değerleri

Dny.No	x_1	x_2	x_3	logk		α (seçicilik)
				Kapesitabin	Rivastigmin	α Rivastigmin/ Kapesitabin
1	-	-	-	0,472	0,673	1,587
2	+	-	-	-0,133	0,312	2,790
3	-	+	-	-0,245	1,180	26,612
4	+	+	-	-0,563	0,601	14,565
5	-	-	+	0,421	0,603	1,519
6	+	-	+	-0,200	0,250	2,824
7	-	+	+	-0,184	1,166	22,434
8	+	+	+	-0,618	0,591	16,186
9	$-\alpha$	0	0	0,492	1,204	5,144
10	$+\alpha$	0	0	-0,317	0,404	5,266
11	0	$-\alpha$	0	0,137	0,111	0,943
12	0	$+\alpha$	0	-0,779	0,824	40,064
13	0	0	$-\alpha$	0,037	0,790	5,657
14	0	0	$+\alpha$	-0,036	0,736	5,910
15	0	0	0	0,023	0,763	5,503
16	0	0	0	0,011	0,763	5,657
17	0	0	0	0,018	0,765	5,583
18	0	0	0	0,023	0,765	5,520
19	0	0	0	0,024	0,765	4,974
20	0	0	0	0,021	0,773	5,642

Tablo 3’de kapesitabin ve rivastigminin logk değerleri için verilen regresyon sonuçlarına göre; parametrelerin ana etkilerinden, kapesitabin için sıcaklığın önemsiz olduğu; rivastigmin için üç parametrenin önemli olduğu görülmektedir. Ayrıca, parametrelerin ana etkilerinin yanında, birbirleriyle ikili etkileşimleri de incelendiğinde kapesitabin için ACN*ACN; ACN*t°C ve pH*t°C değerlerinin önemsiz, diğerlerinin önemli olduğu görülmektedir. Rivastigmin için bu ikili etkileşimlerden t°C*t°C ve ACN*t°C değerlerinin önemsiz, diğer etkilerin ise önemli olduğu görülmektedir.

Parametrelerin iki bileşiğin seçicilik (α) cevap değerleri üzerine etkilerinin belirlenmesi için yapılan regresyon analizine göre, mobil faz pH’sının ve pH*pH ve ACN*pH ikili etkileşimlerinin önemli; diğer

ana etkilerin (ACN ve t°C) ve ikili etkileşimlerin önemsiz olduğu görülmektedir.

Yapılan regresyon analizi sonuçlarının parametrelerin her iki cevap değeri üzerindeki etkisini değerlendirerek, optimum ayırma koşulunu yorumlamadaki zorluklar nedeniyle, istenebilirlik fonksiyonundan faydalanılmıştır. Bu fonksiyonda, ilk başta her bir cevap değeri için istenen hedefler belirlenmiştir (Tablo 4).

Kapesitabin için hedef logk değeri 0,079 olarak, bileşiğin kapasite faktörü değerini 1,2 yapan k değerinden belirlenmiştir. Rivastigmin için logk değeri 0,380 olarak, kapesitabin piki ile rivastigmin pikinin arasındaki α değerini 1,15 yapan k değerinden belirlenmiştir. Daha sonra bu hedefler doğrultusunda, tasarımdaki tüm noktalar istenebilirlik skalasındaki 0 ile 1 arasındaki değerlere dönüştürülmüştür (Tablo 5). İstenebilirlik skalasına çevrilen değerler (d_{logk} ve $d_{\alpha-1}$), geometrik ortalama formülü kullanılarak tek bir cevap değerine dönüştürülmüştür.

$$D = (d_1^{w_1} d_2^{w_2} \dots d_n^{w_n})^{1/(w_1+w_2+\dots+w_n)} \quad (2)$$

Eşitlik 2’de, d_i değeri her deneyin cevap değerinin istenebilirlik fonksiyonuna dönüştürülmüş halini; w_i cevapların ağırlıklarını; n cevap sayısını ifade etmektedir.

Tablo 5’deki D_{hepsi} değerlerini kullanarak, ayırmanın en iyi olduğu optimum ayırma koşulları, 3D yüzey yanıt diagramlarına göre belirlenmiştir (Şekil 2). Şekil 2’de verilen 3D yüzey diyagramlarında dikkate alınarak yapılan değerlendirme neticesinde, optimum RPLC ayırma koşulları, 40 (%v/v) asetonitril-su ikili karışımı, mobil faz pH’ı 7,5 ve kolon sıcaklığı 32°C olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu optimum ayırma koşullarında elde edilen kromatogram, Şekil 3’de verilmiştir. Optimum ayırma koşulunda hesaplanan sıvı kromatografik parametreler, Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 3. Çalışılan bileşiklerin logk ve α değerleri için regresyon analizi sonuçları

Faktör etkileri	Katsayılar kapesitabin		Katsayılar rivastigmin		Katsayılar Rivastigmin/Kapesitabin	
		P		P		P
	logk		logk		α	
sabit	0,029	0,058	0,764	0,000	5,472	0,000
ACN	-0,245	0,000	-0,235	0,000	-1,141	0,071
pH	-0,272	0,000	0,212	0,000	10,022	0,000
t°C	-0,017	0,081	-0,018	0,000	-0,159	0,785
ACN*ACN	0,011	0,221	0,014	0,000	-0,042	0,941
pH*pH	-0,133	0,000	-0,105	0,000	5,367	0,000
t°C* t°C	-0,019	0,050	-0,001	0,603	0,163	0,773
ACN* pH	0,060	0,000	-0,055	0,000	-2,600	0,005
ACN*t°C	-0,016	0,189	0,002	0,376	0,738	0,341
pH * t°C	0,015	0,217	0,014	0,000	-0,315	0,678
LOF	0,073		0,661		0,050	

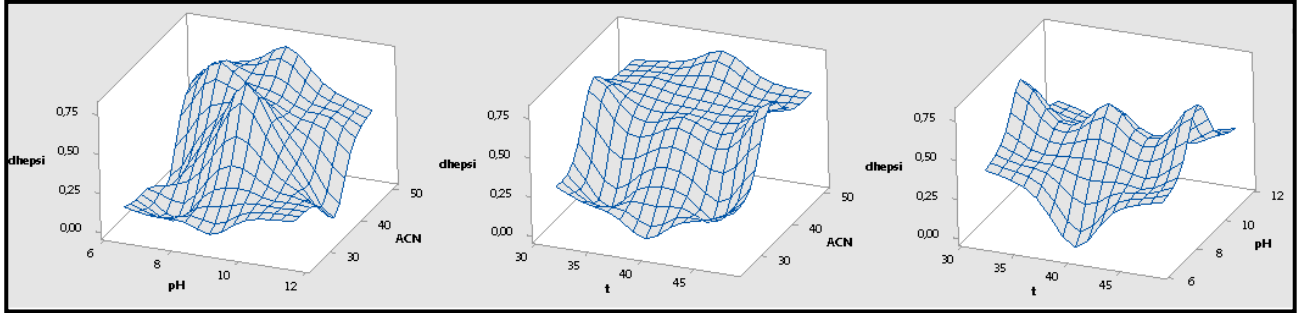
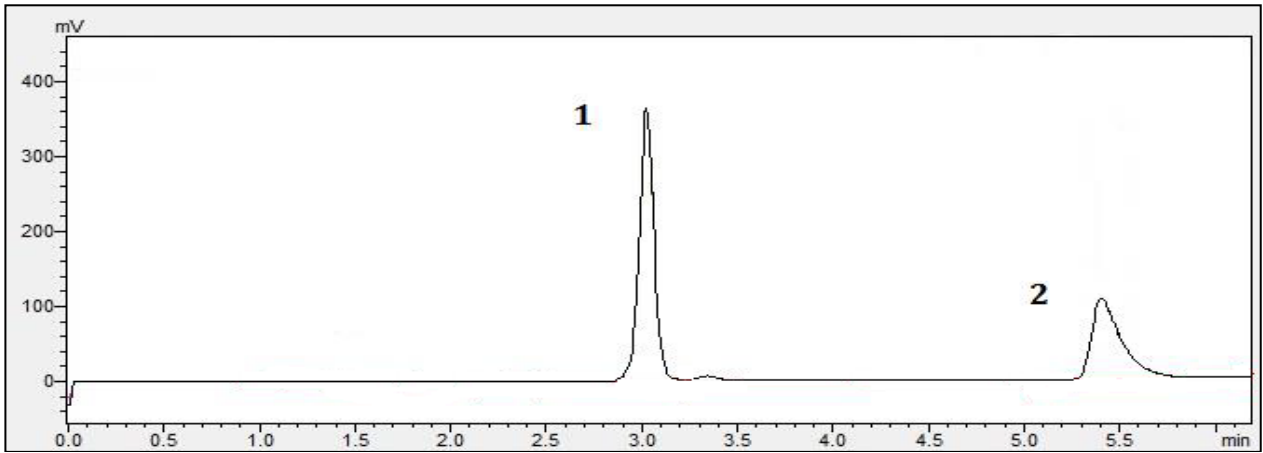
Tablo 4. Cevapların optimizasyonu için belirlenen kriterler

Bileşik	Cevap	Amaç	Alt seviye	Üst seviye	Hedef	Ağırlık
Kapesitabin	$\log k$	Hedef	-0,779	0,472	0,079	1
	$\alpha_{2,1}$	Hedef	0,943	40,064	1,150	1
Rivastigmin	$\log k$	Hedef	0,111	1,204	0,380	1

Tablo 5. Cevap değerlerinin istenebilirlik skalasına göre karşılıkları

Dny No	x_1	x_2	x_3	$d_{\log k}$ kapesitabin	$d_{\log k}$ rivastigmin	$d_{\alpha_{2,1}}$ Rivastigmin/ kapesitabin	D_{hepsi}
1	-	-	-	0,031	0,691	0,000	0,000
2	+	-	-	0,801	0,613	0,989	0,786
3	-	+	-	0,663	0,029	0,362	0,191
4	+	+	-	0,268	0,790	0,592	0,500
5	-	-	+	0,108	0,777	0,000	0,000
6	+	-	+	0,686	0,428	0,943	0,652
7	-	+	+	0,697	0,045	0,425	0,237
8	+	+	+	0,225	0,798	0,579	0,470
9	$-\alpha$	0	0	0,048	0,006	0,841	0,062
10	$+\alpha$	0	0	0,503	0,914	0,939	0,756
11	0	$-\alpha$	0	0,917	0,000	0,930	0,000
12	0	$+\alpha$	0	0,000	0,495	0,066	0,000
13	0	0	$-\alpha$	0,917	0,535	0,869	0,753
14	0	0	$+\alpha$	0,849	0,614	0,882	0,772
15	0	0	0	0,947	0,572	0,887	0,783

$d_{\alpha_{2,1}}$: Seçiciliğin istenebilirliği, $d_{\log k}$: logk değerinin istenebilirliği; D_{hepsi} : tüm cevap değerlerinin toplam istenebilirliği.

**Şekil 2.** Çalışılan bileşikler için çizilen 3D yüzey diyagramları**Şekil 3.** Standart karışımın optimum koşulda elde edilen kromatogramı 1) kapesitabin(185 µg/mL), 2) rivastigmin(I.S)(50 µg/mL)**Tablo 6.** Çalışılan bileşikler için optimum ayırma koşullarına göre elde edilen alıkonma zamanı, seçicilik ve ayırma gücü değerleri

Bileşikler	t_R	k	α	$(a-1)/a$	k_2/k_2+1	$\left(\frac{1}{4}\right)\sqrt{N}$	R_s
Kapesitabin	3,021	1,105					
Rivastigmin	5,400	2,763	2,500	0,600	0,734	18,971	8,358
Urasil (t_0)	1,435						

3.2. Geliştirilen metodun validasyonu

Geliştirilen yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla, ICH validasyon parametrelerine göre geliştirilen yöntem test edilmiştir. Bu amaçla, validasyon çalışmalarında; doğrusalık, duyarlılık, kesinlik, geri kazanım, tekrarlanabilirlik parametreleri incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

Çalışmada metod validasyonu çalışması için iç standart metodu uygulanmıştır. Bunun için rivastigmin iç standart olarak seçilmiştir. Rivastigmin kapesitabin gibi bazik fonksiyonel grup taşıyan bir bileşiktir. Belirlenen optimum ayırma koşullarında kapesitabinin alıkonma zamanına yakın bir değerde pik vermiş ve kapesitabinden ayrılmıştır. Bunun için rivastigmin iç standart olarak bu çalışmada tercih edilmiştir.

3.2.1. Kalibrasyon doğrusu ve duyarlılık

Kapesitabinin yüksek performans sıvı kromatografisi ile analizi yönteminde doğrusal aralığın belirlenmesi için 2. bölümde anlatılan idrar numunesine 2 µg/mL ile 12 µg/mL aralığında farklı derişimlerde kapesitabin ve 2,5 µg/mL derişimde sabit tutulan iç standart rivastigmin eklenerek kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. Kalibrasyon doğrusu, kapesitabinin her bir derişim değeri için elde edilen pik alanının I.S.'ın pik alanına oranının, kapesitabin derişimi değerine karşı işaretlenmesiyle oluşturulmuştur. Geliştirilen yöntem kapesitabin için 2 µg/mL ile 12 µg/mL arasında doğrusal olduğu belirlenmiştir. Kapesitabin analizi için hesaplanan kalibrasyon verileri, Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Kapesitabinin analizine ait kalibrasyon fonksiyonu özellikleri

Regresyon Denklemi*	y = 0,539x -0,059
Eğimin Standart Hatası	0,010
Kesimin Standart Hatası	0,074
Korelasyon Katsayısı (r)	0,999
Kalibrasyon Aralığı (µg/mL)	2,000-12,000
Teşhis Sınırı (µg/mL)	0,490
Tayin Alt Sınırı (µg/mL)	1,484

*y = bx + a ; x : µg/mL biriminde derişim; y : Kapesitabin/I.S alan oranı değerleri

3.2.2. Sistem uygunluk testi sonuçları

Sistem uygunluk testleri (SST), geliştirilen RPLC yöntemin tekrarlanabilirliğini değerlendirmek için uygulanan testlerdir. Bu testler, tekrarlanan enjeksiyonlar için pik alanı ve t_R değerlerinin bağlı standart sapması (% BSS), seçicilik (α), kuyruklanma faktörü (TF), alıkonma zamanı (t_R), teorik tabaka sayısı (N), ayırma gücü (R_s) ve kapasite faktörü (k), parametrelerin değerlendirilmesinden oluşmaktadır. Bu test uygulamasında kapesitabin için 6 µg/mL, rivastigmin için 2,5 µg/mL derişimlerde hazırlanan

çözeltiler sisteme 5 tekrarlı olarak enjekte edilmiş ve verilerin ortalaması alınarak, kromatografik parametreler hesaplanmıştır. Elde edilen veriler, Tablo 8'de verilmiştir. Sistem kararlılık parametrelerine göre gerçekleştirilen değerlendirmede, geliştirilen RPLC yöntemin rutin analizler için uygun olduğu görülmektedir.

Tablo 8. Kapesitabin ve rivastigmin için sistem uygunluk parametreleri

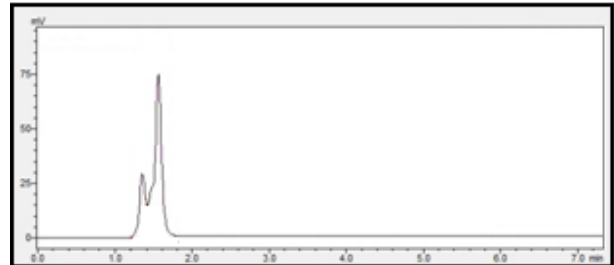
Param.	Kapesitabin	Rivastigmin (IS)	Önerilen değerler
t_R	3,176	5,450	
TF	1,023	1,217	0,95-1,20
k	2,710	3,837	>1
R_s		11,507	>2
N	6605	12173	>2000
α		2,478	>1
RSD (t_R)	0,094	0,090	≤ 1
RSD(alan)	0,040	0,018	≤ 1

3.2.3. Kesinlik sonuçları

Kapesitabin tayini için kesinlik çalışmaları için gün içi ve günler arası testleri uygulanmıştır. Gün içi çalışmaları iki farklı derişim düzeyinde ve beş bağımsız çözeltili kullanılarak aynı gün içerisinde; günler arası çalışmalar ise iki farklı derişim düzeyinde beş bağımsız çözeltili kullanılarak üç ayrı günde yapılmıştır. Bu testler sonucunda elde edilmiş veriler, Tablo 9'da verilmiştir.

3.2.4. Geri kazanım sonuçları

Geliştirilen RPLC yönteminin doğruluğunu ve idrar numunesi içerisinde bulunan proteinlerin yöntemle bir etkisinin olup olmadığını belirlemek için, kapesitabinin idrar numunesinden geri kazanım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Normal şartlarda, sağlıklı bir insanda vücuda alınmadıkça, bu bileşikler bulunmaz. Kapesitabin ve rivastigminin bulunmadığı idrara ait kromatogram, Şekil 4'de verilmiştir.



Şekil 4. Kapesitabin ve rivastigmin (I.S) bulunmayan idrar kromatogramı

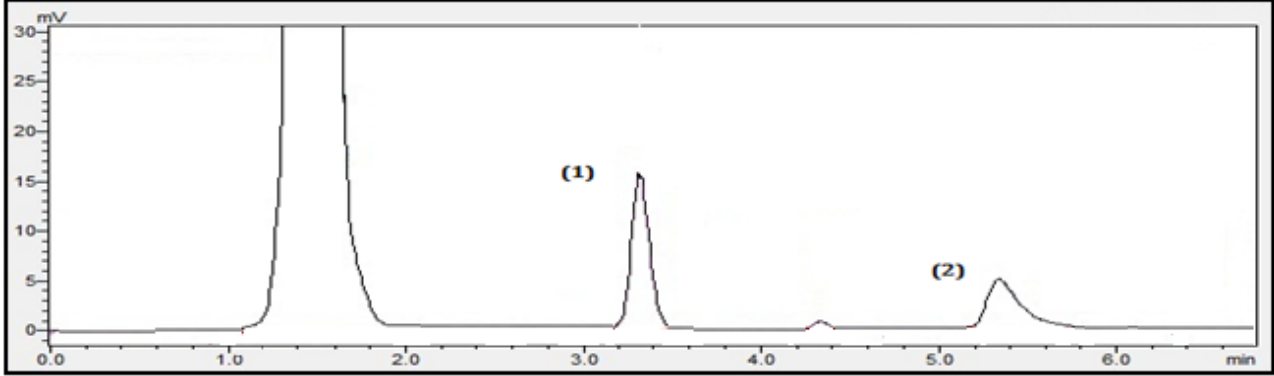
Bu çalışmada, idrara kapesitabin çözeltilisinden 4µg/mL ve 8 µg/mL; rivastigmin (I.S) çözeltilisinden idrarda 2,5 µg/mL derişimde olacak şekilde katkı yapılmıştır. Bu işlem birbirinden bağımsız 3 kez ayrı ayrı yapılmıştır.

Tablo 9. Kapesitabinin analiz yöntemine ait gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk analizi bulguları

	Teorik Derişim ($\mu\text{g/mL}$)	Gün içi derişim ortalaması	% BSS ($\mu\text{g/mL}$)	Günler arası derişim ortalaması	% BSS ($\mu\text{g/mL}$)
Kapesitabin	4	3,974	0,540	3,931	0,782
	10	10,077	0,080	9,957	0,280

Tablo 10. İnsan idrarında kapesitabinin RPLC analizi için geri kazanım sonuçları

Bileşik	Teorik Derişim ($\mu\text{g/mL}$)	N	Ortalama bulunan derişim (konsantrasyon ort. ($\mu\text{g/mL}$) \pm güven aralığı)	Geri kazanım (%) (yüzde ort. \pm güven aralığı)	SS	BSS (%)
Kapesitabin	4	3	3,971 \pm 0,013	99,269 \pm 0,256	0,103	0,731
	8	3	8,094 \pm 0,012	101,175 \pm 0,899	0,050	0,124

**Şekil 5.** Kapesitabin ve rivastigmin (I.S) ile katkılandırılmış idrar numunesi; 1) kapesitabin (8 $\mu\text{g/mL}$) 2) rivastigmin (I.S) (2,5 $\mu\text{g/mL}$)

Yapılan analiz sonucunda okunan pik alan oranı değerleri kalibrasyon denkleminde yerine konularak, idrar numunelerinin içerdiği kapesitabin miktarı hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar, Tablo 10'da verilmiştir. Kapesitabin ve rivastigmin (I.S) ile katkılandırılmış idrar numunesinin analizi sonucu elde edilmiş kromatogram, Şekil 5'de verilmiştir.

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışma, kapesitabinin RPLC yöntemiyle tayini için yapılan optimizasyon çalışmasında merkezi kompozit dizayn metodu kullanılarak gerçekleştirilen ilk çalışmadır. Farklı kromatografik davranışa sahip olan bileşiklerin, eş zamanlı kromatografik tayininde mümkün olan en iyi sıvı kromatografik ayırma koşulu, Derringer'in istenebilirlik fonksiyonuyla belirlenmiştir. Bu fonksiyon sayesinde CCD'den elde edilen veriler, 3D yüzey yanıt diyagramlarıyla değerlendirilerek tek bir ayırma koşuluna karar verilmiştir. Geliştirilen RPLC yöntemin ICH parametrelerine göre gerçekleştirilen çalışma verileri yöntemin rutin uygulamalar için uygun olduğunu göstermiştir.

Teşekkür

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı 4581-D2-16 nolu proje ile desteklenmiştir. Çalışmamızı maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığına teşekkür ederiz.

Kaynakça

- [1] Tozkoparan, B., Aytac, S.P., 2007. Kanser kemoterapisinde terapötik hedef olarak glutatyon s-transferazlar. Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi, 27(2), 139-64.
- [2] Domaç, M. (Ed.) 2005. Kemoterapötikler. Fersa Matbaacılık Ltd., Ankara, 96s.
- [3] Kayaalp, O. 2000. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti, Ankara, 880s.
- [4] Süzer, Ö. (Ed.) 2009. Goodman & Gillman Tedavinin Farmakolojik Temeli. Nobel Tıp Kitabevi, Ankara, 2017s.
- [5] Kazakevich, Y., Lobrutto, Y. 2007. HPLC for Pharmaceutical Scientists. Wiley-Interscience, Canada, USA, 1135s.
- [6] ICH Expert Working Group, 2005, April. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). In Proceedings of the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland.
- [7] Meyer, V.R. 2010. Practical High-Performance Liquid Chromatography. John Wiley and Sons, Ltd., United Kingdom, 428s.
- [8] Uysal, R., Daldal, Y.D., Üstün, Z., Çubuk Demiralay, E. 2017. Optimization of RPLC

- Method for Separation of Some Acetylcholinesterase Inhibitors by using Central Composite Design. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, 12(1), 23-43.
- [9] Gündoğan, B., Çubuk Demiralay, E., Daldal, Y.D., Üstün, Z. 2017. Determination of Optimum Separation Condition for Some Carbapenem Antibiotics Using RPLC with the Aid of Central Composite Design and Desirability Function. *Current Pharmaceutical Analysis*, 13,100-109.
- [10] Çubuk Demiralay, E. 2012. An Experimental Design Approach to Optimization of the Liquid Chromatographic Separation Conditions for the Determination of Metformin and Glibenclamide in Pharmaceutical Formulation. *Acta Chimica Slovenica*, 59(2), 307-314.
- [11] Myers, R.H., Montgomery, D.C. 2002. *Response Surface Methodology*. Wiley, New York, 798s.
- [12] Montgomery, D.C. 2005. *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons, Westford, 757s.
- [13] Meloun, M., Zuzana Ferenčíková, Vrána, A. 2011. Determination of The Thermodynamic Dissociation Constant of Capecitabine Using Spectrophotometric and Potentiometric Titration Data. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 43, 930-937.
- [14] Łaszcz, M., Trzcińska, K., Filip, K., Szyprowska, A., Mucha, M., Krzeczyński, P. 2011. Stability Studies of Capecitabine. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 105, 1015-1021.
- [15] Pujeri, S.S., Khader, A. M. A., Seetharamappa, J. 2012. Stability Study of Capecitabine Active Pharmaceutical Ingredient in Bulk Drug and Pharmaceutical Formulation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 35, 40-49.
- [16] Wang, X.J, You, J.Z. 2016. Study on The Thermal Decomposition of Capecitabine. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 123, 2485-2497.
- [17] Farkouh, A., Ettlinger, D., Schueller, J., Georgopoulos, A., Scheithauer, W., Czejka, M. 2010. A Rapid and Simple HPLC Assay for Quantification of Capecitabine for Drug Monitoring Purposes. *Anticancer Research*, 30, 5207-5212.
- [18] Deenen, M.J., Rosing, H., Hillebrand, M.J., Schellens, J.H.M., Beijnen, J. H. 2013. Quantitative Determination of Capecitabine and Its Six Metabolites in Human Plasma Using Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 913, 30- 40.
- [19] Deng, P., Ji, C., Daia, X., Zhong, D., Ding, L., Chen, X. 2015. Simultaneous Determination of Capecitabine and its Three Nucleoside Metabolites in Human Plasma by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 989, 71-79.
- [20] Jacobs, B. A.W., Rosing, H., de Vries, N., Meulendijks, D., Henricks, L. M., Schellens, J.H.M., Beijnen, J.H. 2016. Development and Validation Of A Rapid and Sensitive UPLC-MS/MS Method for Determination of Uracil and Dihydrouracil in Human Plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 126, 75-82.
- [21] Stashkevich, M.A., Khomutov, E.V., Dumanskii, Y.V., Matvienko, A.G., Zinkovich, I.I. 2016. Effect of 5-Fluorouracil on Thymidine Phosphorylase Activity in Model Experiment. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 160(5), 646-647.
- [22] Daldal, Y.D. 2018. Kemoterapide kullanılan bazı antimetabolit ilaçların sıvı kromatografik tayininde merkezi kompozit dizayn tekniğinin uygulanması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 233s, Isparta.
- [23] Daldal, Y.D., Demiralay, E.Ç., Ozkan, S.A. 2016. Effect of Organic Solvent Composition on Dissociation Constants of Some Reversible Acetylcholinesterase Inhibitors, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(3), 493-499.

Effect of Silicon Carbide Nanotube (SiCNT) on the Mechanical Properties and Moisture Susceptibility of Hot Mix Asphalt

Şebnem KARAHANÇER*¹

¹Isparta University of Applied Sciences, Department of Civil Engineering, Isparta, Turkey

(Alınış / Received: 03.10.2019, Kabul / Accepted: 29.01.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Keywords

Silicon carbide nanotube,
Bitumen modification,
Indirect tensile strength,
Moisture susceptibility

Abstract: Asphalt pavements are damaged by moisture. Strength loss is caused by moisture damage. Anti-stripping agent is used to address this damage in asphalt mixtures. Bitumen modification is also effective method to prevent moisture damage. To this aim, in this study, bitumen was modified by silicon carbide nanotube (SiCNT) in three percentages (1%, 3% and 5%) by weight. After the modification effort was performed, asphalt mixtures were designed according to Superpave™ procedure. Indirect Tensile (IDT) Strength test was employed determining moisture damage in asphalt mixtures modified by SiCNT. As a result, moisture susceptibility of two percentages (3% and 5%) of SiCNT ensured the specification limit.

Silikon Karbür Nanotüplerin (SiCNT) Sıcak Karışım Asfaltın Suya Duyarlılığına ve Mekanik Özelliklerine Etkisi

Anahtar Kelimeler

Silikon karbür nanotüp,
Bitüm modifikasyonu,
İndirekt çekme dayanımı,
Nem hassasiyeti

Özet: Asfalt kaplamalar nemin etkisiyle zarar görmektedir. Sudan kaynaklanan bozulmalar ile dayanım kaybı oluşmaktadır. Asfalt karışımlarda sudan kaynaklanan bozulmaların önüne geçebilmek için soyulma önleyici malzemeler kullanılmaktadır. Bitüm modifikasyonu da sudan kaynaklanan bozulmaları önlemede etkili bir metottür. Bu amaçla, bu çalışmada, bitüm silikon karbür nanotüplerle (SiCNT) üç farklı oranda (ağırlıkça %1, %3 ve %5) modifiye edilmiştir. Modifikasyon gerçekleştirildikten sonra asfalt karışımlar Superpave tasarım yöntemine göre tasarlanmıştır. Silikon karbür ile modifiye edilmiş asfalt karışımların suya karşı duyarlılığı İndirekt Çekme Dayanımı testi ile belirlenmiştir. Sonuç olarak, SiCNT modifikasyonu iki oranda (%3 ve %5) şartname limitini sağlamıştır.

1. Introduction

Materials exhibit significant properties at the nano level owing to its large surface area and it is possible to apply in the field [1]. Asphalt-like materials having a complex structure with better engineering at nano level resulted in some novel smart characteristics. The service life of a pavement depends on the structure conditions, material properties, thickness and accepted damage criterion. To prevent moisture deteriorations, nanomaterials are novel in the literature such as polymer-modified materials, nano silica, nano carbon fiber. To this aim, in this study, SiCNT was chosen to improve moisture susceptibility and indirect tensile strength of asphalt mixtures. Nanomaterials with unique properties such as large surface area, surface atoms have a wide fraction, quantum effects, structural properties are growing up rapidly. Benefits of nano modified asphalt have

improved rutting resistance, cracking, and fatigue life [2]. Silicone and carbon nanotubes have been generally adopted as an agent to improve bitumen characteristics [3, 4].

Silica as an additive is used in three percent (2%, 4%, 6%) for modification of bitumen to improve some properties of warm mix asphalt (WMA) containing sasobit (2%). Resilient modulus of modified WMA was increased [3]. Properties of modified bitumen containing 1, 3, 5, 7 and 9% nano silica and 0.01, 0.1, 0.5 and 1% nano carbon are investigated in terms of penetration, viscosity and softening point. Increment of softening point and decrement of penetration values were obtained according to test results [2]. Nano silica as an anti-aging agent is used in three percent (2%, 4% and 6%). Short term aging was applied to bitumen by rolling thin film oven (RTFO). After aging, complex modulus (G^*) and complex

viscosity (η^*) parameters of bitumen was increased by nano silica modification [4]. Nano silica have been added into bitumen in three percentages (2%, 4%, 6%) to modify WMA containing sasobit in 2% by weight. Complex modulus increment has been obtained [5]. Generally, nano silica used as an inorganic agent to modify bitumen [6]. Modified asphalt mixtures by steel slag, TiO_2 and SiO_2 were examined by Shafabakhsh and Ani. Improvement of resistance of modified asphalt mixture was aimed by modification with nano particles. As a result, TiO_2 and SiO_2 nano particles boost the characteristics of bitumen. Rutting and fatigue life of bitumen were also increased [7].

Rutting performance of asphalt pavements by modifying bitumen with nano- TiO_2 is examined by Tanzadeh et. al. [8] and the results illustrated that modifying bitumen with nano- TiO_2 improved rutting depth when compared to base mixtures. Polymer modified bitumen containing styrene-butadiene-styrene (SBS) was used to boost visco-elastic characteristics of the mixture. Fatigue life was increased when the additive increased [9]. Bitumen and mixture characteristics were examined by Mothlagh et. al. [10] using carbon nanotube, and minimal changes were obtained by results on physical characteristics.

Moisture damage is occurred by the bond loss between the bitumen and the fine and coarse aggregates. Moisture damage speeds up as moisture permeates and weakens the mastic during repetitive traffic loading. Stripping, bleeding, rutting etc. distresses were observed by the results [11]. The common method for eliminating the moisture damage is using antistripping additives. Hamedi et. al. [12] examined the moisture damage of hot mix asphalt (HMA) using nano- particles as an antistripping agent. The results showed indirect tensile strength ratio for the mixtures modified with nano ZnO have better performance. Nano- TiO_2 were used by Azarhoosh et. al. [13] has used the surface free energy method. The results showed the nano- TiO_2 increases the wettability of the asphalt binder and strengthen the bond between the asphalt binder and the aggregate.

Nabiun and Khabiri [14] examined ferrite filler in different combinations to address mechanical properties and moisture resistance of asphalt mixtures. Marshall resistance, indirect tensile strength (ITS) and resilient modulus were conducted. Results showed that the higher ferrite percentages proved high performance. Hossain et. al. [15] examined the effect of two different nanoclays on moisture resistance of modified binders. As a result, nanoclay modified binders were more resistive against moisture damage than the base binder. Behbahani et. al. [16] evaluated that the glassphalt mixture modified with zycosoil as an anti-stripping agent to determine the moisture sensitivity. Results

showed the zycosoil improved the moisture sensitivity of mixture.

Yao et. al. [17] investigated that the moisture susceptibility of nano hydrated lime modification of asphalt mixtures. Tensile Strength Ratio (TSR) test was used to explore moisture susceptibility. After TSR test, polar groups were extracted and analyzed from tested asphalt mixtures by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). As a result, moisture damage is reduced. Hamedi et. al. [18] investigated the effects of nano- CaCO_3 on moisture resistance of asphalt mixtures. Surface Free Energy (SFE) method and modified Lottman test was used to determine the moisture susceptibility. Modified Lottman test results showed that the nano modified mixtures were high resistive to moisture. SFE results indicated that the nano material decrease the moisture susceptibility. Iskender [19] examined that the performance of nano clay modified asphalt mixtures against moisture damage. The results showed higher performance against moisture damage. Hamedi [20], evaluated the effects of two types of nano materials on moisture susceptibility. Nano materials have decreased moisture susceptibility. Ziari et. al. [21] investigated that the effect of nano-organosilane modification on water damage of asphalt mixtures. Nano modified asphalt mixtures have improved resistance against water damage.

Babagoli et. al. [22] investigated that the performance of SMA mixtures modified with styrene-butadiene-styrene (SBS) and nanoclay. According to the results, nanoclay and SBS improved the moisture susceptibility of SMA mixtures. Zahedi and Baharvand [23] examined the effect of nano clay and crumb rubber on performance of hot mix asphalt. Results showed that nano clay and crumb rubber improved the mixture properties. Arabani and Hamedi [24] evaluated the susceptibility of asphalt binder with liquid antistripping against moisture damage. Based on the results, liquid antistripping agent decreases the stripping in presence of water.

SiCNT nanotube was chosen to improve the performance of modified asphalt mixtures against moisture. Base bitumen was mixed with nano materials in different ratios (1, 3 and 5% by weight). Rheological properties of nano-modified bitumen were analyzed using standard bitumen tests in terms of penetration, softening point and rotational viscosity (RV).

The mechanism of the SiCNT compound has been examined to determine the resistance of modified asphalt mixtures against moisture damage. The IDT test has been conducted in dry and wet conditions according to the Modified Lottman test procedure (AASHTO T283). The main objectives of the study are:

- Determining rheological characteristics of non-modified and SiCNT modified bitumen;

Table 1. Base bitumen properties

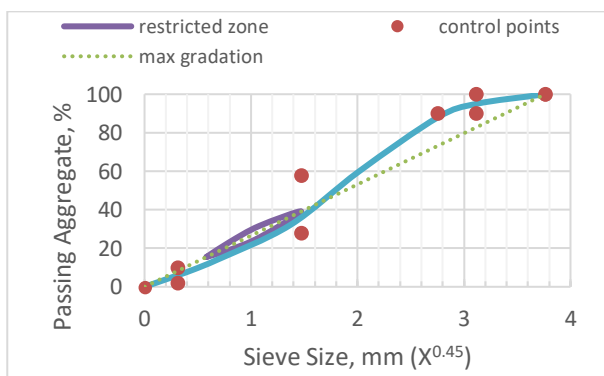
Test	Unit	Base Bitumen	Specification Limit
Penetration @25 °C	0.1 mm	62.2	50-70
Softening Point Ring&Ball	°C	49.9	46-54
Ductility @25°C, 5 cm/min	cm	>100	>100
RV @135 °C,	Pa.s	0.475	≤3Pa.s
RV @165 °C	Pa.s	0.15	-
DSR @10 rad/s	Fail Temperature	°C	G*/sinδ>1 kPa
	Grade	°C	64
Mass Loss	%	0	<0.5
Permanent Penetration	%	70.4	>50
Change in Softening Point	°C	+3.2	<9
DSR @10 rad/s	Fail Temperature	°C	G*/sinδ>2.2 kPa
	Grade	°C	64
DSR @10 rad/s	Fail Temperature	°C	G*.sinδ<5.000 kPa
	Grade	°C	22
	Temperature	°C	-12
BBR @60 s	m-value	0.325	m≥0.300
	Stiffness	MPa	213
		Performance Grade	PG 64-22

- Examining the effects of SiCNT on moisture susceptibility of asphalt mixtures; and
- Analyzing the dispersion of nano materials into bitumen using Scanning Electron Microscopy (SEM).

2. Materials and Methods

2.1. Aggregate and gradation

Hot mix asphalt (HMA) mixtures were prepared with limestone aggregate. Wearing course was adopted for preparation of HMA samples. 12.5 mm nominal maximum aggregate size was used. Dense graded HMA was prepared by Superpave™ guidance and gradation curve was selected as illustrated in Figure 1.

**Figure 1.** Gradation curve for HMA

2.2. Bitumen

Bitumen used in this study was PG 64-22 performance grade. Modified and non-modified bitumen characteristics were examined in accordance with the Superpave™ in terms of DSR, BBR, RTFOR and PAV. Rheological properties were determined in terms of penetration, ductility,

rotational viscometer and softening point and the results were given in Table 1.

2.3. SiC nanotube

SiC nanotube was used as an antistripping agent. Silicon carbide is an inorganic nanotube with formula of Silica (Si) and Carbon (C). SiC nanotube is a grayish white, insoluble in water. SiC nanotube properties are given in Table 2.

Based on the literature, the dosage of nano materials are used generally 1%-10% by the weight of bitumen. 1, 3 and 5 percent were used by the weight of bitumen in this study.

Table 2. Properties of SiCNT

Purity (%)	99+%
Average Particle Size	<80nm
Morphology	Cubic
Surface Area	25-50 m ² /g
Color	Grayish white
Bulk Density	0.05 g/cm ³
True Density	3.216 g/cm ³
Free Si	0.24%
Free C	0.76%

2.4. Experimental set up and procedure

Mixing the SiC nanotube with base bitumen was conducted by high shear mixer. DSR, BBR, RTFOT and PAV was adopted to determine the rheological properties of base bitumen. Compaction effort was performed with Superpave Gyrotory Compactor (SGC) for the nano modified asphalt mixtures. Optimum bitumen content (OBC) was determined for nano modified mixtures separately. Modified Lottman procedure was adopted to determine the moisture susceptibility. Experimental setup is given in Figure 2.

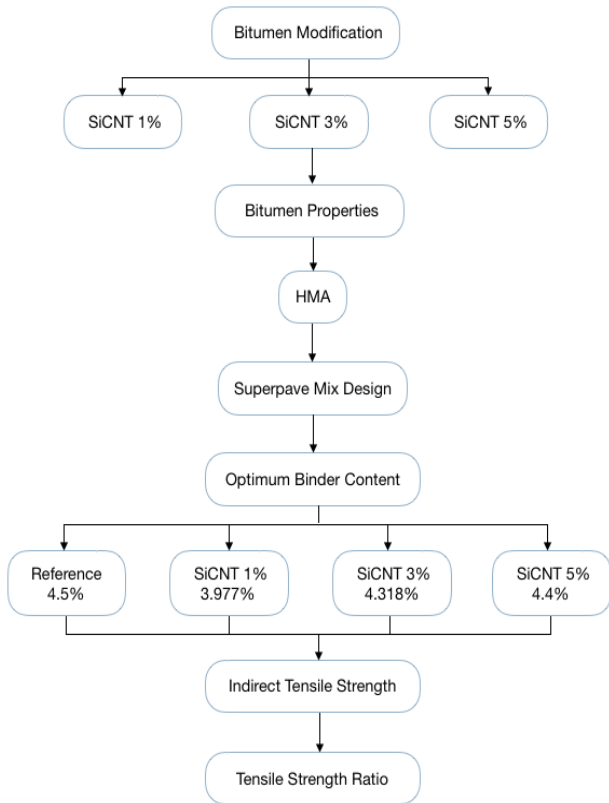


Figure 2. Experimental program

2.5. Preparation method of the modified bitumen with SiC nanotube

Modification effort was conducted with the high shear mixer. The mixer is capable of mixing 1.5 liter at 8000 rpm and 210°C. In this study, bitumen was mixed with nano materials at 4000 rpm. Temperature was set to 160°C and nano materials and bitumen was mixed for two hours in accordance with the literature review. Also, the contents of SiCNTs were chosen as 1%, 3% and 5% by weight of bitumen.

2.6. Mix design

OBCs of SiCNT modified mixtures were determined by Superpave™ mix design. %4 air void is aimed for compaction by SGC. Samples were compacted at 4% air void and in bitumen contents of 3.5%, 4%, 4.5% and 5% by SGC. OBC of base HMA was found as 4.5%. Air void content graphs of optimum binder were drawn from SGC compaction results. OBC was checked whether the limit value is ensured for VMA and VFA.

2.7. Tensile strength ratio (TSR)

Modified Lottman procedure is adopted to evaluate the moisture sensitivity. IDT strength and moisture susceptibilities of HMA was determined according to AASHTO T283 test procedure. First, samples are compacted a set of conditioned and unconditioned, three samples for dry and three samples for wet sets. Each sample is vacuum saturated to condition.

Modified Lottman test includes short term aging, freeze thaw cycle, limits on air voids (6 to 8%) and saturation (55 to 80%). Saturation level is calculated. And then the Tensile strength and TSR is calculated.

3. Results and Discussion

3.1. Results of the modified bitumen test

Penetration results were decreased by SiCNT modification. Softening point was increased for 3% SiCNT modified bitumen. All results were given in Table 3.

Table 3. Bitumen results modified by SiCNT

Test	Unit	Base	SiCNT 1%	SiCNT 3%	SiCNT 5%
Penetration	0.1 mm	62.2	56	50	53
Softening Point	°C	49.9	48.1	50.7	47.8
Penetration Index		-0.7	-1.4	-1.02	-1.6
Ductility	cm	>100	98	82	75
RV @135 °C	Pa.s	0.475	0.5	0.562	0.75
RV @165 °C	Pa.s	0.15	0.15	0.162	0.2

The viscosity of SiCNT modifications were increased when the content was increased. So that temperatures of mixing and compaction were higher than the base bitumen meaning that these modifications were less workable except SiCNT 1% modification (Figure 3). Mixing and compaction temperatures were given in Table 4.

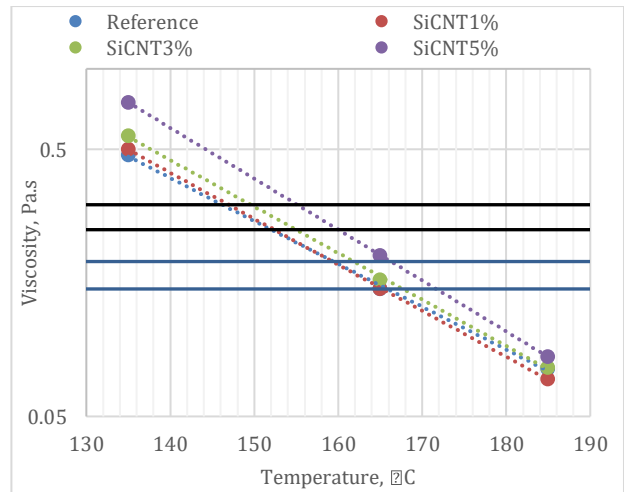


Figure 3. Rotational viscometer test results

Table 4. Compaction and mixing temperatures

Sample*	Reference	SiCNT 1%	SiCNT 3%	SiCNT 5%
CI	147-152	147-152	149-155	155-160
CT	149.5	149.5	152	157.5
MI	159-165.9	159-165	161.5-167.5	166-171.5
MT	162.45	162	164.5	168.75

*CI: compaction interval; CT: compaction temperature; MI: mixing interval; MT: mixing temperature

3.2. Results of the mix design

Optimum binder graphs were drawn and VMA and VFA was checked and ensured by 4.5% OBC of HMA (Figure 4). Same graphs were drawn for SiCNTs,

separately and OBC was obtained for all content of SiCNT modified HMA as 3.977% for 1% modification, 4.318% for 3% modification and 4.4% for 5% modification (Figure 5). VMA and VFA was checked also for modified samples.

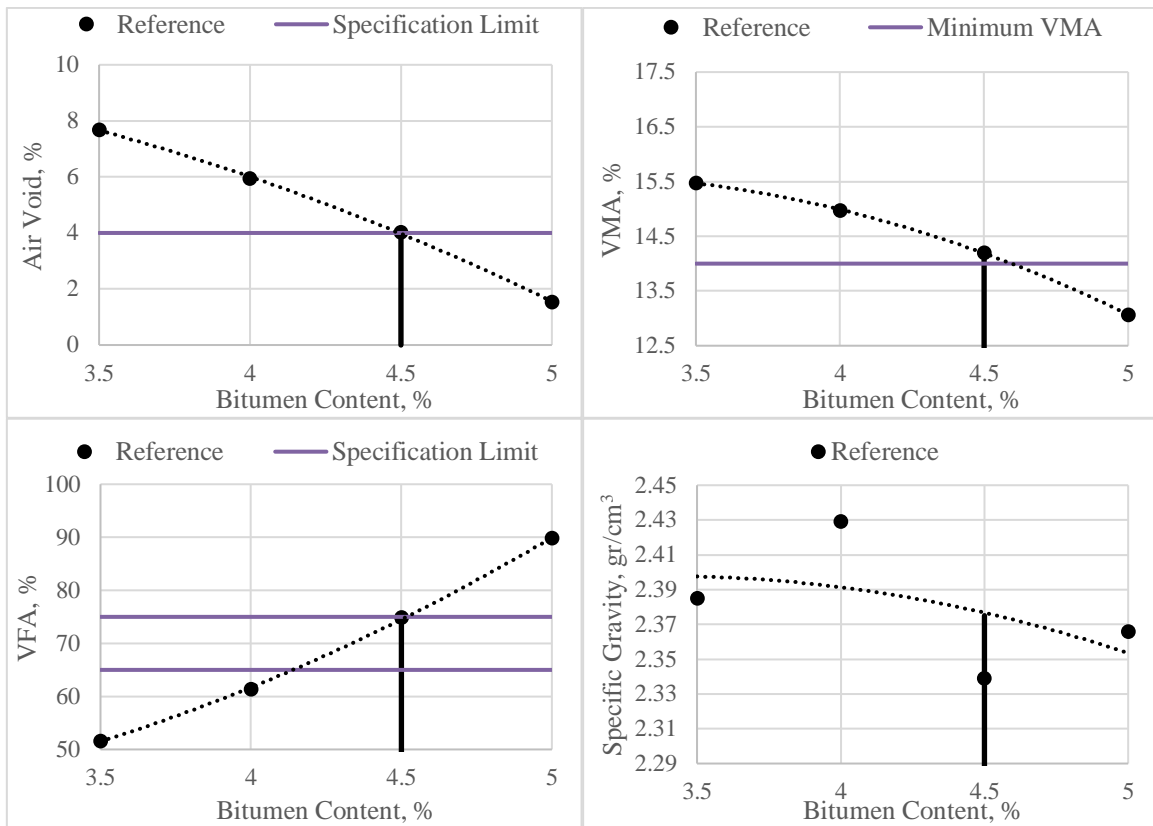


Figure 4. Optimum binder content for base HMA

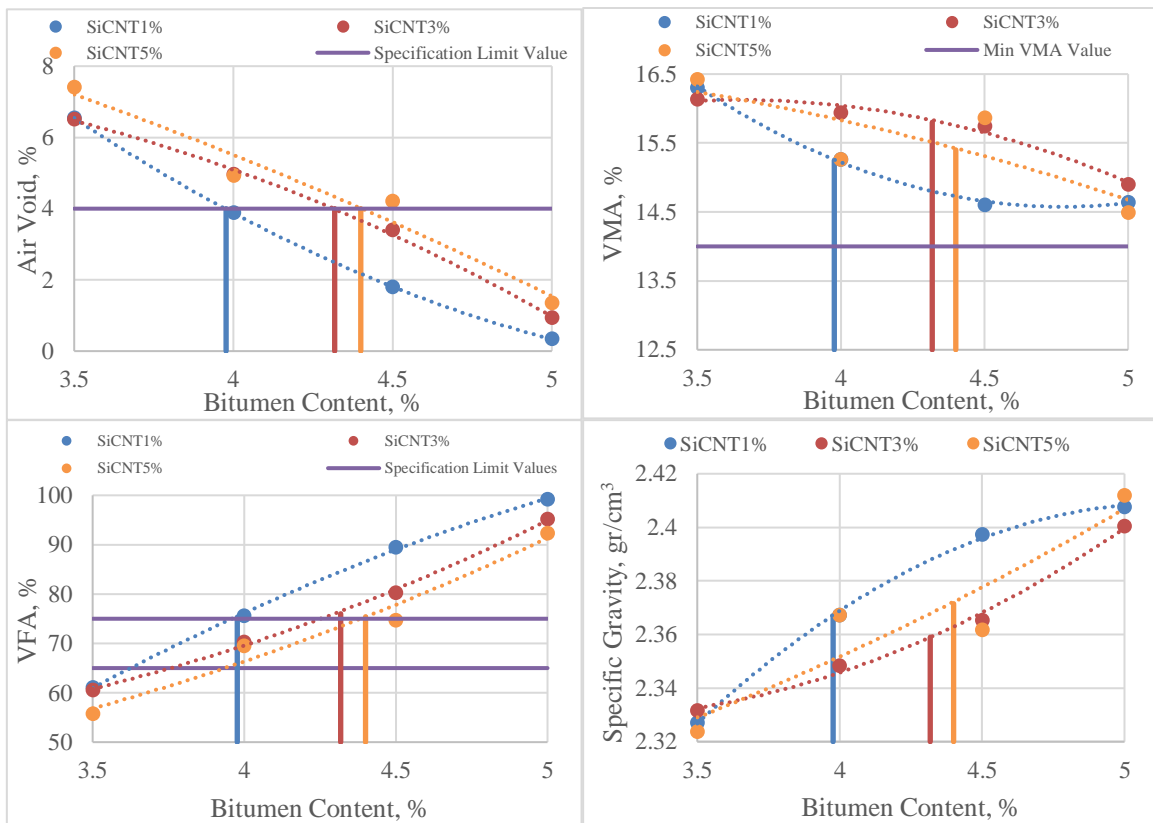


Figure 5. Optimum binder content for SiCNT

3.3. Results of the moisture susceptibility

IDT Strength test results were obtained as shown in Fig. 6. Indirect Tensile Strength of unconditioned sample (IDT_u) parameters were increased when the content of SiCNT increased for 1% and 3%. So, all modifications showed higher strength. IDT_u parameters of all modifications were increased approximately 47%. High-performance was obtained by SiCNT modifications.

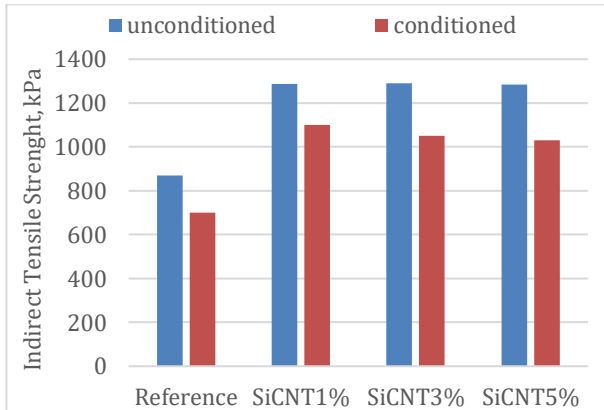


Figure 6. Indirect Tensile Strength

TSR was calculated for all modified samples (Fig. 7). The limit value should be 80% for TSR according to the specification. Specification limit was ensured for all modified HMA. TSR values were higher than the reference sample. As a result, bitumen modified samples have more resistance to the moisture.

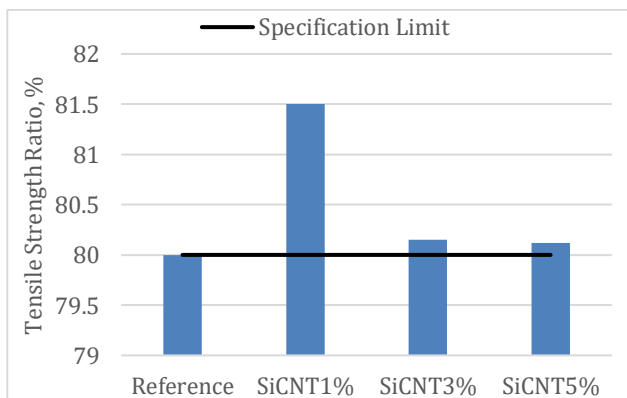


Figure 7. Tensile Strength Ratio

Results were given as improvement percentage in Table 5. Improvement percent was indicated as high (\uparrow) having higher performance and low (\downarrow) having lower performance. But, for penetration and OBC results, lower values mean high performance.

According to penetration index (PI) results, SiCNT modifications were found the less temperature susceptible. According to mixing and compaction temperatures only the SiCNT 1% modification was the most workable bitumen same as base bitumen. OBCs were decreased by modification. The highest moisture resistive sample was found the sample modified by SiCNT 1%.

Table 5. Comparison of all results

Test	SiCNT modification (% improvement)				
	Penetration	Softening Point	IDT_u	TSR	Optimum Bitumen
1%	\downarrow 9.9	\downarrow 3.6	\uparrow 47.8	\uparrow 1.875	\downarrow 11.6
3%	\downarrow 19.6	\uparrow 1.6	\uparrow 47.9	\uparrow 0.187	\downarrow 4
5%	\downarrow 14.7	\downarrow 4.2	\uparrow 47.5	\uparrow 0.15	\downarrow 2.2

* \uparrow Higher % when compared to reference sample
* \downarrow Lower % when compared to reference sample

Economically, bitumen costs were big problems in terms of construction costs. Bitumen costs 2.135 TL/tons and additive costs increase these costs. However, additives are able to increase performance of the bitumen. So that, nanotubes can improve bitumen properties. According to the results, SiCNT nanotubes were found to be increase performance and decrease optimum bitumen contents. Decreasing optimum bitumen content provides less usage of bitumen content and less costs. In terms of economic evaluation SiCNT nanotubes provide decreasing costs.

4. Conclusion

Conclusions can be drawn as follows:

- Minimum 9.9% decrement was obtained by all modifications. The consistency was improved maximum 19.6% by SiCNT 3% modification.
- The mixing and compaction temperatures were same both for SiCNT 1% and base bitumen.
- The strength of all modifications was increased according to IDT_u values.
- SiCNT 1% modified HMA had higher moisture resistance compared to reference HMA. All modifications have also high resistance against moisture according to TSR results.
- Optimum bitumen content was decreased by all modifications. Less bitumen usage provides less cost. Cost analysis could be conducted by these modifications for further studies.
- Best performance was obtained by SiCNT 3% evaluating whole test results which are given in Table 5.
- Bitumen properties should be investigated for further studies in accordance with the aging procedures.

References

- [1] Li, R., Xiao, F., Amirkhanian, S., You, Z., Huang, J. 2017. Developments of nano materials and technologies on asphalt materials-A review. Construction and Building Materials, 143, 633-648.
- [2] Mostafa, A. E. A. 2016. Examining the Performance of Hot Mix Asphalt Using Nano-Materials. IOSR Journal of Engineering, 6(2), 25-34.
- [3] Zalnezhad, H., Galooyak, S. S., Farahani, H., Goli, A. 2015. Investigating the effect of nano-silica on

- the specification of the sasobit warm mix asphalt. *Petroleum & Coal*, 57(5), 509-515.
- [4] Zafari, F., Rahi, M., Moshtagh, N., Nazockdast, H. 2014. The improvement of bitumen properties by adding nanosilica. *Study of Civil Engineering and Architecture*, 3(1), 62-69.
- [5] Sadeghpour Galooyak, S., Palassi, M., Goli, A., Zanjirani Farahani, H. 2015. Performance evaluation of nano-silica modified bitumen. *International Journal of Transportation Engineering*, 3(1), 55-66.
- [6] Enieb, M., Diab, A. 2017. Characteristics of asphalt binder and mixture containing nanosilica. *International Journal of Pavement Research and Technology*, 10(2), 148-157.
- [7] Shafabakhsh, G. H., Ani, O. J. 2015. Experimental investigation of effect of Nano TiO₂/SiO₂ modified bitumen on the rutting and fatigue performance of asphalt mixtures containing steel slag aggregates. *Construction and Building Materials*, 98, 692-702.
- [8] Tanzadeh, J., Vahedi, F., Kheiry, P. T., Tanzadeh, R. 2013. Laboratory study on the effect of nano TiO₂ on rutting performance of asphalt pavements. In *Advanced materials research* 622-623, 990-994.
- [9] Akbulut, H. 2013. Viscous behavior of asphaltic mixtures: Simplified fatigue test methods. *Indian Journal of Engineering and Materials Sciences*, 10, 161-165.
- [10] Motlagh, A. A., Kiasat, A., Mirzaei, E., Birgani, F. O. 2012. Bitumen modification using carbon nanotubes. *World Applied Sciences Journal*, 18(4), 594-599.
- [11] Yilmaz A., Sargin, S. 2012. Water Effect on Deteriorations of Asphalt Pavements. *The Online Journal of Science and Technology*, 2 (1), 1-6.
- [12] Hamed, G. H., Nejad, F. M., Oveisi, K. 2016. Estimating the moisture damage of asphalt mixture modified with nano zinc oxide. *Materials and Structures*, 49(4), 1165-1174.
- [13] Azarhoosh, A., Moghaddas Nejad, F., Khodaii, A. 2018. Evaluation of the effect of nano-TiO₂ on the adhesion between aggregate and asphalt binder in hot mix asphalt. *European Journal of Environmental and Civil Engineering*, 22(8), 946-961.
- [14] Nabiun, N., Khabiri, M. M. 2016. Mechanical and moisture susceptibility properties of HMA containing ferrite for their use in magnetic asphalt. *Construction and Building Materials*, 113, 691-697.
- [15] Hossain, Z., Zaman, M., Hawa, T., Saha, M. C. 2015. Evaluation of moisture susceptibility of nanoclay-modified asphalt binders through the surface science approach. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 27(10), 04014261.
- [16] Behbahani, H., Ziari, H., Kamboozia, N., Khaki, A. M., Mirabdolazimi, S. M. 2015. Evaluation of performance and moisture sensitivity of glassphalt mixtures modified with nanotechnology zycosoil as an anti-stripping additive. *Construction and Building Materials*, 78, 60-68.
- [17] Yao, H., Dai, Q., You, Z. 2015. Chemo-physical analysis and molecular dynamics (MD) simulation of moisture susceptibility of nano hydrated lime modified asphalt mixtures. *Construction and Building Materials*, 101, 536-547.
- [18] Hamed, G. H., Moghadas Nejad, F., Oveisi, K. 2015. Investigating the effects of using nanomaterials on moisture damage of HMA. *Road Materials and Pavement Design*, 16(3), 536-552.
- [19] Iskender, E. 2016. Evaluation of mechanical properties of nano-clay modified asphalt mixtures. *Measurement*, 93, 359-371.
- [20] Hamed, G. H. 2017. Evaluating the effect of asphalt binder modification using nanomaterials on the moisture damage of hot mix asphalt. *Road Materials and Pavement Design*, 18(6), 1375-1394.
- [21] Ziari, H., Mirzababaei, P., Babagoli, R. 2016. Properties of bituminous mixtures modified with a nano-organosilane additive. *Petroleum Science and Technology*, 34(4), 386-393.
- [22] Babagoli, R., Mohammadi, R., Ameri, M. 2017. The rheological behavior of bitumen and moisture susceptibility modified with SBS and nanoclay. *Petroleum Science and Technology*, 35(11), 1085-1090.
- [23] Zahedi, M., Baharvand, B. 2017. Experimental study of Nano clay and crumb rubber influences on mechanical properties of HMA. *Journal of Civil Engineering and Structures*, 1(1), 10-24.
- [24] Arabani, M., Hamed, G. H. 2014. Using the surface free energy method to evaluate the effects of liquid antistripping additives on moisture sensitivity in hot mix asphalt. *International Journal of Pavement Engineering*, 15(1), 66-78.

A Locally Searched Binary Artificial Bee Colony Algorithm Based on Hamming Distance for Binary Optimization

Zeynep Banu ÖZGER¹, Bülent BOLAT², Banu Diri³

¹Sütçü İmam Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Bilgisayar Mühendisliği Bölümü, 46040, Kahramanmaraş, Türkiye

²Yıldız Teknik Üniversitesi, Elektrik-Elektronik Fakültesi, Elektronik ve Haberleşme Mühendisliği Bölümü, 34220, İstanbul, Türkiye

³Yıldız Teknik Üniversitesi, Elektrik-Elektronik Fakültesi, Bilgisayar Mühendisliği Bölümü, 34220, İstanbul, Türkiye

(Alınış / Received: 21.10.2019, Kabul / Accepted: 03.02.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Keywords

Artificial bee colony,
Data mining,
Heuristic algorithms,
Machine learning

Abstract: Artificial Bee Colony is a population based, bio-inspired optimization algorithm that developed for continues problems. The aim of this study is to develop a binary version of the Artificial Bee Colony (ABC) Algorithm to solve feature subset selection problem on bigger data. ABC Algorithm, has good global search capability but there is a lack of local search in the algorithm. To overcome this problem, the neighbor selection mechanism in the employed bee phase is improved by changing the new source generation formula that has hamming distance based local search capacity. With a re-population strategy, the diversity of the population is increased and premature convergence is prevented. To measure the effectiveness of the proposed algorithm, fourteen datasets which have more than 100 features were selected from UCI Machine Learning Repository and processed by the proposed algorithm. The performance of the proposed algorithm was compared to three well-known algorithms in terms of classification error, feature size and computation time. The results proved that the increased local search ability improves the performance of the algorithm for all criteria.

Hamming Mesafesi ile Lokal Arama Tabanlı İkili Yapay Arı Kolonisi Algoritması

Anahtar Kelimeler

Yapay arı kolonisi,
Veri madenciliği,
Sezgisel algoritmalar,
Makine öğrenmesi

Özet: Yapay Arı Kolonisi Algoritması sürekli uzay problemleri için geliştirilen, popülasyon tabanlı, doğadan esinlemeli bir optimizasyon algoritmasıdır. Bu çalışmanın amacı, büyük veride, öznitelik alt küme seçimi problemini efektif bir biçimde çözmek için Yapay Arı Koloni (YAK) Algoritmasının ikili bir versiyonunu geliştirmektir. YAK Algoritması başarılı bir global yakınsama sunmakla birlikte lokal bölgedeki olası çözümleri gözden kaçırabilmektedir. Algoritmanın komşu kaynak seçimi mekanizmasına, Hamming Mesafe ölçümü tabanlı bir yerel arama prosedürü eklenmiştir. Ayrıca, yeniden nüfus stratejisi ile popülasyonun çeşitliliği artırılmış ve erken yakınsama önlenmiştir. UCI Makine Öğrenmesi Havuzu'ndan, öznitelik sayısı 100'den fazla olan 14 veri kümesi seçilmiş ve önerilen yöntem ile öznitelik seçimi yapılmıştır. Algoritmanın performansı, yaygın kullanılan ve başarısı kanıtlanmış üç sezgisel algoritma ile sınıflandırma hatası, seçilen öznitelik sayısı ve hesapsal maliyet bakımından karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, YAK algoritmasına entegre edilen lokal arama prosedürünün, algoritmanın performansını tüm kriterler bakımından artırdığını göstermektedir.

1. Introduction

The process of selecting the distinctive features (attributes) of a given dataset is called feature subset selection [1], or simply features selection. Unlike the

process of feature extraction, a feature selection process finds the most relevant features of the data without using a transformation and removes all unnecessary features. Three common feature selection methods are reported in the literature:

* Corresponding author: zeynepozger@ksu.edu.tr

filters, wrappers and hybrid methods. Filters select the most relevant top n features according to an arbitrary quality score such as t -score, p -stat, etc., but they do not consider the relationships between features. The computational cost of filters is low; however, their performance is not sufficient for most applications [2]. Furthermore, when the datasets differ in size and complexity, it is a problem to determine what the value of n will be. Wrappers consist of an induction algorithm to select a subset of the features and a learner to produce feedback for the induction algorithm. Wrappers yield better performance in terms of computational complexity. For example, if the data consists of n features, 2^n possible subsets need to be searched. Especially for very large datasets, it is not possible to search the entire set of possibilities [3]. To overcome this problem, hybrid methods have been developed. A hybrid feature selection method first reduces the number of features to a reasonable value by using a filter. Then, the best subset is determined by a wrapper.

The feature selection process has two main steps: subset generation and subset evaluation. Subset generation is basically a search procedure. Since heuristic search algorithms do not need to search the entire space, they are widely used in wrappers to overcome the curse of dimensionality. Particle swarm optimization [4-6], genetic algorithms [7, 8], genetic programming [9], ant colony optimization [10-12], the Bat algorithm [13], tabu search [14, 15], simulated annealing [16, 17] and differential evolution [18, 19] are some examples of heuristic algorithms that have been applied to feature selection problems.

If an algorithm produces multiple solutions and tries to improve the solutions iteratively, it is called a population-based algorithm. Artificial Bee Colony (ABC) is a population-based swarm intelligence algorithm that simulates the foraging behaviour of honeybees. A bee colony includes three types of bees: employed bees, onlooker bees and scout bees. Communication between the employed and onlooker bees is based on sharing information the quality of the food source. Scout bees are responsible for searching for new sources when a food source is abandoned.

ABC is a stochastic optimization technique that operates on continuous space. In this study the feature selection problem is tackled at binary space. Therefore, it is necessary either to transform the result vector to binary space using a binarization function, or to adapt the equations in the employed bee phase to work with binary vectors. The literature reports several binary versions of ABC algorithms. Ozturk et al. [20] presented an algorithm that uses binary vectors and a cross-over genetic operator to solve the dynamic image clustering and 0-1 knapsack

problems. Jia et al. [21] utilized bitwise AND, OR, and XOR operators to generate new sources for solving some benchmark functions. Kiran and Gunduz [22] also employed the bitwise XOR operator for the uncapacitated location problem at binary space. Kashan et al. [23] proposed a distance-based ABC algorithm called DisABC. They preferred the Jaccard Coefficient measure on binary vectors for solving pure binary optimization problems. Ozturk et al. [24] added genetic cross-over, swap and selection operators to DisABC and named their variant as IDisABC. IDisABC is used for dynamic clustering problems. Because of its effectiveness, Hancer et al. [25] hybridized DisABC with the Differential Evolution algorithm (MDisABC) for feature selection problems. Singhal et al. [26] also utilized DisABC to produce new binary sources for solving the unit commitment problem. They modified the \emptyset vector, which is a component of the production mechanism for new sources. Additionally, in order to increase the convergence rate, the abandoned source is determined as the global best vector. Yurtkuran and Emel [27] determined different cross-over operators for producing new sources both in the employed and scout bee phases. Zhang and Zhang [28] also used binary vectors as food sources to construct spanning trees in vehicular ad hoc networks. In this work, to produce a candidate solution in the employed bee phase, two random bits are selected from the current source, and then they are inverted. Zhang and Gu [29] proposed a combination of the insertion and swap operators to solve the flow shop scheduling problem. Tasgetiren et al. [30] improved the previous work by adding a local search mechanism in the employed and onlooker bee phases. The algorithm proposed by Zhang and Ye [31] produced a new source by performing a local search around the current source, and then selecting the best one in the employed bee phase. Ye and Chen [32] proposed a method that uses some local search strategies based on velocity computation for solving the minimum attribute reduction problem. Ribas et al. [33] also used the local search strategy in their study for the blocking flow shop problem. Han et al. [34] developed a differential evolution-based binary ABC algorithm for the flow shop scheduling problem. Schiezero and Pedrini [35] utilized a perturbation parameter in the employed bee phase. In this method, a random number from a distribution between 0 and 1 is generated for each position of the current source. If this random value is greater than a predefined perturbation parameter, the bit is set as 1. Ozmen et al. [36] produced new sources in discrete space with substitution and shift operators.

The methods mentioned above use binary vectors and/or impose changes on the component of the ABC algorithm that produces the new source. However, some other methods use continuous vectors, and then transform the results to the binary space. Wei and Hanning [37] used the round function for four

benchmark functions and named it BABC. Tran and Wu [38] modified BABC by changing the transformation function: they preferred a sigmoid function and expanded the threshold values. While Kiran [39] used the mod and the round operators together for solving the uncapacitated facility location problem, Mandala and Gupta [40] utilized the tangent function to transform the continuous results into binary space.

ABC is a strong optimization algorithm. Therefore it applied to many optimization problems. To avoid falling to local optimum, the local search capability of the algorithm is limited. Candidate solutions are generated somewhere between two sources. We examined that, because of this strategy, sometimes causes to lose a good solution. This issue motivated us to adopt a local search procedure in the algorithm. Our aim was to add a local search procedure to the algorithm without losing its heuristic.

The goal of this study is to develop a binary version of the ABC algorithm to solve the feature subset selection problem on large datasets. To achieve this goal, BitABC [21], which is a binary variant based on bitwise operators, is selected as a starting point with reference to our previous studies [41]. To improve the local search ability of this algorithm, the neighbour selection mechanism in the employed bee phase is improved by changing the new source generation formula and by using multiple candidates for new sources. To improve exploration capacity, the initialization phase is updated. Additionally, a repopulation strategy is provided to increase the diversity of the population. To measure the effectiveness of the proposed algorithm, fourteen datasets that each has more than 100 features were selected from the UCI Machine Learning Repository and processed by the proposed algorithm. The performance of the proposed algorithm was compared to that of three well-known heuristic algorithms.

Organization of the paper as follows. Section 2 introduces the principles of ABC, Binary ABC, and BitABC. The proposed method is introduced in the Section 3. Section 4 summarizes the experimental results. Finally, Section 5 devotes to the concluding remarks.

2. Material and Method

In this section the background of study is presented.

2.1. Artificial bee colony algorithm

ABC is a bio-inspired swarm intelligence algorithm proposed by Karaboga in 2005 [42]. The algorithm was developed to solve multi-dimensional optimization problems by modelling the foraging, learning, and knowledge sharing behaviors of honey

bees. Typically, during the food searching process three distinct bee types are present. Employed bees exploit their sources and provide information to onlooker bees about the food sources. The onlooker bees select a food source and try to optimize it. Scout bees search new sources randomly. The food sources represent possible solutions, and the quality of a solution is indicated by the amount of nectar. Each food source is exploited by one employed bee and optimized by one onlooker bee; therefore, the number of the food source is equal to the number of the employed and onlooker bees. The original ABC algorithm includes 4 phases:

1. Initialization phase: Suppose that there are N bees in the hive and each bee represents a solution that is expressed by D parameters. The initial food sources are generated randomly by (1).

$$x_{ij} = x_j^{min} + U(0,1)(x_j^{max} - x_j^{min}) \quad (1)$$

Where $x_i = \{x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{ij}, \dots, x_{id}\}$ is the i^{th} food source, $U(0, 1)$ is a uniformly distributed random variable between 0 and 1, and x_j^{min} and x_j^{max} are the minimum and maximum values of parameter j .

The current source number is represented by i , and j is the dimension of the vector.

2. Employed bee phase: Each employed bee directs to a food source and then finds a new source in the vicinity of the current source by using (2).

$$v_{ij} = x_{ij} + \phi_{ij}(x_{ij} - x_{kj}) \quad (2)$$

Where i is the index of the current source, k is the index of a randomly selected neighbor source, and ϕ_{ij} is a uniformly distributed random number between -1 and 1. If the fitness value of the new source is better than the previous one, the employed bee memorizes it, sets the number of trials to zero, and abandons the previous source. Otherwise, the number of trials of the current source is increased by 1 until a predefined maximum value is reached.

3. Onlooker bee phase: Once the employed bees provide information to the onlooker bees about the location and the quality of the food sources, each onlooker bee selects a source by using the roulette-wheel method (3). According to this equation, if the nectar volume of a source is high, it has a high probability of being selected. In other words, onlooker bees make a greedy selection according to information provided by employed bees. The selection probability of the i^{th} source is calculated as follows:

$$p_i = \frac{fitness_i}{\sum_{j=1}^N fitness_j} \quad (3)$$

where 'fitness' is the fitness value of ' x_i ' and ' N ' is the total number of the food sources. After calculating the probabilities of all sources, a uniformly distributed random value between 0 and 1 is generated. If p_i is greater than the random value, a new source is generated using equation (2) and its fitness value is calculated. An onlooker bee selects the new source if it has better fitness value than the current source, and the onlooker bee becomes an employed bee for the next iteration.

4. Scout bee phase: There is a pre-defined threshold value for the number of trials of the sources. When the number of trials of a source exceeds this threshold value, it is assumed that this source is a local optimum, and the source is abandoned. If a food source is abandoned, the bee that had been assigned to it becomes a scout bee, and a new source is generated by using (1) for the scout bee.

2.2. Binary artificial bee colony algorithm

Initially, the ABC algorithm was designed to solve optimization problems effectively in continuous space. Hence, the original ABC algorithm is not suitable for binary optimization problems such as feature selection. There have been a few attempts to overcome this issue reported in the literature, as seen in Section 1. Their common properties are summarized as follows. The sources are represented by binary vectors, and the size of the vector is equal to the number of features. Logic 1 in this vector indicates that the corresponding feature is being selected, and logic 0 indicates the opposite. The fitness value of any source is calculated by using the classification accuracy of the feature subset determined by the source.

2.3. Bitwise operators ABC algorithm

Ji et al. [21] introduced a binary ABC algorithm (BitABC) based on the bitwise operators between binary vectors. In this work, the authors used binary vectors, and to generate a new source they used bitwise operators. The authors revised the initialization method and the new source generation strategy of the employed and onlooker bee phases. In the initialization phase, ABC uses the maximum and the minimum values of each parameter. However, if the problem comes from a binary space, any parameter can only be 0 or 1. Sources are initialized for BitABC with equation (4). According to this, a random value between 0 and 1 is produced, and if this value greater than a threshold value, corresponding dimension of vector is set to 1 otherwise it is set to 0.

$$x_{ij} = \begin{cases} 1, & \text{if } \text{rand}(0,1) \geq \text{threshold} \\ 0, & \text{if } \text{rand}(0,1) < \text{threshold} \end{cases} \quad (4)$$

ABC uses arithmetic operators for generating new sources. In binary space, arithmetic operators are not meaningful. To overcome this issue BitABC changed the new food source production method in the employed and onlooker bee phases by using binary operators instead of arithmetic operators.

2.4. The proposed method

In our previous paper [41], we applied binary ABC algorithms on the feature selection problem using 10 datasets. We have seen that one of these binary algorithms (BitABC) yielded better results in the feature selection process. Its better results and simplicity lead us to select it a starting point. The weakness of BitABC is its lack of local search ability.

The main goal of this study is to develop a binary ABC algorithm that can solve the feature selection problem effectively. As mentioned above, in our previous experiments we found that BitABC achieved better accuracy than the other binary ABC variants. However, because of its new source generation strategy, its local search capacity is limited. Hence, this deduction led us to improve the local search capacity of BitABC. In the ABC algorithm, local search is performed in the onlooker and employed bee phases. Then, we have modified the new source generation method of the employed bee step of BitABC.

The ABC algorithm's strategy for new source generation is as follows. In the i^{th} iteration, a new source is generated by using the current source x_i , a randomly selected neighbor x_k and a random value \emptyset . Therefore, the new source should fall within the range between x_i and x_k . The \emptyset_i term determines whether the new source is close to x_i or x_k . If the new source is far from the current source, the bee moves away from its own local area, and the current source is potentially abandoned, even it contains a promising amount of nectar. Abandoning a potentially good region causes the lack of local search ability of the algorithm. To improve the local search ability of ABC, we limited the distance between the current source and the new source. By using such restrictions the risk of abandoning a promising source is reduced. Since the position of a given source is represented by a binary string, Hamming distance is used as the distance metric. Additionally, since using arithmetic operators is not meaningful in binary space, we used bitwise operators like BitABC. The \emptyset vector is also a binary vector.

As mentioned above, the location of the new source is determined by the random \emptyset vector and a randomly selected neighbor. It is not possible to restrict the distance between the selected neighbor and the current source. For example, if the data have 100 features, the food sources must have 100 dimensions. Therefore, the Hamming distance between the

current source and the random neighbor should be any integer between 1 and 100, and using existing methods, there is no way to limit the distance to be lower than a certain number. However, using the BitABC algorithm, this can easily be controlled by modifying the new source generation formula that is used in BitABC. New source generation formula is updated with equation (5).

$$v_i = \emptyset_2 AND (\emptyset_1 AND (x_i OR x_k)) \quad (5)$$

Where \emptyset_1 and \emptyset_2 are random vectors, x_i is the current source, x_k is a randomly selected neighbor and v_i is the new source. As an example, let $x_i = \{1\ 0\ 1\ 1\ 1\ 1\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0\}$ be the current source, $x_k = \{1\ 0\ 1\ 0\ 1\ 1\ 0\ 0\ 0\ 1\ 1\ 0\}$ be the neighbor source, and \emptyset be a random binary vector, $dH(x_i, x_k) = d$ where $dH(x, y)$ is the Hamming distance between the binary vectors x and y , and d is an integer. To increase the diversity of the selected features, i.e. the position of 1s in the source vector, the bitwise 'OR' operator is applied to the current sources and the neighbor sources using equation (6).

$$y = x_i OR x_k = \{1\ 0\ 1\ 1\ 1\ 1\ 0\ 0\ 0\ 1\ 1\ 0\} \quad (6)$$

This operation increases the diversity of the selected features; however, the resulting vector y has greater than or equal to the number of 1s in x_i . Since the main goal of the feature selection process is to find the minimal set of relevant features, this result is inappropriate. Another problem is that, after such operation, the distance between x_i and x_k increases, and the ability to search locally is reduced. To resolve these problems, a random \emptyset_1 vector is used. If $dH(x_i, x_k) = r$, then \emptyset_1 is produced by altering random d bits of x_i . Let $d = 5$ and $\emptyset_1 = \{0\ 0\ 1\ 1\ 1\ 1\ 1\ 0\ 1\ 1\ 0\ 1\}$; then y_2 is found using equation (7):

$$y_2 = \emptyset_1 AND (x_i OR x_k) = \{0\ 0\ 1\ 1\ 1\ 1\ 1\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0\} \quad (7)$$

Where $dH(x_i, y_2) = 1 < d$. However, after simulation experiments we saw that if another random term, e.g. \emptyset_2 , is used, it is possible to find better new sources. This new \emptyset_1 vector is derived by altering r bits of \emptyset_1 . Again, let $d = 5$ and $\emptyset_2 = \{0\ 1\ 1\ 0\ 0\ 0\ 0\ 1\ 1\ 0\ 0\ 1\}$. By using equation (5), the final solution of the new source v_i becomes $v_i = \{0\ 0\ 1\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0\ 0\}$. The distance between v_i and x_i is a Gaussian-like distributed variable between 1 and d . In a feature selection problem, identifying distinctive feature subgroups is important. By using (5) at the employed bee phase, we provided that there are small changes between the previous and current sources. Thus, the algorithm is able to identify features that are highly discriminatory when combined together.

As a final improvement, to increase the local search ability of the ABC algorithm, five new candidate sources were generated for each employed bee within a maximum distance of r from the current

source, and the best one was selected. This step concludes the first version of the proposed method. Following preliminary experiments, a new version of this method has been developed. If the fitness of the current source is better than all of the new candidate sources, it means that the current source is a local optimum. If d is chosen as a small value, then the new candidates originate from narrow vicinity, and it is possible to miss a better solution due to the highly localized nature of the search algorithm. To fix this problem, a small change has been made to the proposed algorithm. First, the number of the candidate sources is reduced to three. If these three candidates cannot produce a better solution than the current source, a fourth candidate is produced by using a new source generation formula (8) of BitABC because this equation always produces a new source that has a larger distance from the current one.

$$v_i = x_i XOR (\emptyset_i AND (x_i OR x_k)) \quad (8)$$

If the fitness of the fourth candidate is better than the current, the new solution of this candidate becomes the current source for the next step. Otherwise, the number of trials parameter of the i^{th} source is increased by four (four new sources are generated). The flowchart of the proposed method is shown in Figure 1. We named this method exBitABC.

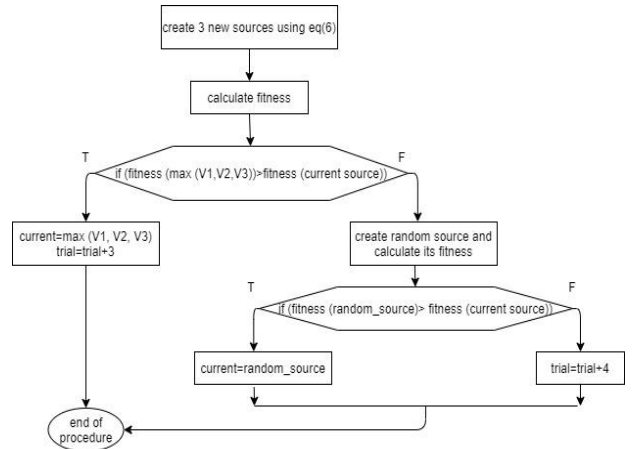


Figure 1. Flow chart of the new source generation procedure of exBitABC

The initial food sources are determined randomly by the ABC algorithm. In this way, any two sources are close to each other. Namely, the Hamming Distance between any two sources can be a small value. Our purpose is to increase the search capacity in the local regions around the sources. If two or more sources are close to each other, the regions being searched will also overlap. To overcome this problem, the initialization strategy is updated: The search space is divided into regions, and the number of regions is equal to the number of food sources. In this way, the distance between sources is equal. For the feature selection problem, the size of the search space is equal to the feature size of the dataset. Consequently, the distance between any two sources is determined

by using equation (9). Each employed bee is responsible for a single specified region when iterations are initiated.

$$\text{minDistance} = \frac{\text{featureSize}}{\text{\#sources}} \quad (9)$$

The roulette-wheel method used in the onlooker bee phase directs more bees to better sources. However, this strategy may cause a decrease of diversity over time. Since the proposed method performs a comprehensive local search around each source, the proximity of sources leads to searching in the same regions. To overcome this problem and to increase diversity, a re-population strategy is applied. At the end of each iteration, the Hamming distances between the sources are calculated. If the distance between two sources is less than d (the predefined maximum Hamming distance value that mentioned above), the one with better fitness is kept, and the other is re-initialized. In this way, premature convergence is prevented and diversity is increased. Also, this algorithm supports our more comprehensive local search strategy without decreasing global search.

3. Results

To show the effectiveness of our method, 14 benchmark datasets with different sizes were selected from the UCI Machine Learning Repository, and a binary particle swarm optimization method (BinPSO), genetic algorithm (GA), a binary ABC algorithm (BitABC), and the proposed algorithm were applied on these benchmarks. We did not need to reapply the other binary ABC variants in the literature since we have previously examined these [41]. To prove the effectiveness of feature selection, the benchmark data were classified by using 5-NN without feature selection. Table 1 summarizes the number of features, the number of classes, and the sizes of the datasets selected for the benchmark testing. During the experiments, all datasets were randomly divided into three parts. The first part includes approximately 60% of each dataset as the training set, 20% of each dataset as the test set and the remaining data are used as the validation set. The validation data is never used in the feature selection process. During the feature selection, a 5-NN is trained with the training set by using the selected subset of features, and then its effectiveness is measured by using the test set. Once the best subset is determined, its performance is measured by using validation set.

The initial population was generated by using a threshold value of 0.85, i.e. any bit of ξ set to 0 with a probability of 0.85. Since these algorithms include non-deterministic operations, all of the experiments were repeated 30 times, and the results were averaged to confirm the results statistically. The

distance parameter of exBitABC (d) was set to 15. The number of the trials value for the scout bee was set to 50. All of the parameters were chosen by trial and error. For the BinPSO, learning factors c_1 and c_2 were selected as 2, the initial weight (w) was set to 0.9, and the maximum speed (V_{\max}) for particles was selected as 0.6, as stated in [43]. For the GA, the crossover and mutation rates were set as 0.8 and 0.2, respectively, as reported in [44]. BinPSO and GA were implemented according to the suggestions of the authors of [43, 44].

Table 1. The datasets consider in this work

Dataset Name	#Features	#Classes	#Samples
Hill-Valley	100	2	606
UrbanLandCover	148	9	168
Musk-I	166	2	476
Arrhythmia	279	16	452
LSVTVoice Rehabilitation	309	2	126
Madelon	500	2	2600
Secom	591	2	1567
Malacious	513	2	373
Isolet5	617	26	1559
Multiple Features	649	6	2000
CNAE	857	9	1080
Micromass	1300	9	931
Gisette	5000	2	6000
Arcene	10000	2	200

In a feature selection problem, the quality of the selection method is determined by the accuracy and the number of the selected features. Since the accuracy is more important than the number of the selected features, the fitness and accuracy values are determined as in equation (10) and (11) respectively, where $c=0.9995$.

$$\text{fitness} = (c * \text{acc}) + ((1 - c) \frac{\text{\#selectedFeatures}}{\text{\#totalFeatures}}) \quad (10)$$

$$\text{acc.} = \frac{\text{\#correctlyClassifiedInstances}}{\text{\#totalInstances}} \quad (11)$$

Population size is one of the important parameters for swarm intelligence algorithms, and generally it is problem dependent. To determine the size of a population, the colony sizes 30, 40, and 50 were compared according to consumed fitness number as shown in Figure 2. There is a general opinion that the error decreases as the size of the population increases. However, our results did not support this idea. For all other datasets, after the algorithm consumed 1000 fitnesses, the system became stable. Although the increase of the population size for some datasets reduced the error, we can see that 40 bees are sufficient for the system for the majority of datasets. A much larger population is needed for hard optimization, problems but it is clear that after reaching a sufficient population size, increasing the population size only increases the execution time. As shown in the convergence graph, generally train set

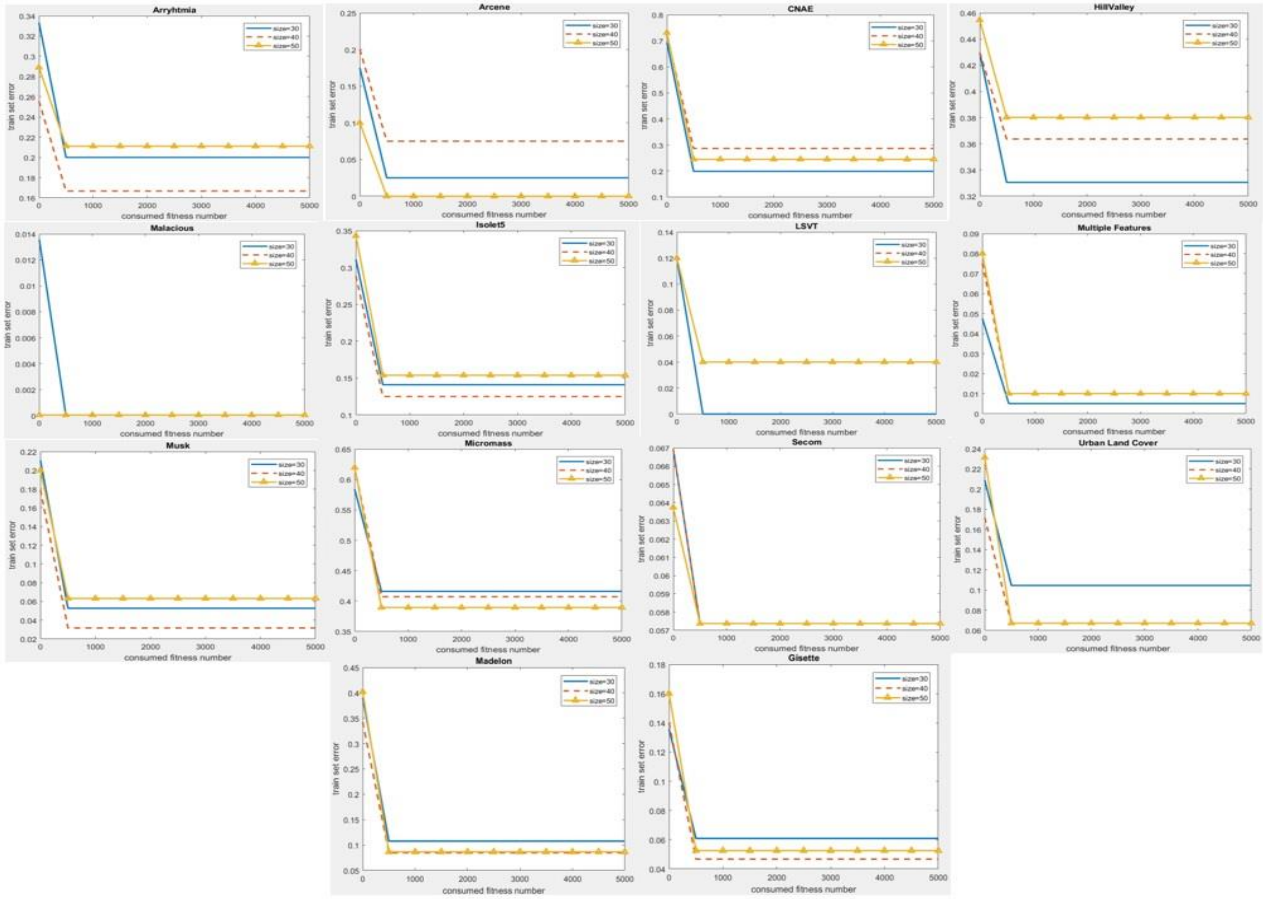


Figure 2. Convergence graph according to the consumed fitness number

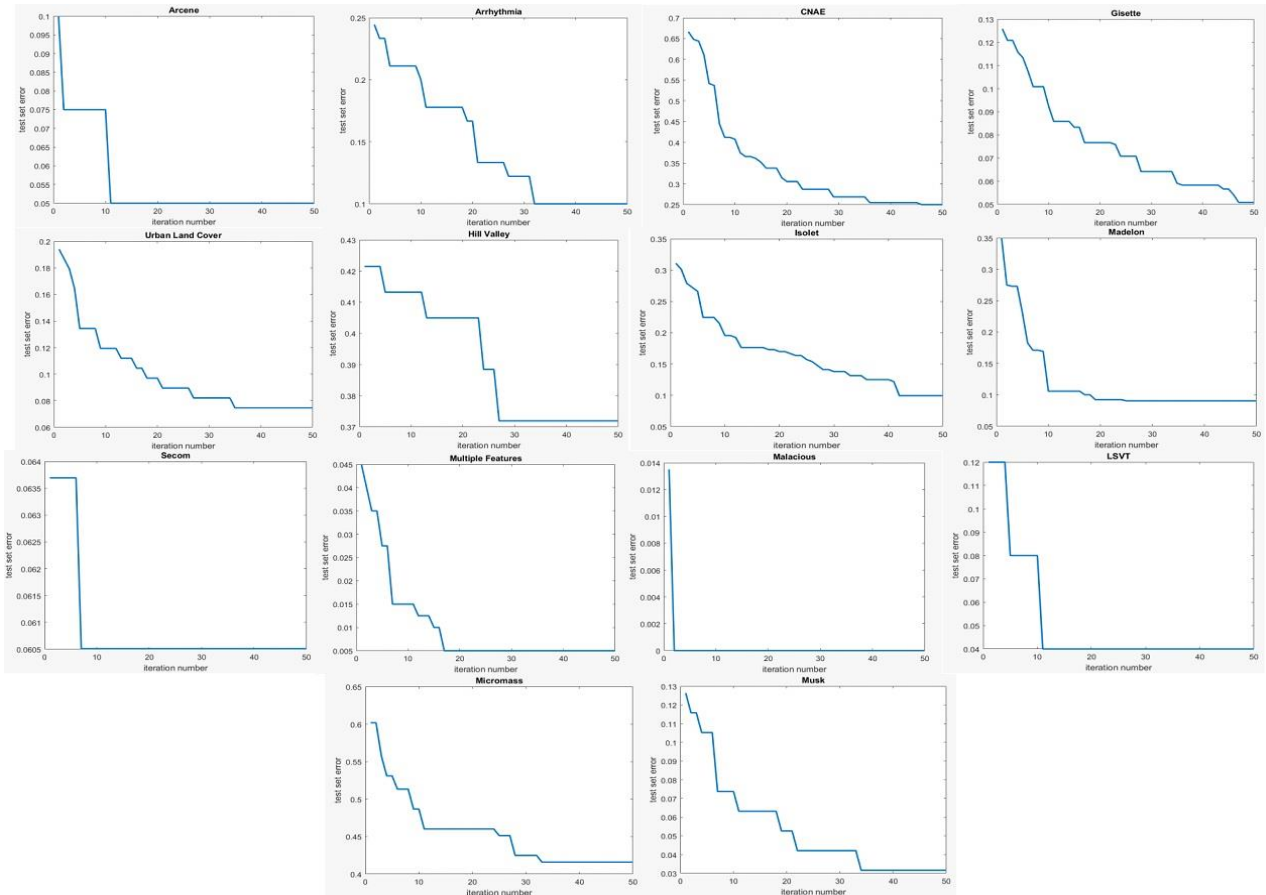


Figure 3. Convergence graph according to iterations

error differences are very small for different population sizes, but we saw that the difference between the execution times is quite high. For LSVT and Secom datasets, the curves for sizes 30 and 40 overlap. Also for Malacious, Multiple Features, and Madelon datasets the curves for sizes 40 and 50 overlap. Therefore, for our datasets population size was set as 40. In ABC algorithms, the sources are being improved in both the employed bee and onlooker bee phases. Namely, the total population size is the sum of the numbers of employed and onlooker bees. However, in GA and PSO, each source can be improved in only one phase in a cycle. Therefore there are 20 employed and onlooker bees for exBitABC and BitABC, 40 individuals for GA and 40 particles for PSO.

To compare different algorithms with each other, the maximum number of iterations is typically used. exBitABC consumes more than one fitness for each resource. According to [45-47], to make a fair comparison in such situations, it is more suitable to use execution time or number of consumed fitness. Background applications, updates, etc. affect the running time of the PC; therefore, the consumed fitness number is selected as the stopping criterion and this is based on the dataset. The consumed fitness number is calculated by counting the number of new sources that produced by the algorithm and setting this as the stopping criterion for BitABC, GA, and Bin PSO.

ABC is an iterative algorithm. At the end of any iteration, if the algorithm converges to an optimum, the algorithm stops to improve, and the fitness value remains constant after this point. Subsequently, continuing the iterations usually does not improve the result but increases the execution time. It is important to find the optimum iteration number to reduce the time complexity. The convergence graph related to iteration number and test set error is shown in Figure 3. The number of max iteration is chosen by trial and-error and is set as 50 for exBitABC. It is clear that for all datasets, 50 iterations are sufficient, and all of them became stable after reaching an optimum point.

At our previous work [41], we implemented, different binary ABC variants to feature selection problem. We saw that, BitABC got better results according to other binary ABC variants. Therefore in this study, we did not apply again other binary ABC algorithms. Since the proposed methods are derived from BitABC, we first compared the performance of the proposed method with respect to BitABC. However, we also compared our results with other well-known meta-heuristic algorithms such as Genetic Algorithm (GA) and Binary Particle Swarm Optimization Algorithm (BinPSO). In order to test the usefulness of the feature selection process, the 5-NN classifier was applied to datasets without any feature reduction.

Table 2 summarizes the classification errors; these are shown in terms of mean and standard deviation in percent. If two methods have the same classification error, the one that selects fewer features is considered as better. In Table 2, the results of exBitABC and the results of other meta-heuristic methods are compared and the best results are shown in bold text. The results of 5-NN is given to show the usefulness of the feature selection process. It is not included in comparison. The 'Sig' row shows statistically significant differences obtained by Wilcoxon Rank Sum Test between the algorithms. "+" indicates that exBitABC is significantly better than the compared algorithm. "-" shows that exBitABC is significantly worse than the compared algorithm. If any other algorithm produces a significantly similar result relative to exBitABC, the compared algorithm is labelled with the "~" symbol.

As seen in Table 2, the proposed method outperforms the other three methods both in terms of validation error and of the number of selected features. With the exception of Isolet, the improvement of test set errors is meaningful. In addition, it is clear that the size of the feature subsets selected by exBitABC is much smaller than the size of the feature subsets selected by the other methods. The Secom, Malacious, Multiple Features, and Gisette datasets are classified with very small error. Consequently, there is no significant difference between the methods in terms of validation set error. For these datasets, success is determined by the number of selected features. It is clear that exBitABC achieves the same error, but using fewer features than other algorithms. Hill Valley and Micromass are difficult datasets: Even if they are classified with 5-NN by using all features, the error rate is very high. Unlike the other methods, exBitABC decreased the error rate for Micromass using fewer features, and the error difference with all features-5NN is small for Hill Valley. When the results of exBitABC are compared with 5-NN, by using feature selection, it is possible to achieve lower or similar test errors by using fewer features. If exBitABC was excluded, BitABC generally produced better test error results than GA and BinPSO. Among these, the smallest subsets were always selected by using BitABC. According to standard deviation values, GA and BinPSO cannot produce stable results for feature subset size. The significance test is applied to show statistically significant differences in terms of only validation set errors. The significance test performance of exBitABC is statistically worse than BinPSO, GA, and BitABC for the Isolet and Musk datasets. For Secom, Malacious, and Multiple Features datasets, no statistically meaningful difference is observed between methods, but it is clear that for these datasets there is no significant difference between validation error results.

Computation time of the algorithms is shown in Table 2. The algorithms were executed on a server with 32

Table 2. The performance comparison of the algorithms

		BitABC	GA	BinPSO	exBitABC	5-NN
Hill-Valley	Valid Error	0.481±0.044	0.482±0.035	0.495±0.004	0.462±0.034	0.44±0.034
	#Feature	19.83±3.18	20.7±4.09	14.37±13.45	8.9±3.45	
	Sig	+	+	+		
Urban Land Cover	Valid Error	0.188±0.026	0.202±0.042	0.191±0.031	0.147±0.03	0.192±0.025
	#Feature	43.23±29.21	30.07±56.62	48.93±13.8	10.2±2.22	
	Sig	+	+	+		
Musk-I	Valid Error	0.191±0.042	0.179±0.047	0.173±0.042	0.155±0.047	0.147±0.021
	#Feature	21.37±4.05	38.5±7.29	57.2±12.93	12.67±2.22	
	Sig	-	-	-		
Arrhythmia	Valid Error	0.337±0.047	0.33±0.04	0.351±0.045	0.296±0.04	0.375±0.035
	#Feature	27.67±6.9	51.97±7.66	66.37±29.87	13.33±2.78	
	Sig	+	+	+		
LSVT	Valid Error	0.247±0.09	0.26±0.09	0.24±0.08	0.201±0.102	0.33±0.062
	#Feature	30.7±6.92	49.1±8.1	83.73±44.14	19.73±6.57	
	Sig	+	+	-		
Madelon	Valid Error	0.2±0.021	0.218±0.027	0.26±0.029	0.1±0.011	0.271±0.014
	#Feature	51.07±14.16	86.57±9.05	155.8±37.3	11.3±2.13	
	Sig	+	+	+		
Secom	Valid Error	0.07±0.004	0.071±0.004	0.069±0.003	0.069±0.004	0.071±0.01
	#Feature	72±11.42	90.93±9.92	170.9±81.74	41.77±21.57	
	Sig	~	~	-		
Malacious	Valid Error	0.025±0.017	0.022±0.015	0.03±0.023	0.023±0.017	0.007±0.007
	#Feature	70.6±9.77	75.83±7.46	125.3±77.9	24.63±1.35	
	Sig	~	~	+		
Isolet5	Valid Error	0.196±0.023	0.221±0.025	0.242±0.024	0.211±0.022	0.277±0.018
	#Feature	50.6±5.9	109.23±11.59	192.73±50.95	44.9±9.87	
	Sig	-	-	+		
Multiple Features	Valid Error	0.032±0.009	0.035±0.01	0.046±0.01	0.03±0.01	0.023±0.004
	#Feature	60.67±7.95	109.17±11.73	236.5±35.88	44.87±14.89	
	Sig	-	~	+		
Cnae	Valid Error	0.31±0.041	0.309±0.045	0.285±0.047	0.212±0.034	0.129±0.015
	#Feature	67.53±10.39	157.47±8.5	350.93±25.98	44.83±7.99	
	Sig	+	+	+		
Micromass	Valid Error	0.617±0.067	0.719±0.047	0.71±0.041	0.587±0.054	0.688±0.033
	#Feature	58.03±11.79	207.03±14.18	164.57±169.95	42.9±10.02	
	Sig	+	+	+		
Gisette	Valid Error	0.073±0.011	0.102±0.011	0.069±0.007	0.071±0.009	0.066±0.004
	#Feature	232.17±44.053	761.03±20.28	2104.2±166.21	146.53±20.48	
	Sig	~	+	~		
Arcene	Valid Error	0.247±0.06	0.243±0.072	0.262±0.063	0.182±0.076	0.229±0.053
	#Feature	924.5±139.33	1504.4±36.13	3233.4±904.37	776.4±37.68	
	Sig	+	+	+		

GB RAM and an Intel Xeon E5 2.6 GHz CPU by using MATLAB 2016b. In the case of computational cost, the size of the dataset is evaluated according to the number of cells ($\#features \times \#samples$). Generally, the execution time of exBitABC is shorter than that of other methods. Regarding Table 3, for small datasets no substantial difference is observed between methods. However, when the larger datasets like Gisette are considered, exBitABC is faster than the others.

4. Discussion and Conclusion

The aim of this study is to develop a binary ABC algorithm. Within this scope, existing binary ABC algorithms are examined for strengths and weaknesses. When the performances of these

variants are compared, it is clear that, using bitwise operators are successful in binarization process [41]. Therefore, at the proposed method, binarization process was carried out using bitwise operators.

It is also investigated that is it possible to make a limited local search around good sources that have already been discovered without falling local optima. After some research, adding a local search procedure was performed using Hamming distance measurement. So, promising results are obtained when the proposed method applied to feature selection problem. Because of local search strategy, it was consumed multiple fitness at each iteration. For all that, the computational costs did not exceed other algorithms.

Table 3. Time consumptions of algorithms in seconds

Dataset	BitABC	BinPSO	GA	exBitABC
Hill-Val.	45.065 ±0.71	43.57 ±0.17	54.1 ±0.71	48.92 ±0.55
UrbL.C	46.64 ±0.76	48.49 ±0.36	57.17 ±0.75	49.91 ±0.43
Musk	42.47 ±0.31	45.047 ±0.3	54.21 ±0.85	47.32 ±0.24
Arrayht.	43 ±0.62	48.002 ±0.28	54.68 ±0.32	46.67 ±0.36
Lsvt	40.2 ±0.22	40.12 ±0.22	54.54 ±4.67	45.23 ±0.17
Madel.	101.3 ±9.16	198.47 ±7.44	140.3 ±6.45	76.61 ±1.85
Secom	82.21 ±1.73	118.38 ±5.46	97.08 ±9.59	80.31 ±1.42
Malac.	42.64 ±0.52	51.21 ±0.58	54.5 ±0.4	48.22 ±0.38
Isolet	106.4 ±25.64	174.96 ±3.42	113.6 ±4.38	95.48 ±6.27
Mul.F.	147.98 ±6.68	223.3 ±70.36	146.1 ±9.26	118.1 ±6.28
Cnae	66.85 ±3.38	117.13 ±4.94	84.13 ±3.49	59.54 ±0.67
Micro.	58.86 ±1.97	86.21 ±2.45	65.66 ±0.81	58.38 ±1.35
Gisette	2741.3 ±101.7	7931 ±261.7	4431.4 ±88	1227 ±12.3
Arcene	100.79 ±3.72	154.83 ±2.65	144.6 ±1.36	99.06 ±1.46

In this article, a new binary ABC algorithm named exBitABC that is suitable for feature selection problems is proposed. The new method has strong local search capability and can easily escape local optima. To show the effectiveness of the proposed method, 14 benchmark datasets from the UCI Machine Learning Repository were processed by using BinPSO, GA, BitABC and exBitABC algorithms, and the results were compared. For all datasets, exBitABC produced better results than BitABC in terms of validation set error, and completed processing in a shorter time. exBitABC also selected fewer features in every trial. When compared with BinPSO and GA, exBitABC yielded better performance for 13 datasets, while BitABC was better for the remaining one dataset. exBitABC also reduced the features better than both BinPSO and GA. These results demonstrate that the increased local search ability of the exBitABC algorithm improves the performance of the algorithm in terms of validation set error, feature size, and running time.

Results are only compared with BitABC within existing binary ABC methods. It is because, some binary variants of ABC algorithm are applied and compared in our previous study [41]. BitABC outperformed other methods, therefore this study focused on getting a good result from BitABC. Additionally, results are compared with GA and BinPSO because of their optimization performances. In our next study, we will compare our results some

other population-based algorithms like Ant Colony Optimization, Bacterial Colony Optimization.

The main purpose of this study is, adding a limited local search process to ABC algorithm. At the new source generation formula, 'AND' and 'OR' bitwise operators and two random vectors are used. With 'OR' operator diversity of the selected features are increased. With random vectors generated from current source, it is ensured that the new source is in a certain distance to the current source. Namely, new sources are produced in the local area of the current source. Finally 'AND' operator used for obtaining a sparse vector.

There are some ABC variants based on bitwise operators in the literature. All of these are proposed for some binary problems. Bitwise operators are used for producing neighbor source. At [21] bitwise 'XOR', 'AND' and 'OR' operators are used. At [22] only 'XOR' operator is used. The 'XOR' operator prevents the new source from staying in the local area. Therefore it did not used. The main difference from these studies is the new source generation strategy ensures that the new source remains in the local area.

References

- [1] Guyon, I., Elisseeff, A. 2013. An Introduction to Variable and Feature Selection. *Journal of Machine Learning Research*, 3, 1157–1182.
- [2] Sánchez-Maróño, N., Alonso-Betanzos, A., Tombilla-Sanromán, M. 2007. Filter Methods for Feature Selection: a Comparative Study. I Proceedings of the 8th International Conference on Intelligent Data Engineering and Automated Learning, December, Berlin, Heidelberg, 178–187.
- [3] Kohavi, R., John, G. H. 1997. Wrappers for Feature Subset Selection. *Artificial Intelligence*, 1-2, 273-324.
- [4] Unler, A., Murat, A. 2010. A Discrete Particle Swarm Optimization Method for Feature Selection in Binary Classification Problems. *European Journal of Operational Research*, 206(3), 528-539.
- [5] Cervante, L., Xue, B., Shang, L., Zhang, M. 2012. A Dimension Reduction Approach to Classification Based on Particle Swarm Optimisation and Rough Set Theory. *Advances in Artificial Intelligence*, 1 st ed., Springer, Berlin, Heidelberg, 313–325.
- [6] Cervante, L., Xue, B., Shang, L., Zhang, M. 2013. A Multi-Objective Feature Selection Approach Based on Binary Pso and Rough Set Theory. *Evolutionary Computation in Combinatorial Optimization*, 7832, 25–36.

- [7] Yang, J., Honavar, V.G. 1998. Feature Subset Selection Using a Genetic Algorithm. *IEEE Intelligent System*, 13(2), 44–49.
- [8] Raymer, M. L., Punch, W. F., Goodman, E. D., Kuhn, L. A., Jain, A. K. 2000. Dimensionality Reduction Using Genetic Algorithms. *IEEE Transactions on Evolutionary Computation*, 4(2), 164–171.
- [9] Ahmed, S., Zhang, M., Peng, L. 2014. Improving Feature Ranking for Biomarker Discovery in Proteomics Mass Spectrometry Data Using Genetic Programming. *Connection Science*, 26(3), 215–243.
- [10] Nemati, S., Basiri, M. E., Ghasem-Aghaei, N., Aghdam, M. H. 2009. A Novel ACO-GA Hybrid Algorithm for Feature Selection in Protein Function Prediction. *Expert System Application*, 36(10), 12086–12094.
- [11] Wen, L., Yin, Q., Guo, P. 2008. Ant Colony Optimization Algorithm for Feature Selection and Classification of Multispectral Remote Sensing Image. *IEEE International Geoscience and Remote Sensing Symposium (IGARSS2008)*, 7-11 July, Boston, USA, 923-926.
- [12] Jensen, R. 2006. Performing Feature Selection with ACO. *Swarm Intelligence in Data Mining*, Springer, Berlin, Heidelberg, 45-73.
- [13] Nakamura, R., Pereira, L., Costa, K., Rodrigues, D., Papa, J. 2012. BBA: a Binary Bat Algorithm for Feature Selection. *Conference on Graphics, Patterns and Images*, 22–25 Aug, Ouro Preto, 291-297.
- [14] Oduntana, I. O., Toulouse, M., Baumgartner, R., Bowman, C., Somorjai, R., Crainic, T. G. 2008. A Multilevel Tabu Search Algorithm for the Feature Selection Problem in Biomedical Data. *Computers & Mathematics with Applications*, 55, 1019–1033.
- [15] Chuang, L. Y., Yang, C. H. 2009. Tabu Search and Binary Particle Swarm Optimization for Feature Selection using Microarray Data. *Journal of Computational Biology*, 16(12), 1689-1703.
- [16] Balabina, R. M., Smirnov, S. V. 2011. Variable Selection in Near-Infrared Spectroscopy: Benchmarking of Feature selection Methods on Biodiesel Data. *Analytica Chimica Acta*, 692, 63–72.
- [17] Ustunkar, G., Ozogur-Akyuz, S., Weber, G. W., Friedrich, C. M., Aydin Son, Y. 2011. Selection of Representative SNP Sets for Genome-Wide Association Studies: a Metaheuristic Approach. *Optimization Letters*, 6(6), 1207–1218.
- [18] Hancer, E. 2019. Differential Evolution for Feature Selection: a Fuzzy Wrapper-Filter Approach. *Soft Computing*, 23(13), 5233-5248.
- [19] Li, T., Dong, H., Sun, J. 2019. Binary Differential Evolution Based on Individual entropy for Feature Subset Optimization. *IEEE Access*, 7, 24109-24121.
- [20] Öztürk, C., Hançer, E., Karaboğa, D. 2015. A Novel Binary Artificial Bee Colony Algorithm Based on Genetic Operators. *Information Science*, 297, 154-170.
- [21] Jia, D., Duan, X., Khan, M. K. 2014. Binary Artificial Bee Colony Optimization Using Bitwise Operation (BitABC). *Computers and Industrial Engineering*, 76, 360–365.
- [22] Kiran, M. S., Gündüz, M. 2013. XOR Based Artificial Bee Colony algorithm for Binary Optimization. *Turkish Journal of Electrical Engineering & Computation Sciences*, 21, 2307–2328.
- [23] Kashan, M. H., Nahavandi, N., Kashan, A. H. 2012. DisABC: A New Artificial Bee Colony Algorithm for Binary Optimization. *Applied Soft Computing*, 12, 342-352.
- [24] Öztürk, C., Hançer, E., Karaboğa, D. 2014. Dynamic Clustering With Improved Binary Artificial Bee Colony-IDisABC. *Applied Soft Computing*, 28, 69-80.
- [25] Hançer, E., Xue, B., Karaboğa, D., Zhang, M. 2015. A Binary ABC Algorithm Based on Advanced Similarity scheme for Feature Selection. *Applied Soft Computing*, 36, 334-348.
- [26] Singhal, P. K., Noresh, R., Sherma, V. 2015. A Novel Strategy-Based Hybrid Binary Artificial Bee Colony Algorithm for Unit Commitment Problem. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 40(5), 1455–1469.
- [27] Yurtkurtaran, A., Emel, E. 2016. A Discrete Artificial Bee Algorithm for Single Machine Scheduling Problem. *International Journal of Production Research*, 54(22), 6860-6878.
- [28] Zhang, X., Zhang, X. 2016. A Binary Artificial Bee Colony Algorithm for Constructing Spanning Trees in Vehicular ad Hoc Networks. *Ad Hoc Networks*, 58, 198-204.
- [29] Zhang, S., Gu, X. 2015. An Effective Discrete Artificial Bee Colony Algorithm for Flow Shop Scheduling Problem with Intermediate Buffers. *Journal of Central South University*, 22, 3471–3484.
- [30] Tasgetiren, M. F., Pan, Q., Suganthan, P. N., Chen, A. 2011. A Discrete Artificial Bee Colony Algorithm for the Total Flow Time Minimization in Permutation Flow Shops. *Information Sciences*, 181, 3459–3475.
- [31] Zhang, H., Ye, D. 2015. Key-Node-Based Local Search Discrete Artificial Bee Colony Algorithm for Obstacle-Avoiding Rectilinear Steiner Tree

- Construction. *Neural Comput & Applications*, 26, 875–898.
- [32] Ye, D., Chen, Z. 2015. A New Approach to Minimum Attribute Reduction Based on Discrete Artificial Bee Colony. *Soft Computing*, 19, 1893–1903.
- [33] Ribas, I., Companys, R., Tort-Martorell, X. 2015. An Efficient Discrete Artificial Bee Colony Algorithm for the Blocking Flow Shop Problem with Total Flowtime Minimization. *Expert Systems with Applications*, 42, 6155–6167.
- [34] Han, Y. Y., Gong, D., Sun, X. A Discrete Artificial Bee Colony Algorithm Incorporating Differential Evolution for the Flow-Shop Scheduling Problem with blocking. *Engineering Optimization*, 47, 927–946.
- [35] Schiezarò, M., Pedrini, H. 2013. Data Feature Selection Based on Artificial Bee Colony Algorithm. *Journal on Image and Video Processing*, 47.
- [36] Özmen, Ö., Batbat, T., Özen, T., Sinanoğlu, C., Güven, A. 2018. Optimum Assembly Sequence Planning System Using Discrete Artificial Bee Colony Algorithm. *Mathematical Problems in Engineering*, 2018, 340764.
- [37] Wei, L., Hanning, C. 2012. BABC: A Binary Version of Artificial Bee Colony Algorithm for Discrete Optimization. *International Journal of Advancements in Computing Technology*, 4(14), 307-314.
- [38] Tran, D. C., Wu, Z. 2014. New Approaches for Binary Artificial Bee Colony Algorithm for Solving 0-1 Knapsack Problem. *Advances in Information Sciences and Service Sciences*, 4(22), 464-471.
- [39] Kiran, M. S. 2015. The Continues Artificial Bee Colony Algorithm for Binary Optimization. *Applied Soft Computing*, 33, 15-23.
- [40] Mandala, M., Gupta, C. P. 2014. Binary Artificial Bee Colony Optimization for GENCO's Profit Maximization under Pool Electricity Market. *International Journal of Computer Applications*, 90, 34-42.
- [41] Ozger, Z. B., Bolat, B., Diri, B. 2016. A Comparative Study on Binary Artificial Bee Colony Optimization Methods for Feature Selection. *INnovations in Intelligent Systems and Applications (INISTA)*, 2-5 Aug, Romaina, 1-4.
- [42] Karaboga, D., Akay, B. 2009. A Survey: Algorithms Simulating Bee Swarm Intelligence. *Artificial Intelligence Review*, 31, 61-85.
- [43] Mirjalili, S., Lewis, A. 2013. S-Shaped Versus v-Shaped Transfer Functions for Binary Particle Swarm Optimization. *Swarm Evolution Computation*, 9, 1-14.
- [44] Sivanandam, S., Deepa, S. 2008. Genetic Algorithm Implementation Using Matlab. *Introduction to Genetic Algorithms*, Berlin: Heidelberg, 211-262.
- [45] Mernik, M., Liu, S. H., Karaboga, D., Črepinšek, M. 2015. On Clarifying Misconceptions When Comparing Variants of the Artificial Bee Colony Algorithm by Offering a New Implementation. *Information Sciences*, 291, 115-127.
- [46] Draa, A. 2015. On the Performances of the Flower Pollination Algorithm—Qualitative and Quantitative Analyses. *Applied Soft Computing*, 34, 349-371.
- [47] Črepinšek, M., Liu, S. H., Mernik, L., Mernik, M. 2016. Is a Comparison of Results Meaningful from the Inexact Replications of Computational experiments?. *Soft Computing*, 20(1), 223-235.

Investigating The Effect of Acrylic Latex on Moisture Susceptibility of Hot Mix Asphalt

Şebnem KARAHANÇER*¹

¹Isparta University of Applied Sciences, Department of Civil Engineering, Isparta, Turkey

(Alınış / Received: 26.10.2019, Kabul / Accepted: 12.02.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Keywords

Acrylic latex,
Bitumen modification,
Indirect tensile strength,
Moisture susceptibility

Abstract: Polymers are popular materials as an additive to improve the performance of hot mix asphalt (HMA). To this aim, acrylic latex was chosen to improve the performance of asphalt mixture. In this study, it was investigated that the performance of hot mix asphalt with acrylic latex additive in three percentages (1%, 2% and 3%). Design bitumen contents were determined for all acrylic latex additive. Indirect Tensile Strength and moisture susceptibility of acrylic latex added HMA was conducted using test procedure of AASHTO T283. According to the results, design bitumen contents were increased by acrylic latex. Although the bitumen content was increased, both the indirect tensile (IDT) strength and the moisture resistance were improved by acrylic latex. Best performance was obtained by 3% acrylic latex additive. It is suggested that the percentage of acrylic latex would be increased for further researches.

Akrilik Lateksin Bitümlü Sıcak Karışımların Nem Hassasiyeti Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Anahtar Kelimeler

Akrilik lateks,
Bitüm modifikasyonu,
İndirekt çekme dayanımı,
Nem hassasiyeti

Özet: Polimerler Bitümlü Sıcak Karışımların (BSK) performansını artırmak amacıyla kullanılan popüler katkı malzemeleridir. Bu çalışmada, asfalt karışımların performansını artırmak amacıyla akrilik lateks seçilmiştir. Akrilik lateks karışıma üç farklı oranda (%1, %2 ve %3) karıştırılarak bitümlü sıcak karışımların performansı incelenmiştir. Dizayn bitüm içerikleri her bir oran için ayrı ayrı belirlenmiştir. Akrilik lateks ile karıştırılmış BSK için İndirekt çekme dayanımı ve nem hassasiyeti AASHTO T283 test prosedürü dikkate alınarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, dizayn bitüm içeriği artırılmıştır. Bitüm içeriği artmasına rağmen, hem indirekt çekme (IDT) dayanımı hem de neme karşı dayanımda iyileştirme elde edilmiştir. En iyi performansı gösteren akrilik lateks katkı oranı %3 olarak belirlenmiştir. Sonraki çalışmalar için akrilik lateks oranının artırılması önerilmektedir.

1. Introduction

Increasing demand on oil industry force researchers to find a new binder or regeneration agent. For example, researchers are focus on bio-binders obtained from natural bio wastes. Also, polymers are generally used to modify binder. Rutting and fatigue cracking are mostly encountered problems occur in asphalt pavements caused by significant increase in traffic volume. Structural performance of asphalt pavement reduced by these problems. Bitumen modification with polymers is a popular method to prevent performance reduction.

Sutanta et al. [1] examined the performance of latex and rubber modified bitumen. Three percentages

were used in the study (4, 6, 8%) for the rubber and latex. Dynamic Shear Rheometer (DSR) test was used to evaluate the rheological properties. Results were showed good performance in rutting. Wen et al. [2] investigated the natural rubber latex addition as renewable material in asphalt mixtures. The authors found that the rubber latex can be used as a renewable material in asphalt mixtures. Shafii et al. [3] investigated the natural rubber latex in asphalt emulsions. Result of the study indicated that maximum percentage was found as 7% and blending time was 20 min. Cai et al. [4], examined the performance of SBS latex modified bitumen emulsion. As a result, it is found that the SBS latex was beneficial for bitumen. Shaffie et al. [5], examined the physical properties of natural rubber latex modified

bitumen. It was found that the natural rubber latex was suitable to modify the bitumen and enhanced the bitumen performance. Daniel et al. [6], examined the properties of latex modified bitumen. Latex percentages were 2.5%, 5.0%, 7.5% and 10% used in the study. It was found that latex was hardened the bitumen and provided better rutting performance. Shafie et al. [7] investigated the stripping performance of natural rubber latex polymer modified asphalt mixtures. The investigation resulted in the improvement of stripping performance of hot mix asphalt with 8% natural rubber latex modified bitumen. Zhang et al. [8], examined the performance of SBR modification in asphalt emulsion. As a result, optimum latex modification percentages were found as 4.0% to 5.0%. Forbes et al. [9], examined the microstructure of polymer modification in asphalt emulsions. Improved performance was found as a result. Abedini et al. [10], investigated the low-temperature performance of polymer modified bitumen emulsions in chip seal with SBR latex. It is found that SBR latex leads to increased aggregate retention and resulted in lower bitumen aggregate adhesion. Khadivar and Kavussi [11], examined the rheological properties of SBR and natural rubber modified bitumen. As a result, stiffness was increased with natural latex and SBR was sensitive to applied stress.

In literature, acrylic latex was used as an additive to obtain the asphalt emulsions, mostly. Different from literature, in this study, acrylic latex was mixed into asphalt mixtures directly. In this study, acrylic latex was mixed with asphalt mixture in three percentages (1, 2 and 3%) to investigate the performance of asphalt mixture. Superpave mix design was used and the design bitumen contents were determined. The mixtures were compacted using Superpave Gyratory Compactor (SGC). Finally, tensile strength ratio (TSR) was determined against moisture susceptibility.

2. Materials and Methods

2.1. Aggregate and gradation of mixture

HMA mixtures were prepared according to wearing course mix design criteria. Dense graded HMA was prepared by Superpave™ guidance and gradation curve was selected as shown in Figure 1. Aggregate properties were also given in Table 1.

2.2. Bitumen

In this study PG 64-22 base bitumen was chosen. Bitumen characteristics were examined in terms of Dynamic Shear Rheometer (DSR), Bending Beam Rheometer (BBR), Rotating Thin Film Oven Test (RTFOT) and Pressure Aging Vessel (PAV) in convenience with Superpave. Rheological properties were determined in terms of penetration, ductility, rotational viscometer and softening point and the results were given in Table 2.

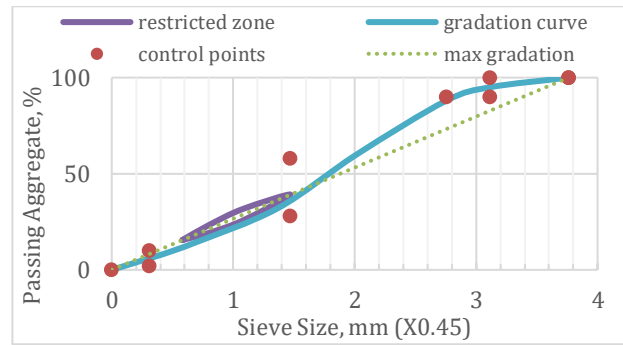


Figure 1. Gradation curve

Table 1. Properties of limestone aggregate

Sieve Diameter (mm)	Specific Gravity (g/cm ³)	Absorption of water (%)	Los Angeles Abrasion Loss (%)	Flatness Index
25-4.75	2.747	2.895	20.50	
4.75-0.075	2.665	0.129		18%
≤0.075	2.683			

Table 2. Characteristics of base bitumen

Test	Unit	Base Bitumen
Penetration @25 °C ASTM D5 [12]	0.1 mm	62.2
Softening Point Ring&Ball ASTM D36 [13]	°C	49.9
Ductility @25°C, 5 cm/min ASTM D113-17 [14]	cm	>100
RV @135 °C, ≤3Pa.s ASTM E3116-18 [15]	Pa.s	0.475
RV @165 °C	Pa.s	0.15
DSR G*/sinδ>1 kPa @10 rad/s	Fail Temp. °C	67.9
ASTM D7552-09 [16]	Grade °C	64
Mass Loss	%	0
Permanent Penetration	%	70.4
Change in Softening Point	°C	+3.2
DSR G*/sinδ>2.2 kPa @10 rad/s	Fail Temp. °C	67
	Grade °C	64
DSR G*.sinδ<5.000 kPa @10 rad/s	Fail Temp. °C	28.6
	Grade °C	22
BBR S≤300 MPa, m≥0.300,@60s	°C	-12
	m-value	0.325
ASTM D6648-08 [17]	Stiffness MPa	213
	Performance Grade	PG 64-22

2.3. Acrylic latex

In this study, acrylic latex was used in three percentages (1, 2 and 3% by weight of bitumen). The percentages were chosen in accordance with the literature. Acrylic latex properties were given in Table 3.

Table 3. Properties of acrylic latex

Property	Value
Appearance	milky white liquid
Specific Gravity	1.065
Solubility (in water)	<1 mg.L ⁻¹ at 20 °C
Maximum weight-percentage of residual impurities	<0.4%
Boiling temperature	152.4 °C

2.4. Experimental

Mixing the acrylic latex with hot mix asphalt was investigated. DSR, BBR, RTFOT and PAV was adopted to determine the rheological properties of base bitumen. Compaction effort was performed with Superpave Gyratory Compactor (SGC) for the acrylic latex modified asphalt mixtures. Design bitumen content (DBC) was determined for acrylic latex modified mixtures separately. Modified Lottman procedure was adopted to determine the moisture susceptibility.

2.5. Mix Design

DBCs of acrylic latex modified mixtures were determined by Superpave™ mix design. 4% air void is aimed for compaction. Samples were compacted in different bitumen contents (3.5%, 4%, 4.5% and 5%) to find out the design bitumen contents at 4% air void. DBC of base HMA was found as 4.5%. Graphs of design bitumen were drawn. DBC was checked whether the limit value is ensured for VMA and VFA.

2.6. Moisture Susceptibility

Modified Lottman procedure is adopted to evaluate the moisture sensitivity. IDT strength and moisture

susceptibilities of HMA was determined according to AASHTO T283 [18] test procedure. Samples are compacted as conditioned samples and unconditioned samples (three samples for dry and three samples for wet). Each sample is vacuum saturated to condition. A freeze thaw cycle was conducted and saturation level was achieved (55 to 80%). Tensile strength and tensile strength ratio (TSR) are determined. Moisture damage resistance is determined as a ratio of the tensile strength of dry sample to wet sample.

3. Results and Discussion

3.1. Design bitumen contents

Design bitumen graphs were drawn and VMA and VFA were checked and ensured by 4.5% DBC of HMA (Figure 2) for control HMA. Same graphs were drawn for acrylic latex, separately and DBCs were determined for all content of acrylic latex modified HMA as 6.34% for 1% modification, 5.49% for 2% modification and 5.78% for 3% modification (Figure 3, 4 and 5). VMA and VFA was checked also for modified samples. Only the 1% acrylic latex modified HMA hasn't ensure the VFA limit values.

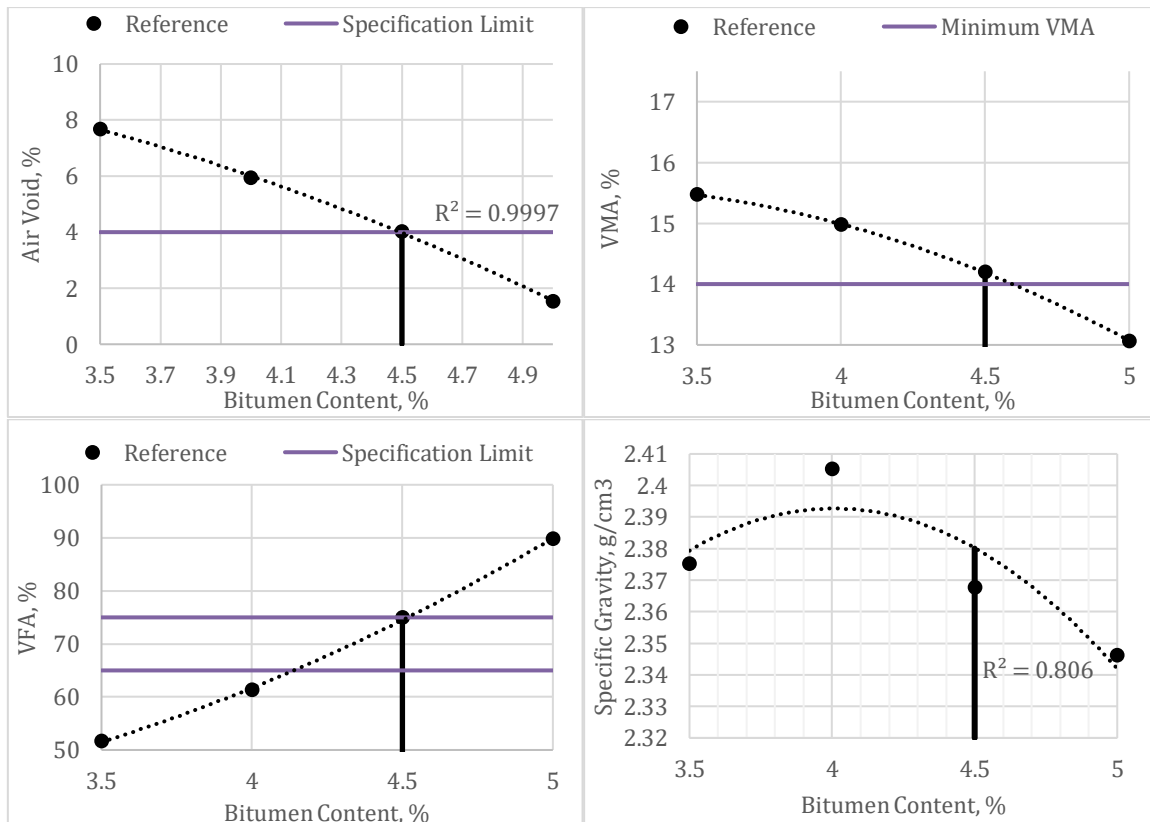


Figure 2. Design bitumen content for base HMA

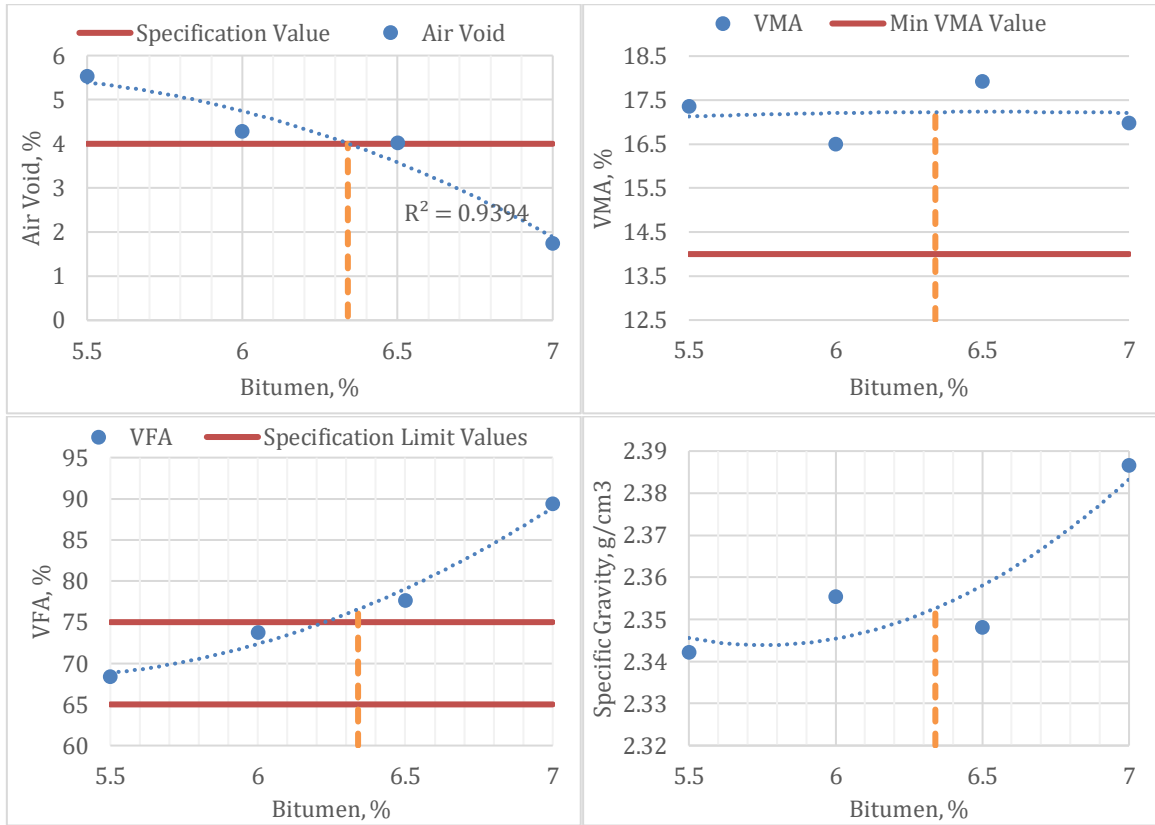


Figure 3. Design bitumen content for 1% acrylic latex

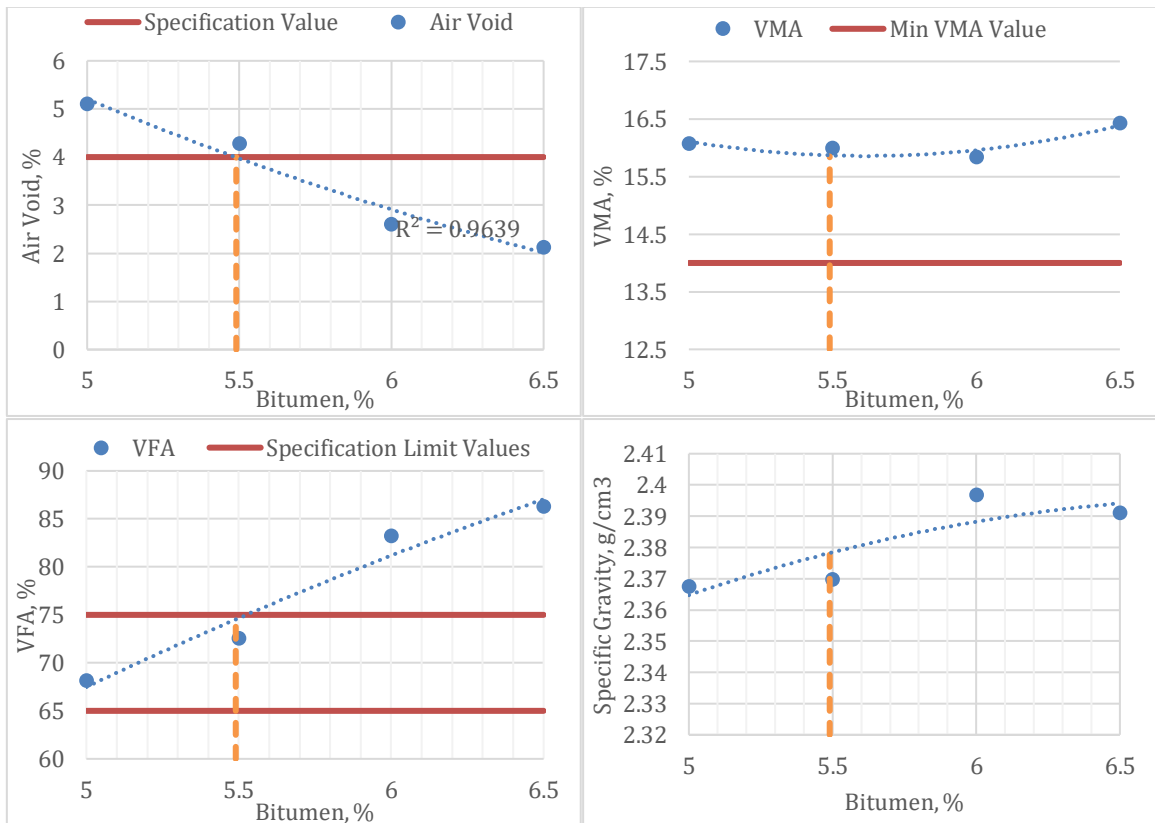


Figure 4. Design bitumen content for 2% acrylic latex

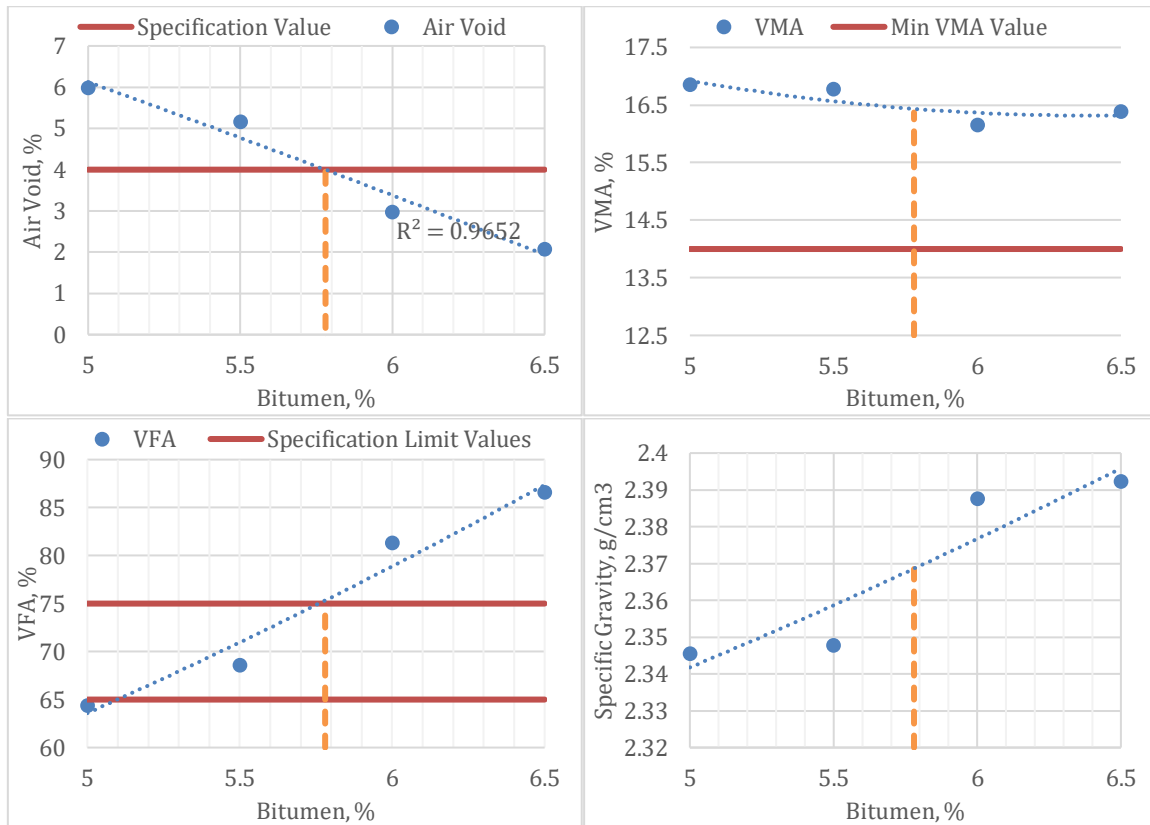


Figure 5. Design bitumen content for 3% acrylic latex

3.2. Moisture susceptibility

IDT of acrylic latex added HMA was identified. According to the results, increasing IDT was obtained with the increase of the acrylic latex content (Figure 6). IDT unconditioned values indicate the strength of the mixtures. So that, the strength of the acrylic latex modified asphalt mixtures were increased. The IDT unconditioned value of control mix was determined as 7.2 kPa, and the acrylic latex modified samples 1%, 2% and 3% was determined as 9.95, 10.53, 10.8 kPa, respectively. Acrylic latex was found beneficial to the strength of the asphalt mixtures.

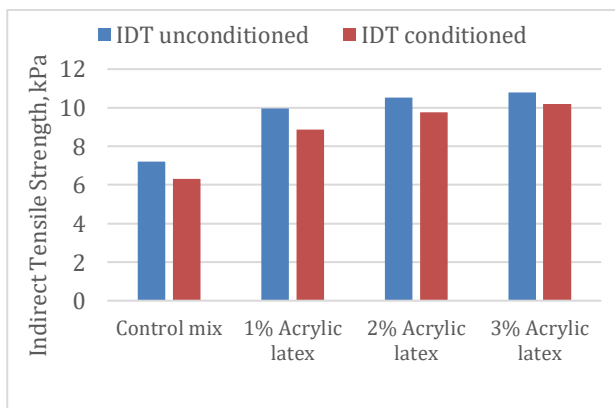


Figure 6. IDT test results for acrylic latex

Moisture susceptibility of acrylic latex modified asphalt mixture was determined by Tensile Strength Ratio (TSR). According to the results, moisture susceptibility was decreased when increasing the acrylic latex content (Figure 7). Meaning that, acrylic latex modified HMA was found to be resistive against moisture. The TSR was determined as 88%, 92% and 94% for 1%, 2% and 3% acrylic latex modified HMA, respectively. The moisture resistance was

increased by using acrylic latex compared to control HMA. It can be concluded that acrylic latex was effective for stripping.

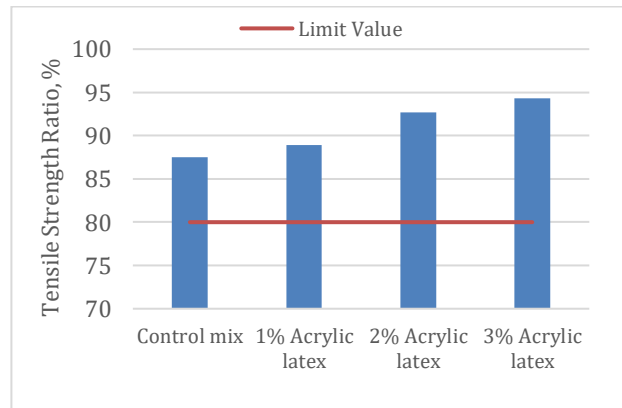


Figure 7. TSR results for acrylic latex

4. Conclusion

In this study, acrylic latex additive was used in HMA to improve the moisture resistance. To this aim, 1%, 2% and 3% acrylic latex was added to the HMA. According to test results conclusions can be drawn as follows:

- The design bitumen contents were increased with the acrylic latex additive.
- IDT strengths were increased with the increase of acrylic latex additive.
- Moisture susceptibility was decreased with the addition of acrylic latex.
- Best performance was obtained by 3% acrylic latex additive.

References

- [1] Sutanto, M., Bala, N., Al Zaro, K., Sunarjono, S. 2018. Properties of Crumb Rubber and Latex Modified Asphalt Binders using Superpave Tests, In *MATEC Web of Conferences* 203, 05007.
- [2] Wen, Y., Wang, Y., Zhao, K., Sumalee, A. 2017. The use of natural rubber latex as a renewable and sustainable modifier of asphalt binder. *International Journal of Pavement Engineering*, 18(6), 547-559.
- [3] Shaffie, M., Ahmad, J., Shaffie, E. 2013. Physical properties of asphalt emulsion modified with natural rubber latex. *World Journal Engineering*, 10(2), 159-164.
- [4] Cai, H. M., Wang, T., Zhang, J. Y., Zhang, Y. Z. 2010. Preparation of an SBS latex-Modified bitumen emulsion and performance assessment. *Petroleum science and technology*, 28(10), 987-996.
- [5] Shaffie, E., Arshad, A. K., Alisibramulisi, A., Ahmad, J., Hashim, W., Abd Rahman, Z., Jaya, R. P. 2018. Effect of mixing variables on physical properties of modified bitumen using natural rubber latex. *International Journal of Civil Engineering Technology*, 9, 1812-1821.
- [6] Daniel, N. H., Hassan, N. A., Idham, M. K., Jaya, R. P., Hainin, M. R., Ismail, C. R., Puan, O. C., Azahar, N. M. 2019. Properties of bitumen modified with latex. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 527(1), 012063.
- [7] Shaffie, E., Ahmad, J., Arshad, A. K., Kamarun, D., Kamaruddin, F. 2015. Stripping performance and volumetric properties evaluation of hot mix asphalt (HMA) mix design using natural rubber latex polymer modified binder (NRMB). In *CIEC 2014*, 873-884, Springer, Singapore.
- [8] Zhang, Q., Fan, W., Wang, T., Nan, G. 2011. Studies on the temperature performance of SBR modified asphalt emulsion. In *2011 International Conference on Electric Technology and Civil Engineering (ICETCE)*, 730-733.
- [9] Forbes, A., Haverkamp, R. G., Robertson, T., Bryant, J., Bearsley, S. 2001. Studies of the microstructure of polymer-modified bitumen emulsions using confocal laser scanning microscopy. *Journal of microscopy*, 204(3), 252-257.
- [10] Abedini, M., Hassani, A., Kaymanesh, M. R., Yousefi, A. A. 2017. Low-temperature adhesion performance of polymer-modified Bitumen emulsion in chip seals using different SBR latexes. *Petroleum Science and Technology*, 35(1), 59-65.
- [11] Khadivar, A., Kavussi, A. 2013. Rheological characteristics of SBR and NR polymer modified bitumen emulsions at average pavement temperatures. *Construction and Building Materials*, 47, 1099-1105.
- [12] ASTM D5 / D5M-19. 2019. Standard Test Method for Penetration of Bituminous Materials, ASTM International, West Conshohocken, PA.
- [13] ASTM D36 / D36M-14e1. 2014. Standard Test Method for Softening Point of Bitumen (Ring-and-Ball Apparatus), ASTM International, West Conshohocken, PA.
- [14] ASTM D113-17. 2017. Standard Test Method for Ductility of Asphalt Materials, ASTM International, West Conshohocken, PA.
- [15] ASTM E3116-18. 2018. Standard Test Method for Viscosity Measurement Validation of Rotational Viscometers, ASTM International, West Conshohocken, PA.
- [16] ASTM D7552-09. 2014. Standard Test Method for Determining the Complex Shear Modulus (G^*) Of Bituminous Mixtures Using Dynamic Shear Rheometer, ASTM International, West Conshohocken, PA.
- [17] ASTM D6648-08. 2016. Standard Test Method for Determining the Flexural Creep Stiffness of Asphalt Binder Using the Bending Beam Rheometer (BBR), ASTM International, West Conshohocken, PA.
- [18] AASHTO. 2014. AASHTO T 283: Standard Method of Test for Resistance of Compacted Asphalt Mixtures to Moisture-Induced Damage, American Association of State Highway and Transportation Officials (AASHTO).

⁵⁵Mn İzotopunun Fotonükleer Tesir Kesitleri Üzerinde Kollektif Nükleer Seviye Yoğunluğunun Etkisi

Bora CANBULA*¹

¹Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, 45140, Manisa, Türkiye

(Alınış / Received: 30.10.2019, Kabul / Accepted: 06.03.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Anahtar Kelimeler

Fotonükleer reaksiyon,
Tesir kesiti,
Kollektif nükleer seviye
yoğunluğu,
TALYS

Özet: ⁵⁵Mn izotopunun (γ, n), ($\gamma, 2n$) ve ($\gamma, 3n$) fotonükleer reaksiyonlarının tesir kesitleri eşik enerjisinden 37 MeV'e kadar TALYS 1.95 bilgisayar kodu kullanılarak hesaplandı. Elde edilen teorik sonuçlar reaksiyonların deneysel verileri ile karşılaştırıldı. Hesaplamalarda, kollektif nükleer seviye yoğunluğu modeli (CSCFGM-Collective semi-classical Fermi gas model) bilgisayar programında opsiyonel bir girdi olarak dahil edildi ve kollektif etkilerin (rotasyonel ve vibrasyonel) fotonükleer tesir kesitleri üzerindeki etkisi araştırıldı. Sonuçlar incelendiğinde, kollektif yarı-klasik nükleer seviye yoğunluğu modelinin bu reaksiyonların tesir kesiti hesaplamalarında güvenilir bir araç olarak kullanılabilirliği gösterildi. Ayrıca, dev dipol rezonansın baskın olduğu 30 MeV gama enerjisi altında gerçekleşen reaksiyonlarda kollektif katkıları içeren nükleer seviye yoğunluğu fonksiyonunun etkisi analiz edildi.

Collective Nuclear Level Density Effect On Photonuclear Cross Section of ⁵⁵Mn Isotope

Keywords

Photonuclear reaction,
Cross section,
Collective nuclear level
density,
TALYS

Abstract: The cross sections of (γ, n), ($\gamma, 2n$) and ($\gamma, 3n$) photonuclear reactions of ⁵⁵Mn isotope were calculated by using TALYS 1.95 computer code from threshold energy to 37 MeV. Obtained theoretical results were compared with the experimental data. In the calculations, collective nuclear level density was included as an optional input in the computer code and the influence of the collective effects (rotational and vibrational) was investigated. As seen from the results, collective semi-classical nuclear level density model can be used as a reliable tool to calculate the cross sections of photonuclear reactions. Also, the effect of nuclear level density function which includes collective contributions was analyzed below 30 MeV gamma energy dominated by giant dipole resonance for these reactions.

1. Giriş

Fotonükleer reaksiyonların tesir kesitleri uygulamalı ve teorik nükleer fizik alanında geniş bir kullanım alanına sahiptir. Düşük reaksiyon enerjilerinde özellikle 30 MeV altındaki enerjilerde, dev dipol rezonansı (GDR) gibi yüksek kollektif uyarma modlarının oluşumu ve daha sonra bozunmasıyla devam eden bir süreçte sahip olan fotonükleer reaksiyonlar, çekirdeklerin hem bireysel hemde sistematik özelliklerine duyarlılık gösterirler. 1950'li yıllarda başlayan fotonükleer reaksiyon çalışmaları ile yüzlerce çekirdek için reaksiyon tesir kesiti ölçümlerinin deneysel verileri erişime açık bir veritabanında toplanmıştır [1]. Fotonükleer reaksiyon verileri astrofiziksel nükleosentez, radyasyondan korunma ve tasarımı, radyoterapideki radyasyon doz durumları, nötron üretimi, aktivasyon analizi gibi teorik ve uygulamalı bilimsel araştırma

alanlarında da büyük bir öneme sahiptir. Bu çalışmada, mono-izotropik bir element olan ⁵⁵Mn'in fotonükleer tesir kesitleri eşik enerjisinden 37 MeV gama enerjisine kadar yarı-klasik kollektif nükleer seviye yoğunluğu modeli [2] kullanılarak hesaplandı. ⁵⁵Mn izotopunun (γ, n), ($\gamma, 2n$) ve ($\gamma, 3n$) reaksiyonlarının tesir kesiti ölçümleri ilk kez 1979 yılında Alvarez vd. tarafından [3] eşik enerjisinden 36.5 MeV'e kadar yapılmıştır. Ölçümlerde hızlı pozitron demetlerinin anihilasyonundan elde edilen monoenerjetik foton demetleri radyasyon kaynağı olarak kullanılmıştır. Daha sonra, ⁵⁵Mn izotopunun fotonükleer tesir kesitleri ¹⁶²Er izotopunun fotonükleer reaksiyon tesir kesiti ölçümlerinde kullanılmak üzere, gama ışınım şiddet fonksiyonları kullanılarak analiz edilmiştir [4].

Yaklaşık 70 yıllık bir geçmişe sahip olan fotonükleer reaksiyon tesir kesitlerinin deneysel ölçümlerinde,

doğadaki monoenerjik foton yoğunluğu tam olarak bilinemediğinden çekirdek ve foton arasındaki etkileşimde zorluklar yaşanmaktadır. Bu nedenle, bu tip reaksiyonların tesir kesiti analizlerinin yapılacağı teorik çalışmalar oldukça önemlidir. Çünkü, fotonükleer reaksiyonların tesir kesitlerinin iyi olarak analiz edilmesi onların daha geniş enerji aralıklarına genişletilebilmesine, deneysel verisi olmayan reaksiyonlarda tahmin yapılmasına ve kullanım alanlarının artmasına imkan sağlar.

Orta ve ağır çekirdekler için, istatistiksel yaklaşımın [5] fotonükleer reaksiyonların tesir kesitlerinin tanımlanması için en uygun yöntem olduğu kabul edilir. Bu yöntemin kullanıldığı TALYS [6], EMPIRE [7] veya ALICE/ASH [8] gibi genel amaçlı hesaplama paketleri, bu tür hesaplamaları gerçekleştirmeye olanak sağlar. Bu çalışmada, hesaplamalar TALYS 1.95 bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu hesaplamalarda kullanılan önemli girdilerden bir tanesi nükleer seviye yoğunluğudur. Çalışma grubumuz tarafından ortaya konmuş olan kolektif yarı-klasik nükleer seviye yoğunluğu modeli (CSCFGM) TALYS bilgisayar programına opsiyonel bir girdi olarak dahil edilerek fotonükleer tesir kesitleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Önceki çalışmalarımızda, lityum izotopunun elastik ve inelastik saçılma tesir kesitleri [9] ve alüminyum hedef çekirdeğinin döteronlarla bombardımanı sonucu oluşan reaksiyonların tesir kesitleri [10] yarı-klasik nükleer seviye yoğunluğu modeli kullanarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar deneysel veriler ile karşılaştırıldığında bu reaksiyonlar üzerinde hem modelimizin açıklamadaki başarısı hem de nükleer seviye yoğunluğunun göz önüne alınması gereken bir hesaplama girdisi olduğu görülmüştür. Bu çalışmada amaç, fotonükleer reaksiyonlar üzerinde nükleer seviye yoğunluğunun etkili olduğunu ve kolektif etkileri içeren modelimizin bu tip reaksiyonların tesir kesiti verilerini açıklamada başarılı olabileceğini göstermektir. Bu bağlamda, çalışmamız 2. bölümde materyal ve yöntem, 3. bölümde bulgular ve tartışma ve 4. bölüm de sonuçlar ile sunulmuştur.

2. Materyal ve Metot

2.1. Kolektif yarı-klasik nükleer seviye yoğunluğu (CSCFGM)

Nükleer seviye yoğunluğu, sonsuz küçük enerji aralığında bulunan uyarılmış enerji seviyelerinin sayısına karşılık gelmektedir. Bu enerji seviyeleri düşük uyarılma enerjilerinde gözle ayırt edilip sayılabilirken artan uyarılma enerjilerinde sıklaşır ve sürekli bir fonksiyon haline gelirler. Bu durumda, çekirdeğin uyarılmış seviyelerini belirlemek için bir fonksiyona ihtiyaç vardır ve kullanılan bu fonksiyon nükleer seviye yoğunluğudur. Nükleer astrofizikte [11], medikal fizikte [12] ve özellikle nükleer reaksiyonların tesir kesiti hesaplamalarında önemli

bir girdidir. İlk ve en basit nükleer seviye yoğunluğu modeli Fermi gaz modelidir ve 1936 yılında Bethe [13] tarafından ortaya konmuştur. Bu modele göre, nükleonlar birbirleri ile etkileşmezler, tek-parçacık enerji seviyelerine eşit boşluklar ile yerleşirler ve kolektif seviyeleri yoktur. Uyarılma enerjisine bağlı toplam seviye yoğunluğu fonksiyonu,

$$\rho^{top}(U) = \frac{1}{12\sqrt{2}\sigma} \frac{\exp[2\sqrt{aU}]}{a^{1/4}U^{5/4}} \quad (1)$$

ile verilir. Burada, U uyarılma enerjisi, σ^2 spin eşik parametresi ve a nükleer seviye yoğunluğunun temel değişkeni olan nükleer seviye yoğunluğu parametresidir. a seviye yoğunluğu parametresi U uyarılma enerjisine bağlıdır. Bu bağımlılık genellikle Ignatyuk vd. [14] tarafından ortaya konmuş olan

$$a(U) = \tilde{a} \left(1 + \delta W \frac{1 - \exp[-\gamma U]}{U} \right) \quad (2)$$

formülasyonu ile verilir. Burada \tilde{a} asimptotik seviye yoğunluğu parametresi, δW mikroskopik düzeltme terimi ve γ sönüm parametresidir. \tilde{a} , a seviye yoğunluğu parametresinin nötron ayrılma enerjisinin üzerindeki yüksek enerjilerde gittiği limit değeridir. γ sönüm parametresi, a seviye yoğunluğu parametresinin \tilde{a} limit değerine ne kadar hızlı gideceğini belirleyen değerdir. Bu formülasyon düşük enerjilerde başarılı ancak yüksek enerjilerde bir diverjans problemi ile karşı karşıya kalır. Bu problemin sonraki yıllarda çözülmesinden [15,16] sonra bu formülasyon da tesir kesiti hesaplamalarında yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Ancak bu formülasyon ile birlikte hesaplamalara dahil edilen kolektif etkilerin sonuca sonradan dahil edilmesi bu etkilerin varlığını istenilen oranda yansıtamamıştır [2,17]. Kolektif etkiler

$$\rho(U) = K_{rot} K_{vib} \rho^{top}(U) \quad (3)$$

şeklinde hesaplamalara dahil edilmiştir. Burada K_{rot} ve K_{vib} sırasıyla rotasyonel ve vibrasyonel iyileştirme faktörleridir. Fermi gaz modelini temel alan ve kolektif etkileri en temelden yani nükleer seviye yoğunluğu parametresinin içine dahil eden nükleer seviye yoğunluğu modeli (CSCFGM) [2] geçtiğimiz yıllarda ortaya konmuştur. Bu modele göre, seviye yoğunluğu parametresinin uyarılma enerjisine bağlı değişimi bir Laplace dağılım davranışı sergiler ve bu davranışın formülasyon şekli

$$a(U) = \tilde{a} \left(1 + A_c \frac{S_n \exp(-|U - E_0|/\sigma_c'^3)}{\sigma_c'^3} \right) \quad (4)$$

ile verilir. Burada, A_c kolektif şiddet olarak adlandırılır ve kritik sıcaklıktaki şekil bağımlı kabuk düzeltme enerjisi olarak tanımlanır. S_n nötron

ayrılma enerjisi, E_0 ise çift-çift çekirdeklerin 2+ seviyelerinin uyarılma enerjilerine karşılık gelir.

$$E_0 = 0.2 \hbar\omega \quad (5)$$

Burada $\hbar\omega = 41/A^{1/3}$ MeV dir.

$$A_c = [M_{den} - (M_0 + E\theta^2)] \frac{\tau_c}{\sinh \tau_c} \quad (6)$$

M_{den} çekirdeğin deneysel kütlesi, M_0 karşılık gelen küresel çekirdeğin kütlesi, E fissilite (ayrılma, bölünme) parametresi ile ilişkili bir katsayı, θ deformasyon büyüklüğü ve $\tau_c = 2\pi^2 T_c / \hbar\omega$ formülü ile T_c nükleer sıcaklığa bağlı bir parametredir. CSCFGM, kolektif etkileri (rotasyonel ve vibrasyonel) kabuk ve çiftlenme etkilerine ek olarak hesaplamalara dahil eder. Ayrıca, ayarlanabilir parametre içermez.

2.2. TALYS bilgisayar kodu

Nükleer reaksiyonların analiz edilmesi için bilinen en iyi bilgisayar kodlarından bir tanesi TALYS'dir [6]. Döteron, proton, gama, triton, alfa, nötron parçacıkları ile bombardımanı sonucu oluşan nükleer reaksiyonların 1 keV'den 1 GeV'e kadar simülasyonunu gerçekleştirebilen bir programdır. Nükleer seviye yoğunluğu fonksiyonu TALYS bilgisayar programında opsiyonel bir girdi olarak kullanılabilir. Bu çalışmada, kolektif yarı-klasik nükleer seviye yoğunluğu modeli (CSCFGM) TALYS programına opsiyonel bir girdi olarak dahil edilerek hesaplamalar gerçekleştirilmiştir.

3. Bulgular

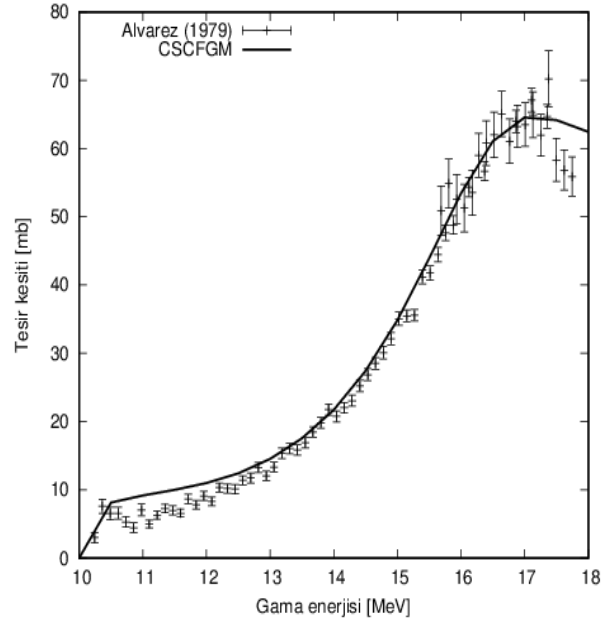
Bu çalışmada, $^{55}\text{Mn}(\gamma, n)^{54}\text{Mn}$, $^{55}\text{Mn}(\gamma, 2n)^{53}\text{Mn}$ ve $^{55}\text{Mn}(\gamma, 3n)^{52}\text{Mn}$ reaksiyonlarının tesir kesitleri kolektif yarı-klasik nükleer seviye yoğunluğu modeli kullanılarak TALYS 1.6 bilgisayar kodu ile hesaplanmıştır. Elde edilen teorik tahminler nükleer reaksiyonların deneysel veri tabanından alınan deneysel veriler ile karşılaştırılmıştır. Özellikle GDR'nin baskın olduğu bölgelerde fotonükleer reaksiyonların karakteristik yapıları incelenmeye çalışılmıştır.

Tablo 1'de reaksiyonlara ait eşik enerjisi değerleri MeV cinsinden verilmiştir. Eşik enerjisi değerleri incelendiğinde beklendiği üzere nötron çıkışının fazla olduğu reaksiyona doğru artış olduğu görülmektedir. Fotonlar nükleon emisyonu için çekirdeğin bağlanma enerjisinin üzerinde yeterli enerjiye sahip olmalıdırlar. Nükleer bağlanma enerjisi çoğu izotop için 6 MeV'in üzerinde olması nedeniyle fotonlar böyle bir eşik enerjisi değerine sahip olmalıdır.

Tablo 1. Fotonötron eşik enerjileri (MeV cinsinden) [18].

Çekirdek	$E_{eşik}(\gamma, n)$	$E_{eşik}(\gamma, 2n)$	$E_{eşik}(\gamma, 3n)$
⁵⁵ Mn	10.227	19.266	31.220

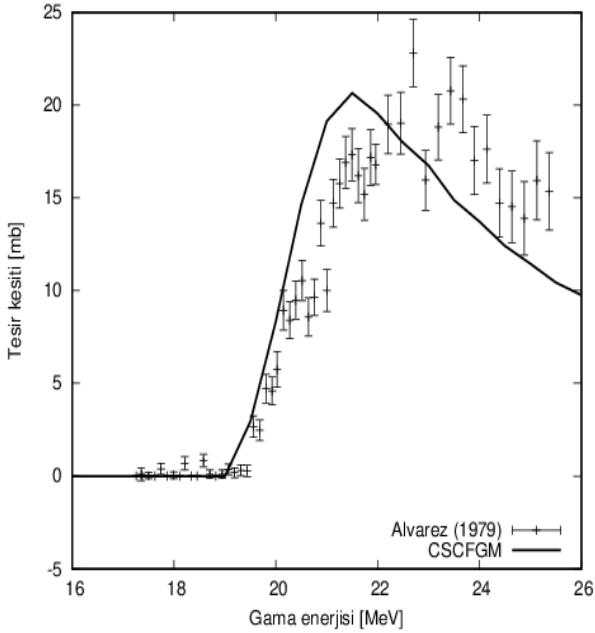
Şekil 1'de $^{55}\text{Mn}(\gamma, n)^{54}\text{Mn}$ reaksiyonunun fotonükleer tesir kesiti hesabının deneysel veriler ile karşılaştırılması sunulmuştur. Reaksiyona ait deneysel veriler oldukça çoktur ve tek bir çalışma grubu [3] tarafından yapılmıştır. Orta ve ağır çekirdekler için tipik olarak beklenen durum, eşik enerjisinden sonra hızlı bir artış ve ardından uyarılmış birleşik sistemin bir karakteristik değeri etrafında merkezlenmiş çok daha fazla kademeli artışların takip etmesidir. Bu karakteristik değer (γ, n) için yaklaşık 2.3 MeV dir [3]. Şekil 1'de 17-18 MeV aralığında görülen pik GDR'ye karşılık gelmektedir. GDR iki genellikle iki büyük zirveden oluşur ancak bazı durumlarda üst üste binen ince bir yapı ile daha geniş pik durumu gözlenebilir. Yaklaşık 10-18 MeV gama enerjisi aralığında bulunan tesir kesiti değerlerinin CSCFGM ile elde edilen teorik sonuçlar ile uyum içerisinde olduğu görülmüştür. Tesir kesitinin genel davranışının açıklanması hedeflenen ilk amaçtır. Bunun yakalanması modelin bu reaksiyon için doğru çalıştığını ve kolektif etkileri içeren nükleer seviye yoğunluğunun hesaplara dahil edilmesi gerektiğinin bir göstergesidir.



Şekil 1. $^{55}\text{Mn}(\gamma, n)^{54}\text{Mn}$ reaksiyonunun CSCFGM ile hesaplanan tesir kesiti değerlerinin deneysel veriler [3] ile karşılaştırılması.

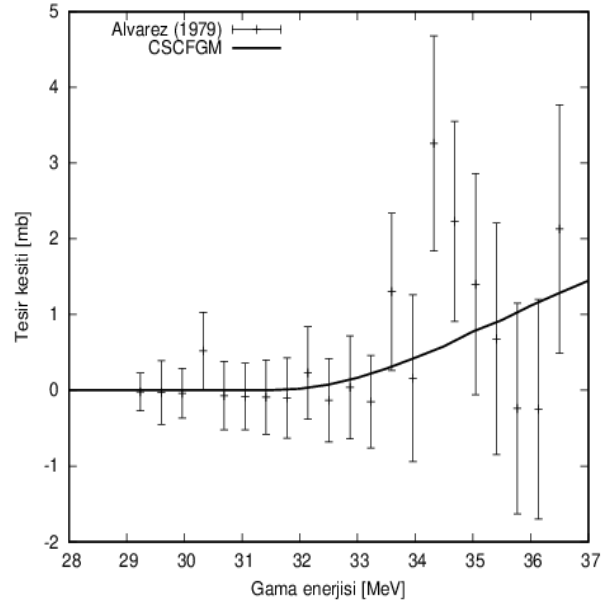
$^{55}\text{Mn}(\gamma, 2n)^{53}\text{Mn}$ reaksiyonunun CSCFGM kullanılarak elde edilen tesir kesiti değerlerinin deneysel veriler ile karşılaştırılması Şekil 2'de verilmiştir. Reaksiyona ait deneysel veriler ilk reaksiyon ile aynı çalışmadan [3] alınmıştır. Fazla sayıda deneysel veri mevcuttur ve verilerin özellikle artan enerjilerde deneysel hata

paylarının arttığı görülmektedir. Tesir kesiti değerleri ise çok küçük değerlerden başlayıp yaklaşık 25 mb'lara kadar ulaşan bir dağılım sergilemektedir. CSCFGM ile elde edilen hesaplama tahminlerinin ise düşük enerjilerden itibaren dağılımın genel davranışını yakaladığı sadece 22 MeV'den sonraki enerjilerde deneysel verilerden uzaklaşma gösterdiği ancak davranışın benzer olduğu görülmektedir. Reaksiyonun, eşik enerjisinden itibaren hızlı bir yükselişe geçtiği ve 23 MeV gama enerjisi civarında dalgalanmaların olduğu görülmektedir. Bu dalgalanmalar GDR'ye karşılık gelmektedir ve Şekil 1'deki durumun aksine iki belirgin tepe biçiminde kendini göstermektedir.



Şekil 2. $^{55}\text{Mn}(\gamma,2n)^{53}\text{Mn}$ reaksiyonunun CSCFGM ile hesaplanan tesir kesiti değerlerinin deneysel veriler [3] ile karşılaştırılması.

Şekil 3'de $^{55}\text{Mn}(\gamma,3n)^{52}\text{Mn}$ reaksiyonunun hesaplanan tesir kesiti değerlerinin deneysel veriler [3] ile karşılaştırılması sunulmuştur. Bu reaksiyonda deneysel veri sayısı diğer hesaplamalarda da olduğu gibi fazladır ve tesir kesiti değerleri 28-37 MeV gama enerjisi aralığında ölçülmüştür. Deneysel veriler incelendiğinde değerlerin çok yüksek deneysel hata değerine sahip oldukları ve tesir kesiti değerlerinin bir önceki reaksiyonlara göre çok daha düşük değerlerde olduğu görülmektedir. Reaksiyonun eşik enerjisinden sonra tesir kesiti değerlerinin artmaya başladığı 34-35 MeV aralığında tepe noktasına ulaştığı görülmektedir ve bu tepe noktası reaksiyona ait GDR değeridir. GDR'nin kendisi iki ana pikten oluşur ancak burada muhtemelen üst üste binen ince bir yapı ile belirgin tek bir pik gibi görünmektedir. Tesir kesiti değerlerine bakıldığı zaman diğer iki reaksiyona göre çok küçüktür. Bu davranış ağır çekirdekler için alışılmadık bir durumdur ve nadir görülen bir sonuç olarak bu reaksiyonda karşımıza çıkmaktadır.



Şekil 3. $^{55}\text{Mn}(\gamma,3n)^{52}\text{Mn}$ reaksiyonunun CSCFGM ile hesaplanan tesir kesiti değerlerinin deneysel veriler [3] ile karşılaştırılması.

4. Tartışma ve Sonuç

^{55}Mn izotopunun fotonükleer tesir kesitleri kolektif yarı-klasik nükleer seviye yoğunluğu modeli kullanılarak TALYS 1.95 bilgisayar kodu ile hesaplandı. Elde edilen teorik sonuçlar her reaksiyon için deneysel veriler ile karşılaştırıldı. Şekiller toplu olarak değerlendirildiğinde, daha fazla nötron ayrımı gerçekleşen reaksiyona doğru gidildikçe reaksiyon eşik enerjilerinin arttığı ve tesir kesiti değerlerinin azaldığı yorumu yapılabilir. Şekillerdeki dikkat çeken piklerin GDR'ye karşılık geldiği ve GDR'lerin beklenen karakteristik özellikleri arasında yer alan ön kısımlarında birkaç zayıf tepe noktalarının görülmesi durumu tüm şekillerde açıkça görülmektedir. Ayrıca, orta ağır çekirdeklerde 15-25 MeV gama enerji bölgesinde meydana gelen pikler reaksiyonlarda protonların baskın olduğu noktaları işaret etmektedir. Daha ağır çekirdeklere gidildikçe bu durumun tersine dönmesi beklenmektedir. Tüm tesir kesitlerinde zayıf bir yapı ortaya çıkmaktadır. Şekiller incelendiğinde, GDR'nin ön kenarlarında oluşan zayıf tepe noktaları bu durumun kanıtıdır. Çalışmanın ana amaçlarından bir tanesi 30 MeV gama enerjisinin altında yani GDR'nin baskın olduğu aralıkta fotonükleer tesir kesitlerine ait olan deneysel verilerin teorik olarak doğru bir şekilde açıklanması ve bu değerler elde edilirken kullanılan fonksiyonların etkili olup olmadığının araştırılmasıydı. Yaptığımız hesaplamalar ve karşılaştırmalar sonucunda görülüyor ki, kolektif etkileri içeren nükleer seviye yoğunluğu ^{55}Mn izotopunun fotonükleer reaksiyonlarının tesir kesiti hesaplamalarında etkin bir role sahiptir ve fotonükleer reaksiyonların tesir kesiti hesaplamalarında göz önüne alınması gereken bir niceliktir.

Kaynakça

- [1] IAEA Nuclear Data Section 2014. Experimental Nuclear Reaction Data (EXFOR), <http://www-nds.iaea.org/exfor> (Erişim Tarihi: 10.09.2019).
- [2] Canbula, B., Bulur, R., Canbula, D., Babacan, H. 2014. A Laplace-like Formula for the Energy Dependence of the Nuclear Level Density Parameter. *Nuclear Physics A*, 929, 54-70.
- [3] Alvarez, R. A., Berman, B. L., Faul, D. D., Lewis Jr, F. H., Meyer P. 1979. Photoneutron Cross Sections for ⁵⁵Mn and ⁵⁹Co. *Physical Review C*, 20(1), 128.
- [4] Vagena, E., Stoulos, S. 2017. Average Cross Section Measurement for ¹⁶²Er (γ , n) Reaction Compared with theoretical Calculations Using TALYS. *Nuclear Physics A*, 957, 259-273.
- [5] Hauser, W., Feshbach, H. 1952. The Inelastic Scattering of Neutrons. *Physical Review*, 87(2), 366.
- [6] Koning, A. J., Hilaire S., Duijvestijn, M. C. 2007. TALYS-1.0, International Conference of Nuclear Data Science and Technology, 211-214.
- [7] Herman, M., Capote, R., Carlson, B.V., Oblozinsky, P., Sin M., Trkov, A., Wienke, H., Zerkin, V. 2007. EMPIRE: Nuclear Reaction Model Code System for Data Evaluation. *Nuclear Data Sheets* 108, 2655-2715.
- [8] Broeders, C. H. M., Konobeyev, A. Y., Korovin, Y. A., Lunev, V. P., Blann, M. 2006. ALICE/ ASH - Pre-Compound and Evaporation Model Code System for Calculation of Excitation Functions, Energy and Angular Distributions of Emitted Particles in Nuclear Reactions at Intermediate Energies, Report FZKA 7183. <http://bibliothek.fzk.de/zb/berichte/FZKA7183.pdf> (Erişim Tarihi: 28.08.2019).
- [9] Canbula, B., Canbula, D., Babacan, H. 2015. Analysis of Elastic, Quasielastic, and Inelastic Scattering of Lithium Isotopes on a ²⁸Si Target. *Physical Review C*, 91(4), 044615.
- [10] Canbula, B. 2017. Collective Effects in Deuteron Induced Reactions of Aluminum. *Nuclear Instruments and Methods Section B*, 391, 73-77.
- [11] Rauscher, T., Thielemann, F. K., Kratz, K. L. 1997. Nuclear Level Density and the Determination of Thermonuclear Rates for Astrophysics. *Physical Review C*, 56(3), 1613.
- [12] Okuducu, S., Akti, N., Saraç, H., Bölükdemir, M., Tel, E. 2009. Calculation of Nuclear Level Density Parameters of Some Light Deformed Medical Randonuclides Using Collective Excitation Modes of Observed Nuclear Spectra. *Modern Physics Letters A* 24 (33), 2681-2691.
- [13] Bethe, H. A. 1937. *Nuclear Physics B, Nuclear Dynamics, Theoretical. Reviews of Modern Physics*, 9(2), 69.
- [14] Ignatyuk, A. V., Smirenkin, G., Tishin, A. 1975. Phenomenological Description of Energy Dependence of the Level Density Parameter. *Yadernaya Fizika*, 21(3), 485-490.
- [15] Grossjean, M. K., Feldmeier, H. 1985. Level Density of a Fermi Gas with Pairing Interactions. *Nuclear Physics A*, 444(1), 113-132.
- [16] Demetriou, P., Goriely, S. 2001. Microscopic Nuclear Level Densities for Practical Applications. *Nuclear Physics A*, 695(1-4), 95-108.
- [17] Canbula, B., Babacan, H. 2011. Calculation of the Level Density Parameter Using Semi-Classical Approach. *Nuclear Physics A*, 858(1), 32-47.
- [18] Wapstra, A. H., Bos, K. 1977. The 1977 Atomic Mass Evaluation: in Four Parts Part II. Nuclear-Reaction and Separation Energies. *Atomic Data Nuclear Data Tables*, 19, 215-275.

Tek Tohum Nesli Seleksiyon Yöntemi ile Geliştirilen Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Hatlarının Tarımsal ve Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Ali ŞENATEŞ¹ , Sabri ERBAŞ² 

^{1,2}Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 32260, Isparta, Türkiye

(Alınış / Received: 12.11.2019, Kabul / Accepted: 06.01.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Anahtar Kelimeler

Aspir,
Carthamus tinctorius,
Hat geliştirme,
Tek tohum nesli,
Verim ve kalite

Özet: Bu çalışma, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nde 2016 yılında tesadüf blokları deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Gelendost-2 (GE) hattı ile Centennial (CE), Montola 2000 (MO) ve W6 9822 (W6) çeşitlerinin melezlemesinden elde edilerek F₈ generasyonuna kadar tek tohum nesli seleksiyon yöntemi ile ulaştırılan 68 hat (20 adet GE×CE, 28 adet GE×MO ve 20 adet GE×W6) ve aspir genotipleri (Gelendost-2, Montola 2000, W6 9822, Dinçer 5-18-1, Remzibey-05, Balcı, Linas ve Olas) materyal olarak kullanılmıştır. Sonuçlara göre; 1000 tane ağırlığı, tohum verimi, yağ oranı ve yağ veriminin sırasıyla 30.2-51.0 g, 30.2-252.6 kg/da, % 25.1-35.4 ve 10.0-77.2 kg/da arasında değiştiği görülmüştür. GECE-11 ve 12 hatlarının 1000 tane ağırlığı, GEMO-10 ve 19 nolu hatlarının tohum verimi, GEMO-1, 20, 28, GEW6-16, 20 ve GECE-4, 8, 9, 12 nolu hatların yağ oranı, GEMO-10, 19, 28 ve GEW6-20 nolu hatlarının ise yağ verimi açısından ebeveynler ve çeşitlere göre daha üstün oldukları belirlenmiştir. Sonuç olarak 4 adet verim tipi (GECE-11, 12 ve GEMO-10,19), 11 adet yağ tipi (GEMO-1, 10, 19, 20, 28, GEW6-16, 20 ve GECE-4, 8, 9, 12), 2 adet oleik tipi (GEMO-3 ve GEMO-23), 1 adet linoleik tipi (GECE-7) olmak üzere 15 hat bir sonraki generasyona aktarılmıştır.

Determination of Agricultural and Technological Characters of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Lines Developed by Single Seed Descent Selection Methods

Keywords

Safflower,
Carthamus tinctorius,
Lines development,
Single seed descent,
Yield and quality

Abstract: This study was conducted in 2016 as 3 replications at randomized blocks design at Department of Field Crops, Faculty of Agriculture, Isparta Applied Sciences University. Total of 68 lines (20 progenies from GE×CE, 20 from GE×W6 and 28 from GE×MO) were selected with single seed descent methods up to F₈ generation. These lines derived from hybridization of Gelendost-2 and Centennial, Montola 2000 and W6 9822. Standard genotypes (Gelendost-2, Montola 2000, W6 9822, Dinçer 5-18-1, Remzibey-05, Balcı, Linas and Olas) were also used along with the above lines as plant materials. According to the results; 1000 seed weight, seed yield, oil content and oil yield were varied between 30.2-51.0 g, 30.2-252.6 kg/da, 25.1-35.4% and 10.0-77.2 kg/da, respectively. GECE-11, 12 had higher 1000seed weight, GEMO-10, 19 had higher seed yield, GEMO-1, 20, 28, GEW6-16, 20 and GECE-4, 8, 9, 12 had higher oil content, GEMO-10, 19, 28 and GEW6-20 had higher oil yield than cultivars. As a result, 4 yield types (GECE-11, 12 and GEMO-10, 19), 11 oil types (GEMO-1, 10, 19, 20, 28, GEW6-16, 20 and GECE-4, 8, 9, 12), 2 oleic types (GEMO-3 and GEMO-23), 1 linoleic type (GECE-7) 15 lines are transferred to the next generation.

1. Giriş

Türkiye, uzun yıllardır yağlı tohumlar ve bitkisel yağlar ticaretinde net ithalatçı (% 70) ülkeler arasında yer almakta ve birçok tarımsal ürünlerdeki yeterli üretimine karşın özellikle yağlı tohumlar ve

bitkisel yağlar üretiminde giderek artan nüfusa ve yağların kullanım alanlarının genişlemesine paralel olarak dış ticaret açığı gittikçe büyümekte olup petrol ve ürünlerinden sonra en büyük ikinci ithalat kalemi durumundadır. Türkiye İstatistik Kurumu'nun (TÜİK) dış ticaret verilerine göre, Türkiye 2018 yılında 3.7

*İlgili yazar: sabrierbas@isparta.edu.tr

milyon ton yağlı tohum (1.6 milyar \$), 1.3 milyon ton ham yağ (1.1 milyar \$), 3.5 milyon ton küspe (837 milyon \$) ve olmak üzere 3.5 milyar \$ değerinde toplam 8.5 milyon ton bitkisel yağ, yağlı tohum ve küspe ithal etmiştir [1]. Aspir bitkisi geniş alanlarda ticari olarak yetiştirilmesi durumunda, hem üretici ve hem de sanayici isteklerine cevap verebilecek bir potansiyele ulaşması mümkündür. Kurak ve tuzlu topraklarda ve nispeten soğuk bölgelerde ve yüksek bir tolerans gösteren aspir ülkemizin kuru tarım yapılan alanlarında başarılı bir şekilde üretilebilir [2]. Özellikle karasal iklimim hüküm sürdüğü Orta, Doğu ve Geçit Bölgeleri gibi kuru tarım bölgelerinde tahıllarla münavebeli olarak en azından nadas yılında aspir ekimi yapılabilir. Ancak kültürü yapılan aspir çeşitlerinin tohum verimi (Türkiye ortalaması kuru koşullarda 150 kg/da ve sulu koşullarda 200 kg/da'dır) ve yağ oranı (%25-33) düşüktür [3]. Aspir tohum veriminin ve yağ oranının diğer yağ bitkilerine göre nispeten düşük kalması, dünyada ve Türkiye'de tarımın istenen seviyede gelişmesinin önüne geçmektedir.

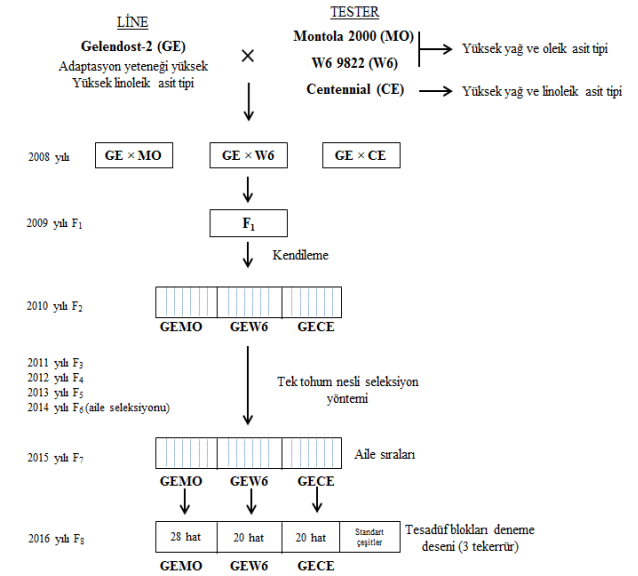
Aspir ıslahının hedefi; tohum/yağ verimi ve kalitesi yüksek, olumsuz çevre koşulları ile hastalık ve zararlılara dayanıklı yüksek adaptasyon ve stabilite gösteren hibrit çeşitler geliştirmektir [4]. Islah amaçları doğrultusunda, geliştirilen aspir çeşit ve hatlarının farklı çevre koşullarında stabil bir üretime izin verecek şekilde adaptasyon yeteneğinin ve verim performansının yüksek olması gerekir. Genetik çeşitlilik barındıran popülasyonlardan veya introüksiyon materyallerinden melezlemeye başvurmadan basit toplu veya teksele seleksiyon yöntemleriyle çok sayıda saf hat elde edilerek kolaylıkla çeşit geliştirilebilir. Türkiye'deki ticari aspir çeşitlerinin 2019 yılında Dinçer 5-118 ve Montola 2000 melez popülasyonundan geliştirilen ve tescil edilen Olein, Safir ve Zirkon çeşitleri dışında tamamı (Yenice 5-38, Dinçer 5-11-8, Remzibey-05, Balcı, Linas, Olas ve Asol gibi) introüksiyon materyallerinden seleksiyon yapılarak geliştirilmişlerdir. Oysa dünyada ticari değeri yüksek aspir çeşitleri yaygın olarak melezleme ıslahı ile geliştirilmiş olan çeşitlerdir [4] ve aspirin ıslah amaçları doğrultusunda ülkemizde de bu sayının artırılması gereklidir.

Bu çalışmada; Gelendost 2 (GE) hattı ile Centennial (CE), Montola 2000 (MO) ve W6 9822 (W6) çeşitlerinin melezlemesinden elde edilen F₈ generasyonu (GE×CE melezi 20 hat, GE×MO melezi 28 hat ve GE×W6 melezi 20 hat) toplam 68 hat ebeveynleri ve diğer standart aspir çeşitleri (Dinçer 5-18-1, Remzibey-05, Balcı, Linas, Olas) ile agronomik ve kalite özellikleri bakımından karşılaştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

Bu çalışma 2016 yılında Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü

yürütülmüştür. Çalışmada materyal olarak 2008 yılında sentetik kimyasal erkek kısırılık oluşturularak melezlenen ve F₈ generasyonuna kadar tek tohum soy nesli seleksiyon yöntemi ile ulaştırılan "Gelendost-2 × Centennial" melezi 20 hat, "Gelendost-2 × Montola 2000" melezi 28 hat ve "Gelendost-2 × W6 9822" melezi 20 hat ve 6 adet standart çeşit (Dinçer 5-11-8, Centennial, Remzibey-05, Balcı, Linas, Olas) materyal olarak kullanılmıştır. Ana ve baba ebeveynlerin melezleme ve F₈ generasyonuna kadar süren seleksiyon aşamaları Şekil 1'de sunulmuştur.



Şekil 1. Materyallerin melezleme ve seleksiyon aşamaları

Tarla denemelerinin kurulduğu 2016 yılına ilişkin iklim verileri incelendiğinde, vejetasyon döneminde (Mart-Ağustos) genel olarak aspir bitkisinin normal büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkileyecek sıcaklıklar yaşanmamış, yine özellikle Nisan-Haziran ayları arasında aspir bitkilerinin ihtiyacı olan su yağışlarla sağlanmıştır (Tablo 1.). Bu nedenle, denemede sulama yapılmamış, bu dönemde (toplam 147.8 mm) düşen yağışlar sayesinde bitkilerin çıkış, rozet ve sapa kalkma dönemleri başarılı bir şekilde atlatılmıştır. Yine çiçeklenme dönemi sonrasında aralıklarla düşen yağışlar dölleme sonrası tane dolumuna katkı sağlamıştır. Diğer taraftan olgunlaşma döneminde düşen yağışlar bitkilerin hasat ve harmanına herhangi bir olumsuzluk oluşturmamıştır. Araştırma alanının toprak özellikleri Rowell [5], tarafından önerilen metoda bağlı olarak yapılmıştır. Toprak tekstürü bakımından killi-tınlı, organik madde içeriği Walkley-Black metodu ile % 1.1, kireç içeriği Schiebler kalsimetre ile 7.20 (%), tuz oranı % 0.38, alınabilir fosfor 3.9 mg/kg, alınabilir potasyum 1N NH₄OAc'da 119.0 mg/kg olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan toprak pH'sı hafif alkali (pH 7.5) yapıda olduğu tespit edilmiştir. Aspir, diğer birçok tarla bitkisine göre daha az toprak seçiciliği olan bir bitkidir. Bu yönüyle deneme alanı toprağı her ne kadar alkali, ağır yapılı ve organik maddesi düşük de olsa aspir tarımı için yeterlidir.

Tablo 1. Isparta ilinin 2016 yılı Isparta iline ait aylık ortalama yağış, sıcaklık ve nem değerleri [8]

Aylar	Yağış (L/m ²)		Sıcaklık (°C)		Nem (%)	
	1950-2015	2016	1950-2015	2016	1950-2015	2016
Ocak	73.6	96.8	1.9	1.6	73.2	71.6
Şubat	64.0	33.3	2.9	7.1	70.2	68.0
Mart	55.3	59.9	6.2	7.7	65.3	60.7
Nisan	55.3	47.8	10.8	14.5	61.0	48.5
Mayıs	52.3	87.6	15.6	15.1	57.4	61.5
Haziran	30.6	12.4	20.2	22.0	51.2	43.9
Temmuz	14.6	25.7	23.7	25.4	45.3	40.8
Ağustos	11.7	45.4	23.2	24.7	46.4	47.6

Her üç popülasyona ait hatlar ve çeşitler 45 × 15 cm ekim normunda 5 m uzunluğunda 3 sıra olacak şekilde tesadüf blokları deneme desenine göre üç tekerrürlü olarak 24.03.2016 tarihinde ekilmişlerdir. Ekimle birlikte deneme alanına taban gübresi olarak 6 kg saf fosfor olacak (P₂O₅) şekilde diamonyum fosfat (%18 N, % 46 P₂O₅) ve üst gübre olarak 8 kg saf azot (N) olacak şekilde amonyum nitrat (%33) gübresi atılmıştır. Yağışlar aspirin çıkış, büyüme ve gelişmesi için yeterli olduğundan denemede sulama yapılmamıştır. Olgunlaşma ile birlikte parsellerde rastgele seçilen 10 bitkide bazı önemli tarımsal [bitki boyu (cm), dal sayısı (adet/bitki), tabla sayısı (adet/bitki), tabla çapı (mm), hasat indeksi (%), 1000 tane ağırlığı (g), tohum ve yağ verimi (kg/da)] ve kalite [kabuk oranı (%), yağ oranı (%), yağ asitleri kompozisyonu (%)] özellikleri belirlenmiştir. Çeşit ve hatların yağ analizleri, Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) cihazında % olarak okutularak saptanmıştır. Tohumlar 70 °C ayarlı etüvde 48 saat bekletilerek nemi uçurulup 2'şer g tartılmış ve NMR cihazında her parselde 3 okuma yapılarak % yağ oranı ortalaması hesaplanmıştır. Yağ asitleri kompozisyonu ise alev iyonlaşma detektöre (FID) sahip gaz kromatografisi (Shimadzu GC-2025) cihazında yapılmıştır. 2 g kurutulmuş öğütülmüş aspir tohumu n-hekzan ile soğuk ekstraksiyona tutulmuş ve solvent karışımı uçurulduktan sonra elde edilen ham yağ AOAC [6] tarafından önerilen yöntemle %0.5'lik Sodyum Metilat (NaOMe) ile metil esterlerine (FAME) dönüştürmüştür. Yağ asitlerine ilişkin kromatogramlar elde edilerek palmitik (C16:0), stearik (C18:0), oleik (C18:1) ve linoleik (C18:2) yağ asitlerinin % oranları tespit edilmiştir. GC cihazının çalışma koşulları şu şekildedir; Kolon Teknokroma TR-CN100 (100 m × 0.25 mm, 0.20 µm), enjektör sıcaklığı 250 °C, detektör sıcaklığı 250 °C, akış hızı (psi) 10, taşıyıcı gaz N (40 ml/dk), enjektör kapasitesi 1.0µl'dir. Fırın sıcaklığı 140°C'de 10 dakika bekledikten sonra 240 °C'ye dakikada 3°C'lik artışla ulaşıyor ve bu sıcaklıkta 10 dakika bekliyor. Elde edilen kromatogramlardaki pikler ticari standart yağ asidi metil ester karışımına (Sigma, Supelco® 37 Component FAME Mix) göre isimlendirilmiştir. Elde edilen veriler tesadüf blokları deneme desenine göre SAS [7] istatistik paket programında analiz edilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

Aspir genotiplerinin bitki boyu ortalamalarına göre her üç popülasyonda da Gelendost-2 hattı en uzun (100.7 cm), W6 9822 çeşidi ise en kısa (64.7 cm) bitki boyuna sahip olduğu gözlenmiştir (Tablo 2, 3, 4). GEMO popülasyonunda GEMO-4, 9, 10 ve 16 ve 27 nolu hatlar ile Balcı çeşidi (Tablo 2), GEW6'da GEW6-5, 6, 7, 8, 12, 14, 16 ve 18 nolu hatlar ile Balcı çeşidi (Tablo 3), GECE'de GECE-16, 18 ve 19 nolu hatlar ile Balcı, Olas ve Remzibey-05 çeşitleri, W6 9822 çeşidi (Tablo 4) ile aynı istatistiksel grupta yer almışlardır. Aspirde makineli hasada uygunluk ve ekonomik bir verim alınması açısından bitki boyunun 55.0-65.0 cm olması gerektiğini bildirilmiştir [9]. Çalışmamızda sadece W6 9822 genotipi bu sınırlar içerisinde kalmıştır. Diğer taraftan ebeveynlerinden biri olan Gelendost-2 hattı geççi ve uzun boylu bir genotip olduğundan dolayı bu özelliğini hatlara aktardığı düşünülmektedir. Aspirde bitki boyu eklemeli genler tarafından kontrol edildiğinden [10], düşük ve orta düzeyde bir kalıtım derecesi tahminlenmekte [11], bu nedenle yapılan çalışmalarda geniş bir bitki boyu varyasyon rapor edilmektedir. Yapılan çalışmalarda aspirde bitki boyunun 31.7-150.1 cm arasında değiştiği bildirilmektedir [2, 12-14]. GEMO popülasyonunda W6 9822 genotipi en yüksek dal sayısına (7.6 adet/bitki) sahip iken, Linas çeşidi ile 13 hattın (1, 2, 4, 5, 7, 8, 13, 17, 19, 21, 23, 24, ve 28 nolu) en düşük dal sayısına sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 2). GEW6 popülasyonunda W6 9822 (7.6 adet/bitki), Montola 2000 (6.7 adet/bitki) ve Centennial (6.5 adet/bitki) genotipleri en yüksek dal sayısına sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3). GECE popülasyonunda ise GECE-7 (7.8 adet/bitki) genotipinin çeşidinin en yüksek, GECE-2 (4.0 adet/bitki) genotipinin ise en düşük dal sayısına sahip olduğu saptanmıştır (Tablo 4). Aspirde dal sayısı çevre ve genetik faktörlerden etkilenen bir özelliktir. Nitekim aspirde dal sayısı için % 64.2 oranında kalıtım derecesi tahminlenmiştir [15]. Yapılan diğer çalışmalarda aspirde dal sayısının 4.1-18.9 arasında değiştiği bildirilmiştir [15-17].

Tablo 2. Gelendost-2 × Montola 2000 melezi hatların agronomik ve kalite özellikleri

Genotip (F) CV	Bitki boyu	Dal sayısı	Tabla sayısı	Tabla çapı	1000 tane ağırlığı	Hasat indeksi	Tohum verimi	Kabuk oranı	Yağ oranı	Yağ verimi
	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
	5.1	8.8	5.7	5.9	5.2	8.7	14.2	2.8	2.6	14.4
GEMO-1	76.8 c-i ¹	4.9 f-k	8.8 l-n	25.8 a	35.5 h-m	20.6 g-l	171.2 g-l	44.2 mn	34.9 ab	59.7 b-h
GEMO-2	74.4 e-j	4.1 k	7.8 n-q	23.4 a-h	35.3 i-n	24.1 b-g	201.3 b-h	47.8 e-l	33.2 c-h	66.8 a-f
GEMO-3	80.2 c-f	5.7 c-f	11.9 fg	21.1 g-l	38.5 c-h	17.9 k-p	148.5 k-o	49.3 c-h	30.0 o-q	44.5 i-m
GEMO-4	71.6 g-k	4.5 i-k	10.0 h-k	21.7 d-k	42.5 ab	21.3 f-k	171.6 g-l	52.1 b	30.8 j-o	53 f-j
GEMO-5	75.0 d-j	4.7 g-k	8.9 l-n	23.9 a-f	39.6 b-f	19.5 i-o	175.9 g-l	48.9 c-h	31.2 i-o	55.0 e-j
GEMO-6	79.9 c-f	6.2 b-d	14.6 ab	23.8 a-f	39.5 b-f	25.1 b-d	220.2 a-f	47.9 e-k	32.0 g-m	70.6 a-c
GEMO-7	77.1 c-i	4.6 h-k	6.7 qr	23.4 a-h	31.7 n-q	23.0 b-i	155.3 i-n	49.1 c-h	30.5 m-p	47.3 h-l
GEMO-8	81.3 c-e	4.7 g-k	13.7 bd	22.6 b-k	30.5 p-q	20.1 h-n	127.2 m-q	50.6 b-d	30.6 k-o	39.0 k-o
GEMO-9	70.9 h-k	6.2 b-d	15.1 a	18.7 l	36.5 e-l	20.7 g-l	145.2 k-p	51.0 bc	28.6 q	41.4 j-n
GEMO-10	68.9 j-k	6.7 b	15.4 a	20.2 k-l	36.3 f-l	20.3 h-m	238.3 a-c	47.7 f-l	32.3 g-j	77.2 a
GEMO-11	80.0 c-f	5.2 e-j	8.6 l-n	24.0 a-e	35.2 i-n	20.0 h-n	153.6 j-o	47.8 e-l	33.3 c-h	51.1 g-k
GEMO-12	82.5 cd	5.5 d-h	10.6 h-j	20.6 i-l	42.1 a-c	20.1 h-n	94.0 q-t	57.9 a	30.5 m-p	28.7 n-q
GEMO-13	76.8 c-i	4.6 h-k	10.9 gh	24.2 a-d	38.4 c-h	26.1 ab	185.3 e-k	49.5 b-h	30.1 n-q	55.8 d-i
GEMO-14	82.2 c-e	5.5 d-h	8.1 n-p	25.1 ab	30.2 q	23.1 b-i	210.0 a-g	47.0 h-l	32.4 e-j	68.0 a-e
GEMO-15	81.7 c-e	5.2 e-i	9.4 k-m	23.7 a-g	34.2 j-o	19.3 j-o	181.2 f-l	47.5 g-l	32.5 e-i	58.8 c-h
GEMO-16	71.6 g-k	5.4 d-i	7.2 o-r	22.7 b-k	36.9 e-l	28.3 a	197.7 c-i	46.1 i-m	32.3 g-j	63.7 a-g
GEMO-17	92.8 b	4.8 f-k	8.8 l-n	21.4 e-k	32.9 l-q	19.6 i-o	252.6 a	49.1 c-h	29.0 p-q	73.4 ab
GEMO-18	84.4 c	5.7 c-f	9.7 i-l	21.2 f-l	31.3 o-q	15.4 p-q	104.4 p-s	46.2 i-m	32.2 g-k	33.5 l-p
GEMO-19	80.3 c-f	4.8 f-k	9.6 i-l	23.3 a-i	39.2 b-h	16.5 o-q	243.0 ab	45.2 k-n	31.7 h-n	77.0 a
GEMO-20	78.0 c-h	5.4 d-i	10.7 hi	23.2 a-i	38.2 e-h	21.5 e-j	177.6 f-l	43.8 mn	34.9 ab	62.0 b-g
GEMO-21	75.0 d-j	4.7 g-k	10.1 h-k	24.5 a-c	37.5 e-j	25.7 a-c	226.3 a-e	49.9 b-g	30.9 j-o	70.0 a-d
GEMO-22	81.9 c-e	5.6 c-g	7.1 p-r	23.9 a-e	40.0 b-f	21.4 f-k	140.3 l-p	48.5 c-i	33.6 b-g	47.0 h-l
GEMO-23	81.4 c-e	4.7 g-k	9.6 i-l	21.8 c-k	36.1 g-m	17.0 m-q	112.5 o-r	48.1 d-j	32.4 f-j	36.4 l-p
GEMO-24	79.3 c-g	4.6 h-k	6.6 r	24.9 ab	39.4 b-f	24.9 b-e	165.0 h-m	47.3 g-l	34.5 a-c	56.9 c-i
GEMO-25	77.9 c-h	5.3 d-i	8.1 n-p	20.4 j-l	33.8 j-p	21.8 d-j	86.6 q-t	45.5 j-n	34.0 a-f	29.5 n-q
GEMO-26	74.5 e-j	5.1 e-j	10.8 h	21.9 c-k	32.6 m-q	11.6 q-r	76.0 r-t	45.5 j-n	33.3 c-g	25.3 o-q
GEMO-27	69.4 i-k	5.5 d-h	8.2 n-p	24.5 a-c	37.0 e-k	22.5 c-j	213.0 a-g	48.2 d-j	32.1 g-l	68.1 a-e
GEMO-28	74.5 e-j	4.3 jk	8.3 m-o	24.6 ab	43.9 a	24.7 b-f	194.5 d-j	46.0 i-m	35.3 a	68.7 a-e
Balcı	67.7 j-k	5.3 d-i	10.4 h-k	24.7 ab	38.6 c-h	21.7 d-j	114.2 n-r	45.2 l-n	34.0 a-e	38.8 k-o
Centennial	78.5 c-h	6.5 bc	14.4 a-c	22.6 b-k	33.6 k-q	14.0 q-r	55.7 t	43.7 mn	34.1 a-d	19.0 q
Dinçer 5-18-1	79.8 c-f	5.5 d-h	11.9 fg	23.0 b-j	38.8 b-i	23.4 b-h	232.8 a-d	49.4 c-h	29.0 p-q	67.4 a-e
Gelendost-2	100.7 a	6.0 b-e	12.9 d-f	21.3 e-k	37.0 e-k	16.8 n-q	92.7 q-t	56.2 a	25.1 r	23.2 p-q
Linas	91.7 b	4.7 g-k	9.5 j-l	23.7 a-g	40.4 b-d	14.1 q	65.2 st	43.2 n	35.1 ab	22.9 p-q
Montola 2000	78.2 c-h	6.7 b	13.6 c-e	23.5 a-h	39.6 b-f	20.1 h-n	175.7 g-l	50.3 b-f	30.1 o-q	52.7 f-j
Olas	72.3 f-j	5.5 d-h	10.2 h-k	22.8 b-k	40.0 b-f	20.2 h-n	89.0 q-t	43.3 n	35.4 a	31.5 m-q
Remzibey-05	74.3 e-j	6.0 b-e	12.6 ef	23.8 a-f	37.4 e-j	24.5 b-f	201.3 b-h	50.5 b-e	30.4 n-p	61.2 b-g
W6 9822	64.7 k	7.6 a	13.5 c-e	20.9 h-l	40.3 b-e	17.8 l-p	84.6 q-t	48.2 d-i	30.6 l-p	26.0 o-q

** : P<0.01, 1: Aynı harflere sahip ortalamalar arasında farklılık bulunmamaktadır.

GEMO popülasyonunda Centennial çeşidi ve 3 hat (6, 9 ve 10 nolu) en yüksek tabla sayısına sahip iken, 4 hat (7, 16, 22 ve 24 nolu) en düşük tabla sayısına sahiptir (Tablo 2). GEW6 popülasyonunda Centennial, Montola 2000, Remzibey-05, W6 9822 ve Gelendost-2 genotipleri en yüksek tabla sayısına, 9 hat ise (4, 5, 7, 9, 13, 14, 16, 18 ve 19 nolu) en düşük tabla sayısına sahiptir (Tablo 3). Diğer taraftan GECE popülasyonunda Centennial (14.4 adet/bitki) çeşidi en yüksek, GECE-2 (6.4 adet/bitki) hattı ise en düşük tabla sayısına sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4). Asperde tabla sayısı için farklı varyasyonlar elde edilse de [12, 14-16], tabla sayısının 5-50 arasında değiştiğini, ancak ekonomik bir verim için 10-12 tablanın olması gerektiği bildirilmektedir [9]. Çalışmamızda, her bir populasyonda yarıya yakın genotipin bu değerler arasında değiştiği tespit edilmiştir. Sonuçlarımız ile diğer çalışmaların sonuçları arasındaki farklılığın genotiplerin ve iklim koşullarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Zira asperde tabla sayısı orta ve

yüksek bir kalıtım derecesine sahip olduğu, aynı genetik yapıya sahip bitkilerin farklı lokasyonlarda yetiştirildiğinde varyasyon oluşabileceği bildirilmektedir [18]. Populasyonlarda tabla çapı bakımından benzer varyasyonlar elde edilmiştir. GEMO popülasyonunda GEMO-1 hattı (25.8 mm) en yüksek tabla çapına sahip iken, GEMO-9 (18.7 mm) en düşük tabla çapına sahiptir (Tablo 2). GEW6 popülasyonunda Balcı çeşidi ile 2 hat (1, 19 nolu) en yüksek tabla çapına sahip iken, 5 hat (2, 6, 10, 11, 18 nolu) en düşük tabla çapına sahiptir (Tablo 3). Diğer taraftan GECE popülasyonunda 2 hat (6, 20 nolu) en yüksek tabla çapına, 2 hat (13, 16 nolu) ise en düşük tabla çapına sahiptir (Tablo 4). Asperde tabla çapının 10.0-35.0 mm arasında değiştiği bildirilmektedir [9]. Diğer çalışmalarda asperde tabla çapının 23.3-32.0 mm arasında değiştiği tespit edilmiştir [19]. Asperde tabla çapı değişen çevre koşullarından kolaylıkla etkilenebilmekte ve değişen çevre koşullarında farklılık gösterebilmektedir [17].

Tablo 3. Gelendost-2 × W6 9822 melezi hatların agronomik ve kalite özellikleri

Genotip (F)	Bitki boyu	Dal sayısı	Tabla sayısı	Tabla çapı	1000 tane ağırlığı	Hasat indeksi	Tohum verimi	Kabuk oranı	Yağ oranı	Yağ verimi
CV	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
GEW6-1	83.2 cd ¹	4.4 e-h	7.7 f-j	25.0 a	51.0 a	25.4 a	156.3 c-e	52.4 b	28.0 j	43.9 ef
GEW6-2	86.5 bc	5.0 d-h	8.2 e-i	19.7 f-h	31.5 kl	16.1 fg	80.9 ml	49.8 b-d	30.9 f-i	24.9 l-p
GEW6-3	77.2 d-i	4.2 f-h	8.2 e-i	21.8 b-f	35.7 gh	20.2 b-e	102.8 h-l	48.2 c-g	31.0 f-i	31.7 h-l
GEW6-4	73.2 f-k	4.3 e-h	5.5 kl	21.3 b-f	32.0 j-l	12.3 hi	45.0 no	48.8 c-e	32.2 e-h	14.5 qr
GEW6-5	71.3 i-m	4.8 d-h	6.1 i-l	21.8 b-f	37.7 d-g	19.8 b-f	83.5 lm	46.4 e-i	32.4 d-h	27.0 k-p
GEW6-6	69.3 j-m	5.3 c-g	7.7 f-j	18.2 h	37.6 e-g	17.1 e-g	63.9 mn	46.4 e-i	32.4 c-h	20.8 o-q
GEW6-7	70.2 j-m	4.8 d-h	7.0 g-l	23.0 a-e	40.4 bc	22.1 a-c	179.1 bc	47.6 c-h	32.7 b-g	58.4 bc
GEW6-8	65.5 lm	5.5 b-f	7.8 f-j	22.8 a-e	32.4 i-l	21.9 a-c	151.7 de	48.4 c-f	30.8 f-i	46.7 de
GEW6-9	72.7 g-k	4.2 f-h	7.2 g-l	22.6 a-e	37.6 e-g	17.5 e-g	106.7 h-l	45.3 g-j	31.9 e-h	34.0 g-k
GEW6-10	75.9 e-i	5.2 c-g	8.6 d-g	20.7 d-h	40.4 bc	22.0 a-c	125.3 f-h	49.9 b-d	30.9 f-i	38.7 e-i
GEW6-11	79.8 d-f	5.1 c-g	8.4 d-h	18.6 gh	32.9 i-k	10.1 i	30.2 o	46.6 e-i	32.9 a-g	10.0 r
GEW6-12	71.2 i-m	5.0 d-h	9.7 d-f	22.4 a-f	32.5 i-l	19.8 b-f	120.0 g-i	48.4 c-f	33.4 a-f	40.0 e-g
GEW6-13	79.5 d-g	4.0 gh	6.0 j-l	23.4 a-d	34.8 hi	22.1 a-c	112.2 h-k	47.7 c-h	31.9 e-h	35.7 g-j
GEW6-14	69.4 j-m	3.9 gh	6.3 i-l	22.8 a-e	33.9 h-k	21.6 a-d	143.2 e-g	47.0 d-h	32.7 b-g	46.7 de
GEW6-15	81.6 c-e	5.7 b-e	8.6 d-g	21.5 b-f	32.7 i-k	19.7 b-f	145.5 ef	50.7 bc	30.8 f-i	44.8 ef
GEW6-16	65.8 lm	4.0 gh	6.4 h-l	24.1 ab	32.0 j-l	19.0 c-f	87.8 k-m	45.3 g-j	34.8 a-d	30.5 i-n
GEW6-17	78.0 d-i	5.0 d-h	7.7 f-j	21.4 b-f	34.0 h-j	20.1 b-e	81.8 lm	45.7 f-j	32.6 b-g	26.8 k-p
GEW6-18	65.4 lm	4.0 gh	6.7 g-l	20.2 e-h	30.2 l	16.6 e-g	95.6 i-l	49.1 c-e	29.9 h-j	28.5 j-o
GEW6-19	78.9 d-h	3.6 h	5.2 l	24.7 a	42.1 b	21.9 a-c	115.9 h-j	47.9 c-h	32.0 e-h	37.2 f-i
GEW6-20	78.5 d-h	4.4 e-h	7.3 g-k	24.0 ab	39.1 c-f	24.7 a	180.1 bc	45.1 h-j	34.9 a-c	62.7 ab
Balcı	67.7 k-m	5.3 c-g	10.4 cd	24.7 a	38.6 c-f	21.7 a-d	114.2 h-k	45.2 g-j	34.0 a-e	38.8 e-h
Centennial	78.5 d-h	6.5 a-c	14.4 a	22.6 a-e	33.6 h-k	14.0 gh	55.7 n	43.7 ij	34.1 a-e	19.0 pq
Dinçer 5-18-1	79.8 d-f	5.5 b-f	11.9 bc	23.0 a-e	38.8 c-f	23.4 ab	232.8 a	49.4 c-e	29.0 ij	67.4 a
Gelendost-2	100.7 a	6.0 b-d	12.9 ab	21.3 b-f	37.0 fg	16.8 e-g	92.7 j-l	56.2 a	25.1 k	23.2 n-p
Linas	91.7 b	4.7 d-h	9.5 d-f	23.7 a-c	40.4 bc	14.1 gh	65.2 mn	43.2 j	35.1 ab	22.9 n-p
Montola 2000	78.2 d-h	6.7 ab	13.6 ab	23.5 a-d	39.6 c-e	20.1 b-e	175.7 cd	50.3 bc	30.1 h-j	52.7 cd
Olas	72.3 h-l	5.5 b-f	10.2 c-e	22.8 a-e	40.0 b-d	20.2 b-e	89.0 k-m	43.3 j	35.4 a	31.5 h-m
Remzibey-05	74.3 f-k	6.0 b-d	12.6 ab	23.8 ab	37.4 e-g	24.5 a	201.3 b	50.5 bc	30.4 g-j	61.2 a-b
W6 9822	64.7 m	7.6 a	13.5 ab	20.9 c-g	40.3 bc	17.8 d-g	84.6 lm	48.2 c-g	30.6 g-i	26.0 k-p

** : P<0.01, 1: Aynı harflere sahip ortalamalar arasında farklılık bulunmamaktadır.

Tablo 4. Gelendost-2 × Centennial melezi hatların agronomik ve kalite özellikleri

Genotip (F)	Bitki boyu	Dal sayısı	Tabla sayısı	Tabla çapı	1000 tane ağırlığı	Hasat indeksi	Tohum verimi	Kabuk oranı	Yağ oranı	Yağ verimi
CV	**	**	**	**	*	**	**	**	**	**
GECE-1	76.8 c-e ¹	5.3 a-g	7.4 f-h	22.4 a-d	37.9 a-e	16.5 g-j	101.9 e-i	48.3 b-f	31.9 c-f	32.7 d-g
GECE-2	76.1 c-e	4.0 g	6.4 h	23.1 a-d	37.6 a-e	19.3 b-h	101.1 f-i	46.1 d-k	32.4 b-f	32.9 d-g
GECE-3	76.0 c-e	5.0 c-g	8.6 b-h	23.0 a-d	36.6 a-e	21.5 a-e	98.0 f-i	48.6 b-e	33.1 a-d	32.5 d-h
GECE-4	76.7 c-e	5.0 b-g	8.4 b-h	23.2 a-d	36.6 a-e	18.8 c-h	118.4 d-f	46.1 d-k	32.9 a-e	38.8 cd
GECE-5	77.2 c-e	4.8 c-g	9.9 a-h	23.3 a-d	36.4 a-e	18.4 c-i	127.1 de	47.9 b-h	31.4 c-g	39.8 cd
GECE-6	75.7 c-e	4.8 c-g	8.4 b-h	25.7 a	35.6 a-e	22.2 a-c	111.0 d-h	45.5 e-k	33.2 a-d	37.0 c-f
GECE-7	79.0 cd	7.8 a	13.2 a-e	24.5 ab	38.1 a-e	17.4 d-i	114.7 d-g	46.7 d-i	32.7 a-e	37.5 c-e
GECE-8	75.1 c-e	7.2 a-c	11.7 a-h	23.1 a-d	34.6 c-e	17.4 d-i	130.5 d	46.1 d-k	33.9 a-c	44.1 c
GECE-9	77.8 c-e	7.7 ab	14.0 ab	23.4 a-d	34.5 c-e	16.6 g-j	93.6 f-i	44.9 g-k	34.9 ab	32.7 d-g
GECE-10	77.4 c-e	5.6 a-g	10.1 a-h	22.5 a-d	35.3 a-e	15.8 g-j	89.1 g-j	47.1 c-h	32.8 a-e	29.2 e-j
GECE-11	78.6 cd	4.9 c-g	12.1 a-g	23.9 a-c	37.0 a-e	17.0 e-j	91.7 g-i	47.1 c-h	32.0 c-f	29.4 e-j
GECE-12	82.9 bc	4.7 d-g	8.2 c-h	22.5 a-d	36.2 a-e	15.4 h-k	89.7 g-j	44.5 h-k	33.2 a-d	29.7 e-j
GECE-13	80.5 cd	5.1 b-g	7.9 d-h	20.3 d	33.0 e	11.3 k	54.8 k	47.1 c-h	31.1 d-g	17.1 l
GECE-14	82.8 bc	4.4 e-g	7.1 g-h	22.3 a-d	36.2 a-e	12.4 j-k	94.5 f-i	46.2 d-k	30.3 e-g	28.5 f-j
GECE-15	78.0 c-e	4.3 f-g	8.7 b-h	24.3 ab	37.2 a-e	19.1 b-h	81.6 ij	46.9 d-i	31.8 c-f	26.0 g-k
GECE-16	72.8 c-f	5.1 b-g	10.4 a-h	20.4 d	35.5 a-e	16.2 g-j	77.7 i-k	49.0 b-d	31.0 d-g	24.0 i-l
GECE-17	76.8 c-e	4.7 d-g	9.6 a-h	22.6 a-d	34.4 c-e	14.9 h-k	80.7 ij	47.1 c-h	32.4 b-f	26.2 g-k
GECE-18	70.0 d-f	4.8 d-g	7.8 d-h	23.5 a-d	35.1 b-e	21.3 a-f	103.6 e-i	46.2 d-k	32.5 b-f	33.6 d-g
GECE-19	74.5 c-f	7.1 a-d	8.9 b-h	23.1 a-d	38.2 a-d	16.9 e-j	91.9 g-i	46.5 d-j	31.1 d-g	28.5 f-j
GECE-20	79.8 cd	4.7 d-g	7.5 e-h	24.8 a	38.9 a-c	21.4 a-f	98.8 f-i	47.4 b-h	31.7 c-f	31.4 d-j
Balcı	67.7 ef	5.3 a-g	10.4 a-h	24.7 ab	38.6 a-d	21.7 a-d	114.2 d-g	45.2 f-k	34.0 a-c	38.8 cd
Centennial	78.5 cd	6.5 a-f	14.4 a	22.6 a-d	33.6 d-e	14.0 i-k	55.7 k	43.7 i-k	34.1 a-c	19.0 kl
Dinçer 5-18-1	79.8 cd	5.5 a-g	11.9 a-h	23.0 a-d	38.8 a-d	23.4 ab	232.8 a	49.4 b-d	29.0 g	67.4 a
Gelendost-2	100.7 a	6.0 a-g	12.9 a-f	21.3 b-d	37.0 a-e	16.8 f-j	92.7 f-i	56.2 a	25.1 h	23.2 i-l
Linas	91.7 b	4.7 d-g	9.5 a-h	23.7 a-d	40.4 a	14.1 i-k	65.2 jk	43.2 k	35.1 ab	22.9 j-l
Montola 2000	78.2 c-e	6.7 a-e	13.6 a-c	23.5 a-d	39.6 a-c	20.1 a-g	175.7 c	50.3 bc	30.1 f-g	52.7 b
Olas	72.3 c-f	5.5 a-g	10.2 a-h	22.8 a-d	40.0 ab	20.2 a-g	89.0 g-j	43.3 jk	35.4 a	31.5 d-i
Remzibey-05	74.3 c-f	6.0 a-g	12.6 a-g	23.8 a-c	37.4 a-e	24.5 a	201.3 b	50.5 b	30.4 e-g	61.2 a
W6 9822	64.7 f	7.6 a-c	13.5 a-d	20.9 c-d	40.3 a	17.8 c-i	84.6 h-j	48.2 b-g	30.6 d-g	26.0 g-k

*:P<0.05, **: P<0.01, 1: Aynı harflere sahip ortalamalar arasında farklılık bulunmamaktadır.

Aspirde 1000 tane ağırlığı yüksek kalıtım derecesi gösteren bir özellik olması nedeniyle, 1000 tane ağırlığına göre yapılacak seleksiyonlarda yüksek tohum verimine sahip tiplerin seçilmesine dolaylı olarak katkı sağlayacaktır [10]. İdeal verim için aspirde 1000 tane ağırlığının 50 g'ın üzerinde olması gerektiği rapor edilmektedir [9]. Çalışmamızda 1000 tane ağırlığı GEMO popülasyonunda 3 hat (4, 12, 28 nolu) en yüksek 1000 tane ağırlığına sahip iken, Centennial çeşidi ile 6 hat (7, 8, 14, 17, 18, 26 nolu) en düşük ağırlığına sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2). GEW6 popülasyonunda ise GEW6-1 (51.0 g) en yüksek 1000 tane ağırlığına sahip iken, 6 hat (2, 4, 8, 12, 16, 18 nolu) en düşük 1000 tane ağırlığına sahiptir (Tablo 3). GECE popülasyonunda ise Linas ve W6 9822 genotipleri en yüksek 1000 tane ağırlığına sahip iken 15 hat ve Centennial hariç diğer standart genotipler aynı istatistiksel grupta yer almışlardır (Tablo 4). GECE-13 (33.0 g) ise en düşük 1000 tane ağırlığına sahiptir. Çalışmamızda 50 g'ın üzerinde GEW6-1 hattı bu sınırın üzerinde bir değer (51.0 g) vermiştir. Ülkemizde ve dünyada yapılan çalışmalarda aspir genotiplerinde 1000 tane ağırlığı 17.8-54.0 g arasında geniş bir varyasyon gösterdiği belirlenmiştir [14-17].

Hasat indeksi diğer bitkilerde olduğu gibi aspirde de önemli ıslah amaçlarından birisidir. Çalışmamızda GEMO popülasyonunda 3 hat (13, 16 ve 21 nolu) en yüksek hasat indeksine sahip iken, Centennial çeşidi ile GEMO-26 hattı en düşük hasat indeksine sahiptir (Tablo 2). GEW6 popülasyonunda Remzibey-05 çeşidi ile 2 hat (1 ve 20 nolu) en yüksek hasat indeksine sahip iken, bunları Dinçer 5-18-1, GEW6-7, 13, 10, 8, 19, 14 ve Balcı genotipleri takip etmiştir (Tablo 3). GECE popülasyonunda ise Remzibey-05 (% 24.5), Dinçer 5-18-1 (% 23.4), GECE-6, (% 22.2), Balcı (% 21.7) GECE-3 (% 21.5), 20 (%21.4), 18 (% 21.3), Olas (% 20.2) ve Montola 2000 (% 20.1) çeşidi en yüksek hasat indeksine, GECE-13 (% 11.3) ise en düşük hasat indeksine sahiptir (Tablo 4). Aspirde hasat indeksinin kalıtımında eklemeli etkili allellerin daha etkin rol aldığı ve hasat değerinin yükseltilmesinde çevre faktörlerinin etkisinin önemli düzeyde olduğu rapor edilmektedir [15]. Aspirde hasat indeksi ile ilgili araştırmacılar tarafından farklı sonuçlar alınmıştır. Lakshmi Prayaga vd. [20] aspirde hasat indeksinin %5.0-36.0 ve Parameshwar [21] % 22.5-37.5 arasında değiştiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile uyumlu bulunmuştur.

GEMO melez hatlarında tohum verimi 55.7-252.6 kg/da, GEW6 melez hatlarında 30.2-232.8 kg/da ve GECE melez hatlarında 54.8-232.8 kg/da arasında değişim göstermiştir. GEMO popülasyonunda Dinçer 5-18-1 çeşidi ve 7 hat (6, 10, 14, 17, 19, 21 ve 27 nolu) en yüksek tohum verimine sahip iken, Centennial (55.7 kg/da) çeşidi en düşük tohum verimine; GEW6 popülasyonunda Dinçer 5-18-1 (232.8 kg/da) çeşidi en yüksek tohum verimine sahip

iken, GEW6-11 (30.2 kg/da) en düşük tohum verimine; GECE popülasyonunda Dinçer 5-18-1 (232.8 kg/da) çeşidi en yüksek tohum verimine, Centennial (55.7 kg/da) çeşidi ve GECE-13 (54.8 kg/da) hattı ise en düşük tohum verimine sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2, 3, 4). Aspirde tohum veriminin kalıtımında eklemeli etkiye sahip birçok gen etkili olduğu için düşük bir kalıtım derecesi göstermektedir [9, 15]. Bu nedenle iklim, toprak ve genetik faktörlere bağlı farklı tohum verimleri elde edilebilir. Dünyada kurak koşullarda aspiden 40-170 kg/da tohum verimi elde edilirken, uygun toprak ve iklim koşullarında verim 300 kg/da'a kadar yükselebilmektedir [9]. Çalışmamızda elde edilen verim değerleri 170 kg'ın üzerinde olan GEMO popülasyonunda 16 hat, GEW6 popülasyonunda 2 hat bulunmasına rağmen, GECE popülasyonunda bu değerler üzerine hat bulunmamaktadır. Yapılan diğer çalışmalarda aspiden tohum veriminin 6.9-343.4 kg/da arasında değiştiği rapor edilmektedir [14-17, 22].

GEMO popülasyonunda kabuk oranı % 43.2-57.9, GEW6'da % 43.2-56.2 ve GECE'de % 43.2-56.2 arasında değişim göstermiştir. GEMO popülasyonunda Gelendost-2 ve GEMO-12 hatları en yüksek kabuk oranına sahip iken, Olas ve Linas çeşitleri en düşük kabuk oranına sahiptir. GEW6 popülasyonunda Dinçer 5-18-1 (232.8 kg/da) çeşidi en yüksek kabuk oranına sahip iken, GEW6-11 (30.2 kg/da) en düşük kabuk oranına sahiptir. GECE popülasyonunda Olas ve Linas çeşitleri en yüksek kabuk oranına, Linas çeşidi ise en düşük kabuk oranına sahiptir. GEMO popülasyonunda 5 hat (1, 19, 20, 25 ve 26 nolu), GEW6 popülasyonunda 4 hat (9, 16, 17 ve 20 nolu) ve GECE popülasyonunda ise 8 hat (2, 4, 6, 8, 9, 12, 14 ve 18 nolu) istatistiksel olarak en düşük kabuk oranına sahip grupta yer almışlardır (Tablo 2, 3, 4). Aspirde kabuk kalınlığını kontrol eden genler pleotropik etki göstererek, aynı zamanda sap hücrelerinde sekonder duvar kalınlığını ve çiçekte anter kapalılığını (yapısal kısırlık) kontrol ettiği için, ince tohum kabuklu bitkiler daha zayıf saplı ve düşük fertiliteye sahiptirler [9]. Bu yüzden aspir ıslahçıları tohum verimi ve yağ oranını etkilemeyecek düzeyde minimum kabuk oranına sahip aspir genotiplerini geliştirmeye çalışmaktadır. Yapılan çalışmalarda Weiss [9] % 35-50 ve Reddy vd. [16] % 39.5-50.8 arasında değiştiğini rapor etmiştir. Çalışmamızda popülasyonlarda elde edilen kabuk oranı varyasyonu yukarıda belirtilen araştırmaların varyasyonu ile benzerlik göstermiş ancak düşük kabuk oranına sahip genotip elde edilememiştir.

Popülasyonların yağ oranı incelendiğinde bütün popülasyonlarda Olas çeşidi en yüksek (% 35.4), Gelendost-2 hattı en düşük (% 25.1) yağ oranına sahip olduğu tespit edilmiştir. Ancak GEMO popülasyonunda GEMO-1, 20, 24, 25, 28 hatları, GEW6'da GEW6-11, 12, 16, 20 hatları, GECE popülasyonunda GECE-3, 4, 6, 7, 8, 9 ve 10 nolu hatlar

Olas çeşidi ile aynı istatistiksel grupta yer almıştır (Tablo 2, 3, 4). Asperde yağ oranının az sayıda eklemeli etkiye sahip alleller tarafından kontrol edildiği, dolayısıyla orta ve yüksek oranda kalıtım derecesine sahip olduğu araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır [11]. Bu nedenle, aspir hatlarında belirlenen yağ oranının olası bir yabancı dölleme olmadığı takdirde sonraki generasyonlara aktarılabılır ve seleksiyonda başarı şansı artabilir. Çalışmamızda Olas çeşidinden yüksek yağ oranına sahip hatlar olmamasına rağmen, istatistiksel olarak aynı grupta yer alan hatlar ümitvar görülmektedir. Yapılan birçok araştırmada asperde yağ oranı bakımından benzer varyasyonlar yakalansa da farklı sonuçlar elde edilmiştir. Fernandez-Martinez vd. [23] 37 ülkeden topladıkları 200 aspir genotipinde yağ oranının % 20.1-40.0, Johnson vd. [24] 137 introduksiyon materyalinde yağ oranının % 13.0-46.0, Reddy vd. [16] % 27.8-31.6 ve Erbaş vd. [24] 39 aspir çeşidinde % 22.6-33.8 arasında değiştiğini rapor etmişlerdir.

Yağ verimi GEMO popülasyonunda 19.0-77.2 kg/da arasında değişirken, en yüksek yağ verimi GEMO-2, 6, 10, 14, 16, 17, 19, 21, 27, 28 nolu hatlar ve Dinçer 5-18-1 çeşidinde, en düşük ise Centennial çeşidinde tespit edilmiştir (Tablo 2). GEW6 popülasyonunda 10.0-67.4 kg/da arasında değişim gösterirken, Dinçer-5-18-1 ve Remzibey-05 çeşitleri ile GEW6-20 hattı en yüksek, GEW6-11 hattı ise en düşük yağ verimine sahip genotip olarak belirlenmiştir (Tablo 3). GECE popülasyonunda ise yağ verimi 17.1-67.4 kg/da arasında değişmiş ve en yüksek yağ verimi Dinçer-5-18-1 ve Remzibey-05 çeşitlerinde, en düşük ise GECE-13 hattında saptanmıştır (Tablo 4). Asperde yağ verimi değişen çevre koşullarından kolaylıkla etkilenmediği rapor edilmektedir [15]. Yapılan çalışmalarda asperde yağ verimi için geniş bir varyasyon elde edilmiş [16, 25], sonuçlarımız bu sınırlar arasında yer almıştır. Çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlara bakıldığında bütün özellikler bakımından diğer araştırmacıların çalışmaları ile farklılıklar gösterebileceği, bu farklılığın kullanılan genotiplerin ve iklim koşullarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Aspir hat ve çeşitlerinin yağ asitleri kompozisyonu sonuçları Tablo 5'te verilmiştir. Palmitik asit oranı GEMO popülasyonunda % 4.6 (GEMO-24) ile % 9.2 (GEMO-18), GEW6'da % 5.2 (GEW6-10) ile % 10.1 (GEW6-6) ve GECE'de % 6.2 (GECE-19) ile % 8.6 (GECE-16) arasında değişirken, stearik asit oranı sırasıyla % 1.5 (GEMO-19, 26, 27)-3.1 (GEMO-18), % 1.8 (GEW6-6, 8, 12)-3.2 (GEW6-19) ve % 1.8 (GECE-14)-3.3 (GECE-2) arasında varyasyon göstermiştir. Oleik asit oranı en yüksek GEMO popülasyonunda % 76.0 GEMO-3 ve 23 nolu hatlarda tespit edilmiş ve GEMO popülasyonunda % 70'in üzerinde oleik asit içeren 3 adet hat belirlenmiştir. Ancak GEW6 popülasyonunda 2 adet hat (GEW6-15 ve 18) % 45-

60 arasında orta oleik asit grubunda yer aldığı görülmektedir. GECE hatlarının ana ve baba ebeveynleri yüksek linoleik tipi olduğu için popülasyonda bulunan hatlar yüksek linoleik asit içeriğine sahip olmuş ve ancak 6 hat (GECE-8, 9, 10, 12, 18, 19 ve 20) kontrol genotiplerinden daha yüksek linoleik asit içeriği vermiştir. Yapılan araştırmalarda asperde yağ asitleri bakımından oldukça geniş varyasyonlar elde edilmiştir. Fernandez-Martinez vd. [23] 37 ülkeden topladıkları 200 farklı aspir genotipinin oleik ve linoleik asit içerikleri önemli farklılıklar göstermiş ve bu yağ asitlerinin oranları sırasıyla % 3.1-90.6 ve % 3.9-88.8 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Valesco ve Fernandez-Martinez [27] ABD aspir koleksiyonundan 132 ekotipinde ortalama % 5.8 palmitik asit (% 3.4-10.2), % 2.2 stearik asit (% 0.8-9.9), % 26.2 oleik asit (% 5.6-86.9) ve % 65.9 linoleik asit (% 7.1-88.7) içerdiğini belirlemişlerdir. Arslan ve Culpun [28] USDA (United States Department of Agriculture) koleksiyonundan 39 aspir genotipinde oleik asidin %13.97-74.74 ve linoleik asidin %12.21-69.83 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Johnson vd. [24] tarafından 797 aspir introduksiyon materyalinde palmitik asidin % 3.9-6.8, stearik asidin % 1.1-4.5, oleik asidin % 6.2-81.9 ve linoleik asidin % 11.0-83.1 arasında değiştiğini rapor etmişlerdir. Erbaş [13] 64 aspir hattında % 5.43-9.18 palmitik asit, % 1.98-4.15 stearik asit, % 12.33-76.50 oleik asit ve % 13.17-75.06 linoleik asit varyasyonu olduğunu rapor etmiştir. Elde edilen sonuçlarımız yukarıda belirtilen araştırmacıların sonuçları ile uyum göstermiş ve belirtilen varyasyon sınırları içerisinde yer almıştır.

4. Sonuç

Sonuç olarak, 1000 tane ağırlığı, tohum verimi, yağ oranı ve yağ verimi özelliklerinin sırasıyla 30.2-51.0 g, 30.2-252.6 kg/da, %25.1-35.4 ve 10.0-77.2 kg/da arasında değiştiği görülmüştür. GECE-11 ve 12 nolu hatların 1000 tane ağırlığı, GEMO-10 ve 19 nolu hatların tohum verimi, GEMO-1, 20, 28, GEW6-16, 20 ve GECE-4, 8, 9, 12 nolu hatların yağ oranı, GEMO-10, 19, 28 ve GEW6-20 nolu hatların ise yağ verimi açısından ebeveynler ve diğer standart çeşitlere göre daha üstün oldukları tespit edilmiştir. 4 adet verim tipi (GECE-11, 12 ve GEMO-10,19), 11 adet yağ tipi (GEMO-1, 10, 19, 20, 28, GEW6-16, 20 ve GECE-4, 8, 9, 12), 2 adet oleik tipi (GEMO-3 ve GEMO-23), 1 adet linoleik tipi (GECE-7) olmak üzere toplam 15 hat bir sonraki generasyona aktarılmıştır.

Teşekkür

Bu çalışma Ali ŞENATES'in yüksek lisans tezinden türetilmiştir. Araştırmaya destek sağlayan (SDU BAP 4949-YL1-17) Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederiz.

Tablo 5. Çeşitler ve hatların yağ asitleri kompozisyonu

Çeşitler														
	C16:0				C18:0				C18:1				C18:2	
Dinçer 5-18-1	6.6				1.8				10.0				81.2	
W6 9822	4.8				1.7				71.8				21.2	
Remzibey-05	6.2				1.9				23.4				68.1	
Linas	5.8				2.1				39.2				52.4	
Olas	6.5				2.1				29.3				61.5	
Balcı	6.1				2.0				34.5				57.2	
Montola	6.2				2.2				69.2				21.9	
Gelendost-2	6.5				2.4				11.6				78.9	
Centennial	6.8				1.9				11.3				79.7	
Hatlar														
GEMO					GEW6					GECE				
Hat	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	Hat	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	Hat	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
GEMO-1	6.9	2.5	13.9	76.7	GEW6-1	6.5	2.5	11.3	79.7	GECE-1	7.7	2.6	10.7	79.0
GEMO-2	8.8	2.3	9.0	79.9	GEW6-2	7.0	2.0	16.6	74.5	GECE-2	7.2	3.3	10.6	78.9
GEMO-3	6.0	2.4	76.0	15.7	GEW6-3	7.1	2.3	21.4	69.3	GECE-3	7.7	2.8	10.9	78.7
GEMO-4	6.3	2.2	26.1	66.0	GEW6-4	6.5	2.7	25.8	62.2	GECE-4	6.7	2.2	10.0	81.1
GEMO-5	6.4	2.1	10.5	81.0	GEW6-5	5.8	1.9	15.3	74.7	GECE-5	7.1	2.1	11.2	79.6
GEMO-6	7.4	2.1	15.2	75.3	GEW6-6	10.1	1.8	8.9	79.1	GECE-6	7.3	2.2	10.7	79.8
GEMO-7	6.3	2.2	9.0	82.5	GEW6-7	9.5	2.0	11.5	77.0	GECE-7	7.1	2.4	10.3	80.2
GEMO-8	7.5	2.6	8.8	81.1	GEW6-8	6.4	1.8	16.5	75.3	GECE-8	6.3	1.9	9.1	82.7
GEMO-9	8.2	2.1	9.8	79.9	GEW6-9	10.0	2.0	10.3	77.6	GECE-9	6.8	2.5	9.3	81.4
GEMO-10	6.9	2.1	20.5	71.0	GEW6-10	5.2	2.4	11.8	77.8	GECE-10	7.0	2.1	9.4	81.5
GEMO-11	6.1	1.9	8.8	83.2	GEW6-11	6.9	2.6	9.8	73.4	GECE-11	6.3	2.9	11.1	79.7
GEMO-12	7.9	2.2	10.4	79.5	GEW6-12	5.5	1.8	10.9	79.3	GECE-12	6.6	2.4	9.0	81.9
GEMO-13	6.5	2.3	14.2	74.8	GEW6-13	7.3	2.1	10.7	79.9	GECE-13	6.8	2.0	10.2	81.0
GEMO-14	8.7	2.0	8.7	80.6	GEW6-14	7.9	3.2	13.2	73.8	GECE-14	7.2	1.8	9.9	81.2
GEMO-15	7.6	2.1	10.5	79.8	GEW6-15	5.8	0.7	45.7	47.7	GECE-15	7.5	2.2	9.7	80.7
GEMO-16	7.4	2.3	9.6	80.7	GEW6-16	6.5	2.3	10.8	79.6	GECE-16	8.6	2.2	8.8	80.4
GEMO-17	7.9	2.0	9.0	81.1	GEW6-17	6.9	2.2	8.7	82.2	GECE-17	6.5	2.3	10.4	80.8
GEMO-18	9.2	3.1	9.8	77.9	GEW6-18	7.4	1.9	58.7	32.0	GECE-18	6.9	2.2	9.6	81.3
GEMO-19	5.3	1.5	65.7	27.4	GEW6-19	7.3	3.2	9.6	79.9	GECE-19	6.2	2.2	9.1	82.5
GEMO-20	6.8	2.8	13.4	77.1	GEW6-20	6.5	2.6	9.0	81.9	GECE-20	6.6	2.3	9.2	81.9
GEMO-21	6.2	2.3	30.5	61.1										
GEMO-22	6.7	2.2	10.4	80.7										
GEMO-23	4.9	2.0	76.0	17.1										
GEMO-24	4.6	2.3	74.2	18.9										
GEMO-25	6.2	1.7	30.8	61.3										
GEMO-26	7.9	1.5	7.3	83.3										
GEMO-27	5.4	1.5	7.9	79.6										
GEMO-28	6.2	2.8	30.8	60.3										

Kaynakça

- [1] Anonim, 2019a. <http://www.bysd.org.tr/DisTicaretRakamlari/>(Erişim tarihi: 20.06.2019).
- [2] Erbaş, S., Baydar, H. 2007. Aspirde (*Carthamus tinctorius* L.) Sentetik Erkek Kısırlık Tekniği ile Elde Edilmiş Melez Popülasyonlardan Hat Geliştirme Olanakları, 7. Tarla Bitkileri Kongresi, 25-27 Haziran, Erzurum, 370-374.
- [3] Emongor, V.E., Oarabil, P., Phuduhudud, O. 2017. Effects of Genotype on Vegetative Growth, Yield Components and Yield, Oil Content and Oil Yield of Safflower. *Agricultural Science Research Journal*, 7(12), 381-392.
- [4] Baydar, H., Erbaş, S. 2016. Aspir (*Carthamus tinctorius* L.)'de Verim, Yağ ve Oleik Asit İçeriği Yüksek Hat Geliştirme Islahı Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 25 (Özel sayı-2), 155-161.
- [5] Rowell, D.L. 1996. *Soil Science: Methods and Applications*. Longman. London.
- [6] AOAC, 2005. *Official method of Analysis*. 18th Edition, Association of Officiating Analytical Chemists, Washington DC.
- [7] SAS Institute. 1998. *INC SAS/STAT User's Guide Release 7.0*, Cary, NC, USA.
- [8] Anonim, 2019b. Meteoroloji Genel Müdürlüğü.
- [9] Weiss, E.A., 2000. *Oilseed Crops*, (2nd Edition), Blackwell Sci. Ltd., Victoria, Australia.
- [10] Pahlavani, M.H., Saeidi, G., Mirlohi, A.F. 2007. Genetic Analysis of Seed Yield and Oil Content in Safflower Using F₁ and F₂ Progenies of Diallel Crosses. *International Journal of Plant Production*, 2, 129-140.

- [11] Ramachandram, M., Goud, J.V. 1981. Genetic Analysis of Seed Yield, Oil Content and Their Components in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Theor. Appl. Genet., 60, 191-195.
- [12] Alizadeh, K. 2005. Evaluation of Safflower Germplasm by Some Agronomic Characteristics and Their Relationships on Grain Yield Production in the Cold Dry Land of Iran. International Journal of Agriculture & Biology, 7(3), 389-391.
- [13] Polat, T. 2007. Farklı sıra aralıklarının ve azot seviyelerinin kuru şartlarda yetiştirilen aspir (*Carthamus tinctorius* L.) bitkisinin verim ve verim unsurları üzerine etkisi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 155s, Erzurum.
- [14] Paşa, C., Esenal, E., Arslan, B. 2009. Kışlık ve Yazlık Ekimin Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Bitkisinin Verimi ve Bitkisel Özelliklerine Etkisi Türkiye VIII. Tarla Bitkileri Kongresi, 19-22 Ekim, Hatay, 168-171.
- [15] Erbaş, S. 2012. Melezleme ıslahı ile tohum verimi, yağ ve oleik asit içeriği yüksek aspir (*Carthamus tinctorius* L.) hatlarının geliştirilmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 132s, Isparta.
- [16] Reddy, M.V.S., Chand, P., Vidyadhar, B., Devi, I.S.L. 2004. Estimation of Genetic Parameters for Yield and Its Component in F₄ Generation of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Prog. Agric., 4(1), 16-18.
- [17] Erbaş, S. 2007. Aspirde (*Carthamus tinctorius* L.) sentetik erkek kısırılığı tekniği ile elde edilmiş melez populasyonlarından hat geliştirme olanakları. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 94s, Isparta.
- [18] Safevi, S.A., Pourdad, S.S., Safavi, S.M., Safavi, A.S. 2011. Heritability and Genetic Gain of Some Morphological Traits in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). American Journal of Scientific Research, 17, 14-18.
- [19] Çelikoğlu, F. 2004. Eskişehir Koşullarında Geliştirilen Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Hatlarında Verim Kriterlerinin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 76s, Ankara.
- [20] Lakshmi Prayaga, P., Lakshamma, P., Padmavathi, P., 2003. Characterization of Safflower Germplasm for Physiological Traits. Sesame and Safflower Newsletter, 18, 90-92.
- [21] Parameshwar, K.B. 2009. Stability of Non-Spiny Breeding Lines in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Dharwad University of Agricultural Sciences, Master Thesis, 92s, India.
- [22] Arslan, B., Culpan, E. 2017. Effects of Different Gibberellic Acid Doses on Seed Yield, Oil Content and Some Quality Traits of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Journal of Global Innovations in Agricultural and Social Sciences, 5(1), 5-9.
- [23] Fernandez-Martinez, J., Del Rio, M., De Haro, A. 1993. Survey of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Germplasm for Variants in Fatty Acid Composition and Seed Characters. Euphytica, 69, 115-122.
- [24] Johnson, R.C., Bergman, J.W., Flynn, C.R. 1999. Oil and Meal Characteristics of Core and Non-Core Safflower Accessions from the USDA Collection. Genet. Res. Crop Evol., 46, 611-618.
- [25] Erbaş, S., Tonguç, M., Şanlı, A. 2016. Variations in the Agronomic and Quality Characteristics of Domestic and Foreign Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Genotypes. Turk J. Field Crops, 21(1), 110-119.
- [26] Kılıç, F., Ermiş, H. 2009. Kahramanmaraş Koşullarında Farklı Miktarlarda ve Zamanlarda Uygulanan Azotun Aspir (*Carthamus tinctorius* L.)'de Tohum Verimi, Verim Unsurları ve Tohumun Makro-Mikro Element İçeriğine Etkisi. Türkiye VIII. Tarla Bitkileri Kongresi, 19-22 Ekim, Hatay, 107-110.
- [27] Valesco, L., Fernandez-Martinez, J.M. 1999. Screening for Low Saturated Fatty Acids in Safflower. Sesame and Safflower Newsletter, Cordoba, Spain.
- [28] Arslan, B., Culpan, E. 2018. Identification of Suitable Safflower Genotypes for the Development of New Cultivars with High Seed Yield, Oil Content and Oil Quality. Azarian Journal of Agriculture, 5 (5), 133-141.

Karbon Katı Asit Katalizör ile Atık Biyokütle Kaynaklarından 5-Hidroksimetilfurfural Eldesi

Burçak KAYA ÖZSEL*¹ 

¹Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Kimya Bölümü, 16310, Bursa, Türkiye

(Alınış / Received: 12.11.2019, Kabul / Accepted: 18.02.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Anahtar Kelimeler

Biyokütle,
Karbon katı asit katalizör,
5-Hidroksimetilfurfural

Özet: Bu çalışmada, buğday samanı biyokütlesinden hidrotermal karbonizasyon yöntemi ile biyokütle türevli karbon katı asit katalizör (BH250S) elde edilmiş, katalizörün atık biyokütle kaynaklarından 5-Hidroksimetilfurfural (5-HMF) sentezi aktivitesi belirlenen optimum koşullarda sulu reaksiyon ortamında ticari katalizör (Amberlyst-15) ile kıyaslanmıştır. Katalizörün karakterizasyon çalışması elemental analiz, BET, SEM ve XRD analizleri yapılarak tamamlanmıştır. Atık biyokütle olarak mısır samanı, hav, linter, model bileşik olarak ise mikrokristalin selüloz kullanılmış, 5-HMF'ye dönüşüm verimleri kıyaslandığında mısır samanı, hav ve mikrokristalin selüloz için BH250S katalizörünün aktivitesinin ticari katalizörden daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Gram biyokütle başına en yüksek 5-HMF miktarı 14,2 mg olarak BH250S katalizörü ile model bileşik mikrokristalin selülozun dönüşümünden elde edilirken, ekonomik değeri olmayan atık biyokütle havdan elde edilen değer 12,5 mg' dır. Çalışma sonucunda ekonomik değeri düşük atık lignoselülozik/selülozik biyokütle materyalleri değerlendirilmiş, çevreye dost, sürdürülebilir ve ucuz katalitik yolla 5-HMF eldesi sağlanmıştır.

Synthesis of 5-Hydroxymethylfurfural from Waste Biomass Feedstocks Using Carbon Solid Acid Catalyst

Keywords

Biomass,
Carbon solid acid catalyst,
5-Hydroxymethylfurfural

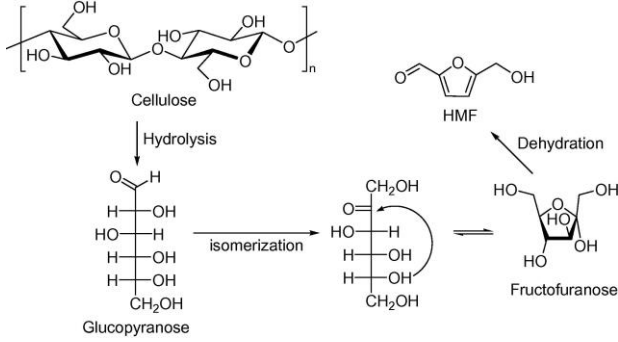
Abstract: In this study biomass derived carbon solid acid catalyst (BH250S) was obtained by hydrothermal carbonization method from wheat straw, 5-HMF synthesis activity of the catalyst from waste biomass sources in optimum conditions was determined and compared with commercial catalyst (Amberlyst-15). Characterization of the catalyst was completed by elemental analysis, BET, SEM and XRD analysis. Corn straw, fluff and linter were used as waste biomass, microcrystalline cellulose was used as a model compound and conversion efficiency to 5-HMF was found to be higher than that of commercial catalyst for BH250S for corn straw, fluff and microcrystalline cellulose. The highest amount of 5-HMF per gram biomass was obtained from the conversion of model compound microcrystalline cellulose with BH250S catalyst was 14.2 mg while the value obtained from economically non-useful waste fluff was 12.5 mg. As a result of this study, waste lignocellulosic/cellulosic biomass materials with low economic value were evaluated and 5-HMF was obtained by a eco-friendly, sustainable and cheap catalytic method.

1. Giriş

Son yıllarda fosil kaynakların tükenmek üzere oluşu ve çevreye verdiği zararlar nedeniyle biyokütleden yakıt ve çeşitli değerli kimyasalların eldesine ilişkin prosesler son derece önem kazanmıştır. Biyokütle kaynakları içerisinde lignoselülozik/selülozik biyokütle olarak adlandırdığımız (tarımsal atıklar,

enerji bitkileri, orman atıkları vb. kaynaklar) grup bol bulunma ve çevre dostu olma özelliği, gıda maddesi olarak insanlar tarafından tüketilmeyenler sınıfına girmeleri, atmosferdeki sera gazı artışına katkıda bulunmayışları gibi özelliklerinden dolayı enerji ve değerli kimyasal ürün eldesi alanında değerlendirilme açısından oldukça cazip görünmektedir.

'Uyuyan Dev' olarak adlandırılan 5-hidroksimetilfurfural (5-HMF) biyokütle türevli değerli kimyasallardan biri olup, monosakkarit (fruktoz, glukoz) ve disakaritlerin (sukroz, sellobioz) katalizörlü ortamda hidroliz, izomerasyon ve dehidrasyonu (Şekil 1) ile elde edilebilmekte, birçok önemli yeni nesil biyopolimer ve biyoyakıt eldesi için öncü bileşik olarak kullanılmaktadır [1].



Şekil 1. Selülozik yapının 5-HMF'ye dönüşümü [2].

Örneğin; 5-hidroksimetilfurfuralın (5-HMF) oksitlenmesi sonucu elde edilen 2,5-furandikarboksilik asit (FDCA), etilen glikol ile reaksiyona sokularak polietilen tereftalata (PET) alternatif yeni nesil bir biyopolimer olan polietilen furanoatın (PEF) sentezinde kullanılmaktadır. PEF, günümüzde yaygın olarak kullanılan petrol bazlı ambalaj malzemelerine kıyasla üstün performans özelliklerine sahip, %100 geri dönüştürülebilir, tamamen yenilenebilir biyokütle kaynaklarından elde edilen bitki-bazlı bir plastiktir [3]. Etil levulinat (EL) ise 5-hidroksimetilfurfuralın (5-HMF) asit katalizli hidrasyonu ile oluşan levulinik asidin esterleşmesi ile elde edilen ve günümüzde dizel yakıtta %5'e kadar katkı maddesi olarak eklenen bir kimyasaldır. Dizel yakıtlara eklendiğinde temiz yanma özelliği, kayganlık ve parlama noktası kararlılığı kazandırır ve viskoziteyi artırır [4]. 5-hidroksimetilfurfuralın (5-HMF) asit katalizli hidrasyonu ile oluşan levulinik asidin hidrojenasyonu ile elde edilen gamma-valerolakton (GVL) ise hem yakıt katkısı hem de yeni nesil çevreci çözücü olarak kullanılabilen ve metiltetrahidrofuran, 1,4-pentandiol vb. birçok farklı kimyasalın sentezi için kullanılabilen öncü bir bileşiktir [5].

5-hidroksimetilfurfuralın yapısındaki hidroksil ve aldehit fonksiyonel grupları ve furan halkasının varlığı daha büyük ve önemli moleküllerin sentezi açısından bu yapıyı avantajlı hale getirmektedir. Karbonhidratların 5-HMF dönüşümünü sağlamaya yönelik çalışmalarda kullanılan katalizörler ve biyokütle çeşidi verimi etkileyen parametrelerin başında gelir. Dönüşüm proseslerinde reaksiyon ortamından kolay ayrımı, çevre dostu olması ve tekrar tekrar kullanılabilirliği açısından heterojen katı asit katalizörlerle daha çok tercih edilmekte ve son yıllarda özellikle biyokütle türevli karbon-bazlı katı asit katalizörlerin 5-HMF dönüşüm prosesinde kullanımı ön plana çıkmaktadır. Karbon katı asit katalizörler literatürde genellikle

selüloz, glikoz vb. saf bileşiklerden yüksek sıcaklıkta yarı karbonizasyon sonrası sülfolama metodu ile elde edilmektedir [6,7].

Bu çalışmada ise sert karbonizasyon koşulları ve zararlı gazların emisyonu nedeniyle çok çevreci ve sürdürülebilir olmayan bu karbonizasyon prosesi yerine, yine ılımlı sıcaklıkta gerçekleştirilen hidrotermal karbonizasyon uygulanarak gerçek biyokütle olan buğday samanından biyokütle türevli sülfolanmış karbon katı asit katalizör (BH250S) elde edilmiş, katalizörün aktivitesi belirlenen optimum koşullarda sulu reaksiyon ortamında ticari katalizör (Amberlyst-15) ile kıyaslanmıştır. Atık ve dolayısıyla ucuz lignoselülozik biyokütle kaynağı olarak buğday ve mısır samanı; selülozik biyokütle olarak ise linter ve hav kullanılmıştır. Havlar tekstilde pamuklu kumaş ön terbiye işlemleri sırasında atık olarak ortaya çıkan, ekonomik değeri olmayan selüloz esaslı kısa liflerdir. Selüloz içeriği yüksek linter ise pamuk bitkisini işleyen fabrikalarda (çırçır, yağ fabrikaları vb.) pamuk tohumundan işlenmeyen yan ürün olarak elde edilmektedir. Mısır ve buğday samanı ise dünyada en bol bulunan ve tarım atığı olarak değerlendirilebilen yenilenebilir biyokütle kaynaklarının başında gelmektedir. Ülkemizin bir tarım ülkesi olduğu düşünüldüğünde bu çalışma endüstriyel ve tarımsal bu ve benzeri katı atıkların ucuz hammadde olarak değerlendirilmesi ve geri dönüşümüne de olanak sağlayacaktır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Materyal

Çalışmada kullanılan buğday samanı ve mısır samanı Adana'daki lokal satış noktalarından; linter ER-MO Pamuk İhracat, İthalat Tic. Ltd. Şti. (Adana) firmasından; hav ise Bursa'daki çeşitli tekstil firmalarından temin edilmiştir. Biyokütle materyallerinin nem ve kül, selüloz, hemiselüloz ve lignin içerikleri belirlenmiştir. Saf mikrokristalin selüloz dönüşüm deneylerinde gerçek biyoküteller ile karşılaştırma amacıyla kullanılmıştır.

2.2. Biyokütle türevli karbon bazlı katı asit katalizörün hazırlanması

Biyokütle türevli karbon bazlı sülfolanmış katı asit katalizörlerin hazırlanmasında başlangıç biyokütle materyali olarak lignoselülozik karakterli buğday samanı seçilmiştir. Yöntemde, belirli miktarda buğday samanı deiyonize su ile birlikte reaktöre konmuş, 250°C'de 2 saat hidrotermal otohizoliz ile yarı-karbonizasyona uğratılmıştır. Elde edilen yarı-karbonize yapıdan 1 g alınarak 20 ml derişik sülfirik asitle 150 °C de 16 saat N₂ atmosferinde sülfolanmıştır. Buz banyosu ile oda sıcaklığına soğutulan karışım 1000 ml'ye saf su ile seyreltilip vakumlu süzme düzeneği ile süzümüştür. Nötralizasyon tamamlanincaya ve fazla sülfat iyonu

kalmayınca kadar yıkama işlemi uygulanmıştır. Etüvde bir gece 105±2 °C'de bekletilerek kurutulmuş karbon yapılar kullanıma hazır hale getirilmiştir. Üretilen katı asit katalizör BH250S (B:buğday samanı, H:hidrotermal yarı-karbonizasyon, S:sülfolanmış) şeklinde kodlanmıştır.

2.3. Katı asit katalizörün karakterizasyonu

Katalizörün elementel analizi (C,H,N,S) LECO 628 CHNS cihazı ile gerçekleştirilmiştir. XRD analizleri, PANALYTICAL/Empyran X-Işını Difraktometresi ile 3°/dk tarama hızında ve 2θ= 5-90° aralığında tarama yapılarak elde edilmiştir. Toplam yüzey alanı (BET) ve gözenek boyutu analizi için Micromeritics TriStar II cihazı kullanılmıştır. Katalizörün morfolojik özellikleri ise Zeiss Supra 40VP model taramalı elektron mikroskopunda incelenmiştir.

2.4. Tek-basamaklı katalitik dönüşüm deneyleri ve çözelti analizleri

Tek-basamaklı biyokütle dönüşümlerinde 0,5 g biyokütle, 0,25 g katalizör ve 25 ml deiyonize su batch tipi reaktöre konulmuş, reaktör azot gazı ile purge edilmiş ve 200 °C'de 1 saat sürede katalitik reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon süresi sonunda buz banyosu ile hızlı soğutma uygulanmış ve elde edilen çözelti HPLC (sıvı kromatografisi) analizleri için 2 ml'ye deriştirilerek filtreden geçirilmiştir. 5-HMF miktarlarının tayini ACE C18 kolonda (250 x 4,6 mm) analitik modda, UV dedektörü ile 280 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Analiz, 0,5 ml/dk akış hızı ile 25 °C sıcaklıkta, %0,001 H₃PO₄ çözeltisi ve saf MeOH mobil fazları kullanılarak gradient olarak yapılmıştır. Glikoz miktarları ise InertSustain-NH₂ kolonda (250 x 4,6 mm), refraktif indeks (RI) dedektör ile, 35 °C sıcaklık, 1ml/dk akış hızı, asetonitril/su (3:1, v/v) mobil fazı ile gerçekleştirilmiştir. Analizlerde kantitatif tayin için kalibrasyon eğrilerinin oluşturulmasında 5-HMF ve glikoz standartları kullanılmıştır. Tek-basamaklı dönüşüm reaksiyonlarından sonra başlangıçtaki katı miktarı ve kalan katı biyokütle miktarlarından yola çıkılarak hidroliz verimleri hesaplanmıştır.

3. Bulgular

3.1. Biyokütle materyallerinin karakterizasyon analizleri

Çalışmada kullanılan biyokütle materyallerinin nem yüzdesi ASTM 1983 D-2016-74, kül yüzdesi ise ASTM 1983 D-1102-84 [8] yöntemi kullanarak belirlenmiştir. Lignin oranının belirlenmesi için ASTM 2009 E-1721-01 [9] yöntemi kullanılmış, selüloz içeriği monoetanolamin metodu [10] ile hemiselüloz içeriği ise Sun ve Tomkinson tarafından geliştirilen hemiselüloz izolasyon yöntemi [11] ile belirlenmiştir. Hesaplanan sonuçlar Tablo 1' de

verilmiştir. Lignoselülozik biyoküteller olan buğday ve mısır samanının kül ve nem içerikleri birbirine benzer sonuçlar verirken, selülozik biyoküteller hav ve linterin kül ve nem içeriklerinin nispeten daha düşük olduğu görülmektedir. Linter ve havın kül oranının düşük olması, kül içeriğindeki inorganik elementlerin katalitik dönüşüm basamağında çar oluşumunu azaltıcı yöndeki etkileri düşünüldüğünde dezavantaj olarak düşünülebilir. Biyokütleden farklı değerli kimyasalların elde edildiği proseslerde lignin, selüloz ve hemiselüloz oranları önemlidir. Selüloz içeriğinin daha fazla olması nedeniyle linter etkin hidrolizi halinde mısır samanına göre 5-HMF'ye dönüşüm potansiyeli daha yüksek bir biyokütle kaynağı olarak düşünülebilir. Ayrıca yüksek sıcaklık ve katalizör varlığında gerçekleşecek dönüşüm reaksiyonları düşünüldüğünde lignin gibi aromatik ve karmaşık bir yapıyı içermemesi de başka bir avantajdır.

Tablo 1. Biyokütellerin nem, kül, lignin, selüloz ve hemiselüloz içerikleri

Biyokütle	Nem (%)	Kül (%)	Selüloz (%)	Lignin (%)	Hemiselüloz (%)
Mısır Samanı	8,10 ±0,1	8,06 ±2,0	49,96 ±0,6	15,09 ±0,1	15,30 ±1,1
Buğday Samanı	6,33 ±0,2	6,87 ±1,0	48,13 ±0,1	19,97 ±1,0	24,72 ±2,6
Linter	4,54 ±0,3	2,66 ±0,4	82,20 ±0,8	3,00 ±0,2	4,19 ±0,4
Hav	4,80 ±0,1	1,10 ±0,2	55,11 ±1,3	2,30 ±0,6	21,01 ±0,1

3.2. Biyokütle türevli katı asit katalizörün karakterizasyonu

Hidrotermal yarı-karbonizasyon ve sülfolama işlemi ile buğday samanından elde edilen BH250S katı asit katalizörünün yüzey alanı, gözenek boyut dağılımı analizi ve elementel analiz sonuçları Tablo 2' de verilmiştir.

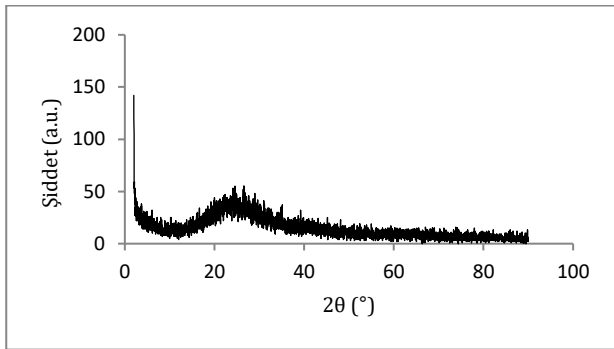
Tablo 2. Katı asit katalizör (BH250S) gözenek boyut dağılımı ve elementel içeriği

Gözenek hacmi (cm ³ /g)	Gözenek boyutu (nm)	SO ₃ H (mmol/g)	S (%)	C (%)	N (%)	H (%)
0,002	5,52	1,70	5,5	50,5	0,5	3,4

SO₃H, COOH, ve OH grupları taşıyan polisiklik aromatik karbon yüzeylerden oluşmuş bir yapıda olan karbon katalizörün yüzey alanının oldukça küçük olduğu görülmektedir. Benzer bir çalışmada Gan ve arkadaşları [12] lignini 240 °C'de 10 saat süre ile hidrotermal yarı-karbonizasyona uğrattıktan sonra sülfürik asit ile sülfolama işlemine tabii tutmuş ve yüzey alanı 0,8 m²/g olan katı asit karbon katalizör elde etmişlerdir. Katalizörü selülozun hidrolizinde kullanmış ve yüksek katalitik aktivite gösterdiğini kaydetmişlerdir. Suganuma ve arkadaşları [13] ise mikrokristalin selülozdan azot atmosferinde 450 °C'de termal yarı-karbonizasyon sonrası sülfolama işlemi ile aktivitesi yüksek karbon katı asit katalizör elde etmiş ve yüzey alanını 2,0 m²/g olarak

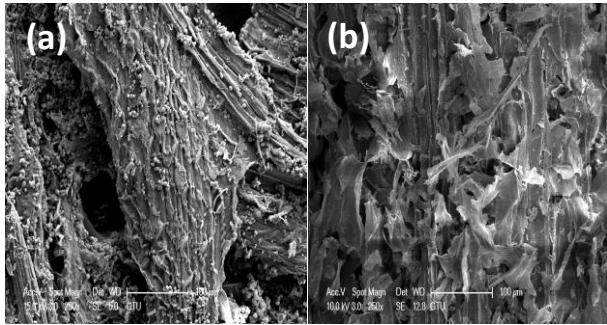
belirlemişlerdir. Dolayısıyla katalizörün yüzey alanının küçük olması literatürden de beklenen bir sonuçtur. Katalizörün yüzey asidik grup (-SO₃H) miktarı elementel analiz sonuçları kullanılarak 1,70 mmol/g olarak hesaplanmıştır. Aynı zamanda elementel analiz sonuçlarına göre sülfolama sonrası, ham biyokütle materyali ile kıyaslandığında BH250S katalizörünün S içeriği % 0,4'ten % 5,5 değerine çıkmıştır. Bu durum aromatik karbon yapıya sülfonasyon ile -SO₃H gruplarının başarılı bir şekilde bağlandığını göstermektedir.

Biyokütle türevli karbon bazlı sülfolanmış katı asit katalizörün XRD analiz sonucu Şekil 2' de verilmiştir. Spektrumda 2θ= 25° civarında gözlenen (002) düzleminden kaynaklanan pik rasgele yerleşmiş amorf karbon tabakaların varlığını işaret etmektedir [14].



Şekil 2. BH250S katalizörünün XRD spektrumu

Şekil 3' deki SEM görüntülerinde yarı-karbonize olmuş biyokütle yapısı ve konsantre sülfürik asit ile sülfolama işleminin etkisi gözlenmektedir.

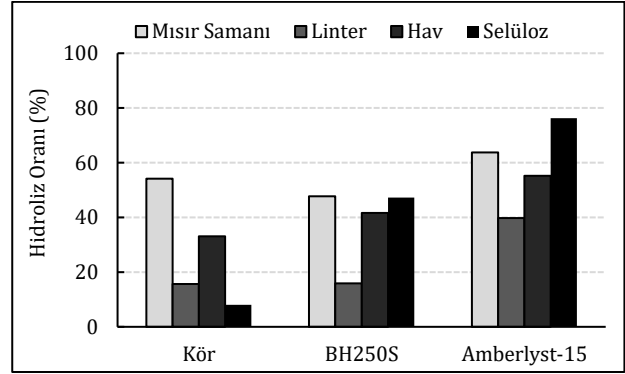


Şekil 3. (a) 250°C hidrotermal yarı-karbonize (b) 250°C hidrotermal yarı-karbonizasyon sonrası sülfolanmış biyokütle yapısının SEM görüntüleri

Hidrotermal yarı-karbonizasyon işlemi sonrası yüzeyde oluşan damlacıklar sulu ortam ve yüksek sıcaklıkta hidrolize olmaya başlayan lignoselülozik yapıdan kaynaklı yüzeyde lignin birikimini işaret etmektedir [15]. Ayrıca sert sülfolama işlemi görüldüğü gibi gözenek yapılarını değiştirmekte ve yapının parçalandığı görülmektedir.

3.3. Tek basamakta biyokütle dönüşümü ile 5-HMF eldesi

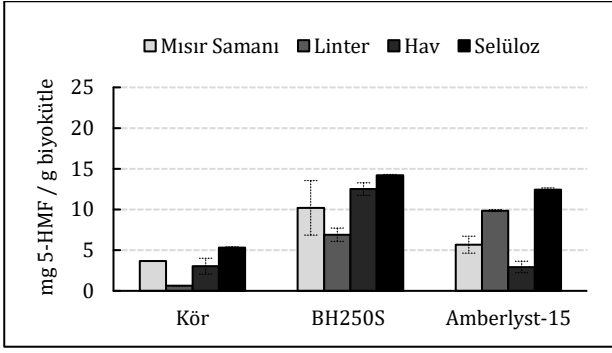
Farklı biyokütle materyalleri ile tek basamakta gerçekleştirilen dönüşüm deneylerinde katalizör varlığında hidroliz oranlarının arttığı gözlenmektedir (Şekil 4). Amberlyst-15, BH250S katalizörüne kıyasla hidroliz verimini arttırmada daha etkili olmuş, en yüksek hidroliz oranına %76,2 ile model bileşik olan selülozda ulaşılmıştır. BH250S katalizörü ise selülüzün hidroliz verimini katalizörsüz denemeye kıyasla %36,2 oranda arttırmaktadır.



Şekil 4. Dönüşüm deneyleri sonrası farklı biyokütle türleri için hidroliz verimlerinin kıyaslaması

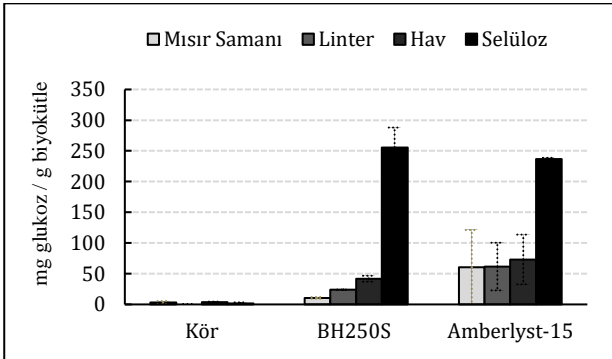
Gerçek biyoküteller içinde ise lignoselülozik biyokütle olan mısır samanı en fazla hidroliz olan yapıdır, hav ve linter onu takip etmektedir. Görüldüğü gibi katalizörlerin farklı biyoküteller üzerinde hidroliz etkileri biyokütle ve katalizörün yapısına bağlı olarak farklılaşabilmektedir. Yüksek kristaliniteye sahip rijit yapıları linteri katalitik olarak parçalamak bu nedenle diğer biyokütellere göre daha zor olmuştur.

Biyokütellerin 5-HMF'ye dönüşüm verimleri kıyaslandığında mısır samanı, hav ve mikrokristalin selüloz için laboratuvar ortamında elde edilen BH250S katalizörünün aktivitesinin ticari katalizör Amberlyst-15'in önüne geçtiği gözlenmiştir (Şekil 5). BH250S katalizörü varlığında yapılan deneylerde elde edilen 5-HMF miktarları katalizörsüz dönüşüm deneylerine kıyasla mısır samanı, hav, linter ve mikrokristalin selüloz biyokütelleri için sırasıyla 2,8, 4,2, 11,5 ve 2,7 katına çıkmaktadır. Gram biyokütle başına en yüksek 5-HMF miktarı (14,2 mg) BH250S katalizörü ile model bileşik mikrokristalin selülüzün dönüşümünden elde edilirken, tamamen atık bir biyokütle olan havdan elde edilen değer (12,5 mg) ise ona oldukça yakındır. BH250S katalizörünün yapısındaki -COOH grupları asiditeyi arttırırken, -OH grupları ise β-1,4-glukandaki glikozit bağları ile hidrojen bağı oluşturarak etkileşir ve bu durum zincirdeki glikozit bağların diğer asidik bölgelerle etkileşimini arttırır. Bu özellik 5-HMF verimini arttırıcı yönde etki etmektedir [16].



Şekil 5. Dönüşüm deneyleri sonrası elde edilen 5-HMF miktarlarının kıyaslaması

Şekil 6' de görüldüğü üzere katalizörlü dönüşüm deneylerinden reaksiyon sonrası ortamda bulunan glikoz miktarı daha fazla olmaktadır. Reaksiyon ortamında asidik karakterli bu katalizörler çözünmüş küçük şeker moleküllerini dönüştürmede etkili olurken, bir yandan da biyokütle materyallerinin etkin hidrolizini sürdürmektedir. Bu hidroliz etkisi her zaman glikoza kadar parçalanma şeklinde değil, daha büyük yapıları şeker moleküllerine (disakkaritler, polisakkaritler, vb.) parçalanma şeklinde de olabilir. Bu durum ticari Amberlyst-15 katalizörünün hidroliz etkisinin yüksek olmasına karşın 5-HMF dönüşüm etkinliğinin düşük olmasının sebeplerindedir.



Şekil 6. Dönüşüm deneyleri sonrası çözeltide kalan glikoz miktarlarının kıyaslanması

Sonuçlara bakıldığında özellikle mikrokristalin selüloz katalizör yardımıyla glikoz monomerlerine daha fazla parçalanmış ve 5-HMF'ye dönüşmeyen fazlaca bir kısım çözelti ortamında kalmıştır. BH250S katalizörünün 5-HMF dönüşüm aktivitesi ticari katalizör Amberlyst-15 kıyasla daha iyi olduğundan reaksiyon sonrası ortamda genel olarak daha az glikoz molekülü bulunmaktadır.

4. Tartışma ve Sonuç

Biyokütle türevli karbon bazlı sülfolanmış katı asit katalizörler literatürde özellikle selülozun hidrolizinde yüksek katalitik aktiviteleri, tekrar kullanılabilir olmaları, ucuz ve doğal hammaddelerden hazırlanmaları nedeniyle son yıllarda oldukça ilgi çekmektedir. Bu çalışmada buğday samanı ilk kez karbon katalizörler için başlangıç materyali olarak kullanılmış ve daha önce hiç

çalışılmamış olan linter ve hav gibi farklı atık biyokütellerin bu katalizör ile sulu ortamda 5-HMF'ye dönüşüm verimleri incelenmiştir. Mısır samanı, hav ve mikrokristalin selüloz dönüşümlerinde en iyi sonuçlar BH250S katalizörü ile elde edilmiş, atık havdan bu katalizör ile gram biyokütle başına 12,5 mg 5-HMF elde edilirken, buna karşılık ticari katalizör Amberlyst-15 dönüşüm aktivitesi göstermemiştir. Model bileşik saf mikrokristalin selülozun 5-HMF dönüşümü katalizörsüz ortama kıyasla yaklaşık 3 katlık artış göstermiştir.

Literatürde yer alan benzer bir çalışmada hidrotermal karbonizasyon ile mısır sapından elde edilen sülfolanmış karbon katı asit katalizör ile iyonik sıvı ortamında çalışılmış, iyonik sıvının hem çözücü hem katalizör etkisinden faydalanılarak daha yüksek 5-HMF dönüşüm verimi elde edilmiştir [17]. Ancak iyonik sıvının toksik etkileri göz önünde bulundurulduğunda, çözücü olarak suyun tercih edilmesi ve verimi arttırmak için katalizörün modifikasyon ile geliştirilmesi daha çevreci bir yaklaşım olacaktır. Çalışmanın devamında bu karbon katalizöre daha fazla asidik özellik kazandırabilecek farklı fonksiyonel gruplar bağlanarak biyokütle hidrolizi ve değerli kimyasal eldesi konusunda endüstriyel düzeyde çalışmalar gerçekleştirilebilir.

Teşekkür

Bu çalışmanın gerçekleşmesindeki desteklerinden dolayı Bursa Teknik Üniversitesi BAP (171N09 nolu proje) birimine teşekkür ederiz.

Kaynakça

- [1] Mukherjee, A., Dumont, M-J., Raghavan, V. 2015. Review: Sustainable production of hydroxymethylfurfural and levulinic acid: Challenges and opportunities. *Biomass and Bioenergy*, 72, 143-183.
- [2] Dutta, S., De, S., Alam, M., Abu-Omar, M. M., Saha, B., 2012. Direct conversion of cellulose and lignocellulosic biomass into chemicals and biofuel with metal chloride catalysts. *Journal of Catalysis*, 288, 8-15.
- [3] Rathod, P. V. and Jadhav V. H., 2018. Efficient Method for Synthesis of 2,5-Furandicarboxylic Acid from 5-Hydroxymethylfurfural and Fructose Using Pd/CC Catalyst under Aqueous Conditions. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6, 5766-5771.
- [4] Chang, C., Xu, G., Jiang, X., 2012. Production of ethyl levulinate by direct conversion of wheat straw in ethanol media. *Bioresource Technology*, 121, 93-99.
- [5] Dutta, S., Yu, I. K. M., Tsang, D. C. W., Ng, Y. H., Ok, Y. S., Sherwood, J., Clark, J. H., 2019. Green synthesis of gamma-valerolactone (GVL)

- through hydrogenation of biomass-derived levulinic acid using non-noble metal catalysts: A critical review. *Chemical Engineering Journal*, 372, 992-1006.
- [6] Fukuhara, K., Nakajima, K., Kitano, M., Kato, H., Hayashi, S., Hara, M. 2011. Structure and catalysis of cellulose-derived amorphous carbon bearing SO₃H groups. *Chemosuschem*, 4:778-784.
- [7] Hara, M. 2010. Biomass conversion by a solid acid catalyst. *Energy & Environmental Science*, 3:601-607.
- [8] Uskan, B. 2009. Odun Talaşının Hidrotermal Dönüşümünden Elde Edilen Kimyasalların Karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 109s, Ankara.
- [9] ASTM, 2009. Standard Test Method for Determination of Acid-Insoluble Residue in Biomass, Pennsylvania United States: ASTM
- [10] Foyle, T., Jennings, L., Mulcahy, P. 2007. Compositional analysis of lignocellulosic materials: Evaluation of methods used for sugar analysis of waste paper and straw. *Bioresource Technology*, 98, 3026-3036.
- [11] Sun, R. C., Tomkinson, J. 2002. Characterizations of hemicelluloses obtained by classical and ultrasonically assisted extractions from wheat straw. *Carbohydrate Polymers*, 50, 263-271.
- [12] Gan, L., Zhu, J., Lv, L. 2017. Cellulose hydrolysis catalyzed by highly acidic lignin-derived carbonaceous catalyst synthesized via hydrothermal carbonization. *Cellulose*, 24, 5327-5339.
- [13] Suganuma, S., Nakajima, K., Kitano, M., Yamaguchi, D., Kato, H., Hayashi, S., Hara, M. 2008. Hydrolysis of Cellulose by Amorphous Carbon Bearing SO₃H, COOH, and OH Groups. *Journal of American Chemical Society*, 130, 12787-12793.
- [14] Wu, Y., Fu, Z., Yin, D., Xu, Q., Liu, F., Lu, C., Mao, L. 2010. Microwave-assisted hydrolysis of crystalline cellulose catalyzed by biomass Char sulfonic acids. *Green Chemistry*, 12, 696-700.
- [15] Irmak, S., Meryemoglu, B., Sandip, A., Subbiah, J., Mitchell, R. B., Sarath, G. 2018. Microwave pretreatment effects on switchgrass and miscanthus solubilization in subcritical water and hydrolysate utilization for hydrogen production. *Biomass and Bioenergy*, 108, 48-54.
- [16] Huang Y-B. ve Fu Y. 2013. Hydrolysis of cellulose to glucose by solid acid catalysts. *Green Chemistry*, 15, 1095-1111.
- [17] Yan, L., Liu, N., Wang, Y., Machida, H., & Qi, X. 2014. Production of 5-hydroxymethylfurfural from corn stalk catalyzed by corn stalk-derived carbonaceous solid acid catalyst. *Bioresource Technology*, 173, 462-466.

Usage of Waste Plastics in Road Pavements

Mehmet SALTAN*¹, Nimet İNKAYA²

¹Suleyman Demirel University, Engineering Faculty, Civil Engineering Department, 32260, Isparta, Turkey

²Ardahan University, Vocational School of Technical Sciences, Construction Department, 75000, Ardahan, Turkey

(Alınış / Received: 21.11.2019, Kabul / Accepted: 24.02.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Keywords

Environment,
Waste plastic,
Modified bitumen,
Hot mix asphalt,
Marshall Stability Test,
Roadway pavement

Abstract: Storage of various products obtained from wastes or leaving these to the nature lead to many difficulties and huge problems such as environmental pollution. Today, some studies are carried out on the recycling of wastes and by-products gained during the manufactory of various products. Wastes can be used to obtain new products or as an additional substance on the existing products. Both recycle of wastes and by-products prevents damage to the environment and reduces the occurrence of related problems to a minimum level by mitigating the usage of very scarcely found natural substances. Thus, it is important that industrial wastes be gained to state economy through being recycled for various uses. In recent years, studies on removal of wastes by recycling on highway layers have been extended. The aim of this study is to introduce the technical advantages of plastic materials known only as a simple waste material and to convert the environmental, economic and technical disadvantages of these materials as waste as an asphalt coating material. In the study, the samples were prepared by mixing bitumen with bituminous waste plastic heat treatment method and prepared samples were subjected to Marshall Strength and Indirect Tensile Strength tests and the results were interpreted.

Atık Plastiklerin Karayolunda Kullanımı

Anahtar Kelimeler

Çevre,
Atık plastik,
Modifiye bitüm,
Sıcak asfalt karışım,
Marshall Stabilité Testi,
Yol kaplaması

Özet: Atıklardan elde edilen çeşitli ürünlerin depolanması veya doğaya bırakılması birçok zorluğa ve çevre kirliliği gibi büyük sorunlara yol açar. Günümüzde, çeşitli ürünlerin imalatı sırasında kazanılan atıkların ve yan ürünlerin geri dönüşümü üzerine bazı çalışmalar yapılmaktadır. Atıklar yeni ürünler elde etmek için veya mevcut ürünler üzerinde ek bir madde olarak kullanılabilir. Hem atıkların hem de yan ürünlerin geri dönüşümü, çevreye verilen zararı önler ve çok az bulunan doğal maddelerin kullanımını hafifleterek ilgili sorunların ortaya çıkmasını asgariye indirir. Bu nedenle, endüstriyel atıkların çeşitli kullanımlar için geri dönüştürülerek devlet ekonomisine kazandırılması önemlidir. Son yıllarda, karayolu katmanlarında geri dönüşüm yoluyla atıkların giderilmesine ilişkin çalışmalar genişletilmiştir. Bu çalışmanın amacı, sadece basit bir atık malzeme olarak bilinen plastik malzemelerin performansları açısından teknik avantajlarını tanıtmak ve bu malzemelerin atık olarak çevresel, ekonomik ve teknik dezavantajlarını asfalt kaplama malzemesi olarak kullanarak avantaja dönüştürmektir. Çalışmada sınıflandırılmış granül haldeki atık plastik ısıtma işlemiyle bitümle karıştırılarak numuneler hazırlanmış ve hazırlanan numuneler Marshall Dayanım ve İndirekt Çekme Dayanım deneylerine tabi tutularak sonuçları yorumlanmıştır.

1. Introduction

Due to population growth and rapid industrialization, the world's natural resources are decreasing each year and their needs are increasing [1]. Instead of using natural materials, the by-products and waste materials produced during the production or processing of these natural materials should be reused [2]. This will lead to energy savings through

efficient use of natural resources, and the environmental impact of waste materials will make a major contribution to the country's economy in the long run and minimize storage for disposal [3].

As the quality of life increases as a result of the progress achieved by industrialization, the inevitable growth in the population causes the depletion of natural resources and pollution of the environment

more and more and this necessitates waste management [4].

Changing living standards make it difficult to control and manage waste by increasing waste quantity and waste diversity [5]. The pollution caused by the wastes increases the size of the existing and potential risks day by day and causes the decrease of natural resources [6]. For these reasons, waste management is becoming increasingly important and complex in our age [7]. As a matter of fact, the theme of World Environment Day in 2018 has been determined as 'Combating Plastic Pollution' [8]. With this theme, it is aimed to reduce the production and use of plastic products used in the world [9].

As a result of the researches, it is observed that 50% of the environmental pollution occurred in the last 35 years [10]. Plastics are used in the construction of many household and industrial materials [11]. Worldwide, the production of waste plastics is 460.000 t/day, which accounts for approximately 8% (24% by volume) of municipal solid waste. Plastic based solid wastes constitute 8% and 12% by volume of solid wastes collected in the world [12].

Plastics Manufacturers Association (PAGDER) According to the data, which is 80.8 kilograms per person in 2015 in Turkey plastic consumption increased by 11.5 percent over 3 years 2018 well reached 90.1 kilograms [13].

Within the scope of sustainable development, waste management strategies aiming to ensure that wastes do not threaten the environment and human health and turn them into an input for the economy are adopted throughout the world [14]. Integrated solid waste management is a process which begins with waste reduction at source, reuse, recycling and recovery practices and ends with collection and disposal of waste. The Ministry of Environment and Urban Planning's Packaging Waste Regulation aims to recycle 20% of the year 2020 and is 60% in line with the EU [15].

Indeed, according to the report prepared by the Chamber of Certified Public Accountants of İstanbul (ISMMMO) titled "Treasure in The Trash", 2 Million Turkish Liras worth of waste is regained to the economy on a daily basis thanks to street collectors, wholesalers and recyclers. When the same calculation is made for the whole year, it is seen that the amount that we throw away and cannot recycle is 1.1 Billion TL. As a result of the comparison between 800 Million TL regained to the economy with brand new products, it was calculated that Turkey saved 405 million TL worth of additional waste [16].

In the Workshop Report of the Association of Plastic Industrialists (PAGDER) Strategic Expansions for Plastic Recycling Enterprises; the global market size of plastic recycling sector with current prices will

exceed \$ 900 billion in 2050 and Turkey in 2025 if current growth continues to 3,25 billion dollars; In 2050, it is estimated that it will reach a sector of 63 billion dollars [17]. It is stated that the plastic recycling sector, which is expected to process 4.3 million tons in 2030, is expected to reduce the current account deficit of raw materials by 35.1% [18].

The use of industrial wastes in road construction has become widespread in recent years % [19]. It is possible to remove industrial wastes by using them in road construction % [20]. They can be used in wearing and binder courses, base and sub-base layers and base-floor (as filler material) % [21]. In addition, they can be used as aggregate or supplemental cement material in rigid pavement or cement-concrete [22].

In this study, it is investigated whether waste plastics can be used together with bitumen in asphalt concrete. In addition, the effect of waste plastic used on asphalt concrete on plastic deformation was investigated. In this study, two kinds of plastics were investigated. Shredded polyethylene terephthalate (PET) and granular low density polyethylene (LDPE) obtained from black nylon bags were added directly to the hot mix asphalt (HMA) for a certain period of time to the prepared samples. The waste plastics were mixed into the bitumen in the heat treatment. In addition, hot plastic asphalt (HMA) samples were prepared by reducing the bitumen rate by a certain amount.

2. Material and Method

2.1. Material

2.1.1. Waste Plastic

The word plastic is derived from the Greek word *plastikos* meaning "capable of being shaped or molded" [23]. Plastic is a general name used for materials obtained by breaking the bond in simple-structured molecular groups called monomer formed by carbon (C) with hydrogen (H), oxygen (O), nitrogen (N) and other organic or inorganic elements and turning them into polymers, which are long and chained structures. For example, Ethylene is a monomer. It is one of the most widely used plastics [24]. As can be understood from the definition above, plastics are not available in nature, but derived from humans by using catalysts on elements in nature at a certain temperature and pressure and allowing monomers to react [25]. Plastics are obtained from residual materials generated after processing crude petroleum in refineries. According to studies, only 4% of the petroleum in the world is used for producing plastics [26]. Although rubber and other similar natural products are defined as plastics, these are excluded from plastics in the modern definition. It is difficult to make the distinction between resins and

plastics. Most artificial materials can be referred to as both resin and plastic. Plastic materials have become the most important commercial materials in the world since they are lightweight, cheap, and easy-to-process and have numerous different areas of use. Huge amounts of plastic materials are used in everyday life. Most of these materials are used only once and thrown away and take up a lot of space in terms of volume, which has caused environmental pollution [27].

Waste plastics fall into two categories as production waste and consumption waste. Production wastes are clean wastes, which were generated in the production phase and their type and color are known. Since these wastes do not contain any foreign substances, they are directly crushed in plastic crushers, melted and granulated. This is referred to as dry crushing. Consumption wastes are derived from collection of plastics within the scope of recyclable waste. Collected waste plastics are kept in water tanks in order to eliminate foreign substances. Then, waste plastics are dried in ovens at a temperature which will not impair their chemical structure. Dried plastics are crushed in plastic crushers, melted and granulated. This is referred to as wet crushing. The reason why plastics are granulated is to obtain equal density.

Two types of plastics were used in the research. These are granular low density polyethylene (LDPE) obtained from black nylon bags and shredded polyethylene terephthalate (PET / PETE) from Sefali Scrap Recycling Company located in Isparta Province Waste Collector Zone. These plastics are also available in the market.

Table 1. One kg of PET bottle flake

Sieve Size (mm)	Amount (g)
12.5	-
9.5	-
4.75	0.72
2.00	33.35
0.425	613.29
0.180	129.98
0.075	203.92
Dust	19.20

2.1.2. Aggregate and bitumen

Aggregate and bitumen used to prepare test samples were obtained from the Municipality of Isparta. Weights and characteristics of aggregates used in tests are indicated in Table 2. The gradation graph of aggregate selected within the specification limits is given in Figure 1.

Standard aggregate tests have been performed on bitumen which was used in the mix [28]. The bitumen characteristics obtained as a result of tests can be seen in Table 3.

Table 2. Gradation Limits [29]

Sieve Diameter (mm)	Limit values exceeding	Gradation % of the mix exceeding	Weight % (g)
19 (3/4")	100	100	0
12.5 (1/2")	83 – 100	90	124.5
9.5 (3/8")	70 – 90	80	124.5
4.75 (No. 4)	40 – 55	45	435.75
2.00 (No. 10)	25 – 38	30	186.75
0.425 (No. 40)	10 – 20	15	186.75
0.180 (No. 80)	6 – 15	10	62.25
0.075 (No. 200)	4 – 10	6	49.8
Dust	0	0	74.7
Total	100%	100%	1245

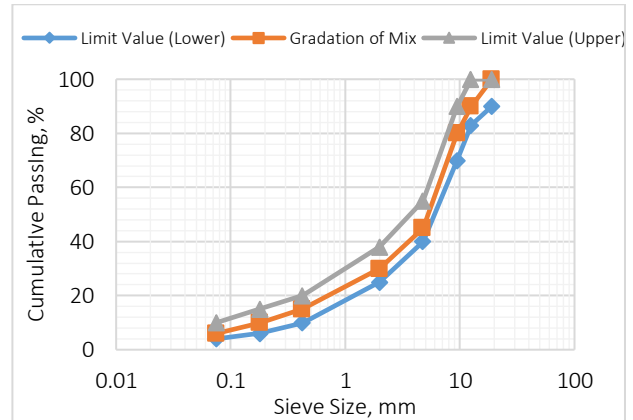


Figure 1. Gradation graph of aggregate selected

Table 3. Characteristics of Bitumen Used

Test	Mean Values	Standard
Penetration (25 °C)	60-70	ASTM D5
Flash Point	180°C	ASTM D92
Combustion Point	230°C	ASTM D92
Softening Point	45.5°C	ASTM D36
Ductility (5 cm/minute)	>100 cm	ASTM D113
Specific Gravity	1.030	ASTM D70

2.2. Method

Several methods have been tried to add waste materials to HMA. The pyrolysis method is one of the most common methods. The pyrolysis method – an important method used to recover waste materials – involves heating organic substances in an oxygen-free environment and turning them into gas, solid or liquid products and it is based on deformation of wastes with or without catalysts with the effect of temperature in inert, vacuum or reducer (hydrogen) environments. Thus, it is aimed to acquire a kind of waste material which causes environmental pollution and appears as an input to the economy. The reason for the use of plastics in the study is that the deformations of plastics under high tension are similar to those of metals. When the process is completed in pyrolysis method; it is observed that the chemical structure of plastics has changed and the resistance of tensile plastics to gas has decreased. In addition, in addition to plastics, the pyrolysis process is not suitable for all products whose crude material is obtained as petroleum, as it changes their chemical

structure. Another method is to mix the waste material with aggregate as aggregate. The plastics adhered to the pan due to high temperature and their chemical structure was deformed as a result of this method. Therefore, we concluded that this method was not appropriate and decided to add the waste material into the bitumen. The waste material was added to the HMA as an additional substance.

With time study, samples were prepared by adding waste materials to bitumen in preheated furnaces to 160 °C. Since the melting temperature of the plastics is 270/380 °C, the oven is fixed to 160 °C in order not to disturb the structure of the bitumen. The main reason for the preparation of the samples by this method is to ensure full adherence between the waste material and the bitumen, which begin to soften at a certain temperature. Optimum ratio and time were determined by time research.

In addition, by reducing the bitumen rate used in HMA, the amount of waste material was reduced and prepared in the samples. Samples prepared with waste plastics were applied Marshall Stability and Indirect tensile strength tests.

3. Research Findings

3.1. Marshall Stability Test Results

Marshall Samples 5% - 4.73% bitumen and bitumen with 60-70 penetration for wear layer Type-1 aggregate gradation.

Two types of plastic wastes were utilized during the tests. Firstly, PET shredded bottle were used in hot mix asphalt instead of bitumen. 15 g (1,21%), 20 g (1.61%), 30 g (2.41%), 35 g (2.81%) of waste plastic were added to bitumen and the same amount of bitumen was reduced to prepare Marshall samples. Figure 2 shows Marshall Test results of samples prepared by keeping in oven for 20 min and adding 5% bitumen.

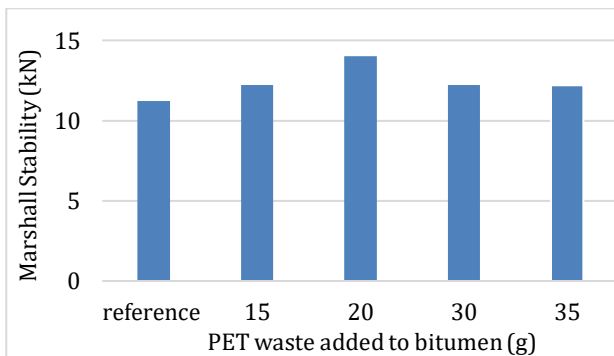


Figure 2. Comparison of Marshall Results of samples prepared with PET

As can be seen in the figure, Marshall Stabilities of samples prepared with PET have increased. The sample prepared with 20 g gave the highest Marshall stability value and yielding remained within the

specification limits. Also, a time study was performed and the best Marshall and yielding values at optimum temperature were investigated. Samples prepared with 10 g, 20 g, 30 g, 35 g and 5% bitumen can be seen in Figure 3.

In addition, bitumen and waste plastic were kept in an oven to preheat at 160 °C in order to ensure bitumen and waste plastic combine better. Samples were kept in the oven for 20 min, 1 hour 20 min and 2 hours 20 min and results were examined. Keeping samples in the oven for 1 hour 20 min produced the best result. Thus, the optimum value at the optimum temperature was investigated.

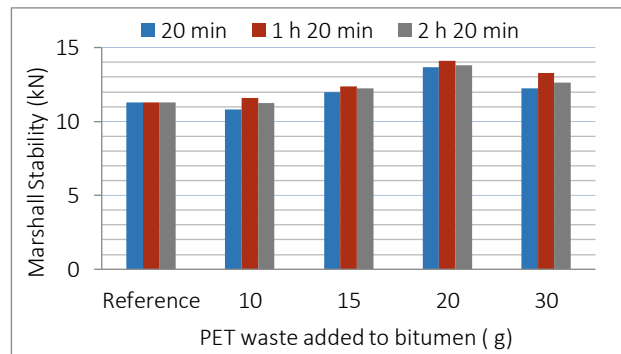


Figure 3. Time study of samples prepared with PET

Time values were studied for samples prepared by adding 15%, 20%, 25%, 30%, 35% PET shredded bottle by weight. The graph shows that all samples prepared with PET shredded bottle were above the Marshall lower limit value. Sample prepared with 20% kept in the oven for 1 hour 20 min produced the best result.

Also, Marshall Samples containing bitumen equal to 4.73% of total weight at Type-1 aggregate gradation and PET waste were prepared for 15 g, 20 g, 25 g, 30 g, 35 g and 20 g produced the best result.

The second type of waste used in the study was granulated LDPE. Among samples prepared with 5% bitumen, 20 g kept in an oven for 1 hour 20 minutes produced the best result. Marshall Stability significantly increased for samples prepared with granulated LDPE. However, yielding values increased beyond the technical specification values.

Marshall Stability increased for all samples prepared by adding PET shredded bottle into bitumen. Also, yielding remained within technical specification values with bitumen reduced by the amount of waste added. This result shows that we can produce environment-friendly solutions by using waste plastics in pavement construction and increase the Marshall stability by reducing the amount of bitumen. Test results show that we can both increase the stability and prevent experimental pollution by reducing bitumen in HMA.

3.2. Indirect Tensile Strength Test Results

Indirect tensile strength test is performed to determine the moisture susceptibility of bituminous mixtures.

After determining Marshall Stability of samples prepared with optimum bitumen ratios, samples prepared with the same ratios were applied conditioned indirect tensile strength test. As can be seen in the Figure 4, the values are close to the right values. PET shredded bottle was used as waste material in samples subjected to indirect tensile strength test. As this graph shows, PET shredded bottle wastes may increase load distribution capacity of bituminous pavements and create a stronger tensile strength against loads.

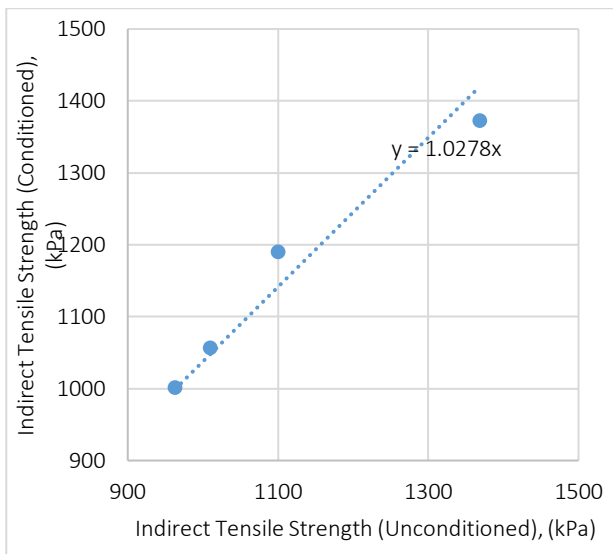


Figure 4. Indirect tensile test results of samples prepared with waste plastics

4. Discussion and Conclusion

The amount of waste plastics, which are industrial solid wastes, increase with each passing by and they have reached a level threatening the environment. Wastes must be used in various areas and disposed of in order to solve this problem.

In the world, most of these industrial wastes may be used in roadways from the base layer to the pavement layer. Using waste materials instead of traditional materials in road construction allows for production with lower costs, disposal of waste materials causing environmental pollution and preservation of natural materials. Sufficient research should be conducted on waste materials, these materials should be known better and the material providing an advantage should be chosen based on its properties and used in the suitable road layer (provided that it meets specification values).

Two values obtained from the results stood out among the results of the tests performed. The first is

that Marshall stability values increased for samples prepared with PET shredded bottle, whereas yielding values remained within specification limits. The second result was that these stability values were achieved with less bitumen. Therefore, it is safe to say that waste materials may be used as binding material in bituminous mixes. However, the need for a preliminary treatment (granulation of wastes) and the addition of a heating unit to asphalt plants to achieve optimum results by adding waste plastics to the mix are factors that increase costs.

The worth of bitumen used for a 1 km road is TL 64743.52. However, if waste plastic is used instead of bitumen, the bitumen cost will be reduced by 32% and 23.13253 tons of waste plastic will be regained to the economy without polluting the environment. Also, processing costs will be eliminated as well since waste materials will not be stored and cause environmental pollution.

References

- [1] Karaşahin, M., Tığdemir, M., Fincanoğlu, A., Saltan, M., 1997. Asfalt Betonunda Karışımında Pomzanın Filler Malzemesi Olarak Değerlendirilmesi. I. Isparta Pomza Sempozyumu, 26-28 Haziran, Isparta.
- [2] Akbulut, H., Gürer, C., 2006. Atık Mermerlerin Asfalt Kaplamalarda Agregata Olarak Değerlendirilmesi. İMO Teknik Dergi, 17(84), 3943-3960.
- [3] Karaşahin, M. 1994, Bitümlü Karışımların Mekanik Özelliklerinin Laboratuvarında Ölçülmesi. Çukurova Üniversitesi Mühendislik – Mimarlık Fakültesi 15. Yıl Sempozyumu, 4-7 Nisan, Adana.
- [4] Karaşahin, M. 1993. Resilient Behavior of Granular Materials of Analysis of Highway Pavements. University of Nottingham, Department of Civil Engineering, PhD Thesis, Nottingham.
- [5] Ata, M. M., 1987. Esnek Üstyapıların Projelendirme ve İnşaat Yöntemlerinin Araştırılması ve Cürüflü Asfalt Betonunun Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- [6] Demirci, B., 2008. Subcontinent Turkey Gazetesi Köşe Yazısı, İstanbul, Sayı 51.
- [7] Deniz, M.T., Sönmez, İ., Yıldırım, S. A., Eren, B. K. 2005. Kullanılmış Otomobil Lastiklerinin Bitümlü Sıcak Karışım Performansına Etkisi. 6. Ulaştırma Kongresi, 23-24 Mayıs, İstanbul.
- [8] Hassani, A., Ganjidoost, H., Maghanaki, A.A., 2005. Use of plastic waste (poly-ethylene terephthalate) in asphalt concrete mixture as aggregate replacement. Waste Management & Research, 23(4), 322-327.

- [9] Huang, Y., Bird, R.N., Heidrich, O., 2007. A review of the use of recycled solid waste materials in asphalt pavements. *Resources, conservation and recycling*, 52(1), 58-73.
- [10] Rahman, W.M.N.W.A. and Wahab, A.F.A., 2013. Green pavement using recycled polyethylene terephthalate (PET) as partial fine aggregate replacement in modified asphalt. *Procedia Engineering*, 53, 124-128.
- [11] de Rezende, L.R., de Carvalho, J.C., 2003. The use of quarry waste in pavement construction. *Resources, conservation and recycling*, 39(1), 91-105.
- [12] Türkiye Belediyeler Birliği. 2015. Katı Atık Geri Dönüşüm ve Arıtma Teknolojileri El Kitabı, Ankara, 298s.
- [13] Plastik Sanayiciler Derneği, 2019. Plastik Geri Dönüşüm İşletmeleri için Stratejik Açılımlar Çalıştayı. 27-29 Nisan, İstanbul.
- [14] Saltan, M. 1999. Esnek Üstyapıların Analitik Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 202s.
- [15] Terzi, S., 1998. Mermer Toz Atıkların Asfalt Betonunda Filler Malzemesi Olarak Kullanılmasının Araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Isparta, 3943-3960s.
- [16] İstanbul Serbest Muhasebeci Mali Müşavirler Odası. 2009. Çöpteki Hazine, Sayı 51, 2214s.
- [17] Ulusal Çevre Eylem Planı. 1995. Evsel ve Tıbbi Katı Atık Yönetimi Grubu I. Taslak Raporu. Ankara.
- [18] Kanal Finans. 2018. Kağıt ve Ambalajı Dönüştür, 5 Milyar Lirayı Toprağa Gömmel. <https://kanalfinans.com/haberler/ifat-eurasia-cevre-kirliligi-nedenleri> (Erişim Tarihi: 23.09.2019).
- [19] Tunç, A., 2001. Yol Malzemeleri ve Uygulamaları, Ankara, 840s.
- [20] Umar, F., Açar, E. 1985. Yol Üstyapısı, İTÜ Yayınları, İstanbul, 255s.
- [21] Vasudevan, R., Sekar, A.R.C., Sundarakannan, B., Velkennedy, R., 2012. A technique to dispose waste plastics in an ecofriendly way–Application in construction of flexible pavements. *Construction and Building Materials*, 28(1), 311-320.
- [22] Çağlar, G. A. 2007. Endüstriyel Atık Malzemelerin Karayollarında Kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 128s.
- [23] Ahmed, I., 1991. Use of waste materials in highway construction. Joint Transportation Research Program, 299.
- [24] Alp, S., 2003. Plastik Sektör Raporu, İstanbul Ticaret Odası, 18s.
- [25] Çevre ve Şehircilik Bakanlığı. 2011, Ambalaj Atıklarının Kontrolü Yönetmeliği.
- [26] Tayyar, A.E., Üstün, S., 2010. Geri Kazanılmış Pet'in Kullanımı. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 16(1), 53-62.
- [27] Başar Y., Savaşçı Ö.T., 1989. Katı Atıklar ve Bu Atıklardan Plastiklerin Geri Kazanılması, *Plastik ve Kauçuk*, 10, 18-24.
- [28] Van Til, C.J., 1972. Evaluation of AASHO interim guides for design of pavement structures. Highway Research Board.
- [29] Highway Technical Specifications, 2013. Karayolları Teknik Şartnamesi, Ankara.

Kütahya İli Üretici Depolarından Alınan Buğday Örneklerinde Bulunan Zararlı Böcek Türleri ve Doğal Düşmanları

Erdal ZENGİN¹, İsmail KARACA²

¹Tarım ve Orman İl Müdürlüğü, 64100, Uşak

²Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 32100, Isparta

(Alınış / Received: 03.12.2019, Kabul / Accepted: 16.01.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Anahtar Kelimeler
Depolanmış buğday,
Böcek yoğunluğu,
Zarar oranı,
Kütahya

Özet: Bu çalışma 2017 yılında Kütahya ili üretici depolarında bulunan buğdaylardaki zararlı ve yararlı böcek türleri ve bu türlerin yoğunluklarının tespiti ile depolarda sebep oldukları zarar oranlarının belirlenmesi amacı ile yapılmıştır. 24 farklı köyden alınan toplam 41 örneğin incelenmesi sonucunda, *Sitophilus granarius* (L.), *Oryzophilus surinamensis* (L.), *Tribolium castaneum* (Herbst), *Tenebroides mauritanicus* (L.), *Tenebrio molitor* (L.), *Anthrenus scrophulariae* var. *albidus* (Reitter), *Dienerella* sp. (Reitter), *Stegobium paniceum* (L.), *Plodia interpunctella* (Hübner) ve *Ephestia cautella* (Walker) olmak üzere toplam 10 böcek türü zararlı olarak tespit edilmiştir. Ayrıca *Lariophagus distinguendus* (Förster), *Anisopteromalus calandrae* (Howard) ve *Bracon hebetor* (Say) türleri doğal düşman olarak bulunmuştur. Zararlı türlerden *S. granarius* ve *O. surinamensis* sırasıyla örneklerdeki yoğunluk (%52.6-%40.2) ve bulaşıklık (%56.1-%46.3) bakımından en fazla karşılaşılan türler olmuştur. Örneklerde zarar görmüş tane ortalaması en yüksek %10 olarak tespit edilmiş olup, il ortalaması %1.39 bulunmuştur. Tespit edilen 13 farklı böcek türünden, *Anthrenus scrophulariae* var. *albidus*'un Türkiye'de ilk kez buğday depolarındaki varlığı bu çalışmayla ortaya konulmuştur.

Harmful Insects and Their Natural Enemies on Wheat Samples taken from Producer Warehouses in Kütahya Province

Keywords

Stored wheat,
Insect density,
Damage ratio,
Kütahya

Abstract: This study was carried out to determine harmful and beneficial insect species and their densities in wheat that is in producer warehouses of Kütahya province in 2017. In a total of 41 samples taken from 24 villages, it was detected 10 harmful insects species, namely *Sitophilus granarius* (L.), *Oryzophilus surinamensis* (L.), *Tribolium castaneum* (Herbst), *Tenebroides mauritanicus* (L.), *Tenebrio molitor* (L.), *Anthrenus scrophulariae* var. *albidus* (Reitter), *Dienerella* sp. (Reitter), *Stegobium paniceum* (L.), *Plodia interpunctella* (Hübner) and *Ephestia cautella* (Walker). Furthermore, *Lariophagus distinguendus* (Förster), *Anisopteromalus calandrae* (Howard) and *Bracon hebetor* (Say) were found as natural enemy. The most common species in the samples in terms of density and infestation were *S. granarius* (52.6%-56.1%) and *O. surinamensis* (40.2%-46.3%), respectively. Although the highest damaged kernel ratio in the samples was calculated to be 10%, provincial average was 1.39%. As a result of this study, 13 different insect pest species were detected and *Anthrenus scrophulariae* var. *albidus* was firstly detected on stored wheat in Turkey.

1. Giriş

Buğday temel besin maddemiz olmasından dolayı diğer tarımsal ürünlere nazaran ayrı bir öneme sahiptir. Ayrıca son yıllarda yenilenebilir enerji için hammadde olarak kullanılmasının yanında saman, kepek, razmol gibi yan ürünlerinin yem sanayisinde uzun yıllardır kullanılıyor olması bu önemi daha da artırmıştır. 2017 verilerine göre ülkemizin yaklaşık

23 milyon hektarlık tarım alanının 7.6 milyon hektarlık kısmında (%33) buğday üretimi yapılmaktadır. Kütahya ilinde ise bu oran toplam ekilebilir alanının (320 bin hektar) %44'üne (140 bin hektar) karşılık gelmektedir [1]. Artan nüfusun talebinin karşılanması, iklim değişikliklerinden dolayı yaşanan olumsuzluklar, buğdaydan elde edilen ürünlerin ihracatında gerçekleşen artış gibi nedenlerden dolayı buğday üretiminde, gerek tarlada

gerekse depolamada yaşanan kayıpların en aza indirgenmesi zorunlu hale gelmiştir. Dünya genelinde, depolanmış tahıllarda meydana gelen kayıp yaklaşık %10 olarak kabul edilmiş olup bu kaybın %5'lik kısmının böcek zararından dolayı kaynaklandığı tahmin edilmektedir [2]. Türkiye'de ise böcekler tarafından depolarda sebep olunan kaybın %10 seviyelerinde olduğu belirlenmiştir [3].

32 takım içinde sınıflandırılan böceklerin sadece 3 takımı (Coleoptera, Lepidoptera, Psocoptera) depolanmış ürünlerde zarar yapan böcekleri içerir [4]. Herhangi bir nedenle zarara uğramamış, sağlam buğday tanesi ile beslenerek zarar yapabilen böcek türleri primer zararlı olarak adlandırılmaktadır. Bu zararlılardan depolanmış buğdaylarda sıkça karşılaşılanlar, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae), *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae), *Sitotroga cerealella* (Olivier) (Lepidoptera: Gelechiidae) ve *Trogoderma granarium* (Everts) (Coleoptera: Dermestidae)'dur [4]. Diğer zararlı türlerin hepsi primer zararlılar ya da farklı etmenler tarafından kırılmış, çatlamış veya yenmiş taneler üzerinde ve bunların tozlarıyla beslenirler. Bu tür zararlılara da sekonder zararlı olarak tanımlanmaktadır. Başka bir depo zararlı türü ise doğrudan buğday tanesi üzerinde beslenmeyip metabolik aktivitesi yüzünden ortamın sıcaklığını ve nemini artırarak fungal gelişimi teşvik etmekte ve depolarda bulunan ürünün bozulmasına neden olmaktadır. Bu türlerin en önemlileri *Ahasverus advena* (Walt) (Coleoptera: Silvanidae), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) (Coleoptera: Laemophloeidae) ve *Liposcelis* spp. (Motschulsky) (Psocoptera: Liposcelididae) türleridir [3-5].

Bu çalışmayla Kütahya ilinde üretici depolarında muhafaza edilen buğdaylarda zarar yapan böcek türleri, bunların yoğunlukları ve depolardaki zarar oranları ile faydalı türlerin durumu ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır.

2. Materyal ve Metot

Kütahya ili ve ilçelerinde bulunan üretici depolarındaki buğdaylarda zarar meydana getiren böceklerin ve onların doğal düşmanlarının tespit edilmesi amacıyla, 2017 Haziran-Eylül ayları arasında Altıntaş, Emet, Gediz, Hisarcık, Simav ve Şaphane ilçelerinde bulunan 23 köyden toplam 41 adet örnek alınmıştır. Çalışmanın yapıldığı köylerde üreticiler tarafından buğday depolama işlemi kısa süreli yapıldığından, örnekler hasat tarihini kapsayacak şekilde 4 aylık dönem içerisinde alınmıştır.

Örnekler, betonarme veya ahşap özellikteki depolarda yığın ya da çuvallanmış olarak bulunan buğdayların dört farklı noktasından ya da dört çuvaldan, yüzeyden ve yaklaşık 50 cm derinlikten olmak üzere 2 kg olacak şekilde elle alınmıştır. Her bir örnekten 66 c'lik kavanozlara alt örnekler alınarak kavanozların ağızları tül ile kapatılmış ve

üzerleri örneklerin alındığı yer ve tarih bilgisi bulunan etiketlerle etiketlenmiştir. Kavanozlar, buğday tanelerinin içerisinde olabilecek böcek türlerinin çıkışının sağlanması için 2 ay süreyle oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. İki ay sonunda örnekler 2 mm göz açıklığına sahip metal eleklerle elenmiş ve her bir örnek içinde bulunan böcek türleri ayıklanarak teşhis için hazırlanmıştır. Örneklerde tespit edilen larvalar plastik kaplara alınarak ergin hale gelinceye kadar oda sıcaklığında bekletilmiş ve sonrasında teşhisleri yapılmıştır.

Alınan buğday örneklerinden elde edilen her bir türün yoğunluk oranı, örnekteki türün birey sayısının aynı örnekteki toplam böcek sayısına oranlanmasıyla bulunmuştur. Türün bulunduğu örnek sayısının toplam örnek sayısına oranı ise o türün bulaşıklık yüzdesini vermiştir. Ayrıca her örnekten rastgele 300 adet buğday tanesi alınarak 100'erli üç gruba ayrılmıştır. Buğday taneleri tek tek kontrol edilerek böcek zararlı olanlar sayılmış ve üç grubun ortalaması alınarak o örneğe ait zarar oranı tespit edilmiştir. Kırık ve parçalanmış tanelerin böcek zararından dolayı olup olmadığı tespit edilemeyeceğinden sayıma dahil edilmemiş, sadece üzerinde yuvarlak muntazam çıkış deliklerine sahip taneler sayılmıştır. Zarar görmüş tane sayılarının ilçeler arasındaki karşılaştırılması SPSS 16.0 programı ile tek yönlü (ANOVA) varyans analizi uygulanarak yapılmış olup, ortalamalar arasında fark belirlenen grupların karşılaştırılması ise 0.05 düzeyinde Tukey testi ile yapılmıştır.

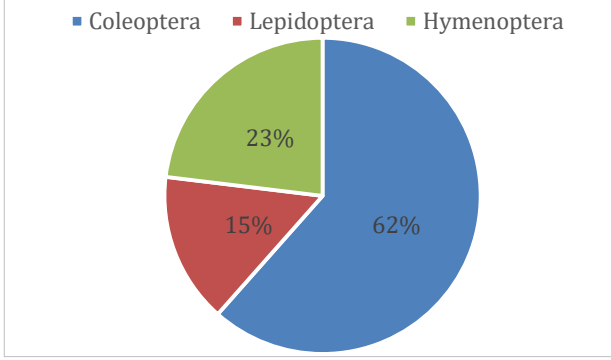
Zararlı türlerin teşhisleri Rees [5] ve Canadian Grain Commission [6] göre yapılmış olup, faydalı türler ise Prof.Dr. Mikdat DOĞANLAR (Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü, Adana) ve Prof.Dr. Ahmet BEYARSLAN (Bitlis Eren Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitlis) tarafından tanımlanmıştır. Ayrıca dermestid türü Prof. Dr. Jiří HAVA (Czech University of Life Sciences, Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech Republic) tarafından teşhis edilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

Kütahya ili ve ilçelerinden toplanan 41 örnekte 13 böcek türü tespit edilmiştir. Bu türlerin 8 tanesi Coleoptera takımına, 2 tanesi Lepidoptera takımına ve 3 tanesi de Hymenoptera takımına ait türlerdir. Takımların tespit edilme oranları Şekil 1'de verilmiştir.

Coleoptera takımının Curculionidae familyasına ait *Sitophilus granarius* (Buğday biti), Silvanidae familyasına ait *Oryzophilus surinamensis* (Testereli böcek), Tenebrionidae familyasına ait *Tribolium castaneum* (Herbst) (Un biti), *Tenebroides mauritanicus* (L.) (Ekin kara böceği) ve *Tenebrio molitor* (L.) (Un kurdu), Dermestidae familyasına ait *Anthrenus scrophulariae* var. *albidus* (Reitter), Latridiidae familyasına ait *Dienerella* sp. (Reitter) ve

Anobiidae familyasına ait *Stegobium paniceum* (L.) türleri tespit edilmiştir. Lepidoptera takımında tespit edilen iki tür Pyralidae familyasına ait olan *Plodia interpunctella* (Hübner) (Kuru meyve güvesi) ve *Ephestia cautella* (Walker) (Kuru incir kurdu) olmuştur. Hymenoptera takımından faydalı tür olarak belirlenen *Lariophagus distinguendus* (Förster) ve *Anisopteromalus calandrae* (Howard)'nin Pteromalidae familyasına, *Bracon hebetor* (Say)'un ise Braconidae familyasına ait olduğu görülmüştür.

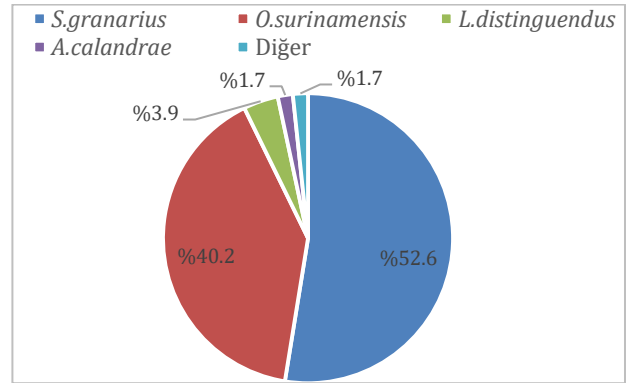


Şekil 1. Kütahya ilinde depolanmış buğday örneklerindeki tespit edilen böcek türlerinin takım düzeyinde bulunış oranları (%)

İncelenen örneklerde 3 takım, 9 familya ve 13 türe ait toplam 2447 adet böcek bulunmuş olup bir örneğe düşen ortalama böcek sayısı 59.7 olarak tespit edilmiştir. Bulunan 13 türün sadece 1 tanesinin primer zararlı (*S. granarius*) olduğu, 9 tanesinin sekonder zararlı ve 3 tanesinin de depolanmış buğdaylarda zarar yapan bazı türler üzerinde ektoparazitoit olarak beslenen faydalı tür olduğu anlaşılmıştır. Bağcı vd. [7] Ankara ili hububat depolarında yaptıkları çalışmada, Coleoptera ve Psocoptera takımlarına ait toplam 9 türün varlığını tespit etmişler ancak herhangi bir faydalı türün varlığına rastlamamışlardır. Benzer şekilde Coşkuncu [8] Bursa ili un fabrikalarında surveyler gerçekleştirmiş ve sonuç olarak sadece Coleoptera ve Lepidoptera takımlarına ait primer ve sekonder zararlı türlerin varlıklarını tespit etmişlerdir.

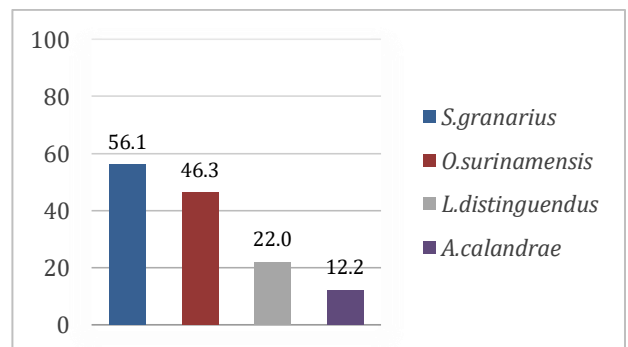
Çalışma süresince alınan örneklerde tespit edilen türlerden yoğunluk oranı en fazla olan üç tür; *S. granarius* (%52.6), *O. surinamensis* (%40.2) ve *L. distinguendus* (%3.9) olmuştur (Şekil 2). Tespit edilen faydalı türlerden olan *L. distinguendus*, alınan 9 örnekte toplam 95 adet, *A. calandrae*, alınan 5 örnekte toplam 41 adet, *B. hebetor* ise alınan 2 örnekte toplam 5 adet olarak bulunmuştur. *B. hebetor*'un konukçusu olan *P. interpunctella*'nın toplam 4 örnekte 12 adet ve *E. cautella*'nın da 2 örnekte toplam 5 adet bulunması, bu doğal düşman türün diğer doğal düşmanlara oranla örneklerde daha az tespit edilmesine neden olmuştur. *L. distinguendus* hem yoğunluk oranı bakımından hem de örneklerdeki bulaşıklık durumu bakımından faydalı türler arasında ilk sırada yer almıştır. Örneklerde bulunan toplam 2447 adet böceğin %5.8 (141

adet)'ini faydalı türler oluşturmuştur. Bu çalışmadan farklı olarak Güneydoğu Anadolu Bölgesinde Özar vd. [9] tarafından yapılan çalışmada faydalı tür olarak *Scenopinus* spp. (Diptera: Scenopinidae)'nin hububat depolarında tespit edildiği bildirilmiştir. Her ne kadar bu çalışmada tespit edilen *A. calandrae* ve *L. distinguendus*'un Türkiye'deki varlığı Öncüer [10] ve Soydanbay-Tunçyürek [11]'de belirtile de, son yıllarda depolanmış ürünler üzerinde yapılan survey çalışmalarının hiçbirinde bu türlerin tespiti yapılamamıştır.



Şekil 2. Kütahya ilinde depolanmış buğdayda tespit edilen türlerin yoğunluk oranları (%)

Toplanan örneklerin 23 (%56.1)'ünde *S. granarius* türüne rastlanmış olup, bu tür örneklerdeki bulaşıklık oranı en yüksek tür olmuştur. Bu türü sırasıyla 19 (%46.3) adet numunede rastlanan *O. surinamensis* ve 9 (%22.0) adet örnekte rastlanan *L. distinguendus* türleri izlemiştir (Şekil 3). Çalışma sonunda *S. granarius* hem yoğunluk oranı bakımından hem de örneklerdeki bulaşıklık durumu bakımından tespiti yapılan türler arasında ilk sırada yer almıştır. Yeni Zelanda'da Chapman vd. [12] tarafından yapılan çalışmada hububat depolarından alınan örneklerde en sık karşılaşılan tür bu çalışmadan farklı olarak *Liposcelis* spp. (Psocoptera: Liposcelididae) olmuştur. Benzer şekilde Bağcı vd. [7]'in Ankara ili hububat depolarında yapmış oldukları çalışmada *Liposcelis bostrychophila* tespit edilen en yoğun tür olmuştur. Ergül vd. [13] tarafından Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerindeki toplam 11 ilde yapılan çalışmada ve Coşkuncu [8] Bursa'daki un fabrikalarında yaptığı araştırmada, örneklerdeki en yoğun ve bulaşıklık oranı en fazla türün, bu çalışmayla benzer şekilde, *S. granarius* olduğunu bildirmişlerdir.



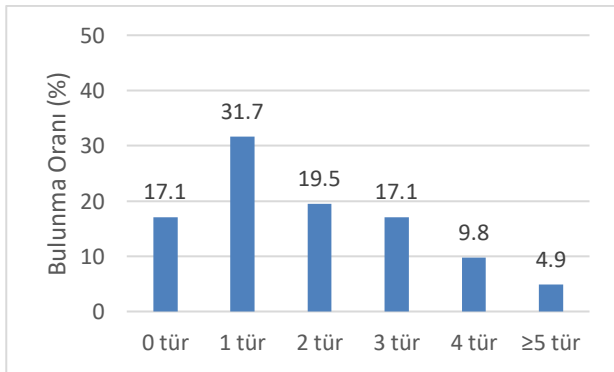
Şekil 3. Kütahya ilinde depolanmış buğday örneklerinde tespit edilen böcek türleri ile bulaşıklık oranları (%)

Çalışma süresince alınan 41 örnekten 34'ünün (%82.9) en az bir böcek türü ile bulaşık olduğu, 7 örneğin (%17.1) ise herhangi bir böcek türü ile bulaşık olmadığı bulunmuştur. Temiz ve bulaşık örnek sayıları ile örneklerin bulaşıklık oranları Tablo 1'de verilmiştir. Böcek bulaşıklığı görülmeyen örnek sayısı Chapman vd. [12] tarafından Yeni Zelanda'da yapılan bir çalışmada %26.7 olarak bulunmuştur. Bağcı vd. [7] Ankara ili hububat depolarından aldıkları toplam 84 örneğin 45 tanesinde (%53.6) böcek bulaşıklığına rastlamadıklarını ifade etmişlerdir. Her iki literatürde de örneklerin çoğunlukla ticari silolardan alınmış olması ve örneklenen depolarda kimyasal mücadele yapılması nedeniyle temiz çıkan örnek sayısı daha yüksek bulunmuştur.

Tablo 1 Kütahya ilinde depolanmış buğday örneklerinin böcek bulaşıklık oranları

İlçe	Bulaşık örnek sayısı	Temiz örnek sayısı	Bulaşıklık oranı (%)
Altıntaş	8	2	80.0
Emet	0	3	0
Gediz	5	0	100
Hisarcık	8	0	100
Simav	5	1	83.3
Şaphane	8	1	88.8

Bir örnekte tespit edilen en fazla farklı tür sayısı 7 olarak bulunmuş ve Çamköy (Şaphane) köyünden alınan örnekte sayılmıştır. Bunu sırasıyla 5 tür ile Hasanlar (Hisarcık) köyü ve 4 türle Göynükören (Gediz), Aşağıdolaylar (Simav), Karamanca (Şaphane) ve Kızılkoltuk (Şaphane) köyleri izlemiştir. Farklı tür sayısı içeren örneklerin toplam alınan 41 örneğe oranı Şekil 4'de verilmiştir.



Şekil 4. Kütahya ilinde depolanmış buğday örneklerinde rastlanan farklı sayıdaki türlerin bulunma oranları

Kütahya ilinden 2017 yılında alınan toplam 41 örneğin her birindeki zarar görmüş tane ortalamaları bulunmuş ve bu değerlere tek yönlü varyans analizi uygulanmıştır. Sonuç olarak alınan buğday örneklerinden hesaplanan zarar görmüş tane ortalamaları arasında ilçelere göre farklılıklara

rastlanmıştır (Tablo 2). En yüksek ortalama zarar %10.0 olarak Hisarcık ilçesi Güldüren köyünden alınan örnekte tespit edilmiştir. Bu örnekte tek bir böcek türü tespit edilmiş olmasına rağmen, bu türün *S. granarius* (primer zararlı) olması ve örnekte 162 adet olarak sayılması ayrıca faydalı türlerin hiçbirine rastlanmaması tanedeki zararın son derece yüksek olmasına neden olmuştur. Hisarcık ilçesi Hasanlar köyünden alınan örnekte *S. granarius* 44 adet tespit edilmiş olmasına rağmen bu örnekteki zarar oranı %2 olmuştur. Aynı örnekte tespit edilen 33 adet *L. distinguendus* ve 17 adet *A. calandreae*, *S. granarius*'un bulunma oranının ve dolayısıyla zarar oranının düşük kalmasına neden olmuştur.

Tablo 2. Kütahya ili depolanmış buğday örneklerine ait ortalama zarar oranları (\pm SH)

İlçe	Örnek Sayısı	Zarar Oranı (Adet/100 tane)	
		Ortalama	Min.-Maks.
Altıntaş	10	0.12 \pm 0.07ab	0.00-0.60
Emet	3	0.00 \pm 0.00a	0.00-0.00
Gediz	5	1.50 \pm 1.05ab	0.0-5.60
Hisarcık	8	4.28 \pm 1.41b	0.0-10.00
Simav	6	0.00 \pm 0.00a	0.0-0.00
Şaphane	9	1.58 \pm 0.98ab	0.0-9.00
Toplam	41	1.39\pm0.43	0.0-10.00

Aynı sütunda aynı harf ile gösterilen ortalamalar arasında fark yoktur (Tukey $p>0.05$).

Işıkber vd. [14] Kahramanmaraş ve Adıyaman illerinde yaptıkları çalışmada örneklerdeki en yüksek zarar oranını %0.3 olarak tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmanın 8-12 adet kontrollü ticari silolarda ve yıl boyunca aynı silolarda yapılmış olması, bu zarar oranının düşük kalmasına neden olduğu düşünülmektedir.

4. Sonuç

Çalışmanın yapıldığı 2017 yılında Kütahya ilçelerindeki üretici depolarından alınan buğday örneklerinin 34 tanesi en az bir böcek türü ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir. Örneklerde, birden fazla canlı primer zararlı bulunması veya bir canlı primer zararlı ile 5 ve üzeri canlı sekonder zararlı olması ya da canlı primer zararlı olmadığı halde 10'dan fazla canlı sekonder zararlı tespit edilmesiyle, o örneğin alındığı depoya uygun bir bitki koruma ürününün uygulanması gerektiği sonucuna dayanılarak [5], alınan örneklerin 28 tanesinin (toplam örneğin %68.3) alındığı depoların ilaçlanması gerektiği tespit edilmiştir. Örneklerdeki il geneli zarar ortalaması olan %1.39, dünya genelinde tahmin edilen %5'lik böcek zararından daha düşük olmasına rağmen, Hisarcık Güldüren Köyünden alınan örnekte bu oranın %10, Şaphane Kızılkoltuk Köyünden alınan örnekte ise %9 çıkması oldukça önemli bulunmuştur. Üreticiler tarafından hasat edilen buğdayların depolanması için kullanılan ahşap ya da betonarme yapıların zarar görmüş kısımlarının zamanında ve muntazam bir şekilde onarılması,

havalandırma pencerelerine zararlı girişini engelleyecek şekilde uygun tellerin takılması gibi kültürel önlemlere dikkat edilmesi gerektiği tespit edilmiştir.

Çalışma sonunda tespit edilen 13 böcek türünden biri olan *Anthrenus scrophulariae* var. *albidus* daha önce Türkiye’de değişik habitatlarda ve farklı illerde tespit edilmiş olmasına rağmen Türkiye’deki buğday depolarındaki varlığı ilk kez bu çalışmayla Şaphane Karamanca köyünden alınan örnekte bulunmuştur [15-16].

Yapılan bu çalışma ile Kütahya ilinde bulunan üretici depolarındaki buğdaylarda bulunan böcek türleri, bu türlerin yoğunlukları ve bulaşıklık dereceleri ile doğal düşmanlarının depolardaki durumu ortaya çıkarılmıştır. Araştırmanın bu yönüyle entegre mücadele programları için önemli olacağı düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma, birinci yazarın doktora tez çalışmasının bir bölümü olup 4771-D1-16 nolu proje ile Süleyman Demirel Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

Kaynakça

- [1] Türkiye İstatistik Kurumu, 2019. Bitkisel üretim istatistikleri <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> (Erişim Tarihi: 28.11.2019).
- [2] Özberk, F., Özberk, İ., Yücel, A., Atlı, A., İzol, D. 2017. Khapra Beetle (*Trogoderma granarium* Everts, 1898) in Durum Wheat (*Triticum durum* Desf): Impacts on Some Seed Characteristics and Marketing Price. Türkiye Entomoloji Dergisi, 41(2), 207-218.
- [3] Donahaye, E.J., Messer, E. 1992. Reduction in Grain Storage Losses of Small-Scale Farmers in Tropical Countries. Research Report RR-91-7, The Allan Shawn Feinstein World Hunger Program, Brown University, USA, 19s.
- [4] Emekçi, M., Ferizli, A.G. 2000. Current Status of Stored Products Protection in Turkey. Integrated Protection of Stored Products IOBC Bulletin, 23(10), 39-46.
- [5] Rees, D. 2004. Insects of Stored Products. SBS Publishers & Distributors PVT. LTD., New Delhi, 181s.

- [6] Mason, L., McDonough, M. 2012. Biology, Behavior, and Ecology of Stored Grain and Legume Insects. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service, 14p, Kansas.
- [7] Canadian Grain Commission, 2019. Identify an insect <https://www.grainscanada.gc.ca/en/grain-quality/manage/identify-an-insect/> (Erişim Tarihi: 28.11.2019).
- [8] Bağcı, F., Yılmaz, A., Ertürk, S. 2014. Ankara İli Hububat Depolarında Bulunan Zararlı Böcek Türleri. Bitki Koruma Bülteni, 54(1), 69-78.
- [9] Coşkuncu, K. S. 2004. Bursa İli Un Fabrika ve Değirmenlerinde Zararlı Böcek Türleri. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 18(1), 33-44.
- [10] Özar, İ., Yücel, A. 1982. Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde Ambarlanan Hububat Ürün Zararlıları Üzerinde Sürvey Çalışmaları. Bitki Koruma Bülteni, 22(2), 89-98.
- [11] Öncüer, C. 1991. Türkiye Bitki Zararlısı Böceklerinin Parazit ve Predatör Kataloğu. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Basımevi, 314s, İzmir.
- [12] Soydanbay Tunçyürek, M. 1976. Türkiye’de Bitki Zararlısı Bazı Böceklerin Doğal Düşman Listesi, Kısım 1. Bitki Koruma Bülteni, 16, 32-46.
- [13] Chapman, R.B., Marris, J.V.M., Drummond, J.B. 2016. Survey of Insect Pests of Stored Grain in New Zealand. New Zealand Plant Protection, 69, 285-289.
- [14] Ergül, C., Dörtbudak, N., Akülke, A. 1972. Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesindeki Hububat ve Mamulleri ile Bakliyat Anbar Zararlılarının Yayılışı ve Zararı Üzerinde Araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni, 12(2),129-143.
- [15] Işıkbek, A.A., Özdamar, H.Ü., Karcı, A. 2005. Kahramanmaraş ve Adıyaman İllerinde Depolanmış Buğdaylar Üzerinde Rastlanan Böcek Türleri ve Bulaşma Oranları. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen ve Mühendislik Dergisi, 8(1), 107-113.
- [16] Tezcan, S., Karsavuran, Y., Pehlivan, E., Hava, J. 2004. Contribution to The Dermestidae (Coleoptera) Fauna of Turkey Alongwith New Records. Türkiye Entomoloji Dergisi, 28(1), 27-37.

Sericin-Montmorillonite Composite Nanoparticles as Drug Delivery System in Human Liver Cancer: Development, Drug Release, Cellular Uptake and Cytotoxicity

Oznur AKBAL VURAL *¹ 

¹Hacettepe University, Advanced Technologies Application and Research Center, 06800, Ankara, Turkey

(Alınış / Received: 17.12.2019, Kabul / Accepted: 05.03.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Keywords

Sericin,
Montmorillonite,
Composite nanoparticles,
Doxorubicin,
Drug delivery

Abstract: Composite nanoparticles obtained increasing interest because of their scientific and curative importance. Herein, sericin-montmorillonite composite nanoparticles (Ser-Mt NPs) were synthesized by taking advantage of the biodegradability and functional surface diversity of sericin, and biocompatibility and high adsorption properties of montmorillonite as natural resources. The composite nanoparticle was obtained by the desolvation technique and crosslinked with glutaraldehyde for the first time. Doxorubicin was selected to be used as a model anticancer drug to perform the loading and release studies. After chemical and morphological characterization studies with various methods such as Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy and Electron Microscopy, the cytotoxic effect of Ser-Mt composite NPs were qualitatively and quantitatively evaluated on HepG2 (human liver cancer cell line) cells. The results obviously exhibited that high drug loading capacity, sustainable drug release property and its effect on cancer cells made Ser-Mt composite NPs as a good candidate as a drug delivery system on cancer therapy with monodisperse, small average size and good polydispersity index.

İnsan Karaciğer Kanseri İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Serisin-Montmorillonit Kompozit Nanopartiküller: Geliştirilmesi, İlaç Salımı, Hücresel Alım ve Sitotoksiste

Anahtar Kelimeler

Serisin,
Montmorillonit,
Kompozit nanopartiküller,
Doksorubisin,
İlaç Dağıtım

Özet: Bilimsel ve iyileştireci özelliklerinden dolayı kompozit nanopartiküller artan ilgi görmüşlerdir. Burada, doğal kaynaklardan serisinin biyolojik olarak parçalanabilirliği ve fonksiyonel yüzey çeşitliliği ile montmorillonitin biyolojik uyumluluk ve yüksek adsorpsiyon özelliklerinden yararlanılarak serisin-montmorillonit kompozit nanopartiküller (Ser-Mt NPs) sentezlenmiştir. Kompozit nanopartiküller ilk defa desolvasyon tekniği ile sentezlenmiş ve glutaraldehit ile çapraz bağlanmıştır. Doksorubisin, yükleme ve salım çalışmalarını gerçekleştirmek için model antikanser ilaç olarak seçilmiştir. Zayıflatılmış Toplam Yansıma - Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi ve Taramalı Elektron Mikroskopu gibi çeşitli yöntemlerle yapılan kimyasal ve morfolojik karakterizasyon çalışmaları sonrasında Ser-Mt kompozit NP'lerin sitotoksik etkisi, HepG2 (insan karaciğer kanseri hücre hattı) hücreleri üzerinde kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, yüksek ilaç yükleme kapasitesi, sürdürülebilir ilaç salım özelliği ve kanser hücreleri üzerindeki etkisinin, monodispers, küçük ortalama boyut dağılımı ve iyi çoklu dağılım indeksine sahip Ser-Mt kompozit NP'lerini, kanser terapisi için ilaç dağıtım sistemi olarak iyi bir aday olduğunu açıkça göstermiştir.

1. Introduction

Nature has always offered us new possibilities and resources. Therefore, when looking for solutions to some problems or setting new possibilities, we must first look at our environment, that is, nature. Besides,

the development of nanotechnology allows more effective use of resources and of nature. For example, montmorillonite (Mt) is a natural clay mineral with nano-sized structure has many application areas from industry or engineering to medicine [1, 2]. Mt has a high ion exchange, adsorption ability, and

storage potential due to the regular arrangement in the structure. It belongs to the smectit group of clay minerals which means 2:1 clay that is two tetrahedral sheets of silica and an octahedral sheet of alumina located centrally [3]. Among these layers there are elements such as Mg, Na, K, and Ca which then can exchange with Al inside the octahedral sheet [4-6]. The replacement of lower valence cations causes the adjacent oxygen atoms with a net negative charge which may invite cations [7]. By this exchange, Mt can absorb a high amount of water and swells which gives Mt to attack the mucus layer in the body. These extraordinary properties have enabled the use of Mt in biomedical areas. Mt has been selected as a drug delivery system in cancer treatment by many researchers. The Mt was mixed with different polymer or protein to participate in the production of composite materials [8]. In this way, the unique properties of both Mt and the mixture material used were exploited.

Sericin is a natural macromolecule received from *Bombyx mori*, a silkworm. As another source from nature, sericin is a protein that contains 18 amino acids with very significant properties. For example, it is antibacterial and antimicrobial with high UV and oxidation resistance. Also, its functional surface has hydroxyl, carboxyl, and amino groups offer huge modification strategies that may include cross-linking, copolymerization, blending with polymers, etc. which ensure the new materials with improved properties [9,10]. Its molecular weight comes across from 10 to 400 kDa. Sericin with small molecular weight or sericin fragments that are soluble in cold water are used in cosmetics and the medical industry while with high-molecular weight which are soluble in hot water are used as biomaterials and biomembranes, copolymers, fibers and especially fabrics [10,11]. Nowadays, progress in biomaterial science has demonstrated promising potential, especially for protein based nanoparticles. Therefore, having diverse usage areas make sericin a good candidate to be selected as a part of drug delivery systems.

In decades, considerable attention on nanotechnology has affected the strategies on the development of successful theragnostic materials. By these strategies, the requirements for non-toxic and non-antigenic drug delivery agents with no or less side effects and improved stability of drugs can be provided. Therefore, natural and synthetic polymers were used to synthesized nanoparticles or as matrix materials which made them candidates for drug encapsulation.

In this study, sericin-montmorillonite composite nanoparticles (Ser-Mt NP) were synthesized by taking advantage of the unique properties of sericin and montmorillonite with the desolvation method and crosslinked with glutaraldehyde to increase the

stability. Doxorubicin (Dox), a chemotherapy drug, interferes with the proliferation of cancer cells by blocking topoisomerase 2 enzyme, was used as a model drug for cancer therapy. To characterize the morphology and chemical structure of the Ser-Mt NP; Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive Spectroscopy (EDS), Dynamic Light Scattering (DLS), Ultraviolet-Vis (UV-Vis) Spectroscopy, Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infra-Red (ATR-FTIR) Spectroscopy, Thermogravimetric Analysis (TGA), the in vitro Dox release profile was performed. The cytotoxic effect of Dox loaded Ser-Mt composite NPs was quantitatively evaluated on HepG2 cells by the microplate reader. Also, cellular uptake of the NPs was evaluated by the Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM).

2. Material and Method

2.1. Materials

For cell culture studies; PBS (pH 7.4), DMEM Ham's F-12 as growth medium with 10% FBS and 1% pen-strep and 1% L-glutamine, trypsin/EDTA, MTT were collected from Serva (Germany) for composite nanoparticle production; sericin, glutaraldehyde, montmorillonite K-10 (Mt), ethanol and Dox-HCl were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). HepG2 liver cancer cell line was collected from Hacettepe University Advanced Technologies Application and Research Center in Turkey. All chemicals and materials were used as collected with no treatment.

2.2. Methods

2.2.1. Composite nanoparticle development

Composite nanoparticles were developed with a desolvation method reported previously by [12,13] with brief modification. Desolvation is a self-assembly process especially used with proteins such as sericin or albumin that is managed by desolvation agents and the environmental conditions such as pH of the solution and the amount of protein.

Firstly, a 10 mg/mL sericin solution was prepared with ultrapure water. Then, 1mL of 3 % of Mt was prepared and added to 1mL of the aforementioned sericin solution. Nearly 3 mL of ethanol was added drop wisely as desolvating agents to the sericin-Mt mixture solution under constant stirring (650 rpm). When the color of the mixture turned to cloudy white after the addition of ethanol, 15 μ L of glutaraldehyde (GA) was used for cross-linking the amine ends of sericin. The prepared solution was kept under the speed of 650 rpm for 4 h at room temperature. Finally, the composite nanoparticle suspension was purified (12.000 rpm, 20 min) three times with ultrapure water to get rid of untreated materials. The obtained Ser-Mt composite nanomaterials were

suspended in 1 mL ultra-pure water and lyophilized at -80 °C under 0.1mbar atmosphere for 24 h for further experiments.

2.2.2. Characterization studies of Ser-Mt NPs

The morphology of the composite nanoparticles was collected and assessed by Electron Microscope (SEM) with a model of Tescan GAIA 3. Also, Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDX) was collected to demonstrate the incorporation of Mt into composite nanostructure. To perform the SEM and EDX studies, a trace amount of NPs was added on a stab and incubated under vacuum, and then covered with 5 nm of gold by using the Coating System (PECS).

The size and zeta potential of composite nanostructure were recorded by the Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern Instruments, UK). The analysis was performed at 25 °C and 173° backscatter angle. The electrophoretic mobility of the composite nanoparticle suspension was quantified and the data was altered to size and zeta potential by the Helmholtz Smoluchowski equation.

Absorbance records were collected to approve Dox, sericin, and montmorillonite in the construction of composite nanoparticles by UV-vis spectroscopy (Shimadzu, Japan). The study was performed at a normal climate condition between 190–800 nm.

The chemical bond identification of nanoparticles with and without drug was managed by Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR). The records were collected using Nicolet™ IS™ 50 spectrometer (Thermo Fisher Scientific). The FT-IR spectra were analyzed between 4000-600 cm⁻¹ wave numbers with 16 scans.

The thermal behavior of composite nanoparticles was evaluated by Thermogravimetric Analysis (TGA) (TA® instruments, DE). The results gathered by operating with a 10°C/min heating rate. The analysis was carried out under a 99.5% nitrogen atmosphere, within 25°C to 800°C.

2.2.3. Quantitative and qualitative determination of the cellular uptake of Ser-Mt NPs

To analyze the cellular uptake of Ser-Mt NPs quantitatively, cells were cultured in a 96-well plate exposure with Dox loaded Ser-Mt NPs (Dox/Ser-Mt NPs) suspension. First, 1.0 x 10⁴ cells/well were seeded on 96-well plate. After incubation overnight, the medium was renewed with fresh medium containing Ser-Mt NPs. The plate was conserved for 2 and 4 h. The nanoparticle suspension was placed on each wells. At separate times, the suspension was withdrawn and wells were cleaned with PBS. Triton X-100 (0.5%) was added to wells to rupture the cell

membranes. Then the cells were centrifuged and the supernatant was analyzed by a microplate reader [14], [15].

Qualitative cellular uptake of nanoparticles in HepG2 cells was recorded with an FV1000 model CLSM, Olympus, Japan). To do this, the cells were cultured in a 6-well plate including glass coverslip coated with poly-L-lysine (PLL) and stained with Alexa Fluor® 594 WGA that particularly attaches to the cell membrane by the help of manufacturer's protocol. Then, the composite nanoparticles were stained with FITC and added on the cells for 2 and 4 h incubation. Fluorescence responses were determined at 593/614 nm for WGA (red) and 488/530 nm for FITC (green).

2.2.4. Loading and release studies of doxorubicin

To prepare Dox/Ser-Mt composite NPs, a known amount of Ser-Mt blend was suspended in ultrapure water followed by the addition of Dox with 1 mg/mL concentration. Then 3 mL of ethanol was dropped to Dox and Ser-Mt blend and crosslinked with GA (8%), then incubated 4h at room temperature under stable stirring (600 rpm). The mixture was precipitated by centrifugation under 12000 rpm for 30 min to remove free Dox and excess additives and freeze-dried.

Encapsulation Efficiency (EE %) of Dox was estimated by Equation (1). A means the total amount of drug used and B the amount of unloaded drug.

$$EE (\%): [(A-B)/A] \times 100 \quad (1)$$

To conclude the amount of Dox released from the synthesized composite nanoparticles, 10 mg Dox-loaded nanoparticles were incubated into a dialysis bag (MWCO 8000–14000 Da) with 50 mL of PBS at pH 5.0 and 7.4 in a shaking water bath at 37 °C under constant shaking. At different times (1, 12, 24h) an amount of incubation medium was taken and absorbance values of dissolved Dox were quantified by spectrophotometer at 480 nm.

2.2.5. In vitro cytotoxicity assay (MTT)

In this study, cytotoxicity of the Ser-Mt composite nanoparticles with and without Dox on a HepG2 liver cancer cell line was assessed by MTT assay. Cells were placed in an incubator containing 5% CO₂ at 37 °C. DMEM- F 12 with 10% FBS and 1% L-glutamine was employed as a culture medium. The cells were collected after getting the desired confluency and 1.0 x 10⁵ cells/ml of the cells were placed to 96-well plate and conserved during the night under the same condition. The composite nanoparticles were prepared with different concentrations (1, 10, 25, 50, and 100 µg/mL) and pipetted to cells and preserved for 24h. After maintenance, the medium that contained composite nanoparticles was removed and

the MTT solution was placed to each well. After exposure for 4 h in the dark at 37 °C, 100 µl DMSO was dropped on cells. The formazan crystals in purple color metabolized from MTT dye by living cells were dissolved in DMSO. The plate was read at 570 nm in a microplate reader (Shimadzu, Japan) to conclude the percentage viability of the cells. All tests were performed in triplicate.

3. Results

3.1. Characterizations of Ser-Mt composite NPs

In this study, spherical and monodisperse composite nanoparticles were synthesized from Sericin (Ser) and montmorillonite (Mt) by self-assembling with desolvation technique. Mt has, mucoadhesive and water-uptake properties which make Mt a good candidate to be used by researchers, especially in drug release studies. Also, having no immunogenicity and excellent biocompatibility and carrying diverse bioactivities are the reason for its use in this study [12], [16]. Here, Mt was successfully incorporate with Sericin and formed a composite structure and then crosslinked with glutaraldehyde (GA) to form stable Ser-Mt composite nanoparticles for the first time in literature. Before, it has been concluded that the incorporation of clay minerals with nano-size into a template causes a noteworthy augmentation of the diverse key properties of these materials. Also, the synthesized composite nanoparticles were crosslinked with GA which reacts with amine ends of sericin protein through Schiff base (-C=N-) construction in which crosslinking stable Schiff bases were managed. The crosslinking of Ser-Mt NPs with GA occurred into the free amine groups of glutamic and aspartic acid (24%) residues of the sericin structure to construct Schiff base intermediates [17], [18].

3.2. SEM and EDX analysis

The synthesized Ser-Mt NPs were monodispersed and spherical shape as demonstrated in the SEM image (Figure 1.A) According to the SEM image, the mean size of composite nanoparticles was nearly 100 nm. The size distributions of composite nanoparticles from DLS measurements demonstrated consistency with those gathered from SEM analysis. Additionally, EDX analysis showed that Mt was intercalated into the Sericin (Figure 1.B). It is well known that Mt contains potassium (K), sodium (Na), aluminum (Al), magnesium (Mg), iron (Fe) and silicon (Si), and sericin contains carbon (C), nitrogen (N), and oxygen (O) in nature [19] which was demonstrated on the EDX spectrum. Therefore it can be concluded that Mt was successfully doped into sericin structure.

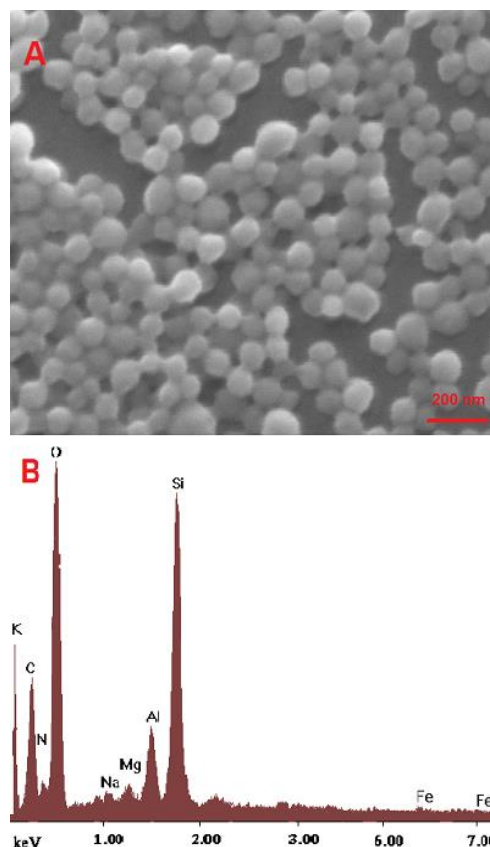


Figure 1. A) SEM image (scale bar: 200 nm), B) EDX spectrum of Ser-Mt composite NPs

3.3. Dynamic light scattering (DLS) analysis

In the study, composite nanoparticles were prepared before and after adding of Mt to sericin solution. The average diameter and zeta potential of Ser NP and Mt doped Ser composite NP with different concentrations were evaluated with DLS analysis. The results were demonstrated in Table 1. According to results the average size of Ser-Mt composite NP was found as 110 ± 2.6 nm with a good polydispersity index. The particle diameter frequency of Ser doped with 3 % (v/w) Mt nanoparticle was also presented in Figure 2. Also, the zeta potential was recorded as an average of -28.1 mV \pm 1.9 mV. As it was mentioned before, the size of the nanoparticle and zeta potential of the NP surface are two significant key affecting the duration of the circulation; distribution in the body, and therapeutic profit [20]. The nano-size is known to enhance the nanoparticle deposition in tumor side through an enhanced permeability and retention effect [21]. The negative zeta potential of the Ser-Mt NPs may improve antitumor efficacy because it interferes with the nanoparticle clearance and increases deposition in the target tissue.

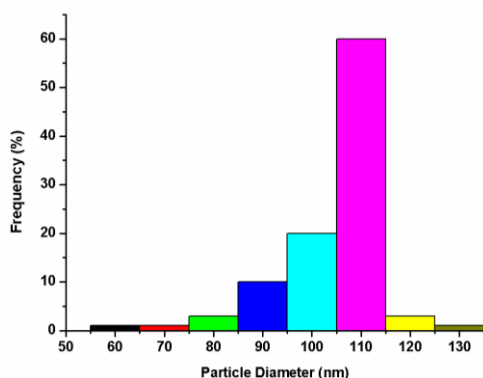


Figure 2. Particle size distribution of Ser-Mt composite NPs

Table 1. The average size, zeta potential and polydispersity index of different nanoparticle formulations

Sample Name	Zeta Pot. (mV)	Average size (nm)	Poly Dispersity Index
Ser NP	-32.0	101.1 ±1.6	0.336
Ser NP +1%Mt NP	-37.9	123 ±3.5	0.193
Ser NP +3%Mt NP	-42.4	174.3 ±2.7	0.083
Ser + 1%Mt NP	-26.7	160.2 ±4.0	0.116
Ser + 3%Mt NP	-28.1	110 ±2.6	0.019
Dox- Ser + 3%Mt NP	-25.4	122 ±3.9	0.109

3.4. UV-Vis spectroscopy analysis

The absorption spectra of Sericin, Mt, Dox, and Dox loaded Ser-Mt composite NPs were demonstrated in Figure 3. Free Sericin showed two absorption peak at 235 and 280 nm which was due to the backbone of Sericin and the aromatic structure, respectively. Mt performed an absorption peak nearly at 260 nm that can be ascribed to Fe³⁺ ions in the octahedral structure of Mt. The characteristic absorption peak of free Dox was seen at 490 nm on the spectrum. The absorption peaks came from Sericin, Dox and Mt were seen on the spectrum of Dox loaded Ser-Mt composite NPs which demonstrated the inclusion of both Dox and Mt into Sericin structure and formation of composite NPs [22-24].

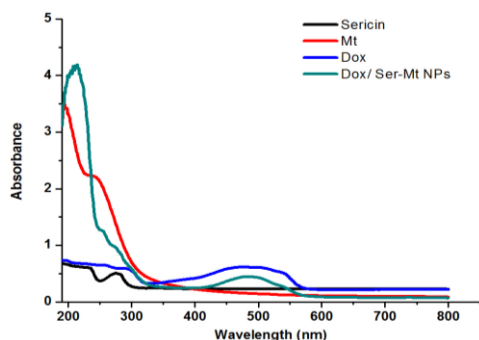


Figure 3. Uv-vis spectrum of Sericin, Mt, Dox and Dox/ Ser-Mt composite NPs

3.5. Infrared analysis

Figure 4 illustrated the FT-IR spectra of Sericin, Mt, Ser-Mt composite NP and Dox loaded Ser-Mt composite NP. In the spectrum, Sericin displayed characteristic bands at 1645 cm⁻¹, 1516 cm⁻¹ and 1235 cm⁻¹ for C = O stretching, N-H bending and C-N stretching of amide-I, amide-II and amide III, respectively, that belong to proteins [9,25-27]. In addition, the spectrum of Mt demonstrated the Si-O-Si stretching absorption band at 1016 cm⁻¹ which is characteristics of Mt and extensively used for its characterization which was also present in the Ser-Mt composite NPs spectrum with a small shift at 1040 cm⁻¹. Also, the peak at 880 cm⁻¹ was because of the Si-O-Al stretching and the peak at 1631 cm⁻¹ was attributed to OH distortion of the water that is also depicted in Ser-Mt composite NP spectrum together with Dox loaded Ser-Mt NPs with a small move in the absorption band and overlapped by sericin band at 1645 cm⁻¹. On the other hand, after Dox loading Ser-Mt composite NPs in addition to sericin and Mt absorption bands, new peaks were observed at Dox loaded Ser-Mt composite NPs spectrum. For example, the bands at 3624 cm⁻¹, 2947 cm⁻¹, 910 cm⁻¹, and 797 cm⁻¹ were attributed to quinone and ketone carbonyl groups which showed the -OH stretching vibration, C-H stretching, primary NH₂ vibration and N-H deformation bonds, respectively. Also, the absorption band at 1226 cm⁻¹ are due to C-O-C stretching while the band at 1406 cm⁻¹ was came from C-C stretching.

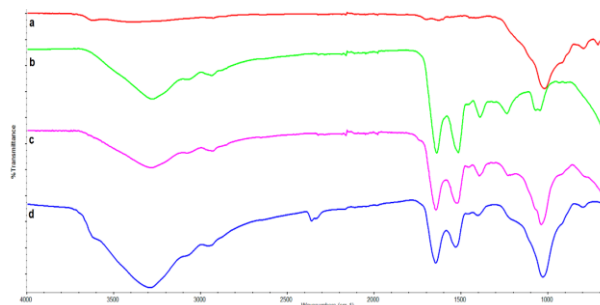


Figure 4. FT-IR spectrum of a) Mt, b) Sericin, c) Ser-Mt composite NP and d) Dox loaded Ser-Mt composite NPs.

The spectrum of Dox loaded Ser-Mt NP revealed the characteristic peaks of Sericin and Mt with a tiny move in the absorption frequency and the extra absorbance bands at the spectrum of Dox loaded Ser-Mt NP confirmed successful loading of Dox into composite nanoparticles. Therefore, it can be concluded that according to ATR-FTIR analysis, both Mt and Dox were successfully combined with Sericin [28-30].

3.6. Thermogravimetric analysis of composite NPs

The stability profiles against heat of Mt, sericin and Ser-Mt composite NPs were performed by TGA. Mt has constancy to high temperatures. In TGA

measurements, the Ser-Mt composite NPs were warmed up to 800 °C. Mt has high stability up to 800°C but loses some of its mass at about 400 °C due to the desorption of intercalated crystalline water molecules [31]. Sericin has a degradation temperature of 120°C. Degradation temperature of the Ser-Mt NPs was 400°C, while there was a residue of 50% at 800°C. Sericin was demoted and the remainder (28%) was due to it. TGA studies supported the interaction of the Mt with the Sericin due to mass change against temperature increase in time (Figure 5).

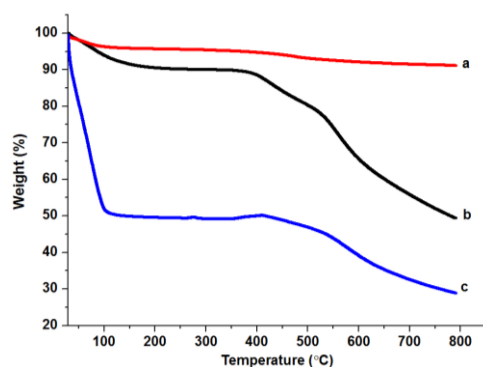


Figure 5. Thermogravimetric analysis of a) Mt, b) Ser-Mt nanoparticles and c) Sericin

3.7. Cellular uptake of Ser-Mt NPs by liver cancer cells (HepG2)

The qualitative cellular uptake of Ser-Mt NPs were recorded using a confocal laser scanning microscope. WGA dye (red fluorescence) and fluorescein isothiocyanate (FITC) (green fluorescence) were chosen to record the image of the membranes of HepG2 cells and Ser-Mt composite NPs, respectively. In this study, the time-dependent uptake of composite nanoparticles by HepG2 cells was performed (Fig. 6A). The cells were treated with Ser-Mt composite NPs for 2 and 4 h at 37 °C. The Ser-Mt composite NPs (green) were intimately placed around the cell membrane (red), marked by WGA, at 2h incubation, and more nanoparticles were observed to settle around the cell membrane and inside the cell at the 4h incubation, revealed that the NPs engulfed by the cells in a time-dependent manner. No auto-fluorescence was observed with HepG2 cells.

The quantitative cellular uptake efficiency of composite NPs were evaluated by a microplate reader that is important for therapeutic effects. Figure 6. B illustrated the uptake of composite NPs by HepG2 cells after 2 h and 4 h exposure with nanoparticles at 37 °C. It was clear the extended exposure time increased the take up of NPs by the cells. Cellular engulfment of nanoparticles could be orientated by particle size [14,32] different cancer cells, compositions of the nanoparticles, and hydrophobic/hydrophilic features of the surface [33].

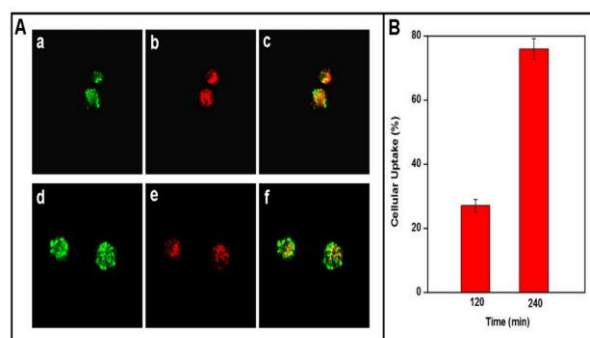


Figure 6. The qualitative (A) and quantitative (B) cellular uptake of Ser-Mt composite NPs. NPs (green) were incubated with HepG2 cells for 2 h (a, b and c) and 4h (d, e and f) and imaged with 40× mag by CLSM. The membranes of the cells were marked with CF594-WGA (red) (b and e). The uptake studies of FITC-blotted Ser-Mt composite NPs were recorded by the FITC section (left), CF594 section (middle), and combined CF594 and FITC sections (right), respectively.

The binding of nanoparticles to the cell membrane is the initial border of the nanoparticle engulfment process by the cell and this process appears to be widely affected by the surface zeta potential of the nanoparticles [34]. In this study, the zeta potential of the NPs are convenient to be chosen as drug carrier systems as aforementioned. Also, the small size of NPs help more of the composite nanoparticles to be taken into the cells. The results were also consistent with the qualitative cellular uptake results.

3.8. DOX Loading efficiency and in-vitro release studies

Drug loading efficiency or encapsulation efficiency (EE) was evaluated by the amount of Dox in the aq phase. The absorbance data of Dox released from composite nanoparticles were analyzed at 480 nm [35]. The mortality rates of cancer cells are affected by EE of NPs. The EE is a requirement for the efficiency of NP used as drug carrier systems [36]. Therefore, EE % of Dox in the Ser-Mt NPs were found to be $79.0 \pm 3.3\%$. Mt has high water uptake and a silica layer containing a high inner area that increases the inclusion of Dox [37]. The FTIR spectra of Dox-loaded Ser-Mt nanoparticles were acquired and proved the loading of Dox.

The drug release studies for Ser- Mt NPs were performed with PBS (pH 7.4 and 5.0) as release medium (Figure 7). Dox release tests demonstrated that after 21 days, 27% and 76% Dox was released from Ser-Mt composite NPs at pH 7.4 and 5.0, respectively. In the study, Mt could adsorb Dox, both at its intercalated in and out layered construction. Dox released from NPs happened by diffusion. As was mentioned before, Mt helps to enhance the crosslinking of NPs due to its layered construction; hence, the internalization of Mt both enhanced the Dox EE and caused a slow and prolonged Dox release [12,38,39].

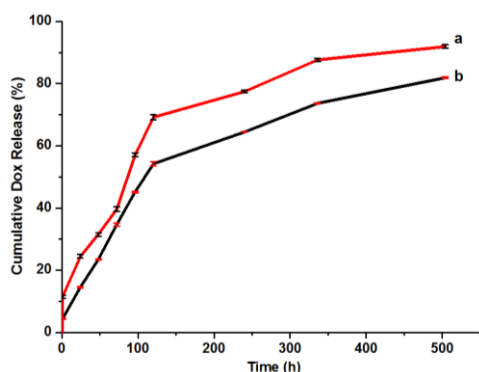


Figure 7. Dox released from Ser-Mt composite NPs a) at pH 5.0 and b) at pH 7.4.

3.9. In vitro cytotoxicity assay (MTT)

The effect of different concentrations of Ser-Mt composite NPs with and without Dox was evaluated on the HepG2 cell line (Figure 8). As known, Dox is a chemotherapeutic drug with side effects such as cardiotoxicity in dose-dependent manner. Therefore, to maximize the effectiveness of Dox in tumor tissue with minimal side effects it should be used with a suitable carrier agent [40]. Here, the fabricated Ser-Mt composite NPs were used as Dox carrier. After 24h exposure of nanoparticle formulations, MTT assay was performed. According to Fig. 8, The Ser-Mt composite NPs demonstrated no toxicity that demonstrated its safety, but the Dox-loaded Ser-Mt composite NPs showed quite toxic side effects on the HepG2 cells. The viability was recorded as $105.3 \pm 4.2\%$, 73.8 ± 3.9 and 41.7 ± 3.2 for 100- $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Ser-Mt composite NPs, Dox loaded Ser-Mt composite NPs and free Dox, respectively.

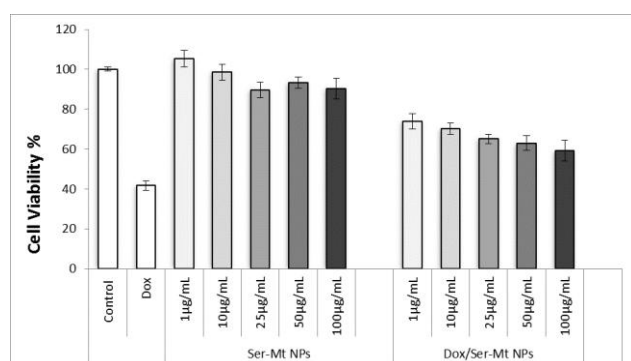


Figure 8. Cytotoxicity of Ser-Mt and Dox loaded Ser-Mt composite NPs. Data was given as percent of mean and standard error (SD) from three independent analysis.

4. Discussion and Conclusion

In conclusion, Ser-Mt composite nanoparticles were synthesized with the desolvation method. Various characterization studies have been conducted and the structure of synthesized composite nanoparticles in accordance with these studies has been revealed. The NPs were crosslinked with glutaraldehyde which reacts with amine ends of sericin protein through

Schiff base ($-\text{C}=\text{N}-$) construction in which with crosslinking stable Schiff bases were managed. Also, the addition of Mt to the nanoparticle structure provided an extra crosslinking due to its smectite structure that was also increased the drug loading capacity due to high water uptake properties.

Doxorubicin was chosen as model cancer drug and HepG2 human liver cancer cell line was used as a model cancer cell for uptake and cytotoxicity studies. The Dox-loaded Ser-Mt composite NPs performed significantly in vitro cytotoxic effects on HepG2 cells, which resulted in high cytotoxicity with high uptake features. Dox has side effects like many other chemotherapy drugs [41]. Therefore, it is very important to move it to the desired area in the body without damaging healthy cells [42]. To solve these, nanoscale materials were developed with the contribution of nanotechnology and used as a drug delivery system. In the presented study, MTT cytotoxicity test was applied and cellular uptake was evaluated. It is known that when Dox is applied alone, it kills approximately 60% of the cells, and when applied in the body, it may damages healthy cells. With the carrier system prepared, only 27% of the cells died, but it was predicted that healthy cells were not damaged. The results implied that the Ser-Mt composite NPs could have high potentials to be used as a drug delivery agent in cancer therapy. However, the results obtained in this study should be supported with further studies with animal modals.

Acknowledgment

I want to thank Prof. Dr. Serdar ABACI and Yesim Tugce YAMAN for their technical support, expertise, and stimulating discussions.

References

- [1] Murray, H.H. 2000. Traditional and new applications for kaolin, smectite, and palygorskite: a general overview. *Applied Clay Science*. 17, 207–221.
- [2] Uddin, F. 2008. Clays, nanoclays, and montmorillonite minerals, *Metallurgical and Materials Transactions A-Physical Metallurgy and Materials Science*, 39, 2804–2814.
- [3] Yao, B.O., Li, C., Yang, F.E.I., Sun, G. 2018. Isothermal crystallization properties and improved rheological performance of waxy crude oil using polyoctadecylacrylate - Modified montmorillonite composite as a pour point depressant, *Clays and Clay Mineral*, 66, 233–244.
- [4] Velde, B. 1992. *Introduction to Clay Minerals*, Springer, Dordrecht.
- [5] Brigatti, M.F., Galn, E., Theng, B.K.G. 2013. *Structure and Mineralogy of Clay Minerals*.

- [6] Schoonheydt, R.A., Johnston, C.T. 2011. The surface properties of clay minerals. Layered Mineral Structures and their Application in Advanced Technologies. 335–370.
- [7] B. Velde. 1977. Clays and Clay Minerals In Natural And Synthetic Systems, 21st ed., Elsevier Scientific Publishing Company, New York.
- [8] Hernández, K.A.H. 2016. Polymer-Clay Nanocomposites and Composites: Structures, Characteristics, and their Applications in the Removal of Organic Compounds of Environmental Interest, Medicinal Chemistry, 6, 201–210.
- [9] Gupta, D., Agrawal, A., Rangi, A. 2014. Extraction and characterization of silk sericin, Indian Journal of Fibre Textile Research, 39, 364–372.
- [10] Zhang, Y.Q. 2002. Applications of natural silk protein sericin in biomaterials, Biotechnology Advances, 20, 91–100.
- [11] Das, S.K., Dey, T., Kundu, S.C. 2014. Fabrication of sericin nanoparticles for controlled gene delivery, RSC Advances, 4, 2137–2142.
- [12] Dong, Y., Feng, S.S., 2005. Poly (D,L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs, Biomaterials, 26, 6068–6076.
- [13] Akbal, O., Vural, T., Malekghasemi, S., Bozdoğan, B., Denkbaş, E.B. 2018. Saponin loaded montmorillonite-human serum albumin nanocomposites as drug delivery system in colorectal cancer therapy, Applied Clay Science. 166, 214–222.
- [14] Hu, Y., Xie, J., Tong, Y.W., Wang, C.H. 2007. Effect of PEG conformation and particle size on the cellular uptake efficiency of nanoparticles with the HepG2 cells, Journal of Controlled Release, 118, 7–17.
- [15] Akbal, Ö., Erdal, E., Vural, T., Kavaz, D., Denkbaş, E.B. 2017. Comparison of protein- and polysaccharide-based nanoparticles for cancer therapy: synthesis, characterization, drug release, and interaction with a breast cancer cell line, Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology, 45, 193–203.
- [16] Sarmah, M., Banik, N., Hussain, A., Ramteke, A., Sharma, H.K., Maji, T.K. 2015. Study on crosslinked gelatin/montmorillonite nanoparticles for controlled drug delivery applications, Journal of Material Science, 50, 7303–7313.
- [17] Huang, L., Tao, K., Liu, J., Qi, C., Xu, L., Chang, P., Gao, J., Shuai, X., Wang, G., Wang, Z., Wang, L. 2016. Design and Fabrication of Multifunctional Sericin Nanoparticles for Tumor Targeting and pH-Responsive Subcellular Delivery of Cancer Chemotherapy Drugs, ACS Applied Materials & Interfaces, 8, 6577–6585.
- [18] Langer, K., Anhorn, M.G., Steinhäuser, I., Dreis, S., Celebi, D., Schrickel, N., Faust, S., Vogel, V. 2008. Human serum albumin (HSA) nanoparticles: Reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation, International Journal of Pharmacology, 347, 109–117.
- [19] Harun, F.W., Almadani, E.A., Radzi, S.M. 2016. Metal cation exchanged montmorillonite K10 (MMT K10): Surface properties and catalytic activity, Journal of Scientific Research and Development, 3, 90–96.
- [20] Banerjee, A., Qi, J., Gogoi, R., Wong, J., Mitragotri, S. 2016. Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery. Journal of Controlled Release, 238, 176–185.
- [21] Jain, A., Singh, S.K., Arya, S.K., Kundu, S.C., Kapoor, S. 2018. Protein Nanoparticles: Promising Platforms for Drug Delivery Applications, ACS Biomaterial Science and Engineering, 4, 3939–3961.
- [22] Ghosh, P., Bag, S., Roy, S.A., Subramani, E., Chaudhury, K., Dasgupta, S. 2016. Solubility enhancement of morin and epicatechin through encapsulation in an albumin based nanoparticulate system and their anticancer activity against the MDA-MB-468 breast cancer cell line. RSC Advances, 6, 101415–101429.
- [23] Shahabadi, N., Fili, S.M., Kashanian, S. 2018. Human serum albumin interaction studies of a new copper (II) complex containing ceftobiprole drug using molecular modeling and multispectroscopic methods. Journal of Coordination Chemistry, 71, 329–341.
- [24] Zhou, S.M., Ma, D.K., Zhang, S.H., Wang, W., Chen, W., Huang, S.M., Yu, K. 2016. PEGylated Cu₃BiS₃ hollow nanospheres as a new photothermal agent for 980 nm-laser-driven photothermochemotherapy and a contrast agent for X-ray computed tomography imaging. Nanoscale, 8, 1374–1382.
- [25] Cho, K.Y., Moon, J.Y., Lee, Y.W., Lee, K.G., Yeo, J.H., Kweon, H.Y., Kim, K.H., Cho, C.S. 2003. Preparation of self-assembled silk sericin nanoparticles, International Journal of Biological Macromolecules, 32, 36–42.
- [26] Suktham, K., Koobkokkrud, T., Wutikhun, T., Surassmo, S. 2018. Efficiency of resveratrol-loaded sericin nanoparticles: Promising bionanocarriers for drug delivery, International Journal of Pharmacology, 537, 48–56.
- [27] Wu, J.H., Wang, Z., Xu, S.Y. 2007. Preparation and characterization of sericin powder extracted from silk industry wastewater. Food Chemistry, 103, 1255–1262.

- [28] Wu, S., Zhao, X., Li, Y., Du, Q., Sun, J., Wang, Y., Wang, X., Xia, Y., Wang, Z., Xia, L. 2013. Adsorption Properties of Doxorubicin Hydrochloride onto Graphene Oxide: Equilibrium, Kinetic and Thermodynamic Studies. *Materials (Basel)*, 6, 2026–2042.
- [29] Victor, S.P., Paul, W., Jayabalan, M., Sharma, C.P. 2014. Supramolecular hydroxyapatite complexes as theranostic near-infrared luminescent drug carriers, *CrystEngComm*, 16, 9033–9042.
- [30] Pradhan, N., Rajkhowa, H., Giri, H., Shrestha, B. 2015. Simultaneous spectrophotometric estimation of moxifloxacin hydrochloride and doxorubicin hydrochloride. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7, 21–26.
- [31] Vasić, M.V., Pezo, L., Zdravković, J.D., Bačkalić, Z., Radojević, Z. 2017. The study of thermal behavior of montmorillonite and hydromica brick clays in predicting tunnel kiln firing curve. *Construction and Building Materials*, 150, 872–879.
- [32] Zauner, W., Farrow, N.A., Haines, A.M. 2001. In vitro uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density., *Journal of Controlled Release*, 71, 39–51.
- [33] Jung, T., Kamm, W., Breitenbach, A., Kaiserling, E., Xiao, J.X., Kissel, T. 2000. Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake?. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50, 147–160.
- [34] Lorenz, M.R., Holzapfel, V., Musyanovych, A., Nothelfer, K., Walther, P., Frank, H., Landfester, K., Schrezenmeier, H., Mailander, V. 2006. Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells., *Biomaterials*, 27, 2820–2828.
- [35] Niu, G., Cogburn, B., Hughes, J. 2010. Preparation and characterization of doxorubicin liposomes. *Methods in Molecular Biology*, 624, 211–219.
- [36] Yue, P.F., Lu, X.Y., Zhang, Z.Z., Yuan, H.L., Zhu, W.F., Zheng, Q., Yang, M. 2009. The study on the entrapment efficiency and in vitro release of puerarin submicron emulsion. *AAPS PharmSciTech*, 10, 376–383.
- [37] Hua, S., Yang, H., Wang, W., Wang, A. 2010. Controlled release of ofloxacin from chitosan-montmorillonite hydrogel. *Applied Clay Science*, 50, 112–117.
- [38] Fomi, F., Iannuccelli, V., Coppi, G., Bernabei, M.T. 1989. Effect of Montmorillonite on Drug Release from Polymeric Matrices. *Archiv der Pharmazie*, 793, 789–793.
- [39] Lee, W., Jou, L. 2004. Effect of the Intercalation Agent Content of Montmorillonite on the Swelling Behavior and Drug Release Behavior of Nanocomposite Hydrogels, *Journal of Applied Polymer Science*, 94, 74–85.
- [40] Elsadek, B., Kratz, F. 2012. Impact of albumin on drug delivery - New applications on the horizon. *Journal of Controlled Release*, 157, 4–28.
- [41] Wang, S., Konorev, E. A., Kotamraju, S., Joseph, J., Kalivendi, S., Kalyanaraman, B. 2004. Doxorubicin Induces Apoptosis in Normal and Tumor Cells via Distinctly Different Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 25535–25543.
- [42] Asadishad, B., Vossoughi M., Alamzadeh, I. 2010. In vitro release behavior and cytotoxicity of doxorubicin-loaded gold nanoparticles in cancerous cells. *Biotechnology Letters*, 32, 649–654.

The Improvement Photoresponsivity of ZnO Based Photodiode with Indium Doping

Serif RUZGAR*¹ 

¹Batman University, Vocational High School of Health Services, 72040, Batman, Turkey

(Alınış / Received: 18.12.2020, Kabul / Accepted: 20.03.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Keywords

Sol-gel,
Photodiode,
Indium,
ZnO

Abstract: The heterojunction photodiodes with undoped ZnO and Indium (In) doping ZnO thin films have been grown on p type silicon wafer by solution based spin coating method. The crystal structure analyzes of the films show that they have amorphous nature. The electrical characterizations of diodes have been performed by classical I-V and C-G-V technique. The minimum ideality factor of 3.97 and minimum series resistance of 7.2 kΩ have been recorded from 5% In doping ZnO/p-Si diode. The phototransient measurements show that photodiodes react fast to visible light and have a good reproducibility switching cycle. Similarly, the highest photosensitivity of 3.15×10^3 and responsivity of 2.02 A/W have been obtained from 5% In doping ZnO/p-Si photodiode. This study indicates that the doping of In improves the electrical and optoelectrical performance of ZnO based photodiodes.

İndiyum Katkısı ile ZnO Tabanlı Fotodiyotun Fototepki Özelliğinin Geliştirilmesi

Anahtar kelimeler

Sol-jel,
Fotodiyot,
İndiyum,
ZnO

Özet: Katkısız ZnO ve İndiyum (In) katkılı ZnO ince filmler sol-gel spin kaplama yöntemi ile p-Si substratı üzerinde büyütülerek, heteroeklem fotodiyotlar üretilmiştir. Filmlerin kristal yapı analizleri, amorf yapıya sahip olduklarını göstermektedir. Diyotların elektriksel karakterizasyonu geleneksel I-V ve C-G-V tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Minimum idealite faktörü ve minimum seri direnç 3.97 ve 7.2 kΩ olarak % 5 In katkılı ZnO/p-Si diyotundan elde edilmiştir. Fotogeçiş ölçümleri, fotodiyotların görünür ışığa hızlı tepki verdiğini ve iyi bir tekrarlanabilirlik anahtarlama döngüsüne sahip olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, 3.15×10^3 'lük en yüksek ışığa duyarlılık ve 2.02 A/W'nin duyarlılığı % 5 İndiyum katkılı ZnO/p-Si fotodiyotundan elde edilmiştir. Bu çalışma, İndiyum katkısının ZnO bazlı fotodiyotların elektriksel ve optoelektrik performanslarını geliştirdiğini göstermektedir.

1. Introduction

Transparent conductive oxides (TCOs) have recently been intensively studied in microelectronic and optoelectronic applications owing to their high electrical conductivity and high optical transparency [1-3]. TCO layers in optoelectronic devices are generally employed as collector and transporter of photogenerated electrons. Therefore, their optical transparency and electrical conductivity must be high [4]. Among the application of TCOs, the optoelectronic photodiode devices sense the incident light and convert it into electrical signals. When photons with higher energy than the optical band gap of photodiode device materials are absorbed, electron and hole pairs occur. These carriers create an increase in current and flow in an external circuit.

The photodiodes operate in reverse bias region. Therefore, the difference between the dark current and the photocurrent of photodiodes is clear in the reverse bias region compared with the forward bias region. The scientists carry out intensive studies on the improvement of the materials used in photodiode fabrication to enhance the light-sensing features of photodiodes. The photodiodes are utilized in various electronic and optoelectrical applications such as civil and military technology [5]. Among TCOs, ZnO is an attractive multifunctional material due to excellent properties such as low resistance, large exciton binding energy (60 meV), high direct broadband energy, high transparency, high thermal and mechanical stability [2,6,7]. Besides all these advantages, ZnO is non-toxic, environmentally friendly and economical due to its abundance in nature.

*Corresponding author: serif.ruzgar@batman.edu.tr

The presence of intrinsic defects causes the ZnO to exhibit n-type electrical characteristics [8]. Also, the type and carrier concentration of ZnO can be altered with different dopant ions. Therefore, to enhance optical and electrical features of ZnO, doping is generally intended to replace the Zn^{+2} ion with the dopant metal of higher valence electrons such as Indium (In^{+3}), Aluminum (Al^{+3}), Tin (Sn^{+4}) [2,9]. Suitable electronegativity and ionic radius, high oxidation resistance and low reactivity of In make it a more attractive dopant to improve photoelectrical performance of ZnO [10]. Also, it has been shown in many studies in the literature that In increases conductivity by increasing the carrier concentration of ZnO [8,11]. The high conductivity and transmittance obtained by In doping in ZnO thin films make it possible to fabricate high-speed photodetectors and transparent electrodes for solar cells [12]. The effect of In doping on the electrical and optical characteristics of the ZnO semiconductor film has been extensively studied. But, the effect of In doping on ZnO-based photodiodes has not been widely investigated. Therefore, there is still some lack of information to understand the behavior of low In doping on the optoelectronic parameters of the ZnO-based photodiode.

The ZnO thin films with In doping can be grown by various deposition methods such as rf helicon magnetron sputtering [12], pulsed laser deposition [13], remote-plasma-enhanced metalorganic chemical deposition (RPE-MOCVD) [14], electrospinning technique [15], sol-gel method [16]. Among these methods, the solution based spin coating has many advantages such as having low fabrication cost, no need for high vacuum, applicability method for large area deposition and suitability for laboratory experiments [17].

In this study, In was selected as dopant material for ZnO semiconductor material owing to the aforementioned advantages. The ZnO thin films with various indium concentrations were deposited on p type Si to fabricate heterojunction structures. The aim of this study is to examine the influence of In doping on morphological and structural features of ZnO thin films and on the optoelectronic properties of fabricated diodes.

2. Materials and Methods

In this experiment, amorphous undoped ZnO and doped ZnO with various In percentage were coated on p-Si by spin coating method. The details of the experiment were given in our previous study [18]. Unlike the materials used in the previous experiment, only the Indium chloride ($InCl_3$) was used instead of the Tin (IV) chloride as a dopant source. Prepared undoped ZnO and doped ZnO solutions having different percentages of In were grown on the p-Si

substrate with spin speed of 3000 rpm for 30s. The undoped and In doped ZnO films were subjected to preliminary drying at 300° C for 10 minutes. This process was repeated four times for each photodiode to ensure ZnO well deposited. After spin-coating and drying, all photodiodes were annealed at 750° C for 2h. Finally, aluminum was evaporated on top of ZnO thin films to form ohmic contact. Figure 1 illustrates the schematic structure of the photodiode. The crystalline structures of undoped and doped thin films, the surface roughness of thin films and optoelectrical properties of photodiodes were analyzed by X-ray diffractometer (XRD), Atomic Force Microscop (AFM) and Electrical Characterization System, respectively.

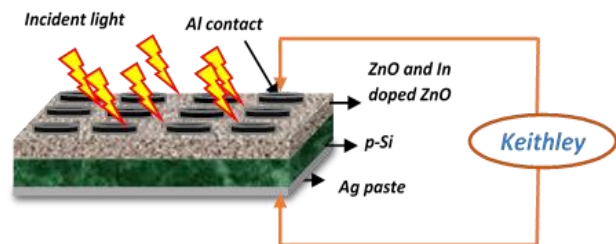


Figure 1. The schematic diagram of the photodiode structure

3. Results

The crystallinity of thin films was performed by X-ray diffractometer (XRD) between 30° and 50°. The XRD pattern of thin films is indicated in Figure 2. All films indicate amorphous characteristics due to the absence of any sharp peak.

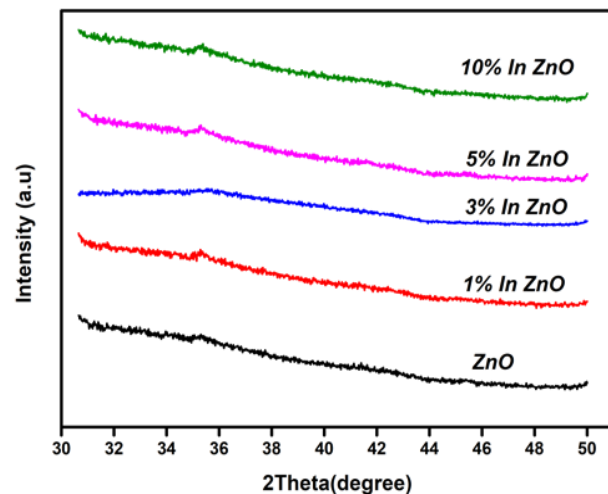


Figure 2. The X-ray diffraction patterns of ZnO and In doped ZnO thin films

The surface roughness of thin films was indicated in Figure 3(a-e). The 3D AFM images of thin films illustrate that the morphologies of films are clearly influenced by In concentration. AFM images show that the films grow homogeneously without void and porosity. The values of the root mean square (RMS) roughness were obtained for undoped ZnO, 1%, 3%, 5% and 10% In doped films as 15.74 nm 13.24 nm

13.06 nm 17.52 nm 30.76 nm, respectively. The increase in the roughness of the films with doping can be ascribed to the deposition of Indium oxide nanoparticles on the surface of the ZnO films [19]. Increasing the surface roughness of the films with the doping may cause an increase in the optical absorption of the films. The increase in optical absorption increases the number of photo-generated carriers. Thus, the responsivity of the photodiodes may be increased with In doping [7].

The I - V measurements of the photodiodes are illustrated under the dark condition and various irradiance intensities in Figure 4(a-e). The forward-to-reverse current ratio of photodiodes at $\pm 4V$ varies between 1.86×10^1 and 4.23×10^3 . Also, the electrical parameters of each photodiode are summarized in Table 1. When Figure 4 is examined, it is seen that the I - V characteristics of the photodiodes are directly related to the In doping concentration. To examine the electrical performance of diodes, the key electrical parameters of diodes can be obtained from Current-Voltage graphs by using standard heterojunction diode equation. The current of diode according to standard equation can be given as [20];

$$I = I_0 \left[\exp \left(\frac{q(V - IR_s)}{\eta kT} \right) - 1 \right] \quad (1)$$

Here, I_0 is the saturation of reverse current, q is the electronic charge, η is the ideality factor, k is the Boltzmann constant, T is the temperature, V is the voltage and R_s is the series resistance. The saturation current can be extracted from the extrapolation of linear part of forward I - V region. The η value which describes the diode performance can be extracted from the following equation;

$$\eta = \left(\frac{q}{kT} \right) \left(\frac{\partial V}{\partial \ln(I/I_0)} \right) \quad (2)$$

When the obtained results are examined, the η values of diodes range from 3.97 to 5.67 for the varying In doping concentration. The Φ_B values of diodes show increasing tendency from 0% to 1% In doping. Then, it decreases from 3% to 10%. The trivalent In can increase the carrier concentration of ZnO because it acts as a donor in ZnO semiconductor layer [8,11]. Therefore, the decrease in barrier height in schottky diodes can be defined by an increase in the carrier concentration depending on In concentration [21]. The ideality factor value is higher than 1, indicating that diodes exhibit non-ideal behavior.

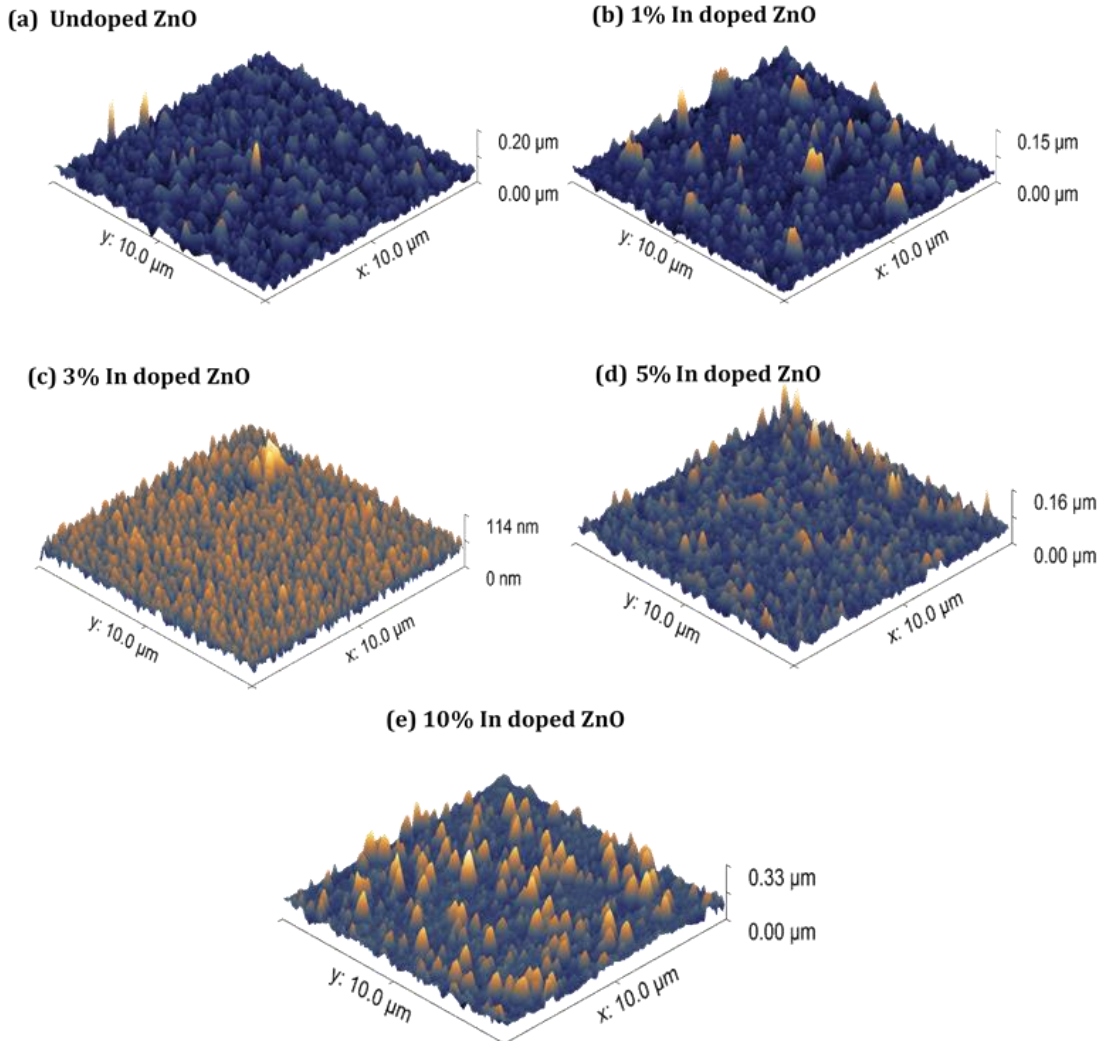


Figure 3. The 3D AFM images of ZnO and In doped ZnO thin films

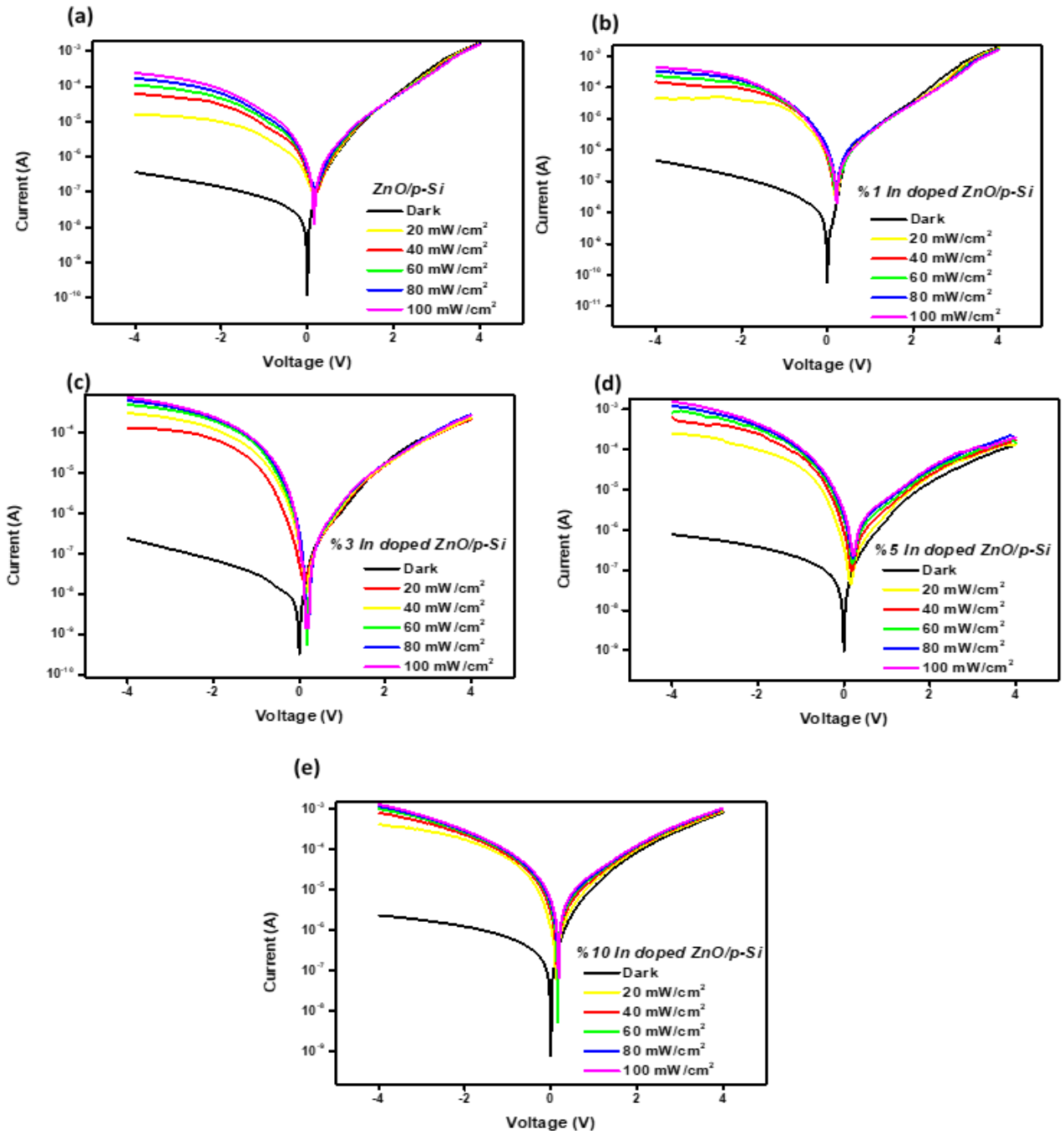


Figure 4. The Current-Voltage characteristics of undoped ZnO and In doped ZnO photodiodes

The non-ideal behavior of diodes is attributed to the interface layer, image force effects, series resistance and oxide layer between n-ZnO and p-Si [22]. The ideality factor and rectification ratio values of the fabricated photodiodes as well as the barrier heights (Φ_B) values are summarized in Table 1. The reverse bias currents of the fabricated photodiodes increase with the light intensity, which is a typical characteristic of photodiodes. The internal and external electric fields are in the same direction in reverse bias for the depletion region of diodes. The recombination process in the reverse bias region takes place less than the forward bias. Therefore, the difference between dark and photocurrent is more clear in the reverse bias region [23]. This case shows that diodes exhibit photoconductivity behavior [24].

The photosensitivity is a key parameter for photodiodes and can be extracted from the following equation;

$$S = \frac{I_{\text{photocurrent}} - I_{\text{darkcurrent}}}{I_{\text{darkcurrent}}} \quad (3)$$

The highest photosensitivity value of photodiodes was obtained from 5% In doped ZnO/p-Si as 3.15×10^3 under 100 mW/cm^2 at -4V and tabulated in Table 1. When η is higher than unity, it can be used the Norde [25] method to calculate some parameters of diodes such as series resistance and Φ_B . This modified method can be expressed by the following equation;

$$F(V) = \frac{V_0}{\gamma} - \frac{kT}{q} \ln \left(\frac{I(V)}{A^*AT^2} \right) \quad (4)$$

Here, γ is the integer greater than η and $I(V)$ represents the current of forward I - V region of diode.

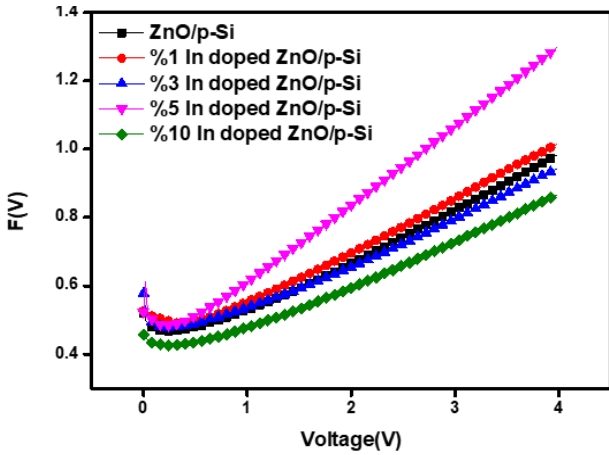


Figure 5. Modified Norde graph of photodiodes

The modified Norde graph of photodiodes $[F(V)-V]$ graph is illustrated in Figure 5. By rearranging the Norde function, the R_s and the Φ_B values can be extracted from the following equations:

$$\phi_B = F(V_0) + \frac{V_0}{\gamma} - \frac{kT}{q} \quad (5)$$

$$R_s = \frac{kT(\gamma - n)}{qI_0} \quad (6)$$

Here, $F(V_0)$ and V_0 represent the minimum point of $F(V)$ and the corresponding voltage value, respectively. The determined Φ_B and R_s values by these equations are given in Table 1. The Φ_B obtained by Norde method has a similar tendency to the Φ_B values obtained by thermionic emission theory. The Φ_B values increase from 0.49 eV to 0.54 eV for increasing In concentration rate from 0% to 1%. Then, it decreases from 0.51 eV to 0.44 eV for increasing In concentration rate from 3% to 10%. The R_s values of fabricated diodes are different values with increasing In doping. In addition, the lowest series resistance was obtained as 7.2 k Ω from 5% In doping ZnO/p-Si diode. To analyze the performance of a photodetector, one of the key characterizations is photoswitching behavior. This behavior can be studied by transient photocurrent

behavior under a constant voltage [26,27]. Figure 6 indicates the transient photocurrent graphs of fabricated photodiodes. The transient photocurrent curves show exponentially increasing and decreasing photocurrents of photodiodes by switching the light on and off under various light intensities. The fast response of photodiodes to light and their reproducibility switching cycle allows them to be a good candidate for photodetectors. Figure 7 (a) shows the responsivity (R) of photodiode versus In doping concentration. The R can be given by the following equation [28];

$$R = \frac{I_{\text{photocurrent}}}{I_{\text{inc}}} \quad (7)$$

Here, I_{inc} represent incident illumination power. The responsivity of photodiodes varies with In concentration. The R -values of the photodiodes increase by up to 5% In doping ZnO/p-Si diode, then decrease under 100mW/cm² at -4V. The highest responsivity of 2.02 (A/W) was obtained from 5% In doping ZnO/p-Si diode. This high photoresponse value indicates that the sensitivity of ZnO can be improved by adequate In doping. The photoresponse values of the fabricated photodiodes are much higher than most published researches on the undoped and doped ZnO/p-Si photodiodes [26,29-31]. Also, to determine the photoconductivity mechanisms of photodiodes, the following equation can be used [32];

$$I_{ph} = AP^\beta \quad (8)$$

Where I_{ph} , A , P and β represent photocurrent, constant, light intensity and an exponent, respectively. The logarithmic graph of the light intensity versus the photocurrent was plotted and illustrated in Figure 7 (b). The values of β for photodiodes were extracted from the slope of Figure 7 (b) and tabulated in Table 1.

The $\beta = 1$ indicates that monomolecular recombination is dominant in the photodiode, $\beta=0.5$ shows that bimolecular recombination is dominant. Whereas, $0.5 < \beta < 1$ and $1 < \beta$ represent the presence of a continuous distribution of trapping centers in the band and photoconductivity mechanism with superlinear behavior, respectively [32,33].

Table 1. The calculated electrical and optoelectrical parameters of photodiodes

Diodes	RR (dark,±4V)	n (I-V)	Φ_b (I-V) (eV)	Φ_b Norde (eV)	R_s Norde (k Ω)	β	S (-4V,I-V)	Responsivity (A/W)
ZnO/p-Si	4.23×10 ³	4.72	0.71	0.49	43.9	1.66	6.50×10 ²	0.30
1% In doped	9.62×10 ²	4.10	0.75	0.54	116.2	1.41	9.54×10 ²	0.57
3% In doped	8.65×10 ¹	5.21	0.73	0.51	233.3	1.09	2.07×10 ³	0.95
5% In doped	1.86×10 ¹	3.97	0.72	0.50	7.2	1.13	3.15×10 ³	2.02
10% In doped	1.97×10 ²	5.67	0.67	0.44	14.4	0.71	5.62×10 ²	1.67

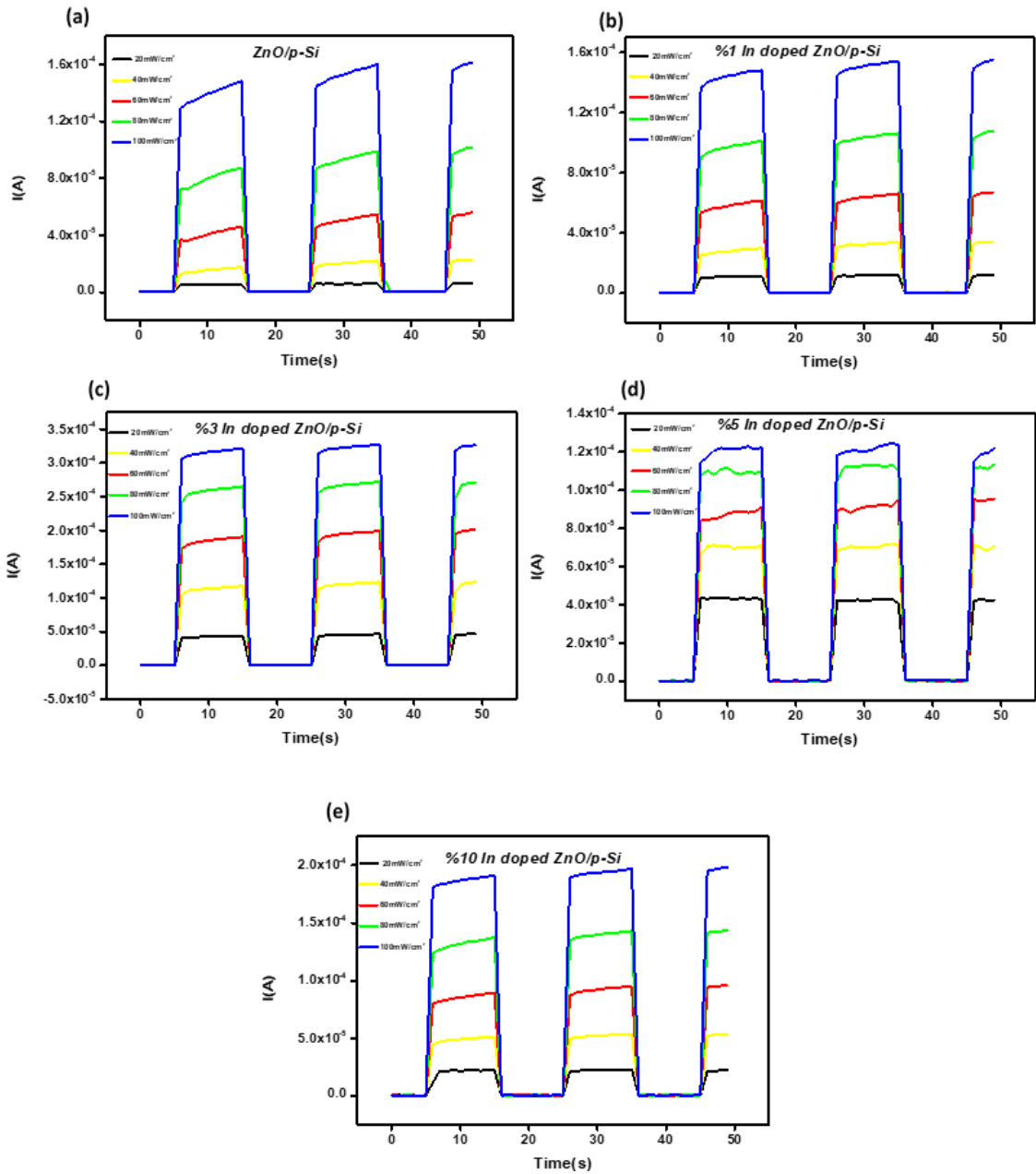


Figure 6. The transient photocurrent graphs of photodiodes

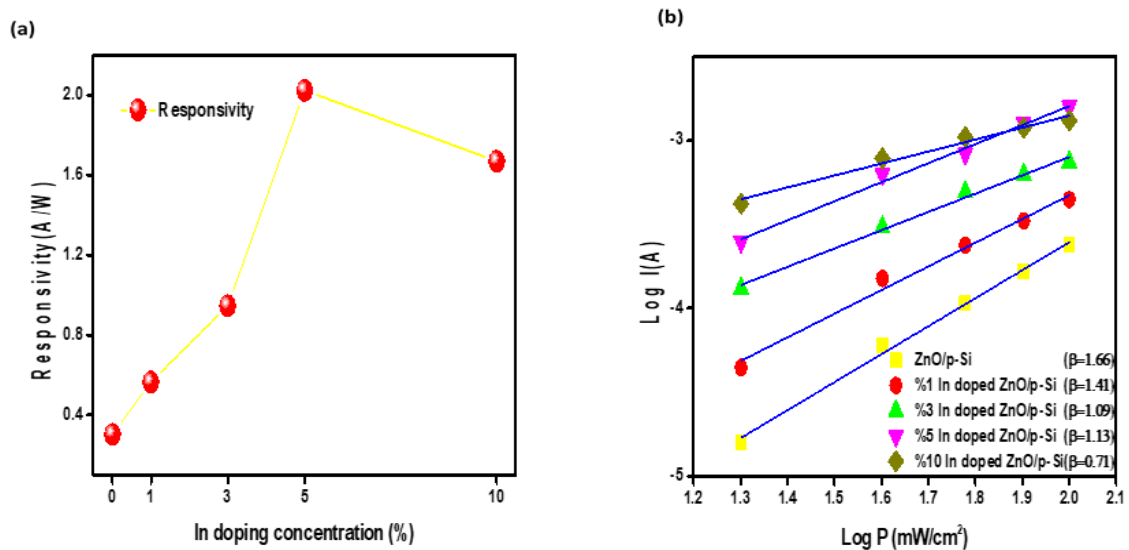


Figure 7. (a) The Responsivity versus In doping concentration of photodiodes (b) The logarithmic graph of the light intensity versus the photocurrent of photodiodes

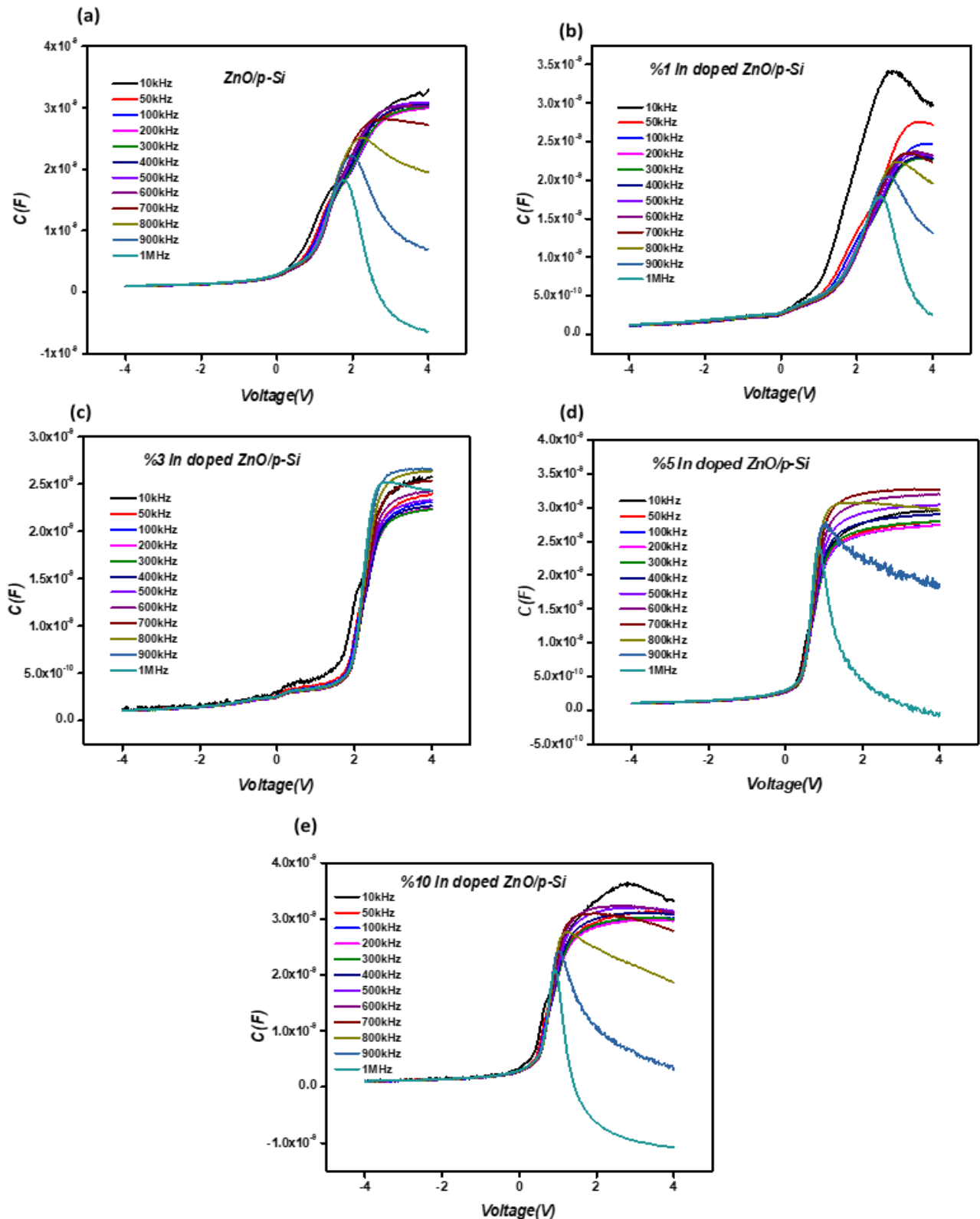


Figure 8. The C - V measurements of photodiodes

The C - V characteristics of fabricated photodiodes as a function of In doping is indicated in Figure 8 between 10 kHz and 1 MHz. The capacitance values of the diodes decrease with increasing frequency. This case is ascribed to the fact that the interface states of the diodes cannot follow the ac signal in the high frequency [34]. It is also seen from Figure 8 that diodes have negative capacitance values at 1 MHz frequency except for 3% In doping ZnO/p-Si diode.

The negative capacitance is ascribed to the injection of minority carriers to polarization [7]. Figure 9 indicates the G - V characteristics of photodiodes between 10 kHz and 1 MHz. The conductance values of the diodes increase with increasing frequency. The conductance of the photodiodes reaches a maximum at certain voltages in the forward bias region and remains almost stable.

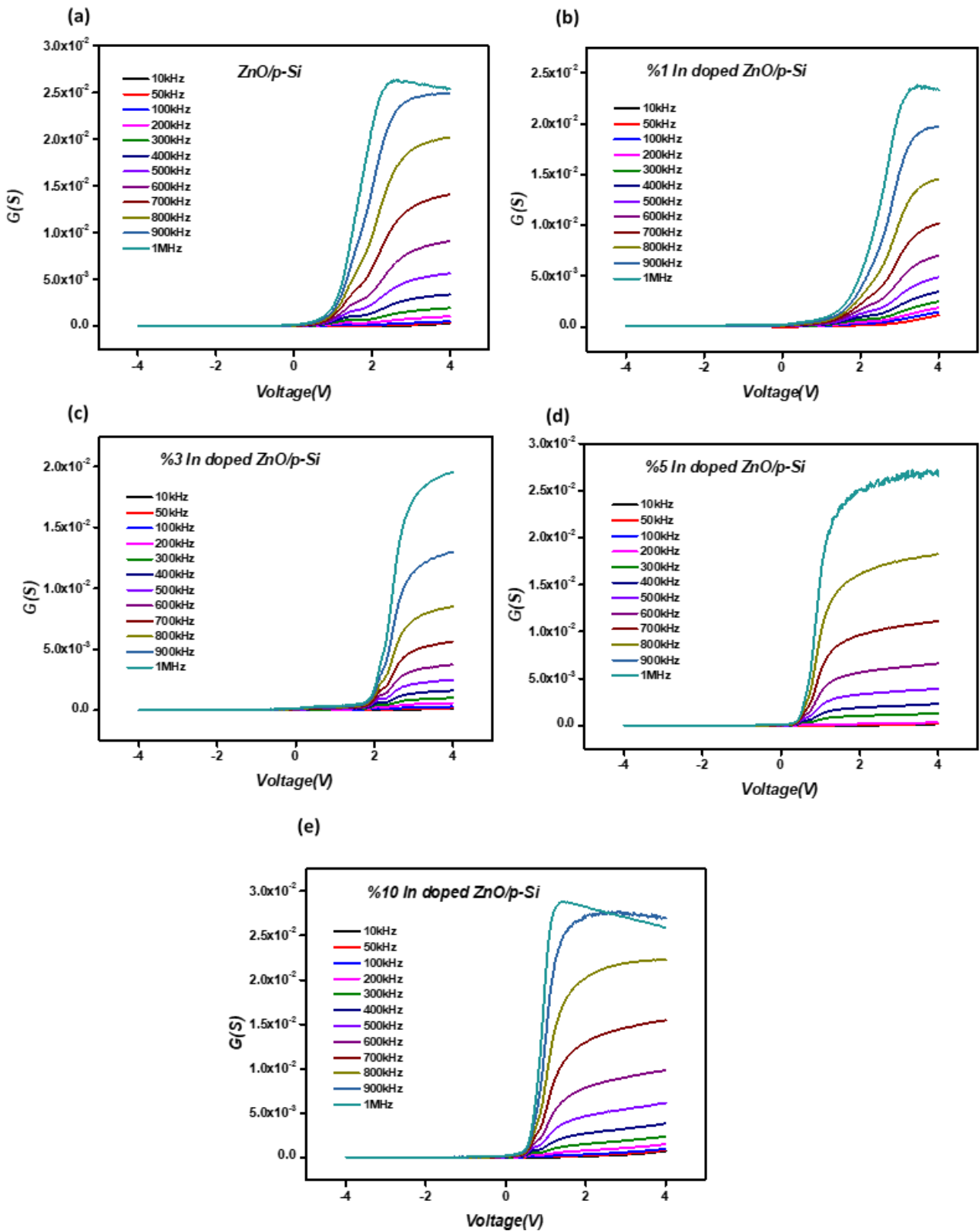


Figure 9. The G - V measurements of photodiodes

4. Conclusion

In summary, the undoped and In doping ZnO based photodiodes were fabricated by sol-gel spin coating methods. The structural and morphological of thin films were investigated by XRD and AFM, respectively. All films showed an amorphous structure nature with homogeneously grown on p-Si. The optoelectrical features of photodiodes were

investigated by conventional I - V and C - G - V technique. The minimum ideality factor (3.97) and series resistance ($7.2\text{ k}\Omega$) were obtained from 5% In doping ZnO/p-Si device. Also, the optoelectrical properties of photodiodes such as photosensitivity, photoresponsivity, and photoconductivity mechanism were studied under various visible illumination intensities. Similarly, the highest photosensitivity (3.15×10^3) and responsivity (2.02

A/W) were obtained from 5% In doping ZnO/p-Si photodiode. When all the obtained results are examined, it is shown that In doping can improve the properties of ZnO based photodiode and the fabricated heterojunctions can be used as a photosensor.

Acknowledgement

The experimental and characterization of this study were carried out in Semiconductors Characterization Laboratory of Eskişehir Technical University. The author would like to thank Prof. Dr. Mujdat CAGLAR and Prof. Dr. Yasemin CAGLAR for providing him use their laboratory facilities.

References

- [1] Ma, M., Wang, Z., Zhou, J., Liang, C., Zhang, D., Zhu, D. 2019. Effect of CeO₂ doping on phase structure and microstructure of aluocufemni alloy coating, *Materials Research*, 22(1).
- [2] Keskenler, E. F., Turgutb, G. 2016. Synthesis and properties of sol-gel derived transparent ZnO thin films: Effect of indium doping. *Journal of Ceramic Processing Research*, 17(12), 1254-1259.
- [3] Orita, M., Ohta, H., Hirano, M., Hosono, H. 2000. Deep-ultraviolet transparent conductive β -Ga₂O₃ thin films. *Applied Physics Letters*, 77(25), 4166-4168.
- [4] Richter, R. S., Yaya, A., Dodoo-Arhin, D., Agyei-Tuffour, B., Musembi, R. J., Onwona-Agyeman, B. 2018. Preparation and characterization of indium and gallium doped transparent ZnO films for Solar Cell Applications. *Oriental Journal of Chemistry*, 34(5), 2325-2331.
- [5] Das, A., Saha, R., Karmakar, A., Chattopadhyay, S., Palit, M., Dutta, H. S. 2016. Self-powered rapid binary UV photoswitching with n-ZnO NW/p-Si photodiode. *MicroCom, International Conference on Microelectronics, Computing and Communications*, 17-20 December, Egypt, 1-5.
- [6] Aksoy, S., Caglar, Y. 2019. Synthesis of Mn doped ZnO nanopowders by MW-HTS and its structural, morphological and optical characteristics. *Journal of Alloys and Compounds*, 781, 929-935.
- [7] Yıldırım, M., Kocyigit, A. 2018. Characterization of Al/In: ZnO/p-Si photodiodes for various In doped level to ZnO interfacial layers. *Journal of Alloys and Compounds*, 768, 1064-1075.
- [8] Lee, J. H., Jang, B. R., Lee, J. Y., Kim, H. S., Jang, N. W., Kong, B. H., Yun, Y. 2011. Effect of indium mole fraction on the diode characteristics of ZnO: In/p-Si (111) heterojunctions. *Japanese Journal of Applied Physics*, 50(3R), 031101.
- [9] Silva-Lopez, H. E., Marcelino, B. S., Guillen-Cervantes, A., Zelaya-Angel, O., Ramirez-Bon, R. 2018. Physical properties of sputtered indium-doped ZnO films deposited on flexible transparent substrates. *Materials Research*, 21(6).
- [10] Alamdari, S., Tafreshi, M. J., Ghamsari, M. S. 2017. The effects of indium precursors on the structural, optical and electrical properties of nanostructured thin ZnO films. *Materials Letters*, 197, 94-97.
- [11] Kim, J., Choi, J. H., Chae, H., Kim, H. 2014. Effect of indium doping on low-voltage ZnO nanocrystal field-effect transistors with ion-gel gate dielectric. *Japanese Journal of Applied Physics*, 53(7), 071101.
- [12] Cao, Y., Miao, L., Tanemura, S., Tanemura, M., Kuno, Y., Hayashi, Y., Mori, Y. 2006. Optical properties of indium-doped ZnO films. *Japanese Journal of Applied Physics*, 45(3R), 1623-1628.
- [13] Chirakkara, S., Krupanidhi, S. B. 2012. Gallium and indium co-doped ZnO thin films for white light emitting diodes. *Physica Status Solidi (RRL)–Rapid Research Letters*, 6(1), 34-36.
- [14] Tsuboi, T., Yamamoto, K., Nakamura, A., Temmyo, J. 2010. Indium-doped Mg_xZn_{1-x}O films for ZnO-based heterojunction diodes. *Japanese Journal of Applied Physics*, 49(4S), 04DG13.
- [15] Mahmood, K., Khalid, A., Ahmad, S. W., & Mehran, M. T. 2018. Indium-doped ZnO mesoporous nanofibers as efficient electron transporting materials for perovskite solar cells. *Surface and Coatings Technology*, 352, 231-237.
- [16] Luna-Arredondo, E. J., Maldonado, A., Asomoza, R., Acosta, D. R., Melendez-Lira, M. A., Olvera, M. D. L. L. 2005. Indium-doped ZnO thin films deposited by the sol-gel technique. *Thin Solid Films*, 490(2), 132-136.
- [17] Caglar, Y., Caglar, M., Ilican, S. 2018. XRD, SEM, XPS studies of Sb doped ZnO films and electrical properties of its based Schottky diodes. *Optik*, 164, 424-432.
- [18] Ruzgar, S., Caglar, M. 2019. The effect of Sn on electrical performance of zinc oxide based thin film transistor. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 30(1), 485-490.
- [19] Singh, S. K., Hazra, P. 2018. Performance analysis of undoped and Mg-doped ZnO/p-Si heterojunction diodes grown by sol-gel technique. *Journal of Materials Science:*

- Materials in Electronics, 29(6), 5213-5223.
- [20] Sze, S. M. 1984. Physics of semiconductor devices, Wiley Interscience, New York, 465s.
- [21] Hudait, M. K., Krupanidhi, S. B. 2001. Doping dependence of the barrier height and ideality factor of Au/n-GaAs Schottky diodes at low temperatures. *Physica B: Condensed Matter*, 307(1-4), 125-137.
- [22] Kamruzzaman, M., Zapien, J. A. 2017. Reduction of schottky barrier height, turn on voltage, leakage current and high responsivity of li doped ZnO nanorod arrays based schottky diode. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 17(7), 5061-5072.
- [23] Çetinkaya, H. G., Sevgili, Ö., Altındal, Ş. 2019. The fabrication of Al/p-Si (MS) type photodiode with (% 2 ZnO-doped CuO) interfacial layer by sol gel method and their electrical characteristics. *Physica B: Condensed Matter*, 560, 91-96.
- [24] Aslan, F., Esen, H., Yakuphanoglu, F. 2019. Electrical and fotoconducting characterization of Al/coumarin: ZnO/Al novel organic-inorganic hybrid photodiodes. *Journal of Alloys and Compounds*, 789, 595-606.
- [25] Norde, H. 1979. A modified forward I-V plot for Schottky diodes with high series resistance. *Journal of Applied Physics*, 50(7), 5052-5053.
- [26] Al-Hazmi, F. E., Yakuphanoglu, F. 2018. Photoconducting and photovoltaic properties of ZnO:TiO₂ composite/p-silicon heterojunction photodiode. *Silicon*, 10(3), 781-787.
- [27] Xu, X., Shukla, S., Liu, Y., Yue, B., Bullock, J., Su, L., Ager, J. W. 2018. Solution-processed transparent self-powered p-CuS-ZnS/n-ZnO UV photodiode. *physica status solidi (RRL)–Rapid Research Letters*, 12(2), 1700381.
- [28] Al-Hardan, N. H., Jalar, A., Hamid, M. A., Keng, L. K., Ahmed, N. M., Shamsudin, R. 2014. A wide-band UV photodiode based on n-ZnO/p-Si heterojunctions. *Sensors and Actuators A: Physical*, 207, 61-66.
- [29] Kang, H., Park, J., Choi, T., Jung, H., Lee, K. H., Im, S., Kim, H. 2012. n-ZnO: N/p-Si nanowire photodiode prepared by atomic layer deposition. *Applied Physics Letters*, 100(4), 041117.
- [30] Sbeta, M., Yildiz, A. 2019. Optical response enhancement of GZO/p-Si heterostructures via metal nanoparticles. *Materials Research Express*, 6(8), 085018.
- [31] Ameen, B. A. H., Yildiz, A., Farooq, W. A., Yakuphanoglu, F. 2019. Solar light photodetectors based on nanocrystalline zinc oxide cadmium doped/p-Si heterojunctions. *Silicon*, 11(1), 563-571.
- [32] Khusayfan, N. M. 2016. Electrical and photoresponse properties of Al/graphene oxide doped NiO nanocomposite/p-Si/Al photodiodes. *Journal of Alloys and Compounds*, 666, 501-506.
- [33] Farooq, A., Karimov, K. S., Ahmed, N., Ali, T., Alamgir, M. K., Usman, M. 2015. Copper phthalocyanine and metal free phthalocyanine bulk heterojunction photodetector. *Physica B: Condensed Matter*, 457, 17-21.
- [34] Orak, I., Kocyigit, A., Turut, A. 2017. The surface morphology properties and respond illumination impact of ZnO/n-Si photodiode by prepared atomic layer deposition technique. *Journal of Alloys and Compounds*, 691,873-879.

Çanakkale Şehitler Abidesi Şevi Dikey Bahçe Tasarım Önerisi

Yavuz ALKAN*¹

¹Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Lapseki Meslek Yüksekokulu, Peyzaj ve Süs Bitkileri Bölümü, 17800, Çanakkale, Türkiye

(Alınış / Received: 01.01.2020, Kabul / Accepted: 13.03.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Anahtar Kelimeler

Çanakkale,
Şehitler Abidesi,
Dikey bahçe,
Planlama,
Tasarım.

Özet: Günümüzde kentler ivmesi artan biçimde plansız bir gelişmeye maruz kalmaktadır. Bu da doğayı kendinden uzaklaştırmaktadır. Bu açığın kapatılmasına yönelik yeterli sayı ve miktarda açık ve yeşil alan planlamalarının yapıldığını söylemek güçtür. Bu süreçte farklı uygulamaların kent tekstüründe yer aldıklarını görmekteyiz. Çatı ve teras bahçeleri, dikey orman uygulamaları bunların başında gelmektedir. Dikey bahçe uygulamaları kullanım amacına göre değişiklik göstermektedir. Mimari yapıların yoğun olduğu, açık ve yeşil alanların ise nispeten çok az olduğu kent dokularında özellikle havadaki karbondioksit, karbonmonoksit gibi gazların miktarını en aza indirmek, daha ılımlı ve estetik görünüm sağlamak, toprak kayması ve aşınmasının önüne geçmek gibi amaçlar için dikey bahçeler kullanılmaktadır. Bu çalışma Çanakkale Şehitler Abidesi'nde gerçekleştirilmiştir. Alanın denizle birleştiği sınıra kadar olan mesafesi oldukça dik bir yamaç özelliğindedir. Bu yamaçta yer alan toprak yapısının zaman içinde iklimsel faktörler ve doğa olaylarının etkisiyle erozyona maruz kalması kaçınılmazdır. Bu çalışmada mevcut yamaç/şev alanın istinat duvarlarıyla teraslanması; teraslarda dikey ve yatay bitkilendirme çalışmaları ile şev stabilizasyonuna gidilmesi amaçlanmaktadır. Böylelikle alana estetik ve fonksiyonel kazanımlar sağlanması ön görülmektedir. Ayrıca Çanakkale Tarihi'nin anlam ve duygusunu ifade edebilen şekil ve sembollere yer verilerek şev alanın görünümüne anlamlı bir kimlik kazandırılması düşünülmektedir.

Design Proposal of Vertical Garden on the Slope of Canakkale Martyrs Monument

Keywords

Canakkale,
Martyrs Monument,
Vertical garden,
Planning,
Design.

Abstract: Today, cities are increasingly exposed to unplanned development. This takes nature away from itself. It is difficult to say that adequate numbers and amount of open and green space planning have been made to close this vulnerability. In this process, we see that different applications are located in the city monopoly. Rooftop and terrace gardens, vertical forest applications are among them. Vertical garden applications vary depending on the purpose of use. Vertical gardens are used to ensure a moderate and aesthetic appearance, reducing the amount of gases such as carbon dioxide, carbon monoxide in the air in urban tissues where architectural structures are high, open and green areas are low, and to prevent landslides and wear. This study was conducted in Çanakkale Martyrs Monument. Fairly steep slope to the border area where it meets the sea the distance property. This is located on the slope of the soil erosion by the action of climatic factors on the structural and natural phenomena that is subject to time is inevitable. In this study, the existing slope/slope teraslanma the area with the retaining wall; slope stabilization planting of the terraces, it is intended to be driven with vertical and horizontal work. Thus, it is important to provide aesthetic and functional gains of the area. Also different shapes that can express the meaning and feeling of the history of the Dardanelles and symbols given to the appearance of a significant area of the slope is thought to be gained identity.

*İlgili yazar: yalkanz58@gmail.com

1. Giriş

Kent olgusunun var oluşundan bu yana yeşil alanların dinsel, toplumsal, sanatsal, tarımsal, ekolojik ve ekonomik amaçlı kullanıldıkları anlaşılmaktadır [1]. Kentsel yapılaşmaların yoğun olmadığı dönemlerde yeşil alan planlamalarının yeterli miktar ve alanda kentsel yapıda yer aldıkları görülmektedir. Ancak son yıllarda artan nüfus ve buna paralel artan yapılaşmaya bağlı olarak kent tekstüründe hem miktar/alan, hem de donatı kapsamında yetersizlikler dikkat çekmektedir [2-5]. Bu durum, yoğun ve iç içe girmiş çok katlı yapıların arasında yaşam mücadelesi veren insanın artan hava kirliliğiyle muhatap olmasını; ayrıca boş zaman değerlendirme aktiviteleri için son derece kısıtlı imkanlar tesis etmesini kaçınılmaz kılmıştır [3]. Dolayısıyla, kent dokusundaki yeşil alan planlamaları ekstrem yeşil alan dinamikleriyle açığa çıkmış olup, pek çok fonksiyonellik ve estetik kapsamda gelişme göstermişlerdir [6]. Öyle ki, “çatı ve teras bahçeleri” ile başlayan bu dinamizm, “dikey bahçe” ve sonrasında “dikey orman” olarak bu gelişmede yerlerini aldıkları görülmektedir. Patric Blanc’in bitkilerin dikey yüzeylerde yetişebildiğini keşfetmesiyle bu uygulama hem konut içinde hem de açık ve yeşil alanlarda yaygınlaşan kullanım potansiyeli ile insan yaşamına entegre olmuştur [7]. Patrick Blanc dikey bahçelerde yaptığı çalışmalarla dünya çapında etkin bir rol üstlenmesinin yanında, yoğun yapılaşmanın görüldüğü kentlerde gerek iç mekan gerekse dış mekanlarda dikey bahçe kullanım alanlarının yaygınlaşmasında etkisi olmuştur [7]. Dikey bahçe kullanımlarının estetik boyutunun yanı sıra işlevsel boyutunun da oldukça yaygın olduğundan bahsedilebilir. Dikey bahçeler işlevsel olarak; enerji tasarrufu, ısı yalıtımı, iklimsel kazanımlar, kentlerde ısı adalarının bertarafı, hava bileşenlerinin dengelenmesi, kuş, böcek gibi canlılara yaşam alanı sunması ve yoğun yapılaşmaların arasında doğal ekosisteme imkan vermesi, birey psikolojisinde iyileştirmeler sağlaması yönünden etkin rol almaktadır [8-10]. Ayrıca, dikey bahçeler istinat duvarları kombinasyonunda dikey ve yatay bitkilendirmelerle şev stabilizasyonlarında önemli bir kullanımı da kapsamaktadır [11]. Dikey bahçe bitkilendirmelerinde duvarın teknik özellikleri ile bitkilerin işlevsel ve estetik kullanımlarının birbirlerini tamamlamaları önemli görülmektedir. Dikey cephede panel sistem, yeşil metal ve çit saksı tipi dikey bahçeler yer almaktadır [7]. Bu formasyonda yaygın olarak sarılıcı, sürüncü, yayılıcı ve tırmanıcı bitkiler tercih edilmektedir. Ayrıca dikey cephelerde yer yer alanın tarihine dokunuşlar yapmak amacıyla tematik kabartma resimler de (röliyef) planlanmaktadır. İstinat duvarı yatay alanında ise, derin kök yapan, az bakım isteyen, ekolojik ihtiyaçlar bakımından geniş tolerans gösteren ağaç, ağaççık ve çalı formunda bitkilendirmeler ağırlıklı olarak kullanılmaktadır [12]. İstinat duvarı bitkilendirmelerinin toz, rüzgar,

güneş gibi çevresel şartlara karşı koruyucu rol üstlenmesi planlanmaktadır. Hatta son dönemlerde kentsel yaşamda dikey bahçelerin yenilebilir tarımsal ürünlerinin değerlendirilmesi ile de gündemde olduklarını görmekteyiz [13]. Zengin kullanım potansiyelleri doğrultusunda dikey bahçe uygulamasının Çanakkale Şehitler Abidesi şevinin mevcut bitkisel ve fiziki koşullarının, ekolojik ve jeolojik koşullarla birlikte değerlendirildiğinde alan için oldukça gerekli bir tasarım olduğu aşıkardır. Çalışma kapsamında “dikey bahçe” uygulamasına yönelik planlama yaklaşımı Çanakkale Şehitler Abidesi örneğinde değerlendirilmiş olup, söz konusu tasarımla dikey bahçe yapısalının yapılış amaçları arasında istinat duvarlarının bitkilendirilmesi ile hem Şehitler Abidesi şevinin deprem, erozyon ve ekolojik faktörler etkisiyle zamanla kaymasının önüne geçilmiş olacak; hem de estetik açıdan alana pozitif peyzaj katkısı da sunulmuş olabilecektir. Çalışmada, uygun bitki popülasyonlarıyla sağlanan bitkilendirme çalışması ve istinat duvarları kombinasyonuyla ortaya çıkan peyzaj planlamasının alana kazandırdıkları kapsamında öneriler geliştirilerek optimal alan kullanımına ulaşılması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

Aralık 2019’da yürütülen çalışmada ana materyal olan Şehitler Abidesi, coğrafi konum itibarıyla 40° 21’ 55¹¹ Kuzey Enlemi ile 26° 14’ 12¹¹ Doğu Boylamının çakıştığı koordinatlarda yer almaktadır (Şekil 1). 1960 yılında tamamlanarak, Çanakkale il sınırları kapsamında Eski Hisarlık Tepe üzerinde inşa edilmiş [14] ve Morto Koyuna bakışı olan Abide, Çanakkale Boğazı’na sınır olup, deniz seviyesinden 50 m yüksekte konumlanmış; 41,70 m boya sahiptir. 10’ar metrelik aralıklarla sıralanan ve her bir kolu 7,5 m olan L şeklindeki kutu gövdeli 4 ayak üzerinde, boyutları 25’er m olan kare alan üzerinde yükselmiştir [15]. Ayaklar yine kutu gövdeli 5 m yüksekliğindeki takke kısmı ile birbirine bağlanarak inşaat tamamlanmıştır. Alan, Abide esas gövdesi ve tören alanından oluşan iki bölüme sahiptir. Temel zemini sert kalkerdir. 30 x 30 metre ebadında bir şeref holü ile ve yine yaklaşık 45 x 45 metre ebadında bir platform ile çevrilidir. Her iki seviyede taş kaplamalıdır. Şehitler Abidesi platformu 175 metre boyunda ve 45 metre eninde olup, platform yeşil alan birlikteliği ise yaklaşık 250 m uzunluğa ve 90 m ene sahiptir [16].

Çalışmada ilk olarak alanda yapılan gezi ve gözlemlerle alanın doğal bitki örtüsü tespit edilmiştir. Bu kapsamda Çanakkale Şehitler Abidesi şev alanında dikey bahçe tasarımı için teraslama bahçe tekniği ile bu alanın bitkilendirilmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Çalışma, Şehitler Abidesi şevinde istinat duvarları yapımı, kabartma resim yapısı, bitkilendirme, ve öneriler olarak dört farklı aşamada geliştirilmiştir. Alanda uygun görülen tasarım aşamaları, aşağıda belirtilen iş akışı şeklinde

gerçekleştirilebilir. 1. Alanın güney ve batı yönleri kapsamında 50 metre rakımdan yaklaşık 80 metrelik yatay mesafeyle deniz seviyesine inen şev, her iki yönlü olarak deniz seviyesinden 10'ar metrelik yükseklik ve 15'er metrelik yatay zemin olacak şekilde 5 basamaklı teraslama sistemi ile istinat duvarlarının inşa edilmesi, 2. Dıştan içe 15'er metrelik yüzeye/zemine/yatay boyuta ve 10'ar metrelik dikey boyuta sahip her teras için amaca ve çevre ekolojisine uygun bitkilendirme tasarımlarının planlanması, 3. Teras duvarları yüzeyinde Çanakkale tarihine yönelik tematik figürlerin, sembollerin, şekillerin kabartmalı resimlerle (Rölyef) planlanması ile alanın kimliğine katkı sağlanması, 4. Bu çalışmalar sonucunda alanın kazanımları ile optimal alan kullanımı üzerinde öneriler geliştirilmiştir.



Şekil 1. Çanakkale Şehitler Abidesi coğrafi konumu ve mevcut durumu [17].

3. Bulgular

Dikey bahçe kullanımları, peyzaj değerlerine hem estetik, hem de işlevsel açıdan sunduğu alternatif uygulamalarla katkı sağlamaktadır. Estetik açıdan yatay ve dikey boyutta renk, şekil, hacim, doku gibi kriterler bakımından değerlendirilmektedirler (Şekil 2,3).

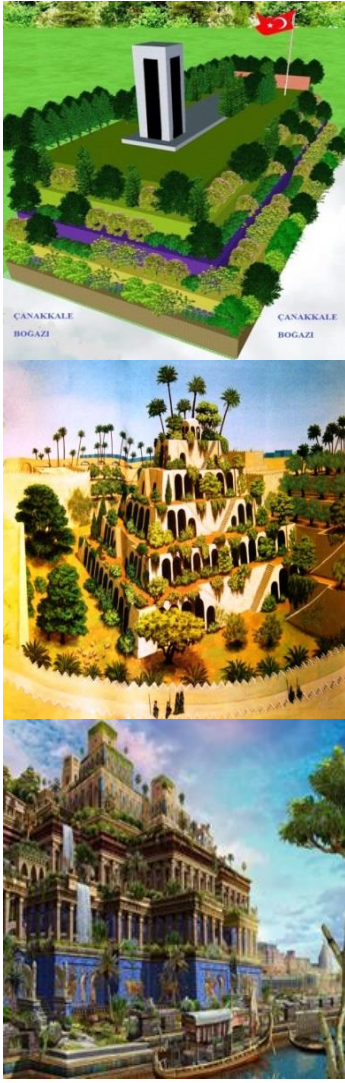
İşlevsel açıdan ise toprak yapısının ıslahı, toprak kaymasının önlenmesi, ekolojik, psikolojik ve sosyal kriterler bu kapsamda değerlendirilebilir (Şekil 4). Sınırları belirli dikey formda bitkilendirme çalışmalarına yönelik ilk dikey bahçelerin örneklerini Babil'in asma bahçeleri'nde görmekteyiz. Yaklaşık 25 yüzyıl öncesine uzanan bu bahçe uygulaması örneklerinin bu çalışmada belirlenen tasarım örneği ile karşılaştırmasını Şekil 4'de görmek mümkündür [8, 19].



Şekil 2. Sıralı olarak Swiss Otel /2013, Antalya EXPO/2016 ve Kolombiya'dan dikey bahçe örnekleri [18].



Şekil 3. Sıralı olarak Quai Branly Müzesi-Paris, Madrid'den dikey bahçe örneği [19]. Athenaeum Hotel-Londra, [7].



Şekil 4. Sıralı olarak Çanakkale Şehitler Abidesi teras bahçe sistemi, Mezopotamya'da bulunan Babil'in Asma Bahçeleri [19].

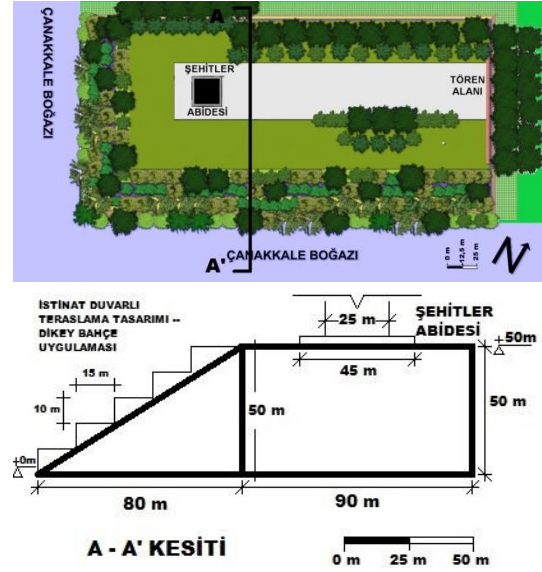
Çalışmanın yürütüldüğü Çanakkale Şehitler Abidesi mevcut şev alanının yetersiz bitki popülasyonu, yüksek eğim ve 50 metrelik rakımdan kaynaklı toprak kayması ya da erozyon riskine karşı istinat duvarları tasarısı ile yatay ve dikey bitkilendirmelerin yanı sıra alana kazandırılan estetik ve rekreasyonel kullanımlar sayesinde alanın daha optimal/rasyonel kullanımına olanak sağlanabilecektir.

Çanakkale Şehitler Abidesi şev alanının hesaplanmasında aşağıda yer alan formül kullanılmıştır (1). Alan şev yapısalının rakımı 50 m; yatay mesafesi ise yaklaşık 80 m bulunmuştur (Google Earth 2019) Şev alanının eğimi yaklaşık % 62,5 hesaplanmıştır. [14], (Şekil 5).

$$\text{Eğim} = \frac{\text{Yükselti Farkı (h)}}{\text{Yatay Uzunluk (L)}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Eğim} = \frac{50 \text{ m}}{80 \text{ m}} \times 100 = \% 62,5$$

Şev alanındaki % 62,5 eğimin mevcut doğal bitki örtüsü dağılımı ile birlikte heyelan riskini arttırdığını söyleyebiliriz (Şekil 5).

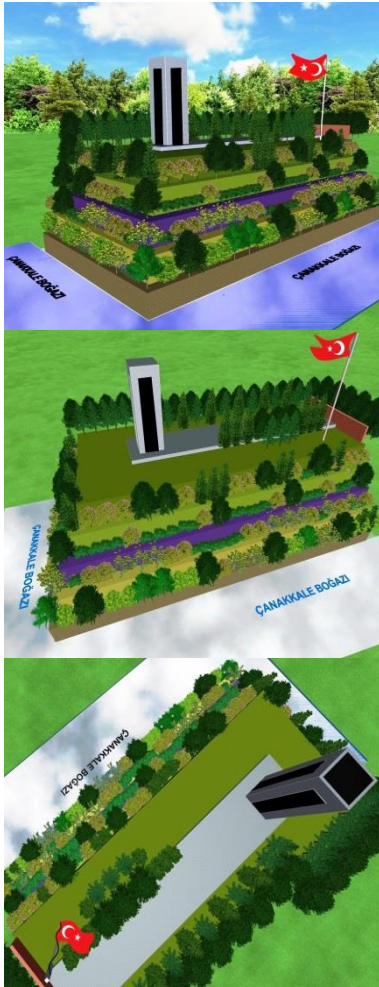


Şekil 5. Çalışma alanı (Şehitler Abidesi) perspektif üst görünüşü ve A-A' kesit görünümü

Çanakkale Şehitler Abidesi şev alanında mevcut doğal bitki türleri ağırlıklı olarak maki bitki topluluğundan oluşmaktadır. *Atriplex halimus* (Tuz çalısı), *Medicago arborea* (Yonca çalısı), *Viburnum tinus* (Kartopu), *Hedera spp.* (Kaya sarmaşığı), *Oenothera lindheimeri* (Gavura çiçeği), *Carex spp.* (Çalı görünümlü sazlıklar), *Arbutus andrachne* (Sandal ağacı), *Calluna vulgaris* (Süpürge çalısı), *Erica arborea* (Ağaç fundası), *Erica manipuliflora* (Funda), *Rhododendron ponticum* (Orman gülü), *Vaccinium arctostaphylos* (Çoban üzümü), *Vaccinium corymbosum* (Yaban mersini), *Vaccinium myrtillus* (Adi yaban mersini), *Olea oleaster* (Yabani zeytin, Delice), *Quercus coccifera* (Kermes meşesi), *Juniperus oxycedrus* (Kadran ardıcı), *Fragaria vesca* (Dağ çileği), *Ceratonia sliqua* (Keçi boynuzu), *Cistus spp.* (Laden), *Rubus caesius* (Böğürtlen), *Laurus nobilis* (Akdeniz defnesi), *Pistacia lentiscus* (Sakız ağacı), *Eleagnus angustifolia* (Kuş iğdesi), *Salix babylonica* (Söğüt), *Ulmus carpinifolia* (Dağ karaağacı), *Populus alba* (Akkavak) alanda tespit edilen bitki türleridir.

Doğal afetler grubunda yer alan toprak kayması (heyelan), şev stabilizasyonunun bozulmasıdır [20]. Yer çekimi devinimi ile ortaya çıkan bu durum insan faktörü veya doğal faktörlerin ya da her ikisinin birlikte tetiklemesi ile ortaya çıkmaktadır. Devininin hızını ve derecesini belirleyen bazı dış faktörler mevcuttur. Eğim fazlalığı, yıllık yağış yoğunluğu, bitki örtüsü zayıflığı, deprem bölgesinde yer alması heyelan oluşumunu ve etki derecesini etkileyen önemli etkenler arasındadır. Toprak yapısı ve eğim ise bunların arasında en önemlilerindedir [21]. Toprak yapısında bağlayıcı toprak sınıfının bulunmaması veya düşük oranda bulunması; başka bir deyişle kil ağırlıklı toprak yapısı toprağın

kaymasında/yer değiştirmesinde hızlandırıcı bir faktördür. Eğimin fazla olması, yer çekimini artırmakta buna bağlı olarak toprak kayması da artmaktadır. Eğimin etkisiyle toprağın yer değiştirmesi, “toprak kayması”; toprağın katman/tabaka olarak yer değiştirmesi “heyelan” olarak tanımlanmaktadır [20]. Bu vakalar yeryüzünün değişmesinde önemli etkenlerdir. Topoğrafya ile heyelanlar arasında sıkı bir ilişki vardır. Öyle ki eğimin olmadığı yerde toprak kaymasından söz edilemez [20]. Sözü edilen çevresel faktörler, hem bölgenin topoğrafik, jeolojik, iklimik ve bitki örtüsü özelliklerine hem de ‘Şehitler Abidesi’ şevine etki yapmaktadır. Şev alanının heyelan riskini azaltmak, stabilizasyonunu güçlendirmek için sağlam kaideler üzerinde bitkilendirme yapılması düşünülmüştür. Bu işlem için Şehitler Abidesi ile şev yapısının kesit görünümünden hareketle (Şekil 5) 80*50 metre dik kenarlara sahip bir dik üçgen üzerinde yaklaşık 10 metre yükseklik ve 15 metre eninde yatay zemine sahip 5 basamaklı teraslama yapılarak (Şekil 5); dikey ve yatay boyutlarda bitkilendirme alanları oluşturulması düşünülmüştür (Şekil 6-8).



Şekil 6. Şehitler Abidesi şev alanı bitkisel tasarım örneğinden farklı açılardan perspektif görünümü

İstinat duvarlarının dikey cephelerinde bitkilendirmesinde ön görülen bitki türleri: *Hedera*

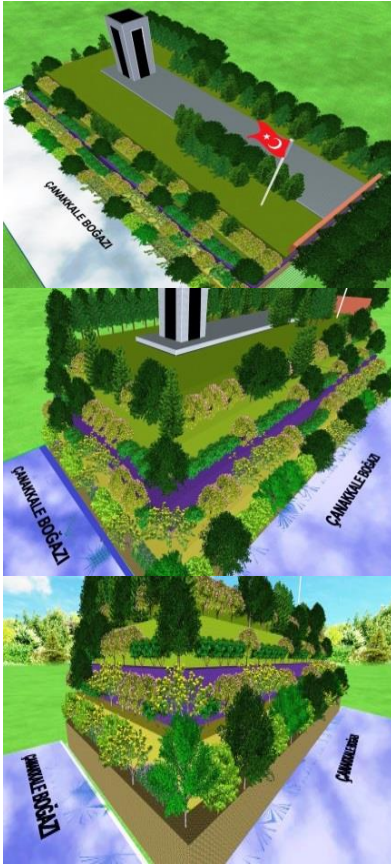
helix (Duvar sarmaşığı), *Parthenocissus ouinquefolia* (Amerikan sarmaşığı), *Parthenocissus tricuspidata* (Amerikan saarmaşığı) gibi tırmanıcı türler, *Hydrangea petiolaris* (Ortanca), *Euonymus fortunei* (Taflan) türleridir. Sarılıcı türler; çelik tel, ahşap kafes gibi özel yapılarda yer almak üzere, *Passiflora caerulea* (Çarkıfelek), *Lathyrus odoratus* (Nazende çiçeği), *Polygonum cuspidatum* (Japon madımağı), *Lonicera periclymenum* (Hanımeli), *Clematis vitalba* (Akasma), *Humulus lupulus* (Şerbetçiotu), *Jasminum officinale* (Yasemin), *Vitis spp.* (Asma üzümü) türlerin kullanılması düşünülmektedir. Ayrıca geven, kazayağı, sedum, telgraf çiçeği, yayvan ardıç gibi özellikle sukulent/kurakçıl çok yıllık bitki türlerinin bu alanda kullanılması uygun görülmektedir. Bu bitkilerin dışında *Wisteria sinensis* (Mor salkım), *Campsis radicans* (Acem borusu), *Bougainvillea glabra* (Gelin duvağı) gibi süs bitkilerinin de kullanılması planlanmıştır (Şekil 6-8). Tasarımda kullanılması düşünülen bitkilerde bitkinin yaşı, cinsi, gelişme gücü ve yönü, taç formu, boyu, yaprak döken ya da her dem yeşil olmaları, çevre şartlarına uyumlu olmaları, olumsuz çevre şartlarına dayanıklılık ve suya karşı toleransı yüksek olması gibi bitki özellikleri bitki seçiminde dikkat edilmesi gereken unsurlardır. [19]. Ayrıca, dikey cephelerde yer yer tarihi alanının anlam ve önemine vurgu yapan kabartma resimlere (rölyef) yer verilmesi de planlanmaktadır (Şekil 6-8).



Şekil 7. Şehitler Abidesi şev alanı bitkisel tasarım örneğinin farklı açılardan perspektif görünümü.

Teraslama sonucu oluşturulan dikey bahçe uygulamasında basamak zeminin bitkilendirmesinde bölge, iklim ve tasarım amacına uygun ağaç ve çalı

grubu bitkiler düşünülmüştür. Bu bitkiler; *Cupressus sempervirens var. pyramidalis/horizontalis* (Servî), *Pinus pinea* (Fıstık çamı); *Pinus sylvestris* (Sarı çam), *Acacia dealbata* (Akasya), *Cedrus libani* (Toros sediri), *Quercus coccifera* (Kermes meşesi), *Abies bornmülleriana* (Uludağ göknarı), *Abies clicica* (Toros göknarı), *Populus alba* (Ak kavak), *Lagerstroemia indica* (Oya ağacı) *Arbutus andrachne* (Sandal ağacı), *Taxus baccata* (Porsuk ağacı), *Ginkgo bloba* (Mabet ağacı), *Fraxinus excelsoir* (Adi dişbudak), *Laurus nobilis* (Defne). *Prunus laurocerasus* (Bodur karayemiş), *Buxus sempervirens* (Bodur şimşir), *Acacia dealbata* (Mimoza ağacı), *Cupressus macrocarpa* (Limoni servi), *Cupressocyparis leylandii* (Leylandi ağacı), *Photinia fraseri* (Alev ağacı), *Ligustrum japonicum* (Kurt bağı), *Cotoneaster horizontalis* (Dağ muşmulası), *Juniperus horizontalis* (Yayılıcı ardıç) türlerinden oluşmaktadır (Şekil 6-8).



Şekil 8. Şehitler Abidesi şev alanı bitkisel tasarım örneğinin farklı açılardan perspektif görüntüleri.

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmayla Çanakkale Şehitler Abidesi şev stabilizasyonu sağlamak için bitkilendirme ve istinat duvarı bileşenleri ile tasarım önerisi geliştirilmiş ve bu öneriler literatür karşılaştırmaları yapılarak alanın daha verimli kullanımı için geliştirilmiştir. Şehitler Abidesi şevinde teraslama ile oluşturulan dikey bahçe tasarımının alanda öne çıkan rüzgar, toz, güneş gibi faktörlerinin giderilmesinde veya azaltılmasında pozitif etkisi ön görülmektedir. Çerçi [10] mimari yapılarda yeşil duvarlar ve çatılar

tasarlamının binaların yalıtımı üzerine olumlu katkılar yaptığını, ayrıca kentsel ısı adacıklarının serinlemede önemli bir paya sahip olduğunu ifade etmiştir. Bu çalışmada da kentsel peyzaja katkı verilmiş ve yapılan tasarım önerisiyle alandaki bitki ve hayvan varlığına da yaşam alanı oluşturulması öngörülmüştür. Yalçınalp vd. [13] kentsel alan içindeki dikey bahçe tasarımında yenilebilir tarımsal bitkilerin kullanılabilirliğini vurgulamışlardır. Bu çalışmada benzer bitkilerin kullanılma olasılığı bulunurken çalışmanın yapıldığı alanın kentsel alan dışında bulunduğu göz ardı edilmemelidir. Kirit ve Sağlık [4] dikey bahçe; tarihsel sürecini, dünya ve Türkiye'den örneklerle, estetik ve işlevsel yönünü belirtmişlerdir. Tasarım önerisinin geliştirilmesinde faydalanılan estetik ve işlevsel öneriler bu çalışmayla örtüşmektedir. Ekren [3] dikey bahçelerin işlevsel ve estetik yönden olumlu ve olumsuz taraflarından bahsetmiş, olumsuz taraflarının nedenleri ve bunun sonucu olarak uygulama oranındaki düşüşe dikkat çekmiştir. Bu çalışmada da olduğu gibi uygulamanın iklimsel faydaları ve sürdürülebilirliğine işaret etmiştir. Gürel ve Kalyoncuoğlu Gürel [11] bu çalışma ile örtüşecek tarzda açık ve yeşil alanlar aleyhine yapısal unsurların ağırlık kazanmasıyla sağlıksız gelişen kentlerde, alternatif peyzaj tasarımlarından dikey bahçelerin kent dokusunda estetik olarak kent kimliği; işlevsel olarak, kent iklimi, doğal yaşam, gürültü ve görüntü kirliliği, birey psikolojisi gibi hususlarda etkin rol üstlendiği vurgulamaktadırlar.

Başdoğan ve Çiğ [1] sürdürülebilir kent modellerinin oluşturulmasında yapı cephelerinde bitkilendirme uygulamalarına değinmişlerdir. Yaşayan duvarlar olarak yeşil cepheler/dikey bahçeler kent ekolojisinde ve kentsel refahın artmasında etkili unsurlar olduğundan bahsetmektedirler. Bu çalışmayla paralel olarak dikey bahçelerin estetik ve işlevselliklerinin yanı sıra ekonomik, ekolojik ve sosyal açıdan sürdürülebilir kent modeline katkılarına değinmişlerdir. Bu çalışmada istinat duvarı ile birliktelik teşkil eden bitki türlerinin şekil, boy, hacim gibi fiziksel özellikleri ile ekolojik, jeolojik, iklimsel etkilerine vurgu yapılmıştır. Benzer şekilde Carpenter [12]'nin yaptığı çalışmada da dikey bahçede kullanım potansiyeline sahip bitkilerin fiziksel özelliklerinden bahsedilmiştir. Ayrıca uygulamada yer alan bitki türleri aracılığıyla ekoloji üzerine olumlu etkileri de vurgulanmıştır. Yine bu çalışmada yapılaşmalardaki yoğunluğa bağlı olarak kent tekstüründeki açık ve yeşil alanların azlığına işaret edildiği gibi Rafiee vd. [2]'nin yaptıkları çalışmada da artan nüfus ve yapılaşmalara paralel olarak azalan yeşil alanlardan bahsedilmektedir. Çakır vd. [8]'nin yaptıkları çalışmada; Amerikan asma bitkisi ile yapılan dikey bahçe uygulamasının, insan psikolojisindeki etkilerini estetik kriterleri, ayrıca bitkinin fizyolojik gelişimlerini değerlendirmişlerdir. Timur vd. [9] çalışmalarında, gelecekteki kent nüfus potansiyellerinin artışına paralel olarak doğadan uzaklaşan insanların yaşam standartlarını artırmak,

kente estetik ve işlevsel kullanımların yanı sıra birey psikolojisi üzerine etkilerine değinmişlerdir. Çalışmalarında özellikle karasal bölgeler için örnek teşkil edebilecek Ankara Sıhhiye Köprüsü'nün yeşillendirme çalışması dikey yönde olan boyutuyla bu çalışmayla örtüşmektedir. Yıldız [6] yaptığı çalışmada, dikey bahçelerin doğal yaşamın belirleyicisi olarak, estetik, işlevsel, hobi, kuş ve böcekler için yaşam alanı olması ile gürültü ve görüntü kirliliğini önlemek amaçlı, kent insanı için vazgeçilmez peyzaj donatıları olduğundan bahsetmektedir. Söz konusu ekstrem peyzaj donatılarının Şehitler Abidesi'nin her yıl özellikle yaz aylarında gerek yerli gerekse yabancı turizm yoğunluğu nedeniyle doğal, estetik ve fonksiyonel anlamda alana kazandırılması turist yoğunluğundaki artışı ile turistler üzerinde bıraktığı olumlu etkileri de beraberinde getirmesi planlanmaktadır [17]. Çalışmadan elde edilen sonuçlar ve bu doğrultuda geliştirilen önerilere aşağıda yer verilmiştir.

- ❖ Çalışmayla alana kazandırılacak istinat duvarlarıyla alanın şev yapısında jeolojik ve ekolojik faktörlere bağlı olarak oluşabilecek toprak taşınmasının/kaymasının gerçekleşme olasılıklarının en aza indirgemesinin de sağlanması ön görülmektedir.
- ❖ Teraslama ile oluşturulan sistemde yatayda ağaç, ağaççık ve çalı formu bitkiler ile çim alan tesisi; dikeyde ise, sarılıcı, sarkıcı, sürünücü ve yayılıcı gelişme gösteren bitkilerin kullanılması düşünülmektedir. Böylelikle alanda ekolojik, estetik ve fonksiyonel alan kullanımları ortaya konabilecektir.
- ❖ Tasarım kazanımı olarak turistlerin gezi-gözlem ve regreasyonel amaçlı terasları kullanabilme şansları ortaya çıkmıştır. Abide alanı dikey bahçe uygulaması kapsamında, alanın jeolojik açıdan tarıma elverişli toprak yapısına ve ekolojik faktörlerine bağlı olarak bakım ve onarımı uygun yapısal unsurların ve bitkisel materyallerin kullanımı ile alan için yeterli estetik, fonksiyonel ve sürdürülebilir optimal alan kullanımı sağlanmalıdır.
- ❖ Alandaki toz, rüzgar ve güneşin olumsuz etkilerine karşı planlamanın işlevselliği öne çıkmaktadır.
- ❖ Alana özgü şev planlaması ile toprak kaymasının uzun vadede önüne geçilmesi planlanmalıdır.
- ❖ Dikey bahçe uygulamasının, alan için hem fiziksel hem de fonksiyonel açıdan katkı sağlama potansiyeli göz ardı edilmemelidir.
- ❖ Dikey bahçe olarak tasarlanması planlanan alanda aynı zamanda rekreasyonel aktivitelerin de yapılabilir olduğu önemsenmelidir.
- ❖ Alanda teraslama yöntemi ile dikey bahçe tasarımının sergilenmesi; Abide alanının artan bir ziyaret alanı sunumunu da beraberinde getirecektir. Öyle ki; bu durum ziyaret alanının yaklaşık iki katına çıkması anlamına gelmektedir.
- ❖ Çalışma kapsamında sulama, drenaj ve gübreleme entegrasyonun sağlanması gerekliliği önemsenmelidir.

Bu çalışmada ortaya konan bu tasarımla sulama, toprak yapısı, gübreleme, drenaj boyutlarına değinilmemiştir. Alanın özgün eğimli yapısı ve bitkilendirme potansiyelindeki zayıflıktan yola çıkılarak, alan kaidesinin güçlendirilmesi ve alanda dikey bahçe uygulamasına yönelik tasarım çalışması ile sınırlı tutulmuştur. Alanın doğal ve kültürel dış etkenlere karşı mukavemetini (rijit özelliğini) artırarak, uzun süreler mevcut durumunun korunması, kullanılması ve sürdürülebilir kılınması amaçlanmıştır. Çalışma sonuçları itibarıyla ileri boyutta planlanan çalışmalara zemin hazırlaması bakımından özgün bir çalışmadır. Öyle ki, alanın drenaj, sulama, toprak yapısı, gübreleme tekniklerini kapsayan kapsamlı ve birbirini bütünleyen farklı çalışmalarla desteklenmesinin önü açılmış olabilecektir.

NOT: Bu makale, Kasım 11-13, 2019'da Konya-Ereğli'de gerçekleştirilmiş olan IV. İNSAC Mimarlık, Tasarım ve Güzel Sanatlar Kongre'sinde Bildiri olarak sunulmuştur.

Kaynakça

- [1] Başdoğan, G. ve Çiğ, A. 2016. Ecological-Social-Economical Impacts of Vertical Gardens in the Sustainable City Model. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 26(3), 430-438.
- [2] Rafiee, R., Mahiny, A.S., Khorasani, N. 2009. Assessment of Changes in Urban Green Spaces of Mashad City Using Satellite Data. International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation, 11(6), 431-438.
- [3] Ekren, E. 2017. Dikey Bahçelerin Avantajları ve Riskleri. Bartın Orman Fakültesi Dergisi, 19(1), 51-57.
- [4] Kırıt, N., Sağlık, A. 2018. Kentsel Peyzaj Tasarımında Dikey Bahçe Uygulamaları. Uluslararası Hakemli Tasarım ve Mimarlık Dergisi, 13, 161-179.
- [5] Olgun, R., Yılmaz, T. 2019. İmar Planlarının Peyzaj Ekolojisi Yaklaşımı ile Değerlendirilmesi: Niğde Kenti Örneği. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 23 (3), 770-779.
- [6] Yıldız, M. 2014. Dikey Bahçe; Beton Yapıların Yeni Yeşil Yüzü. Ekoyapı Dergisi, <https://www.ekoyapidergisi.org/815-dikey->

- bahce-beton-yapilarin-yeni-yesil-yuzu.html (Erişim Tarihi: 29.12.2019).
- [7] Anonim, 2019a. Yaşayan Duvarlar. <https://listelist.com/dikey-bahce/> (Erişim Tarihi: 29.12.2019).
- [8] Çakır, A., Yalcınalp, E., Doğan, E., Meral, A. 2017. Determination of the Suitability of Some American Grapevine Rootstocks as a New Edible Landscape Component of Vertical Gardens. *Journal sustainability*, 9, 1275.
- [9] Timur, Ö., B., Aytaş, İ., Özden, F., Akyol, E., Yazıcı, B., Ataoğlu, F. D. 2018. Vertical Garden Design in Case of Ankara Sıhhiye Bridge and Closed Area. *Journal of Bartın Faculty of Forestry*, 20(1), 53-62.
- [10] Çerçi, S. 2018. Bitkilendirilmiş Cephelelerin Çevresel ve Ekolojik Etkileri., 9. Ulusal Çatı & Cephe Sempozyumu, Nisan, İstanbul, 12-13.
- [11] Gürel, J., Kalyoncuoğlu, B.B. 2017. Dikey Bahçelerin Kentli Algısı ve Kentsel Psikoloji Açısından Değerlendirilmesi. *Ekoyapı Dergisi*. <https://www.ekoyapidergisi.org/3904-dikey-bahcelerin-kentli-algisi-ve-kentsel-psikoloji-acisindan-degerlendirilmesi.html> (Erişim Tarihi: 29.12.2019).
- [12] Carpenter, S. 2014. A Guide to Green Roofs, Walls and Facades in Melbourne and Victoria, Australia. State of Victoria Through the Department of Environment and Primary Industries, Australia, 131p.
- [13] Yalcınalp, E., Meral, A., Doğan, E. 2017. Duvar Yüzeylerindeki Tarımsal Kaçakların Belirlenmesi ve Duvarlarda Yenilebilir Peyzaj Potansiyelinin Geliştirilmesi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi* 4(2): 169-178.
- [14] Atabay, M. 2016. Şehitlikleri İmar Cemiyeti Arşiv Belgelerine Göre Çanakkale Şehitler Abidesi İnşaatının Tamamlanması ve Açılış Töreni Çanakkale Araştırmaları Türk Yıllığı, 14(21), 213-232.
- [15] Erginbaş, D. 1958. İsmail Utkular, "Çanakkale Abidesi," *Arkitekt*, c. 4 (293) 148-150.
- [16] Cihangir, Y. 1979. *Çanakkale Meçhul Asker Anıtı*, İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Sanat Tarihi Bölümü, Yayınlanmamış Mezuniyet Tezi, 32-33, İstanbul.
- [17] Alkan, Y. 2019. Çanakkale Şehitler Abidesi Peyzaj Planlama ve Tasarımında Yeni Bir Yaklaşım. *Turkish Journal of Forest Science*, 3(2), 142-148.
- [18] Anonim, 2019b. Dikey Bahçe Örnekleri. <https://www.yesilist.com/dunyanin-en-buyuk-dikey-bahcesi-85-bin-bitki-ile-kolombiyada-yukseliyor/> (Erişim Tarihi: 29.12.2019).
- [19] Anonim, 2019c. Milli Eğitim Bakanlığı, MEGEP (Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Geliştirilmesi Projesi), Tarım, Dikey Bahçeler. http://megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller/Dikey%20Bah%C3%A7eler.pdf (Erişim Tarihi: 29.12.2019).
- [20] Öztürk, G. 2002. Heyelanlar ve Türkiye'ye Etkileri. *G.Ü. Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 22 (2), 35-50.
- [21] Kahraman, Ö., Aktaş, M., Yurtsever, N. (2018). Çatı ve Dikey Bahçeler Bakımından Çanakkale Kent Merkezinin Değerlendirmesi. *ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 6, 153-159.

Investigation of Antimicrobial and Antitubercular Activities of Some Hydrazone Derived Compounds

Begüm EVRANOS-AKSÖZ¹, Fatma KAYNAK ONURDAĞ², Erkan AKSÖZ³, Selda ÖZGEN ÖZGACAR⁴

¹Süleyman Demirel University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, 32000, Isparta, Turkey

²Trakya University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, 22030 Edirne, Turkey

³Süleyman Demirel University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, 32000, Isparta, Turkey

⁴Ministry of Health of Turkey, Turkish Medicines and Medical Devices Agency, 06520 Ankara, Turkey

(Alınış / Received: 11.01.2020, Kabul / Accepted: 18.02.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Keywords

Hydrazone,
Antitubercular activity,
Antimicrobial activity

Abstract: A series of hydrazone derivatives were synthesized to investigate antifungal, antimicrobial and antitubercular activities. These activities were investigated against *Escherichia coli*, *Escherichia coli* isolate, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* isolate (resistant to gentamicin), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* isolate (MRSA), *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecalis* isolate (VRE), *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Mycobacterium tuberculosis*. Among the synthesized compounds **B23** had the best activity against *Candida albicans* with 16 µg/mL MIC value and **B24** had the best activity against *Staphylococcus aureus* isolate (MRSA) with 16 µg/mL MIC value. The most effective compound against *Mycobacterium tuberculosis* is found to be **E9** with 32 µg/mL MIC value, a chalcone derivative. However, all compounds were determined as ineffective against *Escherichia coli* and *Escherichia coli* isolate.

Bazı Hidrazon Türevi Bileşiklerin Antimikrobiyal ve Antitüberküler Etkilerinin Araştırılması

Anahtar Kelimeler

Hidrazon,
Antitüberküler etki,
Antimikrobiyal etki

Özet: Bir seri hidrazon türevi, antifungal, antimikrobiyal ve antitüberküler etkilerini araştırmak için sentezlendi. Bileşiklerin bu etkileri, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* izolat (ESBL), *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* izolat (gentamisine dirençli), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* izolat (MRSA), *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecalis* izolat (VRE), *Candida albicans*, *Candida krusei* ve *Mycobacterium tuberculosis* karşısında araştırıldı. Sentez edilen bileşiklerden **B23** *Candida albicans* karşısında 16 µg/mL MİK değeri ile, **B24** ise *Staphylococcus aureus* izolatı (MRSA) karşısında 16 µg/mL MİK değeri ile en iyi etkiyi gösterdi. *Mycobacterium tuberculosis* karşısında en etkin bileşiğin ise 32 µg/mL MİK değeri ile bir şalkon türevi olan **E9** olduğu bulundu. Bununla birlikte, tüm bileşiklerin *Escherichia coli* ve *Escherichia coli* izolat karşısında etkisiz olduğu saptandı.

1. Introduction

Tuberculosis causes an estimated one million six hundred and seventy thousand deaths annually [1]. The estimated number of infected people is 1.7 billion, but only some of them are developing the disease [2]. Since the duration of treatment protocols is very long, resistance develops to the drugs used for treatment. While old drugs are usually used in the treatment of tuberculosis, there are several new drugs such as bedaquiline, delamanide, pretomanide

and rifapentine that have reached phase 3 clinical trials [1,3,4]. The microorganism which is resistant to rifampin and isoniazid is called Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), and this resistance is increasing gradually [5,6]. It is very important to shorten the long treatment period, reduce the side effects of combined drug therapy, and discover new, effective drugs with less side-effects, instead of drugs that have lost their effectiveness due to resistance development.

S. aureus is a gram-positive human pathogen leading to community and hospital-acquired infections, which is commensally present in human skin and mucous membranes [7-9]. Since infections of *Staphylococcus aureus* may cause deaths, these bacterial infections are very dangerous [7,10,11]. The main routes of transmission of this microorganism are; patients who are colonized or infected with this microorganism, contaminated medical instruments, contaminated media surfaces, contaminated clothing of healthcare workers. In addition, airborne transmission occurs in the presence of patients who cannot control their secretions [12]. These bacteria can cause many infections in humans, such as bacteremia, skin and tissue infections, septic arthritis, infective endocarditis, lung infections, osteomyelitis, gastroenteritis, meningitis and urinary tract infection [7]. Although these bacteria do not cause infection on healthy skin, they can cause very serious infections mentioned above, if they enter the bloodstream and internal tissues [13,14].

S. aureus infections were successfully treated with penicillin derivatives in the 1940s. However, resistance to penicillin derivatives has developed with the emergence of the strains that synthesize beta-lactamase enzyme. Thereafter, treatment was started with methicillin, a semisynthetic penicillin derivative resistant to beta-lactamase enzyme. Over time, strains resistant to methicillin have also been evolved [9].

Candida are fungi that may be found in the microbiota. However, they are opportunistic pathogens and may cause diseases in case of immunosuppression. They may also be resistant to antifungal agents by different mechanisms, especially by forming biofilm [15].

Since the development of resistance to antibiotics and antifungal drugs increases rapidly, many of these drugs lose their effectiveness in a short time. Therefore, the discovery of new effective antibiotics has gained great importance. Hydrazone group compounds are remarkable for their antimicrobial, antifungal and antitubercular properties [16-18]. In this study, we investigated the antimicrobial, antifungal and antitubercular effects of a group of hydrazone compounds.

2. Material and Method

2.1. Synthesis

Chalcone derivatives were obtained by reacting acetophenone and benzaldehyde derivatives in KOH/methanol. The hydrazone compounds were obtained by reacting the chalcone derivatives with the hydrazide compounds. Reaction and product details, have been previously published [19].

2.2. Determination of antibacterial and antifungal activity

Antibacterial and antifungal susceptibility testing were performed through the guidelines of CLSI-M100-S16 [20] and M27-A3 [21] standards, respectively. *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *C. albicans* ATCC 10231 and *C. krusei* ATCC 6258 and their clinical isolates were used in the study. *E. coli* isolate has extended spectrum beta lactamase enzyme and used as the ESBL strain. *C. krusei* ATCC 6258 strain was used because it is resistant to fluconazole naturally. A methicillin resistant *S. aureus* isolate which is resistant to all beta lactam antibiotics (MRSA), an *E. faecalis* isolate which is resistant to vancomycin (VRE) and a *P. aeruginosa* isolate which is resistant to gentamicin were also included in the study. The lowest concentration of the compounds that completely inhibits macroscopic growth was determined as minimum inhibitory concentrations (MICs). Details of the method is given in the literature [22].

2.3. Determination of antimycobacterial activity

Mycobacterium tuberculosis H37RV (ATCC 27294) was used as the quality control strain. MABA method was used to determine the antituberculosis activity as described by Franzblau et al. 1:1 mixture of 10X Alamar Blue reagent were added to wells. A blue color in the well showed no growth and a pink color showed growth. The MIC was defined as the lowest drug concentration which prevented a color change from blue to pink [23]. Details of the method is given in our previous publication [22].

3. Results

Initially, compounds **E9** and **E13** were synthesized by reaction of acetophenone and aldehyde derivatives. Then, the compounds **E9** and **E13** were reacted with 2-furoic hydrazide, 2-thienyl hydrazide and 4-methyl-1,2,3-thiadiazol 5-carbo hydrazide to form compounds **B22**, **B23**, **B24**, **B25** (Figure 1).

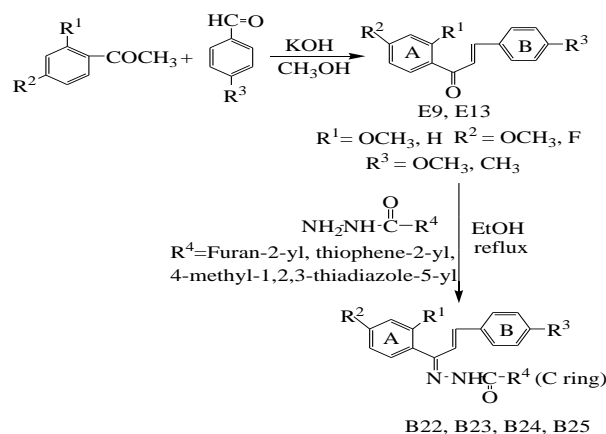


Figure 1. Synthesis stages

Table 1 shows the formulas of the compounds.

Table 1. Formulas of compounds

Compound	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
E9	-H	-F	-OCH ₃	-
E13	-OCH ₃	-OCH ₃	-CH ₃	-
B22	-OCH ₃	-OCH ₃	-CH ₃	Thiophene-2-yl
B23	-OCH ₃	-OCH ₃	-CH ₃	Furan-2-yl
B24	-H	-F	-OCH ₃	Thiophene-2-yl
B25	-H	-F	-OCH ₃	4-Methyl-1,2,3-thiadiazole-5-yl

Antitubercular and antimicrobial activities of synthesized compounds were determined. In determining these effects, ampicillin, gentamicin, ofloxacin, meropenem, vancomycin, ampicillin / sulbactam (1/1), Amoxicillin / clavulonic acid (2/1), fluconazole, amphotericin B, ethambutol and isoniazid standards were compared, obtained results are displayed in Table 2.

4. Discussion and Conclusion

Compounds **B22** and **B23** contain methoxyl at positions 2 and 4 in ring A, and methyl at para position in ring B. Of the two compounds, **B22** carries the thiophene ring as the C ring, while **B23** carries the furan ring. When the compounds **B22** and **B23** were compared, an increase was observed in the activity against MRSA and *C. albicans* with the

substitution of the furan ring instead of thiophene as the C ring. However, the presence of furan ring in the structure was found to increase the effect on *E. coli*, *P. aeruginosa* isolate (gentamicin resistant), *S. aureus*, *E. faecalis* isolate (VRE) and *C. krusei*. Compounds **B22** and **B23** were obtained by reacting compound **E13** with different hydrazides. Compound **E13**, which is a chalcone, showed better activity only against *S. aureus*, when compared with the compounds **B22** and **B23** which are formed by its transformation. Apart from this, it has the same or worse effect against all other bacterial and fungal strains, suggesting that the reaction of the chalcone with hydrazides generally increases the effect. Compounds **B24** and **B25** both carry a fluorine atom at para position of ring A and a methoxyl group at p-position of ring B. Compound **B24** contains thiophene as ring C, while ring C of compound **B25** contains a thiadiazole ring. Compound **B24** was found to be 2-fold more potent against *S. aureus* and *C. krusei* than compound **B25**. In addition, compound **B24** was found to be 4 times more effective against MRSA than compound **B25**. The presence of thiophene in the C ring is preferred because it increases the effect on many strains. The presence of thiadiazole in ring C increased the effect on *E. faecalis*. Compound **E9**, the starting material of compounds **B24** and **B25**, was found to be more effective on *C. albicans* and *M. tuberculosis* than the hydrazone derivative. For better antibacterial effect, the presence of the hydrazone structure and the use of thiophene as the C ring were required. Also, when the effect on tuberculosis is

Table 2. Antimicrobial and antifungal activities of the compounds

MIC (µg/mL)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Compounds												
B22	64	128	128	64	64	128	64	128	64	64	32	64
B23	128	128	128	64	128	256	32	128	128	16	64	64
B24	64	128	128	64	64	64	16	128	128	64	32	64
B25	64	128	128	64	64	128	64	64	128	64	64	64
E9	64	128	128	64	128	128	32	128	128	32	64	32
E13	128	128	128	128	128	64	64	128	128	128	64	64
Ampicilin	2	-	>1024	-	-	0.5	-	0.5	0.5	-	-	-
Gentamicin	0.25	-	256	1	64	0.5	128	8	8	-	-	-
Ofloxacin	0.015	-	16	1	1	0.125	0.5	1	4	-	-	-
Meropenem	0.008	-	0.015	0.25	0.015	0.03	-	4	8	-	-	-
Vancomycin	-	-	-	-	-	0.5	1	1	8	-	-	-
Ampicilin/sulbactam (1/1)	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amoxicilin/clavulonic acid (2/1)	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluconazole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0625	32	-
Amphotericin B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0.03	0.5	-
Ethambutol												4
Isoniazid												0.125

1: *E. coli* ATCC 25922, 2: *E. coli* ATCC 35218, 3: *E. coli* isolate (ESBL), 4: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, 5: *P. aeruginosa* isolate (resistant to gentamicin), 6: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, 7: *S. aureus* isolate (MRSA), 8: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, 9: *E. faecalis* isolate (VRE), 10: *Candida albicans* ATCC 10231, 11: *C. krusei* ATCC 6258, 12: *Mycobacterium tuberculosis* H37RV ATCC 27294

considered, the importance of preserving the chalcone structure emerges. In this group of compounds, it is seen that the chalcone structure is more effective against *C. albicans* which is a common fungal species.

When the compounds **B22** and **B24** carrying thiophene as ring C are compared, the compound **B24** having fluorine at the p-position of ring A and the methoxyl structure at the p-position of the ring B were found to be more effective against *S. aureus* and MRSA, with respect to compound **B22**, with methoxyl at the 2nd and 4th positions of ring A and methyl at the 4th position of the ring B. This study is important for the development of new drug active substances that can be used to treat *S. aureus*, a bacterium that causes many serious infections, including nosocomial infections. **B22** was found to be more effective only against VRE than **B24**.

When **E9** and **E13** compounds were compared, it was found that **E9** was more effective than **E13** in many bacteria (*E. coli*, *P. aeruginosa*, MRSA, *C. albicans*, *M. tuberculosis*). Compound **E9** was found to be 4 times more potent against *C. albicans* than **E13**. Compound **E13** was found to be twice as effective against *S. aureus* as compared to compound **E9**. It is known that the fluorine atom in the structure of compound **E9** increases the effect of the chalcone compounds [11]. Therefore, it is thought that compound **E9** is more effective.

In this study, antimicrobial and antifungal effects of some hydrazone derivatives and chalcones as starting materials of these compounds, were investigated. All the compounds showed a better effect against MRSA than gentamicin. Compound **B24** showed the best effect against MRSA. The presence of the fluorine atom in ring A and the thiophene group in ring C is important for activity against MRSA. Compounds **B22** and **B24** showed the same effect against *C. krusei* as fluconazole. Compounds **E9** and **B23** are the most effective compounds against *C. albicans*. The presence of fluorine atom in the 4th position in ring A and the preference of the furan ring as ring C increased the effect against *C. albicans*. The most effective compound against *M. tuberculosis* is the compound **E9**, which is a chalcone containing a fluorine atom. All other compounds showed a similar effect against *M. tuberculosis*.

References

- [1] Tiberi, S., Plessis, N., Walzl, G., Vjecha, M. J., Rao, M., Ntouni, F., Mfinanga, S., Kapata, N., Mvaba, P., McHugh, T. D., Ippolito, G., Migliori, G. B., Maeurer, M. J., Zumla, A. 2018. Tuberculosis: progress and advances in development of new drugs, treatment regimens and host-directed therapies. *Lancet Infectious Disease*. 18(7), e183-e198.
- [2] Furin, J., Cox, H., Pai, M. 2019. Tuberculosis. *Lancet*, 393, 1642-1656.
- [3] Evranos-Aksöz, B. 2014. New Drug candidates in tuberculosis treatment. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 71(4), 207-220.
- [4] WHO. 2017. Global tuberculosis report, 2017. Geneva World Health Organization, <https://reliefweb.int/report/world/global-tuberculosis-report-2017> (Accessed date: 03.01.2020)
- [5] Monedero, I., Caminero, J. A. 2010. Management of multidrug-resistant tuberculosis: an update. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 4, 117-127.
- [6] Yao, L., LiangLiang, C., JinYue, L., WanMei, S., Lili, S., YiFan, L., HuaiChen, L. 2019. Ambient air pollution exposures and risk of drug-resistant tuberculosis. *Environment International*, 124, 161-169.
- [7] Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., Fowler, V.G. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603-661.
- [8] Rasigade, J. P., Vandenesch, F. 2014. *Staphylococcus aureus*: a pathogen with still unresolved issues. *Infection Genetic Evolution*, 21, 510-514.
- [9] Sancak, B. 2011. *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance. *Bulletin of Microbiology*, 45(3), 565-576.
- [10] Bradley, S. F. 2002. *Staphylococcus aureus* infections and antibiotic resistance in older adults. *Clinical Infectious Diseases*, 34, 211-216.
- [11] Xu, M., Wu, P., Shen, F., Ji, J., Rakesh, K. P. 2019. Chalcone derivatives and their antibacterial activities: current development. *Bioorganic Chemistry*, 91, 103-133.
- [12] Çetinkaya Şardan, Y. MRSA as a causative agent of nosocomial infection: prevention and control. ichastaliklaridergisi.org/managete/fu_folder/2007-03/html/2007-14-3-161-167.htm (Accessed date: 15.12.2019).
- [13] Thomer, L., Schneewind, O., Missiakas, D. 2016. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. *Annual Review of Pathology*, 11, 343-364.
- [14] Lowy F. D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine*, 20, 339(8), 520-532.
- [15] Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., Mendes Giannini, M. J. S. 2013. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural

- antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 10-24.
- [16] Rollas, S., Küçükgülzel, Ş.G. 2007. Biological activities of hydrazone derivatives. *Molecules*, 12, 1910-1939.
- [17] Popiolek, L. 2017. Hydrazone – hydrazones as potential antimicrobial agents: overview of the literature since 2010. *Medicinal Chemistry Research*, 26, 287-301.
- [18] Nasrullaev, A., Bozorov, K., Bobakulov, K., Zhao, J., Nie, L. F., Turgunov, K. K., Elmuradov, B., Aisa, H. A. 2019. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of novel hydrazone-bearing tricyclic quinazolines. *Research on Chemical Intermediates*, 45, 2287-2300.
- [19] Evranos-Aksoz, B., Baysal, I., Yabanoglu-Ciftci, S., Djikic, T., Yelekci, K., Ucar, G., Ertan, R. 2015. Synthesis and screening of human monoamine oxidase-A inhibitor effect of new 2-pyrazoline and hydrazone derivatives. *Archiv Der Pharmazie*, 348, 743-756.
- [20] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS). 2006a. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 6th informational supplement. CLSI M100-S16, Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA.
- [21] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS). 2006b. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast approved standard, M27-A, Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA.
- [22] Evranos-Aksöz, B., Onurdağ, F. K., Özgacar, S. Ö. 2015. Antibacterial, antifungal and antimycobacterial activities of some pyrazoline, hydrazone and chalcone derivatives. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 70(7-8), 183-189.
- [23] Franzblau, S. G., Witzig, R. S., McLaughlin, J. C., Torres, P., Madico, G., Hernandez, A., Degnan, M.T., Cook, M. B., Quenzer, V.K., Ferguson, R.M., Gilman, R.H. 1998. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate alamar blue assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 362-366.

Su Kabağı Lifi (*Luffa Cylindrica*)-Epoksi Kompozitinde Sesin Yutulma Performansını Etkileyen Parametreler

Oya KESKİN¹, Sevta YILMAZ²

¹Antalya Bilim Üniversitesi, Güzel Sanatlar ve Mimarlık Fakültesi, Mimarlık Bölümü, 07190, Antalya, Türkiye

²İstanbul Teknik Üniversitesi, Mimarlık Fakültesi, Mimarlık Bölümü, 34367, İstanbul, Türkiye

(Alınış / Received: 29.01.2020, Kabul / Accepted: 25.02.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Anahtar Kelimeler

Su kabağı lifleri,
Doğal lifli kompozit,
Epoksi bağlayıcı,
Ses yutma katsayısı,
Ses azaltım katsayısı

Özet: Her mekânın kullanım amacına yönelik, yönetmeliklerle belirlenmiş uygun ses düzeyi aralıkları vardır. Mekan içerisinde, ses düzeyinin istenen seviyeye getirilmesi bitirme malzemelerinin ses yutma özellikleri kullanılarak sağlanmaktadır. Pratikte oldukça yaygın kullanılan cam yünü gibi malzemeler, özellikle uygulama sırasında insan sağlığı için zarar verici olmaktadır. Bu nedenle de pek çok alanda olduğu gibi, ses yutma malzemelerinde de doğal malzeme arayışı özellikle son yıllarda daha önemli hale gelmiştir. Bu çalışmada*, doğal bir bitki lifi olan Su Kabağı (LC) lifleri kullanılarak üretilen kompozitler ile insan sağlığı için zararlı olmayan alternatif bir ses yutucu malzeme üretimi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, su kabağı (LC) lifleri epoksi bağlayıcı ile kullanılarak kompozit malzeme üretilmiş ve empedans tüpü yöntemi ile numunelerin ses yutma katsayıları belirlenmiştir. Aynı zamanda, malzeme kalınlığı ve lif oranı parametrelerinin ses yutma performansı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar grafikler halinde sunulmuş ve karşılaştırmalar yapılmış ve sonuçlar, malzeme kalınlığı ve lif oranının ses yutma performansı üzerinde etkili olduğunu göstermiştir.

Parameters Affecting the Sound Absorption Performance of *Luffa Cylindrica* Fibers-Epoxy Composite

Keywords

Luffa Cylindrica,
Natural fiber composite,
Epoxy binder,
Sound absorption coefficient,
Noise reduction coefficient

Abstract: There are appropriate sound level ranges determined by regulations for the intended use of each place. In the room acoustics, finishing material's sound absorption coefficients are used to calculate the reverberation time. Materials such as glass wool, which are widely used in site, are harmful for human health, especially during application. For this reason, as in many fields, the search for natural materials in sound absorption materials has become more important especially in recent years. In this study, it is aimed to produce an alternative sound absorbing material that is not harmful to human health with composites that will be produced by using a natural plant fiber named *Luffa Cylindrica*. In this context, using the *Luffa Cylindrica* fibers with epoxy binder, composite material is produced and the sound absorption coefficients of the samples are determined by impedance tube method. Also, the effect of material thickness and fiber ratio parameters on sound absorption performance are examined. The results are presented in graphs and compared to each other. The results showed that the material thickness and fiber ratio had an effect on sound absorption performance.

1. Giriş

Günlük yaşamda, insanlar kapalı mekânlarda (ofis, restoran, okul, tiyatro salonu vb.) farklı ses düzeylerine maruz kalmaktadırlar. Kapalı mekan içerisindeki ses düzeylerinin, belirlenen değerlerin üzerinde ya da çok altında olması; insanları farkında

olmasalar dahi olumsuz yönde etkilemektedir. Kuttruff, [1], bu durumu pek çok insanın maruz kaldıkları akustik ortamın farkında olmalarına rağmen, bunu 'iyi veya zayıf akustik' olarak tanımlayarak sebeplerini anlayabilen çok az sayıda kişi olduğunu söylemiştir. Farklı mekanlar için olması gereken ses düzeyleri her ülkenin kendine ait

*İlgili yazar: oya.keskin@antalya.edu.tr

yönetmeliklerinde belirtilmiştir. Türkiye için bu değerler 'Binaların Gürültüye Karşı Korunması Hakkında Yönetmelik' 30082 sayılı Resmi Gazete'de 2017 yılında yayınlanmıştır [2]. İnsanların, akustik açıdan konforlu bir ortamda bulunmaları için mekan içerisindeki ses düzeylerinin ayarlanması gerekmektedir. Kapalı bir mekanda ses düzeylerinin ayarlanması, farklı bitirme malzemelerinin ses yutma değerleri kullanılarak sağlanır.

Çoğu ortamda duyulan ses, doğrudan sesin kaynağından veya kaynaklardan, yüzeylerden ve diğer nesnelere gelen dolaylı yansımalarından oluşan bir kombinasyondur. Örneğin, oda akustiğinde, hem doğrudan ses hem de duvarlardan, tavan ve yerden gelen ses yansımaları, akustik kalitesini belirlerken önemlidir [3]. Ses herhangi bir fiziksel nesne ile etkileşime girdiğinde yutulur. Bunun bir nedeni, ses dalgası bir nesneye çarptığında, o nesnenin sonsuz katı olmadıkça titreşim yapmasıdır. Bu, titreşim enerjisinin ses dalgasından çarptığı nesneye aktarıldığı anlamına gelmektedir. Bu enerjinin bir kısmı, nesnenin yapıldığı malzemedeki iç sürtünme kayıplarından dolayı yutulmaktadır. Bir başka enerji kaybı biçimi de ses dalgasının gözenekli bir yüzeye çarptığında ya da geçtiğinde ortaya çıkar. Tüm lifler ve delikler nedeniyle malzemede çok geniş bir yüzey alanı vardır. Ses dalgasının hız bileşeninin yüzey ile etkileşimi nedeniyle malzemenin yüzeyinde sürtünme kayıpları oluşmaktadır [4]. Yutulan enerjinin yutuculuk kısmı ses yutma katsayısı (α) ile ölçülmektedir. Yüksek derecede yansıtıcı malzemelerin ses yutma katsayısı 0'a, yüksek derecede yutucu malzemelerin ses yutma katsayısı 1'e yakındır. Neredeyse hiçbir malzeme tamamen yutucu veya tamamen yansıtıcı değildir. Genel olarak, ses yutma katsayısı 0.20 ve altı malzemeler oldukça yansıtıcı kabul edilirken, yüksek yutucu malzemelerin ses yutma katsayıları 0.80 ve üzeridir. Sesin yutulması tıpkı sesin azaltımında olduğu gibi frekansa bağlıdır [5].

Bir mekânın hacminin akustik performans üzerindeki temel etkisi bulunduğundan beri çınlama süresi en önemli akustik parametre olarak kullanılmaktadır. Çınlama süresi genel olarak, alıcıya gelen direkt sestten sonra 50-100ms içerisinde yine alıcıya ulaşan yansıyan ses olarak tanımlanabilir [6]. Mekânların kullanım amaçlarına göre uygun akustik ortam için sağlanması gereken çınlama süreleri de değişiklik göstermektedir. Mekân içerisinde gerekli çınlama süresinin ayarlanmasında, Sabine formülü bağlamında bitirme malzemelerinin ses yutma katsayıları kullanılmaktadır. Sesin yutulması için kullanılan malzemeler genellikle lifler, köpükler, delikli paneller, zarlar, rezonatörler ve farklı kompozit malzemeler olarak sıralanabilir. Nor vd. [7] ve Zulkifli vd. [8] özellikle inşaat sektöründe tercih edilen ses yutucu malzemelerin cam veya mineral yünü malzemeler olduğunu belirtmişlerdir, Ayrıca Nor vd. [7] bu malzemelerin ticari pazardaki

hâkimiyetleri nedeniyle alternatif malzemelerin üretiminin nispeten zayıf kaldığını da eklemiştir. Ancak son yıllarda duvar veya panel içerisinde kullanılan cam ve mineral yünü malzemelerin özellikle uygulama sırasında akciğer problemleri, göz problemleri gibi işçi sağlığına olan olumsuz etkileri nedeniyle farklı malzemelere yönelim başlamıştır. Biswal, [9], araştırmacıların; özellikle lifli kompozit malzemelerde daha iyi mekanik özellikler göstermesi, daha kolay elde edilebilmesi ve daha ucuz olmaları nedeniyle sentetik lifler yerine organik liflere yöneldiğini söylemiştir. Organik liflerin akustik malzeme olarak kullanım avantajı; maliyetinin daha düşük olması, kolaylıkla elde edilebilir olması, yenilenebilir ve aşınmaya dayanıklı olması, uygulama kolaylığı ve uygulama ve kullanım sırasında insan sağlığını tehdit etmiyor oluşudur.

Doğal liflerin kompozit malzemelerde kullanılmaya başlanmasıyla birlikte, ses yutucu malzemelerde doğal lif kullanımıyla ilgili literatürde pek çok çalışma yapılmış ve yapılmaktadır. Koizumi vd. [10], bambu lifleri ve bağlayıcı kullanarak yaptığı çalışmada ürettiği kompozit malzemelerin ses yutma performansı, karakteristik empedans ve dağılıma sabiti özelliklerini incelemiştir. 2009 yılında doğal lifler kullanılarak yapılan başka bir çalışmada çay yaprağı lifleri kullanılmış ve farklı kalınlıkların ses yutma performansına etkisi gözlemlenmiştir [11]. Kalınlığın ses yutuculuğuna etkisi ile ilgili 2010 yılında yapılan diğer bir çalışmada Malezya Palmiyesi lifleri kullanılmıştır [12]. Kenaf lifleri ve polysterin ses yutma performanslarının incelendiği çalışma, Alba vd. [13] tarafından gerçekleştirilmiştir. Veerakumar ve Selvakumar, [14], Kapok lifleri ile polypropolan'ı karıştırarak kompozit malzeme üretmiş ve malzemenin ses yutma katsayısı ve ses azaltım katsayısını (NRC) ölçmüştür. Çay yaprağı liflerinin izosiyanat ve polioli ile karışımıyla kompozit üreten Ekici vd. [15], kompozitlerin ses yutma performanslarını değerlendirmişlerdir. 2013 yılında Kapok doğal lifleri kullanılarak yapılan başka bir çalışmada kompozit malzeme üretirken liflerin diziliminin ses yutuculuğuna etkisi araştırılmıştır [16]. Kapok, pamuk otu ve ipek otu lifleri ile yapılan çalışmada malzeme kalınlığı ile ses yutma performansı ilişkisi incelenmiştir [17]. Thigalavathi vd. [18] yaptıkları çalışmada, su kabağı (LC) lifleri ile yaptıkları çalışmada lifler içerisinde kapok ve pamuk lifleri karıştırarak ses yutma performansındaki değişimleri incelemişlerdir. Hindistan cevizi lifleri ile polivinil alkol karıştırılarak kompozit üretilen bir çalışmada farklı kalınlıklı kompozitlerin ses yutma performansına etkisi ölçülmüş ve farklı hesaplama yöntemlerine göre sonuçlarda karşılaştırma yapılmıştır [19]. Yuvaraj vd. [20], çalışmalarında, su kabağı (LC) lifleri ve poliüretan köpük kullanılarak kompozit üreterek, özellikle su kabağı lifi eklenen kompozitlerde ses yutma performansının artışı incelemişlerdir. Mohammad vd. [21] farklı malzeme kalınlığı ve farklı oranda hurma ağacı lifleri ile

Hindistan cevizi liflerinin ses yutma performansı üzerine ölçümler yapmış ve sonuçları karşılaştırmışlardır. Su kabağı (LC) lifleri ve epoksi kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada kompozitlerin ses yutma, ses geçiş kaybı ve mekanik özellikleri incelenmiştir [22]. Taban vd. [23], yaptıkları diğer bir çalışmada hurma ağacı liflerine polivinil alkol ekleyerek kompozit malzemeler üretmiş ve malzeme kalınlığı, lif oranı, hava boşluğu gibi farklı parametrelerin kompozitlerin ses yutma performansı üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir.

Tüm bu bilgiler ve literatürde yapılmış çalışmalar doğrultusunda, bu çalışmada insan sağlığına zarar vermeyen doğal lifli bir kompozit malzemenin ses yutma performansı ve ses azaltım katsayısının, malzeme kalınlığı ve hacimce lif oranına bağlı olarak değişiminin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

Çalışma kapsamında, kompozit üretmek için doğal bir bitki lifi olan su kabağı (LC) lifleri ile bağlayıcı olarak termoset grubundan epoksi kullanılmıştır.

Su kabağı lifleri selüloz ve odun özü içermektedir. Farklı yönlerdeki liflerden oluşan odunsu bir yapısı vardır. Bu lifler doğal bir reçineyle bir arada tutulmaktadır. %60 selüloz, %30 yarı selüloz, %10 odun özü içermektedir [24]. Düşük maliyeti, geri dönüşüm özelliği ve insan sağlığı için zarar teşkil etmemesi nedeniyle son zamanlarda farklı alanlarda tercih edilmektedir. Bir grup sert, sıkı liften oluşan lifler aşınmaya meyillidir [25].

Epoksi reçinesinin sentezi 1930'lu yıllarda başlamış ve 1940'lı yıllarda sanayi üretimine geçmiştir. Epoksi reçine, kompozit içerisinde kullanımında yüksek mekanik mukavemet, mükemmel dielektrik özellikleri ve iyi kimyasal korozyon direnci ile liflerle güçlü bir bağ oluşturur. Son yıllarda epoksi reçine ve sertleştirici madde türleri büyük oranda gelişerek, özellikle karbon ve bor lifli kompozit malzemelerin yerine geniş uygulama alanları bulmaktadır [26]. Bu bağlamda, su kabağı (LC) lifleri epoksi bağlayıcı ile kullanılarak elde edilen kompozit malzemenin ses yutma katsayıları belirlenmiştir.

2.1. İncelenen parametreler

Çalışma kapsamında, su kabağı (LC) lifleri ve epoksi kullanılarak üretilen kompozit malzemede malzeme kalınlığı ve kompozit içerisindeki lif oranının ses yutma performansı ve ses azaltım katsayısına etkisi incelenmiştir.

İncelenen parametreler belirlendikten sonra her bir parametre için tanımlanan özellikler aşağıda verildiği gibidir;

- Malzeme kalınlığı: 1cm-3cm-5cm
- Hacimce lif oranı: %10- %30-%50-%70-%90

Belirlenen parametrelere göre su kabağı (LC) ve epoksi kullanılarak kompozit malzeme örnekleri üretilmiştir. Üretilen kompozit numuneleri için belirlenen kodlar aşağıdaki Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Numune Kodları

Numune Kodu	Malzeme kalınlığı ve lif oranı
SE 1-10	1 cm, %10
SE 1-30	1 cm, %30
SE 1-50	1 cm, %50
SE 1-70	1 cm, %70
SE 1-90	1 cm, %90
SE 3-10	3 cm, %10
SE 3-30	3 cm, %30
SE 3-50	3 cm, %50
SE 3-70	3 cm, %70
SE 3-90	3 cm, %90
SE 5-10	5 cm, %10
SE 5-30	5 cm, %30
SE 5-50	5 cm, %50
SE 5-70	5 cm, %70
SE 5-90	5 cm, %90

2.2. Kompozitlerin hazırlanması

Doğadan ham halde elde edilen su kabağı (LC) lifleri, ilk olarak liflerin yumuşatılması ve temizlenmesi işlemlerinden geçirilmiştir. Daha sonra, lifler Şekil 1'de gösterildiği gibi parçalara ayrılmış ve kompozit içerisinde kullanılacak hale getirilmiştir.



Şekil 1. Kompozit içerisinde kullanım için hazır hale getirilmiş lifler

Liflerin hazırlığı tamamlandıktan sonra, daha önce belirlenmiş hacim oranlarına göre farklı kalınlıktaki kaplara lifler yerleştirilmiş ve içerisine epoksi enjektisi yapılmıştır. Bu yöntem, literatürde 'El ile Yayma Yöntemi (Hand Lay-up)' olarak geçmektedir. El ile yayma (hand lay-up) yöntemiyle üretilen lif takviyeli kompozitlerde termoset polimer bağlayıcı kullanılması tipik bir işlemdir [26]. Tüm kalıplara, gerekli düzeyde epoksi enjektisi yapıldıktan sonra, kompozitler 48 saat süreyle oda sıcaklığında kürlmeye bırakılmıştır.

2.3. Ses yutma katsayısı ölçümleri

Ses yutma katsayısı tayininde, yaygın olarak duran dalga yöntemi ve çınlama odası yöntemi kullanılmaktadır. Çalışma kapsamında, empedans tüpü kullanılarak duran dalga yöntemi ile kompozit numunelerinin ses yutma katsayıları belirlenmiştir. Testler, Süleyman Demirel Üniversitesi Doğal ve Endüstriyel Yapı Malzemesi laboratuvarında, BİAS mühendislik tarafından üretilen TestSense empedans tüpü kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

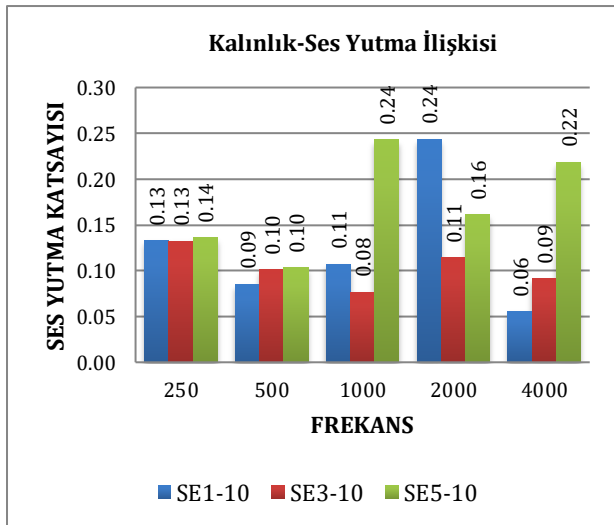
Cihazın hassasiyet düzeyinin artırılması için faz kalibrasyonu yapıldıktan sonra, farklı kalınlık ve lif oranında üretilen her bir numune için ayrı ayrı ses yutma testleri yapılmış ve 1/3 oktav bandında 250-4000Hz aralığında ses yutma katsayıları elde edilmiştir.

3. Bulgular

Ses yutma katsayısı ölçümleri tamamlandıktan sonra, daha önceden belirlenen malzeme kalınlığı ve hacimce lif oranı parametrelerinin ses yutma performansına etkisini incelemek için elde edilen sonuçlar arasında karşılaştırma yapılmıştır.

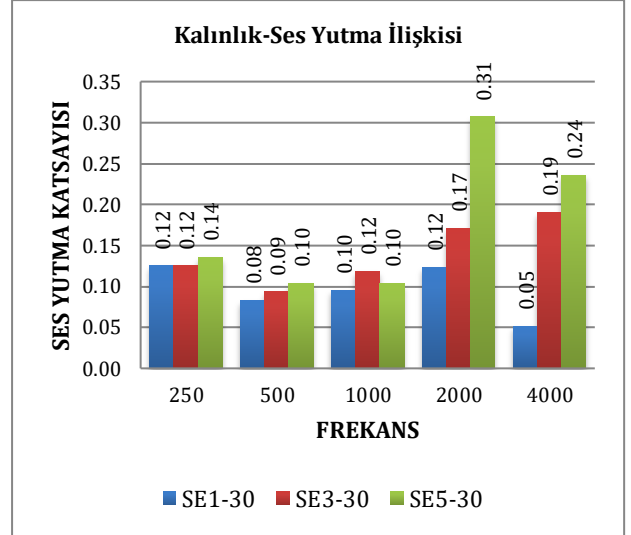
3.1. Malzeme kalınlığı-ses yutma performansı ilişkisi

Malzeme kalınlığının ses yutma performansına etkisini incelemek için aynı kalınlıklı farklı lif oranlı malzemeler kendi içlerine karşılaştırılmıştır. İlk olarak, %10 lif oranlı numunelerde kalınlığın etkisi kıyaslanmış ve Şekil 2'de verilmiştir. Buna göre, lif oranının oldukça düşük olduğu bu 3 numunede, en iyi ses yutma performansı 1000 Hz'de 5cm kalınlıkta ve 2000Hz'de 1cm kalınlıkta elde edilmiştir. Özellikle, 2000 Hz'de 1cm kalınlıklı malzemede ses yutma performansının diğerlerine göre daha yüksek çıkmasının nedeni olarak kalınlık azlığından dolayı liflerin yüzeye daha yakın olması söylenebilir.



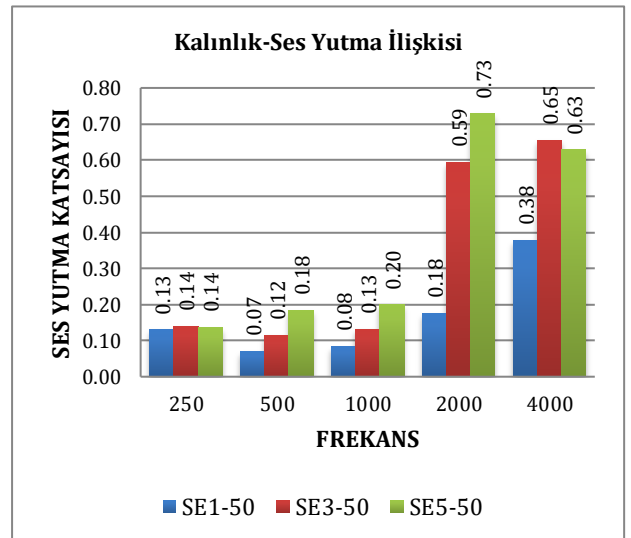
Şekil 2. %10 lif oranlı 1cm, 3cm ve 5cm kalınlıklı malzemelerin ses yutma performansının karşılaştırması

Şekil 3'te, %30 lif oranlı 3 farklı kalınlıklı numunenin ses yutma performansı ilişkisi verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, 250, 500 ve 1000 Hz'de tüm kalınlıklarda benzer ses yutma performansları dikkate çarpmaktadır. 2000 ve 4000 Hz olan yüksek frekanslarda, 5cm kalınlıklı malzeme daha yutucu bir performans sergilemiştir. Yine de sonuçlar ses yutma açısından istenen düzeyde değildir. Bunun nedeni, lif oranının düşüklüğüdür.



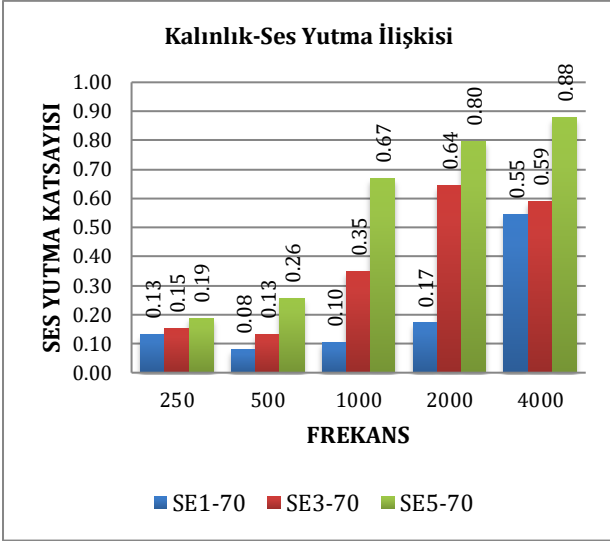
Şekil 3. %30 lif oranlı 1cm, 3cm ve 5cm kalınlıklı malzemelerin ses yutma performansının karşılaştırması

% 50 lif oranlı numunelerin ses yutma performansları Şekil 4'te verilmiştir. 250Hz'de çok etkili olmayan kalınlık parametresi, orta ve yüksek frekanslarda kalınlığın artması ile birlikte artış göstermiştir.



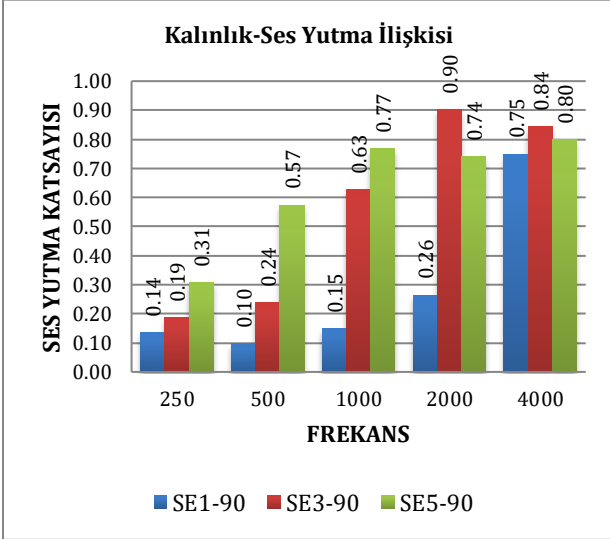
Şekil 4. %50 lif oranlı 1cm, 3cm ve 5cm kalınlıklı malzemelerin ses yutma performansının karşılaştırması

Ses yutma performansı üzerinde kalınlığının etkisinin incelendiği diğer bir grafik Şekil 5'te sunulmuştur. Lif oranının %70 olduğu numunelerde, bütün frekanslarda kalınlık artışı ile birlikte ses yutma katsayısında da artış meydana gelmiştir.



Şekil 5. %70 lif oranlı 1cm, 3cm ve 5cm kalınlıklı malzemelerin ses yutma performansının karşılaştırması

Kalınlığın ses yutma performansı üzerindeki etkisinin incelendiği son grafik Şekil 6'da verilmiştir. %90 lif oranı ile hazırlanan numunelerde özellikle yüksek frekanslarda tüm kalınlıklarda ses yutucu bir performans gözlemlenmiştir. Özellikle bu grafikten de anlaşılacağı üzere, kalınlık artışı daha çok alçak frekanslarda etkili bir parametre olduğundan, yüksek frekanslarda dalgalanma olurken alçak frekanslarda kalınlık artışı ile birlikte ses yutma katsayısının da arttığı açıkça görülmektedir.

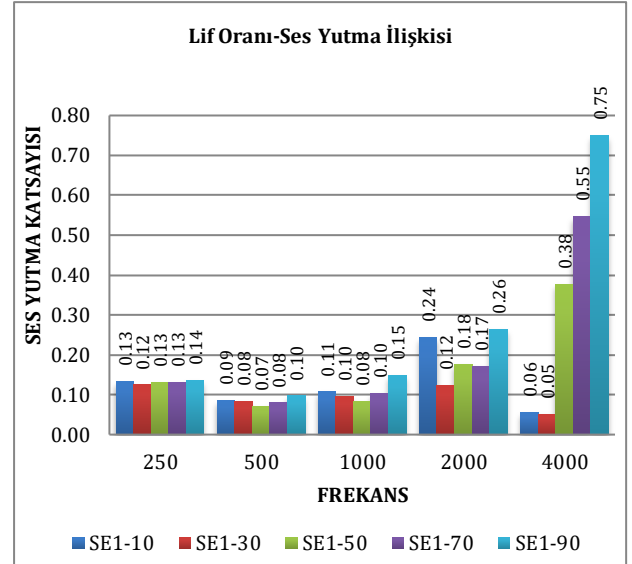


Şekil 6. %90 lif oranlı 1cm, 3cm ve 5cm kalınlıklı malzemelerin ses yutma performansının karşılaştırması

3.2. Lif oranı-ses yutma performansı ilişkisi

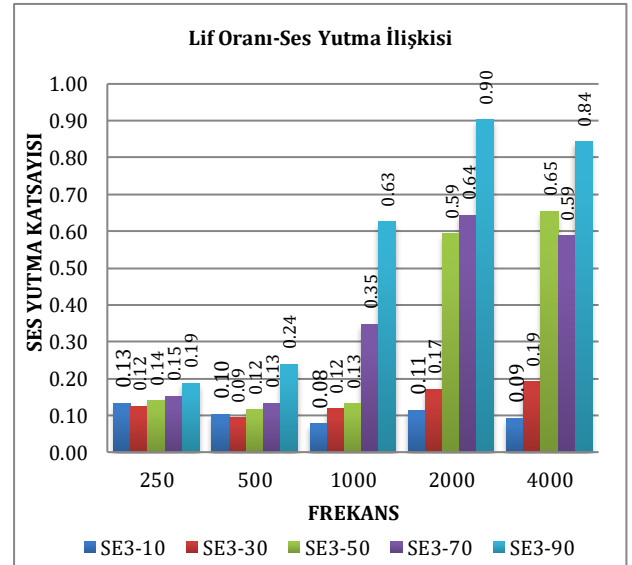
Bilindiği üzere, lifli kompozit malzemelerde, malzeme içerisinde kullanılan lif oranı özellikle orta ve yüksek frekanslarda ses yutuculuğu açısından etkili bir parametredir. Lifli malzemelerde, gelen ses dalgaları lifler arasında titreşime yol açar ve ses enerjisi ısı enerjisine dönüşür. Birim alan başına düşen lif miktarının artması ile lifler arasındaki etkileşim de artacağından ses yutma performansında artış

gözlemlenir. Bunu ölçmek için, üretilen numuneler arasında aynı kalınlıklı numunelerde hacimce farklı lif oranlarının ses yutma sonuçlarına etkisi incelenmiştir. İlk olarak, 1cm kalınlıklı numunelerde lif oranının ses yutma performansına etkisi incelenmiş ve sonuçlar Şekil 7'de sunulmuştur. 1 cm kalınlıklı numunelerde, tüm frekanslarda en iyi yutma performansını %90 lif oranlı numune vermiştir. Özellikle 4000 Hz'de, %50, %70 ve %90 lif oranlı numunelerin ses yutma katsayıları oldukça yüksek çıkmıştır.



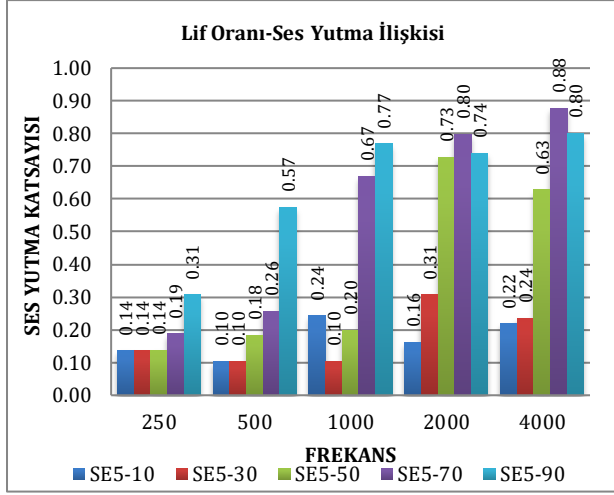
Şekil 7. 1cm kalınlıklı malzemelerde farklı lif oranlarının ses yutma performansına etkisi

Lif oranı artışı ile ses yutma katsayısının ilişkisinin incelendiği diğer bir analiz 3cm kalınlıklı numuneler arasında yapılmıştır ve sonuçlar Şekil 8'de verilmiştir. Özellikle orta ve yüksek frekanslarda fark daha çok olmakla birlikte, tüm frekanslarda lif oranı artışı ile ses yutma katsayısının da artarak 1'e yaklaştığı görülmektedir.



Şekil 8. 3cm kalınlıklı malzemelerde farklı lif oranlarının ses yutma performansına etkisi

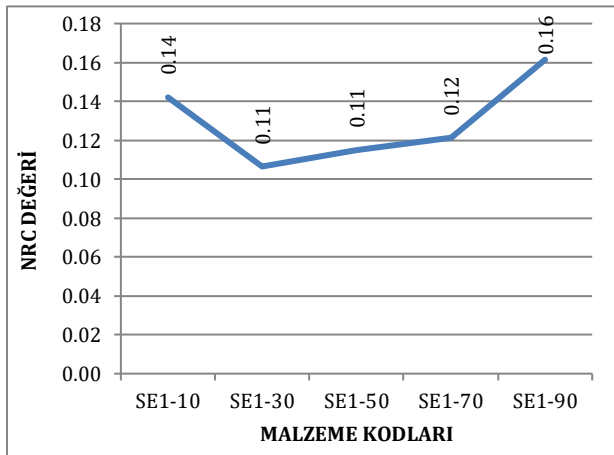
Son olarak, 5cm kalınlıklı numunelerde 5 farklı lif oranının ses yutma katsayısı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Şekil 9'daki sonuçlara bakıldığında, özellikle alçak ve orta frekanslarda lif oranı ile birlikte kalınlık artışının da devreye girmesi ile daha yutucu sonuçların elde edildiği söylenebilir. Grafik detaylı incelendiğinde, yüksek frekanslarda lif oranının ses yutma üzerinde ciddi bir etkisi olduğunu sonucuna varılmıştır.



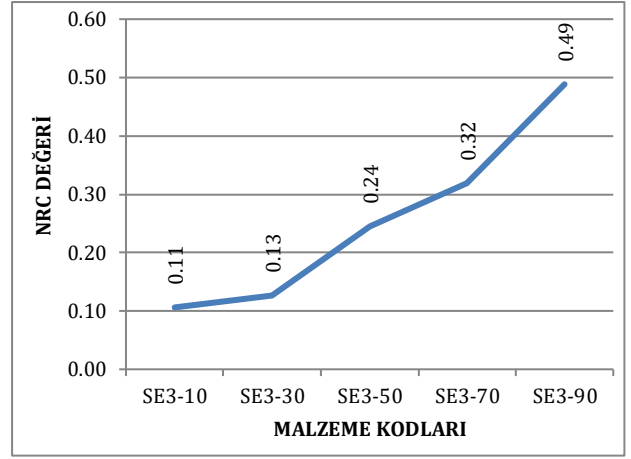
Şekil 9. 5cm kalınlıklı malzemelerde farklı lif oranlarının ses yutma performansına etkisi

3.3. Lif oranı-ses azaltım katsayısı (NRC) ilişkisi

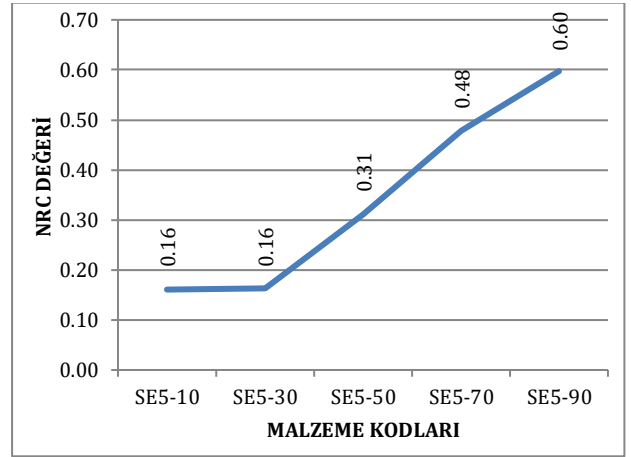
Ses azaltım katsayısı (NRC) bir malzemenin ses yutma performansının tek bir sayı ile gösterilmesidir. Bir malzemenin, 250Hz-2000Hz arasındaki ses yutma katsayısı değerlerinin ortalaması alınarak hesaplanır. Ses yutucu bir malzeme seçiminde elbette yalnızca ses azaltım katsayısı değerine bakmak doğru bir yaklaşım olmayacaktır. Ancak, özellikle yüksek frekanslarda akustik iyileştirme ya da çınlama kontrolü gereken mekanlarda ses azaltım katsayısına (NRC) bakarak seçim yapılabilir. Buna göre, 1cm kalınlıklı numunelerin NRC grafiği Şekil 10'da, 3cm kalınlıklı numunelerin NRC grafiği Şekil 11'de ve 5cm kalınlıklı numunelerin NRC grafiği Şekil 12'de verilmiştir.



Şekil 10. 1cm kalınlıklı malzemelerin ses azaltım katsayısı değerleri



Şekil 11. 3cm kalınlıklı malzemelerin ses azaltım katsayısı değerleri



Şekil 12. 5cm kalınlıklı malzemelerin ses azaltım katsayısı değerleri

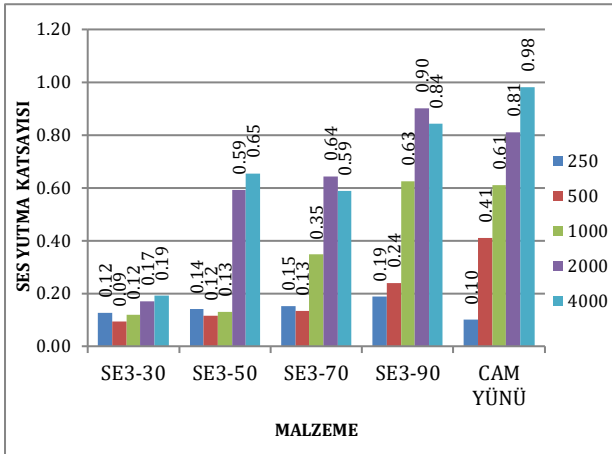
Grafikler incelendiğinde, ses azaltım katsayısı değerinin 1cm kalınlıklı numunelerde, farklı lif oranlarında, dikkate değer düzeyde değişmediğini söylemek mümkündür. Aradaki farkın en yüksek çıktığı düzey %70 ve %90 lif oranlı numuneler arasındadır ve bu değer 0.04 olduğu için ihmal edilecek düzeydedir. Ancak, 3cm ve 5cm kalınlıklı numunelere bakıldığında, ses azaltım katsayısı değerlerinin lif oranının artması ile birlikte gözle görülür düzeyde arttığını söyleyebiliriz. Buna göre, doğal lifli malzemelerde özellikle malzeme kalınlığının fazla olduğu numunelerde, ses azaltım katsayısı değerinin lif oranı artışı ile birlikte yükseldiği belirlenmiştir.

4. Tartışma ve Sonuç

Çalışmada, doğal bir bitki lifi olan su kabağı (LC) lifleri kullanılarak farklı fiziksel özellikli kompozit malzemeler hazırlanmıştır. Kompozit içerisinde bağlayıcı olarak epoksi tercih edilmiştir. Malzeme kalınlığı ve kompozit içerisindeki hacimce lif oranının ses yutma performansına etkisinin incelendiği bu çalışmada, 3 farklı kalınlıklı ve 5 farklı lif oranlı numuneler laboratuvar ortamında üretilmiş ve ses yutma testleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın temel

amacı, insan sağlığı açısından tehdit oluşturmayan ve üretimi hızlı ve üretim maliyeti düşük su kabağı (LC) liflerinin ses yutma malzemesi olarak kullanılabilirliğini incelemek olmuştur.

Sektörde yaygın olarak kullanılan cam yünü malzemesinin özellikle uygulama aşamasında insan sağlığına olan olumsuz etkileri bilinmektedir. Şekil 13'te 2010 yılında yapılmış bir çalışmadan alınan 3cm kalınlıklı cam yünü malzemesinin ses yutma katsayısı değerleri ile [27] bu çalışma kapsamında farklı lif oranları ile hazırlanan 3cm kalınlıklı kompozit numunelerinin sonuçlarının karşılaştırması verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, özellikle %90 lif oranlı kompozitin cam yününe alternatif bir ses yutma malzemesi olarak kullanılabilceği söylenebilir. Ayrıca özellikle 5cm kalınlıklı %90 lif oranlı kompozit, yüksek ses yutma katsayı değerleri nedeniyle, piyasada bulunan pek çok ses yutucu malzemeye alternatif olarak tercih edilebilir. İlerleyen dönemlerde, kompozitlerin ses yutma performanslarını geliştirmeye yönelik çalışmalar yapılmaya devam edecektir.



Şekil 13. 3cm kalınlıklı su kabağı (LC) lifli kompozit numuneleri ile 3cm kalınlıklı cam yünü malzemesinin ses yutma katsayılarının karşılaştırması

Teşekkür

Bu çalışma, İstanbul Teknik Üniversitesi Yapı Bilimleri doktora programında Prof. Dr. Sevtap Yılmaz danışmanlığında Oya Keskin tarafından yürütülmekte olan doktora tezi verileri kullanılarak yapılmıştır. Çalışma sürecinde, kompozit numunelerinin üretilmesinde yardımlarını esirgemeyen İstanbul Teknik Üniversitesi Mimarlık Fakültesi Malzeme Laboratuvarı yetkililerine ve ses yutma katsayısı ölçümlerinin gerçekleştirildiği Süleyman Demirel Üniversitesi Doğal ve Endüstriyel Yapı Malzemeleri Laboratuvarı hocalarına teşekkürü bir borç bilirim.

Kaynakça

[1] Kuttruff, H. 2009. Room Acoustics. 5th edition. Spon Press, 2 Park Square, Milton Park, Abingdon Oxon, 389s.

- [2] Resmi Gazete 2017. Binaların Gürültüye Karşı Korunması Hakkında Yönetmelik. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2017/05/20170531-7.htm> (Erişim Tarihi:23.01.2020).
- [3] Cox, T., d'Antonio, P. 2016. Acoustic Absorbers and Diffusers: Theory, Design and Application. 3rd edition. Crc Press, Boca Raton, 575s.
- [4] Howard, D. M., Angus, J. 2017. Acoustics and Psychoacoustics. 5th edition. Routledge, New York, 518s.
- [5] Cavanaugh, W. J., Tocci, G. C., Wilkes, J. A. 2010. Architectural Acoustics: Principles and Practice. 2nd edition. John Wiley & Sons, Hoboken New Jersey, 329s.
- [6] Fuchs, V. H. 2013. Applied Acoustics: Concepts, Absorbers, and Silencers for Acoustical Comfort and Noise Control. Springer Heidelberg Dordrecht London New York, 607s.
- [7] Nor, M. J. M., Jamaludin, N., Tamiri, F. M. 2004. A Preliminary Study of Sound Absorption Using Multi-Layer Coconut Coir Fibers. Electronic Journal Technical Acoustics, 3, 1-8.
- [8] Zulkifh, R., Nor, M. M., Tahir, M. M., Ismail, A. R., Nuawi, M. Z. 2008. Acoustic Properties of Multi-Layer Coir Fibres Sound Absorption Panel. Journal of Applied Sciences, 8(20), 3709-3714.
- [9] Biswal, M., Sahu, S. K., Asha, A. V. 2016. Vibration of Composite Cylindrical Shallow Shells Subjected to Hygrothermal Loading- Experimental and Numerical Results. Composites Part B: Engineering, 98, 108-119.
- [10] Koizumi, T., Tsujiuchi, N., Adachi, A. 2002. The Development of Sound Absorbing Materials Using Natural Bamboo Fibers. WIT Transactions on The Built Environment, 59.
- [11] Ersoy, S., Küçük, H. 2009. Investigation of Industrial Tea-Leaf-Fibre Waste Material for Its Sound Absorption Properties. Applied Acoustics, 70(1), 215-220.
- [12] Ismail, L., Ghazali, M. I., Mahzan, S., Zaidi, A. M. A. 2010. Sound Absorption of Arenga Pinnata Natural Fiber. World Academy of Science, Engineering and Technology, 67, 804-806.
- [13] Alba, J., del Rey, R., Ramis, J., Arenas, J. 2011. An Inverse Method to Obtain Porosity, Fibre Diameter and Density of Fibrous Sound Absorbing Materials. Archives of Acoustics, 36(3), 561-574.
- [14] Veerakumar, A., Selvakumar, N. 2012. A Preliminary Investigation on Kapok Polypropylene Nonwoven Composite for Sound Absorption. Indian Journal of Fibre & Textile Research, 37, 385-388.
- [15] Ekici, B., Kentli, A., Küçük, H. 2012. Improving Sound Absorption Property of Polyurethane

- Foams by Adding Tea-Leaf Fibers. Archives of Acoustics, 37(4), 515-520.
- [16] Xiang, H. F., Wang, D., Liua, H. C. 2013. Investigation On Sound Absorption Properties of Kapok Fibers. Chinese Journal of Polymer Science, 31(3), 521-529.
- [17] Ganesan, P., Karthik, T. 2016. Development Of Acoustic Nonwoven Materials from Kapok and Milkweed Fibres. The Journal of The Textile Institute, 107(4), 477-482.
- [18] Thilagavathi, G., Neela Krishnan, S., Muthukumar, N., Krishnan, S. 2018. Investigations on Sound Absorption Properties of Luffa Fibrous Mats. Journal of Natural Fibers, 15(3), 445-451.
- [19] Taban, E., Tajpoor, A., Faridan, M. Samaei, S.E., Beheshti, M.H., 2019. Acoustic Absorption Characterization and Prediction of Natural Coir Fibers. Acoustics Australia, 47(1), 67-77.
- [20] Yuvaraj, L., Jeyanthi, S., Chinnapandi, M., Babu, L. 2019. Experimental and Finite Element Approach for Finding Sound Absorption Coefficient of Bio-Based Foam. Journal of Vibroengineering, 21(6), 1761-1771.
- [21] Mohammad, M., Syukri, N. N., Nuawi, M. Z. 2019. Sound Properties Investigation of Date Palm Fiber. In Journal of Physics: Conference Series, IOP Publishing, 1150(1), 012003.
- [22] Koruk, H., Genç, G. 2019. Acoustic and Mechanical Properties of Luffa Fiber-Reinforced Biocomposites. In Mechanical and Physical Testing of Biocomposites, Fibre-Reinforced Composites and Hybrid Composites, Woodhead Publishing, 325-341.
- [23] Taban, E., Khavanin, A., Ohadi, A., Putra, A., Jafari, A. J., Faridan, M., Soleimanian, A. 2019. Study on the Acoustic Characteristics of Natural Date Palm Fibres: Experimental and Theoretical Approaches. Building and Environment, 161, 106274.
- [24] Ghali, L., Msahli, S., Zidi, M., Sakli, F. 2009. Effect of Pre-Treatment of Luffa Fibres on The Structural Properties. Materials letters, 63(1), 61-63.
- [25] Contreras-Andrade, I., Rincón-Pardo, D., Guerrero-Fajardo, C. A., Parra-Santiago, J., Guerrero-Romero, E. 2014. Natural Composite Material from Steelwool or Luffa Cylindrica under Natural, Rigid and Flexible Resin. Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 8, 906-917.
- [26] Wang, R. M., Zheng, S. R., Zheng, Y. G. 2011. Polymer Matrix Composites and Technology. Elsevier-WP, Woodhead Publishing, Oxford 549s.
- [27] Vidinlimen, G. T. 2010. Otomotiv endüstrisinde kullanılan gözenekli malzemelerin akustik özellikleri ve analizi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 149s, İstanbul

Yağ Gülü (*Rosa damascena* Mill.)'nün Mikroçoğaltımında En Uygun Sürgün ve Köklenme Ortamlarının Belirlenmesi

Ramazan DİLMEN¹, Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR^{*2}

^{1,2}Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, 32260, Isparta, Türkiye

(Alınış / Received: 30.01.2020, Kabul / Accepted: 17.03.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Anahtar Kelimeler

Rosa damascena,
Yağ gülü,
Mikroçoğaltım,
In vitro

Özet: Bu araştırma, ekonomik değerinin yanı sıra ülkemiz açısından bir prestij bitkisi olması nedeniyle de büyük önem taşıyan yağ gülü (*Rosa damascena*) için *in vitro* koşullarda etkili ve uygun maliyetli sürgün çoğaltma ve köklenme protokolü geliştirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada eksplant kaynağı olarak yağ gülü bitkilerine ait tek gözlü boğum parçaları kullanılmıştır. Sıvı modifiye MS ortamına ilave edilen benziladenin (BA) (1.0, 1.5 ve 2.0 mg/l)'nin 0 ve 0.1 mg/l konsantrasyonlarındaki naftalin asetik asit (NAA) ile yapmış olduğu 6 farklı kombinasyonunun, boğum eksplantlarından elde edilen *in vitro* sürgünlerin gelişimi üzerine olan etkileri belirlenmiştir. Yapılan üç alt kültür sonrasında elde edilen sürgünler, 2 mg/l indol bütirik asit (IBA), 30 g/l sakkaroz ve 162 mg/l floroglusinol (FG) içeren ½ MS ortamında 7 gün karanlıkta kültüre alınmalarının ardından, köklenme performanslarını değerlendirmek üzere, sıvı ½ MS ve sıvı ½ modifiye MS ortamlarında kültüre alınmışlardır. Araştırma sonucunda, sürgün çoğaltması ve büyümesi için 2 mg/l BA içeren sıvı modifiye MS ortamının; sürgünlerin köklendirilmesi için de 7 gün süreyle 2 mg/l indol bütirik asit (IBA), 30 g/l sakkaroz ve 162 mg/l FG içeren MS ortamında tutulmalarının ardından, sadece 30 g/l sakkaroz içeren sıvı ½ MS ortamlarına transfer edilmeleri ile en başarılı sonuçların elde edildiği belirlenmiştir. Araştırmada ayrıca düşük maliyet ve yüksek başarı ile *Rosa damascena* türü için sıvı ortamların etkin bir şekilde kullanılabileceği de belirlenmiştir.

Determination of the Most Appropriate Shoot and Rooting Media in the Micro-propagation of Oil Rose (*Rosa damascena*)

Keywords

Rosa damascena,
Oil rose,
Micropropagation,
In vitro

Abstract: This study was carried to improve an influential and cost-effective shoot proliferation and rooting protocol for oil rose (*Rosa damascena*) having great importance of its economic value as well as its prestige plant for our country. In this study, single nodal pieces belonging to oil rose plants were used as explant sources. It was determined that the effects of liquid modified Murashige and Skoog (MS) media containing 6 different combinations of benzyladenine (BA) (1.0, 1.5 and 2.0 mg/l) and naphthalene acetic acid (NAA) (0 and 0.1 mg/l) on the development of shoots obtained from nodal explants. After three subculture cycles, to evaluate rooting performance of shoots, they were cultured in ½ MS medium containing 2 mg/l indole butyric acid (IBA), 30 g/l sucrose and 162 mg/l phloroglucinol (PG) for 7 days in the dark and then transferred to liquid ½ MS and liquid ½ modified MS medium. At the end of the study, the most successful results for shoot proliferation were obtained from the liquid modified MS medium containing 2 mg/l BA. The best treatment for rooting of shoots was MS medium supplemented with 2mg/l indole butyric acid (IBA), 30 g/l sucrose and 162 mg/l PG for 7 days and then transferring the explants to liquid ½ MS medium added only 30 g/l sucrose. In the study, it was also determined that liquid media had significant potential for the propagation of *Rosa damascena* with low cost and high success.

1. Giriş

Yağ güllü (*Rosa damascena* Mill.), *Rosaceae* familyasının *Rosa* cinsi içinde yer alan çok yıllık bir bitki türüdür. Dünyada 150, Türkiye'de ise 25 gül türü bulunmakla beraber, bu türler içinde çok azı kuvvetli kokuya sahip bulunmaktadır. *Rosa damascena*, *Rosa centifolia*, *Rosa alba* ve *Rosa moschata* kokulu gül türleri içinde en önemli olanlarıdır [1]. *Rosa gallica* L. ve *Rosa phoenicia* Boiss. türlerinin doğal melezi olan ve "Isparta güllü" ya da "Pembe Yağ Güllü" olarak da isimlendirilen *R. damascena*, kendine özgü keskin ve yoğun kokusu ile başta parfüm ve kozmetik olmak üzere ilaç ve gıda endüstrisi gibi birçok alanda kullanılmaya potansiyeli bulunan bir gül türüdür [2].

Dünyada Bulgaristan, İran, Hindistan ve Çin'de önemli miktarda yetiştirilen *R. damascena*, ülkemizde, Göller Bölgesi olarak da adlandırılan, içinde Isparta, Burdur, Afyon, Denizli ile Konya ve Antalya'nın bir bölümünün yer aldığı yörede üretilmektedir. Yağ güllünden elde edilen başta gül yağı olmak üzere, gül suyu, gül koncreti ve gül absolütü içermiş oldukları uçucu bileşenlerle kozmetik ve parfümeri sanayinde yoğun talep görmektedirler. Bütün bunların yanı sıra tıpta birçok hastalığa karşı koruma, önleme, tedavi etme gibi özellikleri de bulunan bu ürünler, gıda sanayinde, kişisel bakım ve temizlik ürünlerinde de kullanılmaktadırlar [3,4,5].

Yağ güllü genel olarak ya tohum ya da çelik, kök sürgünleri, daldırma ve aşı gibi vejetatif çoğaltma yöntemleriyle çoğaltılmaktadır [6]. Anaç üretimi ve ıslah amaçlı çalışmalarda kullanılan tohumla çoğaltma, generatif yöntem olup, bu şekilde elde edilen bitkiler arasında geniş bir açılım bulunur. Zaman alıcı uygulamaları içeren vejetatif çoğaltma yöntemlerinin ise mevsimlere ve yıllara göre elde edilen başarının farklı olması, fidan elde etme oranının düşük olması, arazi, iş gücü ve yoğun tarımsal uygulamalara ihtiyaç göstermesi gibi birçok dezavantajları bulunmaktadır [7,8]. Son yıllarda yağ güllünün çoğaltılması sırasında yaşanan bu olumsuzlukları ortadan kaldırmak için doku kültürü teknikleri alternatif bir çoğaltma yöntemi olarak önem kazanmaya başlamıştır. Doku kültürü ile çoğaltma bir diğer ifade ile mikroçoğaltım, yılın her döneminde kısa sürede ve çok sayıda bitki elde etme olanağı sunan, tamamen kontrollü koşullarda ve yapay besin ortamlarında eksplant adı verilen küçük bitki parçalarının kullanılmasıyla gerçekleştirilen bir çoğaltma tekniğidir [3]. Sahip olduğu avantajlar nedeniyle yağ güllünün çoğaltımında özellikle son yıllarda mikroçoğaltımın büyük önem kazandığı görülmektedir.

Bu araştırma, ülkemiz açısından ekonomik değerinin yanı sıra bir prestij bitkisi olması nedeniyle de büyük önem taşıyan yağ güllü için *in vitro* koşullarda etkili ve

uygun maliyetli sürgün çoğaltma ve köklenme protokolleri geliştirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Materyal

Araştırmada eksplant kaynağı olarak Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama Bahçesi'nden temin edilen yağ güllü (*R. damascena*) bitkilerine ait yeşil sürgünlerin orta kısımlarından alınan 0.4-0.6 cm kalınlığa sahip yaklaşık 1-1.5 cm uzunluğundaki tek gözlü boğum parçaları kullanılmıştır.

2.2. Metot

2.2.1. Bitkisel materyallerin sterilizasyonu ve besin ortamlarında kültüre alınmaları

Eylül döneminde alınan yeşil sürgünler, üzerindeki yapraklar uzaklaştırıldıktan sonra 20 dakika boyunca akan çeşme suyu altında yıkanmıştır. Yıkama işlemi sona erdikten sonra, her birinin üzerinde bir boğum olacak şekilde parçalara ayrılan sürgün parçaları, %70'lik etil alkolde 30 saniye bekletilip, ardından %0.1 civa klorür ($HgCl_2$) ile 5 dakika süreyle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Ardından her biri 5'er dakika olmak üzere 3 kez steril saf su ile yıkanan eksplantlar, daha sonra içinde 30 g/l sakkaroz, 7 g/l agar bulunan katı Murashige ve Skoog (MS) [9] besin ortamında kültüre alınmıştır. İçinde 50 ml besin ortamı bulunan 250 ml'lik erlenlere dikilen eksplantlar, daha sonra sıcaklığı $24\pm 1^\circ C$ olarak ayarlanmış büyütme kabininde 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ve 3000 lüks ışık yoğunluğu koşullarında kültüre alınmıştır.

2.2.2. Sürgünlerin çoğaltılması

Kültüre alındıkları besin ortamında sürerek yaklaşık 4-5 cm uzunluğuna gelen sürgünler, daha sonra sürgün ortamlarına alınarak çoğaltılmaları sağlanmıştır. Bu amaçla temel besin ortamı olarak magnezyum sülfat ($MgSO_4$), kalsiyum klorür ($CaCl_2$) ve etilen-diamin-ferrik ($Fe-EDDHA$) (etilen diamin tetra asetik asit ($FeEDTA$) yerine) miktarları %25 oranında artırılmış modifiye MS ortamı kullanılmıştır. Sürgün çoğaltma aşamasında üç farklı konsantrasyonundaki benziladenin (BA) (1, 1.5 ve 2 mg/l)'nin 0 ve 0.1 mg/l konsantrasyonundaki naftalin asetik asit (NAA) ile yapmış olduğu 6 farklı kombinasyon kullanılarak, sürgün gelişimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Ortamlara ayrıca 30 g/l sakkaroz ilave edilmiştir. *In vitro* koşullarda tomurcukların sürmesiyle elde edilen sürgünler, içinde bu sıvı ortamdaki 20 ml bulunduran 300 ml'lik kavanozlara yerleştirilerek, sıcaklığı $24\pm 1^\circ C$ olarak ayarlanmış iklim odasında, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ve 3000 lüks ışık yoğunluğunda kültüre alınmışlardır. Araştırma ile ilgili denemeler 3

tekerrürlü, her tekerrürde 3 kavanoz ve her kavanozda da 3 sürgün olacak şekilde kurulmuştur. Kültürler 1 ay aralıklarla 3 kez aynı besin ortamları kullanılarak alt kültüre alınmışlardır.

2.2.3. Sürgünlerin köklendirilmesi

Sürgün ortamlarında elde edilen sürgünler, daha sonra köklendirilmek amacıyla öncelikle 2 mg/l indol bütirik asit (IBA), 30 g/l sakkaroz, ve 162 mg/l floroglusinol (PG) içeren ½ MS ortamlarda 7 gün karanlıkta kültüre alınmışlardır. Daha sonra sürgünler, ½ MS ve ½ modifiye MS (MMS) (MgSO₄, CaCl₂ ve Fe-EDDHA (FeEDTA yerine) miktarları %25 oranında artırılmış) ortamı olmak üzere iki farklı sıvı besin ortamına kültüre alınmışlardır. Her iki besin ortamına sadece 30 g/l sakkaroz ilave edilmiştir. Kültürler aynı şekilde sıcaklığı 24±1 °C, ışıklandırma şiddeti 3000 lüks olarak ayarlanmış iklim odasında 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullarda 1.5 ay süreyle kültüre alınmışlardır. Kültür sonrasında kökler steril saf su ile yıkanmalarının ardından, tartım ve ölçüm işlemlerine tabi tutulmuşlardır. Daha sonra sterilize edilmiş 2:1 oranında torf ve perlit karışımı içeren saksılara aktarılmışlardır.

2.2.4. İncelenen özellikler

Sürgün ortamında her bir alt kültür sonrasında ortalama sürgün uzunluğu, eksplant başına sürgün sayısı; köklenme aşamasında köklenme oranı ve ortalama kök sayısı, elde edilen *in vitro* bitkilerde de ortalama yaş bitki ağırlığı ve ortalama bitki uzunluğu değerleri incelenmiştir.

2.3. İstatistik analizler

Araştırma faktöriyel düzende tesadüf blokları deneme desenine göre kurulmuş olup, elde edilen verilerin istatistik analizleri SPSS 16.0 istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile belirlenmiştir.

3. Bulgular

3.1. Sürgün gelişimine ilişkin elde edilen bulgular

R. damascena türüne ait yeşil sürgünlerin orta kısımlarından alınan boğumlardaki gözlerin, ilk dikim ortamı olarak kullanılan 30 g/l sakkaroz içeren MS ortamlarında sürmesiyle elde edilen 4-5 cm uzunluğundaki sürgünler, daha sonra farklı konsantrasyonlarda BA ve NAA içeren MgCl₂, CaCl₂ ve FeEDDHA (Na-EDTA yerine) içerikleri %25 oranında artırılmış sıvı MMS ortamlarında kültüre alınmışlardır. Sürgünlerin 1 ay aralıklarla 3 kez alt kültüre alındıkları çalışmada (Şekil 1), her bir alt kültürde elde edilen eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunlukları değerleri Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1. BA ve NAA uygulamalarına göre 3 alt kültürde sürgün gelişimi

Ortamlar	SS/E* (adet)	SU** (cm)
1. Alt Kültür		
BA (1 mg/l)	1.04 b***	3.22 d
BA (1.5 mg/l)	1.08 b	4.31 a
BA (2 mg/l)	1.39 a	4.35 a
BA (1 mg/l)+NAA (0.1 mg/l)	1.07 b	3.35 cd
BA (1.5 mg/l)+NAA (0.1 mg/l)	1.05 b	3.88 b
BA (2 mg/l)+NAA (0.1 mg/l)	1.07 b	3.76 bc
2. Alt Kültür		
BA (1 mg/l)	2.84 b	4.36 b
BA (1.5 mg/l)	2.88 b	5.19 ab
BA (2 mg/l)	3.84 a	5.49 a
BA (1 mg/l)+NAA (0.1 mg/l)	2.82 b	4.61 ab
BA (1.5 mg/l)+NAA (0.1 mg/l)	2.47 c	5.21 ab
BA (2 mg/l)+NAA (0.1 mg/l)	2.87 b	5.18 ab
3. Alt Kültür		
BA (1 mg/l)	3.77 bc	5.43 b
BA (1.5 mg/l)	3.87 b	6.60 a
BA (2 mg/l)	4.58 a	6.63 a
BA (1 mg/l)+NAA(0.1 mg/l)	3.34 d	5.33 b
BA (1.5 mg/l)+NAA(0.1 mg/l)	3.43 cd	5.45 b
BA (2 mg/l)+NAA(0.1 mg/l)	3.69 bc	5.89 b

*SS/ESürgün sayısı/eksplant,

**SU:Sürgün uzunluğu,

***Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık vardır (p<0.05).

Tablo 1'in incelenmesinden de anlaşılacağı üzere, 3 alt kültür süresince eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğunun kullanılan BA ve NAA konsantrasyonlarına bağlı olarak önemli derecede değiştiği tespit edilmiştir. Buna göre en yüksek eksplant başına sürgün sayısının 1. alt kültürde 1.39, 2. alt kültürde 3.84 ve 3. alt kültürde 4.58 ile 2 mg/l BA ilave edilmiş besin ortamından elde edildiği; diğer uygulamalar arasında ise kültür sayısı arttıkça istatistiki olarak farklılıkların da arttığı görülmüştür. Sürgün uzunlukları değerleri incelendiğinde ise, 1. ve 3. alt kültür aşamalarında 1.5 ve 2 mg/l BA ilave edilmiş ortamlardan diğer ortamlara göre önemli derecede daha uzun sürgün elde edilirken, 2. alt kültürde ise en düşük değer elde edildiği 1 mg/l BA ilave edilmiş ortam dışında diğer ortamlar arasında istatistiksel olarak bir farklılığın bulunmadığı tespit edilmiştir.



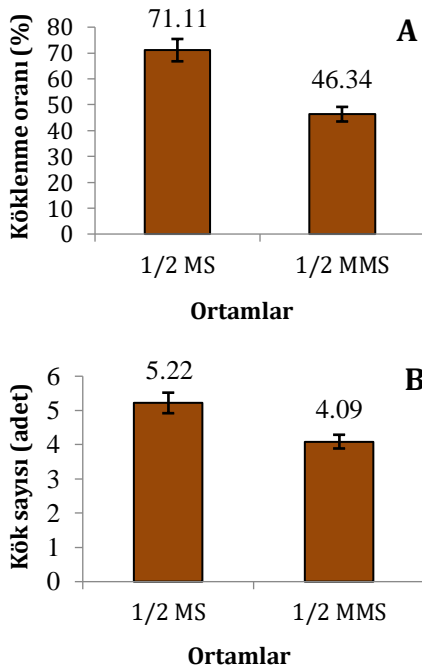
Şekil 1. *Rosa damascena*'ya ait *in vitro* sürgünler

3.2. Kök gelişimine ilişkin elde edilen bulgular

Sürgün ortamlarında uzunluğu 3 cm ve daha fazla olan sürgünler, köklendirilmek için öncelikle 2 mg/l IBA, 30 g/l sakkaroz ve 162 mg/l floroglusinol (PG) içeren 1/2 MS ortamlarda 7 gün karanlıkta bekletilmelerinin ardından, sadece 30 g/l sakkaroz içeren 1/2 MS ile MgSO₄, CaCl₂ ve Fe-EDDHA (FeEDTA yerine) miktarları %25 oranında artırılmış 1/2 modifiye MS (MMS) ortamı olmak üzere iki farklı sıvı besin ortamında kültüre alınmışlardır. İki aylık süre sonunda köklenme oranının kullanılan ortamlara göre değiştiği tespit edilmiştir. Buna göre 1/2 MS ortamında kültüre alınan sürgünlerin, %71.11 köklenme oranı ile 1/2 MMS ortamındaki sürgünlere göre daha yüksek oranda köklendikleri tespit edilmiştir (Şekil 2). MMS ortamında ise köklenme oranının %46.34 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 3.A). Köklenme ile ilgili bir diğer kriter ise kök sayısı olup, köklenme oranına benzer şekilde yine en yüksek kök sayısı 1/2 MS ortamından elde edilmiştir. 1/2 MMS'de 4.09 olan kök sayısının, 1/2 MS ortamında 5.22'ye yükseldiği belirlenmiştir (Şekil 3.B).



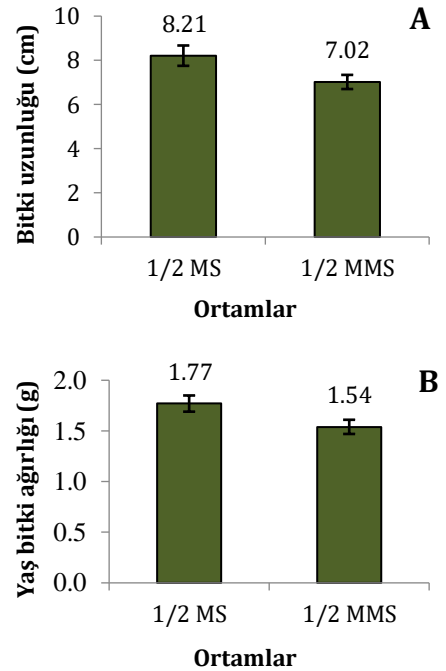
Şekil 2. *Rosa damascena*'ya ait köklenmiş bir bitki



Şekil 3. Ortamlara göre köklenme oranı (A) ve kök sayısı (B)

3.3. Bitki gelişimine ilişkin elde edilen bulgular

İki aylık köklenme periyodu sonunda elde edilen bitkiler, bitki gelişimi ile ilişkili olarak ortalama bitki uzunluğu ve bitki ağırlığı kriterleri bakımından değerlendirilmiştir. Buna göre ortalama bitki uzunluğu bakımından en yüksek değer 8.21 ile 1/2 MS besin ortamında kültüre alınan bitkilerden elde edildiği ve bu kriter bakımından 1/2 MMS ortamındaki bitkiler ile arasında 1 cm'den daha fazla bir farkın olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4A). Bitki gelişimi ile ilgili bir diğer kriter olan ortalama bitki ağırlığının kullanılan besin ortamlarına göre önemli bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir. 1/2 MS ortamında kültüre alınan bitkilerin ağırlığı 1.77 g; 1/2 MMS ortamında gelişen bitkilerin ağırlığı 1.54 g olarak belirlenmiştir (Şekil 4.B). Daha sonra 2:1 oranında torf ve perlit karışımı içeren saksılara aktarılan bitkilerden de %78'inin de iyi bir gelişme gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 5).



Şekil 4. Ortamlara göre bitki uzunluğu (A) ve yaş bitki ağırlığı (B)



Şekil 5. Saksılara alınmış *Rosa damascena* bitkileri

4. Tartışma ve Sonuç

In vitro mikroçoğaltım güllerde elit klonların kısa sürede çoğaltılması, hastalıklardan arı sağlıklı materyallerin elde edilmesi, mevsimlere bağlı kalmaksızın yılın her döneminde üretimin yapılabilmesi gibi bir çok avantaja sahip olan ve bu nedenle de son yıllarda büyük popülarite kazanmış bir kültür tekniğidir [6].

Araştırmada bitkisel materyal olarak yeşil sürgünlerin orta kısımlarındaki 0.4-0.6 mm kalınlığındaki tez gözlü boğum parçaları kullanılmıştır. Benzer şekilde daha önce yapılan birçok araştırmada da tek gözlü boğum eksplantlarının *R. damascena*'nin çoğaltımında başarı ile kullanıldığı belirlenmiştir [7,10,11,12]. Nitekim eksplant olarak sürgün uçları kullanıldığında yoğun kahverengileşme nedeniyle eksplantların kısa sürede kaybedildiği ve bitki gelişiminin bu eksplantlarla gerçekleşmediği bildirilmiştir [13]. Bu nedenle de kararmanın daha az olduğu boğumların sürdürülmesi ile elde edilen lateral sürgünlerin, gül için daha uygun bir eksplant kaynağı olduğu ve sürgün uçları ile kıyaslandığında boğum eksplantlarının güllün çoğaltılmasındaki performansın çok daha yüksek oranlarda gerçekleştiği bildirilmiştir [6].

MS besin ortamı güllerin mikroçoğaltımında en yaygın olarak kullanılan ortamdır [7,12]. Besin ortamlarında belirli mineral maddelerin artırılmasının *R. damascena*'da mikroçoğaltım sırasında elde edilen sürgünlerin miktar ve kalitesini değiştirdiği bilinmektedir. Bu nedenle araştırmada sürgün ortamında demir kaynağı olarak FeEDTA kullanılmış olup, FeEDTA, CaCl₂ ve MgCl₂ miktarları %25 oranında artırılmıştır. Nitekim Podwyszynska ve Olszewski [14], besin ortamlarında CaCl₂ miktarının iki katına çıkarılması ile yapraklardaki sararmanın azaltıldığını belirlemişlerdir. Benzer şekilde Noodezh vd. [8] de CaCl₂'nin 1.5 kat artırılmasının başlangıç ortamında sürgün gelişimini uyardığı, ileriki sürgün çoğalma aşamalarında da elde edilen sürgünlerin kalitesini artırdığı ve yapraklarda sararmaların görülmediğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar ayrıca amonyum nitrat miktarının besin ortamlarında artırılmasının sürgün büyümesini artırdığını; yaprakların daha koyu ve daha sağlıklı olmasına neden olduğunu belirlemişlerdir. Van der Salm vd. [15] de güllerde demir, magnezyum, manganez, kalsiyum gibi minerallerin miktarının artırılmasının oluşan sürgünlerin kalitesini önemli ölçüde artırdığını bulmuşlardır. Ayrıca demir kaynağı olarak FeEDTA yerine FeEDDHA kullanılmasının *R. hybrida*'da [15] ve *R. damascena*'da [8] daha başarılı sonuçlar verdiği belirlenmiştir. FeEDDHA'nın sürgün aşamasında daha uzun sürgün, geniş yapraklar ve yapraklarda daha yüksek klorofil birikimini sağladığı tespit edilmiştir [15].

Büyüme düzenleyici maddelerin miktar ve ortamlara verilme formu *in vitro* mikroçoğaltım çalışmalarında sürgün ve kök gelişimini önemli ölçüde değiştirmektedir. Bu araştırmada 1, 1.5 ve 2 mg/l konsantrasyonlarındaki BA'nın tek ya da 0.1 mg/l NAA ile yapmış olduğu kombinasyonlarının sürgün sayısı ve uzunluğuna olan etkisi incelenmiştir. Araştırmada 2 mg/l BA ilave edilmiş olan besin ortamı, sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından en yüksek değerlerin elde edildiği besin ortamı olarak tespit edilmiştir. Benzer şekilde. *R. damascena*'da sürgün gelişimi için sitokinlerin mutlak gerekli olduğu tespit edilmiştir [16]. Salekjalali [12], sürgün gelişimi aşamasında besin ortamına ilave edilen 2 mg/l BA'nın *R. damascena*'da 1 ve 3 mg/l BA uygulamasına göre daha yüksek sürgün ve yeşil yaprak sayısına neden olurken, kahverengi yaprak sayısını ise azalttığını belirlemiştir. *R. hybrida*'da sürgün çoğalmasında besin ortamına katılan 2 mg/l konsantrasyonundaki BA'nın sürgün çoğalma oranı ve sürgün gelişimini uyarırken, BA konsantrasyonunun artmasının sürgün oluşumunu azalttığı tespit edilmiştir [17]. Nikbakht vd. [11] ile Carelli ve Echeverrigary [18] de yüksek BA konsantrasyonlarının anormal sürgün gelişimini uyardığı ve sonraki alt kültürlerde bu sürgünlerin gelişmediğini belirlemişlerdir. Sürgün ortamında NAA'nın tek başına kullanıldığı *R. hybrida* ve *R. damascena*'da yapılan çalışmalar sonucunda, sürgün gelişimi ve çoğalması üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı, 2 mg/l BA ile birlikte sürgün ortamına ilave edilen 0.1 mg/l NAA'nın ise sadece 2 mg/l BA'nın kullanıldığı ortamla kıyaslandığında sürgün çoğalması üzerine önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir [12,19]. Mamaghani vd. [20], *R. damascena* türünde sürgün çoğalması aşamasında BA'nın kinetinden daha etkili olduğunu bulmuşlardır. Kullanılan BA konsantrasyonu alt kültürler süresince elde edilen sürgün sayısını da etkilemektedir. Nitekim bu araştırmada 1, 1.5 ve 2 mg/l konsantrasyonunda kullanılan BA'nın, yapılan 3 alt kültür sonrasında alt kültür sayısı arttıkça sürgün sayısının da arttığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde bodur güllerde ve *R. chinensis* türünde alt kültür sayısının artmasına bağlı olarak sürgün sayısının da arttığı belirlenmiştir [21,22]. Jabbarzadeh ve Khosh-Khui [11] ise *R. damascena* da 2.5-3 mg/l gibi daha yüksek BA konsantrasyonları kullandıklarında alt kültür sayısı arttıkça sürgün sayısında bir azalmanın ortaya çıktığını belirlemişlerdir. Bu durum yüksek konsantrasyonlarda kullanılan BA'nın kültürün ileri aşamalarında sürgün gelişimini sınırlandırıcı bir etkide bulunması şeklinde açıklanabilir.

Köklenme aşamasında, sürgünler önce 2 mg/l IBA, 30 g/l sakkaroz ve 162 mg/l floroglusinol (PG) içeren ½ MS ortamında 7 gün süreyle karanlıkta tutulmuş, ardından 30 g/l sakkaroz içeren ½ MS ile ½ MMS ortamlarına aktarılmışlardır. *R. damascena*'da köklerin 2 haftadan daha uzun süre oksin içeren köklenme ortamında tutulmalarının, kök uçlarının

kahverengileşmesine ve sürgünlerin birkaç gün içinde canlılıklarını yitirmelerine neden olduğu bildirilmektedir [11]. Bu problem kültürlerin oksin içeren kök çıkışı başlatma ortamından, büyümeyi düzenleyici madde içermeyen kök uzama ortamlarına transfer edilmesiyle çözümlenebilmiştir. Nitekim oksinlerin kök oluşumu için gerekli olduğu ancak, kök gelişiminin ileriki aşamalarında gerekli olmadığı ifade edilmektedir [11]. Pati vd. [7] ise BA ilave edilmiş ortamlarda 7 gün tutulup, ardından büyümeyi düzenleyici madde içermeyen sıvı ortamlara aktarılan sürgünlerde köklenmenin başarı ile elde edildiğini ifade etmişlerdir.

Araştırmada ½ MS ortamında, ½ MMS ortamına göre hem köklenme oranı hem de kök sayısı bakımından daha yüksek değerlerin elde edildiği belirlenmiştir. Ayrıca ½ MS ortamında kültüre alınarak köklendirilen bitkilerin yaş ağırlıkları ile bitki uzunluklarının da ½ MMS ortamındakilere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Khosh-Khui ve Sink [19] ile Kirichenko vd. [23] *R. damascena*'nın modern güllere göre daha zor köklendiğini ifade ederken; benzer şekilde *R. damascena*'da köklenmenin sürgün gelişimine göre çok daha zor olduğunu ifade eden Salekjalali [12], 2 mg/l IBA içeren ½ MS ortamında %80 oranında köklenmenin elde edildiğini ve bu yönüyle en yüksek köklenmenin bu uygulamadan elde edildiğini belirlemiştir. Saffari vd. [24] ise *R. damascena* için büyümeyi düzenleyici içermeyen MS ortamının, 1, 2 ve 4 mg/l IBA içeren MS ortamlarına göre daha başarılı sonuç verdiğini ve büyümeyi düzenleyici madde içermeyen ortamlarda köklenmenin %52.17 ile en yüksek değere ulaştığını belirlemiştir.

Bu araştırmada köklenme ortamlarına 162 mg/l konsantrasyonunda floroglusinol ilave edilmiştir. Floroglusinol ksilem öz suyunda bulunan bir floridzin türevi olup, bitkilerde büyüme ve gelişmeyi teşvik ettiği [25,26], *in vitro* koşullarda ortaya çıkan vitrifikasyon problemini azalttığı [27], asıl kullanımının ise köklenme üzerine olduğu belirlenmiştir [28,29]. Floroglusinolün ayrıca aerobik metabolizma süresince oluşan ve doku kültürü süresince hücre ölümüne, doku zararlarına ve nekrozlara neden olan eksplantların süperoksit anyonları, hidroksil ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türevlerine karşı antioksidan etkilerinin olduğu da tespit edilmiştir [30]. Noodezh vd. [8] de floroglusinolün *R. damascena*'da köklenme üzerinde olumlu etkilerde bulunduğunu ifade etmişlerdir.

Bu araştırmada hem sürgün hem de köklenme aşamasında sıvı ortamlar kullanılmıştır. Sıvı besin ortamlarının bitki gelişimi üzerindeki etkileri farklı gül türlerinde yapılan çalışmalarla ortaya konulmaya çalışılmıştır [22,31]. Pati vd. [7], *R. damascena* ve *R. bourboniana* türlerinde sürgün aşamasında hem agarla katılaştırılmış ortamları hem de sıvı ortamları

kullanmışlardır. Araştırmacılar agarlı ortamlarda yetişen sürgünlerde hem bazı nekrozların görüldüğünü, hem de sıvı ortamlardakilere göre daha ince ve daha az sürgün oluşturdıklarını tespit etmişlerdir. Nikbakht vd. [10] de *R. damascena*'da katı ortamlarda ortaya çıkan yaşlanma problemi ve buna bağlı olarak sürgün çoğalmasının azalmasının sıvı ortamlar kullanılarak çözülebileceğini belirtmişlerdir. Pati vd. [7], düşük maliyet, daha yüksek sürgün çoğalması ve köklenme oranı sağlayan sıvı ortamların *R. damascena*'da başarı ile uygulanabileceğini belirtmişlerdir. Sıvı ortamların güllerde katı ortamlara göre daha başarılı sonuç vermesinin, sıvı ortamların büyümeyi düzenleyici ve diğer besin maddelerinin alınımını artırması [32], eksplantların kesim yerlerinden ortama salınan kahverengi bileşikler seyreltmesi [33] ve kültürün daha iyi havalanmasını sağlaması [34] gibi nedenlerden kaynaklandığı bildirilmektedir. Pati vd. [7] ile Ghashghaie vd. [35] agarın besin ortamlarında ozmotik potansiyeli teşvik ederek özellikle mikro sürgünlerin köklenmesini etkilediğini belirlemiştir. Köklendirme ortamlarında hem sıvı hem de agarla katılaştırılmış ortamları kullanan Pati vd. [7], *R. damascena* türüne ait sürgünlerin, katı ortamlardaki köklenme oranının %5 ile sınırlı kalırken; sıvı ortamlarda bu oranın %85.8'e yükseldiğini ifade etmişlerdir. Benzer şekilde Noodezh vd. [8] de *R. damascena*'da köklenme oranının sıvı ortamlarda daha yüksek olduğunu belirlemiştir. Agarın elimine edildiği sıvı ortamların kullanılması hem maliyet hem de mikroçoğaltımda daha başarılı sonuçların elde edilmesi nedeniyle tercih edilen bir yöntem olduğu daha önce yapılan çalışmalarla da tespit edilmiştir [7,8].

Sonuç olarak, araştırmada tek gözlü boğumların büyümeyi düzenleyici madde içermeyen katı MS ortamında sürdürülmesi ile elde edilen sürgünlerin çoğaltılmasında, 2 mg/l BA içeren sıvı modifiye MS ortamının; sürgünlerin köklendirilmesinde de 7 gün süreyle 2 mg/l IBA, 30 g/l sakkaroz ve 162 mg/l floroglusinol içeren MS ortamında tutulmalarının ardından sadece 30 g/g sakkaroz içeren sıvı ½ MS ortamlarına transfer edilmeleri ile *R. damascena*'nın *in vitro* koşullarda başarı ile çoğaltılabileceği tespit edilmiştir. Araştırmada ayrıca düşük maliyet ve yüksek başarı ile *R. damascena* türü için sıvı ortamların başarı ile kullanılabilirliği önemli bir potansiyele sahip olduğu da belirlenmiştir.

Teşekkür

Bu araştırma 5001-YL1-17 Proje Numarası ile Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiş olup, "Yağ Güllünün (*Rosa Damascena* Mill.) *In Vitro* Çoğaltımı" konulu yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

Kaynakça

- [1] Baydar, H., Erbaş, S., Kineci, S., Kazaz, S., 2007. Yağ Gülü (*Rosa damascena* Mill.) Damıtma Suyuna Katılan Tween-20'nin Taze ve Fermente Olmuş Çiçeklerin Gül Yağı Verimi ve Kalitesi Üzerine Etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 2, 15-20.
- [2] Baydar, H., 2013. Tıbbi, Aromatik ve Keyif Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın Evi, 20-50s, Isparta.
- [3] Khosh-Khui, M., 2014. Biotechnology of Scented Roses: A Review. International Journal of Horticultural Science and Technology, 1, 1-20.
- [4] Özkan, G., Sağdıç, O., Göktürk Baydar, N., Baydar, H., 2004. Antioxidant and Antibacterial Activities of *Rosa damascena* flower extracts. Food Science and Technology International, 10(4), 277-281.
- [5] Mileva, M., Krumova, E., Miteva-Staleva, J., Kostadinova, N., Dobрева, A., Galabov, A.S., 2014. Chemical Compounds, In Vitro Antioxidant and Antifungal Activities of Some Plant Essential Oils Belonging to Rosaceae Family. Comptes Rendus De L Academie Bulgare Des Sciences, 67, 1363-1368.
- [6] Horn, W.A.H., 1992. Micropropagation of Rose (*Rosa* L.). In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 20, High- Tech and Micropropagation IV (pp. 320-342). Springer, Germany.
- [7] Pati, P. K., Sharma, M., Sood, A., Ahuja, P. S., 2005. Micropropagation of *Rosa damascena* and *R. bourboniana* in Liquid Cultures. In Liquid Culture Systems for *in Vitro* Plant Propagation, Springer, 373-385.
- [8] Noodezh, H. M., Moieni, A., Baghizadeh, A., 2012. *In Vitro* Propagation of the Damask Rose (*Rosa damascena* Mill.). *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 48, 530-538.
- [9] Murashige, T., Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum, 15, 473-497.
- [10] Nikbakht, A., Kafi, M., Mirmasoudi, M., Babalar, M., 2005. Micropropagation of Damask Rose (*Rosa damascena* Mill.) cvs. Azaran and Ghamsar. International Journal of Agricultural and Biological Engineering, 7, 535-538.
- [11] Jabbarzadeh, Z., Khosh-Khui, M., 2005. Factors Affecting Tissue Culture of Damask Rose (*Rosa damascena* Mill.). Scientia Horticulturae, 105, 475-482.
- [12] Salekjalali, M., 2012. Phloroglucinol, BAP and NAA Enhance Axillary Shoot Proliferation and other Growth Indicators *In vitro* Culture of Damask Rose (*Rosa damascena* Mill.). American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, 12, 960-966.
- [13] Gülşen, Y., Ağaoğlu, Y.S., Ellialtıoğlu, Ş., 1994. Isparta ve yöresinde yetiştirilen yağ gülünün (*Rosa damascena* Mill.) doku kültürü yoluyla çoğaltılması. TÜBİTAK GÜLAR 7 no'lu proje sonuç raporu. 45 s.
- [14] Podwyszynska, M., Olszewski, T., 1995. Influence of Gelling Agents on Shoot Multiplication and the Uptake of Macroelements by *In Vitro* Culture of Rose, Cordyline and Homalomena. Scientia Horticulturae, 64,77-84.
- [15] Van der Salm, C., Van der Toon, C., Hanisch ten Cate, L., Dubois, D., Vries, H., 1994. Importance of the Iron Chelate Formula for Micropropagation of *Rosa hybrida* L. 'Moneyway'. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 37, 73-77.
- [16] Alsemaan, T., Albatal, N., Almaarri, K., 2011. Micropropagation of Damask Rose (*Rosa damascena*). Arab Universities Journal of Agricultural Sciences, 19, 117-127.
- [17] Attia, A. O., Dessoky, D.S., El-Tarras, A.E., 2012. *In Vitro* Propagation of *Rosa hybrida* L. cv. Al-Taif Rose Plant. African Journal of Biotechnology, 11(48), 10888-10893.
- [18] Carelli, B.P., Echeverrigaray, S., 2002. An Improved System for the *In Vitro* Ppropagation of Rose Cultivars. Scientia Horticulturae, 92, 69-74.
- [19] Khosh-Khui, M., Sink, K.C., 1982. Micropropagation of New and Old World Rose Species. Journal of Horticultural Sciences, 57, 315-319.
- [20] Mamaghani, B. A., Ghorbanli, M., Assareh, M. H., Zare, A. G., 2010. *In vitro* Propagation of Three Damask Roses Accessions. Iranian Journal of Plant Physiology, 1, 85-94.
- [21] Campos, P.S., Pais, M.S.S., 1990. Mass Propagation of the Dwarf Rose Cultivar Rosamini. Scientia Horticulturae, 43, 321-30.
- [22] Chu, C.Y., Knight, S.L., Smith, M.A.L., 1993. Effect of Liquid Culture on the Growth and Development of Miniature Rose (*Rosa chinensis* Jacq. 'Minima'). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 32, 329-334.
- [23] Kirichenko, E.B., Kuz'-Mina, T.A., Kataeva, N.V., 1991. Factors in Optimizing the Multiplication of Ornamental and Essential Oil Roses *In Vitro*. Byulleten'-Glavnogo-Botanicheskogo-Sada, 159, 61-67.
- [24] Saffari, V.R., Sharifi-Sirchi, G.R., Torabi-Sirchi, M.H., 2011. Enhancing Rooting Consistency in *Rosa damascena* Scions. African Journal of Biotechnology, 10, 16495-16500.

- [25] Oliveria, A.J.B., Carvalho, V.M., Ferreira, A., Sato F.Y., Machado, M.F.P., 2003. *In Vitro* Multiplication of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* L. (*Apocynaceae*). *Revista Árvore*, 27, 421-425.
- [26] Bhot, M., S. Naphade, J. Varghese and N. Chandra, 2010. *In Vitro* Culture Studies in Three Varieties of *Codiaeum Variegatum* (L.) Blume Using Node Explants from Field Growth Plants. *Journal of Cell and Tissue Research*, 10, 2439-2444.
- [27] Gaspar, T., 1991. Vitrification in Micropropagation. In: Bajaj Y.P.S. (ed.), Springer, Berlin.
- [28] Modgil, M., Sharma, D.R., Bhardwaj, S.V., 1999. Micropropagation of Apple cv. Tydeman's Early Worcester. *Scientia Horticulturae*, 81, 179-188.
- [29] Wang, Q., 1991. Factors Affecting Rooting of Microcuttings of the Pear Rootstock BP10030. *Scientia Horticulturae*, 45, 209-213.
- [30] Kim, J.A., Lee, J.M., Shin, D.B., Lee, N.H., 2004. The Antioxidant Activity and Tyrosinase Inhibitory Activity of Phlorotannins in *Ecklonia cava*. *Food Science and Biotechnology*, 13, 476-480.
- [31] Ramesh, K., Dohare, S.R., Chopra, H.R., Kumar, R., 1993. *In Vitro* Effect of Growth Regulators and Media State on Seed Germination and Shoot Proliferation of Rose (*Rosa hybrida*). *Punjab Horticultural Journal*, 33, 142-146.
- [32] Debergh, P.C., 1983. Effects of Agar Brand and Concentration on the Tissue Culture Medium. *Physiologia Plantarum*, 59, 270-276.
- [33] Ziv, M., Halevy, A.H., 1983. Control of Oxidative Browning and *In Vitro* Propagation of *Strelitzia reginae*. *Horticultural Sciences*, 18 (4), 434-436.
- [34] Ibrahim, A.I., 1994. Effect of Gelling Agent and Activated Charcoal on the Growth and Development of *Cordyline terminalis* Cultured *In Vitro*. In: Proceedings of the First Conference of Ornamental Horticulture, 1, 55-67 pp.
- [35] Ghashghaie, J., Brenckmann, F., Saagier, B., 1991. Effects of Agar Concentration on Water Status and Growth of Rose Plants Cultured *in Vitro*. *Physiologia Plantarum*, 82, 73-78.

Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.)'nde Azot ve Kükürt Gübrelemesinin Verim ve Kaliteye Etkileri

Sabri ERBAŞ¹, Ali ŞENATEŞ²

^{1,2}Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 32260, Isparta, Türkiye

(Alınış / Received: 22.01.2020, Kabul / Accepted: 17.03.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Anahtar Kelimeler

Ayçiçeği,
Helianthus annuus,
Azot,
Kükürt,
Verim ve kalite

Özet: Bu çalışmada ayçiçeğinde azot (0, 5, 10, 15 kg N/da) ve kükürt (0, 5, 10, 15 kg S/da) uygulamalarının verim ve kalite özellikleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nde 2014 ve 2015 yıllarında yürütülmüştür. Deneme bölünmüş parseller deneme deseninde kurulmuş, ana parsellere azot ve alt parsellere de kükürt dozları uygulanmıştır. Çalışmada bütün özelliklerin yıllar arasındaki farklılıkları; kabuk oranı ve yağ oranı hariç diğer özelliklerin N dozları arasındaki farklılıkları; yağ oranı hariç diğer özelliklerin S dozları arasındaki farklılıkları %1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, tohum verimi 2014 yılında 235.4-348.6 kg/da (N₀S₀-N₅S₅) ve 2015 yılında ise 174.4-327.4 kg/da (N₀S₀-N₁₀S₅) arasında değişmiştir. Azot dozu ortalamalarına göre kontrol parsellerinde 231.9 kg/da olan tohum verimi 10 kg/da'ya kadar %31.3 oranında artış göstermiş ve 304.4 kg/da'ya ulaşmıştır. Kükürt dozu ortalamalarına göre en yüksek tohum verimi 5 kg/da uygulamasından (302.8 kg/da) ve en düşük kontrol parsellerinden (248.4 kg/da) elde edilmiştir. Tohumların yağ içeriği kontrole göre yüksek N ve S dozu uygulamasında sırasıyla %2.1 ve %5.0 oranında artmıştır. Sonuç olarak; Isparta koşullarında yağlık ayçiçeği yetiştiriciliğinde daha yüksek tane verimi ve kalitesi için 10 kg N/da azot ile 5 kg S/da kükürt kullanılmalıdır.

Effects of Nitrogen and Sulfur Fertilization on Yield and Quality in Sunflower (*Helianthus annuus* L.)

Keywords

Sunflower,
Helianthus annuus,
Nitrogen,
Sulphur,
Yield and quality

Abstract: This study was carried out to determine the effects of nitrogen (0, 5, 10, 15 kg N/da) and sulfur (0, 5, 10, 15 kg S/da) applications on yield and quality characteristics of sunflower in Isparta University of Applied Sciences, Faculty of Agriculture, Department of Field Crops in 2014 and 2015 years. The experiment design was in split plots of randomized complete blocks (Nitrogen doses were placed in the main plots) with three replications. The differences of all features between years in the study; differences between N doses of other properties except hull and oil content; differences between S doses of other properties except fat ratio were found to be significant at 1% level. According to our results, seed yield varied between 235.4-348.6 kg/da (N₀S₀-N₅S₅) in 2014 and 174.4-327.4 kg/da (N₀S₀-N₁₀S₅) in 2015. Seed yield, which was 231.9 kg/da in control plots, increased by 31.3% up to 10 kg/da and reached 304.4 kg / da according to the average of N dosage. According to the average of S dosage, the highest seed yield was obtained from 5 kg/da (302.8 kg/da) and the lowest control plots (248.4 kg/da). The oil content increased by 2.1% and 5.0%, respectively, in the application of high N and S doses compared to the control. As a result; in Isparta conditions, it can be recommended to use 10 kg N/da nitrogen and 5 kg S/da sulfur in order to obtain higher yield and quality in oilseed sunflower cultivation.

* İlgili yazar: sabrierbas@isparta.edu.tr

1. Giriş

Dünyada 2017 yılında 26.5 milyon ha alanda 47.9 milyon ton ayçiçeği tohumu üretilmiştir. Ayçiçeği Rusya, Ukrayna, Güney ve Doğu Avrupa ülkeleri başta olmak üzere, birçok ülkenin en önemli bitkisel yağ kaynağıdır. Türkiye'de ise 2017 yılında 779 bin ha alandan 1.96 milyon ton tohum üretilmiştir [1]. Türkiye yağlı tohumlar ve bitkisel yağlar ticaretinde uzun yıllardır net ithalatçı (%70) ülkeler arasında yer almaktadır. Çoğu tarımsal üründe yeterli üretim olmasına karşın, özellikle yağlı tohumlar ve bitkisel yağlar üretiminde artan nüfus yoğunluğu ve yağların kullanım olanaklarının genişlemesi ile birlikte dış ticaret açığı gittikçe büyümekte olup, petrol ve ürünlerinden sonra en büyük ikinci ithalat kalemi durumundadır. Türkiye'de 2018 yılında 3.7 milyon ton yağlı tohum (1.6 milyar \$), 1.3 milyon ton ham yağ (1.1 milyar \$), 3.5 milyon ton küspe (837 milyon \$) olmak üzere 3.5 milyar \$ değerinde toplam 8.5 milyon ton bitkisel yağ, yağlı tohum ve küspe ithal edilmiştir [2]. Türkiye'de yağ bitkileri ekim alanlarının %75'ten fazlasını ve bitkisel yağ üretiminin %50'ye yakını ayçiçeği (*Helianthus annuus*) karşılamaktadır. Yağlık ayçiçeği üretiminin yaklaşık %75'i başta Tekirdağ, Edirne ve Kırklareli olmak üzere Trakya-Marmara Bölgesi'nde yapılmaktadır [1]. Ayçiçeğinin bitkisel yağ üretimine olan mevcut katkısının daha da artması için ekim alanlarının diğer bölgelerde de yaygınlaştırılması gerekmektedir. Türkiye'de yağlık ayçiçeği tarımının yaygınlaşabileceği bölgeler gerçekte halen yoğun şekilde serin iklim tahılları üretiminin yapıldığı kuru tarım alanlarıdır [3].

Tarımsal üretimde yüksek verimlilik için sertifikalı ve hibrit tohumluk kullanımının yanı sıra optimum gübre ve ilaç uygulamalarının yapılması gereklidir [4]. Zira üretimde büyümeyi sınırlayan temel sorunların yaklaşık %60'ını mineral besin eksikliğinden kaynaklandığı rapor edilmektedir. Standart bir ayçiçeği üretiminde vejetatif gelişme döneminde 160 kg/da, generatif dönemde ise 900 kg/da civarında kuru madde üretilmektedir [5]. Bu nedenle toprakta yeterli miktarda bitki besin elementlerine gereksinim duyulmaktadır. Ayçiçeği üretiminde gübrelerin çok maliyetli ve gelir marjlarının çok az olduğu göz önüne alındığında, atılan gübre miktarlarının ve etkileşimlerinin bilinmesi önem arz etmektedir. Ayçiçeğin üretimi için gereken bitki besin maddeleri arasında en önemlileri azotlu ve kükürtlü gübrelerdir. Azot erken büyüme döneminde, karbonhidratların daha iyi asimilasyonuna ve protein sentezine yardımcı olur. Ayrıca proteini artırır ve yağ konsantrasyonunu azaltarak tohum kalitesini de etkilemektedir [6]. Diğer taraftan kükürt protein sentezinde sistin, metionin ve sistein gibi amino asitlerin bileşenlerinin oluşumunda rol oynar [7] ve özellikle yağlı tohumlarda tohum ve yağ verimi ile yağ kalitesini artırıcı yönde olumlu etki yapmaktadır [8]. Bu

nedenle yağlı tohumlu bitkiler diğer bitkilere göre daha fazla kükürt istemektedir. Kükürt noksanlığında ayçiçeğinin gelişiminin yavaşladığı, tane ve yağ veriminin azaldığı rapor edilmektedir [9]. Kükürt uygulaması ile ayçiçeğinde kuru madde, tabla çapı, tablada tohum ağırlığı ve sayısı, 1000 tohum ağırlığı ve tohum verimi ve biyolojik verimin arttığı rapor edilmiştir [10]. Aynı zamanda kükürt klorofil ve vitamin (B, biyotin ve tiamin) sentezinde rol oynar ve özellikle protolitik enzimleri etkileyen büyüme ve metabolizması ile ilişkilidir [11]. Tarımsal verimlilikte önemli bir girdi olan gübrelerin tüketimi giderek artmaktadır. Fakat bu artış ile bazen beklenen seviyede üretim artışına yansımamaktadır. Bilinçsiz gübreleme ile toprağın verimlilik dengesi bozulmakta ve bu topraklarda yetiştirilen bitkilerden elde edilen ürünün kalitesi de azalmaktadır. Yürütülen bu araştırmada; Isparta koşullarında ayçiçeğinde farklı azot (0, 5, 10, 15 kg N/da) ve kükürt dozlarının (0, 5, 10, 15 kg S/da) yağlık ayçiçeğinde verim ve kalite özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

Bu çalışma Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünde (37°45' K ve 30°33' D, 997 m) 2014 ve 2015 yıllarında yürütülmüştür. Düet CL ayçiçeği çeşidi materyal olarak kullanılmıştır. Bu çeşit çiçeklenme süresi 61-64 gün olan erkenci, mildiyonun (Köse) PL6 ırklarına yüksek derecede toleranslı, yüksek yağ oranına sahip, tabla yapısı eğik ve dış bükey, stres koşullarına toleranslı, toprak seçiciliği olmayan ve alternaria, pas, septoria gibi mantari hastalıklarına karşı yüksek toleranslı bir çeşittir. Tarla denemelerinin kurulduğu yıllara ilişkin iklim verilerine göre, vejetasyon döneminde (Nisan-Ağustos) genel olarak ayçiçeği bitkisinin normal büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkileyecek sıcaklıklar yaşanmamıştır. Nisan-Haziran ayları arasında bitkilerinin su ihtiyacı yağışlarla sağlanmıştır, ancak 2014 yılında bu dönemde 194.6 mm yağış olurken, 2015 yılında 185.8 mm yağış düşmüştür (Tablo 1). Araştırma alanının toprak özellikleri Rowell [12]'e göre belirlenmiştir. Toprak killi-tınlı tekstürde olup, pH'sı 7.5, tuz oranı %0.38, organik madde içeriği %1.1 (Walkley-Black), kireç içeriği %7.20 (Schiebler kalsimetresi), alınabilir fosfor 3.9 mg/kg ve alınabilir potasyum içeriği 119.0 mg/kg (1 N NH₄OAc)'dir. Bu yönüyle deneme alanı toprağı her ne kadar alkali, ağır yapılı ve organik maddesi düşük de olsa ayçiçeği tarımı için uygundur.

Deneme tesadüf bloklarında bölünmüş parseller deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak kurulmuş ve tohumlar ekimleri 10.04.2014 ve 08.04.2015 tarihlerinde 70 × 25 cm ekim normunda 5 m uzunluğunda 5 sıra olacak şekilde yapılmıştır. Bir parselin alanı 17.5 m² (5 m × 3.5 m)'dir. Yabancı ot mücadelesi el çapası ile yapılmıştır. Her iki deneme yılında çiçeklenme öncesi dönemde (Temmuz)

Tablo 1. Isparta ilinin 2014 ve 2015 yıllarına ait aylık ortalama yağış, sıcaklık ve hava bağıl nem değerleri [13]

Aylar	Yağış, (L/m ²)			Sıcaklık (°C)			Bağıl nem (%)		
	1950-2015	2014	2015	1950-2015	2014	2015	1950-2015	2014	2015
Ocak	73.6	61.3	125.9	1.9	3.7	1.9	73.2	76.7	73.4
Şubat	64.0	23.4	57.7	2.9	5.2	3.3	70.2	60.8	68.4
Mart	55.3	78.6	111.6	6.2	7.3	6.7	65.3	63.3	64.8
Nisan	55.3	44.8	26.1	10.8	11.7	9.0	61.0	59.5	58.2
Mayıs	52.3	107.0	67.5	15.6	15.1	16.6	57.4	60.3	51.8
Haziran	30.6	42.8	92.2	20.2	20.0	18.3	51.2	49.8	63.5
Temmuz	14.6	0.8	3.0	23.7	24.5	24.2	45.3	43.5	43.9
Ağustos	11.7	10.2	43.4	23.2	24.9	23.8	46.4	44.2	51.0

yağışın çok az olmasından dolayı 15 gün arayla 2 defa 2'şer saat damla sulama yapılmıştır. Ekimle birlikte 8 kg P₂O₅/da olacak şekilde triple süper fosfat (TSP) gübresi (18:46:0) atılmıştır. Ana parsellere azot dozları (N₀: 0, N₅: 5, N₁₀: 10, N₁₅: 15 kg/da) ve alt parsellere ise kükürt dozları (S₀: 0, S₅: 5, S₁₀: 10, S₁₅: 15 kg/da) uygulanmıştır. Azot kaynağı olarak amonyum nitrat gübresinin (%33) yarısı ekimle, kalan yarısı da sapa kalkma döneminde uygulanmıştır. Kükürt kaynağı olarak ise elementel kükürt (%98) ekimle birlikte uygulanmıştır. Çiçeklenme ve dölleme tamamlandıktan sonra kuş zararının önüne geçilmesi için parsellerdeki bitkilerin tablaları kese kâğıdı ile izole edilmiştir.

Olgunlaşma ile birlikte parsellerden tesadüfen seçilen 10 bitkide agronomik [çiçeklenme tarihi (gün), bitki boyu (cm), tabla çapı (cm), 1.000 tane ağırlığı (g) ve tohum verimi (kg/da)] ve kalite [kabuk oranı (%), yağ oranı (%), yağ verimi (kg/da) ve yağ asitleri kompozisyonu (%)] özellikleri incelenmiştir. Tohumların yağ analizleri Nükleer Manyetik Rezonans (NMR, Brüker mq_{one}) cihazında % olarak okutulmuş saptanmıştır. Tohumlar 70 °C ayarlı etüvde 48 saat bekletilerek nemi uçurulup 2'şer g tartılmış ve NMR cihazında her parselde 3 okuma yapılarak % yağ oranı ortalaması hesaplanmıştır. Yağ asitleri kompozisyonu ise alev iyonlaşma detektöre (FID) sahip gaz kromatografisi (Shimadzu GC-2025) cihazında yapılmıştır.

2 g öğütülmüş tohum *n*-hekzan ile soğuk ekstraksiyona tutulmuş ve solvent karışımı uçurulduktan sonra elde edilen ham yağ AOAC [14] tarafından önerilen yöntemle %0.5'lik Sodyum Metilat (NaOMe) ile metil esterlerine (FAME) dönüştürmüştür. Yağ asitlerine ilişkin kromatogramlar elde edilerek palmitik (C_{16:0}), stearik (C_{18:0}), oleik (C_{18:1}) ve linoleik (C_{18:2}) asit oranları belirlenmiştir. GC cihazının çalışma koşulları şu şekildedir; Kolon Teknokroma TR-CN100 (100 m × 0.25 mm, 0.20 µm), enjektör sıcaklığı 250 °C, detektör sıcaklığı 250 °C, akış hızı (psi) 10, taşıyıcı gaz N (40 ml/dk), enjektör kapasitesi 1.0 µl'dir. Fırın sıcaklığı 140 °C'de 10 dakika bekledikten sonra 240 °C'ye dakikada 3°C'lik artışla ulaşıyor ve bu sıcaklıkta 10 dakika bekliyor. Elde edilen kromatogramlardaki pikler ticari standart yağ asidi metil ester karışımına

(Sigma, Supelco® 37 Component FAME Mix) göre isimlendirilmiştir. Elde edilen veriler tesadüf bloklarında bölünmüş parseller deneme desenine göre SAS [15] istatistik paket programında analiz edilmiş ve uygulamaların karşılaştırılmasında Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

Ayçiçeğinde N ve S dozlarının verim ve kalite özelliklerine ilişkin varyans analiz sonuçlarına göre; bütün özelliklerin yıllar arasındaki farklılıkları %1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Diğer taraftan kabuk oranı ve yağ oranı hariç diğer özelliklerin N dozları; yağ oranı hariç diğer özelliklerin S dozları arasındaki farklılıklar %1 seviyesinde önemlidir. Çiçeklenme zamanı, tohum ve yağ verimi için N × S interaksyonu; tohum ve yağ verimi için Yıl × N interaksyonu; kabuk oranı ve yağ verimi için Yıl × S interaksyonunun önemli olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2).

Azot ve kükürt uygulamalarına göre bitkilerin çiçeklenme zamanı 2014 yılında 69.2-77.1 gün ve 2015 yılında ise 64.3-72.0 gün arasında değişmiş olup, 2014 yılındaki bitkiler daha geç çiçeklenmiştir. N×S interaksyonuna göre N ve S dozu artışına paralel olarak bitkilerde erkencilik teşvik edilmiş ve çiçeklenme zamanı kontrolde 74.5 gün olan çiçeklenme zamanı en yüksek N ve S dozu uygulamasında 66.8 güne gerilemiştir (Tablo 3). Yapılan araştırmalarda lokasyon, çeşit ve kuru veya sulu yetiştirilme durumuna göre ayçiçeğinde çiçeklenme gün sayısı ile ilgili farklı sonuçlar elde edilmiştir. Evcı vd. [16] ayçiçeğinde çiçeklenme gün sayısının 54.0-76.0 gün ve Demir [9] ise 60.6-66.3 gün arasında değişim gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ancak yapılan araştırmalarda ayçiçeğinde çiçeklenme süresi üzerine ışık yoğunluğu, gün uzunluğu, enlem dereceleri ve sıcaklığın etkili olabileceği bildirilmektedir [17]. Azot ve kükürt uygulaması bitkilerde erken çiçeklenmeyi teşvik etmiştir. Azot ve kükürt dozlarının artışı ile erken çiçeklenme sayesinde tohum olgunlaşma döneminin uzamasına ve dolaylı olarak tohum veriminin artışına neden olmuştur. Kaya vd. [18] çiçeklenme süresi ile verim arasında negatif ilişki olduğunu ve erken çiçeklenen çeşitlerin daha verimli olduğunu belirtmişlerdir.

Tablo 2. Ayçiçeğinde N ve S uygulamalarının verim ve kaliteye etkileri ile ilgili varyans analiz sonuçları

V.K.	S.D.	Çiçeklenme zamanı (gün) ¹	Bitki boyu (cm)	Tabla çapı (cm)	1.000 tane ağırlığı (g)
Yıl	1	591.5**	6934.3**	606.6**	747.0**
Blok (Yıl)	4	13.5**	42.1	1.0	10.7
Azot (N)	3	29.7**	1387.9**	66.8**	140.3**
Yıl × N	3	0.01	6.7	1.5	0.43
Hata-1	12	0.2	51.9	1.1	7.1
Kükürt (S)	3	65.1**	316.2**	8.6**	70.4**
Yıl × S	3	0.02	1.5	0.2	0.1
N × S	9	4.3**	43.5	0.8	4.6
Yıl × N × S	9	0.01	0.2	0.02	0.3
Hata-2	48	0.5	31.9	2.5	5.6
CV (%)		1.1	3.9	7.1	6.1
V.K.	S.D.	Tohum verimi (kg/da)	Kabuk oranı (%)	Yağ oranı (%)	Yağ verimi (%)
Yıl	1	314.8**	384.0**	9.1**	9245.3**
Blok (Yıl)	4	0.6	5.8	0.1	104.4
Azot (N)	3	104.1**	0.4	3.7**	4508.9**
Yıl × N	3	27.3**	0.7	1.0	1250.5**
Hata-1	12	1.7	2.0	0.5	92.9
Kükürt (S)	3	54.6**	20.9**	22.1**	2636.8**
Yıl × S	3	1.7	10.8*	0.5	230.7**
N × S	9	7.0**	2.5	1.2	226.8**
Yıl × N × S	9	0.7	3.7	0.7	26.7
Hata-2	48	219.9	3.6	0.6	49.8
CV (%)		5.4	6.5	1.9	6.1

*: p<0.05; **: p<0.01; 1: Özelliklerin kareler ortalaması değerleri; V.K.: varyasyon kaynakları; S.D.: serbestlik derecesi; CV: varyasyon katsayısı

Azot ve kükürt kaynaklı gübrelerin ayçiçeğinde bitki boyuna önemli etkisi olmuştur. 2014 yılında bitkiler (153.6 cm) 2015 yılına göre (136.7 cm) daha uzun boylu olduğu tespit edilmiştir. Bu yılda bitkilerin daha uzun boylu olması tohum ekiminden sonra çiçeklenme zamanına kadar (özellikle mayıs ve haziran aylarında) yağışın daha fazla olmasından kaynaklanabilir. Çalışmada hem N hem de S dozu artışı ile birlikte bitki boyu da artmıştır. N uygulaması bitki boyunu %12 artırırken, S uygulamasında %5 artış sağlanmıştır (Tablo 3). Kaya vd. [18] ayçiçeğinde bitki boyunun 105-180 cm arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Ayçiçeğinde S dozu artışına paralel olarak bitki boyunun pozitif yönde etkilendiği birçok araştırmacı tarafından da belirtilmiştir [9, 10, 19, 20].

Her iki yıl sonuçlarına göre N ve S uygulamasında bitkilerin tabla çapı 14.6-31.2 cm arasında değişim göstermiştir. 2014 yılında ortalama tabla çapı 26.0 cm ve 2015 yılında 18.1 cm olarak belirlenmiştir (Tablo 3). 2014 yılında bitkilerin vejetatif döneminde düşen yağışların daha fazla olması bitkilerin boylarını artırarak daha fazla yaprak alanı oluşturmaya bağlı olarak fotosentez etkinliğinin arttığı ve bu sayede bitkilerin daha iri tabla oluşturdukları düşünülmektedir. Azot dozu ortalamalarına göre en geniş tabla çapı 10 kg N/da uygulamasından (25.0 cm) ve en dar ise kontrolden elde edilmiştir. Kükürt uygulamasına göre tabla çapı kontrolden 5 kg S/da'a kadar artmış ve sonraki dozlarda azalmıştır. En yüksek tabla çapı 5 ve 10 kg S/da uygulamasından sırasıyla 23.1 ve 22.4 cm olarak tespit edilmiştir (Tablo 3). Farklı lokasyonlarda yapılan çalışmalarda ayçiçeğinde tabla çapını Demir [9] 17.2-23.1 cm, Evci

vd. [10] 10.0-30.0 cm ve Şahin [21] ise 20.3-28.1 cm arasında değiştiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda ve diğer çalışmalarda tabla çapı bakımından gözlenen varyasyonlar genetik ve çevresel farklılıklardan ileri gelmektedir. Ayçiçeğinde kükürtlü gübre uygulanması sonucunda kükürdün tabla çapını olumlu yönde etkilediği ve tabla çapını artırdığı çok sayıda araştırmacı tarafından da bildirilmiştir [8, 20].

Ayçiçeğinde tohum verimini belirleyen diğer önemli bir seleksiyon kriteri de 1.000 tane ağırlığıdır. Çalışmada tohumların 1.000 tane ağırlığı 2014 yılında (61.1 g) daha yüksek (2015 yılında 55.6 g) bulunmuştur. Bu yılda düşen yağış miktarının bitkilerin boyunu ve tabla çapları pozitif yönde etkilemesine bağlı olarak tohum ağırlıklarını da artırdığı düşünülmektedir. Ayçiçeğinde bin tane ağırlığı bakımından farklı lokasyonlarında yürütülen denemelerde Demir [9] 45.3-79.8 g ve Şahin [21] 54.4-94.6 g arasında değiştiğini bildirmişler ve sonuçlarımız da bu varyasyonlar ile uyumlu bulunmuştur. Azot dozları ortalamasına göre en yüksek 1.000 tane ağırlığı 10 kg N/da uygulamasından elde edilirken, en düşük kontrolden ölçülmüştür. Gül ve Kara [22] ayçiçeğinde N uygulaması ile birlikte 1.000 tane ağırlığının arttığını en yüksek 1.000 tane ağırlığının 15 kg N/da uygulamasından elde edildiğini rapor etmişlerdir. Diğer taraftan S dozları arttıkça tohumların 1000 tane ağırlıkları kontrole göre %6.5 oranında artış göstermiştir (Tablo 3). Ayrıca Ishfaq [23] 15 kg S/da uygulamasının 1.000 tane ağırlığını %15.9 oranında artırdığını rapor etmiştir. Diğer taraftan farklı araştırmacılar da kükürdün 1000 tane ağırlığı üzerine pozitif yönde etkilediği ve önemli ölçüde artırdığını bildirmişlerdir [8, 24].

Tablo 3. Ayçiçeğinde N ve S uygulamalarının bazı agronomik özelliklerine ilişkin ortalama değerler

Yıl	N	Çiçeklenme gün sayısı (gün)					Bitki boyu (cm)				
		S					S				
		0	5	10	15	Ort.	0	5	10	15	Ort.
2014	0	77.1	73.7	72.0	71.6	73.6	141.4	147.5	149.1	149.1	146.8
	5	73.7	72.6	72.0	71.3	72.4	144.9	147.2	151.0	155.2	149.6
	10	73.3	70.9	69.9	69.9	71.0	146.0	153.7	153.7	157.9	152.8
	15	73.0	73.0	70.9	69.2	71.5	161.3	162.9	172.8	163.8	165.2
	Ort.	74.3	72.6	71.2	70.5	72.1 A¹	148.4	152.8	156.7	156.5	153.6 A
2015	0	72.0	68.7	67.0	66.7	68.6	126.0	131.3	132.7	132.7	130.7
	5	68.7	67.7	67.0	66.3	67.4	129.0	131.0	134.3	138.0	133.1
	10	68.3	66.0	65.0	65.0	66.1	130.0	136.7	136.7	140.3	135.9
	15	68.0	68.0	66.0	64.3	66.5	145.3	144.7	153.3	145.5	147.2
	Ort.	69.3	67.6	66.3	65.6	67.2 B	132.6	135.9	139.3	139.1	136.7 B
N×S	0	74.5 a	71.2 b	69.5 c-e	69.1 de	71.1 a	133.7	139.4	140.9	140.9	138.7 c
	5	71.2 b	70.2 b-d	69.5 c-e	68.8 e	69.9 b	137.0	139.1	142.7	146.6	141.3 bc
	10	70.8 b	68.5 ef	67.5 fg	67.5 fg	69.1 c	138.0	145.2	145.2	149.1	144.4 b
	15	70.5 bc	70.5 bc	68.5 ef	66.8 g	68.5 d	153.3	153.8	163.1	154.7	156.2 a
	Ort.	71.8 a	70.1 b	68.7 c	68.0 d		140.5 c	144.4 b	148.0 a	147.8 a	
Yıl	N	Tabla çapı (cm)					1.000 tane ağırlığı (g)				
		S					S				
		0	5	10	15	Ort.	0	5	10	15	Ort.
2014	0	21.2	24.3	23.3	22.2	22.8	57.7	58.0	59.0	59.6	58.6
	5	23.6	24.8	24.3	24.3	24.3	58.2	58.3	61.9	62.1	60.1
	10	27.4	31.2	30.4	28.3	29.3	61.2	64.5	66.1	66.2	64.5
	15	26.3	28.5	27.4	27.7	27.5	59.3	59.8	62.4	63.8	61.3
	Ort.	24.6	27.2	26.4	25.6	26.0 A	59.1	60.2	62.4	62.9	61.1 A
2015	0	14.6	16.9	16.2	15.3	15.8	52.5	52.7	53.6	54.2	53.3
	5	16.4	17.2	16.9	16.9	16.9	52.9	53.0	56.3	56.4	54.7
	10	19.2	22.0	21.4	19.9	20.6	55.7	58.6	60.1	60.2	58.7
	15	18.4	20.0	19.2	19.4	19.3	53.9	54.3	56.8	58.0	55.8
	Ort.	17.2	19.0	18.4	17.9	18.1 B	53.8	54.7	56.7	57.2	55.6 B
N×S	0	17.9	20.6	19.8	18.8	19.3 d	55.1	55.4	56.3	56.9	55.9 c
	5	20.0	21.0	20.6	20.6	20.6 c	55.6	55.7	59.1	59.3	57.4 bc
	10	23.3	26.6	25.9	24.1	25.0 a	58.5	61.6	63.1	63.2	61.6 a
	15	22.4	24.3	23.3	23.6	23.4 b	56.6	57.1	59.6	60.9	58.5 b
	Ort.	20.9 c	23.1 a	22.4 ab	21.8 bc		56.4 c	57.4 bc	59.5 b	60.1 a	

¹: Aynı harflere sahip ortalamalar arasında istatistiksel farklılık bulunmamaktadır.

Ayçiçeğinde tohum veriminin artırılması en önemli yetiştiricilik hedeflerinden birisidir. Her iki yıl sonuçlarına göre tohum verimi 2014 yılında 235.4-348.6 kg/da (N₀S₀-N₅S₅) ve 2015 yılında 174.4-327.4 kg/da (N₀S₀-N₁₀S₅) arasında değişmiştir. Yıllara göre 2014 yılında en yüksek tane verimi (300.4 kd/da) elde edilmiştir (Tablo 4). Bu farklılık 2014 yılı yağış miktarının yüksek olmasından kaynaklanabilir. Çalışmada incelenen bitki boyu, tabla çapı, 1.000 tane ağırlığı gibi verim bileşenlerinin 2014 yılında daha yüksek olması tohum verimine olumlu katkı sağlamış olabilir. Nitekim ayçiçeğinde tohum veriminin aynı lokasyonda yıllara göre farklılık gösterebileceği, genetik × çevre interaksiyonunun yüksek olduğu ve tohum veriminin kalıtımında birçok eklemeli etkili genlerin rol aldığı ve orta düzeyde kalıtım derecesine tahminlendiği rapor edilmektedir [25]. Azot dozu ortalamalarına göre kontrol parsellerinde 231.9 kg/da olan tohum verimi 10 kg N/da'a kadar %31.3 oranında artış göstererek 304.4 kg/da'a ulaşmıştır. Daha sonraki doz artışı ile birlikte gerileyerek 15 kg N/da uygulamasında 286.7 kg/da'a düşmüştür (Tablo 4). Yapılan araştırmalarda tohum verimi üzerine N uygulamalarının önemli etkisinin olduğu ve N dozu arttıkça tohum veriminin de arttığı bildirilmektedir.

Gül ve Kara [22] ayçiçeğinde en yüksek tohum veriminin 15 kg N/da, Namwar vd. [26] 12 kg N/da ve Evcı vd. [27] 5-10 kg N/da uygulamasından elde edildiğini rapor etmişlerdir. Sonuçlarımız Namwar vd. [26] ve Evcı vd. [27]'nin sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Çalışmada S dozu ortalamalarına göre en yüksek tohum verimi 5 kg S/da uygulamasından (302.8 kg/da) ve en düşük kontrol parsellerinden (248.4 kg/da) elde edilmiştir (Tablo 4). Ayçiçeğinde azot ve kükürdün tohum verimini artırdığı birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir [8, 19, 24]. Ancak yüksek miktarda S uygulamasının ayçiçeğinde toksisiteye neden olduğu rapor edilmektedir. Ayçiçeğinde 8 kg S/da dozunun üzerinde yapılan S gübrelemesinin N, P ve K gibi besin elementlerinin alınımı engellediği ve tohum verimini önemli oranda düşürdüğü bildirilmektedir [28]. Nitekim çalışmamızda 5 kg S/da uygulamasından sonra tohum verimi azalmıştır. Diğer taraftan ayçiçeğinde 8 kg S/da ve 14 kg N/da uygulaması ile bitkilerin en yüksek yaprak alanına ulaştığı ve bu gübre kombinasyonunda net asimilasyon oranının en üst seviyeye çıktığı ve dolayısıyla en yüksek tohum veriminin bu uygulamalardan elde edildiği rapor edilmektedir [29].

Tablo 4. Ayçiçeğinde N ve S uygulamalarının tohum verimi ve kalite özelliklerine ilişkin ortalama değerler

Yıl	N	Tohum verimi (kg/da)					Kabuk oranı (%)				
		S					S				
		0	5	10	15	Ort.	0	5	10	15	Ort.
2014	0	235.4	300.9	252.0	279.9	267.1 b ¹	27.4	28.0	26.0	28.0	27.4
	5	271.4	348.6	296.1	334.3	312.6 a	25.2	29.0	26.3	29.0	27.4
	10	303.7	319.7	310.2	304.6	309.6 a	27.1	28.6	26.9	27.0	27.4
	15	293.3	345.4	319.1	291.6	312.4 a	28.5	26.9	27.3	27.3	27.5
	Ort.	276.0	328.7	294.4	302.6	300.4 A	27.1 d	28.1 cd	26.6 d	27.8 d	27.4 B
2015	0	174.4	223.3	185.7	203.6	196.8 d	33.9	30.6	30.5	31.7	31.7
	5	191.4	269.5	217.2	241.2	229.8 c	33.6	33.1	29.0	30.8	31.6
	10	282.4	327.4	313.6	273.4	299.2 a	32.3	32.2	28.7	31.2	31.1
	15	235.0	287.8	283.2	237.8	261.0 b	31.9	31.8	29.7	31.5	31.2
	Ort.	220.8	277.0	249.9	239.0	246.7 B	32.9 a	31.9 ab	29.5 b-d	31.3 a-c	31.4 A
N×S	0	204.9 h	262.1 de	218.9 gh	241.8 e-g	231.9 d	30.7	29.3	28.3	29.9	29.5
	5	231.4 fg	309.1 a-c	256.7 ef	287.8 cd	271.2 c	29.4	31.1	27.7	29.9	29.5
	10	293.1 bc	323.6 a	311.9 a-c	289.0 cd	304.4 a	29.7	30.4	27.8	29.1	29.3
	15	264.2 de	316.6 ab	301.2 a-c	264.7 de	286.7 b	30.2	29.4	28.5	29.4	29.4
	Ort.	248.4 c	302.8 a	272.1 b	270.8 b		30.0 a	30.0 a	28.1 b	29.6 a	

Yıl	N	Yağ oranı (%)					Yağ verimi (kg/da)				
		S					S				
		0	5	10	15	Ort.	0	5	10	15	Ort.
2014	0	41.0	42.4	42.9	43.5	42.5	102.5	125.2	103.2	117.9	112.2 b
	5	41.7	42.8	43.1	42.1	42.4	114.9	144.9	122.7	140.7	130.8 a
	10	41.1	42.6	43.8	43.9	42.9	127.1	137.9	125.1	126.4	129.1 a
	15	43.0	43.4	43.7	44.5	43.7	125.3	146.6	134.7	136.9	135.9 a
	Ort.	41.7	42.8	43.4	43.5	42.8 A	117.5 c	138.7 a	121.4 bc	130.5 ab	127.0 A
2015	0	41.3	42.9	44.2	44.4	43.2	72.1	98.7	79.7	90.3	85.2 c
	5	41.1	43.6	44.8	43.9	43.4	78.5	120.7	74.6	105.9	94.9 c
	10	42.2	43.8	44.0	44.3	43.6	119.1	144.1	137.3	121.1	130.4 a
	15	43.0	43.7	43.8	44.2	43.7	101.0	126.1	123.7	105.0	114.0 b
	Ort.	41.9	43.5	44.2	44.2	43.5 B	92.7 e	122.4 bc	103.8 de	105.6 d	106.1 B
N×S	0	41.2	42.7	43.6	44.0	42.8 b	87.3 g	112.0 de	91.5 g	104.1 ef	98.7 c
	5	41.4	43.2	44.0	43.0	42.9 b	96.7 fg	132.8 a-c	98.7 fg	123.3 cd	112.9 b
	10	41.7	43.2	43.9	44.1	43.2 b	123.1 cd	141.0 a	131.2 a-c	123.8 b-d	129.8 a
	15	43.0	43.6	43.8	44.4	43.7 a	113.2 de	136.4 ab	129.2 a-c	121.0 cd	124.9 a
	Ort.	41.8 c	43.2 b	43.8 a	43.9 a		105.1 c	130.5 a	112.6 b	118.0 b	

¹: Aynı harflere sahip ortalamalar arasında istatistiksel farklılık bulunmamaktadır.

Ayçiçeği tohumlarında kabuk oranının azaltılması önemli ıslah amaçlarından biridir. Geliştirilen çeşitlerde kabuk oranının % 25'in altına düşürülmesi hedeflenmektedir. Çalışmada tohumların kabuk oranları yıllara göre farklılık göstermiş ve 2015 yılında kabuk oranı daha yüksek (%31.4) bulunmuştur (Tablo 4). İklim verileri incelendiğinde bu yılda düşen yağış miktarının bir önceki yıla göre daha az olması nedeniyle tohum verimi ve verim bileşenlerinin düşük olması tohumlarda kabuk oranını artırdığı düşünülmektedir. Uygulamalarda sadece S dozları arasındaki farklılıklar önemli bulunmuş ($p < 0.01$) ve en düşük kabuk oranı 10 kg S/da uygulamasından elde edilmiştir. Ayçiçeği tohumlarında yağ oranı artışı 1000 tane ağırlığı 55 g'a ulaşana kadar devam ettiği, tane ağırlığı 55 g'ın üzerine çıktıkça tohumların yağ içeriğinin azaldığı ve kabuk oranının ise artış gösterdiği bildirilmektedir [16]. Çalışmamızda S uygulamasının tohumlarda yağ sentezini teşvik ettiği ve dolayısıyla kabuk oranını azalttığı düşünülmektedir. Nitekim ayçiçeğinde kabuk ve yağ oranı arasında negatif bir korelasyon olduğunu rapor edilmektedir [3].

Yağlık ayçiçeği tohumlarının ekonomik değerinin %80'inden daha fazlasını ham yağ oluşturmaktadır. Çalışmamızda N ve S uygulamaları tohumların yağ içeriği üzerine önemli etki göstermiştir. Yıllara göre ortalama yağ oranı 2014 yılında %42.8 iken, 2015 yılında %43.5 oranında tespit edilmiştir. Denemenin 2. yılında bitkilerin tohum veriminin düşük olmasından dolayı yağ içeriğinin daha yüksek çıktığı düşünülmektedir. Zira ayçiçeğinde yağ oranı ve tohum verimi arasında negatif ilişki olduğu rapor edilmektedir [18]. N ve S uygulama dozları arttıkça tohumların yağ içeriği artmış olup, kontrole göre en yüksek dozda N uygulamasında %2.1 ve S uygulamasında %5.0 oranında artış tespit edilmiştir (Tablo 4). S uygulaması ile ayçiçeğinde yağ içeriğinin %18 oranında arttığını bildirilmektedir [8]. Bazı araştırmalarda azotun tohumun protein içeriğini artırıcı etkisinden dolayı yağ içeriğine olumsuz etkisi olduğu tespit edilse de [30], S ve N aynı anda uygulandığında yağ içeriğinin önemli oranda arttığı rapor edilmektedir [10].

Ayçiçeğinde yüksek tohum verimliliği kadar yağ verimliliğinin de yüksek olması arzulanmaktadır. Yıllara göre yağ verimi 2014 yılında 102.5-146.6 kg/da (N₀S₀-N₁₅S₅) ve 2015 yılında 87.3-141.0 kg/da (N₀S₀-N₁₀S₅) arasında değişmiştir. Yıllara göre 2014 yılında en yüksek yağ verimi (127.0 kg/da) elde edilmiştir (Tablo 4). Yağış miktarının 2014 yılında daha yüksek olması tohum verimini artırmış ve dolaylı olarak yağ verimi de artış sağlamıştır. Ayçiçeğinde diğer agronomik ve kalite özelliklerinde olduğu gibi yağ veriminin kalıtımında da eklemeli etkili genlerin rol aldığı ve bundan dolayı yağ veriminin çeşitlerin genetik yapısı, bunların yağ oranı ve tohum verimleri ile yetiştirme teknikleri ve ekolojik faktörlere bağlı olarak değiştiği bir çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir [9, 21]. Azot dozlarına göre kontrol parsellerinde ortalama 98.7 kg/da olan yağ verimi 10 kg N/da'a kadar %31.5 oranında artış göstererek 129.8 kg/da'a ulaşmıştır. Daha sonraki doz artışı ile birlikte 15 kg N/da uygulamasında 124.9 kg/da'a düşmüş, ancak bu azalma istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Tablo 4). Ayçiçeğinde yağ verimi üzerine N uygulamalarının olumlu bir etkisi olduğu rapor edilmiş ve yüksek yağ verimi için en uygun azot uygulamasını Gül ve Kara [22] 15 kg N/da, Namwar vd. [26] 12 kg N/da ve Evci vd. [27] 5-10 kg N/da olduğunu önermişlerdir. Sonuçlarımız bu bulgular ile uyumludur. Kükürt uygulamalarına göre en yüksek yağ verimi 5 kg S/da uygulamasından (130.5 kg/da) ve en düşük kontrolden (105.1 kg/da) elde edilmiştir (Tablo 4). Azot ve kükürt gübrelere birlikte uygulanması tohum verimini artırdığı gibi yağ oranını da artırmış ve dolayısıyla yağ verimi üzerine önemli

bir etkisi olmuştur. Ayçiçeğinde azot ve kükürdün yağ verimini belirli bir doza kadar artırdığı, daha yüksek dozlarda toksisiteye neden olduğu rapor edilmektedir [8, 19, 28].

Azot ve kükürt uygulamalarının yağ asitleri kompozisyonu üzerine etkisi incelendiğinde 2014 ve 2015 yıllarında palmitik asit oranı sırasıyla %4.22-6.26 ve %4.44-6.24, stearik asit oranı %1.83-2.64 ve %1.76-2.80, oleik asit oranı %83.01-91.70 ve %86.42-91.09, linoleik asit oranı ise %1.37-7.25 ve %1.67-6.89 arasında değişim göstermiştir (Tablo 5). Çalışmada yılların, gübreler ve dozlarının yağ asitleri üzerine net bir etkisi gözükmemekle birlikte artan N ve S dozlarına karşı oleik asit oranında azalmanın ve linoleik asit oranında bir artışın olduğu görülmektedir. Bazı çalışmalarda N ve S gübrelmesinin ayçiçeğinde oleik asit oranını azalttığı rapor edilmesine rağmen [29, 31], bazılarında etkisinin olmadığı bildirilmektedir [32].

4. Sonuç

Sonuç olarak; azot ve kükürt uygulamaları yağlık hibrit ayçiçeğinde verim ve kaliteyi artırmıştır. Isparta koşullarında yağlık ayçiçeği yetiştiriciliğinde daha yüksek verim ve kalite 10 kg N/da ile 5 kg S/da kullanılması önerilebilir. Özellikle S içerikli gübre kullanımının teşvik edilmesi ve bu konuda gerekli desteklerin sağlanması bitkisel yağ açığının kapatılması, yağ kalitesinin iyileştirilmesi ve ayçiçeği tarımının geliştirilmesine önemli katkılar sağlayacaktır.

Tablo 5. Ayçiçeğinde N ve S uygulamalarının yağ asitleri kompozisyonu (%) üzerine etkileri

Dozlar	Palmitik asit (C _{16:0})		Stearik asit (C _{18:0})		Oleik asit (C _{18:1})		Linoleik asit (C _{18:2})	
	2014	2015	2014	2015	2014	2015	2014	2015
A ₀ S ₀	4.62	4.90	2.25	2.39	91.53	91.01	1.58	1.67
A ₀ S ₅	6.26	6.01	1.83	1.76	89.03	89.18	2.85	3.02
A ₀ S ₁₀	4.22	4.47	2.64	2.80	90.09	89.78	3.04	2.92
A ₀ S ₁₅	5.81	5.58	1.90	1.82	89.22	89.35	3.04	3.22
A ₅ S ₀	4.91	4.90	2.33	2.24	91.38	91.09	1.36	1.74
A ₅ S ₅	5.49	5.27	1.82	1.93	90.97	90.97	1.70	1.80
A ₅ S ₁₀	5.22	5.14	2.25	2.20	86.41	88.98	6.09	3.66
A ₅ S ₁₅	5.35	5.53	2.29	2.39	88.90	86.21	3.45	5.85
A ₁₀ S ₀	4.90	5.19	1.97	2.09	91.70	90.19	1.41	2.49
A ₁₀ S ₅	4.63	4.44	2.47	2.37	86.74	87.26	6.14	5.89
A ₁₀ S ₁₀	5.89	6.24	2.50	2.65	86.23	85.41	5.35	5.67
A ₁₀ S ₁₅	5.38	5.16	2.18	2.09	85.06	86.26	7.37	6.45
A ₁₅ S ₀	5.27	5.59	2.50	2.65	88.92	88.25	3.29	3.49
A ₁₅ S ₅	5.75	5.52	2.51	2.41	90.35	88.59	1.37	3.45
A ₁₅ S ₁₀	4.44	4.71	2.59	2.49	88.58	88.15	4.37	4.63
A ₁₅ S ₁₅	5.28	6.07	2.44	2.59	83.01	86.42	7.25	6.89

Kaynakça

- [1] Anonim, 2020a. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Erişim Tarihi: 10.01.2020).
- [2] Anonim, 2020b. <http://www.bysd.org.tr/DisTicaretRakamlari/> (Erişim Tarihi: 10.01.2020).
- [3] Gültekin, S. 2018. Isparta Koşullarında Bazı Oleik ve Linoleik Asit İçeren Yağlık Hibrit Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) Çeşitlerinin Verim ve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 68 s, Isparta.
- [4] Habib, H., Mehdi, S.S., Rashid A., Anjum, M.A. 2006. Genetic Association and Path Analysis for Seed Yield in Sunflower. Pakistan Journal of Agricultural Sciences, 43,136-139.
- [5] Cakmak, I. 2002. Plant Nutrition Research Priorities to Meet Human Needs for Food in Sustainable Ways. Plant Soil. 247,3-24.
- [6] Gudade, B.A., Thakur, M.R., Ulemale, R.B., Imade, S.R., Bodhade, M.S. 2009. Nutrient Uptake, Soil Nutrient Status and Quality of New Sunflower Varieties as Influenced by Fertilizer Levels. Journal of Soils and Crops, 19 (2), 355-359.
- [7] Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Pres, London Sed. Ed. p. 255-264.
- [8] Hassan, F., Hakim, S.A., Manaf, A., Qadir, G., Ahmad, S. 2007. Response of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) to Sulphur and Seasonal Variations. International Journal of Agriculture and Biology, 9(3),499-503.
- [9] Demir, İ. 2009. Azot ve Kükürdün Ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) Verim ve Verim öğeleri ile Bazı Kalite Özellikleri Üzerine Etkisi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 113 s, Ankara.
- [10] Poonia, K.L. 2000. Effect of Planting Geometry, Nitrogen and Sulfur on Growth and Yield of Sunflower (*Helianthus annuus* L.). Journal of Eco-Physiology, 3, 59-71.
- [11] Najar, G.R., Singh, S.R., Akthar, F. Hakeem, S.A. 2011. Influence of Sulphur levEls on Yield, Uptake and Quality of Soyabean (*Glycine max*) under Temperate Conditions of Kashmir Valley. Indian Journal of Agricultural Sciences, 81(4), 340-343.
- [12] Rowell, D.L. 1996. Soil Science: Methods and Applications. Longman. London.
- [13] Anonim, 2020c. Meteoroloji Genel Müdürlüğü.
- [14] AOAC, 2005. Official method of Analysis. 18th Edition, Association of Officiating Analytical Chemists, Washington DC.
- [15] SAS Institute. 1999. INC SAS/STAT User's Guide Release7.0, Cary, NC, USA.
- [16] Evcı, G., Pekcan. V., Yılmaz M.İ., Kaya, Y., 2011. Ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) Yağ kalitesi ve verim öğeleri arasındaki ilişkilerin belirlenmesi. Türkiye IX. Tarla Bitkileri Kongresi, 12-15 Eylül, Bursa, 2,815-820.
- [17] Connor, D.J., Hall, A.J. 1997. Sunflower Physiology. A.A.Schneiter (ed.) Sunflower Technology and Production. ASA, SCSA Monograph. No: 35, Madison, WI. 113-182.
- [18] Kaya, Y., Evcı, G., Durak, S., Pekcan, V. ve Gücer, T. 2006 Farklı Çevre Koşullarında Ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) Tane Verimi ve Diğer Verim Öğeleri Arasında İlişkilerin Belirlenmesi. Trakya University Journal of Natural Sciences, 7(1), 37-44.
- [19] Bhagat, G.J., Abdul, H., Bonde, S.P., Giri, M.D., Mohammed, S. 2003. Effect of Irrigation and Sulphur Levels on Growth and Yield Attributes of Rabi Sunflower (*Helianthus annuus* L.). Research on Crops, 4(1), 56-59.
- [20] Ramu, Y.R., Reddy, P.M. 2003. Growth and Yield of Sunflower as Influenced by Nitrogen and Sulphur Nutrition. Indian Journal of Dryland Agricultural Research and Development, 18(2), 192-195.
- [21] Şahin, T. 2015. Tokat-Erbaa Şartlarında Bazı Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) Çeşitlerinin Performanslarının Belirlenmesi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 65s, Tokat.
- [22] Gül, V., Kara, K. 2015. Effects of Different Nitrogen Doses on Yield and Quality Traits of Common Sunflower (*Helianthus annuus* L.). Turkish Journal of Field Crops, 20(2), 159-165.
- [23] Ishfaq, M. 2010. Productivity of Sunflower Hybrids as Influenced by Sulphur-Nitrogen Nutrition and Varying Plant Population. Faculty of Agriculture, University of Agriculture, PhD Thesis, 218 p, Pakistan.
- [24] Khan, J.M., Khan, H.M., Khattak, A.R. Jan, T.M. 2006. Response of Maize to diffErent Levels of Sulphur. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 37(1), 41-51.
- [25] Khan, H., Rehman, U.H., Bakht, J., Khan, A.S., Hussain, I., Khan, A., Ali, S. 2013. Genotype × Environment Interaction and Heritability Estimates for Some Agronomic Characters in Sunflower. The Journal of Animal & Plant Sciences, 23(4), 1177-1184.
- [26] Namvar, A., Khandan, T. Shojaei, M. 2012. Effects of Bio and Chemical Nitrogen Fertilizer on Grain and Oil Yield of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) under Different Rates of Plant Density. Annals of Biology Research, 3(2), 1125-1131.
- [27] Evcı G., Kaya, Y., Pekcan, V., Durak, S., Kahraman, T. 2006. The Determination of the Effect of

- Cover Crop Before Sunflower Production on Seed Yield, the Application of Nitrogen Rate and Water Content in the Soil in Trakya Region. Trakya University Journal of Natural Science, 7(1), 71-75.
- [28] Shamima N., Imamul Huq, S.M. 2002. Effect of Sulphur Fertilizer on Yield and Nutrient Uptake of Sunflower Crop in an Albaquept Soil. Pakistan Journal of Biological Sciences, 5, 533-536.
- [29] Iqbal, A. 2008. Production Potential of Autumn Planted Sunflower (*Helianthus annuus* L). Department of Agronomy, University of Agriculture, PhD Thesis, Pakistan.
- [30] Scheiner, J.D., Guterrez-Boem, F.H., Lavado R.S. 2002. Sunflower Nitrogen Requirement and 15 N Fertilizer Recovery in Western Pampas, Argentina. European Journal of Agronomy, 17, 73-79.
- [31] Misra, S.K., Sing, R.N., Tiwari, V.N., Tiwari K.H. 2002. Effect of Sulphur Fertilizer on Quality Characteristics of Mustard Seed in Five Cultivars. Journal of the Indian Society of Soil Science, 50(1), 141-143.
- [32] Manaf, A., Hassan, F. 2006. Effects of Sulphur on Fatty Acid Accumulation in Brassica Cultivars. International Journal of Agriculture & Biology, 5, 588-592.

Pure Elements and Dual Notions of Prime Elements in Lattice Modules

Emel ASLANKARAYİĞİT UĞURLU*¹

¹Marmara University, Faculty of arts and sciences, Department of Mathematics, İstanbul, Turkey
(ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8475-7099>)

(Alınış / Received: 08.01.2019, Kabul / Accepted: 07.01.2019, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Keywords

Multiplicative lattices,
Lattice modules,
Second elements,
Pure elements

Abstract: This paper deals with the pure elements and the dual notions of prime elements (that is, second elements). For this, it introduces the definitions of second element and coprime element. Then it is shown that the concepts of the second element and coprime element are equivalent. Moreover, this study gives us a characterization of comultiplication modules. Finally, it defines pure elements and obtains the relation among pure, idempotent and multiplication elements.

Latis Modüllerindeki Pür Elemanlar ve Asal Elemanların Dual Kavramları

Anahtar Kelimeler

Çarpımsal latisler,
Latis modüller,
İkinci elemanlar,
Pür elemanlar

Özet: Bu makale pür elemanlar ve asal elemanların dual kavramları (yani ikinci elemanları) ile ilgilenir. Bunun için, ikinci elemanı ve eşasal elemanı tanıtır. Daha sonra ikinci eleman kavramı ile eşasal eleman kavramlarının denk olduğu elde edilir. Ayrıca, bu çalışma bize eşçarpımsal latis modüllerinin bir karakterizasyonunu verir. Son olarak, pür elemanları tanımlar ve pür, eşgüçlü ve çarpım elemanlar arasındaki ilişkiyi elde eder.

1. Introduction

L is said to be a multiplicative lattice if L is a complete lattice in which there exists a commutative, associative multiplication that distributes over randomly joins and has compact greatest element 1_L (least element 0_L) as a multiplicative identity (zero).

A complete lattice M is called an L -lattice module if there exists a multiplication between elements of L and M , denoted by xN for $x \in L$ and $N \in M$, that provides the next conditions:

1. $(xy)N = x(yN)$;
2. $\left(\bigvee_{\alpha} x_{\alpha}\right) \left(\bigvee_{\beta} N_{\beta}\right) = \bigvee_{\alpha, \beta} x_{\alpha}N_{\beta}$;
3. $1_L N = N$;
4. $0_L N = 0_M$;

for all x, x_{α}, y in L and for all N, N_{β} in M .

Throughout this note L denotes a multiplicative lattice and M denotes an L -lattice module. Note that 1_M (resp., 0_M) means the greatest element (resp., the least element) of M . $H \in M$ is called proper if $H < 1_M$. Suppose H, K are in M , the join of every $x \in L$ such that $xK \leq H$ is denoted by $(H :_L K)$. Specially, $(0_M :_L 1_M)$ is denoted by $Ann(M)$.

On the other hand, for $x \in L$ and $H \in M$, the join of every $N \in M$ such that $xN \leq H$ is denoted by $(H :_M x)$.

An element H in M is said to be meet principal if $(x \wedge (N :_L H))H = xH \wedge N$ for $\forall N \in M$ and $\forall x \in L$. H is said to be join principal if $x \vee (N :_L H) = ((xH \vee N) :_L H)$ for $\forall x \in L$ and for $\forall N \in M$. Then if H is both meet principal and join principal, we say it is principal. In particular, we say H is weak meet principal (weak join principal) if $(N :_L H)H = N \wedge H$ ($(xH :_L H) = x \vee (0_M :_L H)$) for all $N \in M$ (for all $x \in L$). Then if H is both weak meet principal and weak join principal, H is called weak principal.

We say $H \in M$ is compact if $H \leq \bigvee_{\alpha} N_{\alpha}$, then $H \leq N_{\alpha_1} \vee N_{\alpha_2} \vee \dots \vee N_{\alpha_n}$ for some subset $\{\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_n\}$. M is called CG (compactly generated) if each element of M is a join of compact elements in M . Similarly, we say that M is PG (principally generated) if each element of M is a join of principal elements in M .

If $H \in M$ such that $(H :_L 1_M)H = H$, then it is said to be an idempotent element. Specially, if we consider L as an L -module over itself, $a \in L$ is called idempotent if $a = a^2$. We say $H < 1_M$ in L -module M is prime, if $aX \leq H$ implies $X \leq H$ or $a \leq (H :_L 1_M)$ for all $a \in L, X \in M$. Particularly if 0_M is prime, then M is called a prime lattice module. Note that the necessary and sufficient condition for 0_M to be prime in M is $(0_M :_L 1_M) = (0_M :_L H)$ for all $0_M \neq H \in M$. An element

$H < 1_M$ in M is called a primary element if $aX \leq H$ and $X \not\leq H$, then $a^k \leq (H :_L 1_M)$ for all $a \in L, X \in M$. Moreover M is said to be faithful if $Ann(M) = (0_M :_L 1_M) = 0_L$.

Suppose H is an element in M . Then $[H, 1_M]$ is a set of all $K \in M$ which satisfies $H \leq K \leq 1_M$. Moreover the lattice $[H, 1_M]$ is an L -lattice module with $a.K = aK \vee H$ for all $a \in L$ and $K \in M$ which satisfies $H \leq K$.

For more information of lattice modules, one is referred to [5]-[7].

Throughout the paper we have examined the concept of multiplication and comultiplication lattice module over L and generalized some important conclusions for multiplication and comultiplication modules over commutative rings, shown by M. M. Ali, H. Ansari-Toroghy, F. Farshadifar, P. F. Smith in [1]-[4] and [8]-[11], to the lattice modules over multiplicative lattice.

In this paper, we introduce second and coprime elements of M in Definition 2 and Definition 3, respectively. Then in Proposition 2, we prove that the notion of the second element and coprime element in M are equivalent. In Section 3, we define the notion of pure element in M in Definition 4. Then in Proposition 4 we characterize a pure element in L . Also, in Proposition 5, we show that $a \in L$ is pure in $L \Leftrightarrow a$ is multiplication and idempotent in L . The main theorem of our study (Theorem 3) states that if L is PG and M is faithful multiplication PG such that 1_M is compact, then $H \in M$ is pure $\Leftrightarrow (H :_L 1_M)$ is a pure element of L . Finally, in Corollary 1, we obtain the relationship among pure, multiplication and idempotent elements in lattice and lattice modules. Consequently, this study contributes to the literature introducing the notion of the second element, coprime element and pure element in a lattice module as well as giving relationships among some special elements in lattice and lattice modules.

2. Dual Notions of Prime Elements

Firstly for the sake of completeness the following definition, lemma and theorem are given.

Definition 1. (See [5] and [7])

(i) M is called a multiplication lattice module if for every element $N \in M$ there exists an element $a \in L$ such that $N = a1_M$.

(ii) M is said to be a comultiplication lattice module if for every element N of M there exists an element $a \in L$ such that $N = (0_M :_M a)$.

Lemma 1. (See [5] and [7]) *The following statements hold for a lattice module M over a multiplicative lattice L :*

1. M is multiplication $\Leftrightarrow N = (N :_L 1_M)1_M$ for every element N in M .
2. M is comultiplication $\Leftrightarrow N = (0_M :_M (0_M :_L N))$ for every element N in M .

Theorem 1. (See [7]) *The following statements are equivalent for a lattice module M over a multiplicative lattice L :*

1. M is comultiplication.
2. For any $N \in M$ and any $c \in L$ with $N < (0_M :_M c)$, there is $b \in L$ such that $c < b$ and $N = (0_M :_M b)$.
3. For any $N \in M$ and any $c \in L$ with $N < (0_M :_M c)$, there is $b \in L$ such that $c < b$ and $N \leq (0_M :_M b)$.

Now, let us define the dual notion of prime element, i.e., second element of a lattice module.

Definition 2. $0_M \neq N \in M$ is called second element in M , if for each $a \in L, aN = N$ or $aN = 0_M$. In particular, if 1_M is a second element, M is called second.

Proposition 1. *If N is second, $(0_M :_L N) = p$ is prime. Conversely, if $(0_M :_L N) = p$ is prime for $N \in M$ and M is comultiplication, then N is second.*

Proof. Suppose that $N \in M$ is second and $p = (0_M :_L N)$. Let $ab \leq p$ and $b \not\leq p$. Then $bN \neq 0_M$. Since N is a second element, we have $bN = N$. Then $0_M = (ab)N = a(bN) = aN$. Therefore, $a \leq p = (0_M :_L N)$.

Assume M is comultiplication and $p = (0_M :_L N)$ is prime for $N \in M$. Suppose that $aN \neq 0_M$ for $a \in L$. Then $0_M \neq K = aN \leq N$. If $0_M \neq K = aN < N = (0_M :_M (0_M :_L N)) = (0_M :_M p)$, then by Theorem 1(2), there exists an element $b \in L$ such that $p < b$ and $K = aN = (0_M :_M b)$. It follows that $baN = 0_M$, and so $ba \leq p = (0_M :_L N)$. Since p is prime and $b \not\leq p$, we have $a \leq p$ and so $aN = 0_M$. This is a contradiction. So $K = aN = N$. Consequently N is a second element in L -module M . \square

Now, let us introduce the notion of coprime elements in a lattice module.

Definition 3. $0_M \neq N \in M$ is called a coprime element if $(0_M :_L N) = (K :_L N)$ for all $K \in M, K < N$. In particular, if 1_M is a coprime element, then we say that M is a coprime module.

One can easily see that 1_M is a coprime element in M necessary and sufficient condition $(N :_L 1_M) = (0_M :_L 1_M)$ for any $N \in M$ such that $N < 1_M$.

Owing to the following proposition, one can see that the concepts of second element and coprime element in a lattice module are equivalent.

Proposition 2. $K \in M$ is a coprime element $\Leftrightarrow K$ is a second element.

Proof. Suppose that K is a coprime element in M . Let $aK < K$ for some $a \in L$. Since K is a coprime element we have $a \leq (aK :_L K) = (0_M :_L K)$ and so $aK = 0_M$. Conversely, if K is a second element, then we show that $(N :_L K) = (0_M :_L K)$, for all $N < K$. It is clear that $(0_M :_L K) \leq (N :_L K)$. If $a \leq (N :_L K)$, then we have $aK \leq N < K$. Since K is a second element, then $aK = 0_M$ and $a \leq (0_M :_L K)$. \square

Proposition 3. *Suppose M is coprime. Then $N < 1_M$ is primary $\Leftrightarrow N$ is prime.*

Proof. \Rightarrow : Assume that M is a coprime L -lattice module. Thus $(0_M : 1_M) = (N : 1_M) = p$ is prime by Proposition 1. Since $(N : 1_M) = p$ is prime, if N is a primary element, we obtain N is prime (See Proposition 1 in [5]).

\Leftarrow : Obvious. □

3. Pure Elements in Lattice Modules

Before the definition of the pure element, let us recall some information:

Note that an element $H \in M$ is said to be multiplication if given an element N of M such that $N \leq H$, there exists $x \in L$ such that $N = xH$. In particular, if we consider L as a module over itself, an element $x \in L$ is said to be multiplication if given an element y of L such that $y \leq x$, there exists $z \in L$ such that $y = zx$. It is clear that if 1_M is multiplication, then L -module M is multiplication.

Now, let us define the pure elements in lattice module as the following:

Definition 4. An element $0_M \neq N < 1_M$ in M is called a pure element, if $aN = a1_M \wedge N$, for all $a \in L$. In particular, if we consider L as a module over itself, $c < 1_L$ in L is called a pure element if $ac = a \wedge c$, for $\forall a \in L$.

Theorem 2. *M is coprime with $(0_M :L 1_M) = p \Leftrightarrow [0_M, N]$ and $[N, 1_M]$ are coprime L -lattice modules with $(0_M :L N) = (N :L 1_M) = p$, for all pure elements $N \in M$.*

Proof. \Rightarrow : Let N be pure. As M is second, $a1_M = 0_M$ or $a1_M = 1_M$ for all $a \in L$. If $a1_M = 0_M$, then $aN = a1_M \wedge N = 0_M$ and if $a1_M = 1_M$, then $aN = a1_M \wedge N = N$. Hence N is second (coprime) and $[0_M, N]$ is a coprime L -module.

We shall show that $(0_M :L N) = (0_M :L 1_M) = p$. Clearly, $(0_M :L 1_M) \leq (0_M :L N)$. It is sufficient to show that $(0_M :L N) \leq (0_M :L 1_M)$. Let $aN = 0_M$ for $a \in L$. If $a1_M \neq 0_M$, then $a1_M = 1_M$, because M is coprime. Hence $aN = 0_M = a1_M \wedge N = N$, as N is pure. But this is a contradiction because N is pure, so $N \neq 0_M$. Therefore $a1_M = 0_M$. It follows that $(0_M :L N) \leq (0_M :L 1_M)$. Also, as M is coprime, one has $(0_M :L 1_M) = (N :L 1_M) = p$ for all $N \in M, N < 1_M$. So we obtain that $(0_M :L N) = (0_M :L 1_M) = p$.

We prove that $[N, 1_M]$ is a coprime L -module. For all $N \leq K$, $a.K$ is defined by $a.K = aK \vee N$ in the module $[N, 1_M]$. Since M is a coprime L -module, $a1_M = 1_M$ or $a1_M = 0_M$. Hence $a.1_{[N, 1_M]} = a.1_M = a1_M \vee N = 1_M$ or $a.1_{[N, 1_M]} = a.1_M = a1_M \vee N = N = 0_{[N, 1_M]}$. Therefore $[N, 1_M]$ is coprime.

\Leftarrow : Suppose $[0_M, N]$ and $[N, 1_M]$ are coprime L -modules for all pure element $N \in M$ with $(0_M :L N) = (N :L 1_M) = p$. We show that $(0_M :L 1_M) = p$. Clearly, $(0_M :L 1_M) \leq (0_M :L N) = p$. Conversely, if

$a \leq (0_M :L N) = (N :L 1_M) = p$, we have $aN = 0_M$ and $a1_M \leq N$. Hence $0_M = aN = a1_M \wedge N = a1_M$, i.e., $a \leq (0_M :L 1_M)$.

We show M is coprime. If $N \leq K < 1_M$, as $[N, 1_M]$ is coprime, one has $(N :L 1_M) = p = (K :L 1_M)$. If $N \not\leq K$ for $K \wedge N < N$, since $[0_M, N]$ is coprime, one has $(0_M :L N) = p = (K \wedge N :L N) = (K :L N) \geq (K :L 1_M) \geq (0_M :L 1_M) = p$. Thus $p = (0_M :L 1_M) = (K :L 1_M)$ for all $K < 1_M$. □

Proposition 4. *$a \in L$ is pure in $L \Leftrightarrow b = ab$ for any element $b \in L$ such that $b \leq a$.*

Proof. \Rightarrow : Let $b \in L$ such that $b \leq a$. Since a is a pure element of L , we have $ab = a \wedge b = b$.

\Leftarrow : Let $b = ab$ for any element $b \in L$ such that $b \leq a$. Since $a \wedge c \leq a$ for all $c \in L$, $a \wedge c = a(a \wedge c) \leq ac \leq a \wedge c$. So, we have $a \wedge c = ac$ for all $c \in L$. □

Proposition 5. *$a \in L$ is pure in $L \Leftrightarrow a$ is multiplication and idempotent in L .*

Proof. \Rightarrow : Let a be pure in L . Since a is pure for any element b of L such that $b \leq a$, we have $b = ab$. In particular for $a, b \in L$ such that $a = b$, we have $a^2 = a$.

\Leftarrow : Let a be a multiplication and idempotent element of L . Let b be an element of L such that $b \leq a$. Since a is multiplication element of L then there exists $c \in L$ such that $b = ac$. Because a is an idempotent element, we have $b = ac = a^2c = a(ac) = ab$. □

Theorem 3. *Assume that L is PG and M is faithful multiplication PG such that 1_M is compact. Then $H \in M$ is pure $\Leftrightarrow (H :L 1_M)$ is a pure element of L .*

Proof. \Rightarrow : Suppose that H is a pure element of M . Therefore $xH = x1_M \wedge H$ for every element $x \in L$. And so,

$$\begin{aligned} (xH :L 1_M) &= (x1_M \wedge H :L 1_M) \\ &= (x1_M :L 1_M) \wedge (H :L 1_M) = x \wedge (H :L 1_M). \end{aligned}$$

Since M is a multiplication lattice module, there is $y \in L$ such that $H = y1_M$. Then,

$$(xH :L 1_M) = (xy1_M :L 1_M) = xy = x(H :L 1_M).$$

Hence, one has $x \wedge (H :L 1_M) = x(H :L 1_M)$, i.e. $(H :L 1_M)$ is pure in L .

\Leftarrow : Assume $(H :L 1_M)$ is pure. We show that $xH = x1_M \wedge H$ for every $x \in L$. Because 1_M is compact (see [6], Proposition 2ii), then

$$\begin{aligned} (x1_M \wedge H :L 1_M) &= (x1_M :L 1_M) \wedge (H :L 1_M) \\ &= x \wedge (H :L 1_M) = x(H :L 1_M). \end{aligned}$$

Since M is a multiplication lattice module, there is $y \in L$ such that $H = y1_M$. Similarly, as 1_M is compact (see [6], Proposition 2ii),

$$\begin{aligned} x(H :L 1_M) &= x(y1_M :L 1_M) = xy \\ &= (xy1_M :L 1_M) = (xH :L 1_M). \end{aligned}$$

As M is PG, faithful, multiplication such that 1_M is compact, one obtains $x1_M \wedge H = xH$ (see [5], Theorem 5ii). \square

Finally, with the next Corollary, the relation among pure, idempotent and multiplication elements is obtained under some conditions.

Corollary 1. *Assume that L is PG and M is faithful multiplication PG such that 1_M is compact. For $x \in L$, the following statements are equivalent:*

1. $N = x1_M$ is a pure element in M .
2. $x = (N :_L 1_M)$ is a pure element in L .
3. $x = (N :_L 1_M)$ is a multiplication and idempotent element in L .
4. $N = x1_M$ is idempotent and multiplication.

Proof. (1) \Leftrightarrow (2) is clear by the previous Theorem.

(2) \Leftrightarrow (3) is clear by Proposition 5.

(3) \Rightarrow (4) Suppose $x = (N :_L 1_M)$ is multiplication. Then $x1_M$ is multiplication in M (see [5], Proposition 2iv). Suppose that $x = (N :_L 1_M)$ is an idempotent element in L . We will show that $N = x1_M$ is idempotent, i.e. $(N : 1_M)N = N$. Since M is a multiplication lattice and x is idempotent, one has

$$\begin{aligned} (N : 1_M)N &= (x1_M :_L 1_M)x1_M \\ &= x(x1_M :_L 1_M)1_M = x^2 1_M = x1_M = N. \end{aligned}$$

(4) \Rightarrow (3) Suppose that $N = x1_M$ is multiplication in M . Then $x = (N :_L 1_M)$ is multiplication in L (see [5], Proposition 2iv).

Suppose that $N = x1_M$ is an idempotent element. Hence, $(N : 1_M)N = N$ for $N \in M$. Then,

$$\begin{aligned} N &= x1_M = (x1_M : 1_M)x1_M \\ &= x(x1_M : 1_M)1_M = x^2 1_M. \end{aligned}$$

Since 1_M is compact, we obtain $x^2 = x$ (see [5], Theorem 5ii). \square

4. Conclusion

The study gives us the definitions of second, coprime and pure elements in lattices (similarly, in lattice modules). Then it is obtained that in a lattice module the concept of

second element is equivalent to the concept of coprime element. Moreover, it is shown that if M is coprime, then N is primary $\Leftrightarrow N$ is prime. Under some particular conditions in Theorem 3, it is proved that N is a pure element of $M \Leftrightarrow (N :_L 1_M)$ is a pure element of L . Consequently, the relationship among pure, multiplication and idempotent elements in lattice and lattice modules is obtained.

Acknowledgment

The author thanks to Prof. Dr. Fethi Callialp for his support and the inspiration of the paper.

References

- [1] Ansari-Toroghy, H. and Farshadifar, F. 2007. The dual notion of multiplication module. Taiwanese Journal of Math., 11(4)(2007), 1189-1201.
- [2] Ansari-Toroghy, H. and Farshadifar, F. 2008. On comultiplication modules. Korean Ann. Math. 25(2008), 57-66.
- [3] Ansari-Toroghy, H. and Farshadifar, F. 2011. On Multiplication and comultiplication modules. Acta Mathematica Scientia, 31B(2)(2011), 694-700.
- [4] Ansari-Toroghy, H. and Farshadifar, F. 2012. On the dual notion of prime submodules. Algebras Colloquium, 19(2012), (Spec 1), 1109-1116.
- [5] Callialp, F. and Tekir, U. 2011. Multiplication lattice modules. Iranian Journal of Science & Technology, 4 (2011), 309-313.
- [6] Callialp, F., Tekir, U. and Aslankarayigit, E. 2014. On multiplication lattice modules. Hacettepe Journal of Mathematics and Statistics, 43(4)(2014), 571-579.
- [7] Callialp, F., Tekir, U. and Ulucak, G. 2015. Comultiplication lattice modules. Iranian Journal of Science and Technology, 39A2(2015), 213-220.
- [8] M. M., Ali and Khalaf, R. I. 2010. Dual notions of prime modules. Ibn al-Haitham Journal for Pure and Appl. Sci., 23(2010), 226-237.
- [9] Ali, M. M. and Smith, D. J. 2002. Projective, flat and multiplication modules. New Zeland Journal of Math., 31(2002), 115-125.
- [10] Ali, M. M. and Smith, D. J. 2004. Pure submodules of multiplication modules. Beitrage zur Algebra and Geometrie, 45(1)(2004), 61-74.
- [11] Smith, P. F. 1988. Some remarks on multiplication modules. Arch. der Math., 50(1988), 213-235.

Lucas Polynomial Approach for Second Order Nonlinear Differential Equations

Sevin GÜMGÜM^{*1}, Nurcan BAYKUŞ SAVAŞANERİL², Ömür Kıvanç KÜRKCÜ¹, Mehmet SEZER³

¹İzmir University of Economics, Faculty of Arts and Sciences, Department of Mathematics, 35330, İzmir, Turkey
(ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0594-2377>), (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3987-7171>)

²Dokuz Eylül University, İzmir Vocational School, İzmir, Turkey
(ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3098-2936>)

³Manisa Celal Bayar University, Faculty of Science and Letters, Department of Mathematics, 45110, Manisa, Turkey
(ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7744-2574>)

(Alınış / Received: 29.03.2019, Kabul / Accepted: 15.02.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Keywords

Lucas polynomial,
Operational matrices,
Collocation points

Abstract: This paper presents the Lucas polynomial solution of second-order nonlinear ordinary differential equations with mixed conditions. Lucas matrix method is based on collocation points together with truncated Lucas series. The main advantage of the method is that it has a simple structure to deal with the nonlinear algebraic system obtained from matrix relations. The method is applied to four problems. In the first two problems, exact solutions are obtained. The last two problems, Bratu and Duffing equations are solved numerically; the results are compared with the exact solutions and some other numerical solutions. It is observed that the application of the method results in either the exact or accurate numerical solutions.

İkinci Mertebeden Doğrusal Olmayan Diferansiyel Denklemler için Lucas Polinom Yaklaşımı

Anahtar Kelimeler

Lucas polinomu,
İşlevsel matrisler,
Sıralama noktaları

Özet: Bu makale, karışık koşullar altında ikinci mertebeden doğrusal olmayan adi diferansiyel denklemlerin Lucas polinom çözümünü oluşturur. Lucas matris yöntemi sıralama noktaları ile birlikte sınırlandırılmış Lucas serisine dayanmaktadır. Yöntemin en büyük avantajı matris bağıntılarında elde edilen doğrusal olmayan cebirsel sistemi ele almak için basit bir yapıya sahip olmasıdır. Yöntem dört probleme uygulanır. İlk iki problemde, tam çözümler elde edilir. Son iki problemde Bratu ve Duffing denklemleri sayısal olarak çözülür; sonuçlar, tam çözümler ve diğer bazı sayısal çözümler ile karşılaştırılır. Yöntemin uygulanması, tam ve doğru sayısal çözümler vermesine yol açtığı gözlemlenmektedir.

1. Introduction

Nonlinear ordinary differential equations play an important role in many physical phenomena such as chemical reactions [1], spring-mass systems [2, 3], quantum physics [4], analytical chemistry [5], astronomy [6] and biology [7]. From last decade, researchers pay attention towards analytical and numerical solutions of nonlinear ordinary differential equations. However there is a stiff problem while solving nonlinear equations analytically. Thus, the importance of numerical solutions increase day by day. The Bratu equation arises in the fuel ignition of the thermal combustion theory, radiative heat transfer, and the Chandrasekhar model of the expansion of the universe [10, 11, 13]. Wazwaz [13] studied Adomian decomposition method for a reliable treatment of the Bratu-type equations; in this study, exact solutions of Bratu-type equations are presented. In another study, restarted Adomian's decomposition method is used the approximate the analytical solution by Vahidi and Hasanzade [14]. Several

numerical techniques, such as the finite difference method [15], weighted residual method [12], the shooting method [10], decomposition technique [16], Legendre wavelets [17], wavelet analysis method [18], B-spline method [19], Jacobi-Gauss collocation method [20], Laplace transform decomposition method [21], He's variational iteration [22, 23], have been implemented to solve the Bratu model numerically.

On the other hand, Duffing model [24] arises in several scientific fields such as classical oscillator in chaotic systems, non-uniformity caused by an infinite domain, nonlinear mechanical oscillators, magnetic-pliancy mechanical systems, nonlinear vibration of beams and plates, prediction of diseases. Duffing equation occurs as a result of the motion of a body subjected to a nonlinear spring power, linear sticky damping, and periodic powering [25]. A variety of numerical methods such as the improved Taylor matrix method [26], generalized differential quadrature rule [27], shifted Chebyshev polynomials [28], Daftardar-Jafari (DJM) method [25], Runge-Kutta-Fehleberg algorithm

* Corresponding author: sevin.gumgum@ieu.edu.tr

[29], Laplace decomposition algorithm [30] are used to obtain numerical solutions of this equation.

In this study, Lucas matrix method is applied for solving the second-order ordinary differential equations with nonlinear terms, namely the Ricatti, Bratu and Duffing equations. To the best knowledge of author's this is the first application of the Lucas polynomial solution for both Bratu and Duffing equations.

2. Fundamentals of the Numerical Method

A general class of second-order nonlinear ordinary differential equation can be expressed as

$$\sum_{k=0}^2 P_k(x)y^{(k)}(x) + \sum_{p=0}^2 \sum_{q=0}^p Q_{pq}(x)y^{(p)}(x)y^{(q)}(x) = g(x), \tag{1}$$

with the initial conditions

$$\sum_{k=0}^1 a_{kj}y^{(k)}(a) = \lambda_j, j = 0, 1. \tag{2}$$

where the functions $P_k(x)$, $Q_{pq}(x)$, $y(x)$ and $g(x)$ are defined on $[a, b]$.

The function $y(x)$ is approximated by an N^{th} order polynomial such as

$$y(x) \cong y_N(x) = \sum_{n=0}^N a_n L_n(x) \tag{3}$$

where a_n 's are the unknown coefficients to be determined and $L_n(x)$'s are the Lucas polynomials defined as follows [31, 32].

$$L_n(x) = \sum_{k=0}^{\lfloor \frac{n}{2} \rfloor} \frac{n}{n-k} \binom{n-k}{k} x^{n-2k}$$

Our aim is to seek the approximate Lucas solution of Eq. 1, which can be expressed in matrix form (see [8, 9])

$$y(x) \cong y_N(x) = \mathbf{L}(x)\mathbf{A} \tag{4}$$

where

$$\mathbf{L}(x) = [L_0(x) \quad L_1(x) \quad \cdots \quad L_N(x)]$$

and

$$\mathbf{A} = [a_0 \quad a_1 \quad \cdots \quad a_N]^T.$$

The matrix form $\mathbf{L}(x)$ is

$$\mathbf{L}(x) = \mathbf{T}(x)\mathbf{M}^T. \tag{5}$$

where $\mathbf{T}(x) = [1 \quad x \quad \cdots \quad x^N]$ and \mathbf{M} is a nonsingular matrix given as in [8, 9].

Substituting Eq. 5 into Eq. 4 yields

$$y_N(x) = \mathbf{T}(x)\mathbf{M}^T\mathbf{A}.$$

In order to find the k^{th} derivative of the above equation, we use the relation

$$\mathbf{L}^{(k)}(x) = \mathbf{L}(x)\mathbf{S}^k \tag{6}$$

where $\mathbf{S} = (\mathbf{M}^T)^{-1}\mathbf{B}\mathbf{M}^T$,

$$\mathbf{S}^0 = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & 1 & 0 & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & 1 & \cdots & 0 \end{bmatrix},$$

$$\mathbf{B} = \begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & 0 & 2 & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & \cdots & N \\ 0 & 0 & 0 & \cdots & 0 \end{bmatrix}.$$

The relation in Eq. 6 enables to approximate the derivatives of the solution as

$$y^{(k)}(x) \cong y_N^{(k)}(x) = \mathbf{L}(x)\mathbf{S}^k\mathbf{A} \quad k = 0, 1, 2, \dots, m. \tag{7}$$

In addition, by Eq. 7, we can easily present the matrix forms of the expressions

$$\begin{aligned} & \left(y^{(0)}(x)\right)^2, y^{(1)}(x)y^{(0)}(x), \left(y^{(1)}(x)\right)^2, y^{(2)}(x)y^{(1)}(x), \\ & y^{(2)}(x)y^{(0)}(x), \left(y^{(2)}(x)\right)^2 \end{aligned}$$

similarly as follows

$$\begin{aligned} \left(y^{(0)}(x)\right)^2 &= \mathbf{L}(x)\overline{\mathbf{L}}(x)\overline{\mathbf{A}} \\ y^{(1)}(x)y^{(0)}(x) &= \mathbf{L}(x)\mathbf{S}\overline{\mathbf{L}}(x)\overline{\mathbf{A}} \\ \left(y^{(1)}(x)\right)^2 &= \mathbf{L}(x)\mathbf{S}\overline{\mathbf{L}}(x)\overline{\mathbf{S}}\overline{\mathbf{A}} \\ y^{(2)}(x)y^{(1)}(x) &= \mathbf{L}(x)\mathbf{S}^2\overline{\mathbf{L}}(x)\overline{\mathbf{S}}\overline{\mathbf{A}} \\ y^{(2)}(x)y^{(0)}(x) &= \mathbf{L}(x)\mathbf{S}^2\overline{\mathbf{L}}(x)\overline{\mathbf{A}} \end{aligned} \tag{8}$$

$$\left(y^{(2)}(x)\right)^2 = \mathbf{L}(x)\mathbf{S}^2\overline{\mathbf{L}}(x)\overline{\mathbf{S}^2}\overline{\mathbf{A}}$$

where

$$\overline{\mathbf{L}}(x) = \text{diag} [\mathbf{L}(x)]_{(N+1) \times (N+1)^2},$$

$$\overline{\mathbf{S}} = \text{diag} [\mathbf{S}]_{(N+1)^2 \times (N+1)^2},$$

$$\overline{\mathbf{S}^2} = \text{diag} [\mathbf{S}^2]_{(N+1)^2 \times (N+1)^2}$$

$$\mathbf{A} = [a_0 \quad a_1 \quad \cdots \quad a_N]^T,$$

$$\overline{\mathbf{A}} = [a_0\mathbf{A} \quad a_1\mathbf{A} \quad \cdots \quad a_N\mathbf{A}]^T, .$$

Substituting the collocation points

$$x_i = a + \frac{b-a}{N}i, i = 0, 1, \dots, N$$

into Eq. 1 gives

$$\sum_{k=0}^2 P_k(x_i)y^{(k)}(x) + \sum_{p=0}^2 \sum_{q=0}^p Q_{pq}(x_i)y^{(p)}(x_i)y^{(q)}(x_i) = g(x_i),$$

which can be written in matrix form as

$$\sum_{k=0}^2 \mathbf{P}_k \mathbf{Y}^{(k)} + \sum_{p=0}^2 \sum_{q=0}^p Q_{pq} \mathbf{Y}^{(p,q)} = \mathbf{G} \quad (9)$$

where

$$\mathbf{P}_k = \text{diag} [P_k(x_0) \quad P_k(x_1) \quad \dots \quad P_k(x_N)]$$

and

$$\mathbf{Y}^{(k)} = \begin{bmatrix} y^{(k)}(x_0) \\ y^{(k)}(x_1) \\ \vdots \\ y^{(k)}(x_N) \end{bmatrix}, \mathbf{Y}^{(p,q)} = \begin{bmatrix} y^{(p)}(x_0)y^{(q)}(x_0) \\ y^{(p)}(x_1)y^{(q)}(x_1) \\ \vdots \\ y^{(p)}(x_N)y^{(q)}(x_N) \end{bmatrix},$$

$$\mathbf{G} = \begin{bmatrix} g(x_0) \\ g(x_1) \\ \vdots \\ g(x_N) \end{bmatrix}.$$

When we insert the collocation points into each equation in Eq. 9, we can write the matrices $\mathbf{Y}^{(0,0)}, \mathbf{Y}^{(1,0)}, \mathbf{Y}^{(1,1)}, \mathbf{Y}^{(2,0)}, \mathbf{Y}^{(2,1)}$ and $\mathbf{Y}^{(2,2)}$ as follows

$$\mathbf{Y}^{(0,0)} = \mathbf{L}_{0,0}^* \bar{\mathbf{A}}, \mathbf{Y}^{(1,0)} = \mathbf{L}_{1,0}^* \bar{\mathbf{A}}, \mathbf{Y}^{(1,1)} = \mathbf{L}_{1,1}^* \bar{\mathbf{A}} \quad (10)$$

$$\mathbf{Y}^{(2,0)} = \mathbf{L}_{2,0}^* \bar{\mathbf{A}}, \mathbf{Y}^{(2,1)} = \mathbf{L}_{2,1}^* \bar{\mathbf{A}}, \mathbf{Y}^{(2,2)} = \mathbf{L}_{2,2}^* \bar{\mathbf{A}}$$

where

$$\mathbf{L}_{0,0}^* = \begin{bmatrix} L(x_0)\overline{L(x_0)} \\ L(x_1)\overline{L(x_1)} \\ \vdots \\ L(x_N)\overline{L(x_N)} \end{bmatrix}, \mathbf{L}_{1,0}^* = \begin{bmatrix} L(x_0)\overline{SL(x_0)} \\ L(x_1)\overline{SL(x_1)} \\ \vdots \\ L(x_N)\overline{SL(x_N)} \end{bmatrix},$$

$$\mathbf{L}_{1,1}^* = \begin{bmatrix} L(x_0)\overline{SL(x_0)\overline{S}} \\ L(x_1)\overline{SL(x_1)\overline{S}} \\ \vdots \\ L(x_N)\overline{SL(x_N)\overline{S}} \end{bmatrix}, \mathbf{L}_{2,0}^* = \begin{bmatrix} L(x_0)\overline{S^2L(x_0)} \\ L(x_1)\overline{S^2L(x_1)} \\ \vdots \\ L(x_N)\overline{S^2L(x_N)} \end{bmatrix},$$

$$\mathbf{L}_{2,1}^* = \begin{bmatrix} L(x_0)\overline{S^2L(x_0)\overline{S}} \\ L(x_1)\overline{S^2L(x_1)\overline{S}} \\ \vdots \\ L(x_N)\overline{S^2L(x_N)\overline{S}} \end{bmatrix},$$

$$\mathbf{L}_{2,2}^* = \begin{bmatrix} L(x_0)\overline{S^2L(x_0)\overline{S^2}} \\ L(x_1)\overline{S^2L(x_1)\overline{S^2}} \\ \vdots \\ L(x_N)\overline{S^2L(x_N)\overline{S^2}} \end{bmatrix}$$

3. Application of the Numerical Method

The fundamental matrix equation derived from Eq. 1 can be stated by substituting the matrix relations in Eq. 7 and Eq. 10 into Eq. 9 as

$$\sum_{k=0}^2 \mathbf{P}_k \mathbf{L} \mathbf{S}^k \mathbf{A} + \sum_{p=0}^2 \sum_{q=0}^p \mathbf{Q}_{pq} \mathbf{L}_{p,q}^* \bar{\mathbf{A}} = \mathbf{G}$$

which can also be expressed as

$$\mathbf{W} \mathbf{A} + \mathbf{V} \bar{\mathbf{A}} = \mathbf{G} \quad (11)$$

where

$$\mathbf{W} = [w_{ij}] = \sum_{k=0}^2 \mathbf{P}_k \mathbf{L} \mathbf{S}^k; i, j = 0, 1, \dots, N$$

$$\mathbf{V} = [v_{ij}] = \sum_{p=0}^2 \sum_{q=0}^p \mathbf{Q}_{pq} \mathbf{L}_{p,q}^*; i = 0, 1, \dots, N,$$

$$j = 0, 1, \dots, (N+1)^2$$

The augmented matrix of the equation 11 is

$$[\mathbf{W}; \mathbf{V}; \mathbf{G}] \quad (12)$$

Following the same procedure the matrix equation for the initial conditions given in Eq. 2 can be written as

$$\mathbf{U} \mathbf{A} + \mathbf{O}^* \bar{\mathbf{A}} = \lambda$$

where

$$\mathbf{U} = [u_{j0} \quad u_{j1} \quad \dots \quad u_{jN}]$$

$$= \sum_{k=0}^1 (a_{kj} \mathbf{L}(a) + b_{kj} \mathbf{L}(b) + c_{kj} \mathbf{L}(c)) \mathbf{S}^k, j = 0, 1,$$

$\lambda = [\lambda_0 \quad \lambda_1]^T$ and \mathbf{O}^* is the zero matrix in the form

$$\mathbf{O}^* = [0 \quad 0 \quad \dots \quad 0]_{2 \times (N+1)^2}.$$

The augmented form of the above equation is

$$[\mathbf{U} \quad ; \quad \mathbf{O}^* \quad ; \quad \lambda] \quad (13)$$

Consequently, to find Lucas coefficients $a_n, (n = 0, 1, \dots, N)$, by replacing the two row matrices 12 by the last 2 rows (or any two rows) of the augmented matrix 13, we obtain the resulting matrix

$$[\widetilde{\mathbf{W}}; \widetilde{\mathbf{V}}; \widetilde{\mathbf{G}}]$$

4. Numerical examples and Discussion

In this section, four stiff problems are considered. In the first two problems the exact solutions are obtained. The third problem is the Bratu equation and the last one is the Duffing equation which are both solved numerically and compared with other numerical results where available.

Problem 1: As a first example, we consider the following nonlinear ordinary differential equation

$$y''(x) + 2y'(x) + y(x) + y^2(x) - y''(x)y'(x) = x^2 + x + 2$$

with the initial conditions $y(0) = 0$ and $y'(0) = 1$.

In this problem, $P_0(x) = 1$, $P_1(x) = 2$, $P_2(x) = 1$, $Q_{00}(x,y) = 1$, $Q_{21}(x,y) = -1$, $g(x) = x^2 + x + 2$ when $a = 0$, $b = 1$ and $N = 2$, the collocation points are computed as $\{x_0 = 0, x_1 = 1/2, x_2 = 1\}$. Application of the method gives the fundamental matrix equation of the considered problem as

$$W = \sum_{k=0}^2 P_k L S^k A = P_0 L S^0 A + P_1 L S^1 A + P_2 L S^2 A$$

where

$$L = \begin{bmatrix} 2 & 0 & 2 \\ 2 & \frac{1}{2} & \frac{9}{4} \\ 2 & 1 & 3 \end{bmatrix}, P_0 = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix},$$

$$P_1 = \begin{bmatrix} 2 & 0 & 0 \\ 0 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & 2 \end{bmatrix}, P_2 = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix},$$

$$S^0 = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}, S^1 = \begin{bmatrix} 0 & \frac{1}{2} & 0 \\ 0 & 0 & 2 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix},$$

$$S^2 = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

and hence

$$W = \begin{bmatrix} 2 & 2 & 4 \\ 2 & \frac{5}{2} & \frac{25}{2} \\ 2 & 3 & 9 \end{bmatrix}$$

Let us now prepare

$$V = Q_{00} L_{0,0}^* + Q_{21} L_{2,1}^*$$

Recall that

$$L_{0,0}^* = \begin{bmatrix} 4 & 0 & 4 & 0 & 0 & 0 & 4 & 0 & 4 \\ 4 & 1 & \frac{9}{2} & 1 & \frac{1}{4} & \frac{9}{8} & \frac{9}{2} & \frac{9}{8} & \frac{81}{16} \\ 4 & 2 & 6 & 2 & 1 & 3 & 6 & 3 & 9 \end{bmatrix},$$

and

$$L_{2,1}^* = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 2 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 4 \end{bmatrix}.$$

Thus, the matrix V is obtained as

$$V = \begin{bmatrix} 4 & 0 & 4 & 0 & 0 & 0 & 4 & -2 & 4 \\ 4 & 1 & \frac{9}{2} & 1 & \frac{1}{4} & \frac{9}{8} & \frac{9}{2} & -\frac{7}{8} & \frac{49}{16} \\ 4 & 2 & 6 & 2 & 1 & 3 & 6 & 1 & 5 \end{bmatrix}$$

The augmented matrix of the equation $WA + \bar{V}A = G$ is

$$\begin{bmatrix} \bar{W} & ; & \bar{V} & ; & \bar{G} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 2 & 2 & 4 & ; & 4 & 0 & 4 & 0 & 0 & 0 & 4 & -2 & 4 & : & 2 \\ 2 & 0 & 2 & ; & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & : & 0 \\ 0 & 1 & 0 & ; & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & : & 1 \end{bmatrix}$$

where

$$y(0) = 0 \Rightarrow y(0) = L(0)A = 0$$

$$y'(0) = 1 \Rightarrow y'(0) = L(0)SA = 1$$

and

$$\begin{bmatrix} 2 & 0 & 2 \end{bmatrix} A = 0 \Rightarrow \begin{bmatrix} 2 & 0 & 2 & ; & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & ; & 0 \end{bmatrix}$$

$$\begin{bmatrix} 2 & 0 & 2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 0 & \frac{1}{2} & 0 \\ 0 & 0 & 2 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} A = 1 \Rightarrow \begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 & ; & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & ; & 1 \end{bmatrix}$$

Solving this system, A is obtained as $A = [0 \ 1 \ 0]^T$
From Eq. 4, $y(t)$ is obtained as

$$y(x) = L(t) A = [2 \ x \ x^2 + 2] \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \\ 0 \end{bmatrix}.$$

Thus, the solution of the problem appears as

$$y(x) = x,$$

which is the exact solution which shows that the present method is accurate, efficient and applicable.

Problem 2: The second example is the well known Riccati equation

$$y'(x) - 3y(x) + e^{-x}y^2(x) = -e^x$$

$$y(0) = 0.$$

In this problem,

$$\begin{cases} P_0(x) = -3, & P_1(x) = 1, \\ Q_{00}(x,y) = e^{-x}, \\ g(x) = -e^x \end{cases}$$

and the collocation points when $a = 0$, $b = 1$ and $N = 2$ are computed as $\{x_0 = 0, x_1 = 1/2, x_2 = 1\}$.

The fundamental matrix equation of the given equation is

$$W = \sum_{k=0}^1 P_k L S^k A = P_0 L S^0 A + P_1 L S^1 A$$

where

$$\mathbf{L} = \begin{bmatrix} 2 & 0 & 2 \\ 2 & \frac{1}{2} & \frac{9}{4} \\ 2 & 1 & 3 \end{bmatrix}, \mathbf{P}_0 = \begin{bmatrix} -3 & 0 & 0 \\ 0 & -3 & 0 \\ 0 & 0 & -3 \end{bmatrix},$$

$$\mathbf{P}_1 = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}, \mathbf{S}^0 = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix},$$

$$\mathbf{S}^1 = \begin{bmatrix} 0 & \frac{1}{2} & 0 \\ 0 & 0 & 2 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}, \mathbf{S}^2 = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

and hence, \mathbf{W} is computed as

$$\mathbf{W} = \begin{bmatrix} -6 & 1 & -6 \\ -6 & \frac{-1}{2} & \frac{-23}{4} \\ 6 & -2 & -7 \end{bmatrix}.$$

\mathbf{V} is easily obtained via

$$\mathbf{V} = \mathbf{Q}_{00}\mathbf{L}_{0,0}^*$$

$$\mathbf{Q}_{00} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & e^{-\frac{1}{2}} & 0 \\ 0 & 0 & e^{-1} \end{bmatrix},$$

$$\mathbf{L}_{0,0}^* = \begin{bmatrix} 4 & 0 & 4 & 0 & 0 & 0 & 4 & 0 & 4 \\ 4 & 1 & \frac{9}{2} & 1 & \frac{1}{4} & \frac{9}{8} & \frac{9}{2} & \frac{9}{8} & \frac{81}{16} \\ 4 & 2 & 6 & 2 & 1 & 3 & 6 & 3 & 9 \end{bmatrix}$$

After solving the augmented matrix of the equation, \mathbf{A} yields $\mathbf{A} = [0 \ 1 \ 1/2]^T$. From Eq. 4, $y(t)$ is obtained as

$$y(x) = \mathbf{L}(t) \mathbf{A} = [2 \ x \ x^2 + 2] \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \\ \frac{1}{2} \end{bmatrix} = 1 + x + \frac{x^2}{2} \cong e^x$$

Thus, the solution of the problem becomes $y(x) = e^x$, which is the exact solution.

Problem 3: We considered the classical Bratu’s problem [16]

$$y''(x) + \lambda e^{y(x)} = 0, \quad 0 < x < 1$$

$$y(0) = y(1) = 0$$

which has the exact solution for $\lambda > 0$, $y(x) = -2 \ln \left[\frac{\cosh((x-1/2)\theta/2)}{\cosh(\theta/4)} \right]$, where θ is the solution of $\theta = \sqrt{2\lambda} \cosh(\theta/4)$.

The problem is solved by taking $N = 4$ and $\lambda = 1$. The nonlinear term e^y is approximated by $1 + y + \frac{y^2}{2}$. Table 1 presents the comparison of our method with the exact solution and Decomposition Method (DM) with $N = 6$, [16] at some particular points. One can see that the numerical solutions obtained by the present method using a fourth order polynomial has an accuracy up to four decimal places. On the other hand, the solutions obtained from Adomian

Decomposition method using a sixth order polynomial has an accuracy only up to third order decimal place except for two points. Thus, we can say that the present method is more effective since it enables us to solve the problem with a better accuracy by using a less order polynomial.

Table 1. Comparison of the present method (PM) with the exact solution (ES) and Decomposition method (DM) [16]

x_i	ES	PM, $N = 4$	DM, $N = 6$ [16]	$ e_4(x_i) $	$ e_6(x_i) $ [16]
0.1	0.049847	0.049517	0.047162	3.30e-04	2.69e-03
0.2	0.089190	0.088587	0.87168	6.03e-04	2.02e-03
0.3	0.117609	0.117694	0.117761	8.15e-04	1.52e-04
0.4	0.134790	0.133838	0.136992	9.53e-04	2.20e-03
0.5	0.140539	0.139540	0.143555	9.99e-04	3.02e-03
0.6	0.134790	0.133840	0.136992	9.50e-04	2.20e-03
0.7	0.117609	0.116798	0.117761	8.11e-04	1.52e-04
0.8	0.089190	0.088592	0.087168	5.98e-04	2.02e-03
0.9	0.049847	0.049520	0.047161	3.26e-04	2.69e-03

Fig. 1 shows the numerical and exact solutions of the problem. It can be seen that the numerical solution matches well with the exact solution. This shows that the present method is effective even using a fourth order polynomial.

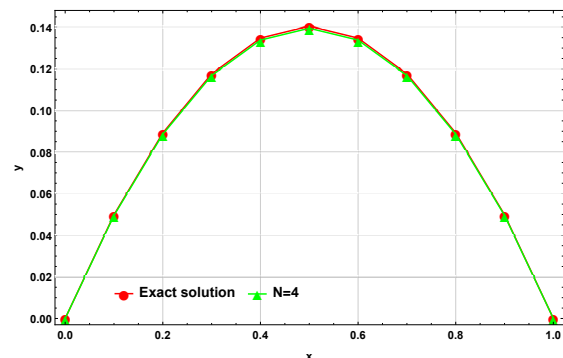


Figure 1. Exact solution and computed solution for $N = 4$

Problem 4: The final example is the Duffing type equation

$$y''(x) + y'(x) - y(x)y'(x) = 2e^x - e^{2x}, \quad x \in [0, 0.5]$$

$$y(0) = y'(0) = 1$$

The exact solution of the problem is $y(x) = e^x$. The problem is solved by taking $N = 5$ and $N = 6$ to find out the order of the polynomial which is adequate to approximate the exact solution. The numerical results and the exact solution are presented in Fig. 2. From this figure, one can see that the numerical solution for $N = 5$ does not match with the exact solution for increasing values of t , but $N = 6$ matches well with the exact solution. In order to emphasize this difference, the absolute errors for both values of

N are given in Fig. 3. It can be seen that when $N = 6$ the absolute errors are quite smaller. This shows that taking $N = 6$ is adequate to solve this problem.

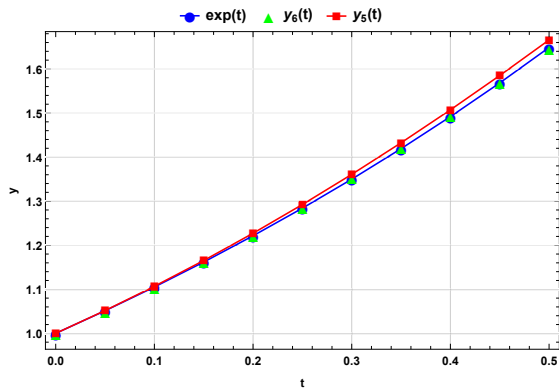


Figure 2. Comparison of the exact solution and the approximated solutions for $N = 5$ and $N = 6$.

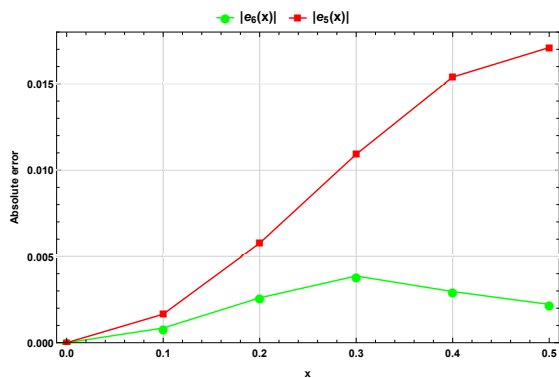


Figure 3. Error analysis of the results for $N = 5$ and $N = 6$.

5. Conclusion

In this paper, the Lucas matrix method is applied to solve nonlinear ordinary differential equations. The method has a simple and efficient structure, which makes it eligible to solve systems of nonlinear algebraic equations, thus greatly simplifying the problems. The proposed method provides several prominent advantages compared to other numerical methods. Main advantage is that the method converts the nonlinear algebraic functions to a matrix system then solves directly the system by eliminating rows of the resulting matrix. Thus, the numerical solution is immediately reached by inserting the obtained coefficients into the solution form. This issue makes the method practical without using any iteration techniques for differential equations of nonlinear type.

Four test problems are considered. In the first two problems, the application of the method results in the exact solutions. The third and fourth problems are the Bratu and Duffing equations, which are solved numerically and compared with the analytical solutions and other numerical solutions when available. One can see that the numerical

results have high accuracy even for quite small values of N .

It is well known that many nonlinear ordinary differential equations either do not have an analytical solutions or have complex solutions which require numerical methods. In order to solve such kind of problems, one has to verify the numerical technique on equations where the analytical solutions are known. Hence, the applications of the Lucas matrix method can be extended to solve indicated type of problems as it is eligible to solve stiff problems.

References

- [1] Danaila, I., Joly, P., Kaber, S.M., Postel, M. 2007. *Nonlinear Differential Equations: Application to Chemical Kinetics. An Introduction to Scientific Computing*, Springer, New York, NY.
- [2] Fay, T.H., Graham, S.D. 2003. Coupled spring equations, *Int. J. Math. Educ. Sci. Technol.*, 34(1), 65–79.
- [3] Bostancı, B., Karahan, M.M.F. 2018. Nonlinear Oscillations of a Mass Attached to Linear and Nonlinear Springs in Series Using Approximate Solutions, *Celal Bayar Univ. J. Sci.*, 14(2), 201–207.
- [4] Cruz, H., Schuch, D., Castañõs, O., Rosas-Ortiz, O. 2015. Time-evolution of quantum systems via a complex nonlinear Riccati equation. I. Conservative systems with time-independent Hamiltonian, arXiv:1505.02687v1 [quant-ph].
- [5] Ganji, D.D., Nourollahi, M., Mohseni, E. 2007. Application of He's methods to nonlinear chemistry problems, *Computers Math. with Appl.*, 54(7-8), 1122–1132.
- [6] Martens, P.C.H. 1984. Applications of nonlinear methods in astronomy, *Physics Reports (Review Section of Physics Letters)* 115(6), 315–378, North Holland, Amsterdam.
- [7] Ilea, M., Turnea, M., Rotariu, M. 2012. Ordinary differential equations with applications in molecular biology, *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.*, 116(1), 347–52.
- [8] Gümgüm, S., Baykuş-Savaşaneril, N., Kürkçü, Ö.K., Sezer, M. 2018. A numerical technique based on Lucas polynomials together with standard and Chebyshev-Lobatto collocation points for solving functional integro-differential equations involving variable delays, *Sakarya Univ. J. Sci.*, 22(6), 1659–1668.
- [9] Gümgüm, S., Baykuş Savaşaneril, N., Kürkçü, Ö.K., Sezer, M. 2019. Lucas polynomial solution of nonlinear differential equations with variable delays, *Haceteppe J. Math. Stat.* 1–12. DOI: 10.15672/hujms.460975.
- [10] Ascher, U.M., Matheij, R., Russell, R.D. 1995. *Numerical Solution of Boundary Value Problems for Ordinary Differential Equations*. Society for Industrial and Applied Mathematics (SIAM), Philadelphia.
- [11] Chandrasekhar, S. 1967. *Introduction to the Study of Stellar Structure*. Dover, New York.

- [12] Aregbesola, Y. 2003. Numerical solution of Bratu problem using the method of weighted residual, *Electronic J. Southern African Math. Sci. Assoc.*, 3, 1–7.
- [13] Wazwaz, A.M. 2005. Adomian decomposition method for a reliable treatment of the Bratu-type equations, *Appl. Math. Comput.*, 166, 652–663.
- [14] Vahidi, A.R., Hasanzade, M. 2012. Restarted Adomian's Decomposition Method for the Bratu-Type Problem. *Appl. Math. Sci.* 6(10), 479–486.
- [15] Mohsen, A. 2014. A simple solution of the Bratu problem, *Comput. Math. Appl.*, 67, 26–33.
- [16] Deeba, E., Khuri, S.A., Xie, S. 2000. An Algorithm for Solving Boundary Value Problems, *J. Comput. Phys.*, 159, 125–138.
- [17] Venkatesh, S.G., Ayyaswamy, S.K., Balachandar, S.R. 2012. The Legendre wavelet method for solving initial value problems of Bratu-type, *Comput. Math. Appl.* 63, 1287–1295.
- [18] Kazemi Nasab, A., Pashazadeh Atabakan, Z., Kılıçman, A. 2013. An Efficient Approach for Solving Nonlinear Troesch's and Bratu's Problems by Wavelet Analysis Method, *Math. Problems Eng.*, 2013, 1–10.
- [19] Caglar, H., Caglar, N., Özer, M., Valaristos, A., Anagnostopoulos, A.N. 2010. B-spline method for solving Bratu's problem, *Int. J. Computer Math.*, 87(8), 1885–1891.
- [20] Doha, E.H., Bhrawy, A.H., Baleanu, D., Hafez, R.M. 2013. Efficient Jacobi-Gauss Collocation Method for Solving Initial Value Problems of Bratu Type, *Comput. Math. Math. Phys.*, 53(9), 1292–1302.
- [21] Khuri, S.A. 2004. Laplace transform decomposition numerical algorithm is introduced for solving Bratu's problem, *Appl. Math. Comput.* 147, 131–136.
- [22] Batiha, B. 2010. Numerical solution of Bratu-type equations by the variational iteration model, *Hacetatepe J. Math Stat.*, 39(1), 23–29.
- [23] Saravi, M., Hermann, M., Kaiser, D. 2013. Solution of Bratu's Equation by He's Variational Iteration Method, *American J. Comput. Appl. Math.*, 3(1), 46–48.
- [24] Zauderer, E. 1983. *Partial Differential Equations of Applied Mathematics*. Wiley, New York.
- [25] Al-Jawary, M.A., Abd-Al-Razaq, S.G. 2016. Analytic and numerical solution for Duffing equations, *Int. J. Basic Appl. Sci.*, 5(2), 115–119.
- [26] Bülbül, B., Sezer, M. 2013. Numerical Solution of Duffing Equation by Using an Improved Taylor Matrix Method, *J. Appl. Math.*, 2013, 1–6.
- [27] Liu, G.R., Wu, T.Y. 2000. Numerical solution for differential equations of Duffing-type non-linearity using the generalized quadrature rule, *J. Sound Vib.*, 237(5), 805–817.
- [28] Anapalı, A., Yalçın, Ö., Gülsu, M. 2015. Numerical Solutions of Duffing Equations Involving Linear Integral with Shifted Chebyshev Polynomials, *AKU J. Sci. Eng.*, 15, 1–11.
- [29] Kaminski, M., Corigliano, A. 2015. Numerical solution of the Duffing equation with random coefficients, *Mechanica*, 50(7), 1841–1853.
- [30] Yusufoglu, E. 2006. Numerical solution of Duffing equation by the Laplace decomposition algorithm. *Appl. Math. Comput.*, 177(2), 572–580.
- [31] Constandache, A., Das, A., Toppan, F. 2002. Lucas polynomials and a standart Lax representation for the polyropic gas dynamics, *Lett. Math. Phys.*, 60(3), 197–209.
- [32] Lucas, E. 1878. *Theorie de fonctions numeriques simplement periodiques*, *Amer. J. Math.* 1, 184–240; 289–321.

Koyun (*Ovis aries*) Solunum Sistemindeki Bronkus, Bronkulus ve Alveoler Hücrelerdeki AIA (*Artocarpus integrifolia*) ve PSA (*Pisum sativum*) Lektinlerinin Dağılımı

Kenan ÇINAR^{*1} , Gülsüm MANAV² , Rovshan Jabbarov³ 

^{1,2,3}Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, , Isparta, Türkiye

(Alınış / Received: 26.03.2019, Kabul / Accepted: 27.01.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

Anahtar Kelimeler

Koyun,
Ovis aries,
Bronkus,
Bronkulus,
İmmunohistokimya,
Lektin

Özet: Bu çalışmada karbonhidratları spesifik ve geri dönüşümlü olarak tanıyan ve bağlanan, glikoproteinlerin çalışılmasında çok önemli bir potansiyel ve değere sahip, birçok fizyolojik ve patolojik süreçlerin anlaşılmasında aracı olan lektinlerden AIA ve PSA'nın koyun primer, sekonder, tersiyer bronkus, bronkulus verus ve bronkulus respiratoryuslarda immunohistokimyasal olarak lokalizasyonunun belirlenmesi amaçlandı. Sonuç olarak, solunum mukozası her zaman enfeksiyöz ajanlara maruz kaldığından, koyun akciğerinde bazı korunma sistemlerinin olduğu ve bu sistemlerden primer bronkuslarda lümene ulaşan kinosilyumlu hücrelerin apikal sitoplazmalarında, lümene ulaşmayan (bazal) hücrelerin lamina epitelyalis yüzeyinde, primer bronkuslarda seröz bez epiteline ait hücrelerin apikal sitoplazmalarında, tersiyer bronkusların lümene ulaşmayan (bazal) hücrelerinde ve lümene ulaşan hücrelerin apikal sitoplazmasında, bronkulus verusun ve bronkulus respiratoryusun lamina epitelyalis hücrelerinin yüzeyinde, alveolar makrofajlarda galaktoz/galaktozamin şeker rezidüleri ve primer bronkusun lamina epitelyalis yüzeyinin mannoz/glukoz şeker rezidüleri için spesifikleştigi, bunun da hayvan yetiştiriciliğine katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Distributaion of AIA(*Artocarpus integrifolia*) and PSA (*Pisum sativum*) Lectins in Bronchus, Bronchulus and Alveolar Cells in Sheep (*Ovis aries*) Respiratory System

Keywords

Sheep,
Ovis aries,
Bronchus,
Bronchulus,
Immunohistochemistry,
Lectin

Abstract: In this study it was aimed to determination of immunohistochemical localization of primary, secondary, tertiary bronchus, bronchulus verus, bronchulus respiratorius of sheep (*Ovis aries*) with lectins which are very important potential and value in the study of glycoproteins, recognizing and binding carbohydrates specifically and reversibly, mediators of many physiological and pathological processes AIA and PSA. In conclusion, since the respiratory mucosa was always exposed to infectious agents it was found that there were some protection systems in the sheep lung and these systems are localized specifically for in the apical cytoplasm of the cells of the kinociliary cells that reach the lumen in the primary bronchus, on the surface of the lamina epithelial cells of the lumen (basal) cells, in the apical cytoplasm of the cells of the serous gland epithelium in the primary bronchus, in the (basal) cells of the tertiary bronchus and in the apical cytoplasm of the cells reaching the lumen, on the lamina epithelial surface of the bronchulus verus, on the surface of bronchus respiratory tract lamina epithelial cells, galactose/galactosamine sugar residues in alveolar macrophages and lamina epithelial surface of primary bronchulus are speculated for mannose/glucose sugar residues, which will contribute to animal agriculture.

*İlgili yazar: kenancinar@sdu.edu.tr

1. Giriş

Solunum sistemi, bir çift akciğerden ve akciğerlere havayı ulaştıran bir seri hava yollarından oluşmaktadır. Akciğer içinde hava yolları, en küçük hava boşluğu olan alveollere ulaşmaya kadar giderek küçülen tüplere dallanmaktadır [1]. Memeli akciğerinde, solunum yollarının selektif inflamatuvar reaksiyonları, viral enfeksiyonlarla, transplant reddetme ve otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Bu selektif reaktivitenin moleküler temeli bilinmese de, immünolojik süreçlerdeki karbonhidratların etkisi, dokuya özgü inflamatuvar reaksiyonlarda, zar glikokonjugatlarının potansiyel bir rolü olabileceğini göstermektedir [2]. İlk lektinin 1888' de keşfedilmesinden bu yana 100 yıldan fazla bir zaman geçti [3]. Eritrositlerdeki spesifikliği nedeniyle, Landsteiner, bitki hemaglutininlerinin eylemlerinin antikor reaksiyonlarına benzer olduğunu varsaydı; ancak, bunlar ne katalitik ne de orijinli bağışıklık değillerdi ve pek antikor olarak kabul edilemezlerdi [4]. Bu nedenle latince kelimeye dayalı seçmek anlamına gelen genel bir terim olan "Legere" immün kökenli olmayan tüm şekere özgü aglutininleri temsil etmesi için önerildi [5]. 1960' larda afinite kromatografisi uygulamasından bu yana çok sayıda lektin izole edilmiştir [6-7]. Lektinlerle ilgili en önemli ve değerli bulgu, karbonhidratları spesifik ve geri dönüşümlü olarak tanımları ve bağlamalarıdır. Bu özellik sayesinde lektinler, glikoproteinlerin çalışmasında muazzam bir potansiyel ve değere sahip ve birçok fizyolojik, patolojik süreçlerin mekanizmalarının anlaşılması kolaylaşmıştır. Örneğin, bakteri veya virüslerin konak hücrelere yapışması, enfeksiyonların başlaması için bir önkoşuldur. *E. coli*' nin bukkal epitel hücrelerine tutunma sürecinde, spesifik şeker reaksiyonları içerdiği bulundu. Tutunma mannozla inhibe edildiğinden Con A lektini ile ön işlemden geçirildikten sonra *E. coli*' nin epitel hücrelerine tutunmasını engelleyebileceği bildirilmiştir [8]. Bu gerekçelerle, mannozün reseptörü ile *E. coli*' nin ortak reseptör olduğu tespit edildi. Ayrıca, birçok başka bakteride spesifik şekerler farklı olsa da lektin-karbonhidrat reaksiyonları ile dokuya tutunmaktadır [9]. Son yıllarda lektinlere olan ilgi, klinik ve biyokimyasal olmak üzere çok çeşitli biyolojik özellikleri ve uygulamaları nedeniyle artmaktadır [10]. Glikokonjugatların şeker kalıntıları solunum patojenleri için reseptör bölgesi olarak işlev görebilir [11]. Solunum sisteminde glikokonjugatlar, mukosillerin temizlenmesinde ve kanal savunmasında merkezi bir rol oynar [2].

2. Materyal ve Metot

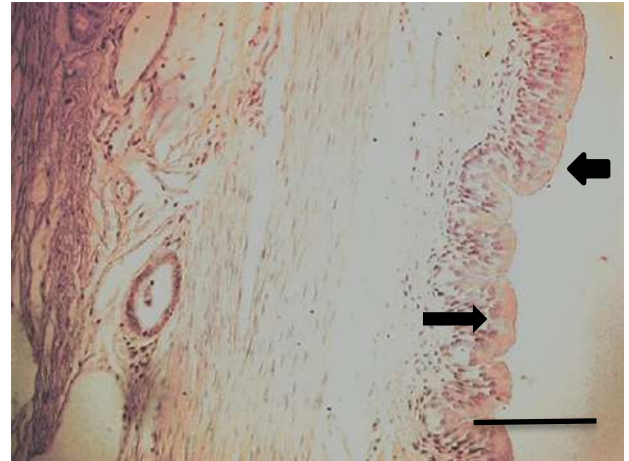
Bu çalışmada 10 adet sağlıklı erişkin koyuna (*Ovis aries*) ait primer bronkus ve akciğer örnekleri materyal olarak kullanıldı. Alınan primer bronkuslar ve akciğer dokuları, Bouin solüsyonunda 16 saat süreyle tespit edildi. Daha sonra alkol serisinden

(%50, %70, %80, %90, %100(I), %100(II), %100(III)) geçirilerek dehidre edilen örnekler, ksilolde sefflaştırılarak parafine gömülüp bloklandı. Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitlere genel yapının belirlenmesi için Masson' un Triple boyası yapıldı. Endojen peroksidazın tutulması için 10 dakika %0,3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele edilen kesitler daha sonra distile su ile çalkalandı ve 0,1 M ve pH 7,2'lik PBS (phosphate buffer saline) (Sigma P4417) içeren %1'lik Bovine Serum Albumine (BSA) (Sigma A3311) ile yıkandı. Kesitler karbonhidrat özgünlüğü ve tür adlarının yanı sıra dilüsyon oranları da PBS içinde çözülen Horseradish Peroksidaz bağlı (HRP) lektinlerle 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek PBS ile yıkandı. HRP lektinlerle bağlantı içeren bölgelerin tespit edilmesi için kesitler DAB (3,3' diamino benzidine tetra hidrökloride)' da (Sigma D0426) 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Distile su ile yıkandıktan sonra alkol ve ksilollerden geçirilen kesitler entellan ile kapatıldı.

3. Bulgular

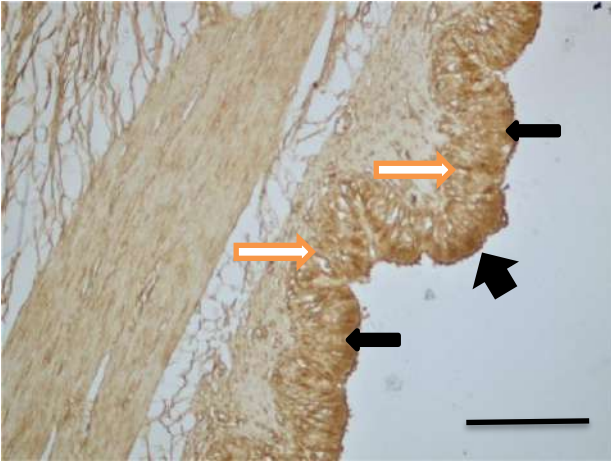
3.1. Primer bronkus

Primer bronkusun lümene ulaşan hücrelerin apikal sitoplazmalarında zayıf, lamina epitelyalis yüzeyi güçlü PSA reaksiyonu verirken, lümene ulaşmayan hücrelerde (bazal), goblet hücrelerinde, seröz ve müköz bez epiteline ait hücrelerin apikal sitoplazmalarında reaksiyona rastlanmadı (Şekil 1).

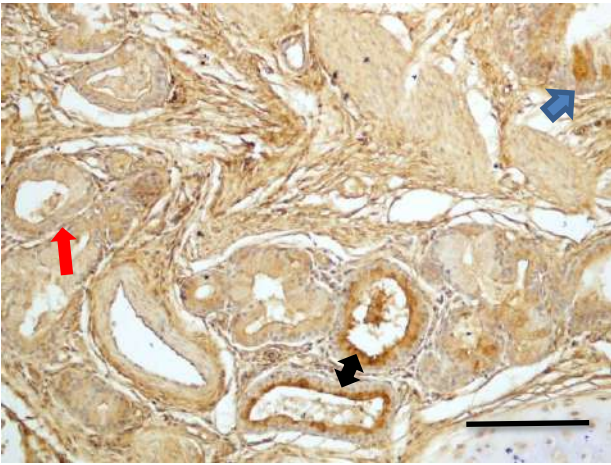


Şekil 1. Primer bronkus. Lamina epitelyalis yüzeyi (kalın ok) güçlü reaksiyon, lümene ulaşan kinosilyumlu hücrelerin apikal sitoplazmaları (ince ok) zayıf reaksiyon. PSA. Bar: 50 µm.

Lümene ulaşan kinosilyumlu hücrelerin apikal sitoplazmalarında, lümene ulaşmayan (bazal) hücrelerde, lamina epitelyalisin yüzeyinde çok güçlü (Şekil 2), seröz bez epiteline ait hücrelerin apikal sitoplazmalarında çok güçlü, goblet hücrelerinde orta yoğunlukta ve müköz bez epiteline ait hücrelerin apikal sitoplazmalarında zayıf AIA reaksiyonu saptandı (Şekil 3).



Şekil 2. Primer bronkus. Lamina epitelyalis yüzeyi (siyah kalın ok), lamina epitelyalin yüzeyi (mavi ok) güçlü, bazal hücrelerde (beyaz oklar), lümene ulaşan kinosilyumlu hücrelerin apikal sitoplazmalarında (ince siyah oklar) çok güçlü reaksiyon. AIA. Bar: 50 µm.



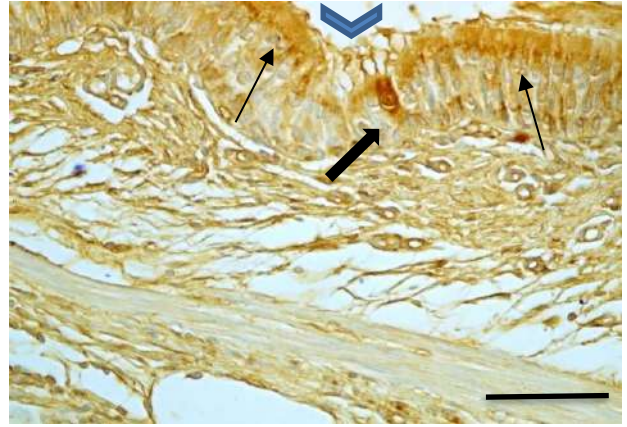
Şekil 3. Primer bronkus. Seröz bez epiteline ait hücrelerin apikal (çift yönlü siyah ok) çok güçlü reaksiyon, müköz bez epiteline ait hücrelerin apikalinde (kırmızı ok) zayıf reaksiyon, goblet hücrelerinde (mavi ok) orta yoğunlukta reaksiyon. AIA. Bar: 50 µm.

3.2. Sekonder bronkus

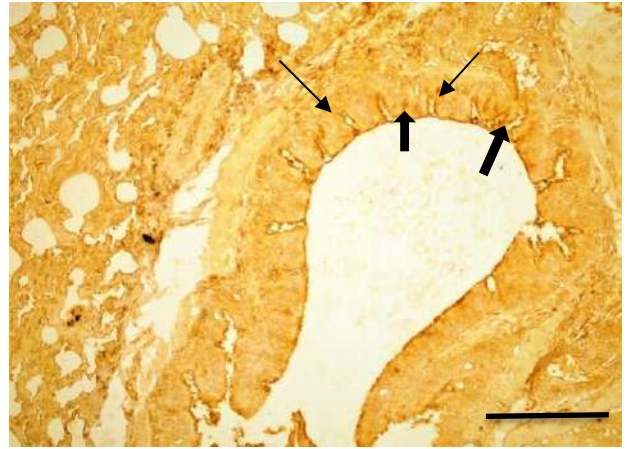
AIA uygulamasında lamina epitelyalin yüzeyinde ve goblet hücrelerinde güçlü, lümene ulaşan kinosilyumlu hücrelerin apikal sitoplazmasında ve lümene ulaşmayan (bazal) hücrelerde orta yoğunlukta (Şekil 4) reaksiyon saptandı. Seröz ve müköz bezlere ait hücrelerin apikalinde ise reaksiyona rastlanmadı. PSA uygulamasındaysa lümene ulaşan kinosilyumlu hücrelerin apikal sitoplazmasında ve lamina epitelyalin yüzeyinde zayıf reaksiyon saptanırken, goblet hücrelerinde, lümene ulaşmayan (bazal) hücrelerde, seröz ve müköz bezlere ait hücrelerin apikalinde reaksiyona rastlanmadı.

3.3. Tersiyer bronkus

Lümene ulaşmayan (bazal) hücrelerde ve lümene ulaşan hücrelerin apikal sitoplazmasında güçlü (Şekil 5), bazı kondroblastlarda orta yoğunlukta AIA reaksiyonu saptanırken, tersiyer bronkusta bu bölgeler için PSA reaksiyonuna rastlanmadı.



Şekil 4. Sekonder bronkus. Goblet hücreleri (siyah kalın ok), lamina epitelyalin yüzeyi (mavi ok) güçlü, bazal hücrelerde (ince, kısa oklar) ve lümene ulaşan kinosilyumlu hücrelerin apikal sitoplazmasında orta yoğunlukta (ince uzun oklar) reaksiyon. AIA. Bar: 50 µm.



Şekil 5. Tersiyer bronkus. Bazal hücreler (ince oklar) ve lümene ulaşan kinosilyumlu hücrelerin apikal sitoplazmaları (kalın oklar) güçlü reaksiyon. AIA. Bar: 50 µm.

3.3.1. Bronkulus verus (terminal bronkulus)

Lamina epitelyalis yüzeyinde ve apikal sitoplazmada zayıf PSA reaksiyonu gözlemlendi (Şekil 6). Bronkulus verus' un lamina epitelyalis yüzeyinde güçlü, bazı epitel hücrelerinde daha yoğun AIA reaksiyonu izlenirken, apikal sitoplazmada zayıf AIA reaksiyonu saptandı (Şekil 7).

3.3.2. Bronkulus respiratoryus (bronkulus alveolaris)

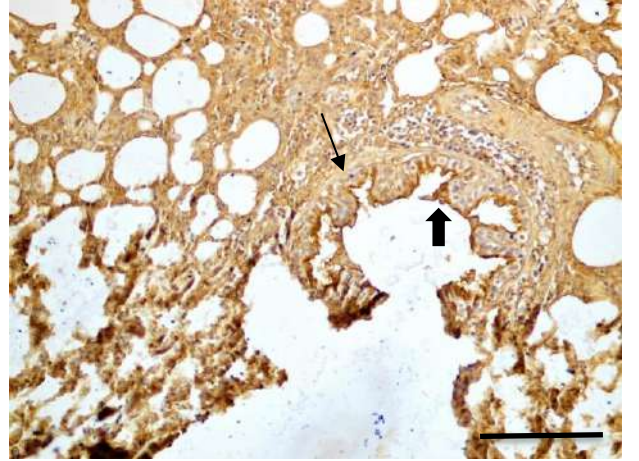
Epitel hücrelerinin yüzeyinde güçlü, hücre sitoplazmalarında ise orta yoğunlukta PSA reaksiyonu gözlemlendi (Şekil 8). Lamina epitelyalis hücrelerinin yüzeyinde çok güçlü, hücre sitoplazmalarında orta yoğunlukta AIA reaksiyonu saptandı (Şekil 9).

3.4. Alveol

Alveollerde Pnömosit II hücresinde PSA orta derecede reaksiyon verirken (Şekil 10), AIA reaksiyonu zayıf olarak gözlemlendi (Şekil 11). Alveolar makrofajlarda AIA lektiniyle güçlü reaksiyon saptanırken (Şekil 12), orta derece PSA lektini reaksiyonu tespit edildi (Şekil 13).



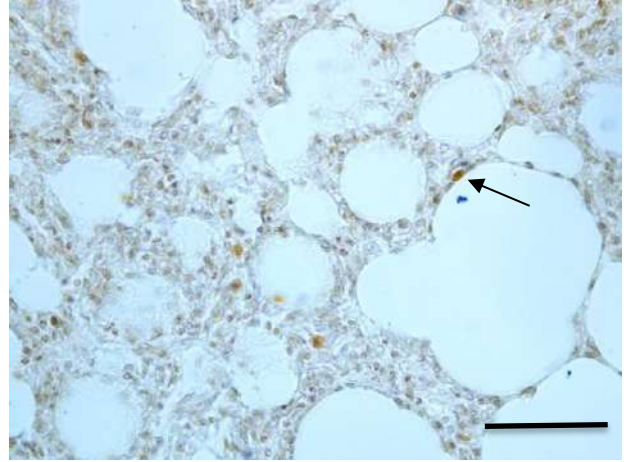
Şekil 6. Bronkulus verus. Lamina epitelyalis yüzeyinde (oklar) zayıf reaksiyon. PSA. Bar: 50 µm.



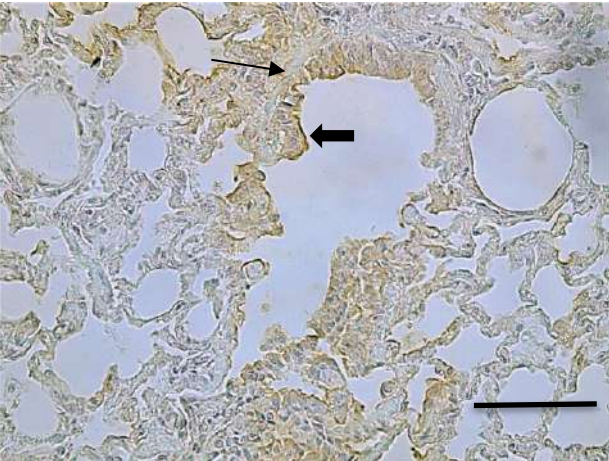
Şekil 9. Bronkulus respiratoryus. Epitel hücrelerinin yüzeyinde (kalın ok) çok güçlü, apikal sitoplazmalarda (ince ok) orta yoğunlukta reaksiyon. AIA. Bar: 50 µm.



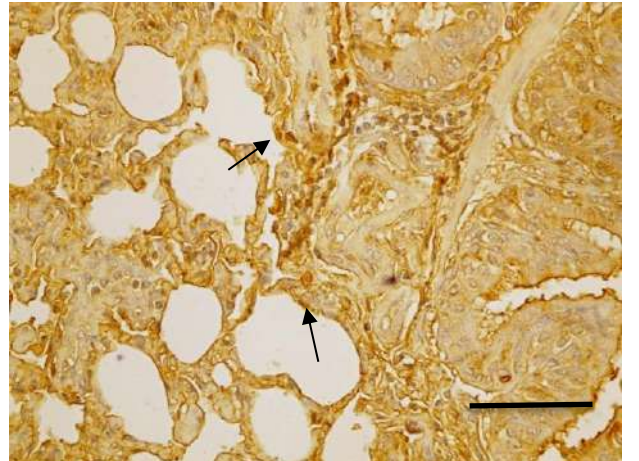
Şekil 7. Bronkulus verus. Apikal sitoplazmada (kalın ok) zayıf, lamina epitelyalis yüzeyinde (ince ok) güçlü reaksiyon AIA. Bar: 50 µm.



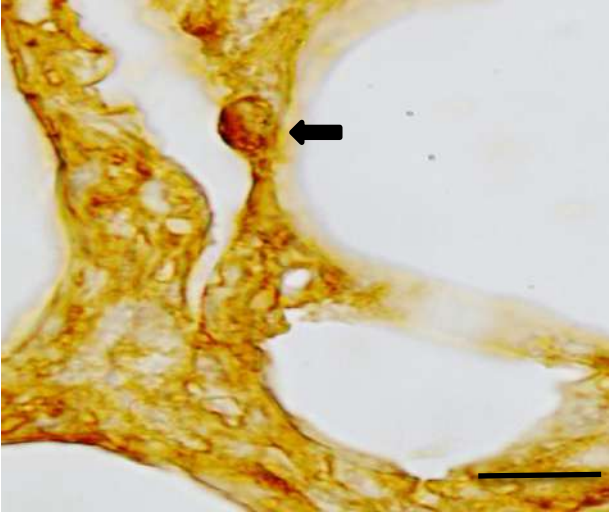
Şekil 10. Alveoller. Pnömosit II' de (ok) orta yoğunlukta reaksiyon. PSA. Bar: 50 µm.



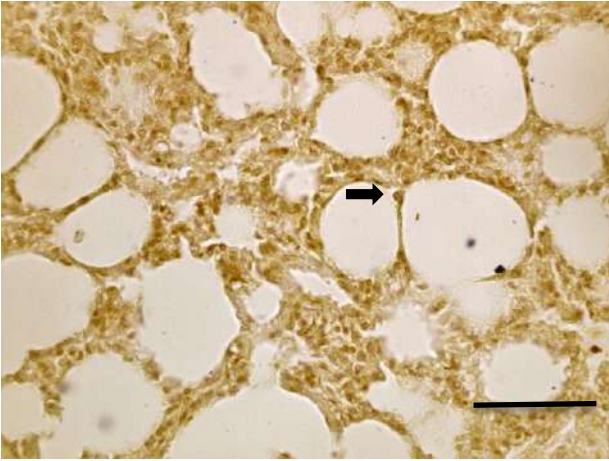
Şekil 8. Bronkulus respiratoryus. Lamina epitelyalis yüzeyinde (kalın ok) güçlü ve sitoplazmalarında (ince ok) orta yoğunlukta reaksiyon. PSA. Bar: 50 µm.



Şekil 11. Alveoller. Pnömosit II de (oklar) zayıf reaksiyon. AIA. Bar: 50 µm.



Şekil 12. Alveolar makrofajda (ok) güçlü reaksiyon. AIA. Bar: 50 µm.



Şekil 13. Alveolar makrofajda (ok) orta derecede reaksiyon. PSA. Bar: 50 µm.

4. Tartışma ve Sonuç

100 yıldan daha uzun bir süre önce keşfedilen ve belirli karbonhidrat yapılarını seçici olarak tanıma yetenekleri ile tanımlanmış olan lektinler, canlı organizmalarda her yerde bulunur. Kesin işlevleri henüz yeterince keşfedilmemiş ve tam olarak anlaşılmamıştır ancak bağlayıcı ortakların tanınması, hücre kimliği, adezyon, sinyalleşme, büyüme düzenlemesi, sağlık ve hastalık konularında yer alan sayısız biyolojik mekanizma içinde açıkça yer almaktadır. “Şeker kodunu” anlamak, mevcut biyolojik araştırmaların en önemlisidir.

Lektinler hücre ve dokulardaki glikosilasyonu haritalamak için histokimyasal çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [10]. Sağlıklı ve pnömoni hastalığı olan hindilerde (*Meleagris gallopavo*) yapılan çalışmada, sağlıklı hindilerin primer ve sekonder bronkuslarının lamina propria ve tunika adventisyasında güçlü pozitif PSA reaksiyonu saptanırken akut pnömonili hindilerin akciğerindeki dejenere epitel ve adventisyal liflerde lektin boyama yoğunluğunun azaldığı ya da düzensiz ve zayıf reaksiyon gözlemlendiği bildirilmiştir [11].

Bu çalışmada primer bronkusun lamina epitelyalis hücrelerinin yüzeyinde güçlü *Pisum sativum* lektini reaksiyonu, sekonder bronkusun lamina epitelyalisinde ise zayıf *Pisum sativum* lektini reaksiyonu saptandı.

Bu çalışmada primer bronkusun seröz bez epiteline ait hücrelerin apikal sitoplazmalarında çok güçlü, goblet hücrelerinde orta yoğunlukta ve müköz bez epiteline ait hücrelerin apikal sitoplazmalarında zayıf AIA reaksiyonu saptandı. Sekonder bronkusun goblet hücrelerinin AIA ile güçlü pozitif reaksiyon verirken, seröz ve müköz bezlere ait hücrelerin apikalinde reaksiyona rastlanmadı. İnsan hava yollarına ait kinosilyumlu epitel, bazal epitel hücrelerine yönelik yapılan çalışmalarda [12-13] AIA lektininin apikal yüzeye bağlandığını, bazı epitel hücrelerinde (kinosilyumlu hücreler) ve ağırlıklı olarak salgı hücrelerinde güçlü reaksiyon verdiği bildirilmiştir.

Endoskopik konfokal floresan mikroskopisine dayanan yeni akciğer görüntüleme tekniğiyle in vivo olarak normal ve zarar verilmiş rat akciğerinde yapılan çalışmada mannoz parçaları için karbonhidrat afinitesine sahip PSA lektininin bazı Tip I epitel hücreleri ve alveolar makrofajların hücre zarı reaksiyonlarının karakteristik olarak gerçekleştiği bildirilmiştir [14]. Bu çalışmada, alveolar makrofajlarda orta derecede PSA reaksiyonu saptandı.

Bu çalışmada primer bronkusun lamina epitelyalis yüzeyinde güçlü PSA ve sekonder bronkusun lamina epitelyalis yüzeyinde zayıf PSA reaksiyonu gözlemlendi. Primer ve sekonder bronkusların goblet hücrelerinde ve lümeneye ulaşmayan (bazal) hücrelerde PSA reaksiyonu saptanmadı. Primer bronkusun lümeneye ulaşan kinosilyumlu hücrelerin apikal sitoplazmalarında güçlü, sekonder bronkusun lümeneye ulaşan kinosilyumlu hücrelerin apikal sitoplazmasında zayıf PSA reaksiyonu saptandı. Primer bronkusun lümeneye ulaşan kinosilyumlu hücrelerin apikal sitoplazmalarında ve lümeneye ulaşmayan hücrelerde çok güçlü reaksiyon gözlemlendi. Goblet hücrelerinde ise orta yoğunlukta AIA reaksiyonu saptandı. Koyunların koku ve solunum mukozası üzerine lektin histokimyasal olarak yapılan çalışmada AIA ve PSA lektinlerine karşı epitelyumda, goblet hücrelerinde, lümeneye açılmayan hücrelerde ve kinosilyumlu hücrelerde reaksiyon gözlemlenmediği bildirilmiştir [15]. Koyun hava yolu epiteli üzerine ifade edilmiş membran glikokonjugatlarına yönelik yapılan lektin histokimyasal çalışmada PSA lektini için bronkus ve bronkulus epitelyalinde ve alveolar duvarda minimal düzeyde reaksiyon verdiği bildirilmiştir [2]. Bu çalışmada primer bronkusların ve bronkulus respiratoryusun lamina epitelyalis yüzeyinde güçlü, sekonder bronkusların ve bronkulus verusun lamina epitelyalis yüzeyinde zayıf PSA reaksiyonu gözlemlendi.

Sağlıklı gönüllülerden ve intersitisyel akciğer hastalarından elde edilen hücrelerle, bu hücrelerin lektin bağlama özelliklerini karşılaştırarak bronkoalveolar lavaj türevli bazal veriler oluşturulmuştur. Alveolar makrofajlarda (AM) hücre yüzeyi glikokonjugat ekspresyonunu belirlemek için florokrom bağlı bitki lektinlerinden oluşan bir panel ve bunların AM' ye bağlanmasını belirlemek için de akış sitometrisi kullanılmıştır. Normal gönüllülerde, alveolar makrofajlarda PSA ve AIA pozitif reaksiyon gözlemlendiği bildirilmiştir [16]. Bu çalışmada da alveolar makrofajlarda orta derecede PSA, güçlü AIA lektini reaksiyonu tespit edildi.

Histolojik anormallikleri ve akciğer hastalığı ile ilgili klinik belirtileri olmayan sağlıklı insanlarda akciğer ile yapılan çalışmada, kapillar endotelial, Tip I ve Tip II hücrelerinde PSA lektini ile reaksiyon saptanmazken, seröz hücrelerde, alveolar makrofajlarda, vasküler endotelial hücrelerinde PSA lektini ile orta dereceli reaksiyon tespit edildiği bildirilmiştir [17]. Bu çalışmada ise primer ve sekonder bronkusların lamina epitelyalis yüzeyinde güçlü, alveolar makrofajlarda ve pnömosit II (Tip II) hücresinde orta derecede PSA reaksiyonu saptandı.

Bu çalışmada, primer, sekonder, tersiyer bronkus, bronkulus verus, bronkulus respiratoryus ve alveol duvarında mannoz/glukoz ve galaktoz/galaktozamin reseptörleri için bölgesel olarak farklı reaksiyonlar tespit edildi.

Sonuç olarak, solunum mukozası her zaman enfeksiyöz ajanlara maruz kaldığından, koyun akciğerinde bazı korunma sistemlerinin olduğu ve bu sistemlerden primer bronkuslarda lümene ulaşan kinosilyumlu hücrelerin apikal sitoplazmalarında, lümene ulaşmayan (bazal) hücrelerin lamina epitelyalis yüzeyinde, primer bronkuslarda seröz bez epiteline ait hücrelerin apikal sitoplazmalarında, tersiyer bronkusların lümene ulaşmayan (bazal) hücrelerinde ve lümene ulaşan hücrelerin apikal sitoplazmasında, bronkulus verusun lamina epitelyalis yüzeyinde, bronkulus respiratoryusun lamina epitelyalis hücrelerinin yüzeyinde, alveolar makrofajlarda galaktoz/galaktozamin şeker rezidüleri ve primer bronkusun lamina epitelyalis yüzeyinin mannoz/glukoz şeker rezidüleri için spesifiklediği, bunun da hayvan yetiştiriciliğine katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Kaynakça

- [1] Baykal, B. ed. 2014. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. Palme Yayıncılık, Ankara, 676-678s.
- [2] Abdi, K., Kozbık, L., Li, X., Menizr, S. J. 1994. Membrane Glycoconjugates Expressed on Sheep Airway Epithelium. The journal of Histochemistry and Cytochemistry, 42(10), 1341-1347.
- [3] Sumner, J. B., Howell, S. F. 1936. Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. J Bacteriol, 32(2), 227-237.
- [4] Landsteiner, K. 1962. The Specificity of Serological Reactions. Agglutination. Dover Publications, New York, 246s.
- [5] Lam, S. K., Ng, T. B. 2011. Lectins: Production and Practical Applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 89, 45-55.
- [6] Vretblad, P. 1976. Purification of Lectins by Biospecific Affinity Chromatography. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure, 169-176.
- [7] Dan, X., Liu, W., Ng, T. B. 2016. Development and Applications of Lectins as Biological Tools in Biomedical Research. Medicinal Research Reviews, 221-247.
- [8] Ofek, I., Mirelman, D., Sharon, N. 1977. Adherence of Escherichia coli to Human Mucosal Cells Mediated by Mannose Receptors. Nature, 623-625.
- [9] Sharon, N., Lis, H. 2004. History of Lectins: From Hemagglutinins to Biological Recognition Molecules. Glycobiology, 53-62.
- [10] Islam, F., Gopalan, V., K-Y Lam, A., Kabir, S. R. 2018. Pea Lectin Inhibits Cell Growth by Inducing Apoptosis in SW480 and SW48 cell lines. International Journal of Biological Macromolecules. 1(117), 1050-1057.
- [11] Gyimah, I. E., Panigraphy, B. 1988. Adhesin-Receptor Interactions Mediating the Attachment of Pathogenic Escherichia coli to Chicken Tracheal Epithelium. Avian Dis 32, 74-78.
- [12] Dorscheid, D. R., Conforti, A. E., Hamann, K. J., Rabe, K. F., White, S. R. 1999. Characterization of Cell Surface Lectin-Binding Patterns of Human Airway Epithelium. Histochemical Journal, 31(3), 145-151.
- [13] Yi, S. M., Harson, R. E., Zabner, J., Welsh, M. J. 2001. Lectin Binding and Endocytosis at the Apical Surface of Human Airway Epithelia. Gene Therapy, 1826-1832.
- [14] Chagnon, F., Fournier, C., Charette, P. G., Moleski, L., Payet, M. D., Dobbs, L. G., Lesur, O. 2010. In Vivo Intravital Endoscopic Confocal Fluorescence Microscopy of Normal and Acutely Injured Rat Lungs. Laboratory Investigation, 90, 824-834.
- [15] İbrahim, D., Nakamuta, N., Taniguchi, K., Yamamoto, Y., Taniguchi, K. 2014. Histological and Lectin Histochemical Studies on the Olfactory and Respiratory Mucosae of the Sheep. Journal of Veterinary Medical Science. 76(3), 339-346.

- [16] Meyer, K. C., Powers, C., Rosentha, N., Auerbach, R. 1993. Alveolar Macrophage Surface Carbohydrate Expression Is Altered in Interstitial Lung Disease as Determined by Lectin-binding Profiles. American Review Of Respiratory Disease, 1325-1334.
- [17] Barkhordari, A., Stoddart, W., McClure, F., McClure, J. 2004. Lectin Histochemistry of Normal Human Lung. Journal of Molecular Histology 35(2), 147-156.