



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

***CANAKKALE ONSEKİZ MART UNIVERSITY  
JOURNAL OF ADVANCED  
RESEARCH IN NATURAL AND  
APPLIED SCIENCES***



ISSN 2757-5195

## **Önsöz**

Journal of Advanced Research in Natural and Applied Sciences Dergisi Fen, Mühendislik, Doğa ve Temel bilimler alanlarında daha önce yayımlanmamış orijinal araştırma makalesi, derleme yazılar, teknik not türünde araştırmaları yayınlayan ulusal ve uluslararası indekslerde taranan, hakemli ve bilimsel bir dergidir. Journal of Advanced Research in Natural and Applied Sciences Dergisi Mart, Haziran, Eylül, Aralık olmak üzere yılda dört sayı yayınlanacaktır. Tr-Dizin’de taranan Journal of Advanced Research in Natural and Applied Sciences Dergisi’nin 7.cilt 1.sayısında 12 adet araştırma makalesi yayına kabul edilmiştir.

### **Dergi Editör Kurulu**

Doç. Dr. Filiz UĞUR NİGİZ

Dr. Öğretim Üyesi Ayça AYDOĞDU

Dr. Tuğba GÜNGÖR

### **Alan Editörleri**

Doç. Dr. Melis ULU DOĞRU

Doç. Dr. Necati KAYA

Dr. Öğretim Üyesi Gülçin ÖZCAN ATEŞ

Dr. Öğretim Üyesi Şebnem ÖNDER

Dr. Öğretim Üyesi Doğukan TAŞER

### **Sekreteryaya**

Arş. Gör. Sinem ALTINIŞIK



**CONTENTS / İÇİNDEKİLER**  
(2021, 7:1)

| <b>Articles &amp; Authors / Makaleler &amp; Yazarlar</b>  | <b>Pages / Sayfa No</b> |
|---|-------------------------|
| <b>The Aphid Fauna (Hemiptera:Aphidoidea) and Host Plants of The Büyükada Island (İstanbul, Turkey)</b><br>Hayal Akyıldırım Beğen*, Gazi Görür<br><b>Research/Araştırma</b>   | 1-11                    |
| <b>The Use of Graph Databases for Artificial Neural Networks</b><br>Doğa Barış Özdemir*, Ahmet Cumhuri Kınacı<br><b>Research/Araştırma</b>  | 12-34                   |
| <b>Benchtop <sup>1</sup>H NMR spectroscopy as a practical tool for characterization of chemically ex-changing systems in Ascorbic acid</b><br>Sevil Çıkrıkçı*<br><b>Research/Araştırma</b>                                  | 35-47                   |
| <b>Kırşehir İlinden Toplanan Morchella esculenta (L.) Pers (Kuzu Göbeği) Mantarlarının Moleküler Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi</b><br>Elif Sevim*, Ali Sevim<br><b>Research/Araştırma</b> | 48-59                   |
| <b>Manisa İli Pamuk Üreticilerinin Bitki Koruma Uygulamaları</b><br>Samet Memiş, Ali Özpınar*<br><b>Research/Araştırma</b>  | 60-70                   |
|   |                         |



|   |         |
|---|---------|
| <b>Preparation of Black-Titanium Dioxide Nanotubes by Thermal Decomposition of Sodium Borohydride</b><br>Murat Efgan Kibar*<br>Research/Araştırma   | 71-81   |
| <b>6 Şubat 2017, Mw=5.4 Ayvacık Depremi Öncesi ve Sonrası Temel Deprem Tehlike Parametrelerinin Analizi</b><br>Ayşe Gezer, Tolga Bekler*<br>Research/Araştırma  | 82-99   |
| <b>Bazı İstant Gıdaların Üretiminde Kızılötesi Kurutmanın Etkisi</b><br>Barış Burak Albayrak*, Necati Barış Tuncel, Habib Kocabıyık<br>Research/Araştırma   | 100-113 |
| <b>Fuzzy Xbar and S Control Charts Based on Confidence Intervals</b><br>Nilufer Pekin Alakoc*<br>Research/Araştırma   | 114-131 |
| <b>Consequence Modelling and Analysis of Methane Explosions: A preliminary Study on Biogas Stations</b><br>Müge Ensari Özay*, Pelin Güzel, Emine Can<br>Research/Araştırma  | 132-144 |
| <b>Ginkgo biloba Bitki Ekstraktı ile Muamele Edilmiş Kayısların Yapay Yolla Kurutulması ve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi</b><br>İrem Akbulut*, Elif Gürbüz, Ahsen Rayman Ergün, Taner Baysal<br>Research/Araştırma | 145-159 |
| <b>Phylogenetic Analysis and Extracellular Enzyme Profiles of Yeast Strains Isolated from Raspberry Fruits</b><br>Tülay Turgut Genç*, Melih Günay<br>Research/Araştırma   | 160-171 |





# The Aphid Fauna (Hemiptera:Aphidoidea) and Host Plants of The Büyükada Island (İstanbul, Turkey)

Hayal Akyıldırım Beğen<sup>1\*</sup>, Gazi Görür<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Vocational School of Health Services, Artvin Çoruh University, Artvin, Turkey

<sup>2</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Arts and Sciences, Niğde Ömer Halis Demir University, Niğde, Turkey

## Article History

Received: 19.05.2020

Accepted: 23.12.2020

Published: 20.03.2021

## Research Article

**Abstract** – About 5100 aphid (Hemiptera: Aphidoidea) species that feed on different host plants have spread all over the world. About 5000 aphid taxon feed on different plant species. Aphids are small, soft-bodied and one of the sap-feeding insect groups and also can damage almost all plants. Some aphid species are specific to only one host plant, while some feed on numerous host plants. In this study, aphid fauna and host plants of aphids were determined in Büyükada islands of İstanbul was determined in this study. Aphid species were distributed from cultivated plants, wild trees and shrubs in the area. During these study, 150 aphid samples were collected in the area. Apteræ and alatae individuals of aphid samples were collected as much as possible from aphid colonies on cultivated and ornamental plants. 43 aphid taxa including two new records Turkey aphid fauna (1 family, 6 subfamily, 6 tribus ve 23 genus) were determined on 46 different plant species at the end of the study. *Malva neglecta*, *Nerium oleander*, and *Pinus* spp. are the most sampled plant species. *Aphis craccivora*, *Aphis fabae*, and *A. spiracola* are the most determined aphid species in the area. All defined aphid species are the first records for the Büyükada island. Findings of the presented study and other recent studies showed that with the detailed studies, Turkey aphid fauna will be substantially increased thanks to the more detailed local studies.

**Keywords** – Aphid, Büyükada, İstanbul, plant, Turkey

## 1. Introduction

Aphids are considered remarkable pest that feeds on plant sap and damages them directly by sucking their phloem sap, indirectly by transmitting pathogens around the world. About 5100 aphid species have been identified around the world, and 1600 aphid species are present in Europe (Favret, 2020; Blackman and Eastop, 2020). Preliminary studies related to Turkey aphid fauna date back to twentieth-century (Fahringer, 1922).

Çanakçioğlu (1975) summarised all studies on aphids and published nearly about 260 aphid species. Remaudière Toros, & Özdemir (2006) listed 417 species and then Toper Kaygın, Görür & Cota (2008), Eser, Görür, Tepecik & Akyıldırım (2008), Görür, Zeybekoğlu, Akyürek, Işık & Akyıldırım (2009), Akyürek, Zeybekoğlu & Görür (2010, 2011), Görür, Akyıldırım Beğen, Olcabey & Akyurek (2012) published 480 aphid taxa including 2 new records from our study area which were *Acyrtosiphon kondoi* Shinji, 1938 and *Eulachnus pumilae* Inouye, 1939. Barjadze, Özdemir & Blackman. (2014) published *Aphis matricariae* Barjadze & Özdemir, 2014 and *Protaphis kvavadzei* Barjadze & Özdemir, 2014 as new records. Moreover,

<sup>1</sup>  [h.akyildirim@artvin.edu.tr](mailto:h.akyildirim@artvin.edu.tr)

<sup>2</sup>  [ggorur@ohu.edu.tr](mailto:ggorur@ohu.edu.tr)

\*Corresponding Author

[Barjadze, Blackman & Özdemir \(2015\)](#) was defined *Aphis polii* on *Teucrium* sp. from Turkey. [Görür, Toper Kaygin, Şenol & Akyıldırım Beğen \(2015\)](#) shown that *Cinara curvipes* (Patch, 1912) was invasive and a new addition for Turkey. [Şenol, Akyıldırım Beğen, Görür & Demirtaş \(2015a,b\)](#) described new records (26 species) and increased the number of the aphid fauna to 532. [Kök, Kasap & Özdemir \(2016\)](#) and [Kök & Kasap \(2019\)](#) added 2 aphid species and the number reached to 534. [Görür, Şenol & Akyıldırım Beğen \(2019\)](#) listed 40 new aphid records to the aphidofauna. Recent reanalysis of the aphid species and determined host plants clearly showed that the number of the aphid taxa in Turkey reached more than 570 ([Görür Şenol & Akyıldırım Beğen, 2019](#); [Görür, Şenol, Akyıldırım Beğen & Akyürek, 2020](#)).

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Field Introduction

The Princes Islands include nine islands, four of them are large (Büyükada, Heybeliada, Burgazada, and Kınalıada) and 5 of them are smaller (Yassıada, Sivriada, Kaşık Adası, Sedef Adası and Tavşan Adası), placed in the southeast part of the Marmara Sea of Istanbul. Büyükada, the area of this study is the biggest island among them ([Figure 1](#)).

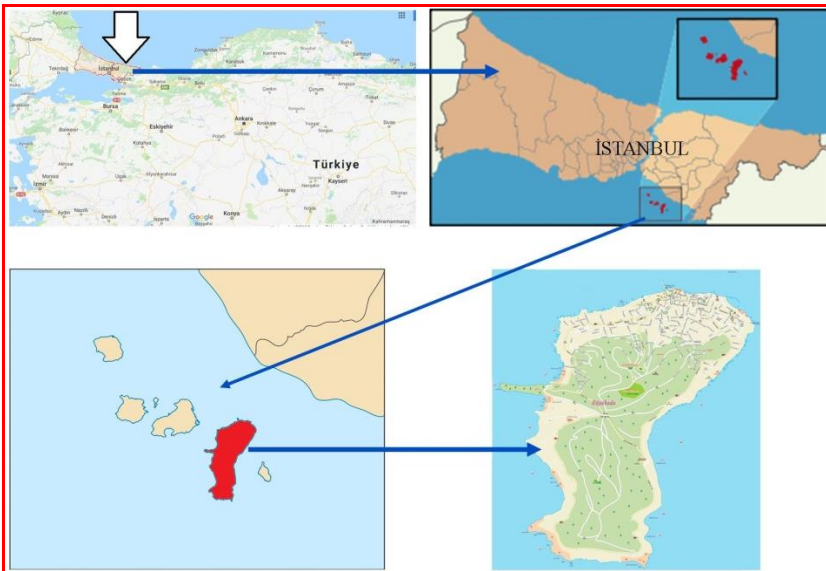


Figure 1. Location of Büyükada Island

The annual average temperature of these Islands is 14.4°C, generally above 25°C during May-September. The annual average precipitation is about 823.0 mm. The relative humidity is between 73- 77% that decreases to around 65-68% during summer ([MGM, 2020](#)). Büyükada island has natural and exotic plant species due to location and climatic types of the area. Blacksea and Mediterranean climatic types are observed in the area ([Kaya & Aladağ, 2009](#)). Exotic plants grown throughout the island, especially in the gardens, parks, and even roadsides in residential areas.

### 2.2. Methods

The field studies were conducted in Büyükada Islands from April to October 2010 ([Figure 1](#)). Focused on the sample possible higher amount of all forms (apterae and alatae individuals) on host plants. Specimens were preserved in an eppendorf tube containing 96% alcohol. Samples were picked up from almost all naturally grown and agricultural plants. Collection and preparation of the aphid samples have been carried out in accordance with the methods of [Martin \(1983\)](#). Species were described based on [Blackman & Eastop \(2020\)](#) and [Çanakçıoğlu \(1975\)](#). Systematic status and host plants of the identified aphids were determined

from [Blackman and Eastop \(2020\)](#) and [Holman \(2009\)](#). When defining all aphid samples, all books and papers published about diagnostic characters, determined plant species, origination and recent dispersal area were examined carefully. Definition, taxonomic status and distribution informations controlled by related literature ([Holman, 2009](#); [Favret, 2020](#); [Blackman & Eastop, 2020](#)). All collected aphid specimens were kept in the Aphid laboratory of Faculty of Arts and Sciences, Niğde Ömer Halis Demir University.

### 3. Results and Discussion

150 aphid population were sampled and 43 aphid species (23 genera, 6 tribe) belonging to 6 subfamilies were determined from the study area ([Figure 1](#)). Identified taxa were edited alphabetically and listed ([Table 1](#)). Photos of some important species were given ([Figure 2,3](#)).

Among these identified species, two new records were determined for Turkey and added to a recent checklist of the Turkey aphid fauna ([Görür et al., 2012](#)). The first of these is *Acyrtosiphon kondoi* Shinji, 1938 and collected on *Malva* sp. (Malvaceae) second one is *Eulachnus pumilae* Inouye, 1939 and collected on *Pinus brutia* (Pinaceae). All taxonomical name lists, host plants and dates of the determined species from study area were given. Determined species are listed alphabetically.

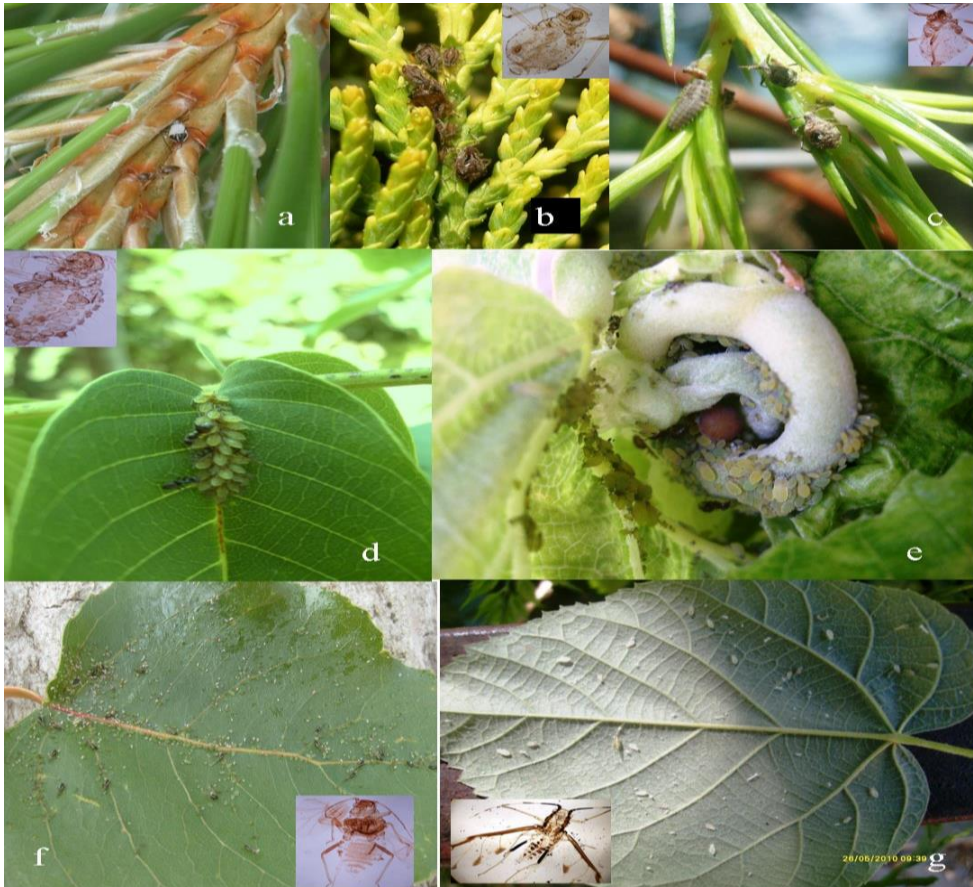


Figure 2. Aphid species on host plants (a- *Cinara brauni* on *Pinus* sp.; b- *Cinara tujafilina* on *Platycladus orientalis*; c- *Cinara maghrebica* on *Pinus* sp. ; d- *Panaphis juglandis* on *Juglans regia* ; e- *Patchiella reaumuri* on *Tilia* sp. ; f- *Chaitophorus populialbae* on *Populus nigra*; g- *Eucallipterus tiliae* on *Tilia* sp.)

***Acyrtosiphon euphorbiae* Börner, 1940.**

Examined specimen: Collected on *Euphorbia* sp. on 11.05.2010.

***A. kondoi* Shinji, 1938**

Examined specimen: Collected on *Lathyrus* sp. on 21.05.2010

***A. malvae* (Mosley, 1841)**

Examined specimen: Collected on *Senecio pseudo-orientalis* on 11.05.2010; *Malva* sp. on 14.05.2010.

***Aphis craccivora* Koch 1854**

Examined specimen: Collected on *Citrus* sp. (Family) on 11.V.2010, *Acacia* sp. on 22.06.2010; *Portulacca oleracea*, *Wistera* sp. on 28.06.2010-02.07.2010.

***A. fabae* Scopoli 1763**

Examined specimen: Sampled on *Hibiscus syriacus* (ağaç hatmi); *Hedera helix* on 10.05.2010 *Polygonum* sp.(çobandeğneği); *Urtica* sp.(ısırgan otu); *Anthemis* sp. on 11.05.2010;

*Nerium oleander* on 12.05.2010; *Hedera* sp.

*Polygonum* sp. on 14.05.2010;

***A. gossypii* Glover 1877**

Examined specimen: Collected on *Punica granatum* on 26.05.2010.

***A. hederæ* Kaltenbach, 1843**

Examined specimen: Collected on *Hedera helix* 07.07.2010.

***A. molluginis* (Börner, 1950)**

Examined specimen: Collected on *Galium aparine* on 10-11.05.2010.

***A. nasturtii* Kaltenbach, 1843**

Examined specimen: Collected on *Rumex* sp. on 28.06.2010.

***A. nerii* Boyer de Fonscolombe, 1841**

Examined specimen: Found on *Nerium oleander* on 10.05.2010; 11.05.2010; 27.06.2010

***A. pomi* de Geer, 1773**

Examined specimen: Collected on *Pyrus* sp. on 26.05.2010

***A. ruborum* (Börner, 1932)**

Examined specimen: Found on *Rubus* sp. on 27.06.2010.

***A. spiraecola* Patch, 1914**

Examined specimen: Collected on *Cotoneaster franchetti* on 10.05.2010;

*Chenopodium* sp. on 11.05.2010; 12.05.2010; *Nerium oleander* on 21.05.2010; *Trifolium* sp. on 22.06.2010; 28.06.2010.

***A. umbrella* (Börner, 1950)**

Examined specimen: Collected on *Malva* sp. on 07.07.2010.

***Aulocorthum solani* (Kaltenbach, 1843)**

Examined specimen: Collected on *Ulmus* sp. on 10.05.2010.

***Brachycaudus cardui* (Linnaeus, 1758)**

Examined specimen: Collected on *Carduus* sp. on 14.05.2010; *Carthamus* sp. on 21.05.2010;

*Carduus acanthoides* on 26.05.2010.

***B. helichrysi* (Kaltenbach, 1843)**

Examined specimen: Collected on

*Cynoglossum* sp. on 12.05.2010 ; 14.05.2010; 21.05.2010;

*Lycopersicum esculentum* on 02.07.2010.

***Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758)**

Examined specimen: Collected on *Bunias orientalis* on 17.05.2010.

***Chaitophorus populialbae* (Boyer de Fonscolombe, 1841)**

Examined specimen: Collected on *Populus nigra* on 21.05.2010.

***Cinara tujafilina* del Guercio, 1909**

Examined specimen:: Collected on *Platycladus orientalis* on 10.05.2010; 21.05.2010.

***C. brauni* Börner , 1940**

Examined specimen: Collected on *Pinus* sp. on 28.06.2010.

***C. maghrebica* Mimeur, 1934**

Examined specimen: Collected on *Pinus* sp. on 26.05.2010 ; 27.06.2010.

***C. pilicornis* (Hartig, 1841)**

Examined specimen: Collected on *Picea* sp. on 27.06.2010.

***C. pruinosa* (Hartig, 1841)**

Examined specimen: Collected on *Picea* sp. on 28.06.2010.

***Drepanosiphum oregonensis* Granovsky, 1939**

Examined specimen:: Collected on *Acer trautvetteri* on 26.05.2010

***Eucallipterus tiliae* (Linnaeus, 1758)**

Examined specimen: Collected on *Tilia* sp. on 12.05.2010 ; 26.05.2010 28.06.2010.

**\**Eulachnus pumilae* Inouye, 1939**

Examined specimen: Collected on *Pinus* sp. on 27.06.2010.

***Hyalopterus pruni* (Geoffroy, 1762)**

Examined specimen: Collected on *Prunus domestica* on 12.05.2010.

***Liosomaphis berberidis* (Kaltenbach, 1843)**

Examined specimen: Collected on *Berberis thunbergii* on 12.05.2010.

***Lipaphis erysimi* (Kaltenbach, 1843)**

Examined specimen: Collected on *Brassica nigra* on 21.05.2010.

***Macrosiphum euphorbia* (Thomas, 1878)**

Examined specimen: Collected on *Urtica* sp. on 10.05.2010.

***M. impatientis* Williams, 1911.**

Examined specimen: Collected on *Rosa canina* on 14.05.2010.

***M. rosae* (Linnaeus, 1758)**

Examined specimen: Collected on *Rosa* sp. on 11.05.2010; 12.05.2010; 02.07.2010 ;07.07.2010

***Myzus persicae* (Sulzer, 1776)**

Examined specimen: Collected on *Malva* sp. on 21.V.2010.

***Ovatomyzus chamaedrysi* (Passerini,1879)**

Examined specimen: Collected on *Mentha* sp. on 14.05.2010.

***Panaphis juglandis* (Goeze, 1778)**

Examined specimen: Collected on *Juglans regia* on 07.07.2010.

***Patchiella reaumuri* (Kaltenbach, 1843)**

Examined specimen: Collected on *Tilia* sp. on 10.05.2010.

***Rhopalosiphum padi* (Linnaeus, 1758)**

Examined specimen: Collected on *Hordeum murinum* on 02.07.2010.

***Schizaphis rotundiventris* (Signoret, 1860)**

Examined specimen: Sampled on *Palm* sp. on 22.06.2010; 27.06.2010.

***Sitobion avenae* (Fabricius, 1775)**

Examined specimen: Collected on *Cynodon*

*dactylon* on 07.07.2010.

***S. fragariae* (Walker, 1848)**

Examined specimen: Collected on *Hordeum* sp. on 14.05.2010; *Poa* sp. on 21.05.2010; *Bromus* sp. on 26.05.2010.

***Uroleucon sonchi* (Linnaeus, 1767)**

Examined specimen: Collected on *Chondrilla juncea* on 10.05.2010.

***Wahlgreniella nervata* (Gillette, 1908)**

Examined specimen: Collected on *Sonchus* sp. on 07.07.2010.





Figure 3. Determined species on host (a- *Aphis fabae* on *Nerium oleander*;b- *A. molluginis* on *Gallium aparine*;c- *A. nerii* on *Nerium oleander*;d- *Aphis spiraeicola* on *Cotoneaster* sp.;e- *Brachycaudus cardui* on *Carduus* sp.;f- *Hyalopterus pruni* on *Prunus domestica*)



Table 1

Determined aphid species and host plants

| APHID SPECIES                                | HOST PLANTS  | APHID SPECIES                                     | HOST PLANTS  |
|--|--|---|--|
| <i>Acyrtosiphon euphorbiae</i> Börner, 1949  | <i>Euphorbia</i> sp.   | <i>C. pilicornis</i> (Hartig, 1841)               | <i>Picea</i> sp.   |
| <i>A. kondoi</i> Shinji, 1938*               | <i>Lathyrus</i> sp.  | <i>C. pruinosa</i> (Hartig, 1841)                 | <i>Picea</i> sp.   |
| <i>A. malvae</i> (Mosley, 1841)              | <i>Malva neglecta</i> .<br><i>Senecio pseudo-orientalis</i>  | <i>Drepanosiphum oregonensis</i> Granovsky, 1939  | <i>Acer trautvetteri</i>   |
| <i>Aphis craccivora</i> Koch, 1854           | <i>Robinia pseudoacacia</i><br><i>Wisteria floribunda</i><br><i>Lycopersicum esculentum</i><br><i>Portulaca oleracea</i>                         | <i>Eucallipterus tiliae</i> (Linnaeus, 1758)      | <i>Tilia</i> sp.   |
| <i>A. fabae</i> Scopoli, 1763                | <i>Hibiscus syriacus</i><br><i>Hedera helix</i><br><i>Polygonum</i> sp.<br><i>Urtica dioica</i><br><i>Anthemis</i> sp.<br><i>Nerium oleander</i> | <i>Eulachnus pumilae</i> Inouye, 1939*            | <i>Pinus</i> sp.   |
| <i>A. gossypii</i> Glover, 1877              | <i>Punica granatum</i><br><i>Senecio</i> sp.   | <i>Hyalopterus pruni</i> (Geoffroy, 1762)         | <i>Prunus domestica</i>  |
| <i>A. hederæ</i> Kaltenbach, 1843            | <i>Hedera helix</i>  | <i>Liosomaphis berberidis</i> (Kaltenbach, 1843)  | <i>Berberis thunbergii</i><br>' <i>Atropurpurea</i> '<br><i>Brassica</i> sp. |
| <i>A. molluginis</i> (Börner, 1950)          | <i>Gallium aparine</i>   | <i>Lipaphis erysimi</i> (Kaltenbach, 1843)        | <i>Urtica</i> sp.  |
| <i>A. nasturtii</i> Kaltenbach, 1843         | <i>Rumex</i> sp.   | <i>Macrosiphum euphorbiae</i> (Thomas, 1878)      |  |
| <i>A. nerii</i> Boyer de Fonscolombe, 1843   | <i>Nerium oleander</i>   | <i>M. impatientis</i> Williams, 1911              | <i>Rosa canina</i>   |
| <i>A. pomi</i> de Geer, 1773                 | <i>Pyrus</i> sp.   | <i>M. rosae</i> (Linnaeus, 1758)                  | <i>Rosa</i> sp.  |
| <i>A. ruborum</i> (Börner, 1932)             | <i>Rubus</i> sp.   | <i>Myzus persicae</i> (Sulzer, 1776)              | <i>Malva</i> sp.   |
| <i>A. spiraeicola</i> Patch, 1914            | <i>Trifolium pratense</i><br><i>Cotoneaster franchetti</i><br><i>Chenopodium</i> sp.<br><i>Nerium oleander</i>                                   | <i>Ovatomyzus chamaedrysi</i> (Passerini, 1879)   | <i>Mentha</i> sp.  |
| <i>A. umbrella</i> (Börner, 1950)            | <i>Malva neglecta</i>  | <i>Panaphis juglandis</i> (Goeze, 1778)           | <i>Juglans regia</i>   |
| <i>Aulocorthum solani</i> (Kaltenbach, 1843) | <i>Ulmus</i> sp.   | <i>Patchiella reaumuri</i> (Kaltenbach, 1843)     | <i>Tilia</i> sp.   |
| <i>Brachycaudus cardui</i> (Linnaeus, 1758)  | <i>Carthamus</i> sp.   | <i>Rhopalosiphum padi</i> (Linnaeus, 1758)        | <i>Hordeum murinum</i>   |
| <i>B. helichrysi</i> (Kaltenbach, 1843)      | <i>Carduus acanthoides</i><br><i>Cynoglossum</i> sp.   | <i>Schizaphis rotundiventris</i> (Signoret, 1860) | <i>Palm</i> sp.  |
| <i>Brevicoryne brassicae</i>                 | <i>Brassica</i> sp.  | <i>Sitobion avenae</i>                            | <i>Cynodon</i>   |

|  |                               |  |                         |
|--|-------------------------------|--|-------------------------|
| (Linnaeus, 1758)                           |                               | (Fabricius, 1775)                            | <i>dactylon</i>         |
| <i>Chaitophorus populialbae</i>            | <i>Populus alba</i>           | <i>S. fragariae</i> (Walker, 1848)           | <i>Hordeum</i> sp.      |
| (Boyer de Fonscolombe, 1841)               |                               |  | <i>Poa</i> sp.          |
| <i>Cinara tujafilina</i> del Guercio, 1909 | <i>Platyclusus orientalis</i> | <i>Uroleucon sonchi</i> (Linnaeus, 1767)     | <i>Bromus</i> sp.       |
| <i>C. brauni</i> Börner, 1940              | <i>Pinus</i> sp.              | <i>Wahlgreniella nervata</i> (Gilette, 1908) | <i>Chondrilla junce</i> |
| <i>C. maghrebica</i> Mimeur, 1934          | <i>Pinus</i> sp.              |  | <i>Sonchus</i> sp.      |

\*These new records were listed in the checklist ([Görür et al., 2012](#))

Aphid species and related host plants of Büyükada island are reported here for the first time. 43 species of aphids belonging to 23 genera from 46 different host plants only in Büyükada were recorded. *Eulachnus pumilae* Inouye, 1939 and *Acyrtosiphon kondoi* Shinji, 1938 were described as new additions to aphidofauna of Turkey. In Yalova, southern province of Büyükada, 21 aphid taxa placed in 13 genera were identified. *Aphis fabae* Scopoli 1763 and *A. gossypii* Glover, 1854 are the most common species, like our study ([Kuloğlu & Özder, 2017](#)). Among aphid population collected host plants *Malva neglecta*, *Nerium oleander* and *Pinus* spp. are the most sampled plant species. *Aphis craccivora*, *Aphis fabae* and *A. spiracola* are the most common and important pests for several plant species. This aphid species affects plants by direct or indirect damage. Therefore, the determining of these species and their distribution areas are crucial for the control of aphids in Büyükada islands.

The determination of the aphid fauna and host plants of aphids from the study area are clearly indicated how it is important to conduct such detailed study to find out aphid-host plant relations in Turkey. Büyükada (İstanbul) has plant richness and different microclimatic areas and is isolated from the mainland. Number of the determined aphid species and collected host plants and new records are in accordance with the findings in neighboring areas and countries near to the study area ([Kuloğlu & Özder, 2017](#); [Kök & Kasap, 2019](#)). [Görür et al. \(2020\)](#) pointed out that even listing about 570 aphid species on about 1100 plant species by analyzing 13.000 samples, findings do not adequately figure out real composition of Turkey aphid fauna. Turkey has its own particular features (floristic and faunistic richness) that directly impact aphid diversity and distributions. In the neighboring countries, number of aphid fauna (Greece, 335; Iran, 328; Georgia, 320) is close to Turkey aphid composition but host plant diversity in Turkey is more ([Barjadze, Japoshvili, & Bakhtadze, 2010](#); [Alikhani, Rezwani, Rakhshani & Madani, 2010](#); [Margaritopoulos, Papapanagiotou, Voudouris, Kati & Blackman, 2013](#); [Güner, Aslan, Ekim, Vural & Babaç, 2012](#)).

#### 4. Conclusion

Due to their reproduction style, invading new areas and resulting in considerable amount of decrease in agricultural production, aphids fascinate researchers. Despite these facts, there are still many places that their aphid fauna has not been observed yet in Turkey. This study is the first detailed scientific effort dealing with the aphid species and collected host plants of Büyükada island of İstanbul region. Furthermore, because of global climate change, tourism, agricultural activities, increasing international trades and transport over the last two decades, introduction of non-native species, including aphids has increased ([Kollar & Barta, 2016](#)). Büyükada is one of the most important tourism center of İstanbul. So non-native host plants and aphid species are easily introduced and distributed in all parts of the island ([Kantarci, 1984](#)). Büyükada has impressive natural and exotic plant species so this introduction can be damage to them. Because Turkey has several natural areas such as Büyükada Island, the findings of the presented study strongly encourage researchers to carry out similar studies.

## Acknowledgement

These results are a part of Hayal AKYILDIRIM BEĞEN's Master Science Thesis and some part of this study published IVth Turkey Plant Protection Congress. This study is a original research article.

## Author Contributions

Hayal AKYILDIRIM BEĞEN: Investigation, collected data, performed the analysis and wrote the paper.

Gazi GÖRÜR: Investigation, resource, review and wrote the paper.

## Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Akyürek, B., Zeybekoğlu, Ü. & Görür, G. (2010). New records of aphid species (Hemiptera: Aphidoidea) for Turkish fauna from Samsun province. *Turkish Journal of Zoology*, 34, 421-424. Retrieved from: <http://journals.tubitak.gov.tr/zoology/issues/zoo-10-34-3/zoo-34-3-18-0810-16.pdf>
- Akyürek, B., Zeybekoğlu, Ü. & Görür, G. (2011). Further contributions to the Turkey Aphid (Hemiptera: Aphidoidea) Fauna. *Journal of Entomological Research Society*, 13 (3), 101-106. Retrieved from: [https://www.researchgate.net/publication/289078208\\_Further\\_contributions\\_to\\_the\\_Turkey\\_Aphid\\_Hemiptera\\_Aphidoidea\\_Fauna](https://www.researchgate.net/publication/289078208_Further_contributions_to_the_Turkey_Aphid_Hemiptera_Aphidoidea_Fauna)
- Alikhani, M., Rezwani, A., Rakhshani, E. & Madani, S.M.J. (2010). Survey of aphids (Hem., Aphidoidea) and their host plants in central parts of Iran. *Journal of Entomological Research*, 2 (2), 7-16. Retrieved from: <https://www.researchgate.net/publication/230839002>
- Barjadze, S., Japoshvili, G. & Bakhtadze, N. (2010). New records for the Georgian aphid fauna (Hemiptera, Aphididae). *Zoology in the Middle East*, 50, 140-141. Retrieved from: [https://www.researchgate.net/publication/248092122\\_New\\_records\\_for\\_the\\_Georgian\\_Aphid\\_fauna](https://www.researchgate.net/publication/248092122_New_records_for_the_Georgian_Aphid_fauna)
- Barjadze, S., Özdemir, I. & Blackman, R. (2014). Two new species of Aphidini Latreille, 1802 (Hemiptera: Aphididae) from Turkey. *Zootaxa*, 3873(2). Retrieved from: <https://www.biotaxa.org/Zootaxa/article/view/zootaxa.3873.2.6>
- Barjadze, S., Blackman, R. & Özdemir, I. (2015). A new species of Aphis Linnaeus (Hemiptera, Aphididae) living on Teucrium polium L. (Lamiaceae). *Zootaxa*, 4057 (2): 248–256. Retrieved from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26701477/>
- Blackman, R.L. & Eastop, V.F. (2020). Aphids of the world's plants. An online identification and information guide. Retrieved from: <http://www.aphidsonworldsplants.info> . Downloaded on 28 February 2020.
- Çanakcıoğlu, H. (1975). *The Aphidoidea of Turkey*. İstanbul: İstanbul University Faculty of Forestry Publication. Retrieved from: <https://www.nadirkitap.com/the-aphidoidea-of-turkey-imzali-hasan-canakcioglu-kitap654139.html>

- Eser, S.İ., Görür, G., Tepecik, İ. & Akyıldırım, H. (2009). Aphid (Hemiptera: Aphidoidea) species of the Urla district of İzmir region. *Journal of Applied Biological Sciences*, 3 (1), 99-102. Retrieved from: <http://www.jabsonline.org/index.php/jabs/article/view/124>
- Fahringer, J. (1922). Eine Rhynchotenausbeute aus der Türkei, Kleinasien und den benachbarten Gebieten. *Konovia* 1, 296-307. Retrieved from: [https://www.zobodat.at/pdf/KON\\_1\\_0296-0307.pdf](https://www.zobodat.at/pdf/KON_1_0296-0307.pdf)
- Favret, C. (2020). Aphid species file (Version 5.0/5.0). (Web page: [aphid.speciesfile.org](http://aphid.speciesfile.org)) (Date accessed: November 2018). Retrieved from: <http://aphid.speciesfile.org/HomePage/Aphid/HomePage.aspx>
- Görür, G., Zeybekoğlu, U., Akyurek, B., Isık, M. & Akyıldırım, H. (2009). *Trabzon, Rize ve Artvin İllerinin Afit (Homoptera: Aphididae) Faunasının Belirlenmesi*. Tubitak Projesi, Proje numarası: 107T450.
- Görür, G., Akyıldırım Beğen, H., Olcabey, G. & Akyurek, B. (2012). The aphid fauna of Turkey: An updated checklist. *Archives of Biological Science Belgrade*, 64 (2), 675-692. Retrieved from: <https://www.researchgate.net/publication/267337017>
- Görür, G., Toper Kaygin, A., Şenol, Ö. & Akyıldırım Beğen, H. (2015). *Cinara curvipes* (Patch, 1912) (Hemiptera; Aphididae) as new aphid species for Turkish aphidofauna. *Artvin Coruh University Journal of Forestry Faculty*, 16, 37-39. Retrieved from: <https://www.researchgate.net/publication/280244383>
- Görür, G., Şenol, Ö. & Akyıldırım Beğen, H. (2019). Adıyaman, Malatya ve Şanlıurfa İllerinden Belirlenen Afit Türlerinin Türkiye Afit Faunasına Katkıları Açısından Değerlendirilmesi. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 45(2), 103-115. Retrieved from: <https://www.researchgate.net/publication/336901673>
- Görür, G., Şenol, Ö., Akyıldırım Beğen, H. & Akyürek, B. (2020). Foresights Derived from Recent Studies Conducted on Turkey Aphid Fauna. *Atatürk University Journal of Agricultural Faculty*, 51 (1), 63-68. Retrieved from: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/ataunizfd/issue/52065/597925>
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. & Babaç, M.T. (2012). *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*. Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırma Derneği Yayını, İstanbul. Retrieved from: <https://www.researchgate.net/publication/273136494>
- Holman, J. (2009). *Host Plant Catalog of Aphids, Palearctic region*. Springer, Branisovska, Retrieved from: <https://www.springer.com/gp/book/9781402082863>
- Kantarcı, M.D. (1984). İstanbul Adalarının Yetiştirme Ortamı Özellikleri, Peyzajı ve Ağaçlandırılması Konusunda Bir İnceleme. *İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi Seri B*, 34, 49-69. Retrieved from: <https://forestist.org/en/istanbul-adalarinin-yetisme-ortami-ozellikleri-peyzaji-ve-agaclandirilmesi-konusunda-bir-inceleme-132624>
- Kaya, B. & Aladağ, C. (2009). Maki ve Garig Topluluklarının Türkiye'deki Yayılış Alanları ve Ekolojik Özelliklerinin İncelenmesi. *Selçuk Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, 22, 67-80. Retrieved from: <https://www.researchgate.net/publication/41484787>

- Kollar, J. & Barta, M. (2016). The first record of tulip tree aphid, *Illinoia liriodendri* (Hemiptera: Aphididae), from Slovakia. *Plant Protection Science*, 52 (2), 142-146. Retrieved from: <https://www.researchgate.net/publication/299418737>
- Kök, Ş., Kasap, İ. & Özdemir I. 2016. Aphid (Hemiptera: Aphididae) species determined in Çanakkale Province with a new record for the aphid fauna of Turkey. *Turkish Journal of Entomology*, 40 (4): 397-412. Retrieved from: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/269965>
- Kök, Ş. & Kasap, İ. 2019. Aphid (Hemiptera: Aphididae) species of the South Marmara Region of Turkey including the first record of *Dysaphis radicola meridialis* Shaposhnikov, 1964 for the aphid fauna of Turkey. *Turkish Journal of Entomology*, 43 (1): 63-78. Retrieved from: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/668506>
- Kuloğlu, I. & Ozder, N. (2017). Aphids (Hemiptera: Aphididae) on Ornamental Plants from Yalova Province, Turkey. *COMU Ziraat Fakültesi Dergisi*, 5 (2): 69-72. Retrieved from: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/comuagri/issue/33321/333141>
- Margaritopoulos, J.T., Papapanagiotou, A.P., Voudouris, C.H., Kati, A. & Blackman, R.L. (2013). Two aphid species newly introduced in Greece. *Entomologia Hellenica*, 22, 23-28. Retrieved from: <https://www.researchgate.net/publication/320938760>
- Martin, J.H. (1983). The identification of common aphid pests of tropical agriculture. *Tropical Pest Management*, 29, 395-411. Retrieved from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09670878309370834>
- MGM (2020). Büyükada iklim verileri. <https://mgm.gov.tr/tahmin/il-ve-ilceler.aspx?il=ISTANBUL&ilce=BUYUKADA#/> Downloaded on 11.04.2020.
- Remaundièrè, G., Toros, S. & Özdemir, I. (2006). New contribution to the aphid fauna of Turkey (Hemiptera:Aphidoidea). *Revue Française d'Entomologie*, 28, 75-96. Retrieved from: <https://www.semanticscholar.org/paper/>
- Şenol, O., Akyıldırım Beğen, H., Gorur, G. & Demirtaş, E. (2015a). New additions and invasive aphids for Turkey's Aphidofauna (Hemiptera: Aphidoidea). *Turkish Journal of Zoology*, 39, 39-45. Retrieved from: <https://www.researchgate.net/publication/267336891>
- Şenol, Ö., Akyıldırım, H., Görür, G., Demirtaş, E. (2015b). New entry for the Turkey aphidofauna [Hemiptera: Aphidoidea]. *Acta Zoologica Bulgarica*, 66 (1), 133-136. Retrieved from: <https://www.researchgate.net/publication/267336790>
- Toper Kaygın, A., Gorur, G. & Cota, F. (2008). Contribution to the Aphid (Homoptera: Aphididae) species damaging on woody plants in Bartın, Türkiye. *International Journal of Engineering Science*, 2 (1), 83-86. Retrieved from: <http://ijnes.org/index.php/ijnes/article/view/382>



# The Use of Graph Databases for Artificial Neural Networks

Doğa Barış Özdemir<sup>1</sup>, Ahmet Cumhuri Kınacı<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Computer Engineering, Faculty of Engineering, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey

<sup>2</sup>Department of Computer Engineering, Faculty of Engineering, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey

## Article History

Received: 08.05.2020

Accepted: 14.12.2020

Published: 20.03.2021

## Research Article

**Abstract** – Storing and using trained artificial neural network (ANN) models face technical difficulties. These models are usually stored as files and cannot be run directly. An artificial neural network can be structurally expressed as a graph. Therefore, it would be much more useful to store ANN models in a database and use the graph database as this database system. In this study, training and testing stages of ANN models are provided with software that will allow multiple researchers to conduct joint research on ANN models. The developed software platform is aimed to increase the representation power of the currently used methods by transferring the models developed in the popular ANN frameworks used today. With the study conducted, even someone who has started learning artificial neural network models from scratch will see the process and can visually develop their own model. When models are stored in the graph database, it will be easier to making versions and observing how the model grows. In addition, data to be input and output to the model can be stored in this database, also. In order to feed ANN models with input data and produce outputs, the graph database's own query language was used. This eliminates the dependency on another software library.

**Keywords** – Collaborative neural network model training, database based artificial neural networks, graph-based artificial neural networks, representation of artificial neural networks, visualization of artificial neural networks

## 1. Introduction

Most of the advances in artificial intelligence are based on statistical models. The majority that provides the most comprehensive advances in statistical models is artificial neural networks. The artificial neural network is the model in which the learning mechanics of the human brain is applied roughly in the computer environment. The artificial neural network has computational units called neurons as in the human brain. Neurons are connected by structures called synapses with weights. The calculation in neurons is provided by multiplying the information in the neuron with the weight in the synapse. In artificial neural networks, with the bond of synapses between neurons and the formation of layers of neurons, it creates network models as in the human brain. With the study of [McCulloch & Pitts \(1943\)](#) first artificial neuron proposed mathematically. Artificial neurons also called as Threshold Logic Units. With the development of artificial neurons, a base mathematical method for neural network models has been prepared, and the artificial neural network era has been started. With the study of [Rosenblatt \(1958\)](#) first artificial neural networks were founded. The first artificial neural network called as Perceptron. Perceptron algorithm learning is linear. In not linear separable data space, Perceptron can't learn the classes of data space. Perceptron learning is based on [Hebb \(1949\)](#) study. By saying that information is stored in the links between neurons, [Hebb \(1949\)](#) suggested that the actions that stimulate or inhibit the neuron are in the information between the inputs and the bonds. The basic

<sup>1</sup> [dogabarisozdemir@gmail.com](mailto:dogabarisozdemir@gmail.com)

<sup>2</sup> [cumhur.kinaci@comu.edu.tr](mailto:cumhur.kinaci@comu.edu.tr)



principle of Hebb theory is to strengthen the bond between two neurons if they are active at the same time and weaken the bond if they are not active at the same time.

Minsky & Papert (1969) showed that in response to the misconception that Perceptrons, formed by the widespread use of Perceptrons, can solve all kinds of problems, artificial neural networks can only solve linear problems. In their work, they aimed to learn the XOR logic gate as an example. With the failure of the model in the example, they caused the era of artificial neural networks to pass into stagnation. After 10 years of recession, when Kohonen (1982) offered a method for self-organizing neural networks, artificial neural networks began to gain popularity again. At the same time, Hopfield (1982) and Hopfield (1984) also contributed to popularization by laying the foundations of new models with his contributions to the mathematical foundations of artificial neural networks in his studies. Thus, Hopfield has shown that artificial neural networks can be generalized and solutions can be produced to problems that are difficult to solve with computer software. Hopfield solved the difficult to solve the Travelling Salesman Problem with the artificial neural network he established. Rumelhart, Hinton & Williams (1985) developed the capabilities of artificial neural networks by introducing the concept of error backpropagation in artificial neural networks. Modern neural networks are divided into input, hidden and output layers based on multilayer perceptrons with backpropagation (Rumelhart et al., 1986). These models are also called recurrent neural networks.

While modern artificial neural networks perform learning, they multiply the weights in the connections between neurons by the input and achieve results by adding the bias value on it. The bias value can be a fixed value or a dynamically changing value. To choose a fixed value, the researcher must know the data space well. Even if the data space is well known, the designed ANN may not achieve the desired result. It is also called the learning rate instead of bias. The part of summing these results and writing them to the neuron is called the summation function. Although there are different types of sum functions, the most common is the summation of all calculated inputs in links. With this calculated result, activation functions decide whether the neuron will be active or not and what kind of output it will produce for the input. The most important feature of the activation function is to ensure the nonlinearity of the artificial neural network. While activation functions take on this important task, besides the selection of nonlinear functions, their derivatives should be calculated with low computational costs. Binary Step, Linear, Sigmoid (Cybenko, 1989), Tanh, ReLU (Nair & Hinton, 2010), Leaky ReLU (Maas, Hannun & Ng, 2013), SoftMax (Goodfellow, Courville, Bengio, 2016) activation functions are the most commonly used activating functions. The activation functions vary according to the data types and output types in the data space, as well as the architecture of the ANN model, established. While using the Linear function while solving linear data space problems, the Binary Step function is used for the neuron output that needs to be binary. It is often used because the sigmoid function is nonlinear and its continuous derivative is available. For example, Sigmoid function is frequently used in multilayer perceptron models. The sigmoid function produces outputs between zero and one. When calculations are made with extreme input values in sigmoid functions, obtaining outputs converging to zero causes gradient loss problem. This approach provides slow learning and prevents getting closer to the desired global minimum point by ensuring that the local minimum points are stuck. Unlike the Sigmoid function, Tanh function obtains output between -1 and +1 values. Although a larger output area is obtained compared to the Sigmoid function, still the disappearing gradient problem cannot be avoided with Tanh function. The ReLU function takes inputs between 0 and infinite values, and its output is either 0 or 1. The calculation cost of ReLU is less than the Sigmoid and Tanh functions. While ReLU accelerates the calculations with inputs in the zero value region, it may cause the learning not to occur because the derivative values in the region are zero. This problem is called the dying neuron or dying ReLU problem. In response to this problem of ReLU, Leaky ReLU function is revealed to ensure that the outputs are not zero. In Leaky ReLU, values between negative infinity and positive infinity are obtained. In Leaky ReLU, it is ensured that a zero result is not obtained by adding the leakage value. Thus, it is ensured that

neurons do not die. Softmax preferred in multi-class ANNs that have more than two class such as Sigmoid function. Softmax gives the probability of its result between 0 and 1 with other classes.

There are three main types of learning in artificial neural networks, depending on the problem to be solved and the data set. Each type of learning has advantages as well as disadvantages. With supervised learning, the researcher must have a command of the problem and know the intended outcomes after the solution of the problem (Öztañır, 2018). The desired outputs and the inputs of these outputs must be marked by the researcher. While supervised learning is being executed, the marked data sets are divided into two parts as training and testing (Tosun, 2007). Generally, the training data set covers a bigger part than testing data set. It aims to reveal a pattern by making error calculations with its proximity to the targeted outcomes by learning with the artificial neural network training data set. The test data set is used to understand the performance of models that are thought to have a high enough performance in data they have never seen. It is a frequently used and generally accepted learning model in classification and estimation problems when the problem space is known. The unsupervised learning method is used in the solution of clustering problems where the problem space is not known and cannot be marked. It aims for the neural network to self-organize to identify clusters and split data (Çuhadar & Kayacan, 2005). Researchers become able to classify results obtained in unsupervised learning by comparing them with real-world problems. The main purpose is to separate the data rather than the solution to the problem. In reinforcement learning, a model in the training process presents the outputs to the researcher and waits for the markup. It is used in situations where marking could not be done before. Model learning takes place in a long time as it needs expert support for each output. It is used in fields such as medicine where critical decisions are made. For example, when it is desired to determine the disease with the test results of a patient, the model examines the data and decides then shows the doctor. The doctor examines the detection and provides feedback to mark it as true or false. This model, which has been learned with support over a long time, can obtain more accurate outputs.

Until now, not all problems have been solved with a single artificial neural network type. For this reason, many different models with proven problem-specific advantages have been developed and continue to be developed. Widrow & Hoff (1960) revealed the learning method of feed-forward adaptive neural neuron with their study. Adaline as known as the adaptive linear neuron is the simplest of all neural networks and uses reinforcement for learning. It is insufficient to solve complex problems due to its linear operation. The multi-layered form of Adaline is called Madaline. Madaline consists of three layers as input, hidden and output layer. Madaline consists of a combination of many Adaline neurons. Madaline has been used for a wide variety of applications such as voice recognition, character recognition, weather prediction, and adaptive control (Widrow & Lehr, 1990). Due to the inability to backpropagation, its use has not become widespread after its first release. Tank & Hopfield (1986) applied the logic of showing the state of the brain in a box in artificial neural networks with their study. The Hopfield model, with its single layer and fully connected neurons, enables the system to converge to a state with its current inputs. With this method, which is self-organized and mimics the state of the brain during learning, solutions are sought for optimization problems. Carpenter & Grossberg (1990) conduct unsupervised learning for classification problems with the adaptive resonance theory they developed. With the adaptive resonance theory, it is aimed not to lose the previously learned information on neural networks. It contains two layers as input and output, but the number of neural networks in the layers changes dynamically. Ackley, Hinton & Sejnowski (1985) introduced the concept of the energy function network with the Boltzmann machine they developed. The Boltzmann machine, which differs from the Hopfield network that it contains hidden layers, works by aiming at minimizing the energy function. It contains a layer to which all neurons are fully connected. The restricted Boltzmann machine model introduced by Smolensky (1986) as Harmonium. Unlike the Boltzmann machine, the restricted Boltzmann machine does not contain links within each layer and contains hidden layers with feedback input. With these restrictions, more effective learning has been achieved. Moody & Darken (1989) presented a generalizable convergence model with their study. The model is called a radial basis function.

The difference from the feed-forward network is that it has a fast learning speed and can only give true or false values. It is used in time series problems and system control areas. Unlike other neural networks, Kohonen (1990) does not keep neurons in the system by keeping the connection weights in vectors. Thus, new neurons can be included in the system and dynamism is given to the network. The proximity of the weight vectors in neuron bonds to the winning vector is calculated by the dot product. This method is called the learning vector quantization. Hochreiter & Schmidhuber (1997) carried recurrent neural networks forward by working on a long short-term memory model. LSTM tries to obtain meaningful outputs with data in old and new times by including input, output and memory layers. They have proven successful in speech recognition and writing recognition. In their study, Cho et al. (2014) add a forgetting layer to LSTM models and determine how much past data will be remembered and when it will be forgotten. Thus, they developed LSTMs and brought an important model to the literature that will work with high performance in subjects such as music modelling and natural language processing. Goodfellow et al. (2014) are trying to generate new data with patterns learned through their generative adversarial networks study. It gives outputs to use the learning from the problem data to generate synthetic new data that cannot be understood by human beings. It works with performance on subjects such as ageing human face images, generating new photographs, and generating paintings. The widespread use of multi-layer networks and the increase in computing power in computers led to the emergence of artificial neural networks, which consisted of several layers, to be networks of hundreds of layers. These artificial neural networks, which can contain dozens of layers and artificial neural networks that serve different purposes of learning, are called deep artificial neural networks. Nowadays, it is seen that deep neural networks work intensely with visual data. Learning in deep networks is provided by methods under the title of deep learning. LeCun, Bottou, Bengio & Haffner (1998) made the most developed study of deep learning with convolutional neural networks. Convolutional neural network name comes from the convolution process on the data by the network.

Artificial neural networks are simply divided into three main different layers. These are the input layer, the hidden layer, and the output layer. The structures where data and relationships are kept and processed as in the human brain and artificial neural networks coincide exactly with the functioning of graphs. With Euler (1741) study the graph theory came out with the famous Seven Bridges of Königsberg problem. It is created by the nodes that define the model objects and the relationships between them. The graph is a mathematical model created to describe the relationship between objects with each other.

The problem data to be learned while performing the learning must be entered from the neurons in the input layer. Calculations should be made in hidden layers and results should be transferred to the output layer. If the results are not performing well in the output layer, the same steps should be repeated according to the type of ANN model. As the model to be learned becomes more complex, one hidden layer is not sufficient and models that need more than one layer are formed. When learning is done with traditional methods, it cannot be observed by the researcher, who makes model training due to the black box structure of the neuron and synapse data in the hidden layer (Touretzky & Pomerleau, 1989). Model design is carried out based on outputs and error rates and parameters. This approach causes researchers to work on artificial neural networks to create the model based on the output parameters and not to follow them visually.

## 2. Materials and Methods

Today, in various applications, data can be displayed naturally in graph structures. Graph structures can be sequential, tree, one-way, bidirectional. In artificial neural networks, nerve cells can be expressed with nodes in graph databases, and links between artificial nerve cells can be expressed in relationships in graph databases. Various studies have been conducted in the literature that deals with the subject of artificial neural networks and graph.

Nekhaev & Demin (2017) visualized the neural network and its hidden layers to solve the problem of the incomprehensibility of the operation of deep artificial neural networks. Liu (2017) significantly reduced the

search time by performing the searches on the neural network they dealt with in the article they published on the graph structure. Wang (2018) have realized better learning compared to other models in the field of reinforcement learning with the learning structure policy in graphical neural networks developed for multilayer neural networks. Muhammad & Halim (2016) examined the graphs in artificial neural networks and data representation in machine learning methods in the best visualization methods and showed them as one of the successful methods. Olden & Jackson (2002) investigated the black-box structure in artificial neural networks with their study and drew attention to the problem of finding out which nerve cell and its relationship is more valuable due to the black-box status of models in studies conducted in the environmental science of artificial neural networks. To solve the problem, they created a randomness procedure to test the statistical significance of neurons in terms of individual link weights and the overall effect of each input variable. They provided removal of link weights that did not significantly contribute to the performance of the artificial neural network and facilitated the interpretation of the direct-acting model of the input variables on the response. With the randomization procedure, they provided weightless neuron bonds and removal of insignificant input variables, thus attempting to make sense of the black box structure by reducing the complexity of the neural network. Witt, Bux, Gusew & Leser (2019) states that the black box structure is formed in artificial neural networks due to the development of the model with performance metric patterns instead of tracking the internal dynamics and working densities. Battaglia, Hamrick, Bapst, Alvaro & Razvan (2018) investigated the question of which structural representations can artificial intelligence be provided with human skills. In their study, they concluded that artificial intelligence and human skills will be achieved through gains in the rich assets, relationships and combined generalization areas in graph networks. Uwents, Monfardini, Blockeel, Gori & Scarselli (2010) made a comparison between relational neural networks and graphical neural networks, which are graphical neural network approaches, and concluded that graphical neural networks perform higher in relational data in the training of biological datasets. Studies show that the representation of artificial neural network nodes and relationships is crucial to understand how models work efficiently as a solution to the problems. In this study, presented a new method which enriches representation and working collaboratively on ANN models.

Armenta & Jodoin (2020) has mathematically examined the subject of representation of artificial neural networks in their study. They represented artificial neural networks with quivers with their work and brought a new form of representation to the literature. The mentioned studies indicate that known methods lack the representation of artificial neural networks. In their work, Choromanska, Henaff, Mathieu, Arous & LeCun (2015) cited an example of lack of representation by referring to his study. Buhrmester, Münch & Arens (2019) examined the black-box structure of artificial neural networks in deep learning and compared the studies that break black-box structures in the field of computer vision.

There are studies in the literature aiming to run artificial neural networks in databases. However, there is no artificial neural network study implemented in graph databases. It is suggested in the studies that the artificial neural networks will be expressed better by realizing them in databases. In his study, Schikuta (2008) presented an exemplary approach to implement the object-oriented method and artificial neural networks in relational databases. Using the Iris database system as a database, suggesting that all kinds of artificial neural networks can be expressed and flexibility can be added to networks with the object-oriented approach. Iris database is Knowledge-based. He separated the learning of neural networks from the architecture of the model and kept them in the database as knowledge rule sets. In the method we propose, an environment where theoretical artificial neural networks can be implemented exactly without the need for these transformations and separations is presented. Cvitkovic (2020) showed that by implementing artificial neural networks in relational databases, data extraction and feature engineering efforts in artificial neural networks will be overcome. It performs calculations on graphs by converting neural networks in relational databases into graphs. In our study, calculations can be performed directly on graphs without conversion from relational databases. It came out for the same purposes as our work and a mathematical basis of artificial

neural networks in databases is explained. Lam, Minh, Sinn, Buesser & Wistuba (2018) achieved successful results by presenting a method that performs feature extractions in artificial neural networks that they keep in relational databases. The similarities with our work are the unique key requirement for each entity in the neural network and the requirement to declare a model schema. It is difficult to determine a schema in relational databases. It focuses on static schemes. In the study we present, a model diagram can be created visually and all kinds of data can be kept. It is possible for each entity to hold different schemas dynamically in graph databases.

In their study, Yahia & Elswawi (2003) realized by keeping the neurons and connections in the ANN architecture in the relational database tables. All functions such as activation functions learning rules are also kept in the database. They realized the learning processes of ANN models by writing 4GL procedures. They wrote a static sample frontend program and created a prototype that learned OR gate in relational databases. In our work, dynamic graphs can be created with the dynamic interface. In relational databases, the relationships with entities are kept in tables and they are not the exact representation of artificial neural networks. The need for an intermediate table in many-to-many relationships will make it difficult to keep more complex models such as deep learning models in the database. In the table operations to be made in relational databases, for example, when a change is desired to be made in a table that holds the many-to-many relationship between two entities, corruption may occur in the already held data. Relational databases are not suitable for this type of dynamic and generalizable ANN representation, as their columns tend to be static and not update by their nature. There are very few studies in the literature to implement artificial neural networks in databases. Therefore, the presented study creates new areas of thinking about artificial neural networks.

Scarselli, Gori, Tsoi, Hagenbuchner & Monfardini (2008) have mathematically expressed computational processes such as learning and activation functions in the graphical representation of neural networks with their graph neural networks study. They supported the graph neural network model they presented with examples on subgraph matching, the mutagenesis, and the web page ranking. In our study, generalizable methods can be obtained by using the mathematical approaches they suggest. The point they focus on in their study is about the learning status of the data in the graph architecture. For this reason, it does not exactly coincide with our work. In our study, neural network models are defined and data input is made to neurons. In our study, there is no mention of learning on the data already in the form of graphs.

In this study, a new approach is aimed to propose to overcome current problems of traditional systems. It is the first study to implement artificial neural networks in graph databases. The study aims to increase the representation of the artificial neural networks and to enable them to develop new types of artificial neural network models by increasing their representation rather than making the processes in the most efficient neural network models. A comparison with a widely accepted library is made in Section 2.6. The developed framework is the solution to the problem that a group of researchers cannot work on the same model. The case study made offers a solution to the lack of representation in traditional methods used in artificial neural networks. With the effect of expressing artificial neural networks entirely with graphs, researchers can visually develop their models on the website. It has been shown that the black box problem can be overcome by graph representation. With the methods used in the study, the need to constantly convert the models into different formats in commonly used software frameworks has been eliminated. The developed method has been created based on these problems. For this purpose, an internet service server was established and software was designed for researchers to log in and continue joint research. To monitor and keep every moment of the artificial neural networks in the model training process, the structure where the models will be stored has been designed with the graph database. Structures were created to visualize the model and follow it live. A structure in which an artificial neural network structure can be created and transferred to the graph database has been designed. The process of transferring h5 models to the developed system, which are the model



output of artificial neural networks realized in the popular Keras framework, was designed. It has been shown that the output model of software that is accepted as Keras models can be transferred to the system can be represented in graph-based artificial neural networks. The h5 file is a data file saved in a hierarchical data format also known as HDF. It contains multi-dimensional scientific data series. H5 files are widely used in aviation, physics, engineering, finance, academic research, genomics, astronomy, electronic tools, and medicine. In the H5 file, the data are divided into two as homogeneous multi-dimensional arrays of data sets and container structures that hold data sets and other groups, making data retention simple.

## **2.1. Methodologies and technologies applied for the solution**

Modelling of a neuron and synapse structure of artificial neural networks is exactly compatible with graph structure. In the study, neurons were used to express the node in a graph structure, and synapses to express relationships. In the study, a graph-based database system and web tool have been developed for visualizing artificial neural networks, creating them visually and solving the problem of collaboration with other researchers.

The web server has been developed so that users can access the graph database and user interface. The web interface has been developed to implement user inputs and outputs. [Neo4j \(2007\)](#) has been preferred as the graph database because it has the widest usage in its field, it is open to development. Since the framework created in the study is designed as an online service, a system is required to log in and register so that users sharing the same group with the user login can view the artificial neural network they have created. To log in and address the models that users work on, an interface has been created for users to log in.

As a methodology, the webserver that forms the basis of the framework was created in the study. The Angular framework was connected to the server to enable dynamic frontend operations. Researchers can create and edit ANN models with drag and drop nodes and relationships. Intuitive actions that come into our lives with touch screens are designed to make researchers think and work on model creation step easily. A database was created and connected to the server on the Neo4j server where graph database services will be used. Thus, an environment was created to make graph-based neural networks. In [Figure 1](#), the relationships between the layers in the system architecture are shown. Neo4j database stores ANN models and serves ANNs for display. Web server executes ANN model actions which triggered from the user interface. Also, the webserver does authorization to match researchers and their ANN models. User interface handles researcher actions over ANN models and shows ANNs with graphs dynamically.



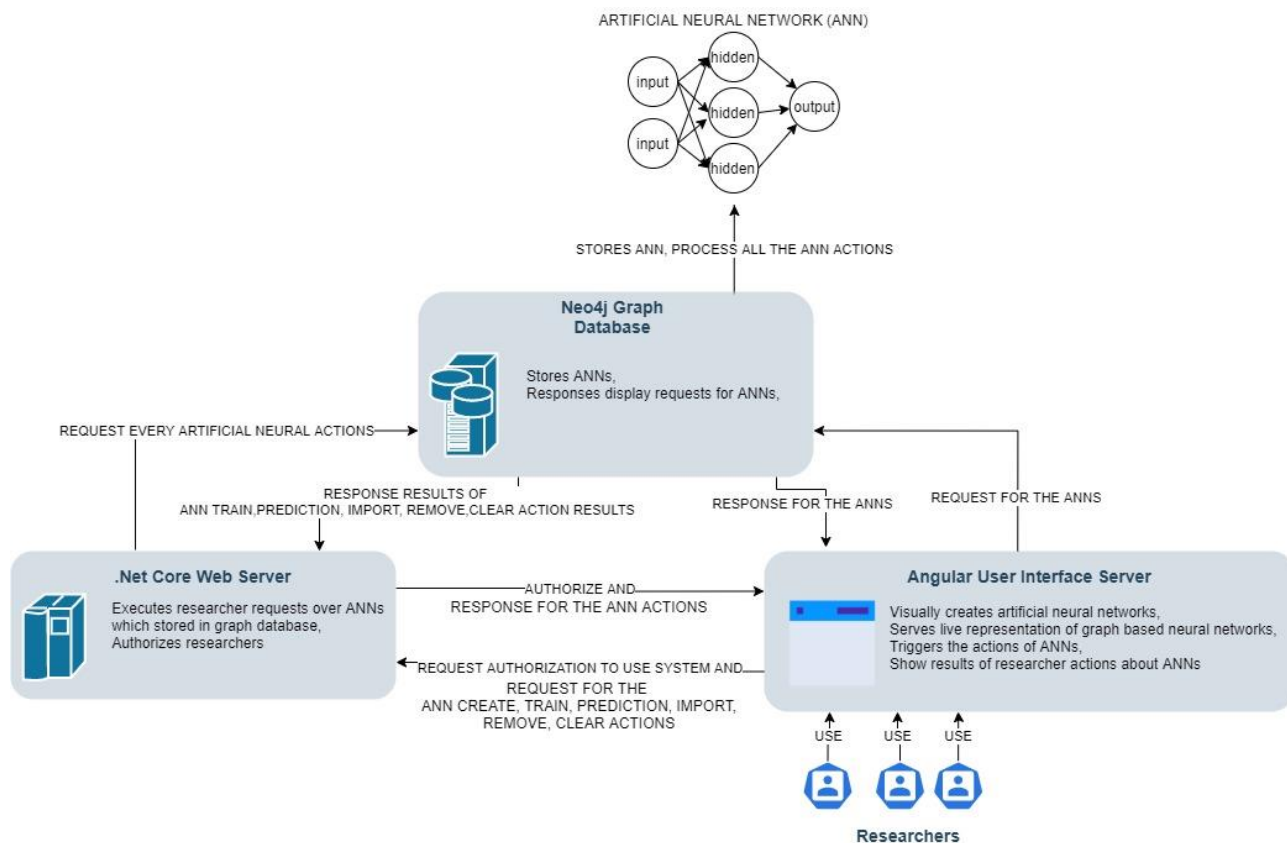


Figure 1. Software system architecture diagram shows layers of software and its relations

The software designed in the presented method works with the individual responsibility of each main part. For this purpose dynamic user interactions, backend service and graph database can work standalone. It makes the developed framework scalable. Designed system optimized to distribute heavy works, such as frontend service users' browsers is responsible for rendering large neural network models on graphs. Visually created ANN models' cypher queries are the responsibility of frontend service. Backend service is responsible to serve queries to the graph database. Also, the backend is responsible for the authentication of users. Socket communication used to dynamically serve data that is responsible for all three layers of the system.

To express, representation power of ANN models on graphs, a popular neural network Keras framework is selected. Trained Keras models are imported into the system. Also, an approach is developed to import Keras models to the system. Keras models are trained and created to show design approach. In Keras, researchers can access layers, not on the nodes. In developed model researchers that import their models to a system, can see every node on model and parameters also can see the layers if they want abstraction. Visualization of ANN models is the same one to one match as to how they are stored in the graph database. The study aims to make ANN modelling one to one representation and storing it like that. The model creation process is also.

Two different ways of representation are explained to do such storing possible. The first way is every matrix cell in multi-dimensional matrices of models are expressed as nodes. The second way is every matrix should be expressed as a node or relationship of nodes. In the study, the ways to be followed while realizing artificial neural networks in the Neo4j graph database were examined. There are also two different methods followed in Figure 12 and Figure 14.

Complex artificial neural network model results of the Keras (2017) realized in the study and transferred to graph database with the developed approach. Training of the artificial neural network model created and demonstration of the training results was realized. Technical problems encountered while creating, testing, visually observing, transferring popular ANN models are explained in the study. The estimation result of the handwritten number recognition model, which is an example problem of the convolutional neural network, in the developed system was compared with Keras. The study showed that the method developed works faster than the estimation made in Keras. A solution to problems is explained, also. The developed approach and system are shared as open-source (Graph Based Neural Network 2019).

**2.2. Creating an artificial neural network model on graph database**

In this section, the creation of artificial neural networks on graph databases using the proposed approach is explained. The actions that the researcher can take and the ANN creation process steps were examined. After the user logs in to the system from the home page, by selecting the “Create New Model” option on the left menu, they are directed to the model creation page and visually creates the artificial neural network model. Login section is shown in Figure 2. As an example, a NAND logic gate learner ANN is created on the system and the main screen is shown in Figure 3.

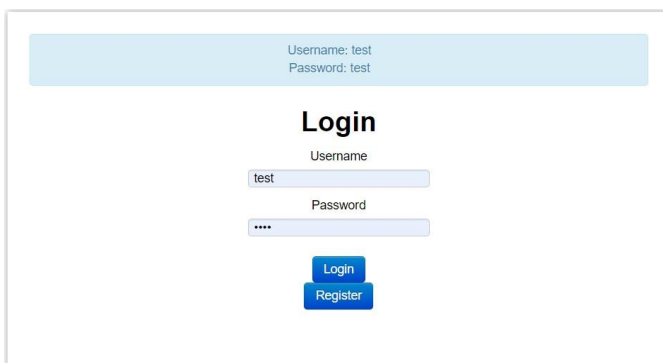


Figure 2. Researcher login screen

In Figure 3, an artificial neural network model is created to learn the NAND logic gate with a three-input model as an example over the system.

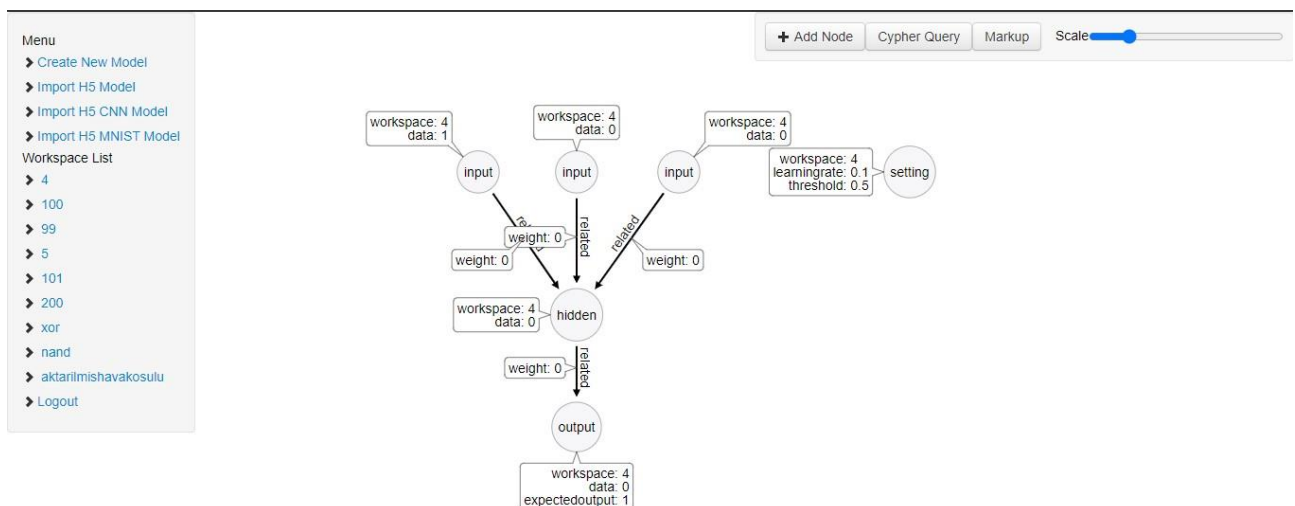


Figure 3. Visually created NAND feed-forward perceptron model

When the “Add Node” button is pressed on the interface and a node is created. To add a new node the "Add Node" button is clicked, the new nodes are displayed on the screen, and the nodes are connected by hovering over the node and dragging and dropping it on the other node. The researcher can design the entire artificial neural network by dragging and dropping with the cursor on the website, double-clicking on the node or relationship and clicking the "Add Node" button. When the created node is double-clicked, the “Edit Node” screen appears as shown in Figure 4. “Edit Node” screen is the editor for node data. A created node corresponds to the node in the graph database and also expresses a neuron in the neural network. The label must be entered to indicate that the neuron is in the input, hidden, or output layer. By writing the model's workspace, it tells the model which name will be recognized when testing and training follow-ups by the researchers. The data property indicates what data the neuron contains in its initial state.

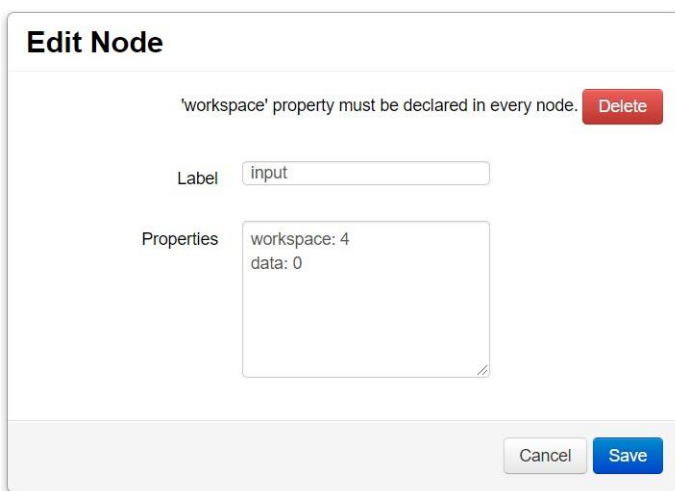


Figure 4. Node editing screen

At the same time, neurons can be dynamically created and linked, and editing screens can be opened and deleted. Relationships in the graph database are created as the equivalent of synapses to connect the neurons after the interface is created, as shown in Figure 5a.

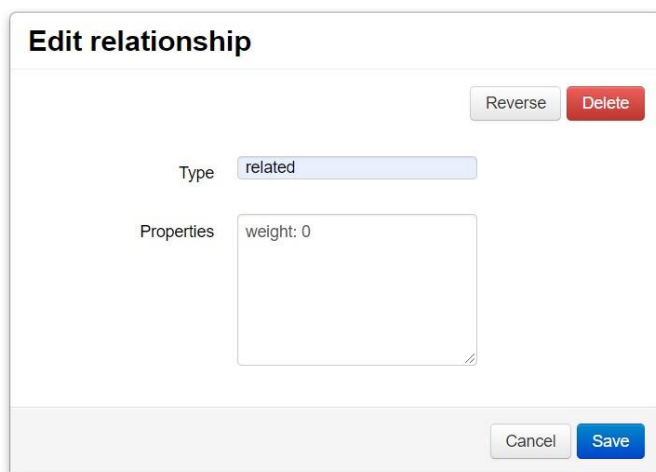


Figure 5a. Relationship editing screen

The type of relationship is used for naming. The "weight" value written in the property of the relationship corresponds to kernel, bias or weight values according to the type of model to be created. During model

training, when switching between neurons, multiply the properties in the relationship, sum, etc. transactions are made. In addition to the nodes and relationships, the setting node appears on the site, this node was created to hold the settings to be used while training, the node is displayed in Figure 3. In the model that learns the NAND gate with three inputs, the “learningrate” value expressed as the step interval is selected as 0.1, the “threshold” value of activation is selected as 0.5 and can be displayed in Figure 3. After the researcher creates the artificial neural network model, it can make it easier to display the model on the screen by changing the scale of the model. The visually created model is ready to be transferred to the graph database.

### 2.3. Transferring artificial neural network models into the graph database

After creating the artificial neural network, the researcher should display the screen with the model output written in the query language named Cypher for the transfer to the graph database. The output of the cypher query that will be run in the database of the model created on the site is displayed in Figure 5b. The data created in the query is kept to send neuron and synapse data to the graph database.

The query contains two different structures. After the “CREATE” command, neuron data is created with virtual id numbers, and then, while expressing relationships, these virtual id numbers connect neurons as they are created in the model. Using the open command on the console, how the query will be displayed in the graph database can be displayed in the new tab, and it is provided to register to the graph database with the “Create New Model” button. After the model is created, in the menu on the left, under the “Workspace List”, a line with 4 is written for the model whose workspace is created and identified as 4. 4 under the workspace list represents a model environment where the status of the model can be monitored. Model registered in graph database via the system.

Before the three input NAND perceptron model diagram is imported into the database, the Cypher query is shown to the researcher. The query appears in Figure 5b. In Figure 6, the neural network created by the researcher on the system is shown in the Neo4j Browser. The query consists of two parts. The first of these sections is the node definitions, and the second is the relation definitions. From the lines used to create a node, for example, the leading 0 in the line "(0: input {workspace: '4', data: '0'})," indicates that the first node will be created virtually. Tags are given to the nodes in the query, for example “: input” plays a role in indicating that the node is an input node. The workspace variable was created to understand the fact that it will be used in the training and test sections, which are given to the node when creating the model, and to provide ease of query. The data is used to express the data to be stored in the node. After six nodes are defined in the query, relationship definitions are made. When defining a relationship in the query for example, the line “(“0”) -[:' related '{weight:' 0.0 '}'] -> (“1”),” has a relationship between which node and which node. The direction of the relationship expressed with “->” arrow. The label of the relationship. and its weight has been defined in the weight field. In the example given in Figure 5b, in the query that creates the relationship there is a command to establish a relation between the zeroth node and first in the query between zero and one, with a weight of 0.0, with the relationship name called as related. For example without node definitions, the relations of the first input node without '0' cannot be identified in the query. “Create New Model” button should be clicked if the researcher wants to create a model in the graph database. After the researcher created the model, Figure 6 shows the ANN generated in the Neo4j database.

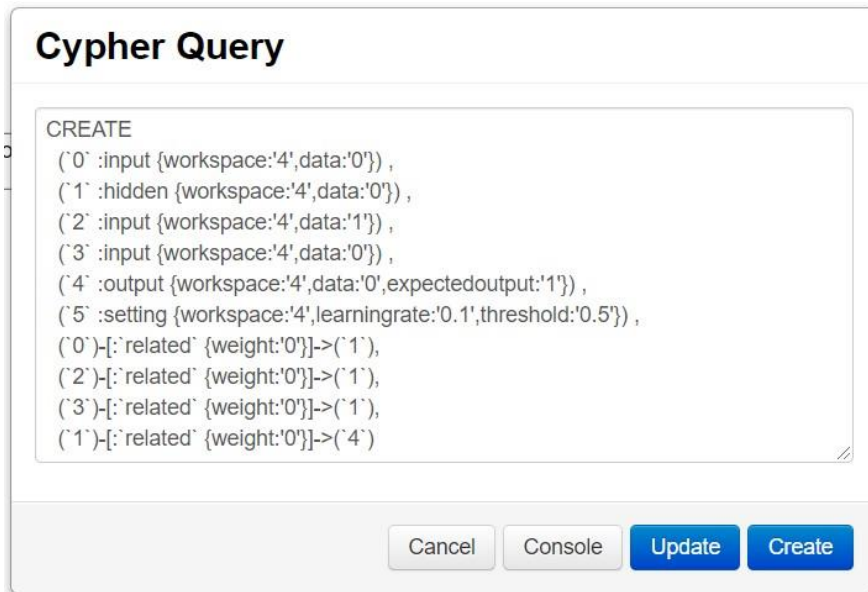


Figure 5b. NAND logic gate learner neural model Cypher query output screen

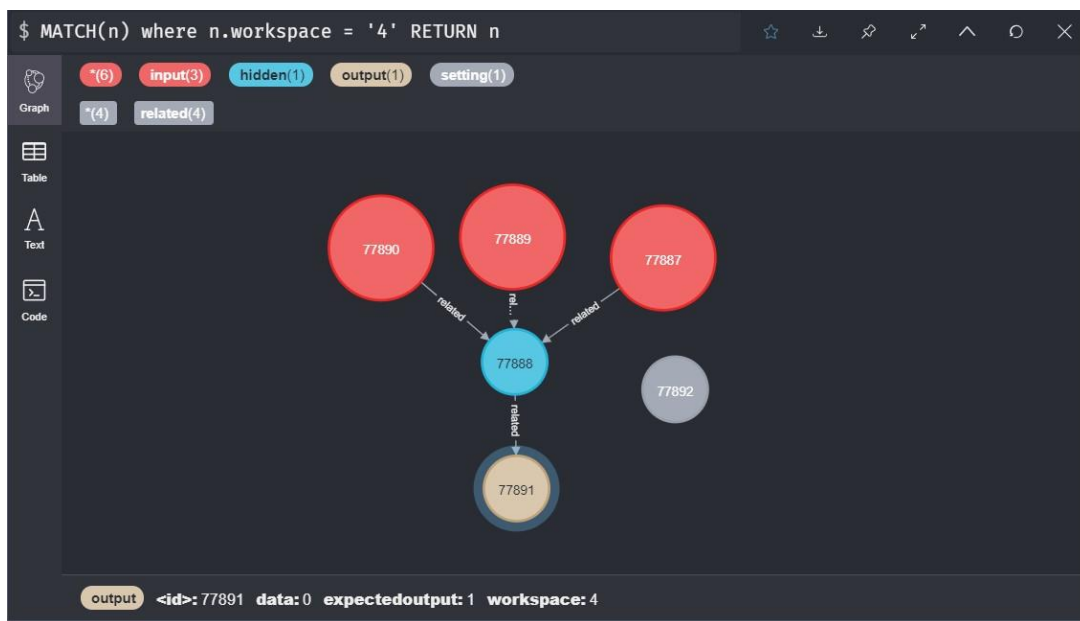


Figure 6. NAND logic gate learner ANN model representation on Neo4j browser

### 2.4. Transferring trained artificial neural models

A structure has been developed to transfer and visualize artificial neural network models and perform predictions on [Tensorflow \(2015\)](#) and [Keras \(2017\)](#) frameworks models. Models trained in Keras can be transferred to the developed system if they are exported with their configurations and weights in h5 file format.

An exemplary feed-forward neural network model for transferring the H5 format to the system was created on the Keras software framework. The model is trained to learn whether someone will play football depending on the weather, humidity, wind variables. [Table 1](#) shows the data used in the feed-forward network model and whether or not football is played as a result. It is used in the ANN model if the weather condition is sunny, 0 if it is overcast and -1 if it is rainy. Moisture value is evaluated as 0 if normal and 1 if

high. It is evaluated as 0 if the wind value is weak and 1 if it is strong. If the value of playing the game is yes, it's evaluated as 1, if no it is evaluated as 0.

The sample data set is shown in Table 1. The feed-forward Keras ANN model which decided to play football was created with the sequential definition of Keras. Tanh is used as the activation function in the input layer of the model since it must receive inputs in the range from -1 to 1. In the output layer, the sigmoid activation function is used because the outputs must be 0 or 1. Mean squared error was used for stochastic gradient descent and loss or cost function for optimization. The model training stopped when it produces values close to the desired results after the five thousand epochs have been trained and took its final form. The h5 output of the model was taken under the name “demo\_model.h5” which is provided in project codes.

Table 1  
Data set of the feed-forward model

| <b>Weather condition</b> | <b>Moisture</b> | <b>Wind</b> | <b>Play</b> |
|--------------------------|-----------------|-------------|-------------|
| Sunny                    | High            | Weak        | No          |
| Sunny                    | High            | Strong      | No          |
| Overcast                 | High            | Weak        | Yes         |
| Rainy                    | High            | Weak        | Yes         |
| Rainy                    | Normal          | Weak        | Yes         |
| Rainy                    | Normal          | Strong      | No          |
| Overcast                 | Normal          | Strong      | Yes         |
| Sunny                    | High            | Weak        | No          |
| Sunny                    | Normal          | Weak        | Yes         |
| Rainy                    | Normal          | Weak        | Yes         |
| Sunny                    | Normal          | Strong      | Yes         |
| Overcast                 | High            | Strong      | Yes         |
| Overcast                 | Normal          | Weak        | Yes         |
| Rainy                    | High            | Strong      | No          |

Using the “demo\_model.h5” example model in framework content files, with the “Import H5 Model” option on the site, firstly the “h5tojson.py” python code is converted from the h5 model to the JSON data format where the layers and neurons are easily processed. Lastly, the JSON model data converted to the graph database query with the developed framework. An example of an artificial neural network converted to a query can be seen in Figure 3. The status of the model mentioned in the study after the transfer from h5 format to the study project is shown in Figure 7. The model has been successfully transferred to show the three weather inputs via data, kernel, bias values in the feature fields on their relationship, and to show in the output node as the output whether it will play football. In Figure 7, data in all relationships and nodes are not shown, only relationships in one path are shown.



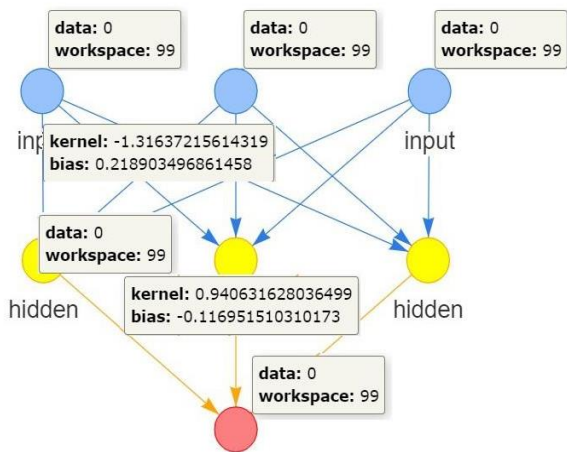


Figure 7. Representation of the transferred feed-forward h5 model

By transferring and visualizing the model into the study, which input node has the highest priority, its working structure can be observed more clearly and it enables us to watch the training and test process live with the socket connection. By transferring the model to the system and running the graph database on the server, it is prevented to have H5 output to move the model as in Keras. The view of the feed-forward model completed and transferred over Neo4j is as in Figure 8, all data and relations are made and kept on the graph database. Thus the transferred ANN which is now in the graph database can be used by researchers as desired and can be accessed online. ANN is implemented in an ecosystem that will not need the cycle again for transmission. While the model cannot be monitored visually while in Keras, all processes can be monitored visually with the proposed system. While the researchers cannot work together on the model with the method offered by Keras, they can perform collaborative studies with the method presented.

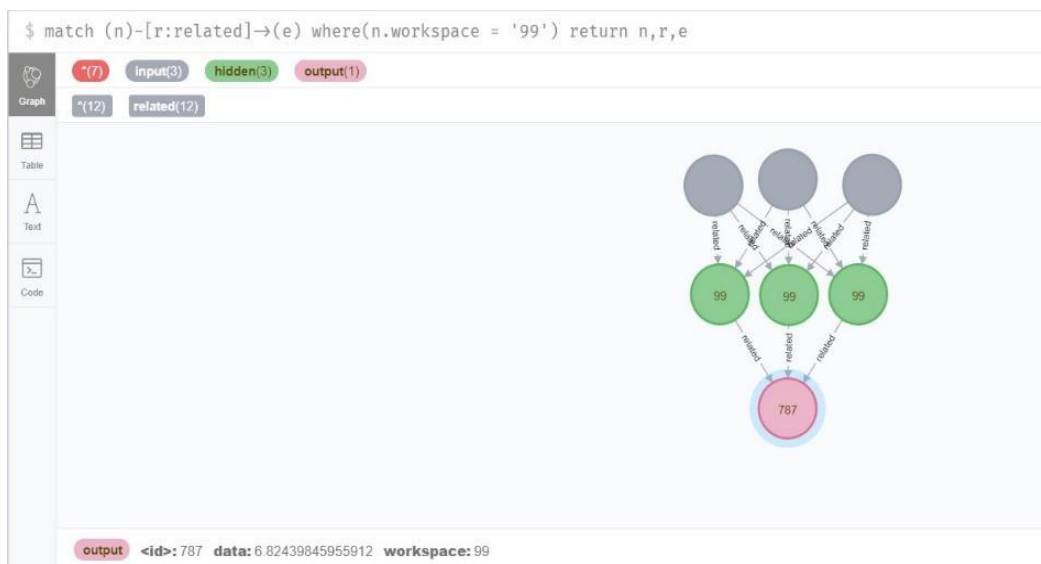


Figure 8. Query representation of the transferred h5 model in Neo4j

## 2.5. Testing the artificial neural network model on the graph database

In the widely used software frameworks such as Keras and Tensorflow, researchers observe model training and testing courses with an error rate, learning rate, etc. Model creation and testing processes are monitored from the parameters and the inference that if the model trained enough or not. While training or testing, researchers have no chance to view the visual status of the model. To eliminate this problem, the test parameters were entered into artificial neural network models on the Neo4j graph database and the status of the test was queried live with its socket communication structure. In Figure 9, a researcher is watching the test process live. By clicking on the workspace name on the left menu, the screen where the models are displayed. In the upper right menu, there is a stop button for ending live tracking, the screen where the test parameters can be entered, and the training button where the training can be started.

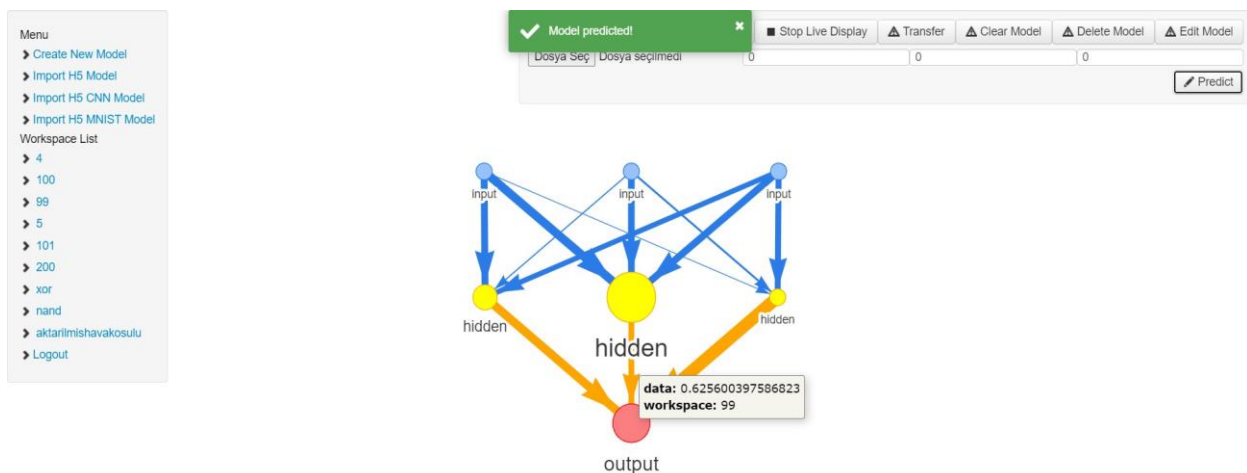


Figure 9. The screen of the researcher conducting the prediction in the feed-forward model

When the parameter input is tested with sample data such as overcast weather, normal humidity, weak wind, i.e. 0,0,0 inputs, the prediction results are calculated and stored in the database, as shown in Figure 9. In Figure 9, researcher trigger prediction process of displayed ANN. Figure 9 shows that the ANN model predicts play football with 62% probability. Another researcher can display test process at the same time and can see the prediction results. Between hidden and input layers Tanh activation function used. Between output and hidden layers, Sigmoid activation function is used.

The figure shows the current status of neurons or relationships over the site. Also, the size of the nodes refers to the size of the data. If the output data is between 0.5 and 1 it means that football will be played, if its between 0.5 and 0 football will not be played. In this case, the result of the test indicates that football will be played. It matches according to the test result and dataset. While performing the test, the data in the node is obtained by multiplying the kernel of the relationship with the previous node and adding bias on it. This continues in the same way until it reaches the output and ends when the output is achieved.

In this study, a NAND logic gate learner perceptron with three inputs was created to perform the training. As seen in Figure 10, input neurons are given [1,0,0]. The value of 1 was given as expected output. Activation will work at values above 0.5 and weights will be increased by increasing 0.1 steps.

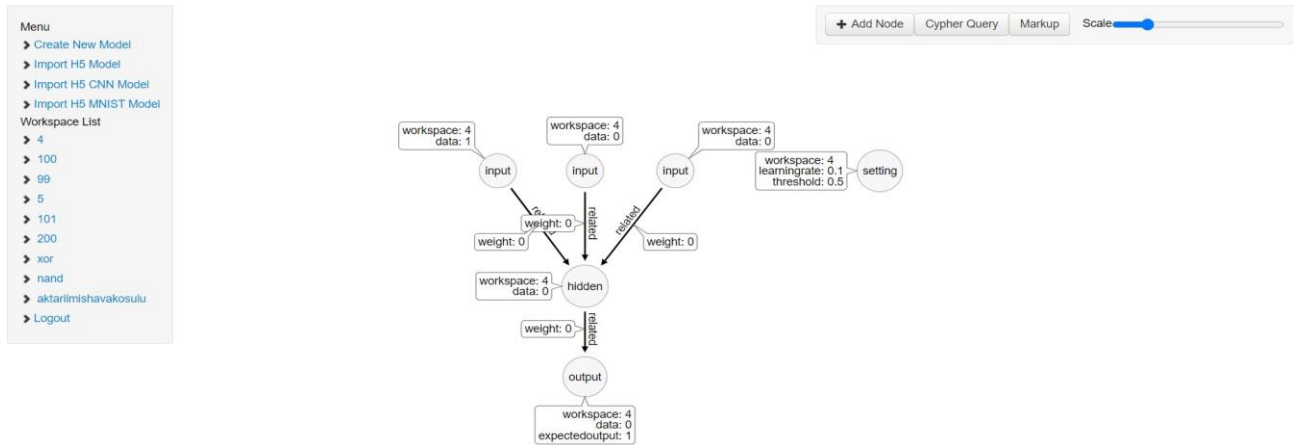


Figure 10. The image after the creation of a model that learns the NAND logic gate created by the researcher on the system.

While performing the training in Figure 11, the process can be observed live, and the result is presented to the researcher in green notification popup. The expected result was obtained in two steps and model weights were assigned. Relationship weights that increase as much as the value of learning rate in each step for learning continue to increase if not equal to expected output. All the processes in the estimation and learning stages were made in the graph database using graph theories. In the perceptron learning performed in Figure 11, the value in each input neuron was transferred by adding the weight in the relationship while passing to the next neuron. When the data value in neurons exceeds the threshold value, the activation is triggered and the outputs are found and the expected output is checked for equality. As can be seen in Figure 11, learning was stopped by providing equality to expected output in 2 steps.

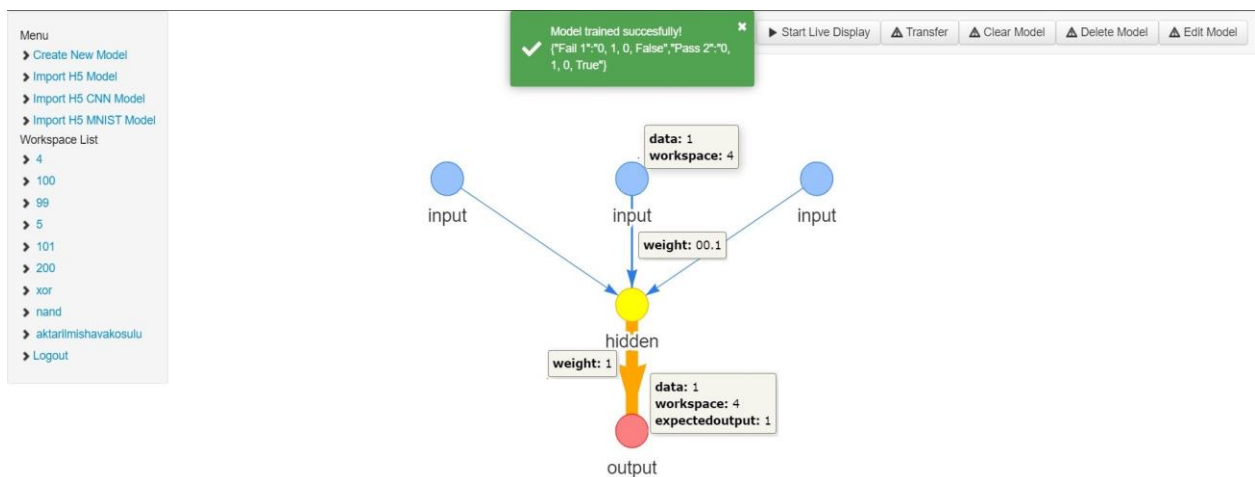


Figure 11. The panel where artificial neural network training is observed

The developed framework was also made to strengthen the representation of convolutional neural network models. The imported convolutional neural network model keeps all its data and structure in the graph database and allows it to be processed and observed. Figure 12 shows a part of the CNN model stored in the system. MobileNet version 2 (Howard et al., 2017) is used to show the import of convolutional neural models into the system. Model matrices are stored as every single matrix as a node. The way is not efficient to store big blob data in node properties as the Neo4j graph database framework suggests. Layer representation is developed to simplify visualization on large models. CNN model layer representation is

shown in Figure 13. The way of model representation on the browser can be zoomed in or out. Also, drag actions can be done on nodes, to observe better. WebGL technology has been used to facilitate the render process in the browser in networks containing many neurons and layers such as CNN.

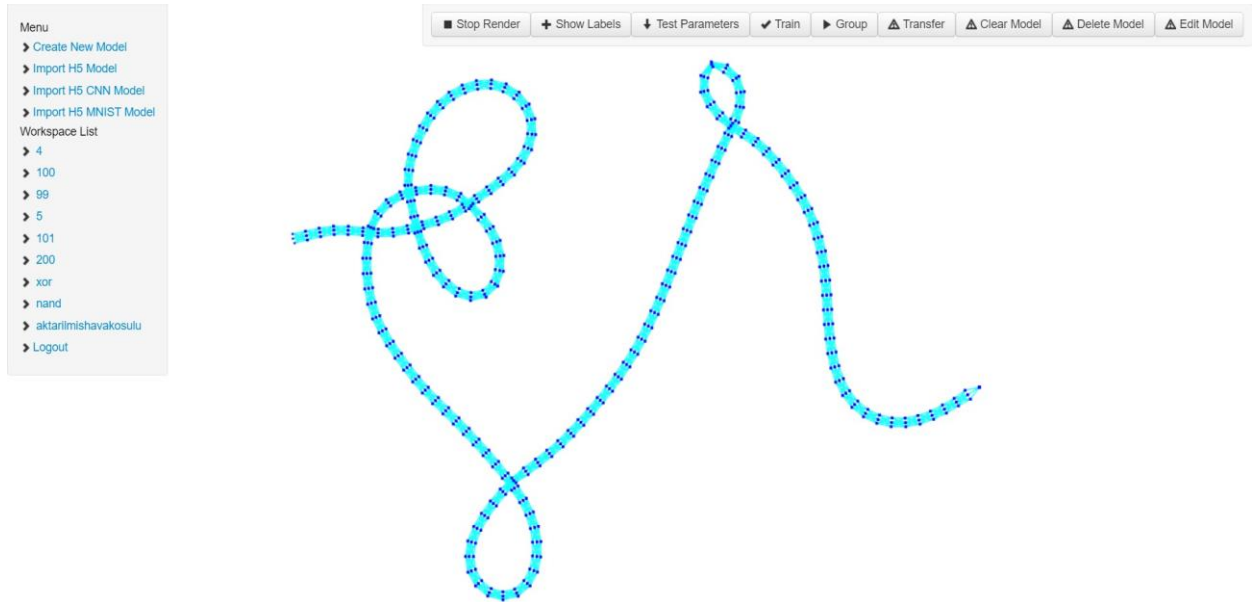


Figure 12. Imported MobileNet convolutional neural network representation

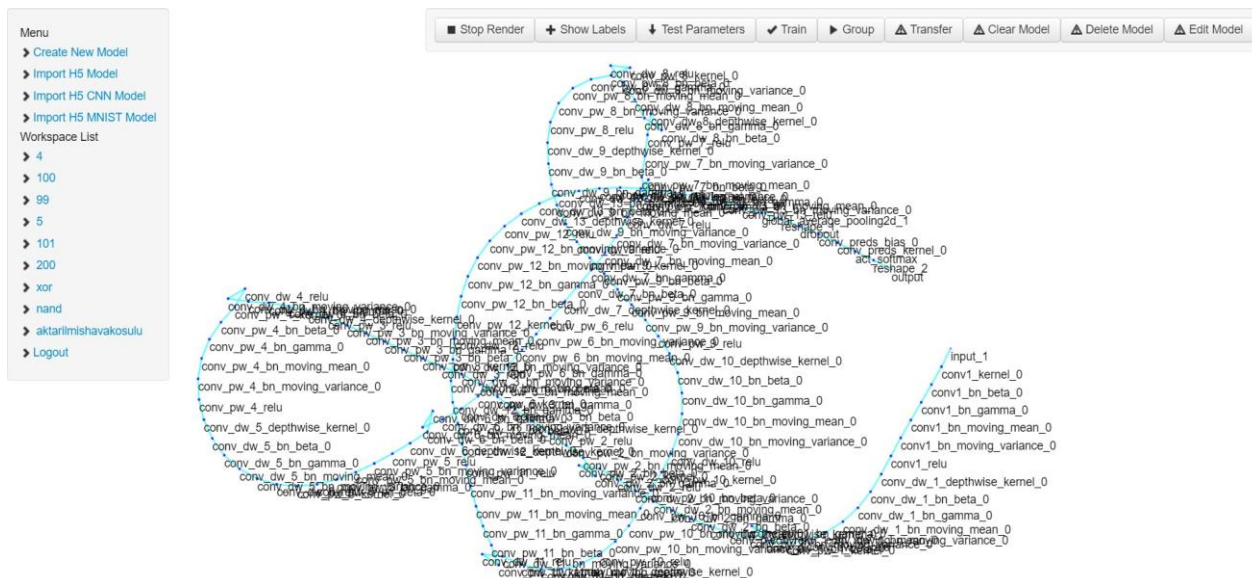


Figure 13. Layer representation of MobileNet network

Well known handwritten digit dataset MNIST (LeCun, Cortes & Burges 2010) trained with Keras framework and imported to the system from hd5 file format of the trained model. The model predicts 28x28 handwritten digits. MNIST data set was a performance criterion of early computer vision machine learning times. Since the MNIST data set is an important toy case, it was preferred in this study. With the importing of the model, every single cell in matrices represents a node to show different ways of holding data in the graph database. The model is shown in Figure 14 with every node represents a cell in the kernel, bias matrices and their output matrices. In Figure 14, nodes in the graph stores matrix cell data on properties. Relationships between

nodes represent connections of nodes and these connections can be virtualized as layer nodes as seen in Figure 15. In Figure 15, the grouping feature of the system executed then the same label nodes of ANN shown as layers to the researchers. Any kind of parameter of ANNs in the system which node or relationship has can be shown with node representation on the web site in case the researcher wants to see. Researchers see the model life cycle and how it's stored and processed. Nodes standing apart on the left represent the input and first matrix multiplier, respectively. Large nodes on the of the nodes forming the ring represent the output of the bias layer. The right side of the nodes forming the ring represents the output of the kernel layer. Nodes that form the ring shape are holding big matrices cell data on nodes. While testing the model every node is used to calculate outputs.

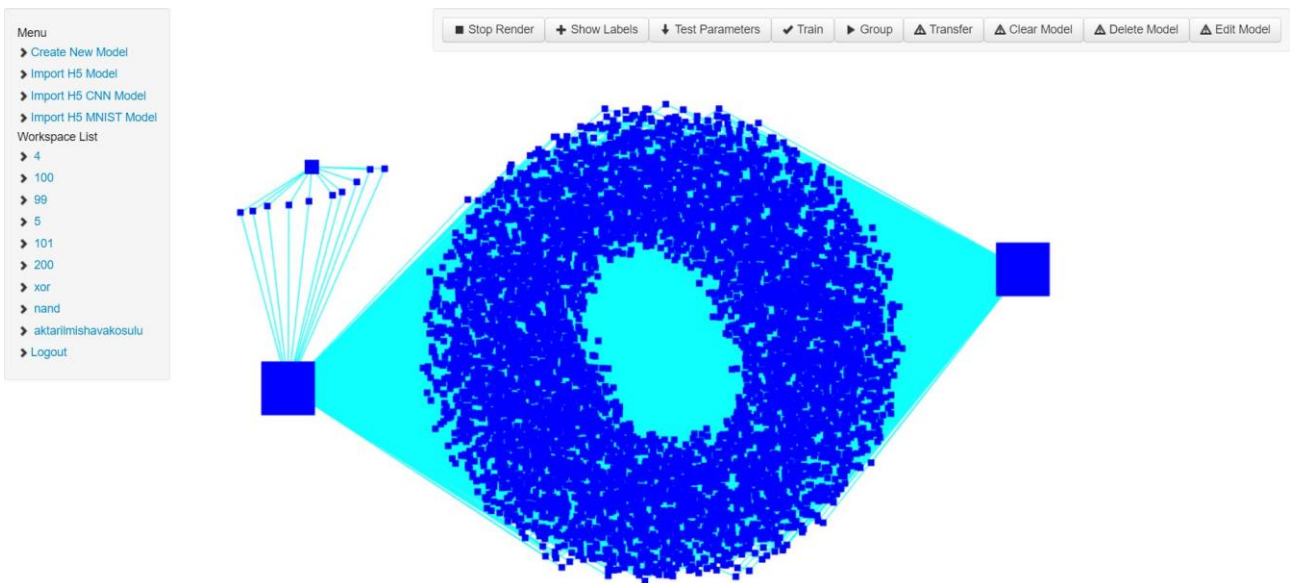


Figure 14. Imported MNIST handwritten digit dataset trained ANN model display in graph form on web site

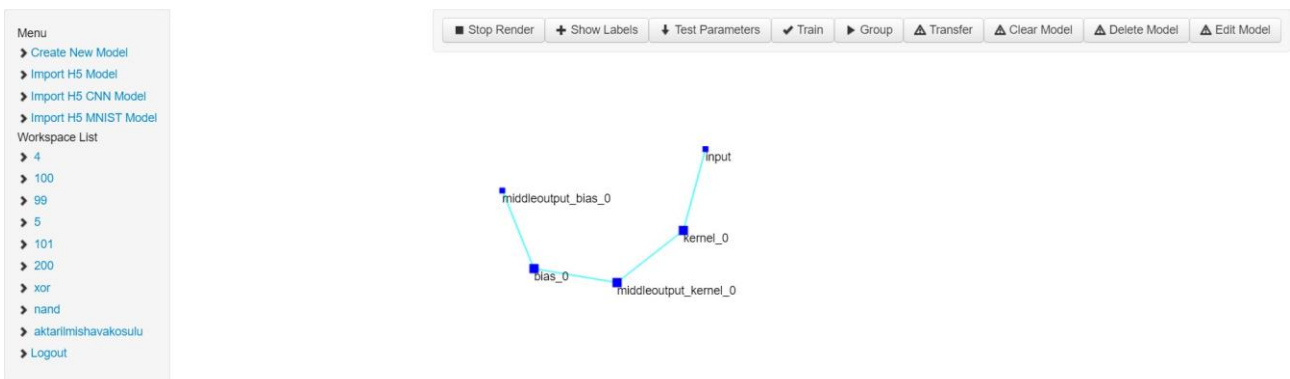


Figure 15. Imported MNIST handwritten digit dataset trained ANN model display on web site with only layer representations

Neo4j does not support multi-dimensional matrices in property values by default. For this reason, in the model described Figure 12 the artificial neural network is represented exactly, but the calculation costs increase. On the other hand, in the Mnist model shown in Figure 14, each cell of the matrices in the layers was expressed as a neuron. Thus, Neo4j directly supported the model data structure used. Although it makes the observation power of the model difficult, it reduces the computational costs. Both methods were



implemented in the proposed system and the difference was examined in this way. In the next section, a sample prediction is made and a comparison of Keras and performance is made. In the next section, a sample prediction is made and performance comparison of Keras and the proposed system is made.

## 2.6. MNIST handwritten digit artificial neural network model prediction comparison

With the Tensorflow 2.0, Keras is officially used to perform high-level operations. Keras is widely accepted by researchers and industry for deep learning and convolutional neural network focused work. In this section, the model prediction has been performed with both Keras and the proposed graph database based neural network study. For comparison, the 2.3.0 version of Keras and the Tensorflow library that supports graphics cards are used. Using the version of Tensorflow that performs calculations on the GPU, the library with the highest performance has been selected for comparison. Comparisons were made on a laptop with Intel i7-7700HQ processor, 16 GB DDR4 memory and Nvidia 1050Ti graphics card.

The Mnist dataset includes 28 by 28-pixel hand-drawn figure images. In this data set, the learning was done on the convolutional neural network. ReLU activation function is used in convolution layers and SoftMax activation function in the output layer. Grayscale visual matrices of the picture take values between 0 and 255. The number drawing with the prediction test is shown in Figure 16. While the estimation is performed in the proposed system, the researcher is expected to upload the image to the system. After selecting the file, the image is transformed into a 1 by 784 matrix with the code running in the browser of the researcher who starts the prediction. Converting the image to a matrix will not incur computational costs on the backend server. As a result of multiplication and sum operations performed with calculation matrices, a 1 by 10 matrix is obtained and the matrix index containing the highest number shows the estimated number. After the prediction is concluded, the researcher is shown the estimated number in the green popup. The researcher can see the data in the neural network layers on the site, as well as the results of each neuron.



Figure 16. 28 by 28 pixel hand-drawn number 9 to be predicted in the Mnist model

In every attempt made with Keras, there is a cost of distributing the input and the model to the GPU, as all computing is done on the GPU. The data needs to be transformed every time. This can cause slow running. As the Neo4j graph database runs, it caches and returns queries quickly. Therefore, in the graph database based neural network the initial slowness seen in Table 2 is gradually decreasing. In Table 2, the return of model estimation results in Keras and the proposed system is given in seconds. The proposed system can give 125 milliseconds faster estimation output on the arithmetic average than Keras based on the graphics card. Because the proposed system is online, network status, server density can change the calculation times. The ability of the proposed system to calculate faster than the accepted libraries shows the power of graph database-based artificial neural networks. All calculation results are kept in artificial neural network cells and links in the graph database.

Table 2

Comparison of the recommended system and GPU supported Keras prediction times

| <b>Trial</b>       | <b>Graph database based neural network<br/>(sec)</b> | <b>Keras<br/>(sec)</b> |
|--------------------|--|------------------------|
| 1                  | 3.34   | 3.41                   |
| 2                  | 3.37   | 3.18                   |
| 3                  | 3.34   | 3.15                   |
| 4                  | 3.28   | 2.97                   |
| 5                  | 3.31   | 3.19                   |
| 6                  | 3.32   | 3.19                   |
| 7                  | 3.26   | 3.76                   |
| 8                  | 3.29   | 3.18                   |
| 9                  | 3.66   | 3.09                   |
| 10                 | 3.36   | 3.16                   |
| Arithmetic<br>Mean | 3.353  | 3.228                  |

As can be inferred from the comparison, although the main focus of this new study in the field is to express artificial neural networks better and enable the development of new types of networks, its performance is also acceptable.

### 3. Conclusion

In this study, a completely new method has been developed and artificial neural networks are processed in graph databases. With this study, artificial neural networks implemented in graph databases can be designed visually by researchers. Researchers can edit the artificial neural network graph shown on the developed software without the need for a code. It is ensured that researchers can operate processes on the same ANN models together. With its infrastructure, researchers can share artificial neural network models without transforming. The one-to-one representation of artificial neural networks in the theory was realized in the graph database. The black box problem is illuminated by observing every element and flow in artificial neural networks kept in the graph database. By comparing the estimation with Keras, it is concluded that the calculation speed of the proposed system is acceptable and makes predictions faster in the example. Since it is shared with open-source code, the first steps of the graph database-based neural network ecosystem have been taken.

In subsequent studies, apart from the artificial neural networks suggested in the study, it can be provided to operate different artificial neural networks. Generalizable prediction and training phases can be designed for graph database-based neural networks. Performance optimizations for training and testing of convolutional neural network models for performing transactions on the graphics card can be developed. In industrial projects, it can be proved that the presented method can work at industry standards by realizing artificial neural networks where data is kept in graph databases.

### Acknowledgement

This work was supported by the Hepsiburada. I would like to thank Hepsiburada for the opportunities it has given.

### Author Contributions

Doğa Bariş ÖZDEMİR: Developed the software platform, generated models for proof of concept.

Ahmet Cumhuri KINACI: Designed and analyzed the artificial neural network processes on graphs approach.

### Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

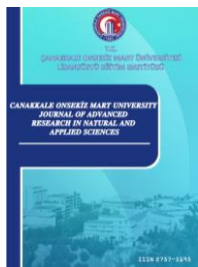
### References

- Ackley, D. H., Hinton, G. E., & Sejnowski, T. J. (1985). A learning algorithm for Boltzmann machines. *Cognitive science*, 9(1), 147-169.
- Armenta, M. A., & Jodoin, P. M. (2020). The Representation Theory of Neural Networks. arXiv preprint arXiv:2007.12213.
- Battaglia, W., P., Hamrick, B., J., Bapst, Alvaro, ... Razvan. (2018, October 17). Relational inductive biases, deep learning, and graph networks. Retrieved from <https://arxiv.org/abs/1806.01261>.
- Buhmester, V., Münch, D., & Arens, M. (2019). Analysis of explainers of black box deep neural networks for computer vision: A survey. arXiv preprint arXiv:1911.12116.
- Carpenter, G. A., & Grossberg, S. (1990). ART 3: Hierarchical search using chemical transmitters in self-organizing pattern recognition architectures. *Neural networks*, 3(2), 129-152.
- Cho, K., Van Merriënboer, B., Gulcehre, C., Bahdanau, D., Bougares, F., Schwenk, H., & Bengio, Y. (2014). Learning phrase representations using RNN encoder-decoder for statistical machine translation. arXiv preprint arXiv:1406.1078.
- Choromanska, A., Henaff, M., Mathieu, M., Arous, G. B., & LeCun, Y. (2015). The loss surfaces of multilayer networks. In *Artificial intelligence and statistics* (pp. 192-204).
- Cvitkovic, M. (2020). Supervised Learning on Relational Databases with Graph Neural Networks. arXiv preprint arXiv:2002.02046.
- Cybenko, G. (1989). Approximation by superpositions of a sigmoidal function. *Mathematics of control, signals and systems*, 2(4), 303-314.
- Çuhadar, M., & Kayacan, C. (2005). Yapay Sinir Ağları Kullanılarak Konaklama İşletmelerinde Doluluk Oranı Tahmini: Türkiye'deki Konaklama İşletmeleri Üzerine Bir Deneme. *Anatolia: Turizm Arastirmalari Dergisi*, 16(1).
- Euler, L. (1741). *Solutio problematis ad geometriam situs pertinentis*. *Commentarii academiae scientiarum Petropolitanae*, 128-140.
- Goodfellow, I. J., Pouget-Abadie, J., Mirza, M., Xu, B., Warde-Farley, D., Ozair, S., ... & Bengio, Y. (2014). Generative adversarial networks. arXiv preprint arXiv:1406.2661, 4(5), 6.
- Goodfellow, I., Bengio, Y., Courville, A., & Bengio, Y. (2016). *Deep learning* (Vol. 1, No. 2). Cambridge: MIT press.
- Graph Based Neural Network (2019). Retrieved from <https://github.com/dogabaris/GraphBasedNeuralNetwork>.
- Hebb, D. O. (1949). *The organization of behavior: a neuropsychological theory*. J. Wiley; Chapman & Hall.
- Hochreiter, S., & Schmidhuber, J. (1997). Long short-term memory. *Neural computation*, 9(8), 1735-1780.
- Hopfield, J. J. (1982). Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. *Proceedings of the national academy of sciences*, 79(8), 2554-2558.
- Hopfield, J. J. (1984). Neurons with graded response have collective computational properties like those of two-state neurons. *Proceedings of the national academy of sciences*, 81(10), 3088-3092.

- Howard, A. G., Zhu, M., Chen, B., Kalenichenko, D., Wang, W., Weyand, T., ... & Adam, H. (2017). Mobilenets: Efficient convolutional neural networks for mobile vision applications. arXiv preprint arXiv:1704.04861.
- Keras: The Python Deep Learning library. (2017). Retrieved from <https://keras.io>.
- Kohonen, T. (1982). Self-organized Formation of Topologically Correct Feature Maps. *Biological Cybernetics*, 43, 59-69.
- Kohonen, T. (1990). The self-organizing map. *Proceedings of the IEEE*, 78(9), 1464-1480.
- Lam, H. T., Minh, T. N., Sinn, M., Buesser, B., & Wistuba, M. (2018). Neural feature learning from relational database. arXiv preprint arXiv:1801.05372.
- LeCun, Y., Bottou, L., Bengio, Y., & Haffner, P. (1998). Gradient-based learning applied to document recognition. *Proceedings of the IEEE*, 86(11), 2278-2324.
- LeCun, Y., Cortes, C., & Burges, C. J. (2010). MNIST handwritten digit database.
- Liu, H. (2017, November 1). Hierarchical Representations for Efficient Architecture Search. Retrieved from <https://arxiv.org/abs/1711.00436v2>.
- Maas, A. L., Hannun, A. Y., & Ng, A. Y. (2013, June). Rectifier nonlinearities improve neural network acoustic models. In *Proc. icml* (Vol. 30, No. 1, p. 3).
- Mcculloch, W. & Pitts, W. (1943). A Logical Calculus of Ideas Immanent in Nervous Activity. *Bulletin of Mathematical Biophysics*, 5, 127--147.
- Minsky, M., Papert, S. (1969). *Perceptrons: An Introduction to Computational Geometry*. Cambridge, MA, USA: MIT Press.
- Moody, J., & Darken, C. J. (1989). Fast learning in networks of locally-tuned processing units. *Neural computation*, 1(2), 281-294.
- Muhammad, T., & Halim, Z. (2016). Employing artificial neural networks for constructing metadata-based model to automatically select an appropriate data visualization technique. *Applied Soft Computing*, 49, 365–384. DOI: 10.1016/j.asoc.2016.08.039.
- Nair, V., & Hinton, G. E. (2010, January). Rectified linear units improve restricted boltzmann machines. In *ICML*.
- Nekhaev, D., & Demin, V. (2017). Visualization of maximizing images with deconvolutional optimization method for neurons in deep neural networks. *Procedia Computer Science*, 119, 174–181. DOI: 10.1016/j.procs.2017.11.174.
- Neo4j. (2007). Retrieved from <https://neo4j.com>.
- Olden, J. D., & Jackson, D. A. (2002). Illuminating the “black box”: a randomization approach for understanding variable contributions in artificial neural networks. *Ecological Modelling*, 154(1-2), 135–150. DOI: 10.1016/s0304-3800(02)00064-9.
- Öztanır, O. (2018). *Makine Öğrenmesi Kullanılarak Kestirimci Bakım* (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Rosenblatt, F. (1958). The perceptron: A probabilistic model for information storage and organization in the brain. *Psychological Review*, 65(6), 386–408. <https://doi.org/10.1037/h0042519>
- Rumelhart, D. E., Hinton, G. E., & Williams, R. J. (1986). Learning representations by back-propagating errors. *nature*, 323(6088), 533-536.

- Rumelhart, D. E., Hinton, G. E. & Williams, R. J. (1985). Learning Internal Representations by Error Propagation. In D. E. Rumelhart & J. L. McClelland (ed.), *Parallel Distributed Processing: Explorations in the Microstructure of Cognition, Volume 1: Foundations* (pp. 318--362). MIT Press.
- Scarselli, F., Gori, M., Tsoi, A. C., Hagenbuchner, M., & Monfardini, G. (2008). The graph neural network model. *IEEE Transactions on Neural Networks*, 20(1), 61-80.
- Schikuta, E. (2008). Neural networks and database systems. arXiv preprint arXiv:0802.3582.
- Smolensky, P. (1986). *Information processing in dynamical systems: Foundations of harmony theory*. Colorado Univ at Boulder Dept of Computer Science.
- Tank, D., & Hopfield, J. (1986). Simple 'neural' optimization networks: An A/D converter, signal decision circuit, and a linear programming circuit. *IEEE transactions on circuits and systems*, 33(5), 533-541.
- TensorFlow. (2015). Retrieved from <https://tensorflow.org>.
- Tosun, S. (2007). *Sınıflandırmada yapay sinir ağları ve karar ağaçları karşılaştırması: Öğrenci başarıları üzerine bir uygulama* (Doctoral dissertation, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Touretzky, D. S., & Pomerleau, D. A. (1989). What's hidden in the hidden layers. *Byte*, 14(8), 227-233.
- Uwents, W., Monfardini, G., Blockeel, H., Gori, M., & Scarselli, F. (2010). Neural networks for relational learning: an experimental comparison. *Machine Learning*, 82(3), 315–349. DOI: 10.1007/s10994-010-5196-5.
- Wang, T. (2018, February 15). NerveNet: Learning Structured Policy with Graph Neural Networks. Retrieved from <https://openreview.net/forum?id=S1sqHMZCb>
- Widrow, B. & Hoff, M. E. (1960). Adaptive Switching Circuits. 1960 IRE WESCON Convention Record, Part 4 (p./pp. 96--104), New York: IRE.
- Widrow, B., & Lehr, M. A. (1990). 30 years of adaptive neural networks: perceptron, madaline, and backpropagation. *Proceedings of the IEEE*, 78(9), 1415-1442.
- Witt, C., Bux, M., Gusew, W., & Leser, U. (2019). Predictive performance modeling for distributed batch processing using black box monitoring and machine learning. *Information Systems*, 82, 33–52. DOI: 10.1016/j.is.2019.01.006.
- Yahia, M. E., & Elsayi, A. M. (2003). *Neural Database Model*.





# Novel Benchtop <sup>1</sup>H NMR and High Field <sup>1</sup>H NMR spectroscopy as practical tools for characterization of chemically exchanging systems in Ascorbic acid

Sevil Çıkırcı<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Engineering, Faculty of Engineering and Architecture, Konya Food and Agriculture University, 42080 Konya, Turkey

## Article History

Received: 04.09.2020

Accepted: 24.11.2020

Published: 20.03.2021

## Research Article

**Abstract** – Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra and its action on characterization of pH dependent systems are among the most useful tools in spectroscopic techniques. Nevertheless, practical considerations often restrict the application of High field NMR owing to its huge dimensions, expense and time-consuming property. On the other hand, benchtop devices could be another option with transportable permanent magnet systems (1–2 T) but with several disadvantages such as reduced sensitivity and low resolution. In this study, proton exchange rates depending on pH of a selected molecule, were monitored by both 800 MHz High-Field and 60 MHz Benchtop H<sup>1</sup> NMR to be compared. L-Ascorbic acid (AA) which is an important substrate for body and biological reactions was chosen as a target model molecule. This study supported the use of NMR for pH dependent chemical changes due to protonation. According to spectrum results and previous literature studies, shifting behaviour of Peak 1 (assigned to H13) towards lower frequencies upon pH increase, gave us its feasibility for pKa determination. While High-field NMR spectroscopy demonstrated the compositional analysis of AA and proton exchanges showing couplings between protons, Benchtop NMR was displayed as a limited tool owing to broadened lines of splitting peaks. Even so, shifting tendency of Peak 1 was still obtained quantitatively and promoted the feasibility of Benchtop NMR for characterization of a model molecule which was L-ascorbic acid. In brief, this study supported the effect of magnetic field strength on characterization of pH dependent chemical exchange regimes for vitamins.

**Keywords** – Ascorbic acid, Benchtop NMR, chemically exchanging system, pH dependency, proton transfer

## 1. Introduction

Nuclear magnetic resonance (NMR) is among the most powerful spectroscopic techniques for analysis of molecular structure and detection of chemical species (M. P. Ledbetter et al., 2009). In polymer chemistry, the peak intensities and chemical shifts in NMR spectra enable some structural quantities such as polymer composition, branching, sequence distribution and crosslinking to be measured or characterized (Park, Kim, Seok, Kim, & Kim, 2015; Shapiro, 2011). On the other hand, spectral sensing of local pH changes in vivo has been of long-standing interest for characterization of metabolites, pathological conditions, substrates etc. (Shchepin et al., 2016). Depending on exchange regime and reaction rate constant, spectral lineshapes show unique pattern in NMR spectroscopy. Labelled pyruvic acid and ascorbic acid are among the substrates that are widely used as biomarker probes for differentiation of healthy and cancer cells by analyzing their chemical transformation into their other forms (pyruvate, dehydroascorbic acid, etc.).

Ascorbic acid also called as Vitamin C, is one of the most outstanding members of antioxidants (reducing agent) by donating electrons to many enzymatic / nonenzymatic reactions. It is converted into oxidized state

<sup>1</sup>  [sevil.cikirci@gidatarim.edu.tr](mailto:sevil.cikirci@gidatarim.edu.tr)

\*Corresponding Author

mainly as dehydroascorbic acid (DHA) and DHA could be used as a probe for redox chemistry in biological systems (Keshari et al., 2019). Injection of hyperpolarized form of DHA and its rapid conversion to Vitamin C in tissues having high oxidative stress including kidney, liver highlights its biochemical role. These reactions like reduction-oxidation are also affected by pH variations. Chemical exchange like proton exchange due to such kind of changes in media is important phenomena to be considered in so many areas from biochemistry to medical applications. These concepts could be characterized and studied by several techniques. One of them, NMR, allows to differentiate chemical species through their resonance frequencies (chemical shifts and  $J$  couplings) (Barskiy et al., 2019). In addition to other features, one of the strongest aspect of NMR is its ability for detection of chemical exchange phenomena even in case where system is in equilibrium (Levitt, 2000). It is a non-invasive and non-destructive method probing the chemical composition of samples. Although there are past studies related to ascorbic acid spectra (Paukstelis J.V., Mueller D.D., Seib P.A., 1982; Reid, 1989; Singh, Mohanty, & Saini, 2016), the use of recent, new-generation instruments with different settings were proposed in this study. In this work, the utility of NMR spectra was presented to show pH-dependency of metabolic substrates. For this aim, L-Ascorbic acid (AA) was chosen as a model substrate.

Especially, traditional high field NMR has a tremendous utility with high resolution, high signal to noise ratio and high sensitivity. Nevertheless, the use of high magnetic fields requires high cost, immobile and large superconducting magnets with constant cryogenic temperature setup making sometimes conventional NMR as a limited tool (Micah P. Ledbetter & Budker, 2013). Nowadays, Benchtop NMR instruments (frequencies varying up to 100 MHz) with permanent magnets have opened the ways to access several applications such as pharmaceutical and biotechnology. They are built in a way that is cheaper and highly portable compared to high field equipment but limited devices due to low resolution, low signal to noise ratio, etc. (Heerah, Waclawek, Konzuk, & Longstaffe, 2020). To achieve better results such as better signal to noise ratio (SNR) in Benchtop NMR, it is required to manipulate several parameters like number of scans (Dopona, 2015). In this study, 60 MHz Benchtop NMR spectra was demonstrated to analyze its efficiency in chemical exchange analysis and its use in pH-  $pK_a$  relationship. The objective of the study was to show the application of Benchtop NMR spectroscopy as a practical tool for analysis of pH dependent exchange system in a biological molecule.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Sample preparation

A stock solution of L-Ascorbic acid (AA) (99% Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) was prepared in a 200 mM concentration by dissolving AA in deuterium oxide ( $D_2O$ ) for signal locking. Some samples were prepared in DMSO- $d_6$  (Sigma-Aldrich, USA), as well. Sodium hydroxide (Fisher Chemical, USA), hydrochloric acid (Macron Fine Chemicals, Avantor, USA) or acetic acid (Macron Fine Chemicals, Avantor, USA) at different molarities were used to adjust pH. Sample pH values were measured at room temperature using benchtop pH/ORP meter (HI 2211, Hanna Instruments, Rhode Island, USA) with micro pH combination electrode, glass body (Sigma Aldrich, St Louis, MO). Then, NMR measurements were performed immediately.

### 2.2. NMR methods

Each sample of 600  $\mu$ L was pipetted into a standard 5 mm NMR tube. High-field  $^1H$  NMR measurements were performed at room temperature using an 800 MHz Avance III Bruker NMR spectrometer. High field spectrum of each solution was acquired using 4 scans and 35 s of delay time. Benchtop NMR measurements were conducted at room temperature using a 60 MHz Benchtop NMR (NMReady-60PRO, Calgary, Alberta,

Canada). The optimization of setting parameters of Benchtop NMR was discussed in detail at the next section.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. pH-dependent chemical exchange in L-Ascorbic acid

Ascorbic acid (AA) (shown as  $\text{AscH}_2$  in chemical structure), an essential nutrient for human health, plays a significant role in so many pH dependent biological functions acting as enzymatic cofactor, reducing agent, substrate, etc. There exist several spectrum studies of ascorbic acid by different techniques such as Raman spectroscopy,  $^{13}\text{C}$  NMR,  $^1\text{H}$  NMR at different conditions in the literature (Karakurt, Aydoğdu, Çıkrıkçı, Orozco, & Lin, 2020; Paukstelis J.V., Mueller D.D., Seib P.A., 1982; Singh et al., 2016). As given in Figure 1, structurally it is a water-soluble ketolactone with two ionizable hydroxyl groups in which  $\gamma$ -lactone makes it highly reactive (J. Du, J. J. Cullen, 2013). It has two  $\text{pK}_a$ 's,  $\text{pK}_1$  is 4.2 and  $\text{pK}_2$  is 11.6; so, the ascorbate monoanion,  $\text{AscH}^-$ , is the dominant form at physiological pH (approximately 7.4) (J. Du, J. J. Cullen, 2013). To quantify pH dependent exchange behaviour, we performed 800 MHz High-Field NMR spectra by studying aqueous solutions of L-Ascorbic acid (AA) under varying pH conditions from 0.37 to 12.07. Firstly, the recorded  $^1\text{H}$  NMR spectra for AA, 200 mM stock solution in  $\text{D}_2\text{O}$  adjusting pH to 2.3 was shown in Figure 2. Since -OH hydroxy protons undergo rapid exchange with solvent, they are not seen as separate resonances. Similar to the study of Reid (1989) (Reid, 1989), the stable system could be defined as “**ABMX**” system as figured out in Figure 1a. **A** and **B**, two methylene protons have an adjacent chiral center causing their environments to become different. Although they are similar, they are not exactly chemically equivalent and do not have exact coupling constants, as well.  $J$  coupling constants belonging to system at specific pH values were listed on Table 1. Geminal coupling in -10 to -20 Hz range was ignored.

As given in Figure 2, AA gave peaks at around 4.94 ppm assigned to H13 (**X** proton); a triplet peak at around 4.06 ppm (**M** proton) and a doublet peak at around 3.74 ppm (**A** and **B** proton). Peak 1 (**X** proton) at around 4.94 ppm assigned to C4-H13 is expected to be a doublet due to the presence of **M** proton. However, most probably due to low coupling constant value, it was seen as a doublet just in stock solution at pH 2.3. Proton **X** was magnified to see peak splittings in detail in Figure 2a. Peak 2 as a solvent peak was observed at around 4.8 ppm similar to the literature (Reid, 1989; Singh et al., 2016). Figure 3 was obtained at around 4.06 ppm as a triplet peak due to **M** proton assigned to H14 bond coupling with C6- $\text{H}_2$ . Peak 4, another splitting pattern as doublet peak, at around 3.74 ppm rose due to two freely rotating protons of C6- $\text{H}_2$  having a three bond coupling with H14 (Reid, 1989).

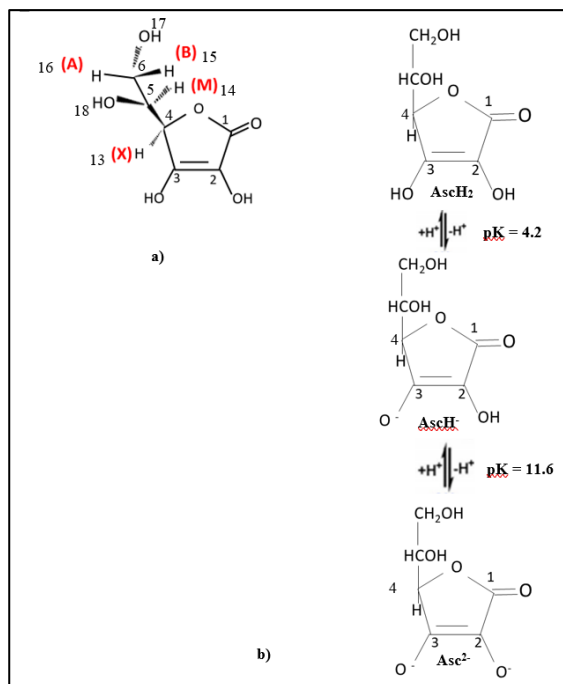
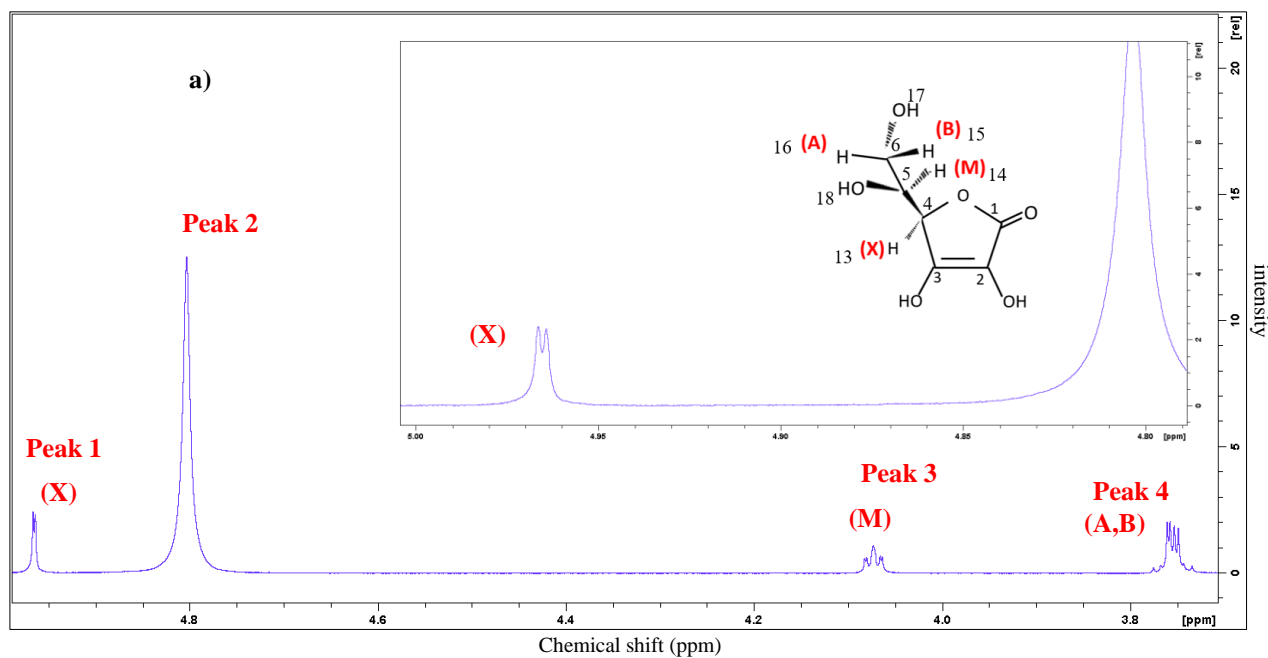


Figure 1. **a)** AA structure in acidic solution showing “ABMX” system (J. Du, J. J. Cullen, 2013) and **b)** AA structures representing pK values associated with AA.

In addition to determined hydrogens, there are four in hydroxyl groups, as well. However, they can not be observed in aqueous solution owing to D<sub>2</sub>O which could exchange OH with O<sup>2</sup>H (Singh et al., 2016). Therefore, NMR spectrum of AA in DMSO-d<sub>6</sub> solution was also figured out to show peaks belonging to H17 and H18 protons at around 5 ppm (Figure 3).



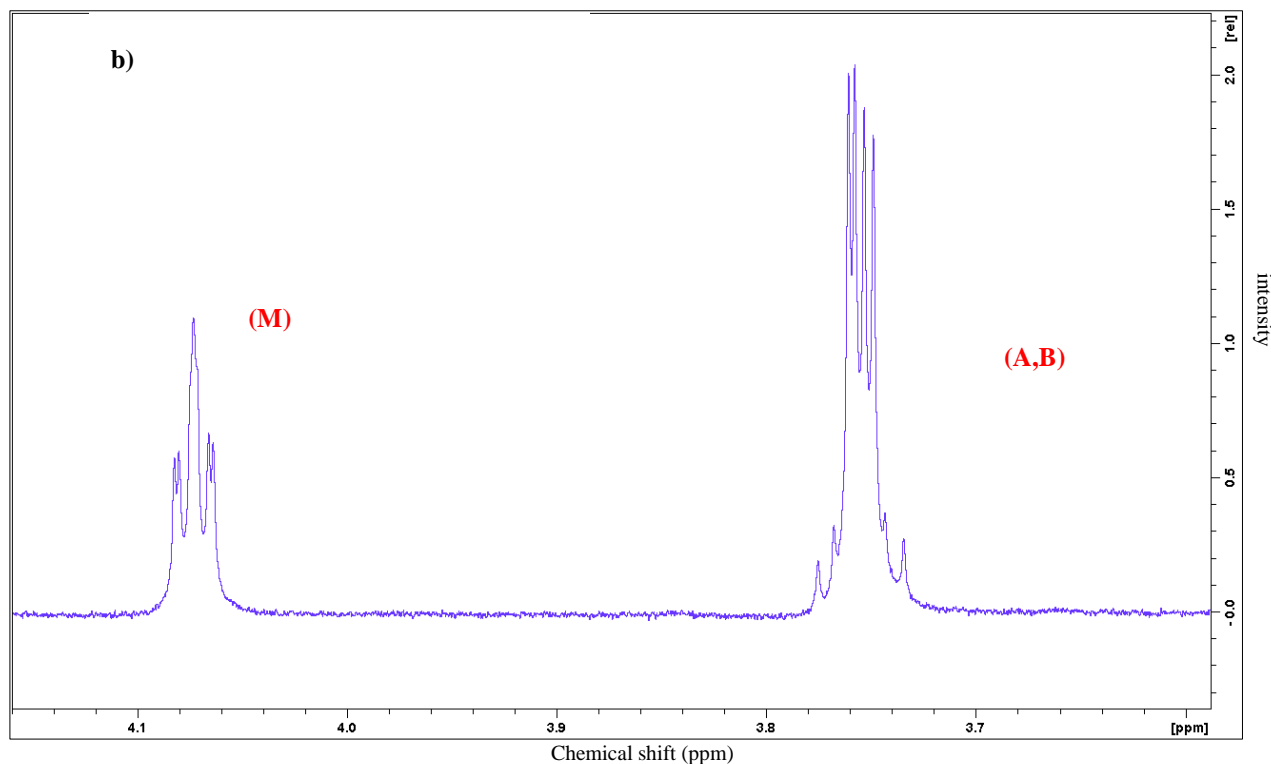


Figure 2. The 800 MHz proton NMR spectrum of ascorbic acid, 200 Mm in D<sub>2</sub>O (pH was adjusted to 2.3) **a**) as overview **b**) between 3 and 4 ppm.

Table 1. Coupling constants for AA at certain pH values

| Compound        | pH  | $J_{MX}$ | $J_{AM}$ | $J_{BM}$ | $J_{AB}$ | $\Delta\delta_{A,B}$ |
|-----------------|-----|----------|----------|----------|----------|----------------------|
| L-ascorbic acid | ~ 2 | 1.8      | 5.8      | 7.3      | -11.5    | 6.48                 |
|                 | ~ 7 | 1.9      | 5.6      | 7.6      | -11.6    | 14.77                |

Note: The data was taken from (Paukstelis J.V., Mueller D.D., Seib P.A., 1982) measured at 600.2 MHz NMR in D<sub>2</sub>O.

pH dependence of chemical shifts was evaluated to see the ability of High Field <sup>1</sup>H NMR in chemical exchange phenomena. Owing to complex nature of AA, it is not easy to interpret its spectra. The long-range coupling patterns of those resonances could be complex and probably unclear. However, in this study it was aimed to refresh the potential of NMR spectroscopy for vitamins to investigate exchange mechanism.



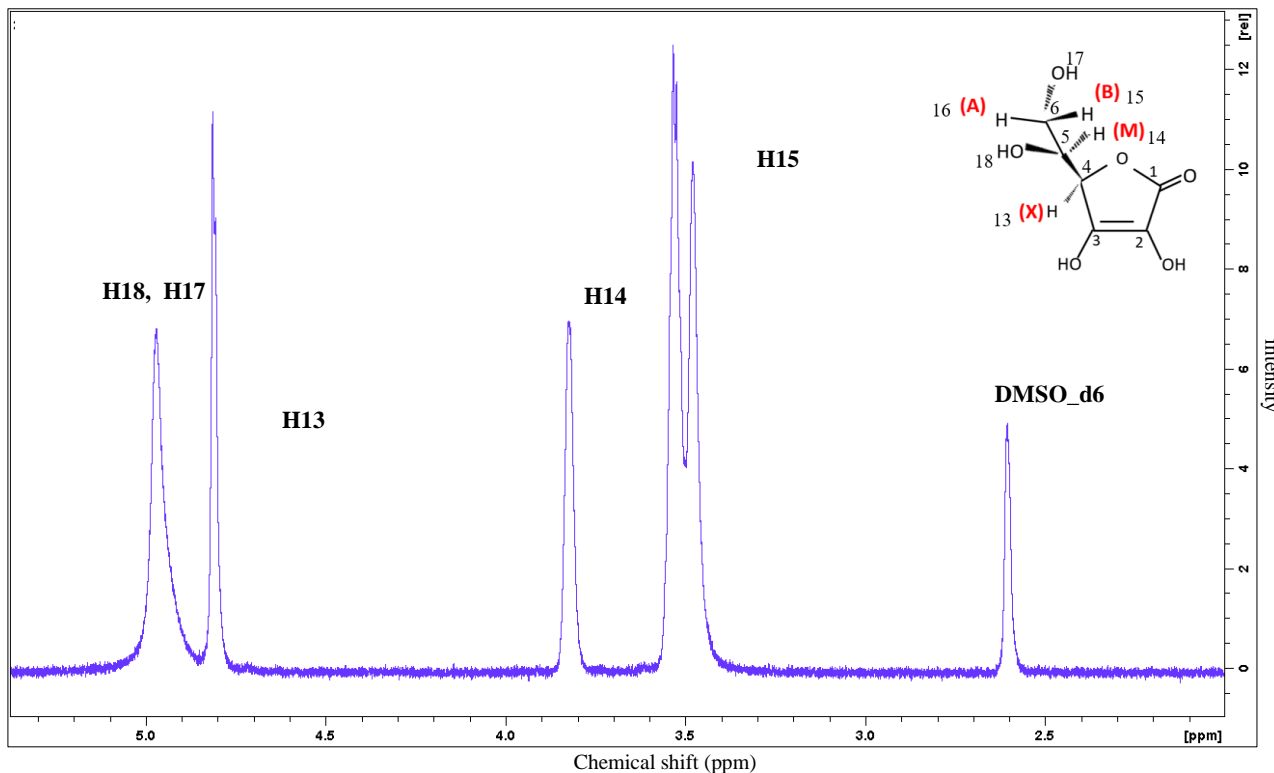
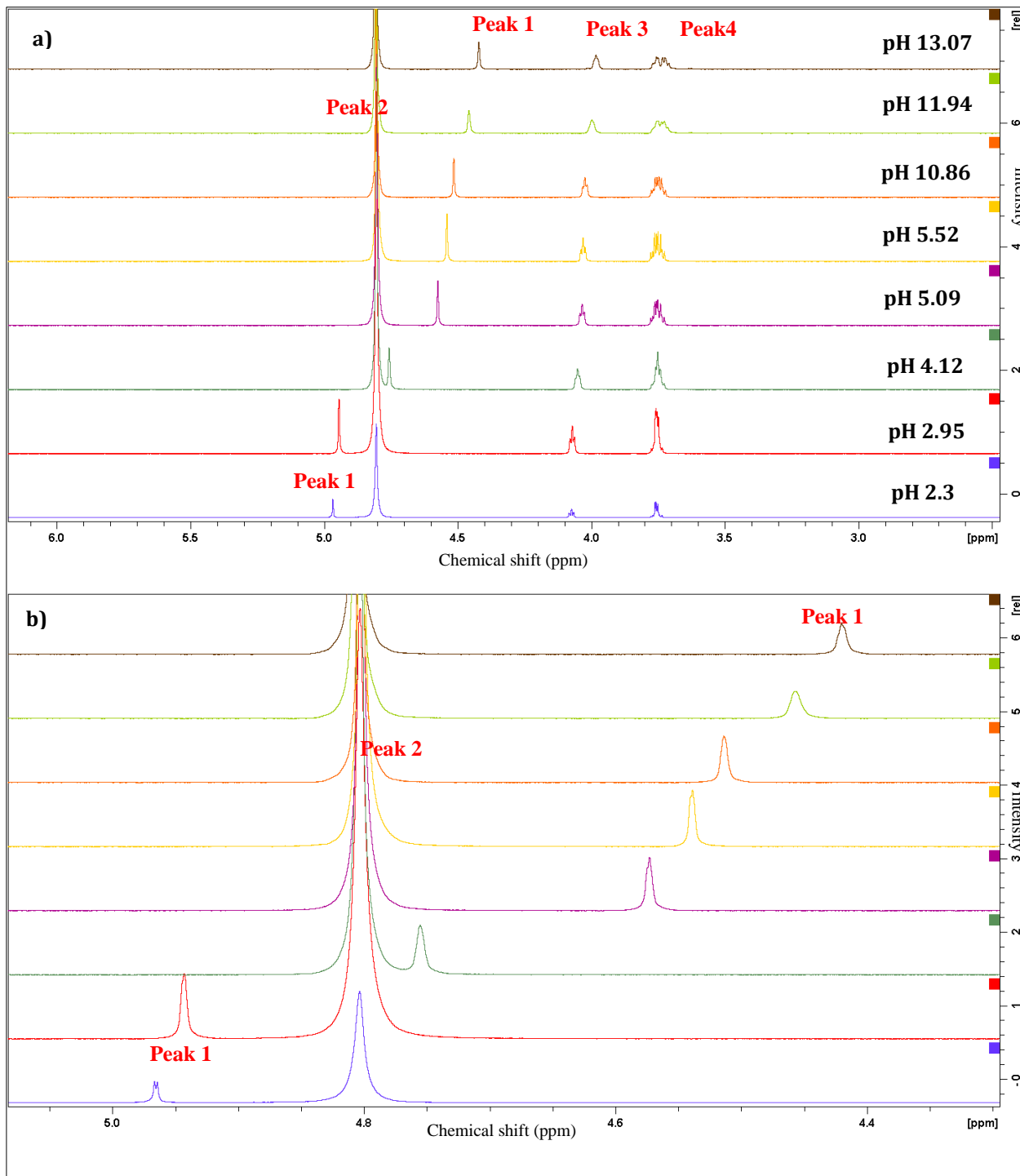


Figure 3. 200 mM AA in DMSO\_d6 without TSP in 800 MHz High Field NMR

Figure 4, produced an observable chemical shift change between the substrate and its proton exchanged forms, to allow spectroscopic imaging of both metabolites (Bohndiek et al., 2011). According to the results, three main findings were reached upon increasing pH level. Firstly, Peak 1 shifted to lower frequency at higher pH values. Secondly, splittings at Peak 3 merged into one peak. As a final result, Peak 4 started to split into two main peaks as pH increased.



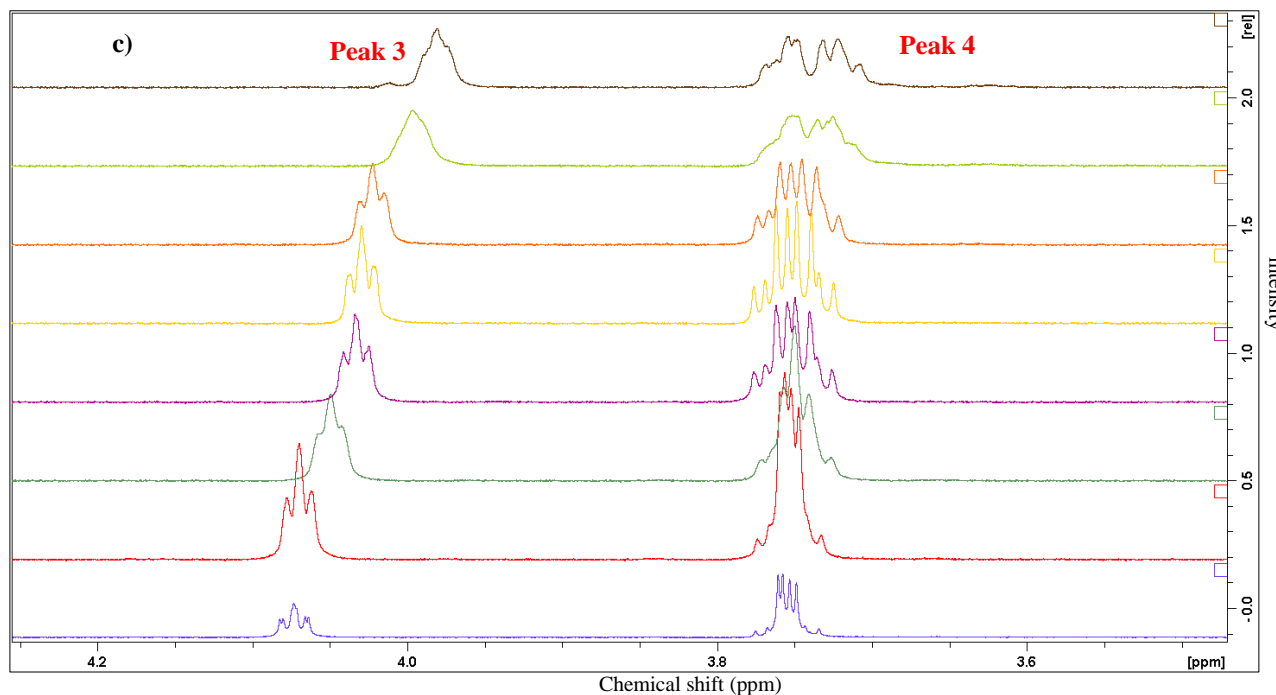


Figure 4. The 800 MHz proton NMR spectrum of AA 200 Mm in D<sub>2</sub>O at varying pH values **a)** as overview **b)** belonging to only peak 1 and peak 2 **c)** belonging to only peak 3 and peak 4.

There might be several scenarios for these findings. One of them might be related to shielding effect of oxygen especially on **X** proton. As given in Figure 1, the first donated hydrogen is the closest one (belonging to -OH group) to **X** proton. Electronegativity effect of adjacent oxygen might have caused **X** proton to shield and to show its signal at upfield. Clearly, at basic conditions higher than pK<sub>2</sub> of AA, the splitting in proton **M** vanished with the increase of pH dependent proton dissociation rates. Electronegative substituents modify the magnitude of vicinal coupling constants. Moreover, different orientations of a coupled proton with respect to adjacent OH group in cyclic compounds is attributed to difference in coupling constants (Paukstelis J.V., Mueller D.D., Seib P.A., 1982). Upon ionization of AA, conformational changes in AA structure such as different rotamers might also have led changes in J constants and hereby variation in NMR spectral lines.

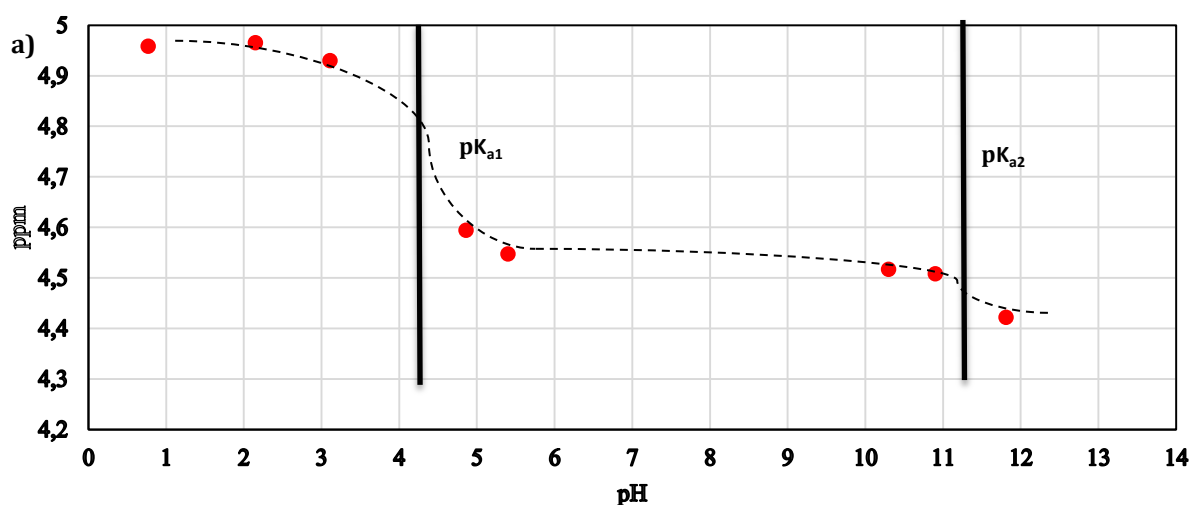


Figure 5. ppm-pH relationship for peak 1 at High Field NMR.

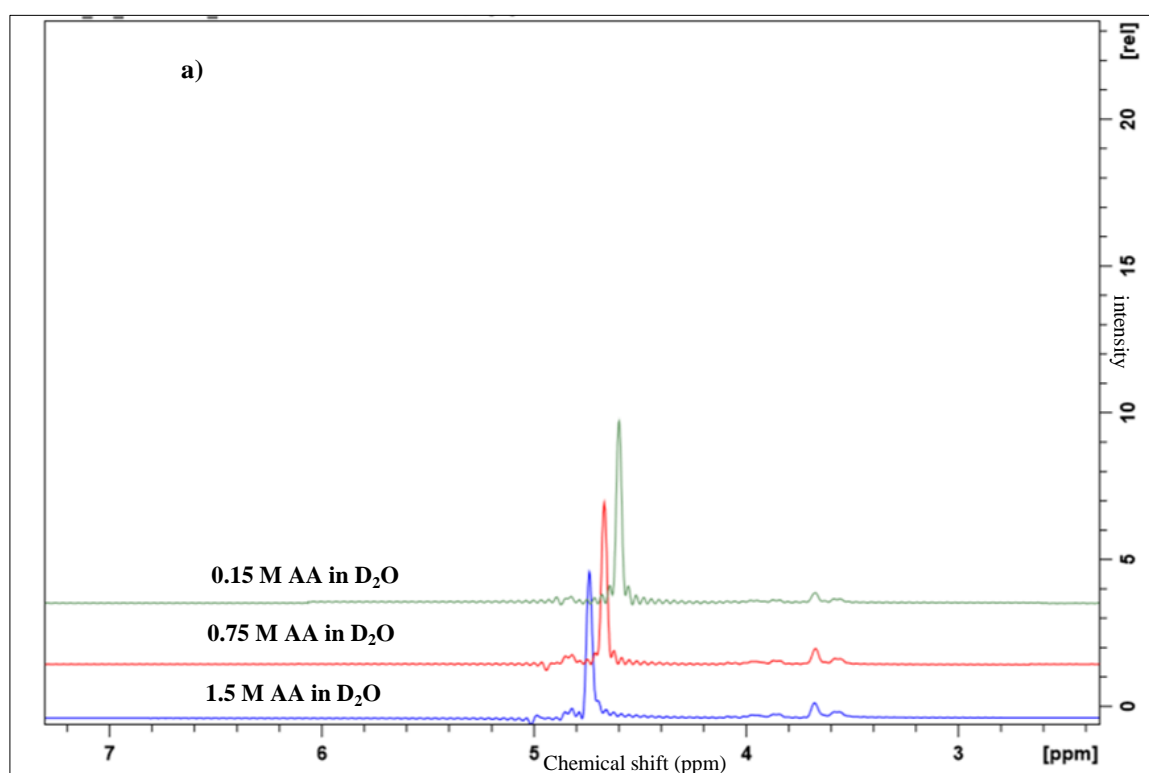
Another reason could be explained by dissociation / association mechanism with corresponding conjugates. As pH value showed an increase, it might have been resulted in higher  $k_d$  (dissociation constant) values indicating decrease in mean life time of protons. Thus, NMR peaks could lose some splitting patterns and give much more wider line shapes at high pH conditions. Here, relationship between pH and  $pK_a$  is an important event. Another relationship between  $pK_a$  and shifting of Peak 1 was found as given in Figure 5. Two sharp decreases in chemical shift points of Peak 1 were observed around pH values ( $\sim 4$  and  $\sim 11.5$ ) corresponding to two  $pK_a$  values of AA. It was expected from our basic chemistry knowledge, the populations of acids and base change fastest around the  $pK_a$  in a titration.

Finally, Peak 4 gave different patterns depending on pH. Since Proton **A** and **B** are close enough, they can affect each other hereby coupled together. Coupled protons moved to each other and this geminal coupling led to a root effect in the presence of strong couplings. Upon increase in pH, this root effect began to change by overlapping weak coupled protons and eventually showing a separation between two.

In the light of findings, it has been proposed that proton exchange, in other words, pH dependency of NMR spectra could be featured for a variety of molecules such as ascorbic acid which is valuable substrate for biomedical applications.

### 3.2. Benchtop 60 MHz NMR detection of L-Ascorbic acid

In order to investigate the performance of NMR system working with permanent magnet, similar analyses were also conducted at 60 MHz Benchtop  $^1\text{H}$  NMR which has a user friendly, cost effective and portable design. In order to increase sensitivity and signal to noise ratio, we conducted preliminary experiments to optimize parameters. For this purpose, firstly relaxation time constants ( $T_1$ ) of AA molecule were considered and found as 3.61 s (for Peak 1), 3.11 s (for Peak 3) and 1.09 s (for Peak 4), to reach equilibrium and to determine scan delays. Then, different sample concentrations and different number of scans were performed as given in Figure 6. While Figure 6a represented the effect of sample concentration, Figure 6b displayed the effect of number of scans on device efficiency.



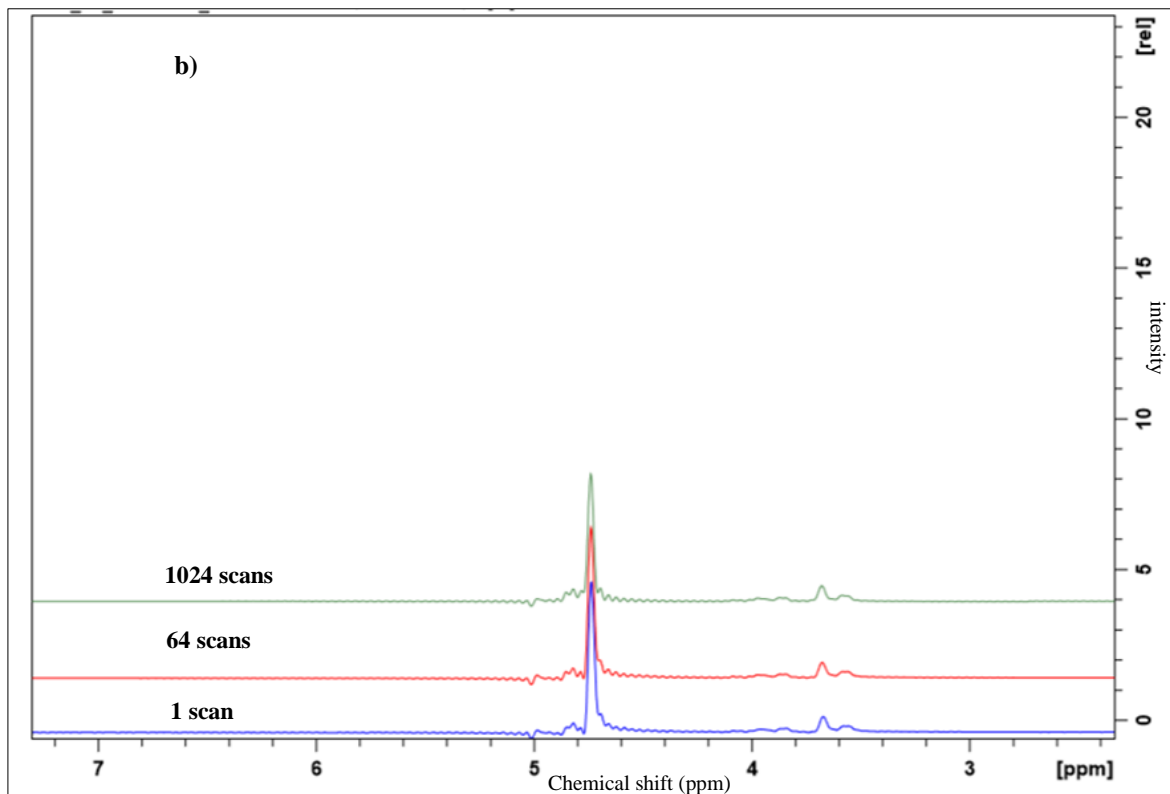
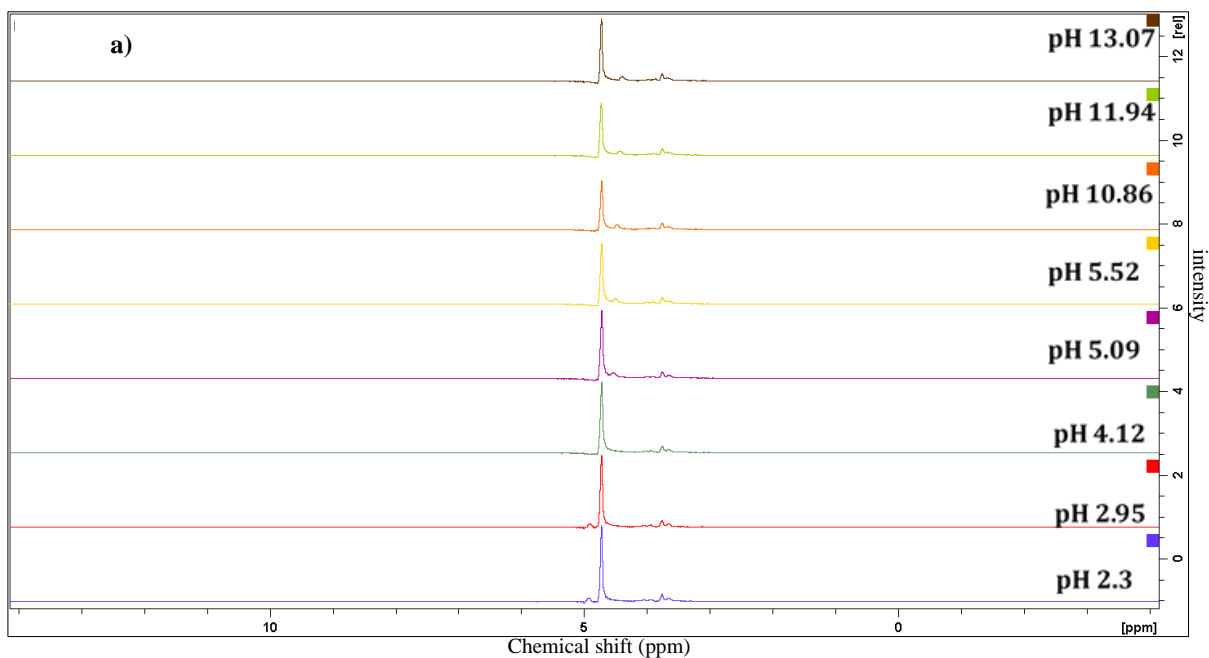


Figure 6. 60 MHz Benchtop NMR measurements **a)** at 32 scans for different AA concentrations in D<sub>2</sub>O and **b)** at different number of scans for 1.5 M AA solution.





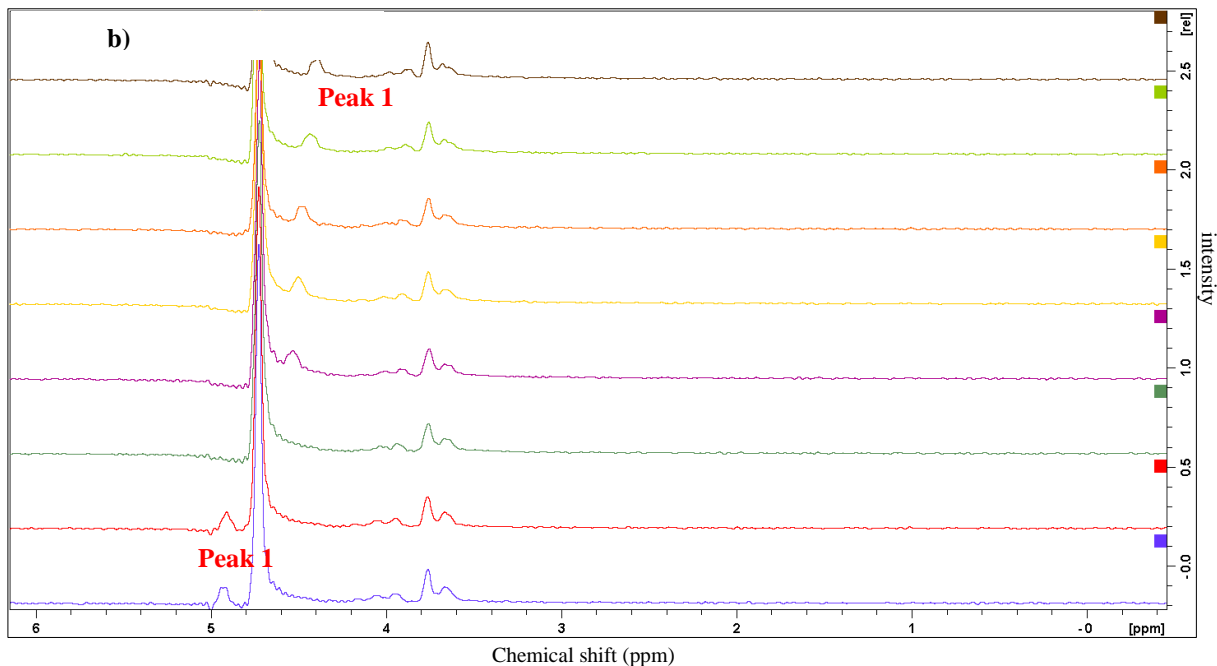


Figure 7. The 60 MHz Benchtop NMR spectrum of AA, 1.5 M in D<sub>2</sub>O at varying pH values **a)** as overview **b)** magnified version

Similar to previous part, pH dependency of proton chemical shift of AA in 60 MHz NMR in D<sub>2</sub>O was figured out in Figure 7. Similarly, shifting in Peak 1 regarding to pH was observed at Benchtop results, as well. However, couplings of the protons could not have clearly seen at low field NMR. Splitting of NMR peaks was overlapped and disappeared due to low resolution and low sensitivity. Thus, Peak 1 was mainly considered in Benchtop NMR analysis. Another relationship between pK<sub>a</sub> and shifting of Peak 1 was also given for benchtop measurement results (Figure 8). These results pointed out that Benchtop NMR spectroscopy could be still challenging for some molecules like vitamins if you aim to identify changes in conformational side chains.

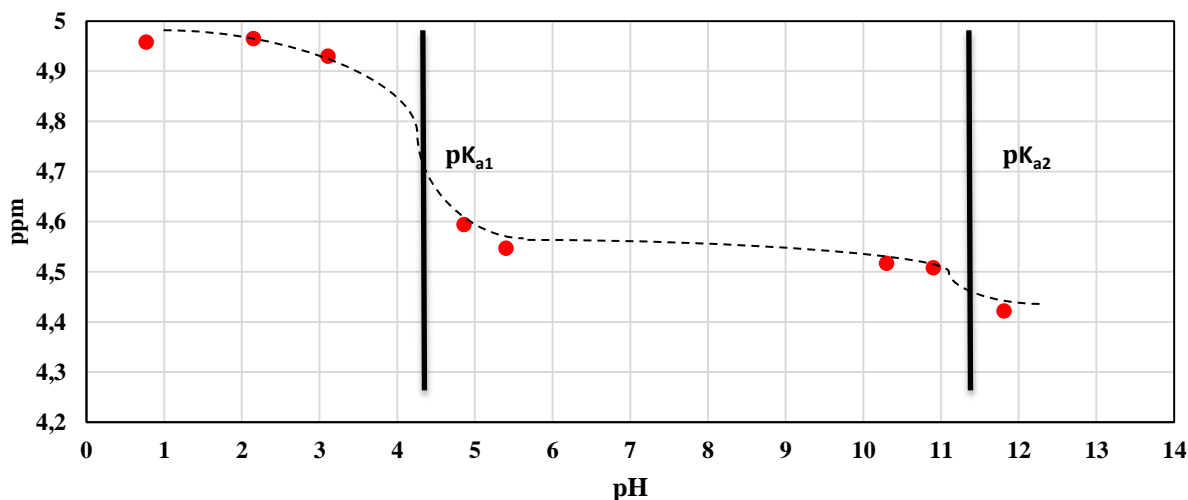


Figure 8. Observed 60 MHz Benchtop <sup>1</sup>H NMR chemical shift (ppm) of Peak 1 relative to sample pH

#### 4. Conclusion

In this study, 60 MHz Benchtop NMR and 800 MHz High-Field NMR were performed to verify proton peaks in ascorbic acid as model vitamin, successfully. The obtained figures could also be used in undergraduate student laboratory experiments to show chemical shift dependence on pH. According to the results, the sensitivity of Benchtop NMR limited the detection of peak splitting and multiplets in 60 MHz, but it still showed shifting behaviour of Peak 1 which was assigned to H13 and gave us its feasibility for pK<sub>a</sub> determination. Overall, Benchtop NMR could be a promising and a useful tool to test the vitamins exposed to chemical exchange when conventional NMR spectroscopy is used for detailed characterization. The latest higher performance, 100 MHz Benchtop NMR devices could be more promising for future studies, as well. Overall, Benchtop NMR could be of interest as a low-cost alternative method for characterization of pH dependent chemical exchange regimes for complex molecules.

#### Acknowledgement

S.C. would like to thank Postdoctoral Scholar Danila Barskiy for his help in acquiring Benchtop <sup>1</sup>H NMR spectra and Dr. Jeff Pelton for his technical help in High Field NMR measurements. The author is also very thankful to Prof. Alexander Pines for NMR equipment facilities in Stanley Hall, UC Berkeley. Data analyses and rest of the study were done at Konya Food and Agriculture University.

#### Author Contributions

Author S.Ç: Performed all the study and has currently wrote the paper.

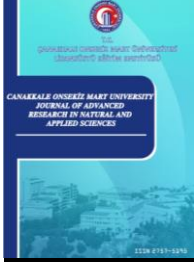
#### Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

#### References

- Barskiy, D. A., Tayler, M. C. D., Marco-rius, I., Kurhanewicz, J., Vigneron, D. B., Cikrikci, S., ... Pines, A. (2019). chemically exchanging systems. *Nature Communications*, (Moin Cc), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10787-9>
- Bohndiek, S. E., Kettunen, M. I., Hu, D., Kennedy, B. W. C., Boren, J., Gallagher, F. A., & Brindle, K. M. (2011). *Hyperpolarized [ 1- 13 C ] -Ascorbic and Dehydroascorbic Acid : Vitamin C as a Probe for Imaging Redox Status in Vivo*. 11795–11801.
- Dopona, V. (2015). *Comparative NMR Studies : Benchtop-NMR and 300 MHz NMR instrument*. (February).
- Heerah, K., Waclawek, S., Konzuk, J., & Longstaffe, J. G. (2020). Benchtop 19 F NMR Spectroscopy as a Practical Tool for Testing of Remedial Technologies for the Degradation of Perfluorooctanoic Acid, a Persistent Organic Pollutant . *Magnetic Resonance in Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/mrc.5005>
- J. Du, J. J. Cullen, G. R. B. (2013). Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta.*, 1826(2), 443–457. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.06.003.Ascorbic>
- Karakurt, I., Aydoğdu, A., Çikrikci, S., Orozco, J., & Lin, L. (2020). Stereolithography (SLA) 3D printing of ascorbic acid loaded hydrogels: A controlled release study. *International Journal of Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119428>
- Keshari, K. R., Sai, V., Wang, Z. J., Vanbrocklin, H. F., Kurhanewicz, J., & Wilson, D. M. (2019). *Hyperpolarized [1- 13 C]Dehydroascorbate MR Spectroscopy in a Murine Model of Prostate Cancer: Comparison with 18 F-FDG PET*. 54(6), 922–929. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.115402>

- Ledbetter, M. P., Crawford, C. W., Pines, A., Wemmer, D. E., Knappe, S., Kitching, J., & Budker, D. (2009). Optical detection of NMR J-spectra at zero magnetic field. *Journal of Magnetic Resonance*, 199(1), 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2009.03.008>
- Ledbetter, Micah P., & Budker, D. (2013). Zero-field nuclear magnetic resonance. *Physics Today*, 66(4), 44–49. <https://doi.org/10.1063/PT.3.1948>
- Levitt, M. . (2000). Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance. In *John Wiley & Sons Ltd.* <https://doi.org/10.1002/cmr.a.20130>
- Park, K. J., Kim, M., Seok, S., Kim, Y. W., & Kim, D. H. (2015). Quantitative analysis of cyclic dimer fatty acid content in the dimerization product by proton NMR spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.04.099>
- Paukstelis J.V., Mueller D.D., Seib P.A., L. D. W. (1982). N M R Spectroscopy of Ascorbic A c i d and Its Derivatives. In *Advances in Chemistry* (Vol. 200).
- Reid, R. S. (1989). The proton NMR spectrum of ascorbic acid: A relevant example of deceptively simple second-order behavior. *Journal of Chemical Education*, 66(4), 344. <https://doi.org/10.1021/ed066p344>
- Shapiro, Y. E. (2011). Structure and dynamics of hydrogels and organogels: An NMR spectroscopy approach. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 36(9), 1184–1253. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.04.002>
- Shepchin, R. V., Barskiy, D. A., Coffey, A. M., Theis, T., Shi, F., Warren, W. S., ... Chekmenev, E. Y. (2016). <sup>15</sup> N Hyperpolarization of Imidazole- <sup>15</sup> N<sub>2</sub> for Magnetic Resonance pH Sensing via SABRE-SHEATH. *ACS Sensors*, 1(6), 640–644. <https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00231>
- Singh, G., Mohanty, B. P., & Saini, G. S. S. (2016). Structure, spectra and antioxidant action of ascorbic acid studied by density functional theory, Raman spectroscopic and nuclear magnetic resonance techniques. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 155, 61–74. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.11.005>



## Kırşehir İlinden Toplanan *Morchella esculenta* (L.) Pers (Kuzu Göbeği) Mantarlarının Moleküler Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Elif Sevim<sup>1,\*</sup>, Ali Sevim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Kırşehir, Türkiye

<sup>2</sup>Bitki Koruma Bölümü, Ziraat Fakültesi, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Kırşehir, Türkiye

### Makale Tarihçesi

Gönderim: 10.10.2020  
Kabul: 17.02.2021  
Yayın: 20.03.2021

### Araştırma Makalesi

**Öz** – Doğal yenilebilir mantarların Dünya'nın birçok ülkesinde geleneksel anlamda besin ve ilaç olarak kullanıldığı uzun zamandan beri bilinen bir konudur. *Morchella esculenta* (L.) Pers (Kuzu Göbeği) tıbbi kullanım ve besin değeri açısından son derece değerlidir. Günümüze kadar yapılan birçok bilimsel çalışmaya göre makro fungusların antiviral, antibakteriyel, antiprotozoal ve antifungal özellik gösteren çeşitli kimyasal bileşiklere sahip olduğu bilinmektedir. Gerçekleştirilen bu çalışmada Kırşehir ili ve ilçelerinden toplanan Kuzu Göbeği mantarlarının 18S rRNA ve ITS gen bölgeleri çoğaltılarak moleküler olarak tanımlamaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, bu mantarlarının etanol, metanol ve sulu ekstraktlarının antimikrobiyal etkileri çeşitli mikroorganizmalar üzerinde agar kuyucuk yöntemi ile araştırılmıştır. Son olarak, etkili bulunan ekstraktların Minimal İnhibisyon Konsantrasyon (MIC, MİK) değerleri Broth Dilüsyon metodu kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda en etkili ekstraktın etanol ekstraktı olduğu ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC43288 üzerine oldukça etkili olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda etanol ve metanol ekstraktlarının *Candida albicans* ATCC60193 üzerinde de etkili olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, *M. esculenta* mantarının antibakteriyel ve antifungal potansiyeli bakımından dikkate değer olduğu görülmektedir.

**Anahtar Kelimeler** –Antimikrobiyal aktivite, kuzu göbeği, moleküler karakterizasyon, *Morchella esculenta* (L.) Pers

## Molecular Characterization and Determination of Antimicrobial Activities of *Morchella esculenta* (L.) Pers (Morel) Collected From Kirsehir

### Article History

Received: 10.10.2020  
Accepted: 17.02.2021  
Published: 20.03.2021

### Research Article

**Abstract** –It has been known for a long time that natural edible mushrooms have been used traditionally as food and medicine in many countries of the world. *Morchella esculenta* (L.) Pers (morel) is extremely valuable in terms of medicinal use and nutritional value. According to many scientific studies performed to date, macro fungi are known to have various chemical compounds showing antiviral, antibacterial, antiprotozoal, and antifungal properties. In this study, morel mushrooms collected from Kirsehir province and its districts were molecularly identified using amplification of 18S rRNA and ITS gene regions. In addition, the antimicrobial effects of ethanol, methanol and aqueous extracts of these mushrooms were investigated by using the agar well method against various microorganisms. Finally, Minimal Inhibition Concentration (MIC) values of the effective extracts were determined using the Broth Dilution method. As a result of the studies, it has been determined that the most effective extract is ethanol extract and it is highly effective against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC43288. It has also been determined that ethanol and methanol extracts are effective against *Candida albicans* ATCC60193. According to the data obtained, it was determined that the ethanol and methanol extracts of *Morchella esculenta* mushrooms collected from Kirsehir province were effective against gram positive, gram negative and yeast. Consequently, *M. esculenta* mushroom appears to be notable for its antibacterial and antifungal potential.

**Keywords** –Antimicrobial activity, morel, molecular characterization, *Morchella esculenta* (L.) Pers

<sup>1</sup> [esevim@ahievran.edu.tr](mailto:esevim@ahievran.edu.tr)

<sup>2</sup> [ali.sevim@ahievran.edu.tr](mailto:ali.sevim@ahievran.edu.tr)

\*Sorumlu Yazar / Corresponding Author

## 1. Giriş

Büyüme ve üreme fazı olarak iki evreye bölünmüş bir yaşam döngüsü olan funguslar ökaryotik ve spor oluşturan mikroorganizmalardır. Makrofunguslar görülebilecek kadar büyük veya yeraltında büyüeyebilen doğal bir meyve gövdesine sahip türlerdir. Bugüne kadar yaklaşık 14.000 kadar makrofungus türü bildirilmiş ve bunların arasından 2000'i yenilebilir olarak rapor edilmiştir. Yenilebilir mantarlar, özellikle  $\beta$ -glukanlar gibi çok zengin polisakkarit içeriği nedeniyle tıbbi özelliklere sahiptirler (Roman vd., 2020). Fungusların tıbbi kullanımını Asya ülkelerinde çok uzun bir geleneğe sahipken, Batı yarımkürede kullanımları sadece son yıllarda artış göstermiştir (Lindequist, Niedermeyer ve Jülich, 2005).

Ülkemizde birçok coğrafi bölgede gözlenebilen ve halk arasında "Kuzu göbeği" mantarı olarak bilinen *Morchella* türleri, tüm Dünya'da yenilebilir mantarlar arasında yer almaktadır (Acar ve Uzun, 2017). Kuzu göbeği mantarı Fungi aleminde, Ascomycota şubesinde, *Pezizomycotina* alt şubesinde, *Pezizomycetes* sınıfında, *Morchellaceae* familyasında ve *Morchella* (gerçek kuzu göbeği mantarı) cinsi içerisinde yer almaktadır (Taşkın ve Büyükalaca, 2012). *Morchella esculenta* (L.) Pers silindirik yapıdan oluşan ve üst kısmı toplam fungus ağırlığının %70-80'ine sahip olan bir pileus'as ahiptir. Bu pileus yaklaşık 3-9 cm uzunluğunda, 2-5 cm genişliğinde, yuvarlak veya düzensiz çukurlara sahip olup kahverengi, sarı, siyah veya soluk renkte olabilmektedir. Fungusun alt kısmı ise toplam fungus ağırlığının % 20-30'una sahip olan sap veya stipe olarak bilinen organdan oluşmaktadır. Stipe ise yaklaşık 1-4 cm uzunluğunda, 0,5 – 3,0 cm kalınlığında ve oyuk yapıdadır. Olgunlaşmanın ilk evrelerinde soluk gri beyazımsı olup olgunlukta ise rengi grimsi kahverengiye dönüşmektedir (Hamayun, Khan ve Begum, 2003).

*M. esculenta*'nın şapka yapısı, tokoferoller, karotenoidleri, organik asitleri ve fenolik bileşikler içeren çok çeşitli aktif bileşenlere sahiptir. Organik asitler oksalik asit, malik asit, sitrik asit, fumarik asit ve kinik asit içermekte olup protokatekuik asit, para-hidroksibenzoik asit ve para-kumarik asit fenolik bileşikler arasında yer almaktadır. Kuzu göbeğinin içerdiği bu bileşikler tıbbi açıdan oldukça önemlidirler (Ajmal, Akram, Ara, Akhund ve Nayyar, 2015). Birçok araştırmacı kuzu göbeği mantarında yer alan bu aktif bileşiklerin antioksidan, antimikrobiyal, antialerjenik, antiinflamatuvar, antitümör, bağışıklık uyarıcı ve nöroprotektif gibi muazzam özelliklere sahip olduğunu bildirmiştir (Duncan, Pugh, Pasco ve Ross, 2002; Meng vd., 2010; Baati, Horcajada, Gref, Couvreur ve Serre, 2011; Halliwell, 2011; Halliwell, 2012; Heleno vd., 2013).

Enfeksiyon hastalıkları, Dünya çapında insan sağlığına yönelik en büyük tehditlerden biri olmuş ve olmaya devam etmektedir. Patojenlere karşı çok sayıda antimikrobiyal kullanılmasına rağmen, bu patojenlerde görülen antimikrobiyal direnç artan bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir (Shameem, Kamili, Ahmad, Masoodi ve Parray, 2017). Artan antimikrobiyal direnç sorunu araştırmacıları çoklu ilaç direncine sahip patojenlere karşı savaşmak ve çeşitli yeni antimikrobiyal maddeleri geliştirmek için alternatif kaynaklar bulmaya teşvik etmiştir (Roman vd., 2020).

Gerçekleştirilen bu çalışmanın amacı; Kırşehir ili ve ilçelerinden toplanan Kuzu göbeği (*Morchella esculenta* (L.) Pers) mantarının moleküler karakterizasyonu ve çeşitli mikroorganizmalara karşı *in vitro* antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi'dir.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. *Morchella esculenta* Mantarlarının Toplanması

Çalışmada kullanılan kuzu göbeği mantarları 2019 yılı Nisan-Haziran ayları içerisinde Kırşehir ili ve ilçelerinden toplanmıştır. İlk olarak mantarın daha önceden bulunduğu belirtilen alanlar tespit edilmiştir. Daha sonra suyun bol olduğu dere kenarları ve baraj çevreleri gibi sulak alanlar tespit edilmiştir. Tespit edilen bu bölgelerde kuzu göbeği mantarı aranmış ve toplanmıştır. Tespit edilen kuzu göbeği

mantarlarının toprak üstü yapılarına zarar verilmeden bir bıçak yardımı ile topraktan çıkarılmış, kilitli buzdolabı poşeti içerisine konularak kısa zamanda laboratuvara getirilmiştir.

## 2.2. *Morchella esculenta* Mantarlarının Moleküler Tanımlanması

Kuzu göbeği mantarlarından total DNA izolasyonu Plant DNA Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'lar etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jel elektroforezinde  $1\times$ TAE tamponunda yürütülmüş (90 V), UV ışığı altında görüntülenmiş ve sonraki çalışmalar için  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

18S ve ITS1-5.8S-ITS2 rRNA gen bölgelerinin çoğaltılması için gereken primerler Tablo 1'de verilmiştir. PCR reaksiyonları 50  $\mu\text{l}$  son hacimde olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımında son hacimde  $1\times$ Taq DNA polimeraz tamponu, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 250  $\mu\text{M}$  dNTPmix (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 10 pmol/ $\mu\text{l}$  ileri ve geri primerler, 2U Taq DNA polimeraz ve 100 ng (yaklaşık 1  $\mu\text{l}$ ) kalıp DNA olacak şekilde hazırlanmıştır. Son hacim ise steril  $\text{dH}_2\text{O}$  ile 50  $\mu\text{l}$ 'ye tamamlanmıştır.

Tablo 1

Çalışmada kullanılan primerler

| Bölge | Primerler | Diziler (5'-3')          | T <sub>m</sub> (°C) | Uzunluk (bp) | Kaynak                            |
|-------|-----------|--------------------------|---------------------|--------------|-----------------------------------|
| 18S   | NS3       | GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC    | 65                  | 907          | White, Bruns, Lee ve Taylor, 1990 |
|       | NS6       | GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC |                     |              |                                   |
| ITS   | ITS1      | TCCGTAGGTGAACCTGCGG      | 53                  | 620          |                                   |
|       | ITS4      | TCCTCCGCTTATTGATATGC     |                     |              |                                   |

PCR döngü parametreleri başlangıç denatürasyonundan sonra ( $95^{\circ}\text{C}$ 'de, 3 dk) 35 döngü  $95^{\circ}\text{C}$ 'de 30 sn,  $55^{\circ}\text{C}$ 'de 30 sn ve  $72^{\circ}\text{C}$ 'de 1,5 dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Son uzama ise  $72^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dk olacak şekilde yapılmıştır. Döngü sonunda PCR ürünleri etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde yürütülmüş (90 V) ve UV ışığı altında görüntülenmiştir. Örnekler dizin analizi için MacroGen (Hollanda) firmasına gönderilmiştir.

Elde edilen 18S ve ITS gen dizileri BioEdit programı ile düzenlenmiş ve NCBI GenBank'ta blastlanarak diğer 18S ve ITS dizileri ile yüzde benzerlikleri belirlenmiştir (Hall, 1999; Sayers vd., 2020). Benzerlik oranları %97 ve üzerinde olan örnekler aynı tür kabul edilmiştir.

## 2.3. *Morchella esculenta* Ekstraktlarının Hazırlanışı

Tür tayinleri yapılan kuzu göbeği mantarları küçük parçalar şeklinde dilimlenerek,  $40^{\circ}\text{C}$ 'de gece boyu kurutulmuştur. Daha sonra kuruyan mantar parçaları homojenizatör yardımı ile toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen materyalden 10 gr tartılıp, 100 ml etanol, metanol ve su içeren erlenlere ayrı ayrı eklenmiş ve, manyetik karıştırıcıda 24 saat karıştırılmıştır. Bu süre sonunda elde edilen ekstraktlar Whatman No 1 kâğıdı ile süzölmüş ve evaporatör (Heidolph, Almanya) yardımı ile basınç altında konsantre edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite belirlenmesi için 0,5 gr konsantre edilmiş ekstraktlardan tartılmış ve 10 ml %5 DMSO içerisinde çözülerek 50 mg/ml olacak şekilde test solüsyonları hazırlanmıştır.

## 2.4. *In-vitro* Antibakteriyel ve Antifungal Aktivitenin Belirlenmesi

Çeşitli çözücüler ile elde edilen kuzu göbeği ekstraktlarının antimikrobiyal özelliği çeşitli bakteri ve mantar suşlarına karşı agar kuyucuk yöntemi ile test edilmiştir (Magaldi vd., 2004). Bakteri ve mantar suşları Refik Saydam Hıfzıssıhha Sağlık Merkezinden temin edilmiştir. Çalışmada kullanılacak mikroorganizmalar



*Escherichia coli* ATCC 25922, *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 43288, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* ATCC 43251, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* 709 Roma, *B. subtilis* subs. *spizizenii* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 60193 ve *Saccharomyces cerevisiae* RSKK 251 olarak belirlenmiştir.

Bakteri suşlarının TSA (Tryptic Soy Agar) besiyerine çizgi ekimleri yapılmış ve gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün üreyen tek kolonilerden steril serum fizyoloji (% 0,9 NaCl) içerisine Mc-Farland 0,5 bulanık değerine sahip olacak şekilde eklenmiş ve bu şekilde hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonlarının steril eküvyon çubuğu ile MHA (Müller Hinton Agar) besiyeri üzerine yayma ekimleri yapılmıştır. Ardından besiyerleri üzerine 4 mm çapında kuyucuklar steril cork-borer ile açılmıştır. Açılan kuyucukların içerisine 50 µl (2500 µg/ml her bir kuyucuk için) test solüsyonları eklenmiş ve petri kapları 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek antibakteriyal aktivite değerlendirilmiştir. Ampisilin (1 mg/ml) antibiyotiği pozitif kontrol olarak kullanılırken, %5 DMSO solüsyonu negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Tüm testler 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

*Candida* suşlarının büyütülmesi ve antifungal aktivitelerin belirlenmesi yukarıda anlatılan şekilde gerçekleştirilmiş olup besiyeri olarak PDA (Potato Dextrose Agar) ve YPD (Yeast Peptone Dextrose) besiyerleri kullanılmıştır. İnkübasyon koşulları ise 25 °C'de 48 saat olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak Fluconazole (1 mg/ml), negatif kontrol olarak %5 DMSO solüsyonu kullanılmıştır. Tüm testler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Agar kuyucuk yöntemi ile etkili bulunan ekstraktların minimal inhibisyon konsantrasyon (MİK) (MIC, Minimal Inhibition Concentration) değerleri Broth mikrodilüsyon metodu ile 96 kuyucuklu playtlerde gerçekleştirilmiştir. Kuzu göbeği etanol, metanol ve sulu ekstraktlarının farklı konsantrasyonları bakteriler için MHB (Müller Hinton Broth) ve funguslar için YPD (Yeast Peptone Dextrose) sıvı besiyeri kullanılarak 2000 µg/ml-15.625 µg/ml (2000, 1500, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625) olacak şekilde hazırlanmıştır. Kuyucukların içerisine 0,5 Mc-Farland bulanıklığa sahip hücre süspansiyonlarından 20 µl ilave edilmiştir. Mikroplaytler bakteriler için 37°C'de 1 gece, funguslar için ise 25°C'de 2 gün inkübe edilerek ve MIC değerleri mikrobiyal üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon olarak belirlenmiştir. MIC deneylerinde ampisilin ve flucozanol pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

## 2.5.GenBank Kayıt Numaraları

Çalışmada kullanılan *M. esculenta* EEA-1mantarının 18S rRNA ve ITS gen bölgelerine ait gen dizilerinin kayıt numaraları sırası ile MT453111 ve MT457418 olarak elde edilmiştir. Tüm gen dizileri NCBI GenBank veri tabanında depolanmıştır.

## 2.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmada gerçekleştirilen agar kuyucuk ve MİK değerlerinin karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Test edilen bakteri türlerinin birbiri ile karşılaştırılmasında ise LSD çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Yine ekstraktların birbirleri ile karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve LSD çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Test edilen maya türlerinin birbiri ile karşılaştırılmasında ise ( $\chi^2$ ) testi kullanılmıştır. Anlamlılık derecesi  $p < 0,05$  olarak alınmıştır. Varyans analizlerini gerçekleştirmeden önce bütün veriler Levene istatistiği kullanılarak varyans homojenliği açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen bütün veriler SPSS 16.0 istatistik programı kullanılarak analiz edilmiştir.

### 3. Bulgular ve Tartışma

Kuzu göbeği mantarları Kırşehir ili, Akçakent ilçesi ve ilçeye bağlı köylerden toplanmıştır. Akçakent ilçesi ilin en yağış alan ve sulak arazilerinin bulunduğu bir ilçedir. Yapılan çalışmalar sonucunda burada kuzu göbeği mantarının daha önceden bulunduğu tespit edilmiş ve bu bölgeden toplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Kuzu göbeği mantarı bal peteğini andıran şapkali görünüme sahip olması ile kolay bir şekilde ayırt edilmiştir (Şekil 1). Tespit edilen bölgelerden dikkatlice kazılarak çıkarılan mantarlar kilitli buzdolabı poşeti içerisine konularak laboratuvara getirilmiştir. Yaklaşık olarak 0,5 gr taze kuzu göbeği mantarı DNA izolasyonu için kullanılmış ve diğer örneklerde antimikrobiyal aktivite testleri için kullanılmıştır.



Şekil 1. Kırşehir ilinden toplanan Kuzu Göbeği mantarının görüntüsü

Genomik DNA'sı izole edilen kuzu göbeği mantarından, 18S rRNA ve ITS gen bölgeleri PCR yardımı ile çoğaltılmıştır. PCR işlemi sonunda 18S rRNA için 907 bp ve ITS bölgesi için ise 620 bp amplifikasyon ürünü agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Kuzu göbeği mantarının çoğaltılmış 18S rRNA ve ITS gen bölgeleri. Sıra 1: ITS gen bölgesi (620 bp), Sıra 2: DNA markır (Vivantis, 100 bp DNA ladder), Sıra 3: 18S rRNA gen bölgesi (907 bp).

PCR ürünleri dizin analizi için Macrogen firmasına gönderilmiş ve gelen sekans sonuçları Bioedit programı ile düzenlenmiştir. Dizin analizleri sonucunda sekanslar GenBank'ta var olan diğer gen sekansları ile karşılaştırılarak yüzde benzerlikler tespit edilmiştir (Tablo 2).

Yapılan 18S rRNA (%98 ve üzeri benzerlik) ve ITS gen dizin analizlerine (%99 ve üzeri benzerlik) göre toplanan mantarların *M. esculenta* olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2

Kuzu göbeği mantarının 18S rRNA ve ITS gen bölgelerinin GenBank Veri Bankasında bulunandığı genler ile yüzde (%) benzerlikleri

| Gen bölgesi | Benzer bulunan tür                    | GenBank No | Örtüşme (%) | Benzerlik(%) |
|-------------|---------------------------------------|------------|-------------|--------------|
| 18S rRNA    | <i>M. cf. esculenta</i> OSC 100041    | AY544708   | 100         | 98,55        |
|             | <i>M. esculenta</i>                   | U42642     | 100         | 98,40        |
| ITS         | <i>M. esculenta</i> isolate VUL641    | MH718237   | 100         | 99.26        |
|             | <i>M. esculenta</i> isolate HAI-C-787 | JQ691478   | 100         | 99.26        |
|             | <i>M. esculenta</i> isolate HAI-C-917 | JQ691476   | 100         | 99.07        |

Özellikle mantarları tanımlamayı amaçlayan moleküler çalışmaların çoğu ITS gen bölgesinin RFLP modellerini ve ITS gen dizilerinin karşılaştırılmasına dayandığı bilinen bir konudur. Kuzu göbeği ile ilgili birçok filogenetik çalışma da bu bölgeler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Diğer moleküler filogenetik çalışmalar ise 18S ve 28S (LSU) rRNA genlerinden alınan dizilere dayanmaktadır. ITS gen bölgeleri genomda çoklu kopyalar halinde bulunurlar ve mantar türleri arasında benzer ve değişken olma eğilimindedirler (Taşkın ve Büyükalaca, 2012). Bu çalışmada da kuzu göbeği mantarının moleküler tür tayinleri 18S rRNA ve ITS gen bölgelerine ait DNA dizileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu gen bölgelerinin dizin analizine göre toplanan mantarların yüksek doğrulukta tür tayinlerinin yapılması sağlamış ve bu da elde edilen verilerin kaynağına dair önemli bilgiler sunmuştur.

*M. esculenta* EEA-1 izolatının etanol, metanol ve sulu ekstraktlarının Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerindeki antibakteriyal etkileri agar kuyucuk yöntemi ile belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, kuzu göbeği mantarının sulu ekstraktlarının 8 bakterinin 4'ü üzerinde etkili olduğu (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus* ve *B. subtilis*) ( $p<0,05$ ,  $df=7$ ,  $F=55,32$ ) tespit edilmiştir. Test edilen sekiz bakteriye karşı etanol ekstraktlarının 7'si üzerine etkili olduğu (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *B. cereus* ve *B. subtilis*) ( $p<0,05$ ,  $df=7$ ,  $F=24,15$ ) bulunmuştur. Metanol ekstraktlarının ise 5 bakteri üzerinde etkili olduğu (*P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus* ve *B. subtilis*) tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ,  $df=7$ ,  $F=93,52$ ). Yapılan istatistik analiz sonucunda etanolün en etkili ekstrakt olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ,  $df=7$ ,  $F=93,52$ ).

Bakteri suşları üzerinde etkili olduğu tespit edilen ekstraktların minimal inhibisyon konsantrasyon değerleri broth mikrodilüsyon tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Kuzu göbeği mantarının etanol, metanol ve sulu ekstraktlarının MİK değerlerinin 125-750 µg/ml arasında olduğu bulunmuştur. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre; en etkili ekstraktların etanol ve metanol ekstraktları olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ,  $df=2$ ,  $F=17,08$ ). Etanol ekstraktının en düşük 125 µg/ml konsantrasyonda *P. aeruginosa* suşu üzerine metanol ekstraktının ise en düşük 250 µg/ml konsantrasyonda *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* suşları üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3).

*M. esculenta* EEA-1 mantarının etanol, metanol ve sulu ekstraktlarının *C. albicans* ve *S. cerevisiae* üzerindeki antifungal etkileri agar kuyucuk yöntemi ile belirlenmiştir. Sonuç olarak, kuzu göbeği mantarının etanol ve metanol ekstraktlarının sadece *C. albicans* üzerinde antifungal etkisinin olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Maya suşları üzerinde etkili olduğu tespit edilen etanol ve metanol ekstraktlarının minimal inhibisyon konsantrasyon değerleri ise broth mikrodilüsyon tekniği yardımıyla 250-500 µg/ml arasında değişen değerlerde olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4).

Tablo 3

*M. esculenta* EEA-1 ekstraktlarının antibakteriyel etkisi

| Bakteriler                           | İnhibisyon zonu (mm) |            |            |            | Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (µg/ml) |        |         |             |
|--------------------------------------|----------------------|------------|------------|------------|---|--------|---------|-------------|
|                                      | Sulu                 | Etanol     | Metanol    | Ampisilin  | Sulu                                      | Etanol | Metanol | Ampisilin   |
| Gram negatif bakteriler              |                      |            |            |            |   |        |         |             |
| <i>E. coli</i> ATCC25922             | -                    | 11,66±1,54 | -          | 20,66±0,57 | -   | 250±0  | -       | 26,04±9,02  |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC43288       | -                    | 11±1       | 9,66±1,52  | 20±1       | -   | 125±0  | 250±0   | 31,25±0     |
| <i>Y. pseudotuberculosis</i> ATCC911 | -                    | -          | -          | 21,66±2,08 | -   | -      | -       | -           |
| Gram pozitif bakteriler              |                      |            |            |            |   |        |         |             |
| <i>E. faecalis</i> ATCC 29212        | -                    | 6,66±0,57  | -          | 18,66±1,52 | -   | 750±0  | -       | 21,16±8,74  |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923          | 6,66±1,52            | 10±1       | 11,33±0,57 | 18,66±0,57 | 750±0                                     | 250±0  | 250±0   | 26,04±9,02  |
| <i>B. cereus</i> 709 Roma            | 7±1                  | 10,33±1,52 | 9±1        | 15,33±0,57 | 750±0                                     | 250±0  | 750±0   | 41,66±18,04 |
| <i>B. subtilis</i> ATCC 6633         | 7±1                  | 10,33±2,51 | 9,66±1,52  | 19±1,73    | 750±0                                     | 250±0  | 250±0   | 41,66±18,04 |
| <i>L. monocytogenes</i> ATCC 43251   | 6,33±1,15            | 8,66±0,57  | 8,66±0,57  | 20±1       | 750±0                                     | 500±0  | 750±0   | 26,04±9,02  |

Tablo 4

*M. esculenta* EEA-1 ekstraktlarının antifungal etkisi

| Funguslar                     | İnhibisyon zonu (mm) |            |            |             | Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (µg/ml) |        |         |             |
|-------------------------------|----------------------|------------|------------|-------------|---|--------|---------|-------------|
|                               | Sulu                 | Etanol     | Metanol    | Flucozanole | Sulu                                      | Etanol | Metanol | Flucozanole |
| <i>C. albicans</i> ATCC60193  | -                    | 14,33±0,57 | 10,66±0,57 | 18,33±1,52  | -   | 250±0  | 500±0   | 23,43±11,05 |
| <i>S. cerevisiae</i> RSKK 251 | -                    | -          | -          | -           | -   | -      | -       | -           |

Mantarların doğal ortamlarında hayatta kalabilmeleri ve ekolojik rekabet açısından antibakteriyel ve antifungal bileşikler üretirler. Bu nedenle, az ya da çok güçlü aktiviteye sahip antimikrobiyal bileşiklerin birçok mantardan izole edilebilmesi ve bunların insanlara faydalı olabileceği hiç de şaşırtıcı değildir (Lindequist vd., 2005). Fungal organizmaların sahip oldukları bazı sekonder metabolitlerin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bilinen bir özelliktir. Farmakolojik açıdan aktif makrofungus bileşiklerinin büyük bir kısmı genellikle polisakkaritler ya da peptidoglikanlardan oluşmaktadır. Bu tür bileşiklerin *in vitro* ve *in vivo* ortamda izolasyonları ve kimyasal yapılarının aydınlatılmasına yönelik çalışmalar hızla artmaktadır. 182 cinse dahil 651 hetero- ve homobasidiomycetes sınıfına ait makrofungus türünde antitumoral ya da bağışıklık sistemini güçlendirici farklı polisakkaritler bulunduğu belirtilmektedir. Daha önceki çalışmalarda *Lentinus* (*Lentinula*) *edodes*, *Schizophyllum commune*, *Grifola frondosa* ve *Sclerotinia sclerotiorum* makrofunguslarında özellikle  $\beta$ -glukanlar, lentinan, schizophyllan (sonifilan ya da sizofiran) ve grifola'nın varlığı tespit edilmiştir (Kalyoncu, Oskay ve Kalmış, 2010). Bu çalışmada ise *M. esculenta* olarak moleküler tanımlaması yapılan kuzu göbeği mantarının antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Bu anlamda bazı ekstraktların hem antibakteriyel hem de antifungal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışma ile kuzu göbeğinden elde edilecek ve tanımlamaları yapılacak etken maddelerin antibiyotik ve antifungal ilaçlara alternatif bir tedavi olarak kullanılabilirliğine dair ön çalışma niteliğinde önemli bilgiler elde edilmiştir.

Makrofungusların sahip olabilecekleri antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek için değişik çözücülerde hazırlanan ekstraktlar birçok çalışmada kullanılmıştır. Değişik çözücülerde hazırlanan ekstraktların çeşitli mikroorganizmalarına karşı oluşturdukları antagonistik etki düzeyleri ile makrofungusların antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmektedir. Antimikrobiyal aktivite araştırmalarında çok çeşitli test yöntemlerinin ve test mikroorganizmalarının kullanılmakta olduğu bilinmektedir (Bekçi, Altınsoy, Sarıkaya, Onbaşlı ve Yuvalı Çelik, 2011). Çalışmamızda da *M. esculenta* EEA-1 mantarının etanol, metanol ve sulu ekstraktlarının antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri ilk olarak agar kuyucuk yöntemi ve daha sonra broth dilüsyon tekniği ile en etkili ekstraktların MİK değerleri belirlenmiştir. *M. esculenta*'dan elde edilen sekonder metabolitlerin gösterdiği antimikrobiyal özellikler ile ilgili literatürde birkaç çalışma bulunmaktadır. Venturini, Rivera, Gonzales ve Blanco (2008) yaptıkları çalışmada *M. esculata*'ya ait metanol, hekzan, etil asetat ve sulu ekstraktların antimikrobiyal aktivitesini *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Vibrio parahaemolyticus* ve *Yersinia enterocolitica* olmak üzere 5 bakteri üzerinde agar kuyucuk yöntemi ile belirlemeye çalışmışlardır. Çalışmada sadece *M. esculata*'nın sulu ekstraktının *Y. enterocolitica*'ya karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da *E. coli* ve *Y. pseudotuberculosis* bakterileri kullanılmıştır. Fakat *M. esculata* EEA-1'in hiçbir ekstraktı *Yersinia*'ya karşı aktivite göstermemiştir. Sadece metanol ekstraktının *E. coli* üzerinde etkili olduğu bulunmuştur. Bu iki çalışma arasındaki sonuçların farklı olmasının nedeninin kullanılan bakteri suşlarının ve fungus örneklerinin toplanma lokasyonlarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Heleno vd. (2013) yaptıkları çalışmada Sırbistan ve Portekiz'den toplanan *M. esculenta* mantarlarının kimyasal içeriğini, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Mantarların metanol ekstraktlarının gram negatif (*Escherichia coli* ATCC 35210, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Enterobacter cloacae* (insandan izole edilen)) ve gram pozitif (*Listeria monocytogenes* NCTC 7973, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) mikroorganizmalara karşı gösterdikleri antimikrobiyal aktivite disk difüzyon ve mikrodilüsyon deneyleri ile test edilmiştir. Yapılan mikrodilüsyon testleri sonucunda Portekiz ve Sırbistan'dan toplanan mantarların metanol ekstraktlarının sırasıyla 600  $\mu\text{g/ml}$  ve 50  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonda *L. monocytogenes* NCTC 7973 bakterisine karşı, 300  $\mu\text{g/ml}$  ve 20  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonda *S. aureus* ATCC 6538 bakterisine karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. Bizim gerçekleştirdiğimiz çalışmada ise kuzu göbeği mantarlarından elde edilen 3 ekstraktında (sulu, etanol, metanol) *L. monocytogenes* ve *S. aureus* bakterileri üzerine etkili olduğu belirlenmiş. Çalışmamızdaki metanol ekstraktının MİK değeri *L. monocytogenes* ve *S. aureus* bakterilerine karşı sırasıyla 750  $\mu\text{g/ml}$  ve 250  $\mu\text{g/ml}$  olarak tespit edilmiştir. Çalışmamız ile



karşılaştırıldığında Portekiz'den toplanan ve metanol ekstraktı gerçekleştirilen kuzu göbeği mantarının antimikrobiyal sonuçları bizim çalışmamızdaki veriler ile benzerlik göstermektedir.

[Shameem vd. \(2017\)](#), Küzey Batı Himalaya bölgesinde yenilebilir mantarların antimikrobiyal aktivitesi üzerine yaptıkları bir çalışmada, *M. esculenta*'ya ait etil asetat ve bütanol ekstraktlarının disk diffüzyon metodu ile çeşitli patojenlere karşı etkinliklerini test etmişler ve etkili olan ekstraktların MİK ve MBC (minimal bakterisidal konsantrasyonu) değerlerini belirlemişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda *M. esculenta*'nın bütanol ekstraktlarının test edilen *P. aeruginosa* CD0012 karşı 750 µg/ml, *E.coli* CD002 karşı 250 µg/ml ve *S.aureus* CD003'e karşı 250 µg/ml konsantrasyonda etkili MİK değerlerine sahip olduğu tespit edilmiş. Etil asetat ekstraktının ise 750 µg/ml konsantrasyondaki MİK değerinde *E. coli* CD002'ye karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Bizim gerçekleştirdiğimiz çalışmada etil asetat ve bütanol ekstraktlarının olmamasına karşı etanol ekstraktlarının *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı gösterdikleri MİK değerleri [Shamemm vd. \(2017\)](#)'nin bütanol ekstraktları ile aynıdır (250 µg/ml). Bu sonuç bize antimikrobiyal etkisi olan kimyasal bileşiğin aynı olabileceğini ve hatta bütanol, etanol ve metanol içerisinde ekstrakte edilebileceğini düşündürmüştür. [Shanem vd. \(2017\)](#)'nin çalışmasında antifungal aktivite için birkaç fungus kullanılmış ve bütanol ekstraktının *C. albicans* MRD3212'e 18 mm zon çapı ile etkili olduğu gösterilmiştir. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada ise kuzu göbeği mantarının etanol ve metanol ekstraktlarının agar kuyucuk metodu ile 14,33 mm ve 10,66 mm zon çapında *C. albicans*'a karşı etkili olduğu belirlenmiştir.

Ülkemizde *M. esculenta*'nın antimikrobiyal aktivitesi üzerine yapılan çalışmalar çok olmamakla birlikte birkaç çalışma mevcuttur. [Kalyoncu vd. \(2010\)](#) yaptıkları bir çalışmada Akdeniz bölgesinden 21 değişik yabani mantar örneği toplamışlar ve misellerin etanol ekstraksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. *M. esculenta* var. *vulgaris*'inde aralarında bulunduğu bu yabani fungusların etanol ekstraktlarının toplamda 11 Gram pozitif ve Gram negatif bakteriye karşı gösterdikleri antimikrobiyal aktiviteleri agar kuyucuk metodu ile araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda *M. esculata* var. *vulgaris*'in agar kuyucuk metodu ile oluşturduğu antimikrobiyal zon çapının *S. aureus* ATCC 6538P ve *C. albicans* ATCC 10231'de sırasıyla 8 ve 10 mm olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda ise Kırşehir ilinden toplanan *M. esculenta* EEA-1 mantarının etanol ekstraktlarının *S. aureus* ve *C.abicans*'a karşı sırasıyla 10,66 ve 14,33 mm çapında aktivite zonuna sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar [Kalyoncu vd. \(2010\)](#)'nin yaptığı çalışma ile benzerlik göstermektedir. Fakat bizim çalışmamızda kuzu göbeği mantarının etanol ekstraktlarının *E. coli*, *E. fecalis*, *B. subtilis* ve *B. cereus* bakterilerine karşı da etkili olduğu tespit edilmiştir. Aynı tür bakteri suşları [Kalyoncu vd. \(2010\)](#)'nin yaptığı çalışmada da kullanılmasına karşın herhangi bir etki zonu gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlar bize etkili olan kimyasal bileşiğin farklı coğrafi bölgeden toplanan kuzu göbeği mantarlarında farklı olabileceğini düşündürmüştür.

[Acay \(2018\)](#) yaptığı bir çalışmada Mardin'den topladığı *M. esculenta* örneklerinin çeşitli kimyasal özelliklerini, bazı bakteri ve funguslara karşı antimikrobiyal aktivitesini disk difüzyon metodu ile incelemiştir. Etanol, metanol ve hekzan ekstraktlarının *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 ve *C. albicans* ATCC 10231 mikroorganizmalarına karşı aktivite gösterdiğini tespit etmiştir. Çalışmada kuzu göbeği metanol ekstraktlarının oluşturduğu zon çapları *P. aeruginosa* ATCC 27853'de 5 mm, *S. aureus* ATCC 25923'de 8 mm ve *C. albicans* ATCC 10231'de 9 mm olarak ölçülmüştür. Çalışmada kullanılan ekstraktların *E. coli* ATCC 25922 ve *B. subtilis* ATCC 11774 bakterilerine karşı etkinliklerinin olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda ise EEA-1 izolatının metanol ekstraktlarının *P. aeruginosa*'da 9,66 mm, *S. aureus*'da 11,33 mm, *C. albicans*'da 10,66 mm ve *B. subtilis*'de 9,66 mm inhibisyon zon çapında aktivite gösterdiği ve *E. coli* bakterisine karşı aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda iki çalışmadan elde edilen verilerin birbiri ile benzer oldukları görülmektedir.

[Canlı, Benek, Şenturan, Akata ve Altuner, \(2019\)](#) yaptıkları çalışmada Bolu, Abant bölgesinden *M. esculenta* ve *Trametes versicolor* mantar örneklerini toplamışlardır. Örneklerinin etanol ekstraktlarının Gram pozitif, Gram negatif bakterilere ve mantarlara karşı gösterdikleri antimikrobiyal aktivite incelenmiştir. *M.*



*esculenta*'nın etanol ekstraktlarının test edilen *B. subtilis* DSMZ 1971'de 7 mm, *C. albicans* DSMZ 1386'da 8 mm, *E. coli* ATCC 25922'de 7 mm, *L. monocytogens* ATCC 7644'de 7 mm, *P. aeruginosa* DSMZ 5071'de 7mm, *S. aureus* ATCC 25923'de 7 mm zon çapı oluşturduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar bizim çalışmamız ile büyük oranda benzerlik göstermektedir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde *M. esculenta* ekstraktlarının farklı veya aynı grup mikroorganizmalar üzerinde farklı aktiviteler gösterdiği görülmektedir. Çalışmamız ile literatürde yer alan bu çalışmalar arasındaki bazı farklılıkların fungus örneklerinin toplanma lokasyonlarının ve kullanılan suşların farklı olmasından dolayı meydana geldiği düşünülmektedir. Fungusların gelişmesinde ve metabolizmalarında buldukları çevrenin çok büyük etkisi bulunmaktadır. Sentezlenecek olan biyoaktif moleküller ve sekonder metabolitler su, hava, sıcaklık ve toprağın besin miktarı gibi birçok çevresel faktörden etkilenmektedir. Aynı zamanda organizma yaşadığı ortamda varlığını sürdürebilmek ve çevresindeki rekabetçi türlere üstünlük sağlayabilmek için sentezlediği bu kimyasallara ihtiyaç duymaktadır. Bu kimyasalların etki düzeyleri miktara ve türe göre zayıf veya kuvvetli olabilmektedir (Kalyoncu vd., 2010). Bu biyotik ve abiyotik faktörlerin de çalışmalar arasındaki farklılığı açıklayabileceği düşünülmektedir.

#### 4. Sonuç

Günümüzde yaklaşık 14.000 makrofungus tanımlanmış ve bunların yaklaşık %15'nin yenilebilir özellikte olduğu bilinmektedir. Yenilebilir makrofunguslar yüksek tıbbi özelliklere sahiptirler (Roman vd., 2020). Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin pek çoğu mikrofunguslardan ve aktinomisetlerden izole edilerek hazırlanmaktadır (Kalyoncu vd., 2010). Makrofungusların antimikrobiyal etkileri funguslar tarafından sentezlenen ve bazı fenolik bileşikler, kinonlar, terpenoidler, pürinler, primidinler ve fenil propanoid türevleri gibi çoğunlukla fungusa özgü olan antagonistik maddelerden kaynaklanmaktadır (Roman vd., 2020). Ülkemizde makrofungusların tespitine ve tür tayinlerine yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Bunun yanı sıra yüksek bir antimikrobiyal rezerve sahip olan bu fungusların farmakolojik, endüstriyel ve tıbbi özelliklerinin de ortaya çıkarılması kaçınılmaz bir konudur. Günümüzde bakteri ve mantarların sürekli olarak geliştirdikleri antimikrobiyal direnç halk sağlığı açısından büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Makrofungusların sahip oldukları bu rezervler göz önüne alındığında, bunlardan yeni antibiyotiklerin araştırılması ve keşfinin önemi de açıkça ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızda kullanılan *M. esculenta* makrofungusunda birçok bakteri ve *Candida* fungusuna karşı güçlü bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak kuzu göbeği mantarının mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlardan korunmak için alternatif bir tıp yöntemi olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.

#### Teşekkür

Bu çalışma Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FEF.A4.19.007 numaralı proje ile desteklenmiştir.

#### Yazar Katkıları

Tüm yazarlar eşit katkıda bulunmuştur.

#### Çıkar Çatışması

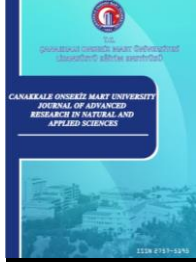
Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

#### Kaynaklar

Acar, İ. ve Uzun, Y. (2017). An Interesting Half-Free Morel Record for Turkish Mycobiota (*Morchella populiphila* M. Kuo, M.C. Carter & J.D. Moore). *The Journal of Fungus*, 8(2), 125-8. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/357091>

- Acay, H. (2018). Yenilebilen Yabani Mantar *Morchella esculenta* (L.) Pers.'nin Besinsel Kalitesi ve Biyoaktif Özelliklerinin Değerlendirilmesi. *The Journal of Fungus*, 9(2), 95-105. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/560149>
- Ajmal, M., Akram, A., Ara, A., Akhund, S. ve Nayyar, B. G. (2015). *Morchella esculenta*: An edible and health beneficial mushroom. *Pakistan Journal of Food Science*, 25(2), 71-8.
- Baati, T., Horcajada, P., Gref, R., Couvreur, P. Ve Serre, C. (2011). Quantification of fumaric acid in liver, spleen and urine by high-performance liquid chromatography coupled to photodiode-array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56(4), 758-762. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.07.011>
- Bekçi, H., Altınsoy, B., Sarıkaya, S., Onbaşılı, D. ve Yuvalı Çelik, G. (2011). Kastamonu Yöresinden Toplanan Bazı Makrofungusların Antimikrobiyal Aktivitesi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 11(2), 187-190. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/159627>
- Canlı, K., Benek, A., Şenturan, M., Akata, I. ve Altuner, E. M. (2019). *In vitro* Antimicrobial Activity of *Morchella esculenta* and *Trametes versicolor*. *The Journal of Fungus*, Aralık10(Özel Sayı), 28-33. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/900186>
- Duncan, C., Pugh, N., Pasco, D. S. ve Ross, S.A. (2002). Isolation of a galactomannan that enhances macrophage activation from the edible fungus *Morchella esculenta*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(20), 5683-5. <https://doi.org/10.1021/jf020267c>
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, 41, 95-8. Erişim adresi: <https://www.academia.edu/2034992>
- Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(3), 125-130. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.12.002>
- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*, 70(5), 257-265. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>
- Hamayun, M., Khan, M. A. ve Begum, S. (2003). Marketing of medicinal plants of Utror-Gabral Valleys, Swat, Pakistan. *Journal of Ethnobotanical Leaflets*, 2003(1), 13-22. Erişim adresi: <https://www.researchgate.net/publication/38285163>
- Heleno, S.A., Stojkovic, D., Barros, L., Glamoclija, J., Sokovic, M., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P. Ve Ferreira, I. C. F. R. (2013). A comparative study of chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Morchella esculenta* (L.) Pers. from Portugal and Serbia. *Food Research International*, 51(1), 236-243. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.020>
- Kalyoncu, F., Oskay, M. ve Kalmış, E. (2010). Bazı Yabani Makrofungus Misellerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi. *The Journal of Fungus*, 1(1), 1-8. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/181923>
- Lindequist, U., Niedermeyer, T. H. J. ve Jülich, W. D. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(3), 285–299. <https://doi.org/10.1093/ecam/neh107>
- Magaldi, S., Essayag, S. M., Hartung de Capriles, C., Perez, C., Colella, M. T., Olaizola, C. ve Ontiveros, Y. (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases*, 8(1), 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2003.03.002>

- Meng, F., Zhou, B., Lin, R., Jia, L., Liu, X., Deng, P., Fan, K., Wang, G., Wang, L. ve Zhang, J. (2010). Extraction optimization and in vivo antioxidant activities of exopolysaccharide by *Morchella esculenta* SO-01. *Bioresource Technology*, 101(12), 4564-9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.113>
- Roman, M. P. G., Mantilla, N. B., Florez, S. A. C., De Mandal, S., Passari, A. K., Ruiz-Villafan, B. ve Sanchez, S. (2020). Antimicrobial and Antioxidant Potential of Wild Edible Mushrooms. In *An Introduction to Mushroom*. IntechOpen; pp:1-18. Erişim adresi: <https://www.intechopen.com/books/an-introduction-to-mushroom/antimicrobial-and-antioxidant-potential-of-wild-edible-mushrooms>
- Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Ostell, J., Pruitt, K. D. ve Karsch-Mizrachi, I. (2020). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 48, D84–D86. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz956>
- Shameem, N., Kamili, N. A., Ahmad, M., Masoodi, F.A. ve Parray, J.A. (2017). Antimicrobial activity of crude fractions and morel compounds from wild edible mushrooms of North western Himalaya. *Microbial Pathogenesis*, 105, 356-360. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.005>
- Taşkın, H. ve Büyükalaca, S. (2012). Kuzu Göbeği (*Morchella*) Mantarı. *Bahçe*, 41(1), 25-36. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/39699>
- Venturini, M. E., Rivera, C. Z., Gonzales, C. ve Blanco, D. (2008). Antimicrobial activity of extracts of edible wild and cultivated mushrooms against foodborne bacterial strains. *Journal of Food Protection*, 71(8), 1701-6. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.8.1701>
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. ve Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press Inc., San Diego. Erişim adresi: <https://www.researchgate.net/publication/262687766>



## Manisa İli Pamuk Üreticilerinin Bitki Koruma Problemleri

Samet Memiş<sup>1</sup>, Ali Özpinar<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Çanakkale, Türkiye

Makale Tarihi  
Gönderim: 04.11.2020  
Kabul: 24.02.2021  
Yayın: 20.03.2021  
Araştırma Makalesi

**Öz-** Bitkisel üretimde ürün kayıplarına neden olan bitki koruma etmenleri doğası gereği ekolojik faktörlerin etkisinde olup, dinamikdir. Agro-ekosistemde uygun mücadele programını gerçekleştirmek bitki koruma sorunlarının iyi analiz edilmesine bağlıdır. Sorunlar hakkında üreticilerin yeterli bilgi düzeyine sahip olması zirai mücadele uygulamaların başarısını arttırmaktadır. Bu bağlamda Manisa Ovası (Şehzadeler ve Saruhanlı ilçeleri) pamuk üreticilerinin bitki koruma uygulamalarında karşılaştıkları sorunları belirlemek amacıyla 2019 yılında bir anket uygulanmıştır. Hazırlanan 20 soruluk anket, basit rastgele örnekleme yöntemine göre seçilen 35 yerleşim yerinin %65'inde ve 471 üreticinin %21.23'ü ile yüz yüze görüşülerek yapılmıştır. Üreticilerin %30'unun tarla ve %70'inin ise bağ bahçe tarımı yaptıkları ve tarla tarımı yapanların %21'inin pamuk ektikleri görülmüştür. Pamuk üretiminde, pazarlama, en önemli sorun olarak bildirilmiştir. Bitki koruma problemleri ise ikinci sırada yer almıştır. Çiftçiler pamuktaki önemli yabancıot türleri olarak *Sorghum halepense* (%42), *Cynodon dactylon* (%30) ve *Solanum nigrum* (%14) ve zararlılar olarak da *Helicoverpa armigera* (%40), *Empoasca* spp (%35) ve *Tetranychus* spp (%15)'yi bildirmişlerdir. Üreticilerin %72'sinin bitki koruma konusundaki tavsiyeleri bayilerden aldıkları ve teknik teşkilattan yeterince yararlanmadıkları belirlenmiştir. Üreticiler kimyasal mücadele dışındaki diğer yöntemleri de bildiklerini söylemelerine rağmen, bu yöntemler hakkında yeterince bilgi sahibi olmadıkları görülmüştür. Çiftçilerin bitki koruma konularında eğitime ihtiyaç duydukları; bu eğitimi %54'ü bayilerden ve %10'u ise tarım teşkilatında almak istemiştir.

**Anahtar Kelimeler** – Anket, Bitki koruma problemleri, Manisa, Pamuk

## Plant Protection Problems of Cotton Producers in Manisa Provinces

<sup>1</sup>Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey

Article History  
Received: 04.11.2020  
Accepted: 24.02.2021  
Published: 20.03.2021  
Research Article

**Abstract-** As a nature, plant protection agents that cause crop losses in crop production are dynamic under the influence of ecological factors. To carry out the appropriate control program depends on a good analysis of the plant protection problems in the agricultural ecosystem. Farmers have sufficient knowledge on the subject increases the success of the application of pest control. For this purpose, a survey was conducted in 2019 to determine the plant protection practices in cotton agriculture and the knowledge level of the producers of (districts Şehzadeler and Saruhanlı) Manisa Plain. Prepared 20-question survey was conducted by interviewing face to face with 65% of 35 cotton producing settlements and 21.23% of 471 farmers. It has been observed that 30% of the producers cultivate fields and 70% of them cultivate orchards. It was found that produced the cotton of 21% field crop growers. In cotton production, marketing is the most important problem, and the crop protection problem is reported as the second. Farmers were reported *Sorghum halepense* (42%), *Cynodon dactylon* (30%) and *Solanum nigrum* (14%), as weeds and *Helicoverpa armigera* (40%), *Empoasca* spp. (35%) and *Tetranychus* spp. (15%) as pests in cotton cultivation area. It was determined that 72% of the producers received the advices on pesticides from pesticide markets but, they did not make enough use of provincial directorate of agriculture to decide pesticides selection. Although they said that they knew other methods other than chemical control, it was observed that they did not know enough about these methods. It has been observed that farmers need training on plant protection, this training wanted to receive 54% of the farmers from pesticide markets and 10% from the agricultural organization

**Keywords** – A survey, Plant protection problems, Cotton, Manisa,

<sup>1</sup> ziraatmuh\_samet@hotmail.com

<sup>2</sup> aozpinar@comu.edu.tr

\*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: [aozpinar@comu.edu.tr](mailto:aozpinar@comu.edu.tr)

## 1.Giriş

Türkiye'deki bitkisel üretimin yaklaşık %3'nü gerçekleştiren Manisa İli, tarımsal üretim potansiyeli bakımında 7. sırada yer almaktadır. Gediz nehrinin sağladığı sulama olanaklarıyla toprakların %52'sinde yoğun tarımsal faaliyetler sürdürülmektedir. Toplam 5 140 691 dekar tarım alanının 2 307 057 dekarında tahıllar ve diğer bitkiler ekilmektedir. Geriye kalan, 2 175 058 dekarın %40'ında bağ ve %47,4'ünde zeytin yetiştirilmekte olup, bu ürünlerle Manisa İli Türkiye genelinde ilk sıralarda yer almaktadır ([TUIK, 2019](#)).

Çalışmanın yürütüldüğü Manisa İli Şehzadeler ve Saruhanlı ilçelerinde ise sırasıyla 179 119 ve 141 096 dekar alanda tarla tarımı yapılmaktadır. Son yıllarda bu yörede pamuk üretim alanlarında önemli bir artış görülmüş ve pamuk ekim alanları 90 360 dekara ulaşmıştır ([Anonim, 2018a](#)). Pamuk üretiminin ağırlıkta olduğu Mütevelli (Saruhanlı ilçesi), Karaağaçlı, Yenimahmudiye, Veziroğlu ve Selimşahlar (Şehzadeler ilçesi) mahallerindeki toplam üretim alanının %35.52'inde bağ-bahçe ve %63.28'ninde tarla tarımı yapılmaktadır. Tarla tarımının ise %51.18'i mısır, %15.28'i pamuk ve %9.57'i buğday şeklindedir ([Anonim, 2020](#)). Girdi maliyetinin yüksek olduğu pamuk tarımında bitki koruma sorunları öne çıkmış olup, toplam girdilerin %40'ını ilaç ve ilaçlama maliyeti oluşturmuştur ([Anonim, 2018a](#)). Özellikle polifag zararlı türlerden *Aphis gossypii* (Glower), *Bemisia tabaci* (Gmell.), *Tetranychus urticae* (Koch), *Empoasca* spp. vegetasyon döneminde yüksek popülasyon yoğunluğuna ulaşarak mücadelesine ihtiyaç duyulmaktadır. Yanı sıra dönemsel olarak bazı yıllar ürün kayıplarına neden olan Yeşilkurt (*Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera; Noctuidae) ile mücadele, girdi maliyetini artırmaktadır.

Söz konusu zararlıların varlığı, polikültür tarımın yapıldığı bu yörede, bitki koruma sorunlarının önemini ortaya koymaktadır. Pestisitlerin yarıdan fazlasının Ege ve Akdeniz bölgelerinde kullanılmasında bu zararlıların önemli paya sahip olduğu da bilenen bir gerçektir. Diğer taraftan bitkisel üretimde zararlılarla mücadele yapılmadığı durumlarda da ürün kayıplarının %45-65 düzeyine ulaştığı tespit edilmiştir ([Altıkat vd., 2013](#)). Günümüzde Türkiye'de bitkisel üretimde bitki koruma sorunlarındaki artışa paralel olarak pestisit kullanımı da önemli oranda artmaktadır. Gereğinden fazla kullanılan pestisitlerin doğal yollarla tolere edilemediği zaman havaya, yer altı ve yer üstü sulara ve toprağa karışarak çevre kirliliğine neden olmaktadır. Bu durum doğada yaşayan diğer canlıların ve insan yaşamını olumsuz etkilemektedir ([Tosun vd., 2001](#)). Bu tür sorunları minimize etmek, hedef zararlıyı iyi tanımakla ve üreticilerin güvenli pestisit kullanımı için bilinç düzeylerinin artmasıyla mümkündür. [Akar ve Tiryaki \(2018\)](#) yaptıkları bir çalışmada üreticilerin pestisit kullanım bilinç düzeylerinin %13.5'nin düşük, %28.3'nün orta ve %58.2'sinin yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir. [Delen vd., \(2015\)](#) üreticilerin eğitim ve bilinç düzeylerinin tarım ilacı seçiminde ve kullanımında önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Farklı ürünlerde üreticilerin mevcut bilgi düzeyleri, genellikle anketlerle ortaya çıkarılmaktadır ([Erdoğan ve Gökdoğan, 2017](#); [Erdoğan vd., 2017](#)). Türkiye'de yapılan çalışmaların çoğu farklı ürünlerde ve bölgelerde üreticilerin tarım ilaçlarının kullanımı konusundaki bilgi düzeylerinin belirlenmesi ile ilgilidir ([Peker, 2012](#)). Bu bağlamda GAP bölgesi pamuk tarımındaki bitki koruma sorunları ve üreticilerin bilgi düzeyleri belirlenmiştir ([Bayhan vd., 2015](#)). İzmir-Menemen yöresi pamuklarında ise yabancı ot türleri ve mücadelesi konularında veri toplanmıştır ([Demirkan ve Uysal, 2011](#)). Benzer çalışmalarla farklı ürünlerde değişik konularda üreticilerin bilgi düzeyleri tespit edilmeye çalışılmıştır.

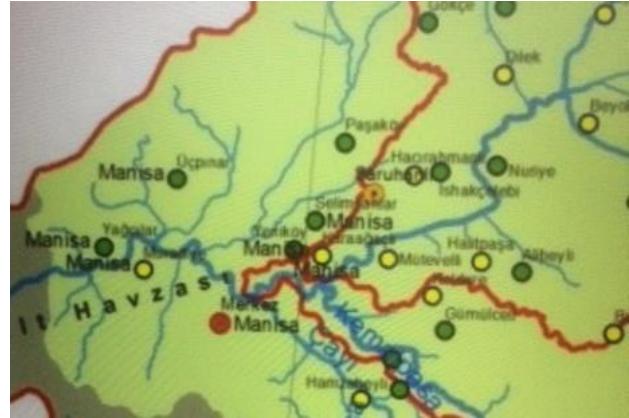
Bu kapsamda sulama olanağı nedeniyle ürün deseninde hızlı bir değişim yaşayan Gediz sulama havzasında yer alan Manisa Ovası (Şehzadeler ve Saruhanlı ilçeleri)'nda pamuk üreticilerinin bitki koruma sorunları ile ilgili bilgi düzeylerinin belirlenmesi için bir anket çalışması yapılmıştır.



## 2. Materyal ve Yöntem

Araştırma alanı, Türkiye'nin batısında Ege Deniz'i'ne dikey olarak uzanan Batı Anadolu Dağları ile çevrili Manisa İli Şehzadeler ve Saruhanlı İlçe ve mahallerinden oluşmuştur (bkz. Şekil 1). Bitki koruma sorunlarının yoğun olarak yaşandığı pamuk tarımı esas alınarak toplam 20 soru içeren bir üretici anketi hazırlanmıştır. 2019 yılında kasım ve aralık aylarında yürütülen bu anket çalışmasında, Manisa Ovası'ndaki ürün deseni, pamuk üretiminde karşılaşılan genel sorunlar, bitki koruma sorunları ve çözüm yolları, bitki koruma sorunlarıyla mücadelede üreticilerin bilgi düzeylerinin belirlenmesine yönelik sorular içermiştir.

Üretici anketi, Tablo 1'de görüldüğü üzere Çiftçi Kayıt Sistemi (ÇKS) esas alınarak toplam 14 710.84 dekar pamuk alanına sahip 368 işletmenin yer aldığı Saruhanlı İlçesi ve 3 766.5 dekar alanda pamuk üreten 103 işletmenin yer aldığı Şehzadeler İlçesi'nde uygulanmıştır (Anonim, 2020). İşletmelerin yerleri, birbirine yakınlığı ve üretim şekillerinin benzerliği göz önüne alınarak homojen olarak kabul edilmiştir. Örnek seçimi mevcut üreticilerin listesinde "Basit Tesadüfî Örnekleme Yöntemine" göre yapılmıştır. Alanda pamuk üreten toplam 35 yerleşim yerinin 23 (%65)'ünde ve 471 işletmenin 100 (%21.23) adetinde üreticiler ile yüz yüze görüşülmüştür. Anketlerden elde edilen veriler Microsoft Excel paket programına aktarılmış ve alınan cevaplara göre değerlendirme yapılmıştır.



Şekil 1. Ege Bölgesi'nde tarımsal faaliyetlerin yapıldığı ovalar ve Manisa Ovası'nın yer aldığı Gediz Havzası (Anonim, 2018b)



Tablo 1

Manisa İli Saruhanlı ve Şehzadeler ilçelerinde pamuk üretiminin yapıldığı mahalleler, işletme sayıları, üretim miktarı (dekar) ve oranları (%) (Anonim, 2020)

| Saruhanlı İlçesi | İşletme sayısı | Oranı (%) | Alan (da) | Oranı (%) | Şehzadeler İlçesi | İşletme sayısı | Oranı (%) | Alan (da) | Oranı (%) |
|------------------|----------------|-----------|-----------|-----------|-------------------|----------------|-----------|-----------|-----------|
| Adiloba          | 2              | 0.5       | 20.8      | 0.1       | Aşağıçobanisa     | 10             | 9.7       | 424.8     | 11.3      |
| Alibeyli         | 41             | 11.1      | 843.9     | 5.7       | Çamköy            | 3              | 2.9       | 170.6     | 4.5       |
| Çınaroba         | 2              | 0.5       | 16.8      | 0.1       | Güzelköy          | 15             | 14.6      | 832.9     | 22.1      |
| Develi           | 1              | 0.3       | 14.3      | 0.1       | Hacihaliller      | 2              | 1.9       | 51.7      | 1.4       |
| Hacırahmanlı     | 1              | 0.3       | 37.1      | 0.3       | Hamzabeyli        | 7              | 6.8       | 258.4     | 6.9       |
| Halitpaşa        | 62             | 16.8      | 3142.0    | 21.4      | Karaağaçlı        | 18             | 17.5      | 687.6     | 18.3      |
| Kayışlar         | 1              | 0.3       | 42.2      | 0.3       | Yeniköy           | 4              | 3.9       | 45.2      | 1.2       |
| Kemiklidere      | 45             | 12.2      | 1348.0    | 9.2       | Sancaklıbozköy    | 1              | 1.0       | 1.6       | 0.0       |
| Koldere          | 68             | 18.5      | 1893.7    | 12.9      | Selimşahlar       | 14             | 13.6      | 524.8     | 13.9      |
| Kumkuyucak       | 42             | 11.4      | 3527.1    | 24.0      | Şehitler          | 1              | 1.0       | 29.8      | 0.8       |
| Lütfiye          | 1              | 0.3       | 8.8       | 0.1       | Tekeliler         | 2              | 1.9       | 46.7      | 1.2       |
| Mütevelli        | 19             | 5.2       | 726.6     | 4.9       | Tilkisüleymaniye  | 3              | 2.9       | 41.7      | 1.1       |
| Nuriye           | 29             | 7.9       | 838.3     | 5.7       | Veziroğlu         | 6              | 5.8       | 172.9     | 4.6       |
| Paşaköy          | 7              | 1.9       | 291.4     | 2.0       | Yenihamandalı     | 8              | 7.8       | 301.5     | 8.0       |
| Sarıçam          | 2              | 0.5       | 199.1     | 1.4       | Yenimahmudiye     | 4              | 3.9       | 89.4      | 2.4       |
| Saruhanlı        | 36             | 9.8       | 1469.9    | 10.0      | Yeşilköy          | 2              | 1.9       | 12.4      | 0.3       |
| Tirkeş           | 5              | 1.4       | 94.7      | 0.6       | Yukarıçobanisa    | 3              | 2.9       | 74.5      | 2.0       |
| Yeniosmaniye     | 4              | 1.1       | 196.3     | 1.3       | -                 | -              | -         | -         | -         |
| Toplam           | 368            | 100.0     | 14710.8   | 100.0     | Toplam            | 103            | 100.0     | 3766.5    | 100.0     |

### 3. Bulgular ve Tartışma

#### 3.1. Manisa Ovası ürün deseninde pamuğun önemi

Anket sonuçlarına göre, Manisa Ovası'ndaki (Şehzadeler ve Saruhanlı ilçeleri) üreticilerin %70'inin ilk sırada bağ-bahçe ve geriye kalan ise %30'nunda tarla tarımı yaptıkları belirlenmiştir. Tarla tarımı yapan üreticilerin ise %63'ünün birinci önceliği mısır ve %21'inin ise pamuk bitkisi olduğu görülmüştür. Geriye kalan üreticilerin %4'ü buğday, %3'ü domates ve bir bölümü ise görüş belirtmeyen üreticilerden oluşmuştur.

Tarımsal faaliyetlerin yüksek olduğu ve örnek olarak seçilen 17 üretici ile görüşülen Karaağaçlı (Şehzadeler İlçesi) Mahallesi'nde bağ ve bahçe tarımı yapanların oranı %52 iken, tarla tarımının oranı %41 olduğu görülmüştür. Tarla tarımı yapan işletmelerin %58'inin mısır, %30'unun pamuk ve %12'sinin buğday yetiştirdikleri tespit edilmiştir. ÇKS verilerine göre ise Karaağaçlı Mahallesi'ndeki üreticilerin %46.18'i bağ-bahçe ve %53.82'si tarla tarımı yaptıkları, tarla tarımı yapanların ise %34.11'i mısır, %38.55'i pamuk ve %7.19'nun ise buğday ektikleri kaydedilmiştir (Anonim, 2020). Görüldüğü üzere ÇKS verilerine göre pamuk üretim oranı (%38.55) anketlere göre daha yüksek çıkmıştır. Bu bulgular üreticilerin süreç içinde fikir değiştirdikleri veya anketlerde sınırlı bilgi aktardıkları şeklinde yorumlanmıştır. Diğer taraftan Karaağaçlı Mahallesi'nde elde edilen bulgular Manisa Ovası genelindeki değerlerden farklı olup, tarla tarımı ve bağlantılı olarak pamuk üretiminin payı (%30) yüksek çıkmış ve pamuk üretiminin yoğunlaştığı bir yer olarak dikkati çekmiştir.

Yine 12 üreticiyle görüşülen Mütevelli (Saruhanlı İlçesi) Mahallesi'nde ise üreticilerin %33'ü ilk sırada tarla tarımını yapıyor iken %60'ı bağ ve bahçe tarımını yaptıklarını bildirmiştir. Tarla tarımı yapanların ise %63'ü mısır ve %27'i ise pamuk ektikleri görülmüştür. 2019 yılı ÇKS verilerine göre ise üreticilerin %40.46'sı bağ-bahçe ve %59.54'nün tarla tarımı yaptıkları, tarla tarımı yapanların ise %57.77'si mısır, %8.28'i pamuk ve %13.53'nün buğday ektikleri kaydedilmiştir (Anonim, 2020). Mütevelli Mahallesi'ndeki sonuçlar Manisa

Ovası'ndaki çiftçilerin bildirdiği ortalama değerlere yakın çıkmıştır. Ancak ÇKS verileri ile tamamen örtüşmediği görülmüştür. Her iki örnekleme yerinde de görüldüğü üzere üreticilerin süreç içinde fikir değişikliği yaşadıkları gibi, anketlerde net rakamları bildirmekten kaçındıkları izlenimi vermiştir.

Sonuç olarak bu iki örnekte de görüldüğü üzere üreticilerin verdiği bilgiler esas alındığında, Manisa Ovası'nda Şehzadeler İlçesi'nde ürün deseni içinde tarla tarımı öncelikli iken, iç bölgelere doğru gidildikçe Saruhanlı İlçesi'nde bağ ve bahçe tarımı ağırlık kazanmıştır. Tarla tarımında ise pamuk yerine mısır bitkisinde artış görülmüş ve birlikte domates tarımı da ürün deseni içinde yer bulmuştur. Tüm bunlarla birlikte Manisa Ovası'nda pamuk alanlarındaki daralmaya rağmen, üreticilerin %32'sinin 3-30 yıldır pamuk ektiklerini bildirmeleri pamuk bitkisinin önemini teyit etmiştir. Pamuk bitkisinin bitki koruma sorunlarına duyarlı olması ve özellikle biyotik potansiyeli yüksek olan polifag zararlıların varlığı nedeniyle, bu alandaki zirai mücadele uygulamalarının yoğunluğu ve üreticilerin bu ürünlerdeki deneyimleri şüphesiz ki diğer üretim alanlarında önemli kolaylıklar sağlayacaktır.

### 3.2.Pamuk üretiminde bitki koruma sorunları ve çözümü

Pamuk tarımı yapan üreticilerin %56'si Progen (BA-440, Carisma ve Lima) %27'si May (MAY 455) firmasının tohumlarını kullandıkları ve bir üreticinin ise Nazilli 87 çeşidini tercih ettiği görülmüştür. [Memiş ve Özpinar \(2020\)](#) tarafından Manisa İli pamuklarında yapılan çalışmada, Carisma çeşidine göre yaprakları daha tüylü olan BA-440 çeşidinin bazı zararlılar için uygun olabileceğini bildirmiştir. [Atakan vd., \(2004\)](#) tüysüz pamuk çeşitleri Yaprak pireler (*Empoasca* spp)'ine karşı duyarlı iken, *Bemisia tabaci*'ye karşı dayanıklı olduğu bildirilmiştir. Pamuk tohumu seçiminde üreticilerin alışkanlıklarının öne çıktığı ve zararlı konukçu bitki arasındaki ilişkiler konusunda bilgi sahibi olmadıkları görülmüştür. Zira Yaprak pirelerinin zararlılar içindeki payının %35 düzeyinde olması da bu kanıyı desteklemiştir.

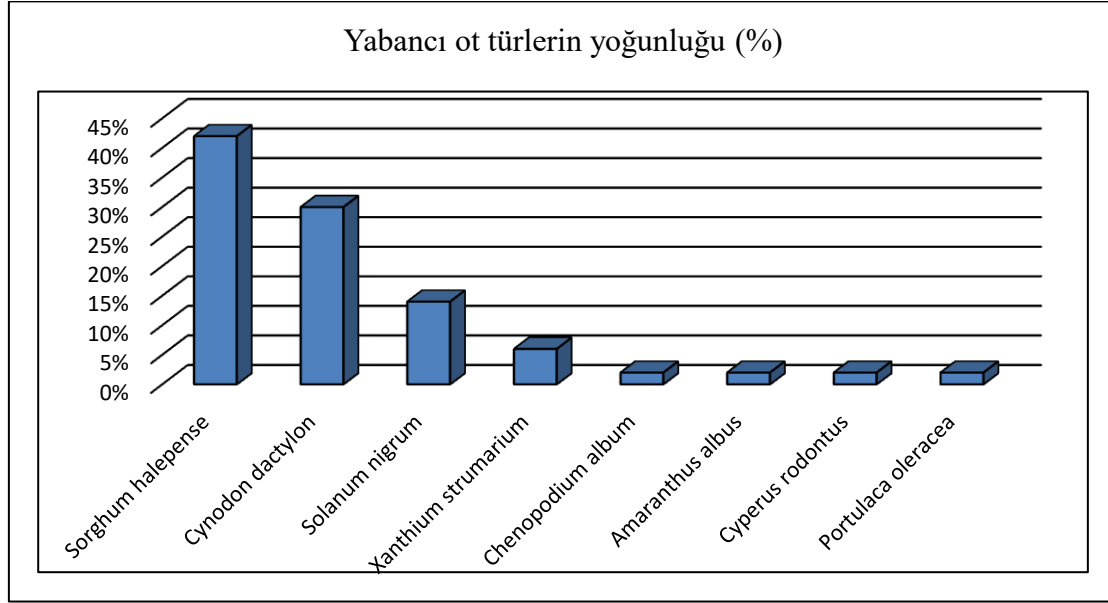
Pamuk üretiminde karşılaştığımız en önemli soruna üreticilerin %80'i pazarlama ve zirai mücadele olarak belirtmeleriyle birlikte %12'si ilave olarak sadece pazarlama şeklinde ifade etmiştir. Dolayısıyla pazarlama en önemli sorun olarak ortaya çıkmıştır.

Pamuk üretiminde karşılaştığımız en önemli hastalık, zararlı ve yabancı ot şeklindeki soruya ise üreticiler yabancı ot ve zararlıları işaret etmiştir. Hastalıklarla ilgili ise herhangi bir bildirimde bulunmamışlardır. Anket sonuçlarına göre üreticilerin pamuk alanlarında karşılaştığı en önemli yabancı ot türleri ve oranları Şekil 2'de verilmiştir.

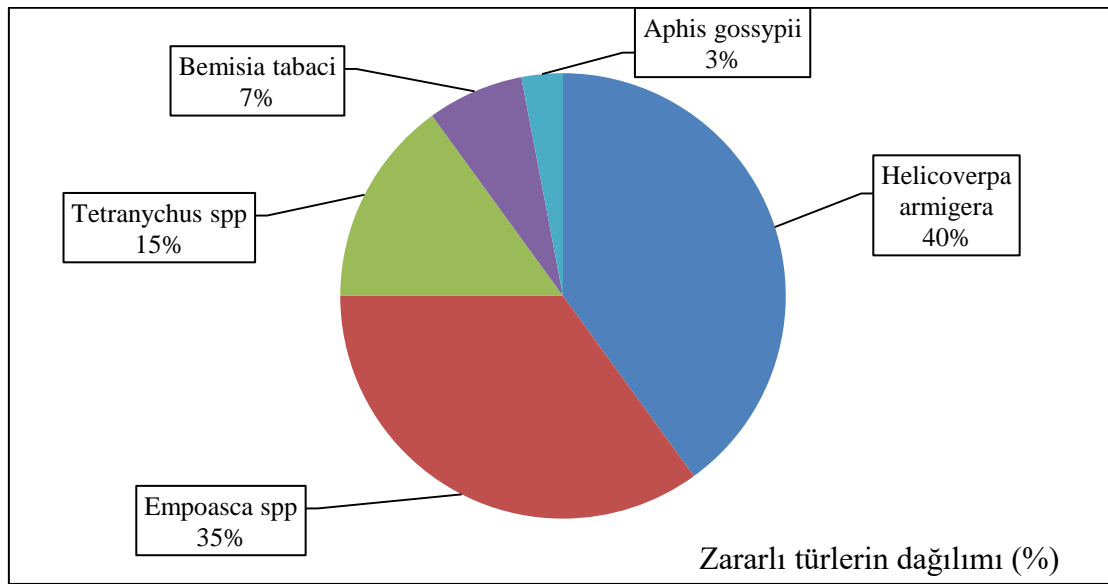
Görüldüğü üzere Kanyaş (*Sorghum halepense*) %42, Ayrık (*Cynodon dactylon*) %30, Köpeküzümü (*Solanum nigrum*) %14, Domuzpıtrağı (*Xanthium strumarium*) %6, Sirken (*Chenopodium album*), Horozibiği (*Amaranthus albus*), Topalak (*Cyperus rodontus*) ve Semizotu (*Portulaca oleracea*)'nun bulunma oranı ise %2 olarak bildirilmiştir. İlk sırada mücadelesi sorunlu olan Kanyaş ve onu Ayrık otu takip etmiştir. [Demirkan ve Uysal \(2011\)](#) 'ın Menemen İlçesi pamuk üreticileri ile yaptıkları anket çalışmasında aynı yabancı ot türlerini bildirmiş olup, ilk sırada Köpeküzümü ve Domuzpıtrağı'nın yer almasıyla bulunma oranlarının farklı olduğu görülmüştür. Çalışma alanı birbirine yakın olmakla birlikte belirtilen yabancı ot türlerin bulunma oranı %14 ve %6 seviyesinde kalmıştır. Tarla içinde yapılan üretim faaliyetleri ve diğer kültürel uygulamaların bu tür farkları doğuracağı gibi, aynı parselde yabancı ot dağılımının homojen olmadığı da göz önüne alındığında söz konusu durumun doğal olduğu görüşüne varılmıştır.

Üreticilerin pamuk tarımında karşılaştıkları en önemli zararlı türler şeklindeki soruya, ise %40'ı Yeşilkurt (*Helicoverpa armigera*), %35'i Yaprak pireleri (*Empoasca* spp), %15'i Kırmızı örümcek (*Tetranychus* spp), %7'si Beyaz sinek (*Bemisia tabaci*) ve %3'ü Yaprakbitleri (Aphididae) olarak bildirmiştir (bkz.Şekil 3). Geriye kalan üreticilerin %9'u ise görüş belirtmemiştir. Ankette katılan üreticiler Yeşilkurt'un en önemli zararlı olduğunu bildirmiştir. Manisa İl Tarım ve Orman Müdürlüğü verilerine göre ise bu zararlılar içinde en

fazla 44.577 da alan ile Yeşilkurt mücadelesi yapılmıştır (Anonim, 2020). Sonuçlar birbiriyle örtüşmüş ve üreticilerin 2019 yılı verilerini yansıtmış olması da mevcut durumun tespiti bakımında önemli bulunmuştur.



Şekil 2. Manisa Ovası (Saruhanlı ve Şehzadeler ilçeleri) pamuk alanlarında üreticiler tarafından bildirilen yabancı ot türleri ve bulunma oranları (%).



Şekil 3. Manisa Ovası (Saruhanlı ve Şehzadeler ilçeleri) pamuk alanlarında üreticilerin bildirdikleri zararlı türler ve bulunma oranları (%).

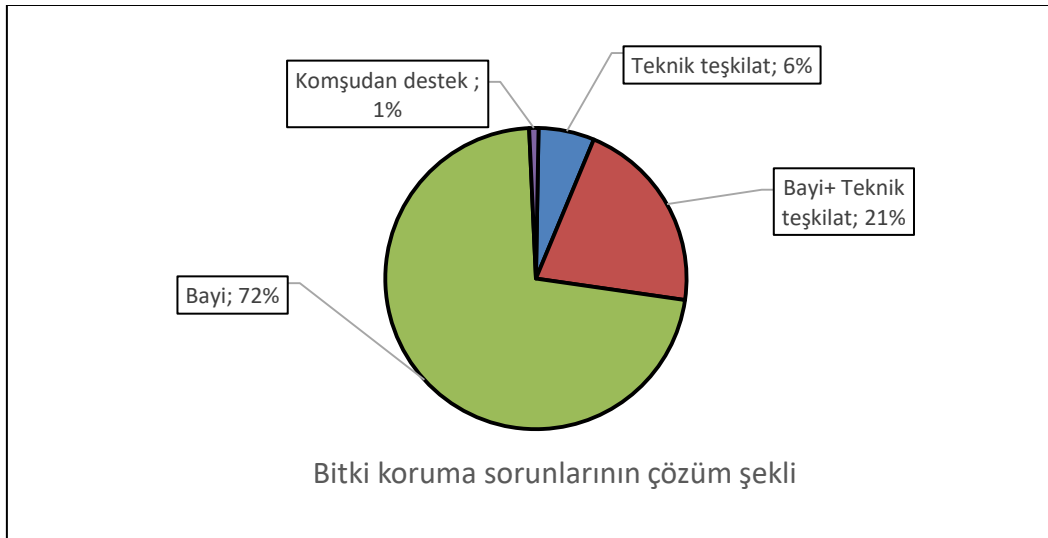
Diğer taraftan üreticilerin 2. derece önemli olarak bildirilen Yaprak pireleri ile mücadele alanı (29.377 da) Yaprakbiti ile mücadele alanlarının (35.370 da) gerisinde kalmıştır. Bu bir zararlı için kullanılan kimyasal preparatların diğer zararlıyı da baskı altına alabileceği şeklinde değerlendirilmiştir. Nitekim farklı bölgelerde pamukta emgi yaparak zararlı olan bu türler il ilgili yapılan çalışmalarda da benzer bulgular tespit edilmiştir (Gençsoylu, 2009; Özpınar vd., 2017).

Üreticiler, pamuk hastalıkları konusunda görüş bildirmemiş olmasına rağmen, tohum ilaçlaması yaptıklarını; hastalıklarla birlikte Bozkurtlar (*Agrotis* spp) ile Telkurtları (*Agriotes* spp) hedeflediklerini bildirmişlerdir. Bu uygulamalarla Manisa İli pamuk üreticilerinin bitkinin çıkış öncesi dönemlerine ait hastalık ve zararlılarla mücadelede yeterli bilgiye sahip oldukları görülmüştür.

Pamuğun hangi gelişme döneminde zararlı türlerin yoğunluk kazandıkları şeklindeki soruya ise bir fenolojik dönem yerine birden fazla dönem şeklinde bildirilmiştir. Pamuğun çiçek ve elma döneminde diyen üreticilerin oranı sırasıyla %77 ve %79'a yakın çıkmıştır. Üreticilerin %59'u ise fide dönemi olarak bildirmiştir. [Memiş ve Özpinar, \(2020\)](#) bu yörede yaptıkları çalışmada pamuk alanlarındaki sokucu emici ağız yapısına sahip türlerden Yaprak pirelerinin hakim olduğu bildirilmiştir. Üreticiler de ifadelerinde de Yaprak pirelerinin öne çıkarmıştır. Yaprak pirelerinin Çukurova'da pamuğun temel gelişme döneminden itibaren görüldüğünü ve haziran sonu ile temmuz ortalarında en yüksek seviyeye ulaştığı bildirilmiştir ([Ölçülü ve Atakan, 2008](#)). Kahramanmaraş'ta ise aynı zararlı türün yoğunluğu pamuğun koza oluşturma dönemi boyunca ve olgunlaşma döneminin başlangıcında en üst düzeye ulaştığı şeklinde tespit edilmiştir ([Sunulu, 2010](#)). Görüldüğü üzere zararlının bitki fenolojisi ile ilişkisi bölgelere göre değişiklik göstermiştir. Aynı zamanda zararlı popülasyon yoğunluğunun pamuk yetiştirme döneminin uzun bir periyodu kapsamı da üreticilerin ifadelerini teyit etmiştir.

Manisa İli pamuklarında ise Yaprak piresi ve diğer sokucu emici ağız yapısına sahip zararlıların varlığı nedeniyle toplam üretimdeki girdilerin %40'nı ilaç ve ilaçlama maliyeti oluşturmuştur ([Anonim, 2018a](#)). Bu zararlılarla mücadelede Manisa İli pamuklarında 2019 yılında 5 uygulama yapılmış ve pamuğun tüm vejetasyon döneminde bu zararlılarla mücadeleye ihtiyaç duyulmuştur ([Memiş ve Özpinar, 2020](#)).

Bitki koruma sorunlarını nasıl çözdüklerine ilişkin soruya ise üreticilerin %6'sı teknik teşkilat, %21'i bayi+teknik teşkilat ve %72'si ilaç bayisi şeklinde bildirmiştir. Anketlerde komşudan yardım alanların oranı ise oldukça düşük olup, %1 ile sınırlı kalmıştır (bkz. Şekil 4). Benzer şekilde birçok anket sonuçlarında da alışlageldiği üzere hiçbir üretici kendi sorununu kendim çözerim beyanında bulunmamıştır.



Şekil 4. Manisa Ovası (Saruhanlı ve Şehzadeler ilçeleri) pamuk alanlarında üreticilerin bitki koruma sorunlarını çözüm şekilleri ve katkı oranları (%).

[Erdoğan ve Gökdoğan \(2017\)](#) Nevşehir İli'nde patates üreticilerini bitki koruma etmenlerine karşı ilaç seçiminde %88.9'nun ilaç satan bayilerden ve %7.9'nun ise kendi deneyimlerinden yararlandıklarını bildirmişler. [Kadıoğlu \(2003\)](#) bayilerin katkısını %36 ve tarım teşkilatını %59 olarak bildirirken, [Emeli](#)

(2006) Adana'da bayilere başvuran üreticilerin oranını %78.6 ve tarım teşkilatına başvuranlar ise %12.5 olarak belirlemiştir. [Karatas ve Aloğlu \(2011\)](#) Manisa'da ilaç seçiminde üreticilerin %68'nin bayilerden destek aldıklarını tespit etmiştir. [Bayhan vd., \(2015\)](#) GAP bölgesinde pamuk üreticileri ile yaptıkları anket çalışmasında üreticilerin %52'nin bayilerde ve %35'nin ise teknik teşkilattan yardım aldıklarını bildirmiştir. Çanakkale İli domates üreticilerinin ise bayi tercihi %70 olarak tespit edilmiştir. Görüldüğü üzere ülkemizin farklı bölgelerinde yapılan çalışmalardan da anlaşıldığı üzere, zirai mücadelede, bayilerin katkısı çok yüksek değerlere ulaşmıştır. Ayrıca bayi memnuniyeti ile ilgili soruya ise üreticilerin %5'i yetersiz olarak belirtse de %95 gibi büyük çoğunluğun memnun olduğu görülmüştür. Şu ana kadar yapılan çalışmalardan da anlaşıldığı üzere bayi sisteminin zirai mücadelenin uygulanmasında büyük önem taşıdığını ortaya koymuştur.

Bu gerçeği göz önüne alarak zirai mücadele uygulamalarının yürütülmesinde bayilerin önemli bir yer tuttuğu gerçeğinin farklı yönleriyle irdelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Zirai mücadele uygulamalarının denetimi ve uygulanmasında teknik teşkilattan yararlanma şekli ile ilgili soruya ise üreticilerin %39'u örnek götürme, %34'ü araziye ziyaret etme ve %27'si arazi ziyareti + örnek götürme şeklinde yürüttüğünü bildirmiştir. Bu durum üreticilerin olumlu yönde bir alışkanlık edindikleri izlenimini vermiştir.

Ankette elde edilen sonuçlara göre pamukta bitki koruma sorunlarını gidermek için kullanılan ilaç maliyetinin toplam girdilerin %10-25'ni oluşturduğu ancak Tarım ve Orman İl Müdürlüğü verilerine göre bu oranın %40'a ulaştığı belirtilmiştir ([Anonim, 2018a](#)). Üreticilerin beyanlarıyla resmi kayıtlardaki değerler arasında önemli bir maliyet farkının olduğu dikkati çekmiştir.

### 3.3.Bitki koruma konusunda üreticilerin bilgi düzeyleri

Tüm üreticilerin %4.55 gibi düşük bir bölümü dışında diğerlerinin tarlasında gördüğü her böceğin zararlı olmadığını, ilacın rafta bekleme süresi ve son kullanım tarihi gibi kavramları bildikleri ve bekleme süresine dikkat ettikleri anlaşılmıştır. Bu bulgular zirai mücadelenin yürütülmesinde pamuk üreticilerinin belli bir bilinç düzeyinde olduğunu göstermiştir.

Üreticilerin zararlılarla mücadelede kimyasal preparatları kullanmalarının dışında bildikleri diğer yöntemler şeklindeki soruya; %3'ü biyolojik mücadeleyi ve %52'si biyoteknik mücadeleyi bildiklerini geriye kalan %45'nin ise başka yöntemler hakkında bilgi sahibi olmadıkları görülmüştür. Biyolojik mücadele konusunda bilgi düzeylerini belirlemek amacıyla sorulan soruya ise %61'inin bilgi sahibi olmadıkları, %11'inin ise genel olarak çoğu kişi tarafından tanınan Yedi noktalı gelinböceklerini (*Coccinella septempunctata* L.) örnek verdikleri ve %4'ü ise örnek vermeksizin bildiğini ifade etmiştir. Her ne kadar üreticilerin alternatif mücadele yöntemleri hakkındaki bilgi düzeyleri sınırlı da olsa zirai mücadelenin yürütülmesinde kullanılan kimyasalların yarattığı sorunların azaltılmasında alternatif uygulamaların varlığından haberdar olmaları oldukça önemli ve üzerinde durulmaya değerdir. [Bayhan vd \(2015\)](#) GAP bölgesi pamuk üreticilerinin %52'sinin biyolojik mücadele yöntemi hakkında bilgi sahibi oldukları, ancak %60'nın Gelin böceklerini tanımadıklarını bildirmiştir. Üreticilere ait söz konusu bildirimler esas alındığında; bu yönde çabanın var olduğu ve üreticilerin bu konularda eğitime ihtiyaçlı oldukları kanaatine varmıştır.

İlacı günün hangi saatinde uygularsınız şeklindeki soruya, üreticilerin %31'i sabah ve akşam saatlerinde, %17'si sadece sabah ve %52'ise sadece akşam saatlerinde şeklinde cevap vermiştir. Bu sonuçlardan anlaşıldığı üzere üreticilerin uygun dönemlerde uygulama yaptıkları görülmüştür.

Üreticilerin eğitime ve yeni teknikleri öğrenmeye ihtiyaç duyduklarını ve eğitimi kimden almak istedikleri şeklindeki soruya ise %54'ü bayiden, %36'sı danışman (mühendis) ve %10'u tarım kuruluşları şeklinde ifade edilmiştir. Bayi tercihi bu cevaptan da öne çıkmıştır. Bu açıdan bakıldığında doğru bilgilerin üreticiye

ulaşması için bayi eğitimi ve denetiminin önem kazandığı ortaya çıkmıştır. Birçok üretici anketinde de önerildiği üzere [Erdil ve Tiryaki \(2020\)](#) Manisa İli'nde yaptıkları bir çalışmada da üreticilerin pestisit kullanımını konusunda da eğitime ihtiyaç duyduklarına vurgu yapmıştır.

#### 4.Sonuçlar

Pamuk üretiminde girdi maliyetinin yüksek olması Manisa Ovası'nda ürün deseni içinde mısır ekim alanlarında bir artış olmuştur. Pamuk ekim alanları daralmış da olsa üreticiler nezdinde halen önemini koruduğu görülmüştür. Üreticilerin pamuk üretimi konusundaki deneyimleri de bu kanyı desteklemektedir. Üreticiler, pamuk alanlarındaki yabancı otları ve zararlıları öne çıkararak bitki koruma sorunlarına vurgu yapmıştır. Yabancı otlardan mücadelesi zor olan Kanyaş ve Ayrık en yaygın yabancı otlar olarak bildirilmiştir. Zararlılar olarak bitkide emgi yapan türlerin yanında dönemsel olarak popülasyonu artan Yeşilkurt'un üründe kayıplara neden olduğu ve mücadele maliyetini arttırdığı ifade edilmiştir. Zirai mücadelenin yürütülmesinde üreticilerin büyük oranda bayilerden tavsiye aldıkları ve eğitime ihtiyaç duyanların da bu eğitimi bayilerden almak istedikleri görülmüştür. Bilgi düzeyleri yeterli olmasa da üreticilerin kimyasal mücadele dışında biyolojik ve biyoteknik mücadele yöntemlerinin varlığını bildikleri tespit edilmiştir. Yapılacak eğitimde bu konulara ağırlık verilmesi gereği ortaya çıkmıştır. Diğer taraftan bekleme süresi, raf süresi gibi teknik bilgiler yanında pamuk tohum ilaçlamasının önemini kavradıkları görülmüştür.

Sonuç olarak Manisa ili pamuk üreticilerinin bitki koruma uygulamaları ve bilgi düzeyleri diğer üretim alanları için de önemli bir deneyimdir. Ülkemizin diğer bölgelerinde yapılan çalışmalardan da görüldüğü üzere üreticilerin büyük oranda ilaç bayilerinde tavsiyeler aldıkları ve yapılacak eğitim çalışmalarının bu ihtiyacı karşılayacak şekilde ele alınması gerektiği ortaya çıkmıştır.

#### Teşekkür

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2018-2591 nolu projeye desteklen çalışmanın bir bölümü olup. Samet Memiş'in Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

#### Yazar Katkıları:

Yazarlar eşit katkıda bulunmuştur.

#### Çıkar Çatışması:

Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

#### Kaynaklar

Altıkat, A., Turan, T. ve Ekmekyapar Torun. F. (2013). Türkiye'de pestisit kullanımı ve çevreye olan etkileri. *Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 40(2): 87-92. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/35339>

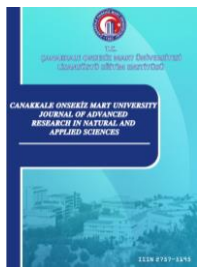
Akar, Ö. ve Tiryaki, O. (2018). Antalya İli'nde üreticilerin pestisit kullanımı konusunda bilgi düzeyi ve duyarlılıklarının araştırılması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 13(1):60-70, 2018. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/530372>.

Anonim, (2020). Manisa İl Tarım ve Orman Müdürlüğü Çiftçi Kayıt Sistemi (ÇKS) Verileri, Manisa, <https://manisa.tarimorman.gov.tr/Menu/59/Tarimsal-Desteklemeler>, Ulaşma tarihi: 18.10.2020.



- Anonim, (2018a). Manisa İl Tarım ve Orman Müdürlüğü, 2018 Yılı 1.Dönem Faaliyet Raporu Manisa., <https://manisa.tarimorman.gov.tr/Belgeler/Brifing%202018/2018Brifing.pdf>. Ulaşma tarihi:18.10.2020.
- Anonim,(2018b).Gediz nehir havzası yönetim planı. <https://www.tarimorman.gov.tr/SYGM/Belgeler/NHYP%20DEN%C4%B0Z/GED%C4%B0Z%20NEH%C4%B0R%20HAVZASI%20Y%C3%96NET%C4%B0M%20PLANI.pdf>. Ulaşma tarihi:12.11.2020.
- Atakan E., Boyacı, K., Gencer, O. (2004). Çukurova’da Yaprak pireleri [*Asymmetrasca decedens* (Paoli) ve *Empoasca decipiens* Paoli (Homoptera: Cicadellidae)]’nin bazı pamuk çeşitlerindeki popülasyon gelişmesi. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 28 (4): 267-273. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/64937>.
- Bayhan, E., Sağır, A., Uygur, F.N., Bayhan, Ö. S. ve Bayram Y. (2015). GAP bölgesi pamuk alanlarındaki bitki koruma sorunlarının belirlenmesi. *Türkiye Entomoloji Bülteni*, 5(3): 135-146. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/64191>
- Delen, N., Tiryaki, O., Türkseven, S., Temur, C. (2015). *Türkiye’de pestisit kullanımı kalıntı ve dayanıklılık sorunları, çözüm önerileri* ss, 758-778. [Türkiye Ziraat Müh. VIII. Teknik Kongresi, 12-16 Ocak 2015, Türkiye.](https://www.turkiziraatmuh.gov.tr/Kitaplar/Turkiye_Ziraat_Muh_VIII_Teknik_Kongresi_12-16_Ocak_2015_Turkiye)
- Demirkan H. ve F. Uysal, (2011). Menemen (İzmir) pamuk üreticilerine Yönelik (Bitki Koruma Açısından) Bir Anket Çalışması. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 48(3): 277-282. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/59395>
- Emeli, M, (2006). *Seyhan ve Yüreğir havzasında bitki koruma yöntemlerinin uygulamadaki sorunları üzerine bir araştırma*. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, Türkiye 86 s.. Erişim adresi: <http://libratez.cu.edu.tr/tezler/5835.pdf>
- Erdil M. ve Tiryaki, O. (2020). Manisa İli’nde çiftçilerin tarım ilaçları kullanımı konusundaki bilinç düzeyi ve duyarlılıklarının araştırılması. *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(1): 81-92. Erişim adres.: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/1115584>.
- Erdoğan, O ve Gökdoğan O., (2017). Nevşehir İli’nde patates üreticilerinin bitki koruma uygulamaları. *Derim*, 34(1):51-60. [doi:10.16882/derim.2017.305448](https://doi.org/10.16882/derim.2017.305448)
- Erdoğan O., Tohumcu E., Baran M. F., Gökdoğan, O. (2017). Adıyaman İli badem üreticilerinin zirai mücadele uygulamalarının değerlendirilmesi. *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5(11): 1414-1421. Erişim adresi: <file:///C:/Users/Lenovo/Downloads/1351-12394-2-PB.pdf>
- Gençsoylu, İ., (2009). Effect of plant growth regulators on agronomic characteristics, lint quality, pests, and predators in cotton. *Journal of Plant Growth Regulators*, 28(2):147–153. [DOI 10.1007/s00344-009-9083-x](https://doi.org/10.1007/s00344-009-9083-x)
- Kadioğlu, İ., (2003). Tokat İli’nde üreticilerin zirai mücadele etkinlikleri üzerinde bir araştırma. *Gaziosman Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20(1): 7-15. Erişim adresi: [http://ziraatdergi.gop.edu.tr/Makaleler/1317686471\\_7-15.pdf](http://ziraatdergi.gop.edu.tr/Makaleler/1317686471_7-15.pdf)
- Karataş, E. ve Aloğlu, Ö. (2011). Manisa İli’nde üreticilerin bitki koruma uygulamaları. *Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 48(3): 183-189. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/59385>
- Memiş, S. ve Özpınar, A. (2020). Manisa İli pamuk alanlarında *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera; Noctuidae)’nın bazı biyolojik özelliklerinin belirlenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 17(3): 369-380. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/966577>.

- Ölçülü, M. ve Atakan, E., (2008). Çukurova’da yaprak pirelerinin [*Assymetresca decedens* (Paoli) ve *Empoasca decipiens* Paoli. (Homoptera: Cicadellidae)] pamuk bitkisindeki popülasyon değişimleri. *Ç.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 17(3):19-23. Erişim adresi: <http://fbe.cu.edu.tr/tr/makaleler/2008-17-3-2.pdf>.
- Özpınar., A., Şahin, A.K., Polat B. ve Özpınar S. (2017). Troia (Çanakkale) Milli Park alanında polifag zararlı türlerle entegre mücadele olanaklarının araştırılması. *ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 5(1): 49–57. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/335464>
- Peker, E. A (2012). Konya İli domates üretiminde tarımsal ilaç kullanımına yönelik çevresel duyarlılık analizi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2(1): 47-54. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/89138>
- Sunulu, S., 2010. *Kahramanmaraş pamuk ekim alanlarında Cicadellidae (Hemiptera) familyasına bağlı türlerin, popülasyon değişimlerinin ve zarar düzeyinin belirlenmesi*. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, S 48. Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp>
- Tosun, N., Karabay, N. Ü. ve Sayım, F. (2001). Pesticide usage and their potential adverse impacts on living organisms. *Anadolu J AARI*. 11(1):113–125. Erişim adresi: <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/etae/Belgeler/AnadoluDergisi/2001/PESTICIDE%20USAGE%20AND%20THEIR%20POTENTIAL%20ADVERSE.pdf>.
- TUIK, (2019). Bitkisel üretim. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>, Erişim tarihi, 10 Eylül 2019.



## Preparation of Black-Titanium Dioxide Nanotubes by Thermal Decomposition of Sodium Borohydride

Murat Efgan Kibar<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Kocaeli University, Kocaeli, Turkey

### Article History

Received: 29.11.2020

Accepted: 24.02.2021

Published: 20.03.2021

### Research Article

**Abstract** – Titanium dioxide is a very attractive material in catalysis. Although the titanium dioxide exhibits superior properties in ultra violet radiation, activity of the catalyst can be improved by some modifications specially for daylight radiation. Titanium dioxide was colored by thermal decomposition of sodium borohydride at 400 °C. The gray colored nanotube-titanium dioxide obtained where the molar ratio of titanium dioxide to sodium borohydride, 1.2 and 0.6. The black nanotube-titanium dioxide was prepared by making the ratio 0.3. While heterogeneous dispersion observed after coloring of commercial titanium dioxide, all photocatalysts prepared from nanotube-titanium dioxide were perfectly homogeneous after coloring. Structural properties of photocatalysts analysed by using XRD, BET and SEM. The nanotube form of titanium dioxide prepared by hydrothermal method. The nanotube photocatalysts are anatase and have high surface area. The activities of colored nanotubes investigated according to these structural properties. Photocatalysts could not be colored homogeneously with the hydrogen reduction process but efficient reduction and coloration obtained with sodium borohydride. The visible region activities of photocatalysts increased by coloring with sodium borohydride compared to coloring by hydrogen. While the surface structure is important, all prepared nanotube-titanium photocatalysts exhibited more efficient color removal yield with regard to commercial one. More active catalysts prepared for absorption of daylight energy and 98.4 % color removal yield from 30 ppm methylene blue solution obtained with black nanotube-titanium dioxide photocatalyst.

**Keywords** – Black nanotube-titanium dioxide, Color removal, Photocatalysts, Sodium borohydride, Visible region

### 1. Introduction

Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) is utilized in the range of electronic material applications, environmental and energy-related uses. Due to its high chemical stability, high availability and low cost, different usage areas are still being investigated by scientists (Haider, Jameel, & Al-Hussaini, 2019). Especially in the last decade, hydrogen (Sinhamahapatra, Jong-Pil Jeon & Yu, 2015) and hydrocarbon production processes (Suprun, Lutecki, Haber, & Papp, 2009), wastewater treatment by degradation of organic pollutants (Kerkez-Kuyumcu et. al., 2015) and removal of bacteria and pollutants from air and water (Zhu, Cai, & Sun, 2018; León-Ríos et. al. 2016), carbon dioxide removal (Nikokavoura & Trapalis, 2017) have become very important processes.

The most important feature of TiO<sub>2</sub> as a photocatalyst is that it forms electron-hole pairs when excited by an external energy. The incoming beam causes excitation on the TiO<sub>2</sub> surface, thus enabling oxidation and reduction reactions to occur with the surrounded environment of TiO<sub>2</sub>. If the mechanism of photoreactions is examined in detail, it can be seen that it takes place in three steps. 1) the semiconductor photocatalyst absorbs the beam to form an electron-hole pair. 2) These electron-hole pairs are separated from the bulk and migrate to the surface of the photocatalyst to form the active centers of the photocatalyst. 3) Oxidation and reduction reactions take place in these surface regions. UV light is the source of energy for the formation of the specified

<sup>1</sup>  [efgankibar@kocaeli.edu.tr](mailto:efgankibar@kocaeli.edu.tr)

\*Corresponding Author

mechanism, but since only 4% of solar energy is UV light, this situation plays a limiting role in TiO<sub>2</sub> excitation efficiency. Although many advantages are given above, the inability of TiO<sub>2</sub> to be used efficiently in daylight appears as a disadvantage. The low energy of daylight beam is not able to excite the electrons of TiO<sub>2</sub> phases where the bandgap of anatase and rutile are 3.0 eV and 3.5 eV, respectively. In addition, excited electrons want to quickly return to their low energy orbits, this process called recombination that causes the photoactivity to decrease. In the presence of these information, two main issues have been focused on to increase the photocatalytic activity of TiO<sub>2</sub>. The first one is the development of methods to reduce the disadvantage of broad band gap and the second is to slow down the recombination rate (Liu et. al. 2016). In order to increase the photocatalytic activity of TiO<sub>2</sub> in the visible region, it has great importance to improve its optical absorption capacity (Ariyanti, Mills, Dong, Yao, & Gao, 2017, Quingli et. al., 2015, Matsunami, Yamanaka, Mizoguchi, & Kojima, 2019). There are some methods to increase the visible region activity of TiO<sub>2</sub>. Traditionally, metal, nonmetal or oxidized forms of metal/nonmetal species are loaded to TiO<sub>2</sub>. Thus, these dopants in the bulk photocatalyst take place in the band gap energy level and partially reduce the band gap value. The beam response of TiO<sub>2</sub> can be increased in visible light region (Li et. al., 2016). Another method is coloring of TiO<sub>2</sub> in order to increase the beam absorption capacity. As it is known that, if a substance absorbs 100% of the light coming in the visible region, the substance appears in black color. In partial absorption, the visible color becomes in the gray-black range. If there is no absorption of light the material will be white and while the absorption at different wavelengths creates different colors of the color scale such as yellow, brown, green and blue. The blackening mechanism of TiO<sub>2</sub> can be summarized by structural changes such as defect formation, formation of Ti<sup>+3</sup>/oxygen hole and loading of hydrogen. With the realization of this mechanism, the surface functionality of TiO<sub>2</sub> evidently changes according to the electronical structures (Ren et. al., 2015). There are various studies in the literature in which sunlight absorption capacity is increased such as hydrogenated black TiO<sub>2</sub> (Chen, Liu, Yu, & Mao 2011), black nanotube TiO<sub>2</sub> in high pressure hydrogen environment (Liu et. al., 2014), blue rutile at 40 bar hydrogen pressure and 450 °C (Qiu et. al., 2014), hydrogenated blue-gray anatase TiO<sub>2</sub> at atmospheric pressure and 700 °C (Yu, Kim & Kim, 2013), gray microspheres (Li, Zhang, Peng, & Chen, 2013), and TiO<sub>2</sub> in the form of green-black nanowires (Wang et. al., 2011). Black TiO<sub>2</sub> preparation methods can be categorized by hydrogenated heat treatments (high-pressure hydrogen, atmospheric or low-pressure hydrogen, atmospheric pressure hydrogen-argon, atmospheric pressure hydrogen-nitrogen, atmospheric argon), hydrogen plasma, chemical reduction (aluminum (Al), zinc (Zn), imidazole (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>), sodium borohydride (NaBH<sub>4</sub>), calcium hydride (CaH<sub>2</sub>)), chemical oxidation, electrochemical reduction, and anode-annealing (Ullattil, Narendranath, Pillai, & Periyat, 2018). While NaBH<sub>4</sub> thermally decomposed, the generated hydrogen reacts with the lattice oxygen of TiO<sub>2</sub>. The removed oxygen makes vacancies in the structure where the vacancies are called defects. The formation of Ti<sup>3+</sup> is also possible by transferring excess electrons to the vacancies of removed oxygen. According to this reduction procedure the white TiO<sub>2</sub> turns black. Apart from traditional methods, surface morphology of TiO<sub>2</sub> is also a factor involved in photoactivity, such as in the oxidation and reduction reactions by facilitating the electron transfer to the surface of the catalyst. The amount of active electrons and holes on the surface of the photocatalyst is directly proportional to the crystalline phase, crystallinity, surface structure and defects on the surface. For instance, the source of the super hydrophilic property of TiO<sub>2</sub> is related with the chemical conformation changes that occurs on the surface. For this reason, tube, fiber, nano-rod, sphere, sheet forms of TiO<sub>2</sub> have become very attractive in photoactivity that these forms can be produced at the nano or micro levels. Different forms of TiO<sub>2</sub> inherently have different properties such as size, surface area, pore volume, pore structure, phase of crystals that are directly related to the photoactivity of TiO<sub>2</sub> (Chen et. al., 2010).

In this study, the coloring of TiO<sub>2</sub> was achieved by thermal decomposition of NaBH<sub>4</sub> to enhance the activity of the catalyst by improving the absorption capacity of daylight energy. During the thermal decomposition of NaBH<sub>4</sub>, defects were formed in TiO<sub>2</sub>, at the same time chemical reduction was achieved and black TiO<sub>2</sub> was prepared. Also, where the surface morphology is an important parameter, the photocatalysts were prepared in

nanotube form from commercial TiO<sub>2</sub> and colored. The process of decolorization depending on the degradation of methylene blue was investigated with the prepared colored catalysts.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Preparation of Nanotubes

1 gram of commercial TiO<sub>2</sub> (Acros, Thermo Fisher Scientific, USA) mixed with 150 mL of 10 M NaOH (Merck, Germany) solution and kept in ultrasonic bath (Bandelin, Sonorex RK106, Germany) for 30 min. After ultrasonic treatment, the suspension of TiO<sub>2</sub> taken into the homemade hydrothermal reactor with teflon liner and treated at 130 °C for 24 hours. After filtration of the suspension, the solid washed with 0.1 M, 150 mL HCl (Merck, Germany) solution for 15 min on a magnetic stirrer (Heidolph, 3001K, Germany). This procedure repeated four times according to the pH value of the residue. After acid treatment the solid washed with distilled water until the pH of the residue was 7. The remaining nanotube catalyst dried in a furnace (Nüve, FN500, Turkey) for 24 hours at 105 °C and calcined at 500 °C for 2 hours in a muffle furnace (Protherm, PLF 120/5, Turkey).

### 2.2. Coloring with NaBH<sub>4</sub>

The commercial TiO<sub>2</sub> mixed with NaBH<sub>4</sub> at a molar ratio of 1.25 ( $n_{\text{TiO}_2} / n_{\text{NaBH}_4} = 1.25 \text{ (mol/mol)}$ ) and was subjected to heat treatment at 400 °C under argon flow rate of 100 mL / min. To determine the coloring potential of NaBH<sub>4</sub>, the time dependency of thermal decomposition was also studied. At the first part of the studies, TiO<sub>2</sub>-NaBH<sub>4</sub> mixture was heated to 400 °C with a ramp rate 50 °C/min. After 60 min treatment the power of the tubular furnace turned off and let the catalyst cool down under argon flow for 24 hours. This catalyst was named TB1. Similar conditions applied to TB2 except ramp rate and cooling time, the ramp rate of TB2 was 10 °C/min and cooling time was 120 min. The last study with commercial TiO<sub>2</sub> was named TB3 with the cooling time parameter was 24 hours. According to the changes in color, TiO<sub>2</sub>/NaBH<sub>4</sub> molar ratios were also carried out as 1.2-0.6 and 0.3 (mol/mol). The studies with nanotubes were named as nTB1, nTB2 and nTB3 related to the similar conditions of commercial TiO<sub>2</sub> counterparts. The parameters and working conditions were given in Table 1. After heat treatment the catalysts washed with ethanol/water mixture (1/2 v/v) for three times and then dried at 105 °C for 24 hours.

Table 1

Experimental design and naming of the catalysts

| Catalyst | TiO <sub>2</sub> /NaBH <sub>4</sub> molar ratio (mol/mol) | Heating rate (°C/min) | Heat treatment (min) | Cooling time (h) |
|----------|---|-----------------------|----------------------|------------------|
| TB1      | 1.25  | 50                    | 60                   | 24               |
| TB2      | 1.25  | 10                    | 60                   | 2                |
| TB3      | 1.25  | 10                    | 60                   | 24               |
| nTB1     | 1.20  | 10                    | 60                   | 24               |
| nTB2     | 0.60  | 10                    | 60                   | 24               |
| nTB3     | 0.30  | 10                    | 60                   | 24               |

### 2.3. Activity Tests

Activity tests were carried out for decolorization of 30 ppm methylene blue solutions with 100 mL. In each experiment, 0.1 g of photocatalyst was used and the concentration value of the solution obtained by filtering the catalyst after the reaction. Since the catalysts are porous materials the adsorption of methylene blue on the surface has to be considered. To determine the methylene blue adsorption capacity of the catalysts, the reaction conditions were performed in the dark. To obtain the real reaction yield the desorption of adsorbed methylene



blue on the catalysts was conducted with the distilled water in an ultrasonic bath. The removal yield of the reaction calculated related to difference between reaction conversion and adsorbed-unreacted parts. Blank experiments in daylight and in the ultraviolet C (UV-C, 254 nm) region were also conducted with both commercial and prepared nanotube TiO<sub>2</sub>s for comparison.

## 2.4. Characterization

X-ray diffractometer (XRD) (Miniflex 2; Rigakku, Japan) used to determine the crystalline phases of catalysts.  $2\theta$  values determined in the range of 10°- 80° with Cu K $\alpha$  radiation ( $\lambda = 0.1541$  nm) and a step size of 0.02. Standard BET method used to evaluate the data for total surface area and BJH method was used to evaluate the pore size distribution plot in nitrogen adsorption (Micromeritics, ASAP 2020, USA). To emphasize the morphology of the samples FEI Quanta 250 environmental scanning electron microscopy (ESEM) and JEOL 6060 scanning electron microscopy (SEM) were used. The absorbance values obtained with UV-spectrophotometer (Hach Lange, DR5000, Germany).

## 3. Results and Discussion

Although there are many different methods to synthesize nanoscale TiO<sub>2</sub>, the frequently used method is the hydrothermal method. Factors affecting nanotube synthesis by hydrothermal method can be examined under five categories. First, the choice of titanium source (anatase, rutile, alkoxide salt, etc.), second, ultrasonic pretreatment (dispersion of nanoparticles, growth of crystals, etc.), third, hydrothermal reaction time and temperature, fourth, the washing process (water, acid, etc.) and the fifth is the calcination conditions (temperature, time etc.). For instance, the hydrothermal reaction temperature determines the formation nanosphere or nanotube form of TiO<sub>2</sub>. The SEM images of commercial and nanotube TiO<sub>2</sub> were given in Figure 1.

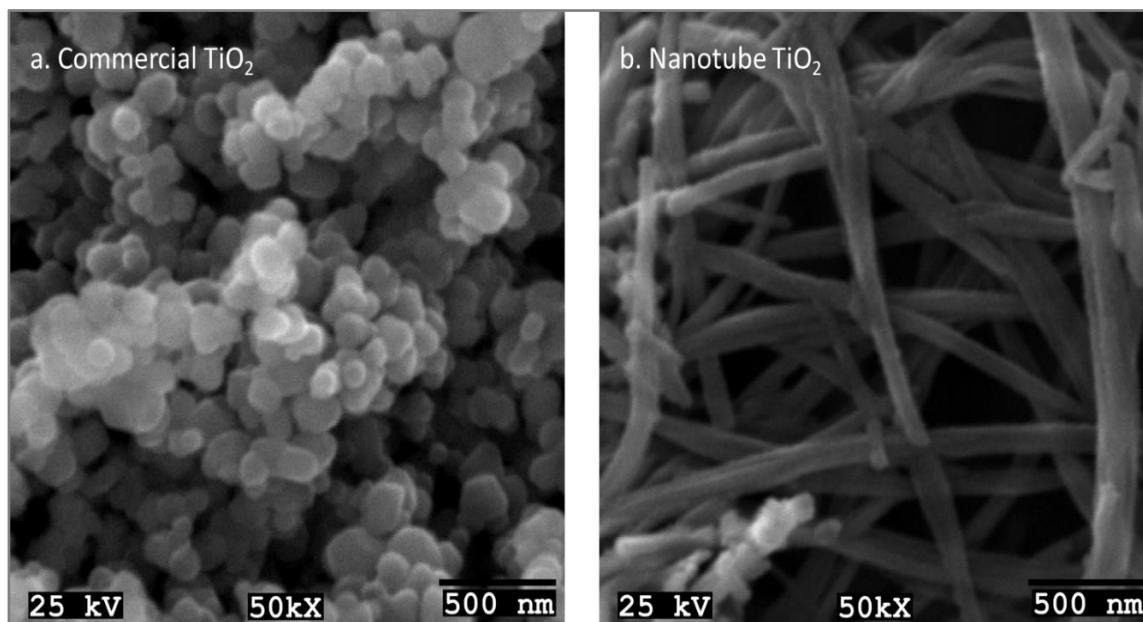


Figure 1. SEM images of a) commercial and b) prepared nanotube TiO<sub>2</sub>

As seen in Figure 1., the nanotubes were produced successfully by chemical treatment of commercial TiO<sub>2</sub>. At the end of the process, partially agglomerated nanotubes with diameters between 10 to 20 nm, not homogeneous in length (100-500 nm) but compatible with the literature (Guo, Wang, & He, 2016) were obtained. In Figure 2., the change in pore distribution and consequently the total surface area of commercial and nanotubes are shown.



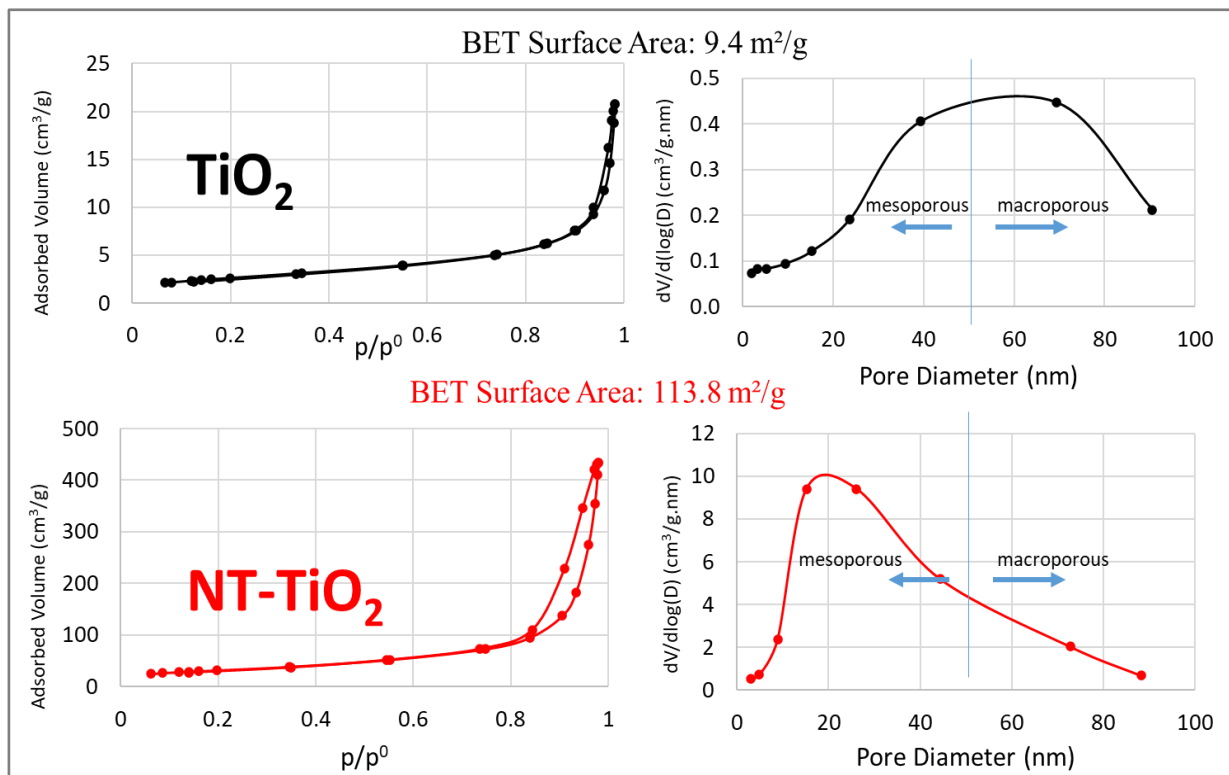


Figure 2. Adsorption-desorption isotherms, pore volume distribution and total surface area values of commercial and prepared NanoTube-TiO<sub>2</sub>

According to Figure 2., nanotubes with a high surface area of 113.8 m<sup>2</sup>/g were produced by modifying the morphological properties. At the same time, the synthesis parameters allowed the formation of a mesoporous structure from the macroporous structure. Adsorption-desorption isotherms of nanotubes are typically Type II with H3 hysteresis loop. Thus, as expected, nanotubes with a morphological property of plate like were obtained by chemical methods. As a result, mesoporous nanotubes with increased surface area were efficiently prepared to be used for decoloring of methylene blue solution. As mentioned before, TiO<sub>2</sub> is active in ultra violet region. The use of colored TiO<sub>2</sub> is important to overcome this limitation that the catalyst can absorb energy including the visible region and increase the efficiency of electron transfer. Due to the obtained results, major problems in providing homogeneous coloration revealed the need to investigate alternative methods of coloring TiO<sub>2</sub>. It has been observed that the most prominent method among the possible methods in the literature also given is the use of NaBH<sub>4</sub> according to its high reduction capacity. In Figure 3., the photographs of colored commercial TiO<sub>2</sub> were given for 1.25 (mol/mol) molar ratio with different heating rates and cooling time.

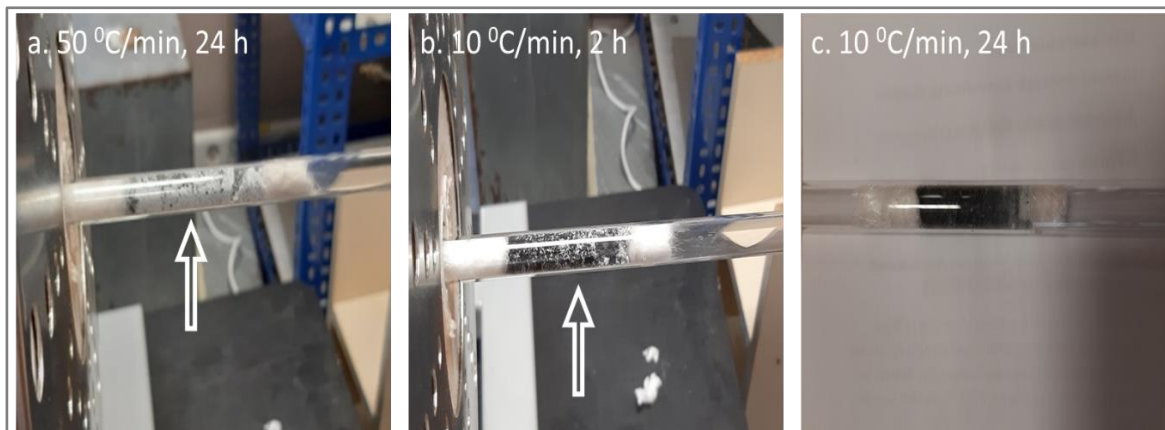


Figure 3. Coloring of commercial  $\text{TiO}_2$  at  $400\text{ }^\circ\text{C}$  by thermal decomposition of  $\text{NaBH}_4$

As seen in Figure 3.a., heterogeneously colored catalyst was obtained while the heating rate was high. Coloring efficiency was also very low and mostly the catalyst was white. It was observed that commercial  $\text{TiO}_2$  turned into a very high amount of black color by decreasing the heating rate, but in this sample with limited cooling time, homogeneity (Figure 3.b.) could not be achieved completely. Also, this catalyst started to burn while it was taken out from the reactor by the contact with oxygen. Therefore, it has been concluded that besides the cooling time, it is necessary to remove the hydrogen from the environment, which is released by thermal decomposition of sodium borohydride that was not used for reduction of  $\text{TiO}_2$ . The homogeneous and black  $\text{TiO}_2$  was obtained where the heating rate was slow, cooling and sweeping period was long (Figure 3.c.). Coloring studies have been done with the optimized conditions on nanotube  $\text{TiO}_2$  catalysts, and in Figure 4, photographs of catalysts prepared with different nanotube- $\text{TiO}_2$  /  $\text{NaBH}_4$  (mol / mol) ratios are given.

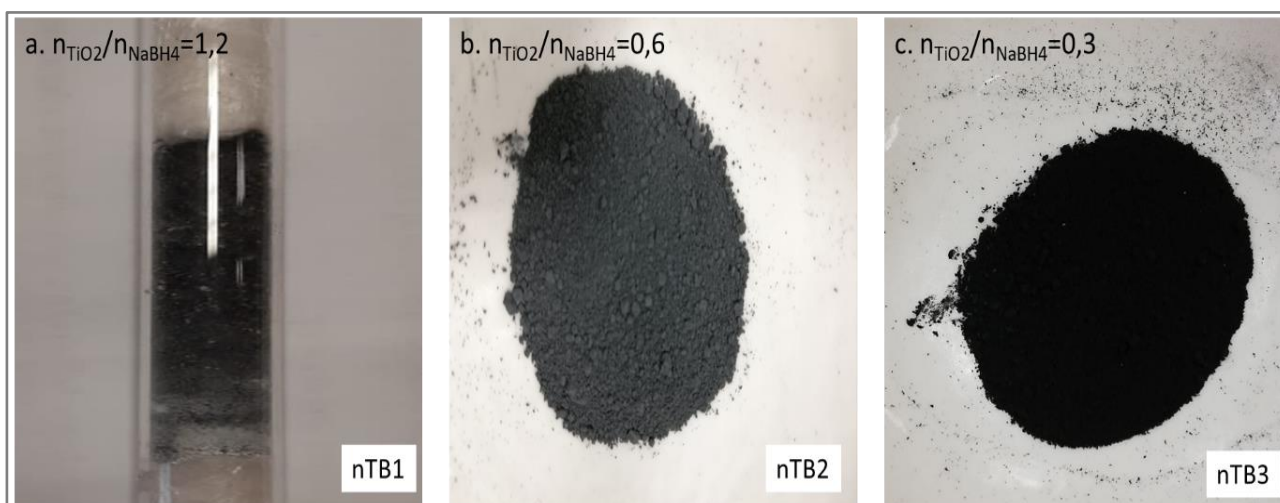


Figure 4. Effect of  $\text{NaBH}_4$  amount on nanotube  $\text{TiO}_2$  coloring

As given in Figure 4.a and 4.b, the catalysts were homogeneous and the color of them were dark gray. While the maximum amount of  $\text{NaBH}_4$  was used to prepare the catalyst, black and homogeneous catalyst was obtained (Figure 4.c.). Thus, by means of  $\text{NaBH}_4$ , the heterogeneity in the reduction process with hydrogen was prevented and homogeneous catalysts in the gray-black color range were prepared.

In Figure 5, XRD spectra of commercial, nanotube and black nanotube of  $\text{TiO}_2$  were given.

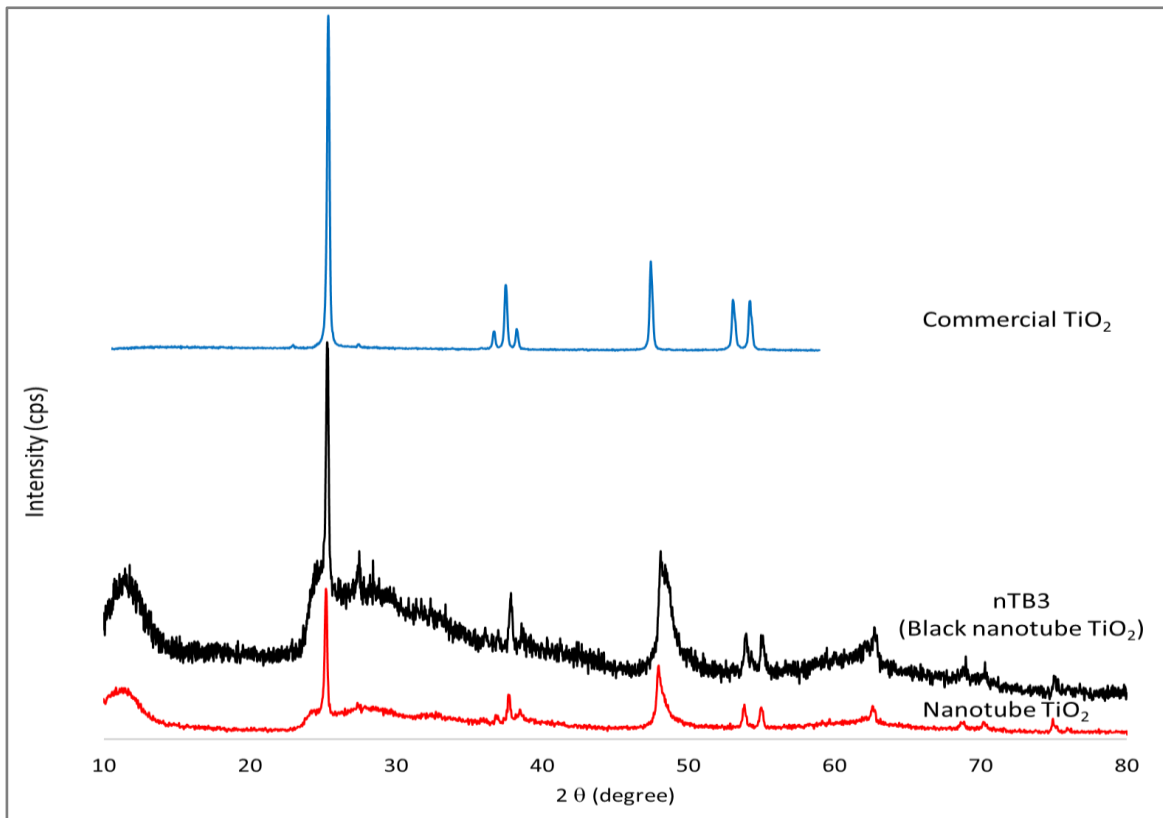


Figure 5. XRD spectra of commercial, nanotube and black nanotube TiO<sub>2</sub> catalysts

XRD spectra of the catalysts exhibit that the crystalline phase is anatase for all with PDF No. 99-101-0957. Additional peaks were observed for nTB3 (black nanotube TiO<sub>2</sub>) at the angles 27° and 28° which was attributed to the deformation of the lattice due to hydrogen atoms from NaBH<sub>4</sub> and which is also used for the reduction of Ti<sup>+4</sup> to Ti<sup>+3</sup> (Ariyanti, Mills, Dong, Yao, & Gao, 2017). To observe the effects of blackening process on total surface area and pore size distribution, the results are given in Figure 6.

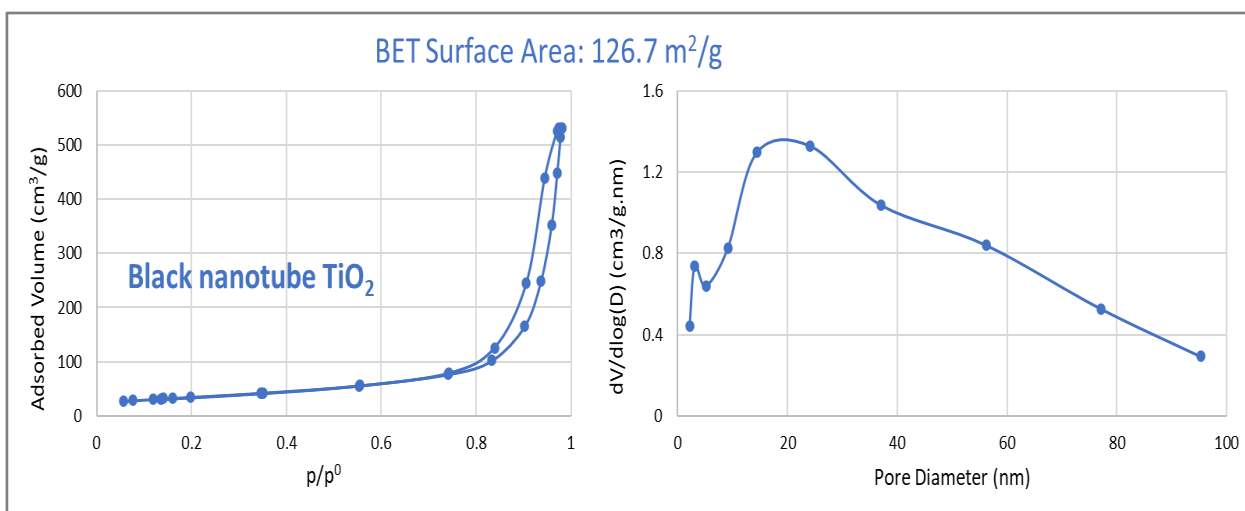


Figure 6. Adsorption-desorption isotherms, pore size distribution and total surface area values of black NanoTube-TiO<sub>2</sub>

After blackening the nanotube  $\text{TiO}_2$ , total surface area of the sample is almost constant. A little increase on total surface area is probably due to creation of some pores during the thermal degradation of  $\text{NaBH}_4$  where some pore formations are observed at narrower pore ranges from pore size distribution results compared to the white nanotubes. Adsorption-desorption isotherms of black nanotubes exhibit typically Type II with H3 hysteresis loop as obtained for prepared nanotubes  $\text{TiO}_2$ . In Figure 7., the ESEM results are given to investigate the microstructure of the of black  $\text{TiO}_2$ .

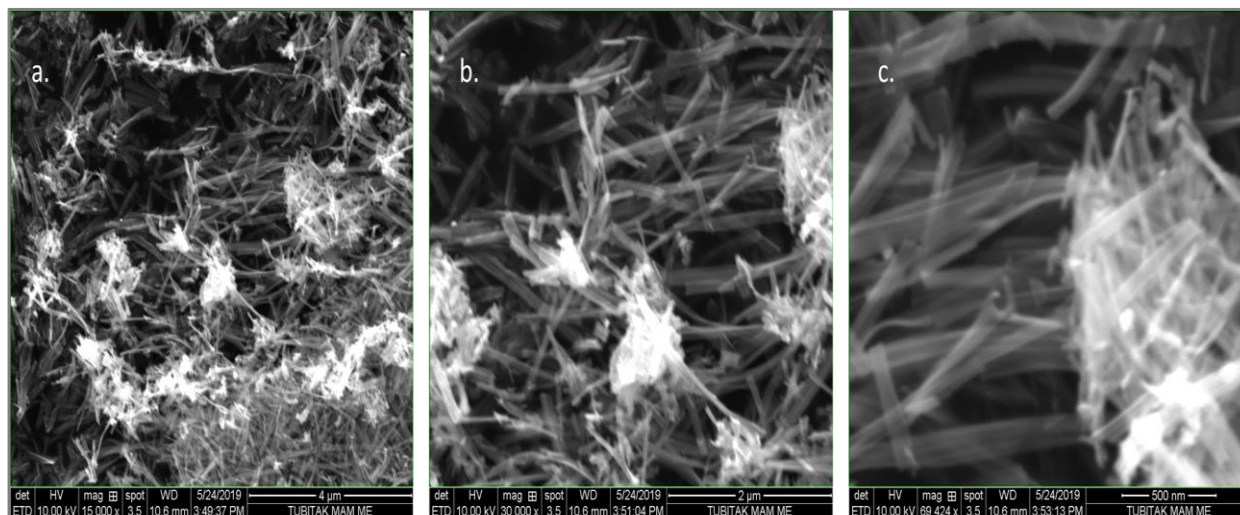


Figure 7. ESEM images of black  $\text{TiO}_2$  a)  $4\mu\text{m}$ , b)  $2\mu\text{m}$  and c)  $500\text{ nm}$

Although agglomeration was observed, the similar shapes and size of nanotubes were obtained after blackening process. This result shows that the role of  $\text{NaBH}_4$  is to lead the formation of oxygen vacancies in the nanotubes by keeping the morphology similar that overlap with the XRD results.

The prepared photocatalysts were performed on degradation of methylene blue and in Table 2., the removal yields were given for methylene blue where the energy source was daylight.

Table 2

Color removal efficiency

| Catalyst                   | Catalyst color and appearance | Removal Yield (%) |
|----------------------------|-------------------------------|-------------------|
| Commercial $\text{TiO}_2$  | White-Homogeneous             | 83.7              |
| *Commercial $\text{TiO}_2$ | White-Homogeneous             | 88.6              |
| TB1                        | White-Black-Heterogeneous     | 91.2              |
| TB2                        | White-Black-Heterogeneous     | 93.1              |
| TB3                        | Black- Homogeneous            | 93.7              |
| Nanotube $\text{TiO}_2$    | White- Homogeneous            | 95.6              |
| *Nanotube $\text{TiO}_2$   | White- Homogeneous            | 96.8              |
| nTB1                       | Dark Gray- Homogeneous        | 97.9              |
| nTB2                       | Dark Gray- Homogeneous        | 97.9              |
| nTB3                       | Black- Homogeneous            | 98.4              |

\*: Blank experiments at UV-C (254 nm)

When the activity test results are examined, the superiority of the prepared nanotubes over the commercial one is revealed. Although homogeneity was not achieved in commercial  $\text{TiO}_2$ , the coloring process worked and a catalyst with increased activity under visible light was prepared. The high performance of colored catalysts are the result of enhancement of daylight absorption capacity of the catalysts. Colored catalysts used the low energy from daylight to excite the electrons in the structure. Photocatalysts were obtained homogeneously in all nanotube coloring studies. When the amount of  $\text{NaBH}_4$  is limited, gray catalysts were prepared. Under all

conditions, the simultaneous coloration of nanotubes and color removal where the sign of methylene blue degradation have ensured that the process is completed with high efficiency. Maximum removal yield, 98.4%, was obtained with black nanotube TiO<sub>2</sub> catalyst.

#### 4. Conclusion

In the nanotube preparation process, the transition from macroporous structure to mesoporous structure has increased the retention of solar energy on the surface and act as a trap for the energy absorption. Thus, the beam hitting the surface was refracted many times, the distance it traveled was extended and the retention time of the beam was increased. Photocatalysts could not be colored homogeneously with the hydrogen reduction process but efficient reduction and coloration obtained with sodium borohydride. In addition to coloring, it has been observed that the surface structure has an important role in activity and the nanotube structure has an important place in the preparation of photocatalysts. The photoactivity in the visible area is increased with colored photocatalysts with increased sunlight absorption capacity. As a result highly active photocatalysts were prepared by thermal decomposition of sodium borohydride with increased beam absorption capacity.

#### Acknowledgement

This work was funded by Kocaeli University Scientific Research Coordination Unit with the project number 2017/127.

#### Conflicts of Interest

The author declare no conflict of interest.

#### References

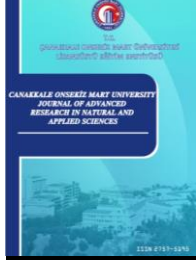
- Ariyanti, D., Mills, L., Dong, J., Yao, Y., & Gao, W. (2017). NaBH<sub>4</sub> modified TiO<sub>2</sub>: Defect site enhancement related to its photocatalytic activity. *Materials Chemistry and Physics*, 199(2017), 571-576. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2017.07.054>
- Chen, S., Zhu, Y., Li, W., Liu, W., Li, L., Yang, Z., Liu, C., Yao, W., Lu, X., & Feng, X. (2010). Synthesis, Features, and Applications of Mesoporous Titania with TiO<sub>2</sub> (B). *Chin. J. Catal.*, 31(6), 605–614. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1872-2067\(09\)60073-5](https://doi.org/10.1016/S1872-2067(09)60073-5)
- Chen, X., Liu, L., Yu, P. Y., & Mao, S. S. (2011). Increasing solar absorption for photocatalysis with black hydrogenated titanium dioxide nanocrystals. *Science*, 331(6018), 746–750. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1200448>
- Guo, L. J., Wang, Y. J., & He, T. (2016). Photocatalytic Reduction of CO<sub>2</sub> over Heterostructure Semiconductors into Value-Added Chemicals. *The Chemical Record*, 16(4), 1918-1933. DOI: <https://doi.org/10.1002/tcr.201600008>
- Haider, A., Jameel, Z. N., & Al-Hussaini, I. H. M. (2019). Review on Titanium Dioxide Applications, *Energy Procedia*. 157(2019), 17-29. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.11.159>
- Kerkez-Kuyumcu, Ö., Kibar, E., Dayioğlu, K., Gedik, F., Akın, A. N., & Özkara-Aydinoğlu, Ş. (2015). A comparative study for removal of different dyes over M/TiO<sub>2</sub> (M = Cu, Ni, Co, Fe, Mn and Cr) photocatalysts under visible light irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 311(2015), 176–185. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2015.05.037>
- León-Ríos, S., González, R. E., Fuentes, S., Ángel, E. C., Echeverría, A., Serrano, A. E., Demergasso, C. S., & Zárate, R. A. (2016). One-Dimensional TiO<sub>2</sub>-B Crystals Synthesised by Hydrothermal Process and Their Antibacterial Behaviour on Escherichia coli. *Journal of Nanomaterials*, 2016, 1-8, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/7213672>



- Li, G., Zhang, Z., Peng, H., & Chen, K. (2013). Mesoporous hydrogenated TiO<sub>2</sub> microspheres for high rate capability lithium ion batteries. *RSC Adv.*, 3, 11507–11510. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3RA41858H>
- Li, L., Chen, Y., Jiao, S., Fang, Z., Liu, X., Xu, Y., Pang, G., & Feng, S. (2016). Synthesis, microstructure, and properties of black anatase and B phase TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Materials and Design*, 100(2016), 235–240. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2016.03.113>
- Liu, N., Schneider, C., Freitag, D., Hartmann, M., Venkatesan, U., Müller, J., Spiecker, E., & Schmuki, P. (2014). Black TiO<sub>2</sub> nanotubes: cocatalyst-free open-circuit hydrogen generation. *Nano Lett.*, 14(6), 3309–3313. DOI: <https://doi.org/10.1021/nl500710j>
- Liu, X., Zhu, G., Wang, X., Yuan, X., Lin, T., & Huang, F. (2016). Progress in Black Titania: A New Material for Advanced Photocatalysis. *Adv. Energy Mater.*, 6(17), 1600452. DOI: <https://doi.org/10.1002/aenm.201600452>
- Matsunami, D., Yamanaka, K., Mizoguchi, C., Kojima, K. (2019). Comparison of photodegradation of methylene blue using various TiO<sub>2</sub> films and WO<sub>3</sub> powders under ultraviolet and visible-light irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 369(2019), 106-114. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.10.020>
- Nikokavoura, A., & Trapalis, C. (2017). Alternative photocatalysts to TiO<sub>2</sub> for the photocatalytic reduction of CO<sub>2</sub>. *Applied Surface Science*, 391, 149–174. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.06.172>
- Qingli, W., Zhaoguo, Z., Xudong C., Zhengfeng, H., Peimei, D., Yi, C., Xiwen, Z. (2015). Photoreduction of CO<sub>2</sub> using black TiO<sub>2</sub> films under solar light. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, 12(2015), 7-11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2015.09.001>
- Qiu, J., Li, S., Gray, E., Liu, H., Gu, Q., F., Sun, C., Lai, C., Zhao H., & Zhang, S. (2014). Hydrogenation Synthesis of Blue TiO<sub>2</sub> for High-Performance Lithium-Ion Batteries. *J. Phys. Chem. C*, 118(17), 8824–8830. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp501819p>
- Ren, R., Wen, Z., Cui, S., Hou, Y., Guo, X., & Chen, J. (2015). Controllable Synthesis and Tunable Photocatalytic Properties of Ti<sup>3+</sup>-doped TiO<sub>2</sub>. *Scientific Reports*, 2015(5), 10714. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep10714>
- Sinhamahapatra, A., Jong-Pil Jeon J. P., & Yu, J. S. (2015). A new approach to prepare highly active and stable black titania for visible light-assisted hydrogen production. *Energy Environ. Sci.*, 8(2015), 3539. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5EE02443A>
- Suprun, W., Lutecki, M., Haber, T., & Papp, H. (2009). Acidic catalysts for the dehydration of glycerol: Activity and deactivation. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 309(1-2), 71–78. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2009.04.017>
- Ullattil, S. G., Narendranath, S. B., Pillai, S. C., & Periyat, P. (2018). Black TiO<sub>2</sub> Nanomaterials: A Review of Recent Advances. *Chemical Engineering Journal*, 343(2018), 708–736. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.01.069>
- Wang, G., Wang, H., Ling, Y., Tang, Y., Yang, X., Fitzmorris, R. C., Wang, C., Zhang, J. Z., & Li, Y. (2011). Hydrogen-treated TiO<sub>2</sub> nanowire arrays for photoelectrochemical water splitting. *Nano Lett.*, 11, 3026–3033. DOI: <https://doi.org/10.1021/nl201766h>
- Yu, X., Kim B., & Kim, Y. K. (2013). Highly Enhanced Photoactivity of Anatase TiO<sub>2</sub> Nanocrystals by Controlled Hydrogenation-Induced Surface Defects. *ACS Catal.*, 3(11), 2479–2486. DOI: <https://doi.org/10.1021/cs4005776>



Zhu, Z., Cai, H., & Sun, D. W. (2018). Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) photocatalysis technology for nonthermal inactivation of microorganisms in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 75(2018), 23–35,. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.018>



## 6 Şubat 2017, Mw=5.4 Ayvacık Depremi Öncesi ve Sonrası Temel Deprem Tehlike Parametrelerinin Analizi

Ayşe Gezer<sup>1</sup>, Tolga Bekler<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Jeofizik Mühendisliği Anabilim Dalı, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye

<sup>2</sup> Jeofizik Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye

<sup>3</sup> Doğal Afetlerin Risk Yönetimi Anabilim Dalı, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye

### Makale Tarihçesi

Gönderim: 23.04.2020

Kabul: 20.11.2020

Yayın: 20.03.2021

### Araştırma Makalesi

**Öz** – Kuzeybatı Ege bölgesinin en karmaşık tektonik unsurlarını barındıran Biga Yarımadası oldukça yoğun bir depremsellik gösterir. Bu yarımada ve yakın çevresi için farklı dönemlerde meydana gelen orta ve büyük depremlerin deprem tehlikesi analizi, çalışmanın temelini oluşturmaktadır. Temel deprem parametreleri olarak da bilinen a ve b-değerleri bu çalışmanın veri tabanı olan aletsel dönem deprem kataloğundaki M>2 için belirlenmiş ve değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, ÇOMÜ ve KRDAE tarafından işletilen deprem istasyonları ve buna bağlı yüksek kaliteli faz okumaları sonucuna dayalı ortak bir deprem kataloğu kullanılmıştır. Ayvacık başta olmak üzere ve yakın çevresinde 6 Şubat 2017’de meydana gelen Mw=5.4 büyüklüğündeki deprem ile başlayan ve süreklilik gösteren deprem sonrası aktivitenin Tuzla deformasyon zonu çevresinde yaklaşık 25x10 km’lik bir alanda kümelendiği gözlenmiştir. Bu deprem öncesi ve sonrası yerel tektonik yapılar ve gerilme durumları ile ilişkilendirilebilecek başta b-değeri olmak üzere olasılıksal parametreler de değerlendirilmiştir. Kısa ve uzun dönemde bu parametrelerin ana deprem öncesi ve sonrası azalım ve artış eğilimleri yerel ve bölgesel hâkim gerilmelerin yanında üst kabuktaki heterojenite ve jeotermal kaynaklar da göz önünde bulundurularak sismisite ve sismotektonik yapıya katkısı ve ilişkisi uzaysal ve zamansal olarak incelenmiştir. Saroz-Ayvacık-Edremit doğrultusunda alansal olarak deprem verisi yoğunluğu dikkate alındığında b-değerlerinin gerilmelerle ters orantılı olarak deprem öncesi artışı ve akabinde de bu davranış azalımı 2014 ve 2017 depremleri ile kendisini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler** – Ayvacık, depremsellik, deprem tehlike analizi

## Analysis of Basic Hazard Parameters Before and After the February 6, 2017 Ayvacik Earthquake (Mw=5.4)

<sup>1</sup>Department of Geophysical Engineering, Faculty of Engineering, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey

<sup>2</sup>Department of Geophysical Engineering Department, School of Graduate Studies, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey

<sup>3</sup>Department of Risk Management of Natural Disaster, School of Graduate Studies, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey

### Article History

Received: 23.04.2020

Accepted: 20.11.2020

Published: 20.03.2021

### Research Article

**Abstract** – The Biga Peninsula, which has the most complex tectonic segments of the northwestern Aegean region, shows a remarkable dense seismicity. The earthquake hazard analysis of medium and large earthquakes occurred at different periods for the peninsula and its vicinity is the basis of this study. The basic earthquake parameters those are generally known as a and b-values, were determined, and evaluated for the earthquakes M> 2 during the instrumental period earthquake catalog, which is the database of this study. A homogenous earthquake catalog combined of two institutions COMU and KOERI data, which are quite dense and have high solution quality, play a remarkable role in this study. It was observed that the dense seismic activity after the earthquake that initiated in the event of Mw = 5.4 on February 6, 2017, especially in Ayvacik and its close vicinity, and which has been continuing, was clustered around Tuzla deformation zone in an area of approximately 25x10 km. Probabilistic parameters including b-value which can be related with local tectonic structures and stress states before and after this earthquake were also evaluated. In the short and long term, the decreasing and increasing tendencies of these parameters before and after the main shock were examined spatially and temporally in addition to local and regional dominant stresses, heterogeneity in the upper crust and the contribution of the geothermal resources to the seismicity and seism tectonic structure. Considering the spatial density of earthquakes towards to Saroz-Ayvacık-Edremit, the pre-earthquake b-values increased inversely with the stresses, and then this decline in behavior was distinguished in the 2014 and 2017 earthquake sequences.

**Keywords** – Ayvacık, seismicity, earthquake hazard analysis

<sup>1</sup> ayse.jfz@gmail.com

<sup>2</sup> tbekler@comu.edu.tr

\*Sorumlu Yazar / Corresponding Author

## 1. Giriş

Olasılıksal deprem tehlike analizi yaklaşımlarında Gutenberg-Richter bağıntısındaki ( $\log N=a-bM$ ) temel iki regresyon parametresi deprensellik çalışmalarında önemli rol oynamaktadır (Gutenberg ve Richter, 1944). Kısaca belirtmek gerekirse bu bağıntıda 'a' ve 'b' pozitif gerçek sabit olduğu yerlerde deprem sayısı ve büyüklüğü tarafından kontrol edilmektedir. Burada; *a-değeri* olay (deprem) oranı tarafından belirlenmekte ve belirli bir bölge için dikkate alınan yoğunluk ve zaman aralığına bağlıdır. Diğer yandan *b-değeri* tektonizma ile ilişkilendirilen bir parametre olarak literatürde birçok araştırmacı (Wyss, 1973) tarafından değerlendirilmiştir. Yer içi heterojen yapısı ve gerilmeler, gözenek basıncı gibi fiziksel oryantasyonlar ile *b-değeri* arasındaki korelasyonlar yanında *b-değerinin* zaman ve mekansal değişimleri bu alandaki gelişmelerin incelenmesine konu olmuştur. Özellikle *b-değerinin* farklı ölçekteki değişimleri yerel ve global sismisite ile olan ilişkisine bağlı olarak açıklanmaktadır. Gutenberg ve Richter (1954), global ölçekte *b-değerinin* 1.0-1.6 arasında, McNally ve James (1989) *b-değerinin* 0.8-1.2 arasında, Udias ve Mezcua (1997) küresel sismisite için *b-değerinin* 0.6-1.6 arasında değişim gösterdiğini ifade etmişlerdir. Monterroso ve Kulhanek (2003), Orta Amerika sismisitesi için *b-değerlerinin* kıtasal çerçevede 0.6 ile 1.6 arasında olduğunu bulmuşlardır.

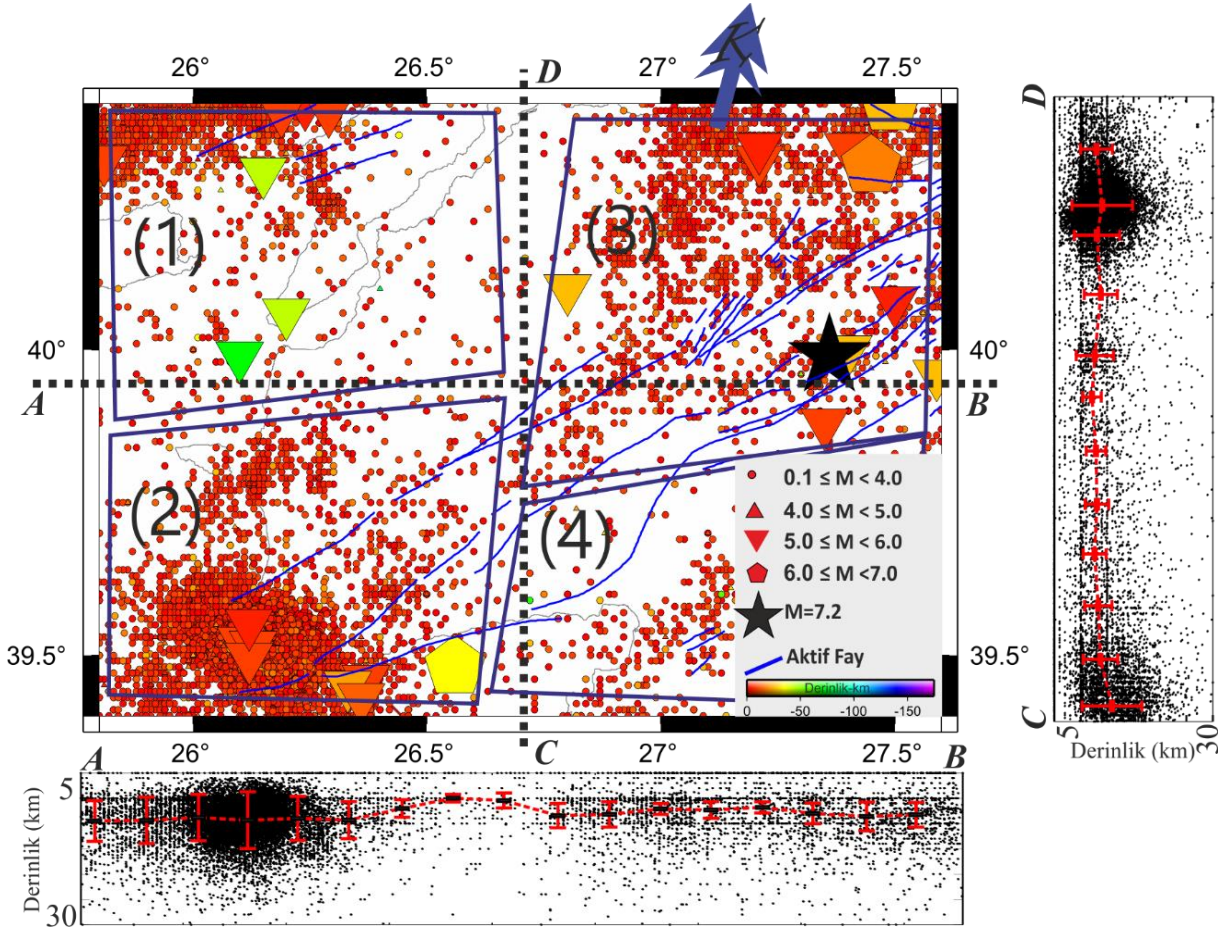
Türkiye'nin güney bölgesi için yapılan sismik tehlike çalışmasında, *b-değeri* 0.33 ile 1.13 arasında değişim göstermiştir (Yilmaztürk ve Burton, 1999). Marmara Bölgesi'nin deprenselliğinin incelendiği Sayıl ve Osmanşahin (2005)'in çalışmasında, Tekirdağ Bölgesi (Saroz-Gaziköy fayı) için  $a=3.38$ ,  $b=0.47$ ; Saroz Bölgesi (Saroz Körfezi) için  $a=3.66$ ,  $b=0.52$ ; Bandırma Bölgesi (Çan- Biga fay kuşağı, Sarıköy fayı ve Yenice-Gönen fayı) için  $a=4.05$ ,  $b=0.56$  hesaplanmıştır. Sismik aktivitenin yoğun olduğu, dünyadaki belli başlı etkin fayları içeren bölgeler için yapılan çalışmalarda, *b-değeri* tektonizmanın karakterine ve deprem sayısına da bağlı olarak 0.55-1.19 arasında hesaplanmıştır (Bayrak vd., 2008). Poisson dağılımı uygulanarak, 100 yıl içerisinde büyüklüğü  $M_s \geq 7.0$  olan bir depremin olma olasılığı, Tekirdağ ve çevresi için %60.3, Saroz Bölgesi için %50.9, Bandırma Bölgesi için ise %57.3 oranında bulunmuştur. Depremlerin istatistiksel hesaplamalara bağlı olarak oluşum ve tektonizma ile birlikte değerlendirilmelerinde sıkça kullanılan Gutenberg-Richter parametresi olan *b-değeri* ile ilgili literatürde oldukça fazla çalışma olmakla beraber bu çalışmaların birçoğu bu değer düşük olduğu alanların yüksek gerilme alanları ile ilişkilendirilebileceğini savunmaktadır (Bridges ve Gao, 2006). Dolayısıyla *b-değeri* alansal değişimlerini deprem oluşma tehlikesinin daha fazla olduğu şeklinde değerlendirmek mümkündür. Orta ve büyük ölçekli depremlerin oluş mekanizmaları bu yaklaşım ile birçok tektonik bölgede uyumludur. Kuzeybatı Ege ve Biga Yarımadası'nda Saroz-Gaziköy ve Yenice-Gönen kırıklarının ürettiği depremlerin olduğu yerelerde düşük *b-değeri* elde edilmiştir. Tarihsel ve aletsel dönemde de bu deformasyon alanlarında yıkıcı depremler olduğu görülmektedir. Bölgesel *b-değerlerinin* güncel tektonizma ile olan ilişkilendirilmesi bu çalışmada yerel ölçekte ve daha sık güncel örnekleme verisi ile çalışılmıştır.

Bu çalışmada, 6 Şubat 2017 Ayvacık depremi ( $M_w=5.4$ ) öncesi ve sonrası deprem parametrelerinin uzaysal ve zamansal değişimleri incelenmiştir. Ayvacık merkez olmak üzere  $100 \text{ km}^2$  lik alanda yıkıcı olarak kabul edilebilecek bir depremin, 5 Şubat 2017 tarihine kadar olmaması bu bölgede yerel ölçekte deprem tehlike analizi yapılmasına imkan vermemiştir. Bunun yanında yerel fay sistemlerine bağlı çok sayıda deprem üretilmemiş olması da bu ve benzer deprem tehlike analizi kapsamında parametrelerinin de hesaplanamamasına neden olmuştur. İlk defa 6 Şubat 2017  $M_w>5.4$  olarak meydana gelen depremlerin olasılıksal parametrelerine bağlı tehlike analizi bu çalışma ile tartışılmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

Kuzey Anadolu Fay kuşağı, deprem üretkenliği açısından dünyadaki bilinen en önemli fay kuşaklarından birisidir. Biga yarımadası ve çevresinde genel olarak bu fay kuşağının uzantıları görülmektedir. Gelibolu ve Biga yarımadalarındaki Saroz-Gaziköy fayı, Etili fayı, Çan-Biga fay kuşağı, Sarıköy fayı ve Yenice-Gönen fayları meydana getirdikleri depremler nedeni ile diri oldukları bilinen faylardır. Sağ yanal doğrultu atım

karakterine sahip Saroz-Gaziköy fayı 1912 Mürefte-Şarköy (Tekirdağ) depremi ( $M_s=7.3$ , KRDAE) olarak bölgesel etkisi oldukça büyük yıkıcı bir depreme neden olmuştur. 1935 tarihinde 6.3 büyüklüğündeki depremin yaşandığı Çan-Biga fay kuşağı, kuzeydoğu-güneybatı yönelimli birçok fay parçasından oluşmaktadır. Biga yarımadası 1935 depreminden sonra yıkıcı etkisi olan bir deprem de bölgedeki yanal atım faylanma karakterinin baskın olduğu Yenice-Gönen fayının yırtılması ile sonuçlanan 18 Mart 1953 Gönen depremidir ( $M_s=7.2$ , KRDAE). Bölgesel faylanmaların genellikle jeotermal sahalarını sınırlayan alanlarda aktif olduğu, bu fayların da Biga yarımadası kuzeybatı kesiminde Kuzey Anadolu Fayı baskın yanal atım karakterli temel özelliklerini yansıtmakla beraber, Ayvacık güneybatı (KB-GD doğrultulu Tuzla fayı, Babakale ve Gülpınar fayı) ve Edremit Körfezi kuzey kesimlerinde (Edremit, Havran Balya fayları, KD-GB ve KB-GD doğrultulu Midilli-Ege Denizi fayları) Batı Anadolu açılma rejimi unsurlarının temsilcisi olan düşey atımlı fayların baskın olduğu görülmektedir (Sözbilir vd., 2018).



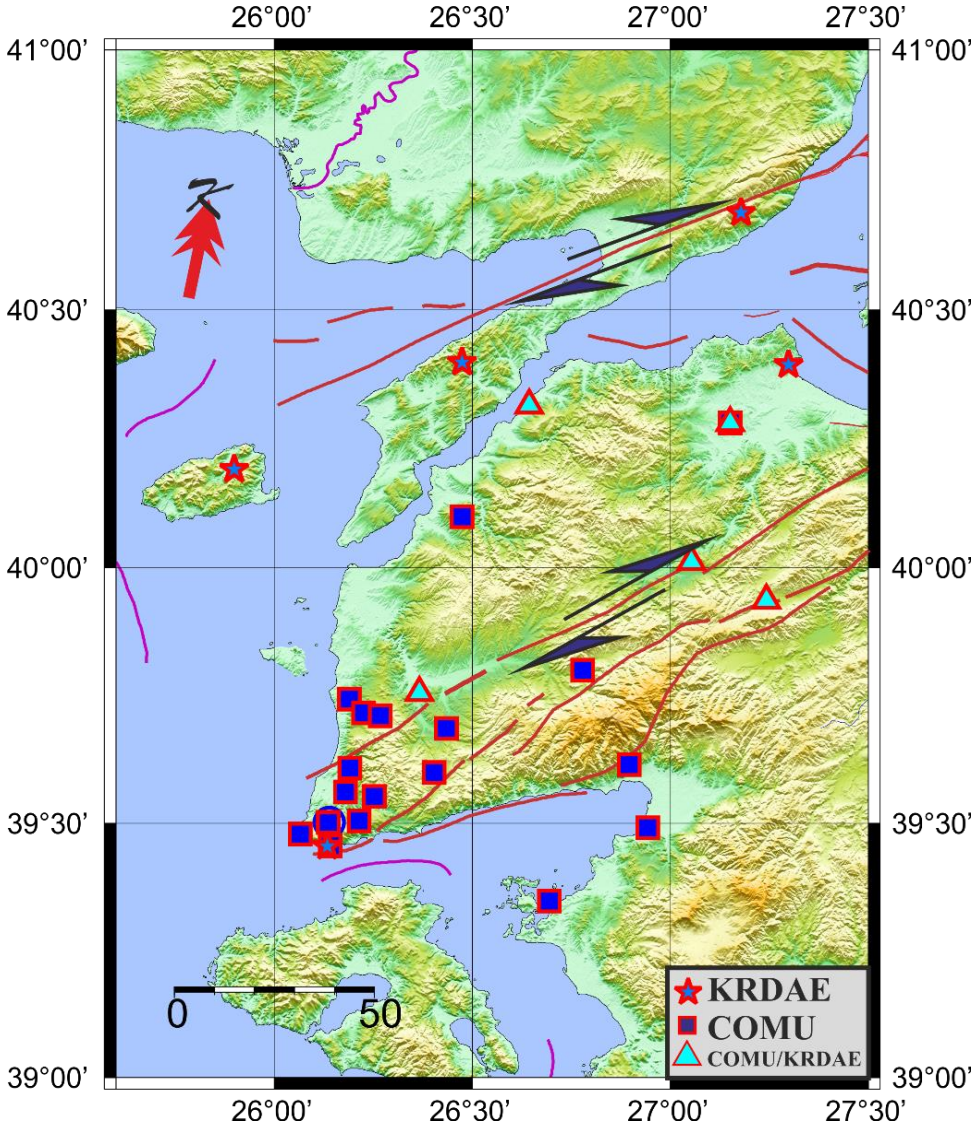
Şekil 1. Biga yarımadası sismisitesi ve deprem kaynak bölgeleri ile deprem odaklarının A-B ve C-D kesitleri boyunca dağılımları. Kesit boyunca çizgiler derinliklerin ortalama deprem yoğunluğu ölçeğindeki değişiminin standart sapmasını göstermektedir.

### 3. Bulgular ve Tartışma

39°–41° K enlemleri ve 25°–28° D boylamları, Ayvacık ve çevresi için çalışma alanının sınırlarını oluşturmaktadır (Şekil 1). Çalışmada kullanılan deprem katalog bilgisi Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi (ÇOMÜ) Deprem Araştırmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAUM) ile Kandilli Rasathanesi ve Deprem Araştırma Enstitüsü Bölgesel Deprem ve Tsunami İzleme Merkezi (KRDAE-BDTİM) veri tabanı kullanılarak oluşturulmuştur. Ayvacık depremi sonrasında başta depremin en çok etkilediği Yukarıköy'e yakın olan Ayvacık, Ezine, Edremit çevresi olmak üzere 15 adet geçici deprem istasyonu belirli süreler içinde



kurulmuş ve kaydedilen sürekli veri seti içinde depremler ayıklanmıştır. Bu istasyonlara ek olarak KRDAE istasyonları tarafından kaydedilen depremler de değerlendirmelere katılmıştır. Kullanılan istasyonların dağılımı Şekil 2’de verilmiştir.



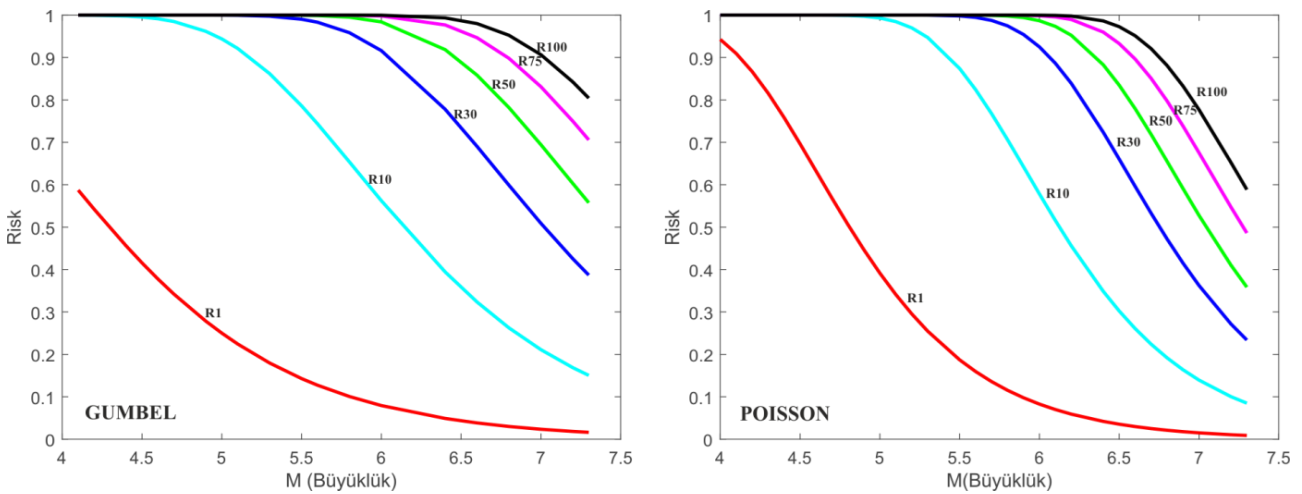
Şekil 2. Biga yarımadası, Ayvacık ve Edremit bölgesi deprem istasyonları (geniş periyot). KRDAE istasyonları yıldız, COMU istasyonları kare ve hem KRDAE hem de COMU tarafından ortak çalıştırılan istasyonlar üçgen ile temsil edilmiştir.

Bu istasyonlar arasında deprem dalgası formunda olan olaya ait toplam 32,922 P ve S dalga fazı varış zamanları okunmak sureti ile bu depremlerin çözümleri yapılarak katalog oluşturulmuştur. Depremlerin çözümünde [Kalafat vd., \(1987\)](#) kabuk modeli kullanılmıştır. Yerel ve bölgesel aktif fayların kinematiki ve deprem episantr dağılımı da dikkate alınarak 4 ayrı sismik alt bölge oluşturulmuştur. 2017 Ayvacık depremleri öncesi katalog bilgisi 1912 yılından itibaren olmak üzere KRDAE veri tabanına göre seçilmiş 2017 ve sonrası depremlere ait ÇOMÜ kataloğu ile birleştirilerek  $M \geq 0.1$  olan toplam 20,300 deprem çalışmanın veri setini oluşturmuştur. Depremlerin dağılımları ve seçilen sismik alt bölgeler Şekil 1’ de verilmiştir.

### 3.1. Gumbel Uç Değerler ve Poisson Dağılımıyla Deprem Tehlikesinin İncelenmesi

Gumbel uç değerler dağılımında, yıllık en büyük deprem büyüklükleri kullanılarak, depremlerin olma olasılıkları ve geri dönüş periyodları hesaplanmaktadır (Bağcı 2000). Poisson dağılım modeli ile karşılaştırıldığında Gumbel uç değer yaklaşımı olasılık modelinin oluşturulmasında daha esnektir; deprem oluşumlarının istatistiksel analizinde veri kümesinin eksik olması durumunda da kullanılabilir. Genelde Gumbel teorisi, tanımlı bir zaman aralığında, en büyük deprem büyüklük değerleri kullanılarak deprem katalog kümesinde olayların sıralamasında kullanılmaktadır. Ayvacık ve Biga yarımadasını da kapsayan alan içinde 1 yıldan 100 yıla kadar beklenen büyüklüklere göre risk eğrilerine bakıldığında 30 yıl içerisinde büyüklüğü 6.0 olan bir depremin oluşma olasılığı %91 olarak değerlendirilmiştir. Bölgesel olarak ise 100 yıl içerisinde  $M > 7.0$  olan bir depremin oluşma olasılığı %90, tekrarlanma periyodu ise 42 yıl olarak elde edilmiştir (Şekil 3).

Genellikle depremlerin zamansal oluşumları Poisson ve Poisson olmayan bir modele göre değerlendirilir. Poisson modeli depremlerin Poisson sürecine göre basit bir değerlendirme imkânı sunarken Poisson sürecine uygun olmayan model, elastik yenilme (rebound) teorisi üzerine kuruludur. Poisson sürecini takip eden olaylar zaman, boyut ve depremin yerine göre rastgele ve bağımsızdır. Poisson olmayan model ise belirli bir fay veya segmentin üzerinde meydana gelen depremler geçmiş depremsellikle ilişkilendirildiği kabullenmesini yapar. Bu yüzden depremlerin oluşumu; olayların zamanları, etki alanları, konumları ve önceki depremler ile ilişkilidir. Bu modelin fiziksel esası da elastik yenilme teorisidir. Deprem oluşum modelleri ağırlıklı olarak Poisson dağılımını içerir. Deprem büyüklükleri ve oluşum sayıları ile ilgili temel regresyon bağıntısı Gutenberg ve Richter (1944) tarafından önerilen " $\log N_c(M) = a - bM$ " olarak verilen ifadedir. Bu, tüm sürecin bir eşik büyüklüğünün üzerinde olduğunu varsayar;  $N_c$   $M$ 'den daha büyük veya eşit birikimli deprem sayısıdır. Uygulamada ise modelin zayıf tarafı doğruluk, özellikle de düşük büyüklük aralıklarında analiz edilen veri kümelerinin tekdüzeliği ve tamamlılığın ( $M_c$ ) eksik olmasıdır. Bu türde bir düzensizliği etkileyen en önemli faktörlerin başında sismik ağın, depremselliğin gözlenmesindeki hassasiyeti ve zamansal olarak düzenli kayıta olmaması sayılabilir. Bu çalışmada kullanılan deprem istasyonlarının sayısı ve algılama kapasitesinin niteliği, Poisson sürecinin bu aşamadaki olumsuzlukları minimize etmiştir. Poisson modeline göre, Biga yarımadası genelinde 30 yıl içerisinde  $M > 6.0$  olan bir depremin oluşma olasılığı %84 olarak değerlendirilirken, yaklaşık 16 yıl da tekrarlanma periyodu olarak hesaplanmıştır. 100 yıl içerisinde büyüklüğü 7.0 olan bir depremin olma olasılığı %80, 105 yıl da tekrarlanma aralığı olarak elde edilmiştir (Şekil 3)

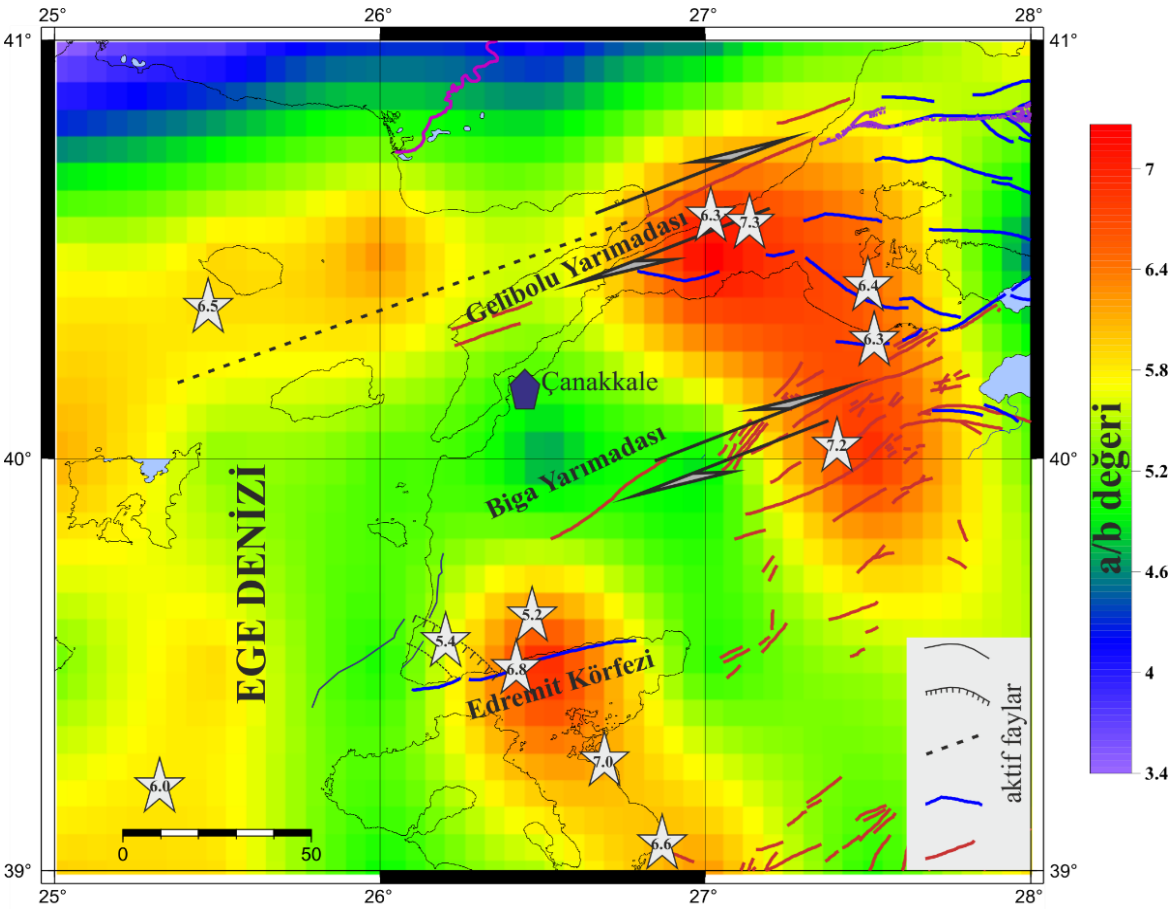


Şekil 3. Gumbel uç değerler ve Poisson dağılımına göre deprem risk analizi eğrileri



### 3.2. Modal Değerin (a/b) Dağılımı

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar (Yılmaztürk ve Burton, 1999; Bayrak vd., 2008) ise, tek başına a ve b parametrelerine karşın *a/b-değerinin* sismisite ile tektonik unsurların uyumunu daha çok ön plana çıkarması ve bir ölçek olması açısından bu çalışmada da kullanılmıştır. *a/b-değerlerinin* yüksek olduğu bölgelerde büyük ve yıkıcı depremlerin olduğu gözlemlenmiştir. 1912 Mürefte-Şarköy ( $M_s=7.3$ , KRDAE), 1944 Edremit Körfezi ( $M_s=6.8$ , KRDAE) ve 1953 Yenice-Gönen ( $M_s=7.2$ , KRDAE) depremleri bu nitelikte depremlerdir. 1912-2018 yılları arasında meydana gelen büyüklüğü  $M \geq M_c$  ( $M_c=2.2$ ) olan deprem verileri kullanılarak, çalışma alanı için  $0.05^\circ \times 0.05^\circ$ 'lik bir grid ağı oluşturularak hesaplanan *a/b-değerleri* görüntülenmiştir (Şekil 4). Bölgesel deprem kataloglarına bağlı deprem parametrelerinin yüksek hassasiyette elde edilmesinde  $M_c$  değerinin değerlendirilmesi Cambaz vd., (2019) tarafından ele alınmış olup Ayvacık için  $M_c=2.0$ , *b-değeri* de  $1.0 \pm 0.08$  hesaplanmıştır. Mevcut çalışma ile bu değerlerin oldukça uyumlu olduğu görülmektedir.



Şekil 4. Çalışma alanındaki *a/b-değerlerinin* basitleştirilmiş tektonik harita (Emre vd., 2013) üzerindeki dağılımı. Yıldızlar  $M>5$  olan depremlerin yerlerini göstermektedir.

### 3.3. *b-değerinin* Zamana Bağlı Değişimi

*b-değerindeki* geçici değişimlerin potansiyelini incelemek için kısa, orta ve uzun vadeli olarak, deprem öncüsü çalışmaları son yıllarda özellikle depremlerin zamansal dağılımının gerilme birikimi olan ilişkisinin araştırılmasında ön plana çıkmaktadır. Sonuçlar büyük depremlerin genellikle *b-değerindeki* artışın orta vadede gerçekleştiğini ardından depremden önceki haftalarda/aylarda bir azalış olduğunu göstermektedir (Sammonds, Meredith ve Main, 1992). Molchan ve Dmitriev (1990)'ın ana şoktan önceki günler-saatlerde öncü depremler için geçici *b-değerleri* çalışmaları vardır. Monterroso (2003)'ün Orta Amerika için deprem

kataloglarında *b-değerinin* büyük depremlerden önce önemli ölçüde azaldığı hipotezini destekleyen çalışması vardır. Büyük magnitudlü depremlerle karşılaştırıldığında küçük depremlerin oluşumu, *b-değerleri* kullanılarak düşük *b-değerlerinin* olduğu bir alandan itibaren başladığını göstermektedir. Bu durum büyük gerilmelerin bir göstergesi olarak da düşünülebilir. 2017 Ayvacık depremi sonrası *b-değerinin* düştüğü, kırılan alanın Tuzla fayı ile ilintili olduğu sonucu ortaya konulmaktadır. Benzer sonuçlar her ne kadar yüksek frekanslı da olsa [Abdikan vd., \(2019\)](#) tarafından yapılan Ayvacık depremi Insar analizlerinde de görülmektedir.

Coulomb gerilme düşümündeki maksimum değişim fay düzleminde oluşmaktadır. Bu yüzden ana şokun oluştuğu, esas kayma düzlemini meydana getiren kırılmaların çevresindeki küçük fay segmentlerinde artçı mekanizmaların meydana gelmesi beklenir. 12 Kasım 1999 Düzce depremi ( $M_w=7.2$ , KRDAE) ana şokun olduğu bölgede düşük *b-değerlerinin* yüksek Columb gerilme artışı ile ilişkili olduğu değerlendirilmiştir. Bu düşük *b-değerinin* nedeni asperite yakınındaki gerilme durumudur [Görgün vd., \(2009\)](#) ve yırtılma sonrası *b-değerinde* yükselme eğilimi olmaktadır. Şekil 5 ve Şekil 6'daki *b-değeri* değişimi, artçı olayların faylanma bölgesindeki ana gerilme alanlarındaki dağılımı ile uyumludur. Çalışma alanında *b-değerleri* her alt bölge için hesaplanmıştır; en yüksek *b-değeri* Alan 4'te ( $b= 1.100$ ), en düşük *b-değeri* ise Alan 3'te ( $b= 0.5844$ ) hesaplanmıştır. Bu bölgelerde meydana gelen deprem büyüklükleri dikkate alındığında Alan 4'te meydana gelen en büyük deprem büyüklüğünün 5.9 olduğu, Alan 3'te ise 6.3, 6.4, 7.2 ve 7.3 büyüklüğündeki depremlerin üretildiği görülmektedir.

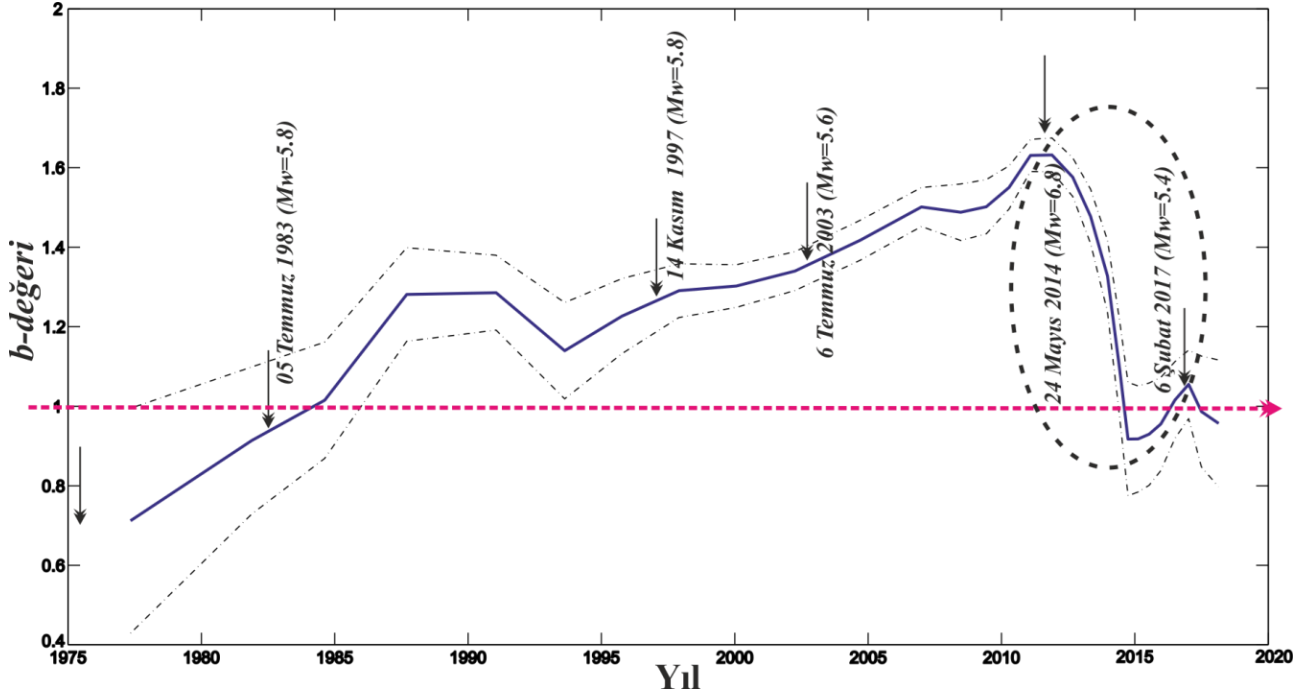
Yerel ve bölgesel tektonizma ile fay topluluklarının farklı geometrilerde yırtılma mekanizmalarının istatistiksel davranışının incelenmesinde *b-değeri* oldukça etkin bir parametre olmakla beraber sayısal veya yığınsal farklılık göstermesi sebebi ile ampirik bir bağıntı üyesidir. Bölgesel ve yerel gerilme koşulları ile *b-değeri* arasındaki ters orantı bu konuda yapılan birçok çalışma ile de ortaya konulmuştur. Yırtılma öncesi gerilmelerin arttığı bölgelerde *b-değerindeki* göreceli düşüş yine ko-sismik davranış sonrası *b-değerindeki* artışın olması çoklu kırılma veya deformasyonun yüksek seyrettiği yerlerde belirgin anomali gösterebilmektedir. Bu bakımdan Şekil 4'teki *b-değerinin* zamana bağlı uzun peryod değişimleri Biga ve Ayvacık yarımadaaları için tipik belirteçler denilebilir.

Orta ve büyük depremler öncesi deprensellik yoğunlaşması olan bölgeler, ana şok öncesi gerilme artışı potansiyel alanları ile ilişkilendirilebilecek bölgeler olarak da değerlendirilebilir. Diğer yandan özellikle Ayvacık ve Biga yarımadaalarında jeotermal kaynakların oldukça yoğun olduğu düşünülürse, böylesi hızlı metamorfizmayı kontrol eden arka plan depremlerin de yine tektonik yüklenmeler ile yoksa tersi bu arka plan depremlerin yerel gerilmelere neden olacağı konusunda hipotezler vardır. Buna göre *b-değerleri* bir sonraki gerilme boşalım alanları hakkında bir fikir verecektir.

Zamana bağlı *b-değerinin* değişimlerini incelemek için kayan bir zaman-pencere yöntemi kullanılmaktadır. Bunun için, bir deprem katalogundan bir grup deprem seçilir, *b-değeri* ilk  $N$  olayı için hesaplanır. Ardından, pencere belirli sayıda olaya karşılık gelen bir zamana göre kaydırılır, örn.  $N/10$  olay. Yeni veri grubu için *b-değeri* hesaplanır ve son olaya ulaşılan kadar işlem tekrarlanır.

Hesaplanan her *b-değeri*, ilgili pencerenin orta noktasına atanır. Şekil 5'te çalışma alanındaki *b-değeri* zamana bağlı değişimi hesaplanmıştır. Buradaki değişimin üst ve alt sapma değerleri (kesikli çizgi), KRDAE kataloguna ek olarak ve ÇOMÜ katalogundaki (Şubat, 2017-Aralık 2018) deprem verisinde 50 olay ve 5 olay kayması içeren zaman penceresi kullanılarak hesaplanmaktadır.

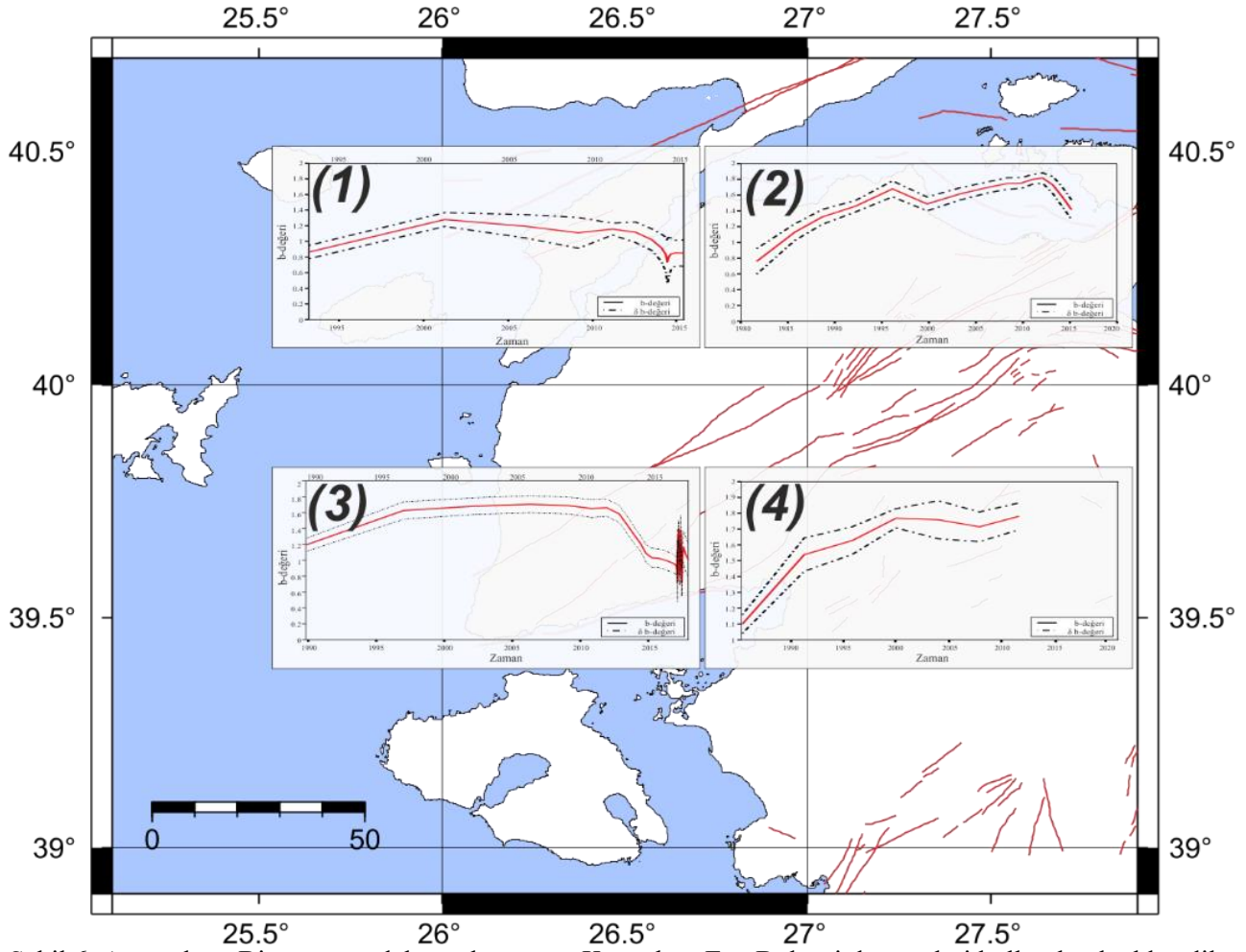
Çalışma alanındaki *b-değerinin* %95 güven aralığında kaldığını ortaya koymak, *b-değeri* değişimindeki kararlılığı doğrulamak için farklı zaman pencereleri test edilmiştir. Pencere içindeki deprem sayısının seçimi zamandaki seçilebilirlik ile daha geniş pencerelerinin yuvarlatma etkisi arasında uyumu açısından önemlidir (detayları için [Wiemer, 2001](#)). Pencere içinde kullanılan farklı sayıda (50 -150) deprem kullanılması yanında her pencerenin kaydırma miktarının (5-10 adımda bir) çözünürlüğü değiştirmedeği görülmüştür.



Şekil 5. Ayvacık, Biga yarımadası, Saros ve Edemit Körfezlerini de kapsayan alanda *b*-değerinin yıllara göre değişimi ve büyüklüğü  $M > 5.4$  olan depremlerin dağılımı. Grafikte, 24 Mayıs 2014 ve 6 Şubat 2017 depremleri öncesi *b*-değerinde belirgin artışın olduğu görülmektedir

Şekil 5'te Ayvacık-Biga yarımadası ve yakın çevresinde 1980' den 2018 yılının sonuna kadar *b*-değerinin değişimi verilmiştir. Bu tarihten önce aletsel döneme ait *b*-değerinin elde edilmesi için yeterli sayıda veri olmadığından regresyon katsayıları belirlenememiştir. Bu grafikte en çarpıcı olan, 24 Mayıs 2014 Gökçeada depremi ( $M_w=6.8$ ) öncesi *b*-değerinde artış ve ardından yaklaşık 3 yıl sonra 6 Şubat 2017 depremi ( $M_w=5.4$ ) öncesi *b*-değerindeki agresif düşüştür. *b*-değerindeki bu artış, bir sessizlik (quiescence) anomalisinin aynı zamanda "belirgin bir anomali" (daha küçük boyutlu olayların sayısındaki nispi bir artış, daha büyük olanların sayısındaki nispi düşüş) olduğunu göstermektedir. 6 Şubat 2017 Ayvacık depremi ( $M_w=5.4$ ) öncesi *b*-değeri yerel olarak yüksek olmakla beraber, düşme eğilimi gösterdiği 24 Mayıs 2014 Gökçeada depremi ( $M_w=6.8$ ) sonrası izlenebilmektedir. Ana depremden yaklaşık 2.5 ile 3 yıl öncesinden başlayan *b*-değerindeki artış oldukça belirgindir.

Yüksek *b*-değerleri büyük heterojenitenin ve düşük dayanımlı bölgelerde beklendiği gibi çok sayıda küçük depremler ile ilişkilendirilmektedir. Buna karşın, düşük *b*-değerleri ise yüksek direnç ve düşük heterojenlik gösteren alanlara tekabül etmektedir. Bölgesel *b*-değerlerinin küresel ölçekte yüksek seyrettiği ve bu konumlardan düşüş gösteren *b*-değerlerinin de yüksek gerilme birikimi ve gelecekte büyük yırtılma olasılığı olan faylanma alanları ile örtüştüğü şeklinde yorumlamak mümkündür.



Şekil 6. Ayvacık ve Biga yarımadaalarını kapsayan Kuzeybatı Ege Bölgesi depremleri kullanılarak elde edilen  $M_c$  ve  $b$ -değerlerinin tüm ve alt bölgeler bazında zamana bağlı değişimleri. Kesikli çizgi standart sapmayı göstermektedir.

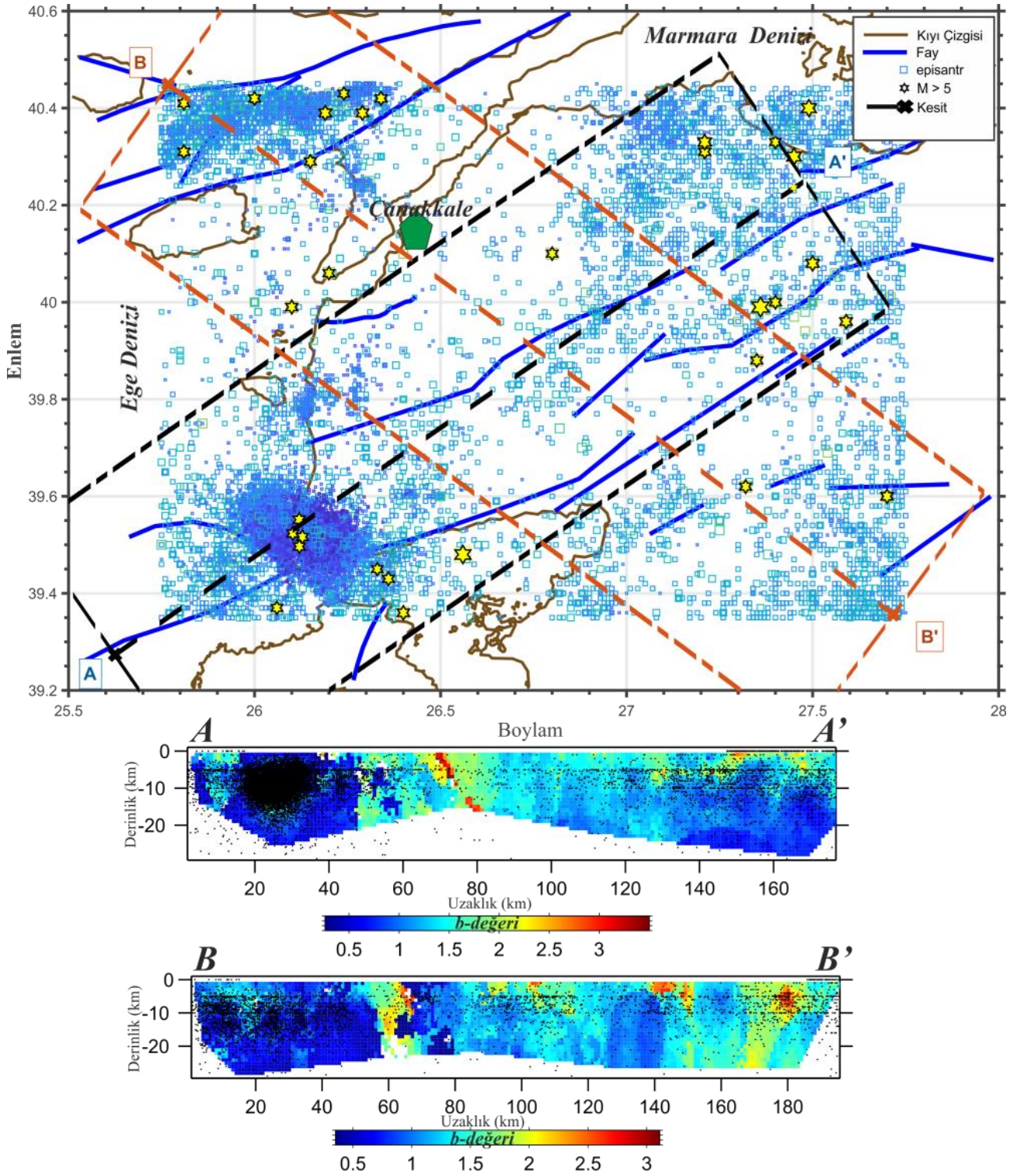
Depremsellik çalışmaları açısından en önemli istatistiksel parametrelerden biri magnitüd tamamlılık ( $M_c$ ) analizidir.  $M_c$  için doğru bir tahmin çok önemlidir, kullanılabilir verinin göz ardı edilmesi durumunda oldukça yüksek değerler olması nedeni ile veri örnekleme kalitesi de düşük olacaktır. Bu durumda depremsellik parametrelerinin sezgisel olmayan bir analizini yapmak da oldukça güçleşecektir.  $M_c$  değerine bağlı yerel ve bölgesel depremselliğin değerlendirilmesinde  $M_c$ 'nin zamana bağlı değişimleri sismik ağın kalitesi ve sürdürülebilirliği ile doğrudan ilintilidir. Şekil 6'da  $b$ -değerinin 1. bölge için belirli bir monotonlukta değişim sergilediği, 2010 yılından sonra da hafif bir düşme eğiliminde olduğu görülmektedir. Bu değişimi takip eden 4 yıl sonrasında 2014 depremi ana şokunun meydana gelmiş olması yerel gerilme yüklemelerinin de artması sonucu ile bağdaştırılmıştır. Depremsellik çalışmalarında önemli ölçüde güvenilir sonuçlar elde edilebilmesi için çok sayıda deprem verisi kullanmak gerekir. Bu çalışmada Ayvacık ve yakın çevresi için ortalama  $M_c$  değerinin zamanla değişimini ortaya koyabilmek için 21,000 adet depremi içeren katalog verisi oluşturularak gözlemlenen değişim, standart sapması ile birlikte Şekil 6'da verilmiştir.

Depremin kaynak bölgesi tektonik gerilimlerle yavaş yavaş yüklenirken, odak bölge er ya da geç kritik bir duruma gelecek ve faylanma ile sonuçlanacak olan yırtılma oluşacaktır.  $b$ -değerlerinin hesaplanmasında daha geniş alanlar ve uzun zaman aralığı, depremin oluşmasında odak bölgesindeki ön plana çıkmayan öncü nitelikli olayları maskeleyecektir. Aslında,  $b$ -değeri Gutenberg-Richter (Gutenberg ve Richter, 1944) ilişkisinde istatistiksel bir ölçüdür. Fakat aynı zamanda,  $b$ -değerinin sanki bir gerilim metre veya gerilim göstergesi şeklinde kabul edilen mekanik temelleri vardır. Bazı deneylerde  $b$ -değeri ile diferansiyel gerilmenin ters

orantılı olduğu ifade edilmiştir (Lei 2003). Diğer yandan *b-değerinin* hem kıtasal kabukta hem de dalma-batma zonu ortamlarında gerilme ile doğrusal azaldığı belirtilmiştir. Dolayısıyla, büyük bir depremin farklı süreçlerinde odak bölgesindeki gerilme rejimi de farklılık gösterecektir. Buna bağlı olarak kaynak bölgesindeki *b-değeri* ana şok öncesi belirteçlerin oluşmasına ve bu şekilde yorumlanabilmesine yönelik gerilmelerdeki farklılıkla değişiklik gösterecektir. Ana şok öncesi *b-değerinde* her zaman istikrarlı bir değişim söz konusu olmayabilir. Bunun başlıca nedenleri arasında; ortam ve gerilmelerin heterojenitesi, faylanma türleri, kabuk yapısı ve reolojisi, kayaç türleri ve gevrekliği ve sünek davranışı, akışkanlık ve yapısal etkileşim sayılabilir. Bu durumda büyük depremler öncesi *b-değeri* oldukça karmaşık olabilir. 17 Ağustos 1999 Kocaeli depreminden ( $M_w=7.4$ , KRDAE) 1 yıl önce ana şokun bulunduğu lokasyondan 10km uzakta düşük bir *b-değeri* tanımlanmıştır (Kalafat ve Görgün, 2019). Bu örnekte asperite bölgesinin tektonik karmaşası ile *b-değerinin* büyük ve küçük depremler arasında bir ilişki kurulabileceği gösterilmektedir. Tüm bu faktörler göz önünde bulundurularak, *b-değerinin* zamansal değişimini farklı durumlar için özetlenebilir. Örneğin büyük bir deprem meydana gelmeden önce *b-değerinin* birkaç yıl veya daha fazla arttığı ve ana şokun ardından düştüğü durumdur. 24 Mayıs 2014 ve 6 Şubat 2017 depremlerinde bu patern sergilenmektedir (Şekil 5 ve Şekil 6'da 1 ve 3. Bölge). Diğer bir durum ise *b-değerinin* ana depremden uzun bir süre önce artış eğilimi gösterdiği, ana depremden çok kısa bir süre içinde de düşüş gösterdiği. Çalışma alanında da 2 ve 4. alt bölgelerindeki değişimin bu yaklaşımı sergiler bir patern gösterdiği izlenimi olmakla beraber bölgesel tektonizmanın bunu doğrulayacak büyük bir yırtılmanın bu zaman sürecinde olmadığı anlaşılmaktadır.

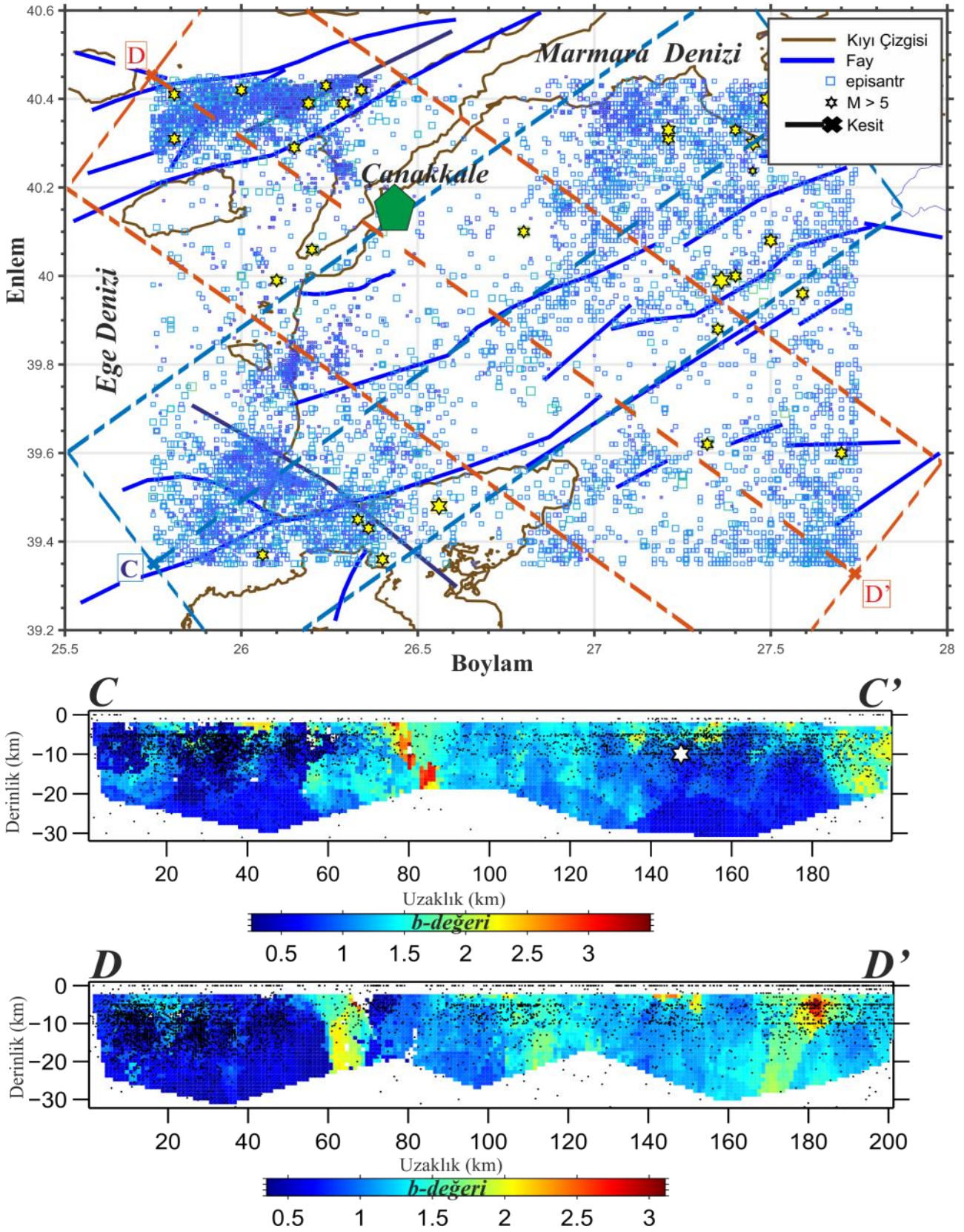
*Mc* değeri 2010 yılına kadar büyük değerlere sahiptir ve 2.5 - 3.5 arasında bir değişim göstermektedir. Sismik kaynakların karakterine ve episantral dağılıma göre farklı bölgelere ayırdığımız çalışma alanındaki 1. ve 2. bölgelerde 24 Mayıs 2014 Gökçeada depremi ( $M_w=6.8$ ) ve 3. Bölgede ise 6 Şubat 2017 Ayvacık depremi ( $M_w=5.9$ ) bağlı olarak *Mc* değerinde artışlar dikkati çekmektedir. Bir diğer dikkat çekici nokta bazı yüksek *Mc* değerleri artçı şok dizilerinin ilk kısımlarından yüksek olabilir, çünkü küçük depremler kaydedilmeyebilir. 2017 yılından sonra çalışma bölgesinde kurulan ek istasyonlar sayesinde *Mc* değerinde önemli ölçüde bir düşüş gözlenir ve ortalama 0.5 – 1.5 arasında değişim gösterir. Artan istasyon sayısı ile büyük depremlerin yanında mikro depremlerin de kaydedilmesiyle birlikte magnitüd tamamlılık değeri düşüş göstermiştir. *b-değerinde* gözlemlenen değişimler, bölgesel gerilme artışı, jeolojik yapı ve heterojenite derecesi gibi bir çok faktörden kaynaklanabilir. Ayrıca meydana gelen büyük bir deprem, *b-değerindeki* değişimleri etkileyebilmektedir. Bu durum büyük bir depremden önce *b-değerinde* azalma veya büyük bir depremin hemen öncesinde *b-değerinde* artış ve sonra keskin bir şekilde azalma olarak izlenebilmektedir. Diğer yandan *b-değeri* artçı deprem silsilesi süresince stokastik bir değişim göstermektedir. Dolayısı ile *b-değeri* belirgin olarak küçük veya büyük olaylarla ilişkili değildir ve büyük alanlar ile uzun zaman aralıklarında değişimler gösterir (Wyss, Klein, Nagamine ve Wiemer, 2001). Bu çalışmada hesaplana *b-değerindeki*, zaman grafiğine baktığımızda 2010 yılından sonraki keskin azalış ve artışlarının bu dönemlerde meydana gelen 2014 Gökçeada ve 2017 Ayvacık depremlerine bağlı olduğunu görmek mümkündür. 6 Şubat 2017 depremi öncesinde Ayvacık ve yakın çevresinde ulusal sismik ağlara (KRDAE ve AFAD) ait istasyon sayısının az olmasından dolayı  $Mc=2.10$  olarak elde edilmiştir. Ancak bölgede meydana gelen mikro deprem aktivitesini gözlemlemek amacı ile ana deprem sonrası mevcut deprem istasyonlarının sayısını arttırmak üzere bölgedeki deprem algılama eşliğinin artması ile *Mc* değerinin de az da olsa düştüğü görülmüştür ( $Mc=2.0$ ). Gerek istasyon sayısındaki artışa bağlı tanımlanabilir küçük magnitüdü depremlerin artması gerekse kısa dönem aralığında veri tabanı ile çalışılması bu farkın oluşmasına neden olabilmektedir. Diğer yandan deprem büyüklüklerinin tayinindeki ve çözülen deprem sayılarındaki çözünürlük yanında özellikle 6 Şubat 2017 Ayvacık depremi hemen sonrası yakın dönem içinde sismik ağın ana şokun olduğu dönemde olmaması ve oldukça az sayıda istasyon olması, bu farkın da düşük olmasına neden olacaktır.



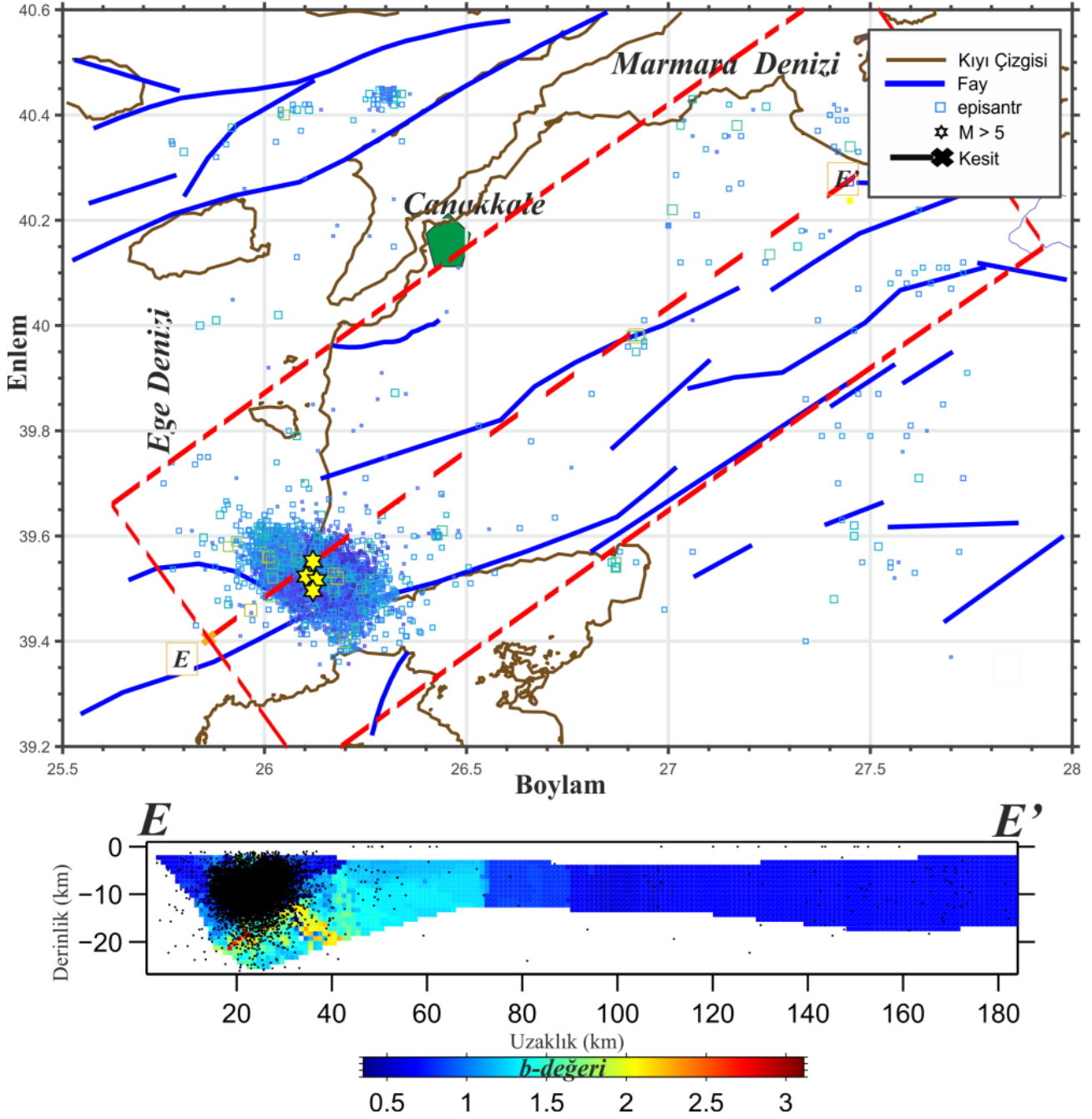


Şekil 7. Kuzeybatı Anadolu'da büyüklüğü  $M > 1$  olan 1912 – 2018 (Aralık 31) yılları arasında meydana gelen depremlerin episantr dağılımı (üstte) ve GB-KD (A-A') ve KB-GD (B-B') episantr uzaklığı – derinlik kesitleri  $b$ -değeri dağılımı





Şekil 8. Kuzeybatı Anadolu'da büyüklüğü  $M > 1$  olan 1912 – 2017 (Ocak 5) yılları arasında meydana gelen depremlerin episantr dağılımı (üstte) ve GB-KD (C-C') ve KB-GD (D-D') episantr uzaklığı – derinlik kesitleri  $b$ -değeri dağılımı



Şekil 9. Kuzeybatı Anadolu’da meydana gelen büyüklüğü  $M>1$  olan 2017 (Ocak 5) – 2018 (Aralık 31) yılları arasında meydana gelen depremlerin episantr dağılımı (üstte) ve GB-KD (C-C') ve KB-GD (D-D') episantr uzaklığı – derinlik kesitleri  $b$ -değeri dağılımı

Kabuk içinde depremlerin oluş derinlikleri, kayaç heterojenitesi, gerilme ve kırılgenlik ile  $b$ -değerleri arasında bir ilişki olduğu son yıllarda bu alanda yapılan araştırmalara da konu olmuştur. Gutenberg ve Richter (1954), sığ, orta ve derin depremler için  $b$ -değerlerinin sırasıyla  $0.90 \pm 0.02$ ,  $1.2 \pm 0.2$  ve  $1.2 \pm 0.2$  olduğunu bulmuşlardır.  $b$ -değerlerinin derinlik ile olan ilişkisi, kabuktaki heterojenitesinin derecesini ve gerilme koşullarını yansıtabilir. Bazı araştırmacılar (Wiemer ve Wyss, 2002) derinlikteki basınçla gerilme koşullarının kırık sistemlerini ve zayıflık bölgelerini oluşturacağını ve  $b$ -değerinin azalacağını belirtmişlerdir. Farklı dönemleri içeren  $b$ -değeri dağılımları Şekil 8 ve Şekil 9’da verilmektedir. Kesit genelinde yoğun tektonizma geçirmiş Saroz körfezi, Ayvacık ve Biga yarımadası sismojenik zonlarında yukarıdaki yaklaşımlar

doğrulanırken, Ayvacık depremlerini de içeren kısımda tam tersi bir patern göze çarpmaktadır. Gerilme düşümü, yüksek *b-değeri*ni düşmesi ile de desteklenmektedir. Diğer yandan, ana deprem sonrası takip eden artçı depremlerin fazlalığı ve oluşum sıklığı birbirine yakın tektonik unsurların gerilme serbestliğinin sürekliliği ve yüksek *b-değeri* ile kendini göstermektedir (Şekil 9). Sismik aktivitenin başladığı ve uzaklıkla *b-değeri*ni azaldığı fay alanındaki yüksek *b-değerlerinin* Ayvacık depremleri artçıları ile uyumlu olduğu görülmüştür. Dikkati çeken bir başka karşılaştırma *b-değeri* dağılımı ile çalışma alanındaki ısı kaynaklarının örtüştüğüdür. Jeotermal sahalarda yerel yüksek sıcaklık ve basıncın olduğu derinliklerde de genelde *b-değerinde* artış gözlenmektedir (Wyss, Mcnutt ve Wyss, 1998).

Singh ve Chadha (2010) çalışmalarında Hindistan'da (Koyna-Warna fay alanı) *b-değeri*ni 8 km derinliğe kadar sistematik düştüğünü, daha derinlerde ise arttığını ve artışın sıvı varlığı ile ilişkilendirilebileceğini belirtmiştir. Çalışmanın dikkat çeken bir sonucu da 5 km derinlikte düşük *b-değeri*ni bir sonraki muhtemel yırtılmanın olacağı yerel yüksek gerilme alanını işaret etmesidir. Benzerlik ve karşılaştırma yapıldığında, Biga yarımadası genelinde özellikle Ayvacık başta olmak üzere (Tuzla) Ayvacık kuzeydoğusu (Külcüler, Çan, Evciler, Kırkgöçit) aktif hidrotermal veya jeotermal sahalara sahiptir. Biga yarımadasındaki düşük *b-değerleri*, gerilmelerin jeotermal aktivite ile daha düşük seviyede kalmasının bir göstergesidir.

Kabuktaki heterojenitenin ve gerilmenin düşük olduğu bölgeler 1.0'dan daha büyük bir *b-değeri* ile 1.0'dan daha düşük değerler ise yüksek diferansiyel gerilmeler ile ilişkilendirilir (Wiemer ve Wyss, 2002). Bu durum belirli bir doğrultuda etkin levha hareketlerinin neden olduğu kuvvetlerin yüklemelerinden kaynaklanmaktadır ki bu genellikle daha büyük gerilmelere neden olur. Fiziksel olarak kayacın maruz kalabileceği en büyük ve en düşük gerilme farkı olarak adlandırılan bu farklılık (diferansiyel gerilme) deformasyona uğramış metamorfik kayaların doğasındaki gerilmelerden de sorumludur. Kayaç, büyük diferansiyel gerilmelere maruz kaldığında, özellikle derin fay zonları boyunca taneler ezilecek ve sürekli kırılmalar ve parçalanmalar oluşacaktır. Bazen fay bölgeleri boyunca deformasyon, sanki bir modelleme kili deformasyonu gibi plastik davranış gösterecektir. Bu durum Ayvacık depremlerinde olduğu gibi ani yırtılmalar yerine küçük ve orta büyüklükte depremlerin oluşmasına neden olacaktır. Çoğu zaman bu ani ve büyük fay zonlarının da yırtılmasının önüne geçecektir. Başka bir deyişle, yüksek bir *b-değeri* küçük depremlerin baskın olduğu anlamına gelir; tersi durumda da, düşük *b-değeri*, büyük depremlerin daha küçük depremleri baskıladığı sonucudur. Dolayısı ile kıtasal kabukta diferansiyel gerilme ile deprem *b-değerlerinin* ters orantılı olduğu doğrulanmıştır. Bölgesel yüksek gerilmeyi işaret eden düşük *b-değeri* ile ilgili farklı bir görüş ise ergimiş kayaçların oluşturacağı aşırı basınçlı gaz ihtiva eden formasyonların varlığıdır.

Ayvacık yarımadası ve Biga yarımadası olarak farklı bölgedeki depremlerin mekanizmaları ile de karşılaştırılabilecek bir durum olarak da değerlendirmek mümkündür. Özellikle Ayvacık ve Biga yarımadalarındaki jeotermal sahaların ısı kaynakları olan derinlik kayaçlarının fizikokimyasal yapılarının bu yoruma bağlı zayıflık zonları oluşturması mümkündür. Bu düşük *b-değeri* bölgeleri, aynı zamanda asperite gibi davranabilir (Wiemer ve Wyss, 2002) ve gerilme altında büyük yapısal süreksizlikler bulunan kayma bölgelerinde kırılma gerçekleşmezse gelecekte meydana gelecek depremler şeklinde sonuçlanabilir. Bu yüzden *b-değeri*ni zamana bağlı değişimlerini izlemek ve buna altlık oluşturacak olan katalogun ortaya çıkması tektonizmanın ve yerel sismik kaynakların etkilerinin araştırılmasında önemli bir rol oynar. Farklı sismik kaynak özelliklerine göre ayrılan bölgelerde alınan ve birbirini kesen profillerde yüksek *b-değeri* değişimi (Şekil 7 ve Şekil 8), düşük *b-değeri* bölgelerine kıyasla nispeten azdır. Bu durum tüm bölgenin kritik olarak yüksek stres altında olduğunu gösterir ve artçı deprem aktivitesi oluşma yoğunluğu daha fazla gevrek (brittle) yapının baskın olduğu zonları işaret ettiği şeklinde değerlendirilebilir. Mori ve Abercrobie (1997) Kaliforniya'da *b-değeri*ni derinliğe göre değişimini araştırmış ve artan deprem derinliği ile *b-değerinde* sistematik bir düşüş olduğunu tespit etmişlerdir. Gözlemleri açıklamak için, sık kabuktaki (0-6 km) kabul edilen uygun yükseklikteki malzeme heterojenitesi ve düşük litostatik gerilme nedeniyle kırılma girişimlerinin daha büyük depremlerden önce durması ve daha küçük depremler oluşturması olasıdır. Zhu vd. (2005) deprem



odak derinlikleri arttıkça *b-değerinde* de sistematik bir azalma olduğunu açıklamıştır. Sığ derinlikte ( $h < 8$  km) daha küçük depremler olduğunu gösterirken, daha derinlerde (8-25 km) daha büyük depremler meydana geldiğini göstermektedir. Ayvacık yarımadasında meydana gelen 6 Şubat 2017 tarihli  $M_w=5.3$  Yukarıköy-Avacık depreminin episantr bölgesinde *b-değerleri* 0.4 – 1.4 aralığında hesaplanmıştır (Şekil 9). Kesit boyunca *b-değerinin* derinliğe bağlı düşük ve yüksek değerlerde bir düzende davrandığı gözlenmektedir. Deprem üreten sismik kaynakların bu bölgede düşük *b-değerleri* ilk 10 km de tekdüze bir dağılıma sahipken, daha derinlerde yüksek *b-değerleri* baskındır. Özellikle 5-10 km derinliklerde bu iki farklı değişimin düzgün dağılımı dikkat çekicidir. Bu patern, üst kabukta ortalama 7 km sismojenik zonun yüksek diferansiyel strese sahip ve hala sismik olarak aktif olduğunu, bu derinliklerin altındaki orta kabuğun ise nispeten düşük gerilmeye ve yüksek kabuk heterojenitesine sahip olduğunu ve kısa zaman aralıklı oluşma davranışı gösteren artçı deprem aktivitesinin sık görülmesi nedeniyle enerjinin serbest bırakıldığını göstermektedir. Yerel ve bölgesel depremlerin çözümünde GB-KD doğrultusunda da derin odaklı depremlerin olmadığı buna karşın orta büyüklükteki depremlerin odak mekanizması çözümleri ortalama 10 km derinliklerde yoğunlaştığı görülmüştür.

Tektonik karmaşıklık yanında deprem kaynaklarının derinliği ile *b-değeri* arasında ters bir ilişki olduğunu [Wiemer ve Wyss \(2002\)](#) San-Andreas fayı için öne sürmüştür. Parkfield yakınlarında ve Hindu-Kush'taki deprem odaklarının uzaysal dağılımı ile *b-değerleri* incelendiğinde düşük *b-değerlerinin* daha derinlerde gözlemlendiği belirtilmektedir. Bu görüş, gerilmelerin derinlikle sınırlandırılmasındaki genel artıştan kaynaklandığı şeklinde yorumlanabilir. Tektonizma içinde farklı faylanma karakterlerine göre de *b-değeri* dağılımının sistematik olarak patern farklılıkları gösterdiği [Schorlemmer, Wiemer ve Wyss \(2005\)](#) tarafından ortaya atılmıştır. Normal faylanma bölgelerinin yüksek *b-değerlerine* sahip olduğu bulunurken, ters ve doğrultu atımlı faylanmaların sırasıyla orta ve düşük *b-değerleriyle* ilişkili olduğu görülmüştür. Bunun nedeni ters faylanma dinamiği için gereken yüksek gerilmelerdir. Tüm bu görüşlerin aksine Aden körfezi ve Batı Anadolu'daki hakim normal faylanma alanlarında gözlenen düşük *b-değerleri* veya ters faylanma ile ilişkili Zagros, kuzey Kafkasya ve Pamir-Hindu-Kush'taki yüksek *b-değerleri* yukarıda belirtilen ilk varsayım modelle tutarsızdır ([Schorlemmer, Wiemer ve Wyss, 2005](#)). Ayvacık ve Biga depremlerinin mekanizmaları oluş derinlikleri ve sismik kaynakların kinematik özellikleri ile *b-değerleri* karşılaştırıldığında bu görüş ile uyumlu bir durum olmadığı anlaşılmaktadır.

#### 4. Sonuçlar

Bu çalışma, başta 2017 Şubat ayında meydana gelen Ayvacık depremi sonrası, yerel ve bölgesel sismik ağ verisi ele alınarak depremlerin olasılıksal tehlike analizi ve ağırlıklı olarak *b-değeri* dağılımının tektonik anlamlandırılması üzerine yapılmıştır. Ayvacık-Biga yarımadası ve Edremit Körfezini içine alan bir kesimin inceleme alanına ait *b-değeri*, tektonik parametresinin ve *a/b* modal değerinin dağılım haritalarını incelediğimizde göreceli olarak *b-değerinin* düştüğü yerlerde, daha yüksek *a/b-değerleri* görülmektedir. Bu alanlar genel olarak kırılma bölgelerinin olduğu ve büyük depremlerin gözlemlendiği alanları işaret etmektedir. Ayvacık kuzeybatısında ve Çanakkale Ezine civarında düşük *a/b-değerleri* elde edilmiştir. Gerek Gumbel ve gerekse Poisson dağılımları kullanılarak büyüklüğü 7 ve üzeri büyük depremlerin oluşma olasılıkları ve tekrarlanma periyodları bu bölge ve bu bölgeyi de içine alan çalışmaları destekler niteliktedir. 100 yıl içinde 7 ve daha büyük bir depremin oluşma olasılığı %90 iken tekrarlanma periyodu ise ortalama 50 yıldır. Poisson dağılımı ile değerlendirmede %65 olma olasılığına karşılık tekrarlanma periyodu da 100 yıl hesaplanmıştır. Tektonizma ve sismisite uyumlu *a*, *b* ve *a/b değerlerinin* dağılımları incelendiğinde büyük depremler ve zayıflık zonları ile ilişkili bölgelerin ortaya çıktığı görülmektedir. Buna göre, Edremit Körfezi kuzeyi, Yenice arasında kalan KB-GD uzanımlı bir alan ve Saroz körfezi batısı yüksek deprem tehlikesi gösteren yerlerdir.

Düşük *b*-değerleri, sismik olarak geniş bir alanda Biga yarımadasının güneybatı, kuzeybatı ve kuzeydoğusunda ağırlıklı görüntülenmektedir. Bu durum bölgesel olarak magmatik ortamın etkisini kaybetmiş gerçeği ile ilişkilidir denebilir. Öte yandan *a*-değeri bölgesel yıllık veya toplam sismik aktiviteyi işaret etmektedir ve *b*-değeri kadar yorum yapılabilecek, fiziksel açıdan anlamı oldukça sınırlıdır. Dolayısı ile tektonik dönüşümün düşük *b*-değeri olarak yansımaya olacaktır. Aslında çok sayıda havzayı da barındıran Ayvacık ve kuzeydoğu kesiminde meydana gelen depremler, makaslamayı veya etkili gerilmeyi arttıran ve *b*-değerini azaltan normal faylanmaya karşılık gelir.

Diğer yandan özellikle mevcut çalışmada da olduğu gibi yerel ve nispeten daha küçük bölgesel faylanma alanlarında bu görüşler arasında bir uyum gözlenirken daha makro ölçekteki çalışmalarda veri niteliği ve çözüm kalitesine bağlı olarak uyumsuzluk olabilmektedir. Bunun bir nedeni olarak da bölgenin genel jeolojisi ele alındığında Kestanbol granitleri olarak bilinen ve daha sağlam bir litoloji gösteren birimler düşünülebilir. Deprem üreten fay sistemlerinin bulunduğu yerlerdeki jeotermal sahaların dağılımı ile *b*-değeri parametresi arasındaki uyum dikkat çekmektedir. Saroz-Ayvacık-Edremit doğrultusunda alansal olarak deprem verisi yoğunluğu dikkate alındığında *b*-değerlerinin gerilmelerle ters orantılı olarak deprem öncesi artışı ve akabinde de bu davranış azalımı 2014 ve 2017 depremleri ile kendisini göstermiştir.

### **Teşekkür**

Bu çalışmanın bir kısmı Çanakkale Onsekiz Mart Üniversite Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi FBA-2018-2814 ve FBA-2019-2923 no'lu projeler ve İçişleri Bakanlığı AFAD-Ç-09-19 kodlu proje tarafından desteklenmiştir.

### **Yazar Katkıları**

Ayşe Gezer: Veri değerlendirme ve sonuçların yorumlamasını yapmıştır.

Tolga Bekler: Deprem verisinin toplanması, değerlendirme sürecine hazır hale getirilmesi ve yorumlamaya katkı vermiştir.

### **Çıkar Çatışması**

Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

### **Kaynaklar**

- Abdikan, S., Imamoglu, M., Alasag, T., Toker, M., Kutoglu, S. H. ve Şahin, S. (2019). In-sar analysis of Ayvacık 2017 (Mw 5.3) earthquake swarm (Canakkale, Nw-Turkey). *International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences*, 42(2/W13). <https://doi.org/10.5194/isprs-archives-XLII-2-W13-1907-2019>
- Bağcı, G. (2000). Güney Marmara Bölgesinin Depremselliği. *Güney Marmara Depremleri Jeofizik Toplantısı*. Bursa, 22 Eylül 2000, 22-43.
- Bayrak, Y., Öztürk, S., Koravos, G. C., Leventakis, G. A. ve Tsapanos, T. M. (2008). Seismicity assessment for the different regions in and around Turkey based on instrumental data: Gumbel first asymptotic distribution and Gutenberg-Richter cumulative frequency law. *Natural Hazards and Earth System Sciences*, 8(1), 109-122. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00299490>
- Bridges, D. L. ve Gao, S. S. (2006). Spatial variation of seismic b-values beneath Makushin Volcano, Unalaska Island, Alaska. *Earth and Planetary Science Letters*, 245(1-2), 408-415. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2006.03.010>

- Cambaz, M. D., Turhan, F., Yılmaz, M., Kekovalı, K., Necmioğlu, Ö., ve Kalafat, D. (2019). An Investigation on the Evaluation of Regional Earthquake Tsunami Monitoring Center (RETMC) Seismic Network and Catalogue. *Yerbilimleri*, 40(1), 110-135. <https://doi.org/10.17824/yerbilimleri.500472>
- Görgün, E., Zang, A., Bohnhoff, M., Milkereit, C. ve Dresen, G. (2009). Analysis of Izmit aftershocks 25 days before the November 12th 1999 Düzce earthquake, Turkey. *Tectonophysics*, 474(3-4), 507-515. <https://doi.org/10.1016/j.tecto.2009.04.027>
- Gutenberg, B. ve Richter, C. F. (1944). Frequency of earthquakes in California. *Bulletin of the Seismological Society of America*, 34(4), 185-188. <https://authors.library.caltech.edu/47734/>
- Gutenberg, B. ve Richter, C. F. (1954). Seismicity of the Earth: Princeton. New Jersey, *Princeton University*.
- Gutenberg, B., ve Richter, C. F. (1954). Seismicity of the Earth, 310 pp. *Princeton University Press, Princeton, NJ*, 235, 1-15.
- Kalafat, D., Gürbüz, C. ve Üçer, S. B. (1987). Batı Türkiye’de kabuk ve üst manto yapısının araştırılması. *Deprem Araştırma Bülteni*, 59, 43-64.
- Kalafat, D. ve Görgün, E. (2019). Source characteristics and b-values of the Tuz Gölü Fault Zone in Central Anatolia, Turkey, *Journal of Asian Earth Sciences*, 179, 337-349. <https://doi.org/10.1016/j.jseaes.2019.05.005>
- Lei, X. (2003). How do asperities fracture? An experimental study of unbroken asperities. *Earth and Planetary Science Letters*, 213(3-4), 347-359. [https://doi.org/10.1016/S0012-821X\(03\)00328-5](https://doi.org/10.1016/S0012-821X(03)00328-5)
- McNally, K. C. ve James, D. E. (1989). Earthquakes and seismicity. *The Encyclopedia of Solid Earth Geophysics*, 308-315.
- Molchan, G. M., Kronrod, T. L. ve Nekrasova, A. K. (1999). Immediate foreshocks: time variation of the b-value. *Physics of the Earth and Planetary Interiors*, 111(3-4), 229-240. [https://doi.org/10.1016/S0031-9201\(98\)00163-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9201(98)00163-0)
- Monterroso, J. D. A. (2003). *Statistical Seismology Studies in Central America: b-value, seismic hazard and seismic quiescence* (Doctoral dissertation, Acta Universitatis Upsaliensis). <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:uu:diva-3613>
- Monterroso, D. A. ve Kulhánek, O. (2003). Spatial variations of b-values in the subduction zone of Central America. *Geofisica Internacional*, 42(4). <http://dx.doi.org/10.22201/igeof.00167169p.2003.42.4.312>
- Mori, J. ve Abercrombie, R. E. (1997). Depth dependence of earthquake frequency-magnitude distributions in California: Implications for rupture initiation. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 102(B7), 15081-15090. <https://doi.org/10.1029/97JB01356>
- Sammonds, P. R., Meredith, P. G. ve Main, I. G. (1992). Role of pore fluids in the generation of seismic precursors to shear fracture. *Nature*, 359(6392), 228-230. <https://doi.org/10.1038/359228a0>
- Sayıl, N. ve Osmanşahin, İ. (2005). Marmara Bölgesinin Depremselliğinin İncelenmesi. *Deprem Sempozyumu, 2005*, Kocaeli, Türkiye.
- Schorlemmer, D., Wiemer, S. ve Wyss, M. (2005). Variations in earthquake-size distribution across different stress regimes. *Nature* 437, 539–542. <https://doi.org/10.1038/nature04094>
- Singh, C. Ve Chadha, R. K. (2010). Variations in the frequency–magnitude distribution of earthquakes with depth in the Koyna–Warna region, India. *Journal of Asian Earth Sciences*, 39(4), 331-334. <https://doi.org/10.1016/j.jseaes.2010.03.014>



- Sözbilir, H., Uzel, B., Sümer, Ö., Eski, S., Softa, M., Tepe, Ç., Özkaymak, Ç. ve Baba, A. (2018). Çanakkale-Ayvacık Deprem Fırtınasının (14 Ocak-20 Mart 2017) Sismik Kaynakları. *Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi B- Teorik Bilimler*, 6, 1-17. <https://dergipark.org.tr/pub/estubtdb/issue/42755/516060>
- Udias, A. ve Mezcua, J. (1997). *Fundamentos De Geofisica*, Qe 501. Alianza Editorial, Madrid, 476s.
- Wiemer, S. (2001). A software package to analyze seismicity: ZMAP. *Seismological Research Letters*, 72(3), 373-382. <https://doi.org/10.1785/gssrl.72.3.373>
- Wiemer, S. ve Wyss, M. (2002). Mapping spatial variability of the frequency-magnitude distribution of earthquakes. *In Advances in Geophysics*, 45, 259-302. [https://doi.org/10.1016/S0065-2687\(02\)80007-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2687(02)80007-3)
- Wyss, M. (1973). Towards a physical understanding of the earthquake frequency distribution. *Geophysical Journal of the Royal Astronomical Society*, 31(4), 341-359. <https://doi.org/10.1111/j.1365-246X.1973.tb06506.x>
- Wyss, M., McNutt, S. R. ve Wyss, M. (1998). Temporal and three-dimensional spatial analyses of the frequency-magnitude distribution near Long Valley Caldera, California. *Geophysical Journal International*, 134(2), 409-421. <https://doi.org/10.1046/j.1365-246x.1998.00561.x>
- Wyss, M., Klein, F., Nagamine, K. ve Wiemer, S. (2001). Anomalously high b-values in the South Flank of Kilauea volcano, Hawaii: Evidence for the distribution of magma below Kilauea's East rift zone. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 106(1-2), 23-37. [https://doi.org/10.1016/S0377-0273\(00\)00263-8](https://doi.org/10.1016/S0377-0273(00)00263-8)
- Yılmazturk, A. ve Burton, P. W. (1999). An evaluation of seismic hazard parameters in southern Turkey. *Journal of Seismology*, 3(1), 61-81. <https://doi.org/10.1023/A:1009791320420>
- Zhu, A., Xu, X., Hu, P., Zhou, Y., Chen, G. ve Gan, W. (2005). Variation of b value with hypocentral depth in Beijing area: Implications for earthquake nucleation. *Chinese Science Bulletin*, 50(7), 691-695. <https://doi.org/10.1360/982004-43>



## Bazı İstant Gıdaların Üretiminde Kızılötesi Kurutmanın Etkisi

Barış Burak Albayrak<sup>1,\*</sup>, Necati Barış Tuncel<sup>2</sup>, Habib Kocabıyık<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Gıda İşleme Bölümü, Pazarlar Meslek Yüksekokulu, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Kütahya, Türkiye

<sup>2</sup>Gıda Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye

<sup>3</sup>Tarım Makinaları ve Teknolojileri Mühendisliği Bölümü, Ziraat Fakültesi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye

### Makale Tarihiçesi

Gönderim: 21.07.2020

Kabul: 17.09.2020

Yayın: 20.03.2021

### Araştırma Makalesi

**Öz** – Gıda endüstrisi ve tüketiciler sürekli yeniliğe ve daha kaliteli ürüne ihtiyaç duymaktadır. Yalnızca sıcak su ilavesi ile kolay bir şekilde tüketime hazır hale gelen instant gıdalar, zaman tasarrufu açısından son zamanlarda popülerlik kazanmıştır. İstant gıdalar, genellikle önce pişirilip daha sonra geleneksel kurutma yöntemi ile kurutulmuş olarak üretilmektedir. Bu çalışmada, geleneksel kurutma yöntemlerine alternatif olarak kızılötesi teknolojisi kullanılarak fasulye, bulgur, kahverengi ve beyaz pirinçten instant ürün üretilmesi ve fizikokimyasal özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, ürünler pişirilmiş ve farklı güçlerde (300, 400, 500 W) orta dalga kızılötesi yayıcı ile kurutulmuştur. Kurutulmuş ürünlerde kuruma süresi, su aktivitesi, hidroksimetilfurfural (HMF) miktarı, renk, tekstür ve rehidrasyon yeteneği ölçülerek kızılötesi kurutmanın ürünlere olan etkisi araştırılmıştır. Kızılötesi yayıcı gücünün artmasıyla kuruma sürelerinin beklenen şekilde azaldığı ve kuruma sonrası tüm örneklerin muhafaza açısından güvenli su aktivitelerine (0.29- 0.49) ulaştığı belirlenmiştir. Uygulanan işlemler sonucu kahverengi ve beyaz pirinçte HMF oluşumu görülmemekle birlikte bulgur ve fasulye örnekleri için HMF oluşumunda kuruma süresinin etkili olduğu saptanmıştır ( $p < 0.05$ ). Bununla birlikte yüksek rehidrasyon yetenekleri sergileyen örneklerin sertlik değerlerinin daha az olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, bulgur ve fasulye örneklerinin rehidrasyon yetenekleri kızılötesi yayıcı güçlerinden etkilenmemiştir ( $p > 0.05$ ). Sonuç olarak, piyasadaki instant gıda yelpazesine yeni ürünler eklemek ve instant gıda üretiminde kızılötesi kurutmanın kullanılabilme potansiyeli ortaya konmuştur.

**Anahtar Kelimeler** – hidroksimetilfurfural (HMF), instant, kızılötesi, rehidrasyon, tekstür

## The Effect of Infrared Drying in the Production of Some Instant Foods

<sup>1</sup>Department of Food Processing, Pazarlar Vocational School, Kütahya Dumlupınar University, Kütahya, Turkey

<sup>2</sup>Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey

<sup>3</sup>Department of Agricultural Machinery and Technologies Engineering, Faculty of Agriculture, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey

### Article History

Received: 21.07.2020

Accepted: 17.09.2020

Published: 20.03.2021

### Research Article

**Abstract** – The food industry and consumers need constant innovation and higher quality products. Instant foods, which are ready to consume only with addition of hot water, have recently gained popularity from the standpoint of time saving. Generally, instant foods are manufactured by cooking and drying with a conventional method, sequentially. In this study, it was aimed to produce instant products by using infrared technology, which is an alternative to conventional drying methods, from beans, bulgur, brown and white rice and to investigate physicochemical properties. For this purpose, the noted materials were cooked and dried with medium-wave infrared emitters at the power of 300, 400, and 500 W. The effect of infrared drying on drying time, water activity, hydroxymethylfurfural (HMF), color, texture and rehydration ability of the products were investigated. It was determined that drying time decreased with the increase of infrared power, as expected and the water activity of the products decreased to safe levels (0.29-0.49). Although HMF was not formed in brown and white rice, it was determined in bulgur and bean and drying time was effective in HMF levels found in bulgur and bean ( $p < 0.05$ ). Additionally, it was observed that hardness levels of samples which exhibited higher rehydration abilities were lower. Moreover, rehydration ability of bulgur and bean samples was not affected by the power of infrared emitter ( $p > 0.05$ ). In conclusion, the potential of adding new products to the instant food category in the market and using infrared drying in instant food production have been demonstrated.

**Keywords** – Hydroxymethylfurfural (HMF), instant, Infrared, rehydration, texture

<sup>1</sup> baris.albayrak@dpu.edu.tr

<sup>2</sup> baristuncel@comu.edu.tr

<sup>3</sup> kocabiyikh@comu.edu.tr

\*Sorumlu Yazar / Corresponding Author

## 1. Giriş

İnsanların varoluşundan bu yana gelişen ekipmanlar ve imkanlar doğrultusunda yemek alışkanlıkları değişmiş ve gelişmiştir ([Ramasamy, Kalaivanan ve Sukumar, 2005](#)). Ayrıca, günümüzde dünya nüfusunun artışı ve buna karşılık kaynakların sınırlı olmasıyla birlikte insanlar gıda tüketiminde zaman tasarrufuna da yönelmiştir. Bu nedenlerden dolayı, instant gıdalar dünya çapında popülerlik kazanmıştır. Örneğin, sadece sıcak su ilavesi ile tüketilebilir forma dönüşen instant gıdalar grubunda bulunan, erişte (noodle) ürünlerinin 2018 yılı verilerine göre, 42.2 milyar ABD Doları değerinde bir pazar payına sahip olduğu ve 2024 yılına kadar pazar payının 57.5 milyar ABD Dolarına ulaşacağı tahmin edilmektedir ([Research And Markets, 2019](#)). Bu talepler doğrultusunda instant ürün yelpazesine yeni gıdaların eklenebilmesi için Ar-Ge çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

İstant gıda üretimi kısaca; önce pişirme daha sonra uygun kurutma yöntemi ile kurutmaya dayanmaktadır ([Sripinyowanich ve Noomhorm, 2013](#)). İstant gıdanın kalitesi, ham maddeye ve kurutma koşullarına bağlıdır. Bununla birlikte kurutma işlemi, instant gıda hazırlanmasında en kritik adım olarak kabul edilmektedir ([Ramesh ve Rao, 1996](#)). Diğer yandan sadece sıcak suyla tüketilebilir forma gelen instant gıda için aranan en önemli parametre ise rehidrasyon yeteneğidir ve instant gıdaya sıcak suyun verilmesinin ardından pişmiş haline geri dönüşebilme oranını ifade etmektedir ([İsmail, 2017](#)).

Kurutma yöntemi ve koşullarına bağlı olarak değişen yapı (büzüşme, hücre yapılarının bozulması vb.) kurutulmuş ürünlerin rehidrasyon yeteneğini olumsuz etkilemektedir ([Cemeroğlu, Karadeniz ve Özkan, 2003](#)). Yapılan çalışmalarda, instant pirincin kurutulmasında farklı kurutma yöntemleri kullanılmıştır. Özellikle sıcak hava ile kurutma, gıdaları korumak için kullanılan eski bir prostestir ve instant pirinç endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır ([Ratti, 2001](#)). Ancak yukarıda bahsedilen dezavantajların yanı sıra kuruma süresi uzun ve enerji verimliliği düşüktür ([Mayor ve Sereno, 2004](#)). Bu kısıtlamalar, instant gıda üretiminde kızılötesi (IR) enerji ile kurutma gibi yeni teknolojilerin kullanım olanaklarının araştırılmasına yol açmıştır.

Kızılötesi (IR), ısı enerjisi elektromanyetik dalga olarak ileten ve elektromanyetik spektrumunda mikrodalga ile görünür ışık bölgelerinin arasında bulunan bir ışınım türüdür. Aynı zamanda güneşin ısıtma etkisinden de IR enerji büyük oranda sorumludur ([Jun vd., 2010](#)). IR yoluyla termal enerji, çevredeki havayı ısıtmadan direkt olarak ürüne aktarılmakta ve dolayısıyla daha hızlı bir ısı transferi sağlanmaktadır ([Das ve Das, 2010](#); [Nowak ve Lewicki, 2004](#)). [Mongpreneet, Abe ve Tsurusaki \(2002\)](#) ve [Chua ve Chuo \(2003\)](#), IR enerji ile kurutmanın geleneksel yöntemlere (sıcak hava ile kurutma) kıyasla; hızlı, basit, ekonomik ve yüksek kaliteli son ürün üretimi gibi pek çok avantaja sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte IR enerji diğer kullanım alanlarındaki tekniklere (kızartma, kavurma, ısıtma, çözdürme ve enzim inaktivasyonu) göre en çok kurutma tekniği olarak kullanılmaktadır ([Tuncel ve Tuncel 2016](#); [Krishnamurthy, 2008](#); [Nowak ve Lewicki, 2004](#)).

[Jiao, Xu ve Jin \(2014\)](#), mikrodalga enerjisini, geleneksel sıcak hava yöntemini ve kombinasyonlarını instant beyaz pirinç üretiminde, [Le ve Jittanit \(2015\)](#) ise instant kahverengi pirinç üretiminde kurutma aşamasında kullanmışlardır. Literatür incelendiğinde kuru fasulye ve bulgur kullanılarak yapılan instant gıda üretimine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla birlikte instant kahverengi ve beyaz pirinç hakkında bilimsel çalışmalar olsa da kurutmada IR enerjinin kullanıldığı bir çalışmaya ulaşılamamıştır.

Gıdalarda uygulanan ısı işlemler sonucu, insan sağlığına zararlı bir bileşik olarak kabul edilen ve Maillard reaksiyonunun bir ara ürünü olan 5-hidroksimetilfurfural (HMF)'in olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Aynı zamanda bu reaksiyon sonucu gıdalarda aminoasit ve şeker miktarlarında azalma meydana geldiğinden, HMF miktarının belirlenmesi bir kalite göstergesi olarak kabul edilmektedir ([Kayacan vd., 2020](#); [Güray vd., 2019](#)). Karbonhidrat ve protein bakımından zengin olan instant gıdalara, üretimi

esnasında uygulanan ısı işlemlerin HMF oluşumunu tetikleyebileceği düşünülmüştür. Bu nedenle ürünlerin HMF miktarlarının belirlenmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada, kuru fasulye, bulgur, kahverengi ve beyaz pirinç pilavından instant ürün üretiminde kızılötesi kurutma teknolojisinin kullanılma potansiyeli ve kurutmanın ürün kalitesine ve bazı özelliklere etkisi incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Materyal

Materyal olarak kullanılan kuru fasulye (Sıra), kahverengi pirinç (Osmancık), pilavlık bulgur ve pirinç (baldo) piyasadan temin edilmiştir.

### 2.2. Yöntem

#### 2.2.1. Hazırlık ve IR Kurutma İşlemi

Yalnızca kuru fasulye örneklerinde oda sıcaklığında (25 °C), 18 saat ön ıslatma işlemi uygulanmıştır. Ardından materyaller yıkanarak pişirme (haşlama) işlemine tabi tutulmuştur. Atmosfer basıncında uygulanan bu aşamada kuru fasulye, kahverengi pirinç, bulgur ve beyaz pirinç örneklerinde kaynatma işlemi sırasıyla 50, 45, 20 ve 8 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Pişmiş ürünlerde tanelerin birbirine yapışması sorununun giderilmesi ve pişme nemlerinin standardizasyonunu sağlamak amacıyla örnekler 25 °C su banyosunda 2 dakika bekletilmiştir. Bu işlemlerden sonra yüzey nemlerini uzaklaştırmak amacıyla örnekler süzümüştür. Hazırlık aşamasındaki süre parametreleri ön denemeler neticesinde belirlenmiştir.

Kurutma işlemi 70 x 40 x 50 cm boyutlarında paslanmaz çelik saçtan oluşan kurutma kabini içerisinde 1250 W gücündeki altın reflektörlü orta dalga kızılötesi (IR) yayıcı (Heraeus Noblelight, Hanau, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir. IR enerji kaynağı ile ürün yüzeyi arasındaki mesafe ve hava hızı tüm kurutma işlemlerinde sırasıyla 20 cm ve 1 m/s olacak şekilde sabit tutulmuştur. Ürünler 30 x 40 cm boyutlarındaki teflon kaplı tel örgü biçimindeki kurutma tepsi üzerine 15 x 30 cm'lik alana serilmiştir. Deneyler boyunca her bir ürün için 300 W, 400 W ve 500 W gücünde IR enerji ile kurutma işlemleri gerçekleştirilmiştir ([Kocabiyik vd., 2014](#)).

Kuruma sürelerini tespit etmek amacıyla kuruma eğrilerini izlemek için bilgisayar ile bağlantısı yapılmış  $\pm 0.01$  g hassasiyete sahip dijital terazi (Precisa XB 3200C, Zürih, İsviçre) kullanılmıştır. Bu işlem için Balint Interface yazılımının (Precisa Instruments AG, Zürih, İsviçre) yardımıyla 3 dakika aralıklarla örneklerin ağırlık (su) kayıpları kaydedilmiştir.

#### 2.2.2. Nem Tayini

Pişmiş ve kuru ürünlerin nem içeriği gravimetrik olarak AACC standartlarında (44-15A) yer alan yöntemle belirlenmiştir ([AACC, 2000](#)).

#### 2.2.3. Su Aktivitesi ( $a_w$ ) Analizi

Öğütülmüş 212 mikron elekte elek altına geçen örnekler numune kabına  $2.00 \pm 0.05$  g tartılarak Aqua Lab - 4 TE model su aktivitesi cihazında (Decagon Devices, Pullman, ABD) analize tabi tutulmuştur. Ölçüm sıcaklığı 25 °C olmak üzere su aktivitesi değerleri iki tekerrürlü olarak elde edilmiştir.

#### 2.2.4. Rehidrasyon Yeteneği

Rehidrasyon yeteneği analizi [Jiao vd. \(2014\)](#)'nin kullandıkları yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. IR enerji ile kurutulmuş ürünlerin rehidrasyon yeteneğini belirlemek için 5 ayrı behere  $4.0 \pm$

0.1 g numune tartılarak üzerine 85 °C sıcaklığında 40 mL saf su eklenmiştir. Ardından 85 °C su banyosunda rehidre edilen ürünler 3 dk aralıklarla alınarak süzülüp hassas terazide tartılmıştır. Böylelikle instant ürünlerin süreç boyunca bünyelerine aldıkları nem miktarı (kuru madde bazında) gravimetrik olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlarla birlikte, 3., 6., 9., 12. ve 15. dakikalardaki rehidrasyon yetenekleri (RY, %), kurutmadan önceki pişmiş ürünlerin ilk nem miktarları da dikkate alınarak, aşağıdaki denklem [2.1](#) ile hesaplanmıştır. Analiz iki tekerrürlü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

$$RY = \frac{Mr}{Mp} \times 100 \quad (2.1)$$

RY : Rehidrasyon yeteneği (%)

Mr : Rehidre edilen örneklerin nem içeriği (g / g KM)

Mp : Kurutmadan önceki pişmiş ürünlerin nem içeriği (g / g KM)

### 2.2.5. Renk Analizi

Piştirilmemiş kontrol örnekleri (k) ve IR enerji ile kurutulmuş ürünler (i) öğütüldükten sonra 212 mikron elekte elenmiş ve renk analizleri Minolta Cr-220 cihazı (Minolta Co., Osaka, Japonya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. CIE Lab renk uzayında ölçülen L (parlaklık), a (kırmızı-yeşil) ve b (sarı-mavi) değerlerinden yararlanılarak toplam renk değişimi ( $\Delta E$ ) aşağıdaki denklem [2.2](#) ile hesaplanmıştır. Numuneler 4 tekerrürlü olacak şekilde ölçülmüştür.

$$\Delta E = \sqrt{(L_i - L_k)^2 + (a_i - a_k)^2 + (b_i - b_k)^2} \quad (2.2)$$

### 2.2.6. Rehidrasyon Sonrası Tekstürel Analiz

İstant gıdaların rehidre edilerek tüketileceği göz önünde bulundurulduğunda, tekstürel analiz rehidrasyon sonrası yapılmasına karar verilmiştir. Bunun için duyuusal açıdan tüketilebilir forma gelebildiği ilk rehidrasyon süresinin temel alınması hedeflenmiştir. Çalışma süresince yapılan ön denemelerde elde edilen tekstür sonuçlarının yeterli tekrar edilebilirliği rehidrasyon uygulamasının 9. dakikasında belirlenmiştir. 15. dakikada örnekler dağılmış, 6. dakikadan kısa sürede de tüketilemez düzeyde sert ürün elde edilmiştir. Görsel açıdan incelendiğinde de 9 dakikalık rehidrasyon süresinin yeterli olduğu görülmektedir (bkz. Şekil [1](#)).



Şekil 1. 400 W IR yayıcı gücünde kurutulan örneklerin rehidrasyon öncesi ve sonrası durumları (9. dakika)



Tekstür profil analizi için IR yayıcı ile kurutulmuş ürünlerin her birinden beher içerisine 10 g örnek alınarak rehidrasyon yönteminde (bkz. Başlık [2.2.4.](#)) de belirtildiği gibi üzerine 85 °C sıcaklığında 40 mL saf su eklenmiştir. Ardından beherler 85 °C su banyosunda 9 dk boyunca rehidre edilmiştir. Rehidrasyonu tamamlanan ürünler Brookfield marka CT3-4500 model tekstür analiz cihazında (Massachusetts, ABD) analiz edilmiştir. Ottawa cell (TA-OC) tabla düzeneğinde, tekstür probu (TA3/100) kullanılarak, 50 g baskı ile Tekstür Profil Analizleri (TPA) gerçekleştirilmiştir. Sıkıştırma işlemi sonucunda ürünlerin, sertlik (g), dış yapışkanlık (mJ), elastikiyet, bağlılık, esneklik (mm), sakızlılık (g) ve çiğnenebilirlik (mJ) özellikleri tespit edilmiştir. Tekstür analizi iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

### 2.2.7. HMF Analizi

Hidroksimetilfurfural (HMF) analizi [Güray vd. \(2019\)](#) kullandıkları yöntem kısmen modifiye edilerek uygulanmıştır. Öğütülmüş ürünler santrifüj tüplerine 1 g (kuru ağırlık) tartılmış, üzerine 10 mL deiyonize su eklenerek 2 dk vorteks uygulanmış, sonrasında oda sıcaklığında çalkalayıcı yardımıyla 200 rpm’de 10 dk çalkalanmıştır. Ardından 5 dk 9000 rpm santrifüj uygulandıktan sonra kaba filtre kağıdından geçirilerek alüminyum folyo ile kaplanmış santrifüj tüplerine dökelti toplanmıştır. Santrifüj tüplerine 250 µL Carrez I ve 250 µL Carrez II eklenerek 2 dk vortex edilmiş ve tekrar 200 rpm’de 10 dk çalkalanmıştır. Ardından 5 °C’de 10 dk santrifüj (9000 rpm) uygulanmıştır. İşlem sonunda dökelti 45 µm filtreden geçirilerek amber renkli viallere alınarak HPLC’de analiz edilmiştir. Kromatografik analiz Agilent Zorbax C18 kolonu (250 x 4.6 mm 5 µm) kullanılarak isokratik akışta % 0.1’lik formik asitli su ve asetonitril (7:93) mobil fazında, akış hızı 1 mL / dk olacak şekilde ve 30 °C kolon sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon hacmi 20 µL olup ve 285 nm dalga boyunda 2 tekerrür ve 2 paralelli olacak şekilde uygulanan analiz işleminin sonuçları HMF kalibrasyon eğrisi yardımıyla “mg / 100 g (KM)” olarak hesaplanmıştır. Kullanılan kimyasallar Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD)’den temin edilmiştir.

### 2.2.8. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde MINITAB 17v (StatSoft Inc., Tulsa, OK., ABD) yazılımı kullanılmıştır. Kurutma işlemi koşullarının (IR yayıcı güçlerinin) bulgur, fasulye, kahverengi ve beyaz pirinç numuneleri için incelenen özelliklerine etkisi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile Tukey testine göre incelenmiştir (p< 0.05). Analiz sonuçları “ortalama ± standart hata” olarak ifade edilmiştir.

## 3. Bulgular ve Tartışma

İstant bulgur, fasulye, kahverengi ve beyaz pirinç örneklerinin üretimi esnasında uygulanan IR yayıcı güçleri, kuruma süreleri, son nem içerikleri, su aktivitesi değerleri ve HMF miktarları Tablo [1](#)’de verilmiştir.

Tablo 1

Farklı IR yayıcı güçlerinde üretilen instant ürünlerin bazı fizikokimyasal özellikleri

| İstant Ürün              | IR Gücü (W) | Kuruma Süresi (dk)       | Son Nem (%)               | $a_w$       | HMF (mg/100 g)             |
|--------------------------|-------------|--------------------------|---------------------------|-------------|----------------------------|
| <b>Bulgur</b>            | 300         | 102.0 ± 0.1 <sup>A</sup> | 7.09 ± 0.02 <sup>A</sup>  | 0.41 ± 0.01 | 0.107 ± 0.002 <sup>A</sup> |
|                          | 400         | 79.5 ± 1.5 <sup>B</sup>  | 7.38 ± 0.09 <sup>A</sup>  | 0.41 ± 0.01 | 0.050 ± 0.001 <sup>B</sup> |
|                          | 500         | 61.5 ± 1.5 <sup>C</sup>  | 6.32 ± 0.09 <sup>B</sup>  | 0.40 ± 0.01 | 0.048 ± 0.001 <sup>B</sup> |
|                          |             | $p=0.000$                | $p=0.005$                 |             | $p=0.000$                  |
| <b>Fasulye</b>           | 300         | 117.0 ± 6.0 <sup>A</sup> | 6.99 ± 0.26 <sup>A</sup>  | 0.42 ± 0.01 | 0.163 ± 0.004 <sup>B</sup> |
|                          | 400         | 97.5 ± 1.5 <sup>AB</sup> | 5.79 ± 0.01 <sup>B</sup>  | 0.37 ± 0.01 | 0.205 ± 0.003 <sup>A</sup> |
|                          | 500         | 84.0 ± 3.0 <sup>B</sup>  | 4.64 ± 0.07 <sup>C</sup>  | 0.33 ± 0.01 | 0.146 ± 0.001 <sup>B</sup> |
|                          |             | $p=0.022$                | $p=0.004$                 |             | $p=0.002$                  |
| <b>Kahverengi Pirinç</b> | 300         | 78.0 ± 0.1 <sup>A</sup>  | 8.00 ± 0.07 <sup>B</sup>  | 0.44 ± 0.01 | T.E.                       |
|                          | 400         | 70.5 ± 1.5 <sup>B</sup>  | 10.52 ± 0.09 <sup>A</sup> | 0.49 ± 0.01 | T.E.                       |
|                          | 500         | 61.5 ± 1.5 <sup>C</sup>  | 10.36 ± 0.07 <sup>A</sup> | 0.49 ± 0.01 | T.E.                       |
|                          |             | $p=0.006$                | $p=0.000$                 |             |                            |
| <b>Pirinç</b>            | 300         | 99.0 ± 0.1 <sup>A</sup>  | 7.82 ± 0.04 <sup>A</sup>  | 0.37 ± 0.01 | T.E.                       |
|                          | 400         | 91.5 ± 1.5 <sup>B</sup>  | 7.87 ± 0.02 <sup>A</sup>  | 0.38 ± 0.01 | T.E.                       |
|                          | 500         | 84.0 ± 0.1 <sup>C</sup>  | 5.80 ± 0.14 <sup>B</sup>  | 0.29 ± 0.01 | T.E.                       |
|                          |             | $p=0.003$                | $p=0.001$                 |             |                            |

<sup>A-C</sup> Her bir ürün satırı özelinde, aynı sütunda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır ( $p < 0.05$ ). (T.E.: tespit edilmedi)

Ürünlerin son nem içerikleri yaklaşık %7 – 8 olacak şekilde kurutma işlemi uygulanmıştır. Ancak kuruma sonrasında yapılan gravimetrik nem tayini sonuçlarında farklılıklar belirlenmiştir. Bulgur, fasulye, kahverengi pirinç ve pirinç için sırasıyla %6.32 – 7.38, %4.64 – 6.99, %8.00 – 10.52, %5.80 – 7.82 aralığındaki değişkenliğin sebebinin ortam koşullarının sıcaklık ve nem düzeyinin, işlem sonrasında nem kaybına/kazanımına neden olması gösterilebilir. Diğer yandan kurutma kabini altında bulunan terazi ile ağırlık kaybına bağlı rutubet değeri hesaplayan yazılımın verdiği değerler ile gravimetrik sonuçlar arasında farklılıklar olabilmektedir. Su aktivitesi ( $a_w$ ) değerleri ise genel olarak 0.29 – 0.49 aralığında belirlenmiş olup her bir ürün için ayrı ayrı incelendiğinde son nem içerikleri ile doğrusal bir ilişki bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Ayrıca,  $a_w < 0.60$  olan düşük nemli gıdalarda genel olarak mikrobiyel faaliyetlerin durduğu bilinmektedir (Erkmen ve Bozoglu, 2016). Nitekim instant ürünlerin muhafazası için kuruma sonrası güvenli  $a_w$  değerlerine ulaşıldığı söylenebilir.

IR yayıcı gücünün artmasıyla kuruma sürelerinin beklenen şekilde azaldığı, bu durumun istatistiksel sonuçlara yansıdığı tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). IR yayıcı gücünün artması ile  $\text{cm}^2$  başına düşen radyasyon yoğunluğunun artması kuruma sürelerinin kısılmasının ana sebebidir. Nitekim bu durum, bulgur ([Savas ve Basman, 2016](#)), instant çimlenmiş kahverengi pirinç ([Nachaisin, Jamradloedluk ve Niamnuay, 2016](#)), instant erişte (noodle) ([Basman ve Yalcin, 2011](#)) ve soya fasulyesi ([Wiriyampaiwong, Soponronnarit ve Prachayawarakorn, 2004](#)) gibi hububat ürünleri ile yapılan çalışmalarda rapor edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

İstant ürünler incelendiğinde bulgur ve fasulye örneklerinde HMF tespit edilmiş ancak kahverengi ve beyaz pirinçte belirlenememiştir. Pirinç grubundaki örneklerin tespit edilememesinin nedeni diğer örneklere göre protein ve indirgen şeker miktarının az olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. ([Rufian-Henares, Delgado-Andrade ve Morales, 2009](#)). Fasulye örneklerinde, uzun kuruma sürelerinde düşük IR gücünün, yüksek IR gücünde de kısa kuruma süresinin HMF oluşumuna olumsuz etkide bulunduğu söylenebilir ( $p < 0.05$ ). Ara değer olan 400 W IR gücünde yapılan kurutma işleminde ise HMF değerinin az da olsa yüksek çıkması, kuruma süresinin 500 W'a maruz kalmış örneğe göre biraz daha fazla olmasına aynı zamanda IR gücünün 300 W'a göre daha yüksek olmasına bağlanmıştır. Bulgur örneklerinde kuruma süresi dolayısıyla da IR enerjiye maruz kalma süresi arttıkça HMF miktarının arttığı belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Böylelikle bulgur örneklerinde HMF oluşumunda IR gücüne kıyasla kuruma süresinin daha çok etkili olduğu söylenebilir. Nitekim, [Kayacan vd. \(2020\)](#), hurmanın kurutulmasında farklı kurutma yöntemlerini karşılaştırdıkları bir çalışmada, ısıya maruz kalma süresinin HMF oluşumunun ana nedeni olabileceğini rapor etmişlerdir. Sonuç olarak 500 W IR gücünün kullanılması üründe hızlı kurumanın yanı sıra HMF oluşumunu da azaltması bir avantaj olarak düşünülebilir.

İstant ürünlerin CIE Lab renk uzayında ölçülen değerleri ve kuruma işlemi ile meydana gelen toplam renk değişimleri Tablo 2'de verilmiştir. Tüm instant ürünler için L, a ve b değerlerinin pişirilmemiş kontrol örneklerinden farklı olduğu istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Bu fark toplam renk değişimi ( $\Delta E$ ) olarak ifade edildiğinde IR güçleri arasında bulgur ve pirinç için farkın önemli olmadığı ( $p > 0.05$ ), fasulye ve kahverengi pirinç için ise farkın önemli olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ).

Tablo 2

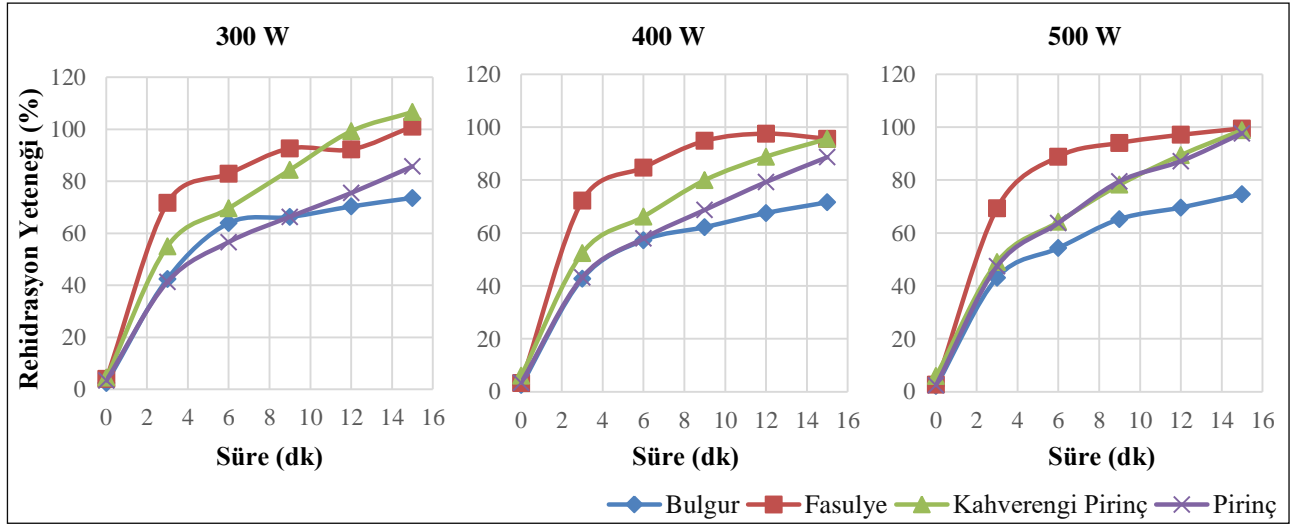
Farklı IR güçlerinde üretilen instant ürünlerin, CIE Lab renk uzayında ölçülen L (parlaklık), a (kırmızı-yeşil), b (sarı-mavi) ve  $\Delta E$  (toplam renk değişimi) değerleri

|                          | IR Gücü (W) | L                       | a                          | b                        | Toplam Renk Değişimi ( $\Delta E$ ) |
|--------------------------|-------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| <b>Bulgur</b>            | K           | 87.3 ± 0.2 <sup>A</sup> | -2.86 ± 0.04 <sup>B</sup>  | 25.2 ± 0.2 <sup>B</sup>  | -                                   |
|                          | 300         | 85.5 ± 0.1 <sup>B</sup> | -2.57 ± 0.02 <sup>A</sup>  | 27.2 ± 0.3 <sup>AB</sup> | 2.71 ± 0.21                         |
|                          | 400         | 86.1 ± 0.3 <sup>B</sup> | -3.03 ± 0.09 <sup>B</sup>  | 28.4 ± 0.9 <sup>A</sup>  | 3.45 ± 0.95                         |
|                          | 500         | 85.4 ± 0.3 <sup>B</sup> | -2.90 ± 1.08 <sup>B</sup>  | 28.4 ± 0.5 <sup>A</sup>  | 3.67 ± 0.57                         |
|                          |             | <i>p=0.000</i>          | <i>p=0.002</i>             | <i>p=0.005</i>           | <i>p=0.567</i>                      |
| <b>Fasulye</b>           | K           | 92.0 ± 0.1 <sup>A</sup> | -0.10 ± 0.04 <sup>A</sup>  | 10.0 ± 0.3 <sup>C</sup>  | -                                   |
|                          | 300         | 90.2 ± 0.1 <sup>C</sup> | -0.08 ± 0.02 <sup>A</sup>  | 13.2 ± 0.1 <sup>A</sup>  | 3.69 ± 0.08 <sup>A</sup>            |
|                          | 400         | 90.6 ± 0.1 <sup>B</sup> | -0.26 ± 0.02 <sup>B</sup>  | 12.7 ± 0.1 <sup>A</sup>  | 3.06 ± 0.04 <sup>B</sup>            |
|                          | 500         | 91.6 ± 0.1 <sup>A</sup> | -0.17 ± 0.02 <sup>AB</sup> | 11.5 ± 0.1 <sup>B</sup>  | 1.65 ± 0.12 <sup>C</sup>            |
|                          |             | <i>p=0.000</i>          | <i>p=0.003</i>             | <i>p=0.000</i>           | <i>p=0.000</i>                      |
| <b>Kahverengi Pirinç</b> | K           | 85.4 ± 0.3 <sup>C</sup> | -2.90 ± 0.08 <sup>B</sup>  | 28.4 ± 0.5 <sup>A</sup>  | -                                   |
|                          | 300         | 87.2 ± 0.1 <sup>B</sup> | -0.19 ± 0.11 <sup>A</sup>  | 13.1 ± 0.1 <sup>B</sup>  | 1.48 ± 0.11 <sup>A</sup>            |
|                          | 400         | 87.3 ± 0.3 <sup>B</sup> | -0.04 ± 0.01 <sup>A</sup>  | 13.2 ± 0.2 <sup>B</sup>  | 1.46 ± 0.15 <sup>A</sup>            |
|                          | 500         | 88.2 ± 0.1 <sup>A</sup> | -0.17 ± 0.03 <sup>A</sup>  | 12.5 ± 0.1 <sup>B</sup>  | 0.71 ± 0.05 <sup>B</sup>            |
|                          |             | <i>p=0.000</i>          | <i>p=0.000</i>             | <i>p=0.000</i>           | <i>p=0.001</i>                      |
| <b>Pirinç</b>            | K           | 94.1 ± 0.1 <sup>A</sup> | -0.43 ± 0.02 <sup>A</sup>  | 6.4 ± 0.1 <sup>C</sup>   | -                                   |
|                          | 300         | 92.6 ± 0.3 <sup>B</sup> | -1.29 ± 0.03 <sup>BC</sup> | 9.0 ± 0.2 <sup>AB</sup>  | 3.16 ± 0.3                          |
|                          | 400         | 92.4 ± 0.1 <sup>B</sup> | -1.21 ± 0.02 <sup>B</sup>  | 8.4 ± 0.2 <sup>B</sup>   | 2.77 ± 0.1                          |
|                          | 500         | 92.5 ± 0.2 <sup>B</sup> | -1.37 ± 0.01 <sup>C</sup>  | 9.5 ± 0.2 <sup>A</sup>   | 3.62 ± 0.3                          |
|                          |             | <i>p=0.000</i>          | <i>p=0.000</i>             | <i>p=0.000</i>           | <i>p=0.104</i>                      |

<sup>A-C</sup> Her bir ürün satırı özelinde, aynı sütunda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır ( $p < 0.05$ ).

Fasulye ve kahverengi pirinçte IR gücünün yüksek olduğu durumlarda renk değişiminin en az olduğu görülmekle beraber IR enerjiye maruz kalma süresinin toplam renk değişimi ( $\Delta E$ ) üzerine daha etkin olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde, [Le ve Jannit \(2015\)](#), mikrodalga ile kurutma yönteminde uzun kurutma süresi uygulandıkça numunelerde parlaklığın azaldığını ifade etmişlerdir. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, yapılan işlemin renk değerlerinde istatistiksel açıdan önemli değişikliklere neden olduğu, ancak bu değişimin pratikte önemli olmadığı sonucu ortaya çıkmıştır.

Şekil 2 incelendiğinde bulgur ve fasulye örneklerinin rehidrasyon yeteneklerinin farklı IR yayıcı güçlerinden etkilenmediği görülmektedir ( $p > 0.05$ ). Düşük IR yayıcı gücünde (300 W) kurutulan kahverengi pirinçlerin rehidrasyon yetenekleri (özellikle 12. dakikadan sonra), diğer IR yayıcı güçlerine kıyasla daha yüksek değerler kaydetmiştir ( $p < 0.05$ ). Buna karşın, pirinç örneklerinin en yüksek rehidrasyon yeteneği (özellikle 9. dakikadan sonra) yüksek IR yayıcı gücünde (500 W) tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ).



Şekil 2. Farklı IR yayıcı güçlerinde kurutulan örneklerin, sürelerle karşı rehidrasyon yetenekleri

İstant ürünlerin rehidrasyon sonrası tekstür sonuçları ve tekstür analizinin gerçekleştirildiği süredeki rehidrasyon yetenekleri Tablo 3'de sunulmuştur. Tekstür analizinde kullanılan rehidrasyon süresi (9. dk), materyal metot kısmında da değinildiği üzere, yapılan ön denemeler neticesinde belirlenmiştir. Yapılan tekstür profil analizi sonucunda pirinç örneklerinin işlem parametrelerinden istatistiksel olarak etkilenmediği görülmüştür ( $p > 0.05$ ). Bununla beraber yapışkanlık ve elastikiyet özellikleri IR yayıcı gücüne göre bir fark oluşturmamıştır ( $p > 0.05$ ). Esneklik özelliği için yalnızca bulgur örneklerinde, bağlılık özelliği için ise yalnızca fasulye örneklerinde IR yayıcı gücünün etkisi anlamlı bir fark yaratmıştır ( $p < 0.05$ ).



Tablo 3

Farklı güçlerde üretilen instant ürünlerin rehidrasyon sonrası tekstürel özellikleri ve aynı süredeki (9. dk) rehidrasyon yetenekleri

| IR         | Sertlik | Yapışkanlık                  | Elastikiyet | Bağlılık    | Esneklik                  | Sakızimsılık             | Çiğnenebilirlik            | 9. dk                    |                           |
|------------|---------|------------------------------|-------------|-------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Güçü (W)   | (g)     | (mJ)                         | (mm)        | (g)         | (mJ)                      | (g)                      | Rehidrasyon Yeteneği (%)   |                          |                           |
| Bulgur     | 300     | 876.0 ± 20.0 <sup>B</sup>    | 0.36 ± 0.02 | 0.24 ± 0.01 | 0.46 ± 0.01               | 3.57 ± 0.07 <sup>B</sup> | 402.0 ± 13.9 <sup>B</sup>  | 14.1 ± 0.7 <sup>B</sup>  | 66.26 ± 1.82              |
|            | 400     | 1043.3 ± 9.8 <sup>A</sup>    | 0.25 ± 0.02 | 0.25 ± 0.01 | 0.50 ± 0.03               | 3.68 ± 0.06 <sup>B</sup> | 516.1 ± 30.1 <sup>AB</sup> | 18.6 ± 1.4 <sup>AB</sup> | 62.19 ± 0.81              |
|            | 500     | 1075.0 ± 36.5 <sup>A</sup>   | 0.43 ± 0.15 | 0.27 ± 0.01 | 0.51 ± 0.01               | 4.28 ± 0.01 <sup>A</sup> | 543.7 ± 14.1 <sup>A</sup>  | 22.8 ± 0.6 <sup>A</sup>  | 65.25 ± 2.19              |
|            |         | p=0.020                      | p=0.426     | p=0.164     | p=0.186                   | p=0.004                  | p=0.033                    | p=0.018                  | p=0.347                   |
| Fasulye    | 300     | 2553.0 ± 52.0 <sup>A</sup>   | 0.25 ± 0.02 | 0.17 ± 0.01 | 0.58 ± 0.01 <sup>A</sup>  | 5.79 ± 0.05              | 1396.3 ± 83.4 <sup>A</sup> | 80.0 ± 4.8 <sup>A</sup>  | 92.67 ± 1.80              |
|            | 400     | 1706.0 ± 113.0 <sup>B</sup>  | 0.21 ± 0.06 | 0.16 ± 0.01 | 0.52 ± 0.01 <sup>B</sup>  | 5.48 ± 0.04              | 888.4 ± 62.3 <sup>B</sup>  | 47.8 ± 3.7 <sup>B</sup>  | 94.81 ± 1.79              |
|            | 500     | 1874.0 ± 187.0 <sup>AB</sup> | 0.44 ± 0.05 | 0.17 ± 0.01 | 0.53 ± 0.02 <sup>AB</sup> | 5.70 ± 0.10              | 981.5 ± 76.7 <sup>AB</sup> | 54.9 ± 5.2 <sup>AB</sup> | 94.02 ± 0.83              |
|            |         | p=0.037                      | p=0.061     | p=0.854     | p=0.041                   | p=0.094                  | p=0.033                    | p=0.031                  | p=0.652                   |
| Kahverengi | 300     | 648.0 ± 45.0 <sup>B</sup>    | 0.86 ± 0.17 | 0.15 ± 0.01 | 0.38 ± 0.01               | 2.87 ± 0.10              | 244.1 ± 10.6 <sup>B</sup>  | 6.9 ± 0.1 <sup>B</sup>   | 84.39 ± 0.87              |
| Pirinç     | 400     | 1180.0 ± 26.7 <sup>A</sup>   | 0.97 ± 0.19 | 0.17 ± 0.02 | 0.42 ± 0.02               | 3.01 ± 0.04              | 496.0 ± 30.7 <sup>A</sup>  | 14.7 ± 1.1 <sup>A</sup>  | 79.94 ± 2.42              |
|            | 500     | 1144.0 ± 21.5 <sup>A</sup>   | 0.53 ± 0.02 | 0.17 ± 0.02 | 0.42 ± 0.01               | 3.06 ± 0.05              | 477.6 ± 5.1 <sup>A</sup>   | 14.3 ± 0.4 <sup>A</sup>  | 78.22 ± 0.42              |
|            |         | p=0.002                      | p=0.225     | p=0.650     | p=0.212                   | p=0.273                  | p=0.004                    | p=0.006                  | p=0.125                   |
| Pirinç     | 300     | 536.8 ± 61.3                 | 0.75 ± 0.03 | 0.14 ± 0.02 | 0.33 ± 0.03               | 2.29 ± 0.19              | 174.4 ± 33.5               | 4.0 ± 1.1                | 66.36 ± 0.31 <sup>B</sup> |
|            | 400     | 517.5 ± 5.0                  | 1.01 ± 0.22 | 0.14 ± 0.01 | 0.34 ± 0.01               | 2.25 ± 0.06              | 172.1 ± 3.4                | 3.8 ± 0.2                | 68.71 ± 0.02 <sup>B</sup> |
|            | 500     | 442.5 ± 4.5                  | 0.79 ± 0.07 | 0.10 ± 0.01 | 0.26 ± 0.03               | 1.67 ± 0.18              | 113.6 ± 11.5               | 1.9 ± 0.4                | 79.51 ± 1.06 <sup>A</sup> |
|            |         | p=0.286                      | p=0.426     | p=0.070     | p=0.126                   | p=0.105                  | p=0.205                    | p=0.191                  | p=0.001                   |

<sup>A-C</sup> Her bir ürün satırı özelinde, aynı sütunda farklı büyük harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır (p < 0.05).

Bulgur örneklerinde farklı IR yayıcı güçleri için sertlik, esneklik, sakızimsılık ve çiğnenebilirlik özellikleri arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar görülmüştür ( $p < 0.05$ ). Bununla beraber IR enerjiye maruz kalma süresi arttıkça (veya IR yayıcı gücü azaldıkça) bu özelliklerin azalma eğiliminde olduğu belirlenmiştir.

Fasulye örneklerinde ise en yüksek sertlik, bağlılık, sakızimsılık ve çiğnenebilirlik özelliklerinin değerleri 300 W IR yayıcı gücünde görülmüştür ( $p < 0.05$ ). Kurutmanın yapıldığı 300 W IR yayıcı gücünde kahverengi pirinç örneklerinde ise sertlik, sakızimsılık ve çiğnenebilirlik özellikleri, 400 ve 500 W değerlere göre istatistiksel olarak farklı ve önemli derecede düşük olduğu belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Ayrıca tüm örneklerde sertlik değerlerinin yüksek olduğu koşullarda, çiğnenebilirlik değerlerinin de yüksek olduğu görülmüştür. Bulgulara uyumlu olarak, [Park, Kim ve Kim \(2001\)](#), enstrümantal tekstür analizlerinde çiğnenebilirlik ve sertlik arasında önemli derecede bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir.

Kepek tabakasına sahip kahverengi pirinçlerin düşük IR gücü ve uzun kuruma süresi ile rehidrasyon yeteneklerinin iyileştiği ve sertlik değerlerinin azaldığı; aksine kepek tabakasına sahip olmayan pirinç örneklerinin aynı eğilimi, yüksek IR gücü ve kısa kuruma süresi ile sergilediği görülmüştür (Tablo 3).

Yapılan çalışmalarda IR enerjiye maruz kalma sürelerinin artmasıyla tanelerde iç stresin artması sonucu endosperm çatlaklarının oluşumunun teşvik edildiği rapor edilmiştir ([Timm vd., 2020](#); [Wu, Zhang ve Li, 2017](#)). Bununla birlikte kahverengi pirinç örneklerinde IR yayıcı gücü ile rehidrasyon yeteneği ortalamaları arasında negatif bir ilişkinin olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda, IR enerjiye maruz kalma süresinin artmasıyla kahverengi pirincin sahip olduğu kepek tabakası ile beraber endosperm çatlaklarının artması, sıcak suyun taneye daha kolay nüfuz etmesini sağlamış olabilir ([Timm vd., 2020](#)). Böylelikle tanenin rehidrasyon yeteneğinin artması ile daha yumuşak bir yapı sergilediği düşünülebilir. Nitekim, tüm örneklerde en düşük sertlik değerleri karşılığında yüksek rehidrasyon yetenekleri görülmüştür (Tablo 3). Ayrıca kahverengi pirincin kepek tabakasının doğası gereği su bağlama yeteneğinin olması, pirinç örneklerine kıyasla bu durumu ayrıca teşvik etmiş olabilir ([Malekian vd., 2000](#)).

Pirinç örneklerinde ise IR yayıcı gücünün yüksek olduğu durumda sertlik değerinin nispeten azaldığı ve rehidrasyon yeteneğinin önemli ölçüde arttığı ( $p < 0.05$ ) saptanmıştır. Bu durumun, hızlı kuruma ile birlikte tane yapısındaki büzülmenin minimum düzeyde olmasıyla gözenekli yapı oluşturmasının bir sonucu olduğu düşünülmektedir ([Le ve Jittanit, 2015](#)). Benzer şekilde [Jiao vd. \(2014\)](#) instant pirincin kurutulmasında hava sıcaklığı ve mikrodalga güçlerinin artmasıyla rehidrasyon hızının arttığını bildirmişlerdir. Nitekim birçok araştırmacı, uzun kuruma süreleri ile birlikte numunenin rehidrasyon kapasitesi ve mikro yapısı üzerinde olumsuzluklara neden olduğunu rapor etmişlerdir ([Chen vd., 2014](#); [Vadivambal ve Javas, 2007](#)).

#### 4. Sonuçlar

İstant gıda üretimi önce pişirme daha sonra uygun kurutma tekniği ile kurutmaya dayanan bir prosestir. Bu çalışmada geleneksel kurutmaya alternatif, orta dalga IR yayıcı güçlerinin (300, 400, 500 W) bulgur, fasulye, kahverengi ve beyaz pirinç numuneleri için incelenen özelliklerine etkisi belirlenmiştir. IR yayıcı gücünün artmasıyla kuruma sürelerinin beklenen şekilde azaldığı ve kuruma sonrası tüm instant ürünlerin muhafaza açısından güvenli  $a_w$  değerlerine (0.29-0.49) ulaştığı belirlenmiştir. HMF sonuçları incelendiğinde kahverengi ve beyaz pirinçte tespit edilememiş ancak bulgur ve fasulye örneklerinde tespit edilmiştir. Bununla birlikte, bulgur ve fasulye örnekleri için HMF oluşumunda IR enerjiye maruz kalma süresinin etkin olduğu saptanmıştır. Ayrıca kurutma işleminin renk değerlerindeki değişimin pratikte önemli olmadığı sonucu ortaya çıkmıştır. İstant gıdaların önemli bir diğer özelliği, sıcak su ilavesi ile pişmiş haline geri dönüşebilme (rehidrasyon) yetenekleridir. Nitekim yüksek rehidrasyon yetenekleri sergileyen örneklerin sertlik değerlerinde azalma eğilimi görülmüştür. Bulgur ve fasulye örnekleri için IR yayıcı gücü rehidrasyon

yeteneklerini etkilemediğinden, HMF oluşumunu da minimuma indirmesinden dolayı hızlı kurutma (500 W) önerilmektedir. Kahverengi pirinçlerin uzun kuruma süresi ile rehidrasyon yeteneklerinin iyileştiği ve sertlik değerlerinin azaldığı; aksine beyaz pirinç örneklerinin aynı eğilimi kısa kuruma süresi ile sergilediği görülmüştür. Yavaş kurutmanın (300 W) kahverengi pirinç tanelerinin iç stresini artırarak kepek tabakası ile birlikte çatlaklara neden olması; kepek tabakasına sahip olmayan pirincin hızlı kurutmayla (500 W) tane yapısının büzülmesinin minimuma inmesi ve gözeneklerin oluşmasıyla rehidrasyon yeteneklerinin iyileştiği düşünülmektedir. Ek olarak, söz konusu mekanizmaların daha iyi açıklanabilmesi adına ileriki çalışmalarda tanenin mikro yapısının incelenmesi önerilmektedir.

## Teşekkür

Bu çalışma, henüz fikir ve prototip aşamasında iken 26-27 Nisan 2018 tarihlerinde Çanakkale’de düzenlenen “1. Proje Pazarı” etkinliğinde, alanında en iyi poster ödülüne layık görülmüş ve alınan ödül bilimsel çalışmanın hayata geçirilmesinde maddi-manevi önemli bir paya sahip olmuştur. Bu motivasyon fırsatını bizlere sunan Çanakkale Valiliği’ne, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi’ne ve “1. Proje Pazarı” etkinliğinin tüm paydaşlarına teşekkürlerimizi sunarız.

## Yazar Katkıları

Bariş Burak Albayrak: Veri toplamış, analizini yapmış ve makaleyi yazmıştır.

Necati Barış Tuncel: Analizi planlamış, tasarlamış ve makaleyi yazmıştır.

Habib Kocabıyık: İstatistiksel analizlerini tasarlamış, yapmış ve makaleyi yazmıştır.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## Kaynaklar

- AACC, American Association of Cereal Chemists, Approved Methods, 2000. No: 44-15a, 10th edition, St. Paul, MN, USA
- Basman, A. ve Yalcin, S. (2011). Quick-boiling noodle production by using infrared drying. *Journal of Food Engineering*, 106(3), 245-252. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.019>
- Cemeroğlu, B., Karadeniz, F. ve Özkan, M. (2003). Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. *Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları*, 28, s. 541, Ankara.
- Chen, X., Qian, P., Zhang, X., Liu, F. ve Lu, R. (2014). Improving instant rice quality by novel combined drying. *Drying Technology*, 32(12), 1448-1456. doi:<https://doi.org/10.1080/07373937.2014.900503>
- Chua, K. J. ve Chou, S. K. (2003). Low-cost drying methods for developing countries. *Trends in Food Science and Technology*, 14, 519-528. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.07.003>
- Das, I. ve Das, S. K. (2010). Emitters and infrared heating system design. In: Pan, Z. ve Atungulu, G. G. (Ed.). *Infrared Heating For Food And Agricultural Processing*. CRC Press, USA. 57-88.
- Erkmen, O. ve Bozoglu, T. F. (Ed.). (2016). *Food Microbiology: Principles into Practice: Vol. 2*. John Wiley & Sons, Somerset, NJ.
- Güray, T., Tuncel, N. Y., Tuncel, M. ve Uysal, U. (2019). Validated micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) method for determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey and comparison with HPLC. *Chemical Papers*, 73, 2209–2220. doi:<https://doi.org/10.1007/s11696-019->

[00770-5](#)

- İsmail, O. (2017). Güneş altında kurutulmuş havuç dilimlerinin rehidrasyon kinetiğinin incelenmesi. *Gazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 32(2), 0-0. doi:<https://doi.org/10.17341/gazimmfd.322157>
- Jiao, A., Xu, X. ve Jin, Z. (2014). Modelling of dehydration–rehydration of instant rice in combined microwave-hot air drying. *Food and Bioprocess Processing*, 92(3), 259-265. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.08.002>
- Jun, S., Krishnamurthy, K., Irudayaraj, J. ve Demirci, A. (2010). Fundamentals and theory of infrared radiation. In: Pan, Z. ve Atungulu, G. G. (Ed.). *Infrared Heating For Food and Agricultural Processing*. CRC Press, USA. 2 p.
- Kayacan, S., Karasu, S., Akman, P. K., Goktas, H., Doymaz, I. ve Sagdic, O. (2020). Effect of different drying methods on total bioactive compounds, phenolic profile, in vitro bioaccessibility of phenolic and HMF formation of persimmon. *LWT – Food Science and Technology*, 118, 108830. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108830>
- Kocabiyik, H., Yilmaz, N., Tuncel, N. B., Sümer, S. K. ve Büyükcan, M. B. (2014). The effects of middle infrared radiation intensity on the quality of dried tomato products. *International Journal of Food Science And Technology*, 49, 703-710. doi:<https://doi.org/10.1111/ijfs.12353>
- Krishnamurthy, K., Khurana, H. K., Jun, S., Irudayaraj, J. ve Demirci, A. (2008). Infrared heating in food processing: an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7, 2-13. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2007.00024.x>
- Le, T. Q. ve Jittanit, W. (2015). Optimization of operating process parameters for instant brown rice production with microwave-followed by convective hot air drying. *Journal of Stored Products Research*, 61, 1-8. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jspr.2015.01.004>
- Malekian, F., Rao, R. M., Prinyawiwatkul, W., Marshall, W. E., Windhauser, M. ve Ahmedna, M. (2000). Lipase and lipoxygenase activity, functionality, and nutrient losses in rice bran during storage. LSU AgCenter, Baton Rouge, LA 70803. 870, 9-10.
- Mayor, L. ve Sereno, A. M. (2004). Modelling shrinkage during convective drying of food materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 61(3), 373-386. doi:[https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00144-4](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00144-4)
- Mongpreneet, S., Abe, T. ve Tsurusaki, T. (2002). Accelerated drying of welsh onion by far infrared radiation under vacuum conditions. *Journal of Food Engineering*, 55, 147-156. doi:[https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00058-4](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00058-4)
- Nachaisin, M., Jamradloedluk, J. ve Niamnuy, C. (2016). Application of combined far-infrared radiation and air convection for drying of instant germinated brown rice. *Journal of Food Process Engineering*. 39(3), 306-318. doi:<https://doi.org/10.1111/jfpe.12226>
- Nowak, D. ve Lewicki, P. P. (2004). Infrared drying of apple slices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5(3), 353-360. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.03.003>
- Park, J. K., Kim, S. S. ve Kim, K. O. (2001). Effect of milling ratio on sensory properties of cooked rice and on physicochemical properties of milled and cooked rice. *Cereal Chemistry*, 78, 151-56. doi:<https://doi.org/10.1094/CCHEM.2001.78.2.151>
- Ramasamy, A. K., Kalaivanan, G. ve Sukumar, S. (2005). Consumer behaviour towards instant food products. *Indian Journal of Marketing*, 35(6), 24-25. Erişim Adresi:

<http://www.indianjournalofmarketing.com/index.php/ijom/article/view/34210>

- Ramesh, M. N. ve Rao, P. N. S. (1996). Drying studies of cooked rice in a vibrofluidized bed drier. *Journal of Food Engineering*, 27(4), 389-396. doi:[https://doi.org/10.1016/0260-8774\(95\)00018-6](https://doi.org/10.1016/0260-8774(95)00018-6)
- Ratti, C. (2001). Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *Journal of Food Engineering*, 49(4), 311-319. doi:[https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00228-4](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00228-4)
- Research And Markets, (2019). Erişim Tarihi: 13.02.2020, <https://www.researchandmarkets.com/reports/4763082/instant-noodles-market-global-industry-trends>
- Rufian-Henares, A. J., Delgado-Andrade, C. ve Morales, J. F. (2009). Assessing the maillard reaction development during the toasting process of common flours employed by the cereal products industry. *Food Chemistry*, 114(1), 93-99. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.021>
- Savas, K. ve Basman, A. (2016). Infrared drying: A promising technique for bulgur production. *Journal of Cereal Science*. 68, 31-37. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.11.001>
- Sripinyowanich, J. ve Noomhorm, A. (2013). Effects of freezing pretreatment, microwave-assisted vibrofluidized bed drying and drying temperature on instant rice production and quality. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37, 314-324. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2011.00651.x>
- Timm, N. S., Lang, G. H., Ferreira, C. D., Pohndorf, R. S. ve de Oliveira, M. (2020). Infrared radiation drying of parboiled rice: Influence of temperature and grain bed depth in quality aspects. *Journal of Food Process Engineering*. 43(4), 1-12. doi:<https://doi.org/10.1111/jfpe.13375>
- Tuncel, N. Y. ve Tuncel, N. B. (2016). Kızılötesi teknolojisi ve gıda işlemedeki kullanımı. *Akademik Gıda*, 14(2), 196-203. Erişim Adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/1186250>
- Vadivambal, R. ve Javas, D. S. (2007). Changes in quality of microwave-treated agricultural products—a review. *Biosystems Engineering*, 98(1), 1-16. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2007.06.006>
- Wiriyampaiwong, S., Soponronnarit, S. ve Prachayawarakorn S. (2004). Comparative study of heating processes for full-fat soybeans. *Journal of Food Engineering*, 65(3), 371-382. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.01.036>
- Wu, J., Zhang, H. ve Li, F. (2017). A study on drying models and internal stresses of the rice kernel during infrared drying. *Drying Technology*, 35(6), 680-688. doi:<https://doi.org/10.1080/07373937.2016.1201834>





## Fuzzy $\bar{X}$ and $S$ Control Charts Based on Confidence Intervals

Nilufer Pekin Alakoc<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Engineering and Technology, American University of the Middle East, Kuwait

### Article History

Received: 28.07.2020

Accepted: 09.01.2021

Published: 20.03.2021

### Research Article

**Abstract** – There have been changes since the companies have realized the important role of quality improvement in their success. If they are able to produce high quality products and satisfy demands, then they can survive in competitive global markets. Quality improvement applications aim to decrease variability, which leads to less cost, production time, number of defects, scrap, rework and more customer satisfaction. Quality can be improved by reducing product variability. On the other hand, uncertainty or subjectivity is a part of many engineering and real life problems. However, these problems cannot be solved by traditional methods. This study focuses on constructing  $\bar{X}$  and  $S$  control charts in fuzzy environment. The approach is developed by considering the theoretical structure of the Shewhart control charts. The core of the approach depends on the combination of parametric interval estimation and fuzzy statistics. Control limits and samples are presented by fuzzy numbers which ensures to maintain fuzziness in control charts. An important property of the approach is that the fuzzy charts can be reduced to Shewhart control charts. A simulation study was conducted for the performance evaluation of fuzzy  $\bar{X}$  and  $S$  control charts. The proposed fuzzy control chart is sensitive to process mean shifts and variance changes, and outperforms the traditional control charts under the changes of variance. In addition, an example from the literature shows that the approach is an effective way of presenting fuzziness in the quality characteristics, which enables the approach to have high applicability to the real life problems.

**Keywords** – Confidence intervals, fuzzy numbers, fuzzy set theory, fuzzy statistics, quality control charts,

### 1. Introduction

Quality improvement is a systemic approach aims to improve the performance of systems. It makes controllable and measurable changes that lead to better outcomes and can be applied to any area. Understanding and improving quality are the main factors for a company or organization to achieve its goals such as increasing profit, efficiency, market share, growth ...etc. Quality of production processes can be improved by the reducing the variability of products. Quality and variability are inversely proportional. Having low variability is the main way of reducing waste, production time and costs, and improving the performance and quality of processes.

Monitoring is the first step of quality improvement methods. In 1924 Walter A. Shewhart who is often considered the pioneer of statistical process control, developed quality control charts. Shewhart control charts are the most commonly referred statistical quality control tools used to monitor processes. These charts are graphical displays of quality characteristics that have been measured or observed over time. If sample values fall within the control limits which are two horizontal lines calculated by the sample data, with a random pattern, the process is said to be in control, otherwise the process is out of control and necessary actions should be taken.

<sup>1</sup>  [nilufer.alakoc@aum.edu.kw](mailto:nilufer.alakoc@aum.edu.kw)

\*Corresponding Author

These traditional control charts are based on random precise data of the quality characteristics. However, uncertainty is the nature of the real life problems, systems, and ignored by the traditional control charts. Sources of uncertainty arise from lack of precise information, such as not fully reliable information due to measurement error, incomplete data, instrument noise or environmental factors. These sources can occur at any point of data collection. For example, a measurement of 0.01 might necessitate a greater precision such as 0.01008. Lack of calibration of measuring instruments or calibration which is not suitable for the production environment might cause inaccurate measurements. Classification of products such as defective non-defective, conforming non-conforming might not be appropriate in some situations. Intermediate states might be required. Judgement of human inspectors might be another reason for uncertainty: a defective product might be non-defective for another person.

Since fuzzy set theory was introduced by Zadeh in 1965 it has been integrated with statistical process control to handle uncertainty in data or human subjectivity. Combination of fuzzy theory and statistical quality control has been studied by many researchers. Various different approaches, methods and applications have been proposed. These studies have been developed from many different points of view but the main objective is same: dealing with uncertainty and fuzziness in process control.

The previous studies were mainly developed on linguistic data. Raz & Wang (1990), Wang & Raz (1990), Kanagawa Tamaki & Ohta (1993) and Gulbay, Kahraman & Ruan (2004) proposed approaches for monitoring attribute data which are in linguistic forms. Chen & Yeh (2004) developed a two stages fuzzy approach for variable sampling interval. In another study, Cheng (2005) developed fuzzy control charts for attributes and generated the fuzzy data by combining the experts' opinion and measurements. Gulbay & Kahraman (2007) introduced direct fuzzy approach (DFA) for c control chart and compared with the previous approaches using defuzzification methods. Hsieh, Tong & Wang, (2007) proposed a fuzzy control chart which is based on engineering experiences and fuzzy theory. A fuzzy approach for constructing attributes control chart in multistage process was presented by Engin, Elik & Kaya (2008). The approach is based on acceptance sampling and solved by genetic algorithms. Amirzadeh, Mashinchi & Parchami (2009) proposed an approach for attributes. Although the approach was proposed for constructing fuzzy p control charts; as data represents the degree of nonconformity of items, the technique of the fuzzy chart is similar to traditional  $\bar{x}$  and s control charts. Shu & Wu (2010) emphasized the critical role of fuzzy data in measurements of quality characteristics and they proposed a fuzzy p chart with permissibly function. Beside these, Wang, Li & Yasuda (2014) introduced fuzzy c chart monitored with weighted possibilistic mean and weighted interval valued possibilistic mean of fuzzy numbers. Thaga & Sivasamy (2015) developed transition probability approach based on markov chain theory for linguistic data. Senturk & Antucheviciene (2017) proposed an interval type-2 fuzzy c-control chart with an application to a food company. Recently, Aslam, Bantan & Khan (2020) developed a neutrosophic NEWNA np chart.

Applications of fuzzy set theory have been investigated in the field of fuzzy variable control charts by many other authors. The former study on monitoring variable control charts for uncertain observations was developed by Fazel Zarandi, Turksen & Kashanet, (2006). They proposed plotting control charts by considering uncertain process parameters for both variables and attributes. Another fuzzy chart approach for variables includes a warning line besides its upper control limit (Faraz & Moghadam, 2007). The shifts between the subgroups of the fuzzy control chart for variables are designed with Pearson goodness of fit statistic. Use of  $\alpha$  - cut midrange transformation technique for fuzzy  $\bar{X}$ , R and S control charts are proposed by Senturk & Erginel (2009).

Faraz & Shapiro (2010) developed an approach for fuzzy  $\bar{X}$  and S charts by considering the assumptions of the Shewhart control charts. The approach is based on a fuzzy region and a graded exclusion measure which defines the degree of a sample out of the in-control region by the percentage area of under fuzzy sets. Shu &

Wu (2011) proposed dominance approach for constructing fuzzy  $\bar{X}$  and R control charts. Dominance results of the resolution identity are used to calculate the control limits of the fuzzy chart. Studies have been carried out in the field of fuzzy control charts in which transformation methods are not used. A Fuzzy mean and range control charts are proposed by Mojtaba Zabihinpour, Ariffin, Tang & Azfanizam, (2014). Observations and control limits are in the form of triangular fuzzy numbers and the processes are defined by percentage of area of the sample mean which remains outside the control limits. They extended their study for a fuzzy  $\bar{X}$  and S charts (Mojtaba Zabihinpour, Arif, Tang & Azfanizam, 2015). Another variable control chart is proposed for non-crisp data by Panthong & Pongpullponsak, (2016). Shu, Dang, Nguyen, Hsu & Phan (2017) proposed fuzzy control limits based on results of the resolution identity in fuzzy set theory. Soleymani & Amiri, (2017) proposed a fuzzy cause selecting control chart to monitor the second stage of a two-stage process where the quality characteristic of the second stage belongs to fuzzy sets in Phase I analysis. Ercan Teksen & Anagun, (2018) considered interval type-2 fuzzy sets based on different methods for  $\bar{X}$ -R control charts. Recently, Mendes, Machado & Rizol, (2019) compared fuzzy control charts and traditional control charts and presented that fuzzy control chart has greater efficiency than the traditional control charts. Al-Refaie, Obaidat, Fouad & Hanayneh, (2019) proposed fuzzy variables control charts under linguistic data and development process capability analysis.

Many other researchers have contributed to fuzzy process control works from different point of view including skewed data in fuzzy control charts (Atta, Shoraim, Yahaya, Zain & Ali, 2016; Yimnak & Intaramo, 2020), nonparametric fuzzy charts (Momeni & Shokri, 2019; Wang & Hryniewicz, 2015), flexible control charts (Pekin Alakoc & Apaydin, 2018), economic design of individual control chart (Wang & Chen, 1995; Chen, Chang & Chiu, 2008), fuzzy inference control system (Saricicek & Cimen, 2011), charts for auto correlated fuzzy observations (Sadeghpour Gildeh & Shafiee, 2015), performance of FEV theory control charts with  $\alpha$  – cut level fuzzy midrange method for three skewed distributions (Intaramo, 2012), nonrandom patterns of fuzzy control charts and fuzzy run rules (Hsu & Chen, 2001; Tannock, 2003; Gulbay & Kahraman, 2006; Chih & Kuo, 2007; Fazel Zarandi, Alaeddini & Turksen 2008; Demirli & Vijayakumar, 2010; Pekin Alakoc & Apaydin, 2013), detecting mean and variance shifts of a process (Chang & Aw, 1996; Moameni, Saghaei, & Ghorbani Salnghooch, 2012; Salnghooch, 2015; Kaya, Erdogan & Yildiz, 2017), fuzzy multivariate control charts (Taleb Limam & Hirota, 2006; Moheb Alizadeh, Arshadi Khamseh & Fatemi Ghomi, 2010; Pastuizaca Fernandez, Carrion Garcia, A. & Ruiz Barzola, 2015), multi objective design of control charts (Morabi, Owlia, Bashiri & Doroudyan, 2015), fuzzy CUSUM and EWMA control charts (Senturk, Erginel, Kaya, & Kahraman, 2014; Akhundjanov & Pascual, 2015).

Although there are many studies in literature, only a few of them focused on using fuzzy statistics. Fuzzy statistical theory is based on both probability theory and fuzzy set theory. The major contribution of this study is to use fuzzy statistical theory to express uncertain data in quality control charts. Therefore, fuzzy control chart values are thoroughly determined in accordance with the uncertain measurements and the probability theory. The main difficulty of designing a fuzzy control chart is to develop appropriate fuzzy control limits and to present uncertain data. The selection of the limits may lead to different judgments on the process state. In order to overcome this issue, in some existing works it is suggested to use transformation methods, but it is known that these methods cause loss of information. On the other hand, using crisp values directly causes a strict classification and may lead to a wrong decision. In this study, we propose an approach for constructing fuzzy  $\bar{X}$  and S control charts, based on confidence interval estimation and fuzzy sets. We conduct a computational simulation study and compare the proposed fuzzy control charts with Shewhart control charts for various mean and variance shifts. The average run length statistics present that the fuzzy control chart is more sensitive to variance shifts than the Shewhart control chart.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Statistical Background

Let  $X_1, X_2, \dots, X_n$  be a random sample with probability density function  $N(\mu, \sigma^2)$  and mean and standard deviation of the sample are crisp numbers. If all of the  $100(1-\alpha)\%$  confidence intervals on  $\mu$  for different significance levels are placed, one on top of the other, then a triangular shaped fuzzy number is produced as fuzzy estimator of  $\mu$  (Buckley, 2006). For this estimator, the confidence limits are continuous nonlinear functions of the significance level and a  $100(1-\alpha)\%$  confidence interval equals to  $\alpha$  - cut set of a fuzzy number denoted by  $\tilde{\mu} = [\mu_1(\alpha), \mu_2(\alpha)]$  where  $\tilde{\mu}$  is a crisp set of elements whose membership degrees are greater than or equal to the specified value of  $\alpha$ . An example triangular fuzzy estimator when  $0.001 \leq \alpha \leq 1$  is displayed in Figure 1 where 0.001 is an arbitrary value.

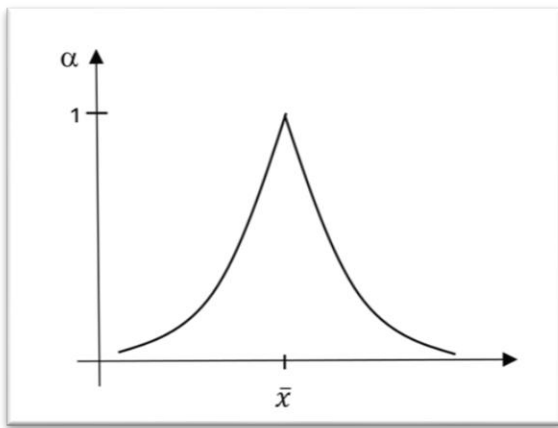


Figure 1. An example: Fuzzy estimator of  $\mu$

The concept of confidence interval estimation on a single parameter can be extended to several parameters. Let  $X_1, X_2, \dots, X_n$  be a random sample from a normal distribution with mean  $\mu$  and variance  $\sigma^2$ , then simultaneous confidence region for the mean and the variance is estimated by a parameter space, which includes all possible combinations of the parameters. A joint confidence region for the mean and variance of a normal distribution is formed by the independence property of  $\bar{x}$  and  $s^2$ . Since,  $\frac{\bar{x}-\mu}{\sigma/\sqrt{n}}$  and  $\frac{(n-1)s^2}{\sigma^2}$  are each pivotal quantities, we may find numbers  $q_1, q'_2$  and  $q''_2$  such that 2.1 and 2.2.

$$P\left(-q_1 \leq \frac{\bar{x}-\mu}{\sigma/\sqrt{n}} \leq q_1\right) = 1 - \gamma_1 \tag{2.1}$$

$$P\left(q'_2 \leq \frac{(n-1)s^2}{\sigma^2} \leq q''_2\right) = 1 - \gamma_2 \tag{2.2}$$

Also since,  $\frac{\bar{x}-\mu}{\sigma/\sqrt{n}}$  and  $\frac{(n-1)s^2}{\sigma^2}$  are independent (Mood, Graybill & Boes 2001) we have joint probability which given in 2.3:

$$P\left(-q_1 \leq \frac{\bar{x}-\mu}{\sigma/\sqrt{n}} \leq q_1; q'_2 \leq \frac{(n-1)s^2}{\sigma^2} \leq q''_2\right) = (1 - \gamma_1)(1 - \gamma_2) \tag{2.3}$$

where  $100(1-\gamma_1)\%$  and  $100(1-\gamma_2)\%$  are confidence levels. The inequalities in 2.3 present a region in the parameter space, which can be drawn by plotting its boundaries where the  $x$  axis and  $y$  axis are  $\mu$  and  $\sigma^2$ , respectively. Figure 2 presents simultaneous confidence region of mean and variance (Mood, Graybill & Boes 2001).

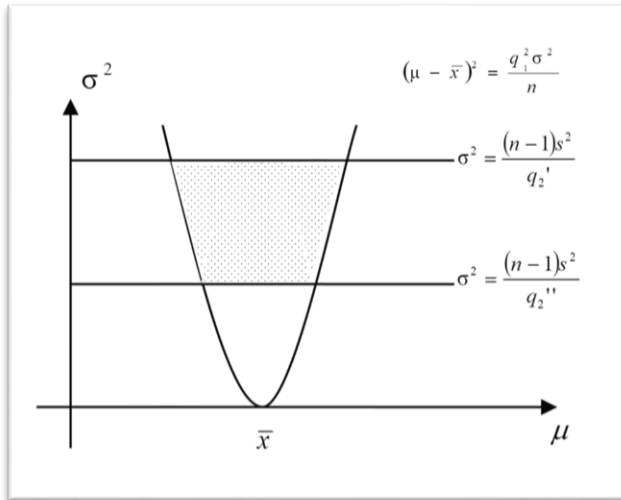


Figure 2. Simultaneous confidence region of  $\mu$  and  $\sigma^2$

### 2.2. Design of Fuzzy $\bar{X}$ Control Chart

Let  $m$  samples with size  $n$  are selected (randomly) from a normal distribution with mean  $\mu$  and variance  $\sigma^2$ , then;  $i^{\text{th}}$  sample mean is estimated by fuzzy estimation method. Based on fuzzy estimation method,  $100(1-\alpha)\%$  confidence intervals on the mean of each sample can be calculated for all significance levels. Then, the fuzzy estimate of each sample's mean is a triangular fuzzy number whose  $\alpha$  - cut is defined by 2.4.

$$[\bar{x}_i^l[\alpha], \bar{x}_i^u[\alpha]] = \left[ \bar{x}_i - t_{\alpha/2, n-1} \frac{S_i}{\sqrt{n}}, \bar{x}_i + t_{\alpha/2, n-1} \frac{S_i}{\sqrt{n}} \right] \tag{2.4}$$

where  $\bar{x}_i^l[\alpha]$  and  $\bar{x}_i^u[\alpha]$  are the lower and the upper limits of  $100(1-\alpha)\%$  interval.

Triangular fuzzy control limits are based on the confidence interval estimations on  $\mu + 3 \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$  and  $\mu - 3 \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$  which are obtained by modifying the simultaneous confidence region of mean and variance approach. In order to have a simultaneous confidence region for  $\mu$  and variance  $\sigma$ , the parabola given in Figure 2 is replaced by the straight lines  $\mu = \bar{x} + q_1 \frac{\sigma}{\sqrt{nm}}$  and  $\mu = \bar{x} - q_1 \frac{\sigma}{\sqrt{nm}}$  which intersect with the horizontal lines  $\sigma = \sqrt{\frac{(n-1)\sum s_i^2}{q_2'}}$  and  $\sigma = \sqrt{\frac{(n-1)\sum s_i^2}{q_2''}}$ . Figure 3 shows the simultaneous confidence region which is confined by these lines.



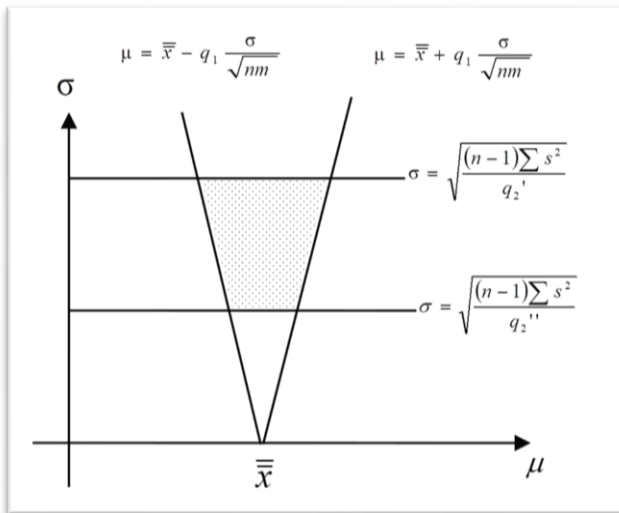


Figure 3. Simultaneous confidence region of  $\mu$  and  $\sigma$

Derivation of confidence intervals for the limits is an optimization problem in which the simultaneous confidence region is the feasible region. The lower and upper bound values of the confidence interval on the upper fuzzy control limit are obtained by minimizing and maximizing  $\mu + 3\frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ , respectively. Confidence interval estimation on the lower control limit is derived by a similar calculation; minimizing and maximizing  $\mu - 3\frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ . The corner points of the confidence region are the optimum points, which give the required confidence limits. A  $100(1-\gamma_1)(1-\gamma_2)\%$  confidence interval estimators of the upper and lower limits are defined in 2.5 and 2.6:

$$\bar{x} + \sqrt{\frac{(n-1)\sum s_i^2}{n\chi_{\gamma_2/2, m(n-1)}^2}} \left(3 - \frac{z_{\gamma_1/2}}{\sqrt{m}}\right) < \mu + 3\frac{\sigma}{\sqrt{n}} < \bar{x} + \sqrt{\frac{(n-1)\sum s_i^2}{n\chi_{1-\gamma_2/2, m(n-1)}^2}} \left(\frac{z_{\gamma_1/2}}{\sqrt{m}} + 3\right) \tag{2.5}$$

$$\bar{x} - \sqrt{\frac{(n-1)\sum s_i^2}{n\chi_{1-\gamma_2/2, m(n-1)}^2}} \left(\frac{z_{\gamma_1/2}}{\sqrt{m}} + 3\right) < \mu - 3\frac{\sigma}{\sqrt{n}} < \bar{x} - \sqrt{\frac{(n-1)\sum s_i^2}{n\chi_{\gamma_2/2, m(n-1)}^2}} \left(3 - \frac{z_{\gamma_1/2}}{\sqrt{m}}\right) \tag{2.6}$$

where  $\bar{x}$  is the mean of  $m$  sample means,  $z_{\gamma_1/2}$  is the upper  $100(\gamma_1/2)\%$  point of the standard normal distribution and  $\chi_{1-\gamma_2/2, m(n-1)}^2$  and  $\chi_{\gamma_2/2, m(n-1)}^2$  are the lower and upper  $100(\gamma_2/2)\%$  points of the chi-square distribution with  $m(n-1)$  degrees of freedom, respectively.

Similarly, we estimate the process mean by the same approach. 2.7 gives a  $100(1-\alpha)\%$  confidence interval on the mean, which is used to define fuzzy centre number of the fuzzy  $\bar{X}$  control chart.

$$\bar{x} - z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{\sum s_i^2}{n m^2}} < \mu < \bar{x} + z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{\sum s_i^2}{n m^2}} \tag{2.7}$$

Consequently, we use the confidence intervals given in 2.5, 2.6 and 2.7 to plot fuzzy  $\bar{X}$  control chart. We define the three sigma  $\alpha$  - cut of control limits and center number by 2.8, 2.9 and 2.10:

$$[\widetilde{UCL}_x^l[\alpha], \widetilde{UCL}_x^u[\alpha]] = \left[ \bar{x} + \sqrt{\frac{(n-1) \sum s_i^2}{n \chi_{\gamma_2/2, m(n-1)}^2}} \left( 3 - \frac{z_{\gamma_1/2}}{\sqrt{m}} \right), \bar{x} + \sqrt{\frac{(n-1) \sum s_i^2}{n \chi_{1-\gamma_2/2, m(n-1)}^2}} \left( \frac{z_{\gamma_1/2}}{\sqrt{m}} + 3 \right) \right] \tag{2.8}$$

$$[\widetilde{CL}_x^l[\alpha], \widetilde{CL}_x^u[\alpha]] = \left[ \bar{x} - z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{\sum s_i^2}{n m^2}}, \bar{x} + z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{\sum s_i^2}{n m^2}} \right] \tag{2.9}$$

$$[\widetilde{LCL}_x^l[\alpha], \widetilde{LCL}_x^u[\alpha]] = \left[ \bar{x} - \sqrt{\frac{(n-1) \sum s_i^2}{n \chi_{1-\gamma_2/2, m(n-1)}^2}} \left( \frac{z_{\gamma_1/2}}{\sqrt{m}} + 3 \right), \bar{x} - \sqrt{\frac{(n-1) \sum s_i^2}{n \chi_{\gamma_2/2, m(n-1)}^2}} \left( 3 - \frac{z_{\gamma_1/2}}{\sqrt{m}} \right) \right] \tag{2.10}$$

where  $\alpha = 1 - (1 - \gamma_1)(1 - \gamma_2)$ .

$\alpha$  - cut triangular fuzzy numbers are used to graph the fuzzy chart. If  $\widetilde{UCL}_x^u[\alpha] \leq \bar{x}_i^l[\alpha]$  or  $\bar{x}_i^u[\alpha] \leq \widetilde{LCL}_x^l[\alpha]$ , then  $\alpha$  - cut of the  $i^{\text{th}}$  fuzzy number is beyond the control limits and the process is out of control. Similarly, if  $\bar{x}_i^u[\alpha] \leq \widetilde{UCL}_x^l[\alpha]$  and  $\widetilde{LCL}_x^u[\alpha] \leq \bar{x}_i^l[\alpha]$ , then the  $\alpha$  - cut of the  $i^{\text{th}}$  fuzzy number is completely between the fuzzy limits. Otherwise, the fuzzy number intersects with fuzzy limits, that is  $\widetilde{UCL}_x^l[\alpha] < \bar{x}_i^u[\alpha] \leq \widetilde{UCL}_x^u[\alpha]$  or  $\widetilde{UCL}_x^l[\alpha] < \bar{x}_i^l[\alpha] \leq \widetilde{UCL}_x^u[\alpha]$  or  $\widetilde{LCL}_x^l[\alpha] \leq \bar{x}_i^u[\alpha] < \widetilde{LCL}_x^u[\alpha]$  or  $\widetilde{LCL}_x^l[\alpha] \leq \bar{x}_i^l[\alpha] < \widetilde{LCL}_x^u[\alpha]$ , and the state of the process is not as certain. In this study, the proposed approach defines the process by a decision function, which is developed by considering all possible situations of fuzzy control limits and fuzzy numbers. The process is defined as in control as long as the fuzzy numbers fall within the fuzzy limits under some specified conditions. 2.11 gives the decision criterion.

$$\text{Process} = \begin{cases} \text{in control,} & \text{if } f_{i_{\bar{x},1}}[\alpha] f_{i_{\bar{x},2}}[\alpha] \geq 0 \\ \text{out of control,} & \text{otherwise} \end{cases} \tag{2.11}$$

where  $f_{i_{\bar{x},1}}[\alpha] = \widetilde{UCL}_x^u[\alpha] - \bar{x}_i^u[\alpha]$  and  $f_{i_{\bar{x},2}}[\alpha] = \bar{x}_i^l[\alpha] - \widetilde{LCL}_x^l[\alpha]$ . If any  $\alpha$  - cut of a fuzzy number is completely or partially beyond the fuzzy control limits, then  $f_{i_{\bar{x},1}}[\alpha]$  or  $f_{i_{\bar{x},2}}[\alpha]$  is negative and the process is out of control, otherwise the process is in control. In addition to the decision function, we propose a membership function to increase the functionality of the control chart. The function shows degree of being out of control of a fuzzy number. In other words, the degree of deviation from in control state is given by this function. The membership function of the  $i^{\text{th}}$  fuzzy number is given in 2.12.

$$\varphi_{i_{\bar{x}}}[\alpha] = \frac{\sum_{k=1}^4 |f_{i_{\bar{x},k}}[\alpha]| + 2(\bar{x}_i^u[\alpha] - \bar{x}_i^l[\alpha]) - (\widetilde{UCL}_x^u[\alpha] + \widetilde{UCL}_x^l[\alpha] - \widetilde{LCL}_x^u[\alpha] - \widetilde{LCL}_x^l[\alpha])}{2 \min\{\sum_{k=0}^1 |f_{i_{\bar{x},2k+1}}[\alpha]|, \sum_{k=1}^2 |f_{i_{\bar{x},2k}}[\alpha]|\}} \tag{2.12}$$

where  $f_{i_{\bar{x},3}}[\alpha] = \widetilde{UCL}_x^l[\alpha] - \bar{x}_i^u[\alpha]$  and  $f_{i_{\bar{x},4}}[\alpha] = \bar{x}_i^l[\alpha] - \widetilde{LCL}_x^u[\alpha]$ . If  $\varphi_{i_{\bar{x}}}[\alpha] < 1$  for all  $i$ , then the process is in control. If  $\varphi_{i_{\bar{x}}}[\alpha] = 0$  then, this denotes that fuzzy number is in desired location: the number lies completely between the fuzzy limits. When  $\varphi_{i_{\bar{x}}}[\alpha] \geq 1$ , then this is considered as an indication of out of control. The membership degree is not ranged in interval  $[0, 1]$ , which means  $\sup(\varphi_{i_{\bar{x}}}[\alpha]) > 1$ . This is because of the possible locations of fuzzy numbers on the chart. Although, the membership degree is not limited, a value which is greater than 1 is rarely observed. This situation is observed when the sample is

completely out of the limits with a high variability. In addition, warning state criteria which increases sensitivity of the fuzzy control chart, is defined as follows:  $0 < \varphi_{i\bar{x}}[\alpha] < 1$ .

The value of  $\alpha$  affects all the statistics and tightness of the control charts. In other words,  $\alpha$  operates like sensitizing rules; selecting a small  $\alpha$  means having a more sensitive control chart. If we increase  $\alpha$ , both of the significance levels ( $\gamma_1$  and  $\gamma_2$ ) increase, and this yields to a narrower center number and a smaller joint confidence region. In other words, as  $\alpha$  approaches to 1, the joint confidence region and center number approach to a point. Consequently, when  $\alpha$  is 1, the fuzzy numbers, fuzzy control limits and the fuzzy center number become crisp numbers and the fuzzy control chart approach is simplified to Shewhart control chart.

### 2.3. Design of Fuzzy S Control Chart

Similar to the previous part, fuzzy S control chart is based on fuzzy estimation method: The triangular fuzzy control limits and center number are obtained by adding  $100(1-\alpha)\%$  confidence intervals for the standard deviation on top of the others. Let  $X_1, X_2, \dots, X_n$  be a random sample from a normal distribution with mean  $\mu$  and variance  $\sigma^2$ , then the random variable  $\frac{(n-1)s_i^2}{\sigma^2}$  has a chi-square distribution with  $n-1$  degrees of freedom. Accordingly,  $\alpha$  - cut of fuzzy estimate of  $i^{th}$  sample standard deviation is formulated by a  $100(1-\alpha)\%$  confidence interval for  $\sigma$  which is given in 2.13.

$$[\tilde{s}_i^l[\alpha], \tilde{s}_i^u[\alpha]] = \left[ \sqrt{\frac{(n-1)s_i^2}{\chi_{\alpha/2, (n-1)}^2}}, \sqrt{\frac{(n-1)s_i^2}{\chi_{1-\alpha/2, (n-1)}^2}} \right] \tag{2.13}$$

If data consists of  $m$  samples each have  $n$  measurements, then the random variable  $\frac{(n-1)\sum s_i^2}{\sigma^2}$  is distributed with chi-square distribution with  $m(n-1)$  degrees of freedom which leads to a  $100(1-\alpha)\%$  confidence interval given in 2.14.

$$\sqrt{\frac{(n-1)\sum s_i^2}{\chi_{\alpha/2, m(n-1)}^2}} \leq \sigma \leq \sqrt{\frac{(n-1)\sum s_i^2}{\chi_{1-\alpha/2, m(n-1)}^2}} \tag{2.14}$$

Fuzzy upper and lower control limits are the fuzzy estimates of  $B_6\sigma$  and  $B_5\sigma$ , where  $B_5$  and  $B_6$  are the Shewhart control chart constants. So, we define  $3\sigma \alpha$  - cut fuzzy center number and control limits by 2.15, 2.16 and 2.17.

$$[\widetilde{UCL}_s^l[\alpha], \widetilde{UCL}_s^u[\alpha]] = \left[ B_6 \sqrt{\frac{(n-1)\sum s_i^2}{\chi_{\alpha/2, m(n-1)}^2}}, B_6 \sqrt{\frac{(n-1)\sum s_i^2}{\chi_{1-\alpha/2, m(n-1)}^2}} \right] \tag{2.15}$$

$$[\widetilde{CL}_s^l[\alpha], \widetilde{CL}_s^u[\alpha]] = \left[ \sqrt{\frac{(n-1)\sum s_i^2}{\chi_{\alpha/2, m(n-1)}^2}}, \sqrt{\frac{(n-1)\sum s_i^2}{\chi_{1-\alpha/2, m(n-1)}^2}} \right] \tag{2.16}$$

$$[\widetilde{LCL}_s^l[\alpha], \widetilde{LCL}_s^u[\alpha]] = \left[ B_5 \sqrt{\frac{(n-1)\sum s_i^2}{\chi_{\alpha/2, m(n-1)}^2}}, B_5 \sqrt{\frac{(n-1)\sum s_i^2}{\chi_{1-\alpha/2, m(n-1)}^2}} \right] \tag{2.17}$$

We develop the decision and membership functions by the same idea. If  $f_{i_{s,1}}[\alpha] f_{i_{s,2}}[\alpha] < 0$ , then the process variability is higher than the specified limits and the process is out of control. Similarly, the membership function which is denoted by  $\varphi_{i_s}[\alpha]$ , shows deviation from the in control state, and the process is out of control, if  $\varphi_{i_s}[\alpha] \geq 1$ . The decision and the membership functions of fuzzy  $S$  control chart are given in 2.18 and 2.19.

$$\text{Process} = \begin{cases} \text{in control,} & \text{if } f_{i_{s,1}}[\alpha] f_{i_{s,2}}[\alpha] \geq 0 \\ \text{out of control,} & \text{otherwise} \end{cases} \tag{2.18}$$

$$\varphi_{i_s}[\alpha] = \frac{\sum_{k=1}^4 |f_{i_{s,k}}[\alpha]| + 2(s_i^u[\alpha] - s_i^l[\alpha]) - (\widetilde{UCL}_s^u[\alpha] + \widetilde{UCL}_s^l[\alpha] - \widetilde{LCL}_s^u[\alpha] - \widetilde{LCL}_s^l[\alpha])}{2 \min\{\sum_{k=0}^1 |f_{i_{s,2k+1}}[\alpha]|, \sum_{k=1}^2 |f_{i_{s,2k}}[\alpha]|\}} \tag{2.19}$$

where  $f_{i_{s,1}}[\alpha] = \widetilde{UCL}_s^u[\alpha] - s_i^u[\alpha]$ ,  $f_{i_{s,2}}[\alpha] = s_i^l[\alpha] - \widetilde{LCL}_s^l[\alpha]$ ,  $f_{i_{s,3}}[\alpha] = \widetilde{UCL}_s^l[\alpha] - s_i^u[\alpha]$  and  $f_{i_{s,4}}[\alpha] = s_i^l[\alpha] - \widetilde{LCL}_s^u[\alpha]$ .

### 2.4. A Numerical Example

In this section, we demonstrate the fuzzy control chart approach on a well-known example from Montgomery, 2019. The data present the inside diameter measurements of forged automobile engine piston rings of 25 samples. Each consists of five piston rings and data follow normal distribution.

First, triangular fuzzy number estimates of mean and standard deviation are calculated for each sample.  $\alpha$  - cut of the fuzzy numbers are given in Table 1. Second, triangular fuzzy control limits and center numbers are computed by 2.8, 2.9 and 2.10, and 2.15, 2.16 and 2.17:  $[\widetilde{UCL}_{\bar{x}}^l[0.6], \widetilde{UCL}_{\bar{x}}^u[0.6]] = [74.0126, 74.0171]$ ,  $[\widetilde{C}_{\bar{x}}^l[\alpha], \widetilde{C}_{\bar{x}}^u[\alpha]] = [74.0007, 74.0016]$ ,  $[\widetilde{LCL}_{\bar{x}}^l[0.6], \widetilde{LCL}_{\bar{x}}^u[0.6]] = [73.9852, 73.9898]$ ,  $[\widetilde{UCL}_s^l[0.6], \widetilde{UCL}_s^u[0.6]] = [0.0190, 0.0205]$ ,  $[\widetilde{C}_s^l[\alpha], \widetilde{C}_s^u[\alpha]] = [0.0099, 0.0102]$ ,  $[\widetilde{LCL}_s^l[0.6], \widetilde{LCL}_s^u[0.6]] = [0.0000, 0.0000]$ . Then, decision function and membership degrees of the fuzzy numbers are calculated for both of the control charts (see Table 1). Finally, the fuzzy control charts are plotted: Figures 4 and 5 show fuzzy  $\bar{X}$  control chart and  $S$  chart, respectively.

Table 1

Fuzzy  $\bar{X}$  and  $S$  control chart example summary statistics.

| Sample | Mean    | Stdev  | $\bar{x}_i^l[0.6]$ | $\bar{x}_i^u[0.6]$ | $f_{i_{x_1}}[0.6]f_{i_{x_2}}[0.6]$ | $\varphi_{i_{\bar{x}}}[0.6]$ | $s_i^l[0.6]$ | $s_i^u[0.6]$ | $f_{i_{s_1}}[0.6]f_{i_{s_2}}[0.6]$ | $\varphi_{i_s}[0.6]$ |
|--------|---------|--------|--------------------|--------------------|------------------------------------|------------------------------|--------------|--------------|------------------------------------|----------------------|
| 1      | 74.0100 | 0.0148 | 74.0064            | 74.0140            | 0.0001                             | 0.3032                       | 0.0134       | 0.0199       | 0.0000                             | 0.6107               |
| 2      | 74.0010 | 0.0075 | 73.9987            | 74.0025            | 0.0002                             | 0.0000                       | 0.0068       | 0.0101       | 0.0001                             | 0.0000               |
| 3      | 74.0080 | 0.0147 | 74.0042            | 74.0118            | 0.0001                             | 0.0000                       | 0.0134       | 0.0199       | 0.0000                             | 0.5889               |
| 4      | 74.0030 | 0.0091 | 74.0007            | 74.0053            | 0.0002                             | 0.0000                       | 0.0082       | 0.0123       | 0.0001                             | 0.0000               |
| 5      | 74.0030 | 0.0122 | 74.0003            | 74.0065            | 0.0002                             | 0.0000                       | 0.0111       | 0.0165       | 0.0000                             | 0.0000               |
| 6      | 73.9960 | 0.0087 | 73.9934            | 73.9978            | 0.0002                             | 0.0000                       | 0.0079       | 0.0118       | 0.0001                             | 0.0000               |
| 7      | 74.0000 | 0.0055 | 73.9986            | 74.0014            | 0.0002                             | 0.0000                       | 0.0050       | 0.0075       | 0.0001                             | 0.0000               |
| 8      | 73.9970 | 0.0123 | 73.9937            | 73.9999            | 0.0001                             | 0.0000                       | 0.0111       | 0.0165       | 0.0000                             | 0.0000               |
| 9      | 74.0040 | 0.0055 | 74.0028            | 74.0056            | 0.0002                             | 0.0000                       | 0.0050       | 0.0075       | 0.0001                             | 0.0000               |
| 10     | 73.9980 | 0.0063 | 73.9964            | 73.9996            | 0.0002                             | 0.0000                       | 0.0057       | 0.0085       | 0.0001                             | 0.0000               |
| 11     | 73.9940 | 0.0029 | 73.9935            | 73.9949            | 0.0002                             | 0.0000                       | 0.0026       | 0.0039       | 0.0000                             | 0.0000               |
| 12     | 74.0010 | 0.0042 | 74.0003            | 74.0025            | 0.0002                             | 0.0000                       | 0.0038       | 0.0057       | 0.0001                             | 0.0000               |
| 13     | 73.9980 | 0.0105 | 73.9957            | 74.0011            | 0.0002                             | 0.0000                       | 0.0095       | 0.0141       | 0.0001                             | 0.0000               |
| 14     | 73.9900 | 0.0153 | 73.9863            | 73.9941            | 0.0000                             | 0.7645                       | 0.0139       | 0.0207       | 0.0000                             | 1.0000               |
| 15     | 74.0060 | 0.0073 | 74.0041            | 74.0079            | 0.0002                             | 0.0000                       | 0.0066       | 0.0099       | 0.0001                             | 0.0000               |
| 16     | 73.9970 | 0.0078 | 73.9946            | 73.9986            | 0.0002                             | 0.0000                       | 0.0071       | 0.0105       | 0.0001                             | 0.0000               |
| 17     | 74.0010 | 0.0106 | 73.9981            | 74.0035            | 0.0002                             | 0.0000                       | 0.0096       | 0.0143       | 0.0001                             | 0.0000               |
| 18     | 74.0070 | 0.0070 | 74.0056            | 74.0092            | 0.0002                             | 0.0000                       | 0.0063       | 0.0094       | 0.0001                             | 0.0000               |
| 19     | 73.9980 | 0.0085 | 73.9960            | 74.0004            | 0.0002                             | 0.0000                       | 0.0077       | 0.0114       | 0.0001                             | 0.0000               |
| 20     | 74.0090 | 0.0080 | 74.0072            | 74.0112            | 0.0001                             | 0.0000                       | 0.0072       | 0.0108       | 0.0001                             | 0.0000               |
| 21     | 74.0000 | 0.0122 | 73.9967            | 74.0029            | 0.0002                             | 0.0000                       | 0.0110       | 0.0164       | 0.0000                             | 0.0000               |
| 22     | 74.0020 | 0.0074 | 73.9997            | 74.0035            | 0.0002                             | 0.0000                       | 0.0067       | 0.0100       | 0.0001                             | 0.0000               |
| 23     | 74.0020 | 0.0119 | 73.9994            | 74.0054            | 0.0002                             | 0.0000                       | 0.0108       | 0.0161       | 0.0000                             | 0.0000               |
| 24     | 74.0050 | 0.0087 | 74.0030            | 74.0074            | 0.0002                             | 0.0000                       | 0.0079       | 0.0117       | 0.0001                             | 0.0000               |
| 25     | 73.9980 | 0.0162 | 73.9941            | 74.0023            | 0.0001                             | 0.0000                       | 0.0146       | 0.0218       | 0.0000                             | 1.0000               |

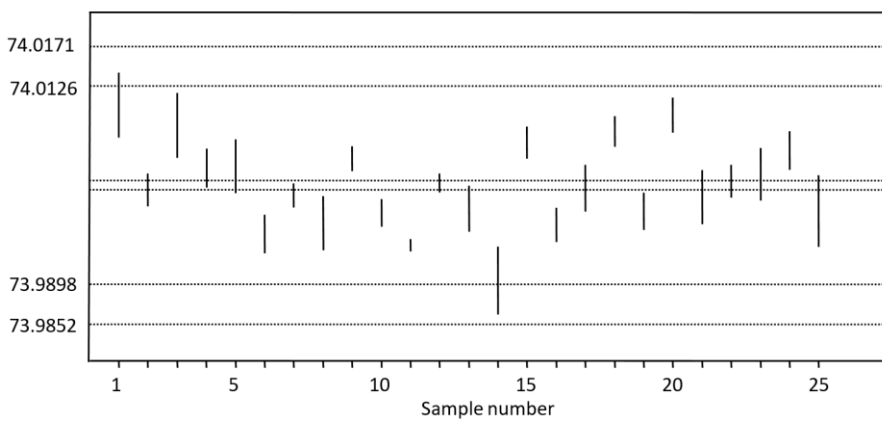


Figure 4. Fuzzy  $\bar{X}$  control chart



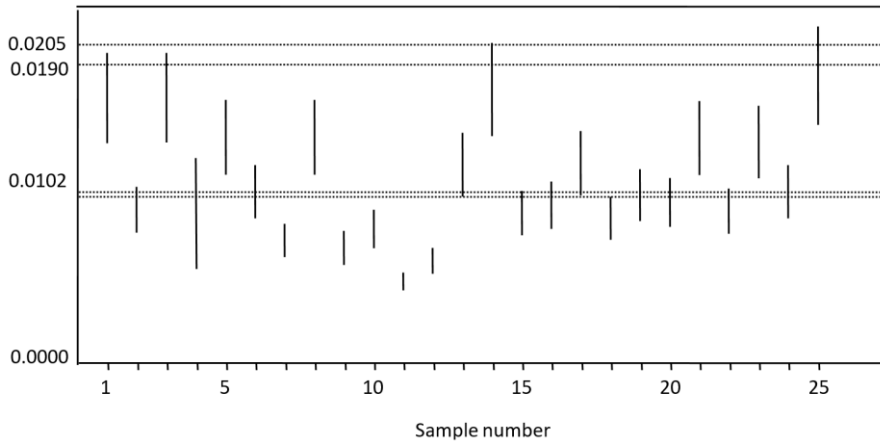


Figure 5. Fuzzy  $S$  control chart

Figure 4 shows that except the 1<sup>st</sup> and the 14<sup>th</sup> samples all the  $\alpha$  - cut of fuzzy numbers are completely between the fuzzy limits. Accordingly, we conclude that based on the  $\bar{X}$  chart there is no indication that the process is out of control. The membership degrees denote the same decision since, all function values are less than 1. In addition, 1<sup>st</sup> sample which has  $\varphi_{1\bar{x}}[\alpha] = 0.3032$  and the 14<sup>th</sup> sample with  $\varphi_{14\bar{x}}[\alpha] = 0.7645$  indicate warning state which means the process may not be operating properly.

The pattern of fuzzy  $\bar{X}$  control chart also gives signals about the result of the fuzzy  $S$  control chart since,  $\alpha$  - cut set of a high variation sample is greater than the set of the low variation. Figure 4 shows greater variation for the 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup>, 14<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> samples. The details are presented in fuzzy  $S$  control chart. Figure 5 shows that upper limit of 14<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup>  $\alpha$  - cut fuzzy numbers are out of the upper fuzzy control limit with the membership degree 1.000. Consequently, the process is out of control by the 14<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> samples.

In this example, we use  $\alpha = 0.6$ . If we want to have more sensitive control charts, the value should be decreased. That is the main difference between the proposed fuzzy charts and Shewhart control charts. As we increase  $\alpha$ , we would have the same results with Shewhart charts.

### 3. Results and Discussion

Throughout the section, all ARL statistics are provided from 100,000 replications of computer simulation and the random variables are generated from standard normal distribution. The simulations are performed for various combinations of in control ARL,  $\alpha$  - cut level and sample size.  $ARL_0$  is fixed at 370 and 500, and three values of  $\alpha$ : 0.4, 0.6 and 0.8, and two values of sample size: 10 and 15 are considered. Process mean shifts with magnitudes of  $\delta_1 \in \{0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00, 3.00\}$  and changes in variability with magnitudes of  $\delta_2 \in \{0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 2.00\}$  are investigated. The samples are generated from  $N(\mu + \delta_1\sigma, \sigma)$  and  $N(\mu, \sigma + \delta_2\sigma)$ . Fuzzy  $\bar{X}$  control chart and Shewhart  $\bar{X}$  control chart simulation results and are given in Tables 2 and 3, and Figures 6, 7, 8 and 9.

Table 2

ARL of fuzzy  $\bar{X}$  chart and Shewhart  $\bar{X}$  chart for the shift of mean when  $\alpha = 0.4, 0.6, 0.8$ ,  $ARL_0=370, 500$  and  $n = 10$ .

| Shifts<br>( $\delta_1$ ) | Shewhart $\bar{X}$ chart |                | Fuzzy $\bar{X}$ chart |                |          | Shewhart $\bar{X}$ chart |                | Fuzzy $\bar{X}$ chart |  |                |                |                |
|--------------------------|--------------------------|----------------|-----------------------|----------------|----------|--------------------------|----------------|-----------------------|--|----------------|----------------|----------------|
|                          |                          | $\alpha = 0.4$ | $\alpha = 0.6$        | $\alpha = 0.8$ |          | $\alpha = 0.4$           | $\alpha = 0.6$ | $\alpha = 0.8$        |  | $\alpha = 0.4$ | $\alpha = 0.6$ | $\alpha = 0.8$ |
| 0                        | 370.3983                 | 369.2675       | 369.3401              | 370.5864       | 499.6091 | 500.9779                 | 499.0698       | 500.0169              |  |                |                |                |
| 0.25                     | 73.2735                  | 76.5974        | 74.1125               | 73.4780        | 92.6582  | 96.7288                  | 94.0668        | 93.0119               |  |                |                |                |
| 0.50                     | 12.8251                  | 13.6806        | 13.1365               | 12.8663        | 15.2280  | 16.2006                  | 15.5751        | 15.2960               |  |                |                |                |
| 0.75                     | 3.7749                   | 4.0319         | 3.8593                | 3.7992         | 4.2321   | 4.5206                   | 4.3360         | 4.25100               |  |                |                |                |
| 1.00                     | 1.7716                   | 1.8590         | 1.7987                | 1.7761         | 1.8910   | 1.9959                   | 1.9259         | 1.8982                |  |                |                |                |
| 1.25                     | 1.2053                   | 1.2392         | 1.2169                | 1.2079         | 1.2409   | 1.2790                   | 1.2547         | 1.2436                |  |                |                |                |
| 1.50                     | 1.0424                   | 1.0525         | 1.0458                | 1.0433         | 1.0517   | 1.0634                   | 1.0559         | 1.0526                |  |                |                |                |
| 1.75                     | 1.0057                   | 1.0078         | 1.0063                | 1.0059         | 1.0073   | 1.0099                   | 1.0083         | 1.0076                |  |                |                |                |
| 2.00                     | 1.0004                   | 1.0007         | 1.0005                | 1.0005         | 1.0006   | 1.0009                   | 1.0007         | 1.0007                |  |                |                |                |
| 3.00                     | 1.0000                   | 1.0000         | 1.0000                | 1.0000         | 1.0000   | 1.0000                   | 1.0000         | 1.0000                |  |                |                |                |

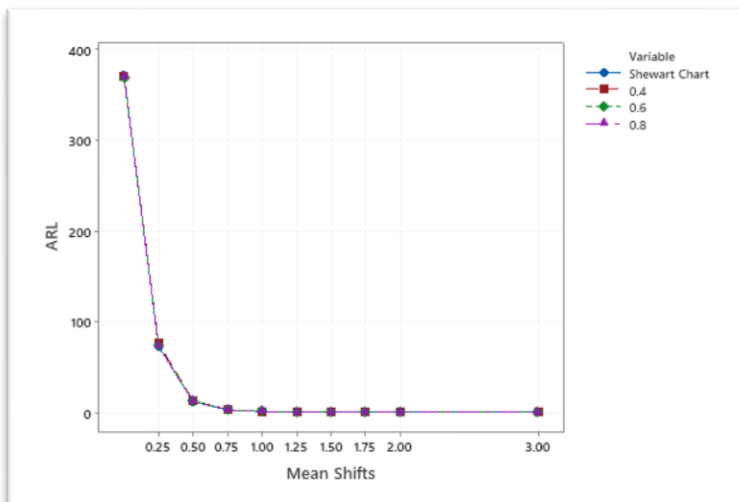


Figure 6. Plot of ARL versus mean shifts for Shewhart  $\bar{X}$  chart and fuzzy  $\bar{X}$  charts,  $ARL_0=370$

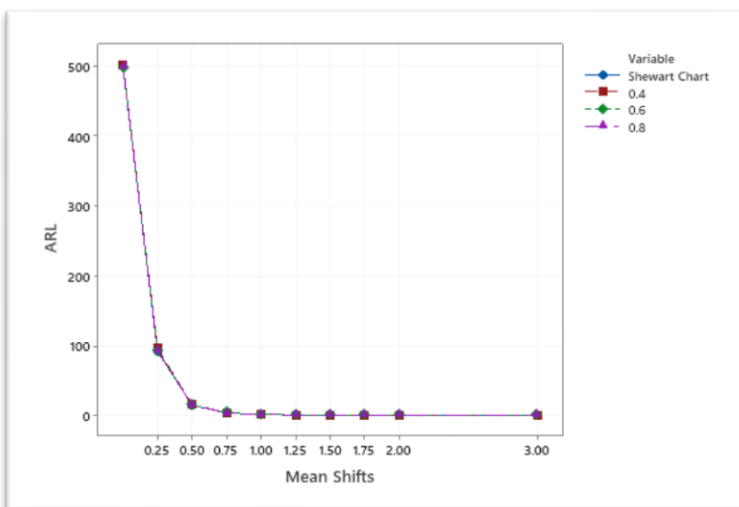


Figure 7. Plot of ARL versus mean shifts for Shewhart  $\bar{X}$  chart and fuzzy  $\bar{X}$  charts,  $ARL_0=500$

Table 3

ARL of fuzzy  $\bar{X}$  chart and Shewhart  $\bar{X}$  chart for the changes in variability when  $\alpha = 0.4, 0.6, 0.8$ ,  $ARL_0 = 370, 500$  and  $n = 10$ .

| Changes ( $\delta_2$ ) | $ARL_0 = 370$            |                       |                |                | $ARL_0 = 500$            |                       |                |                |
|------------------------|--------------------------|-----------------------|----------------|----------------|--------------------------|-----------------------|----------------|----------------|
|                        | Shewhart $\bar{X}$ chart | Fuzzy $\bar{X}$ chart |                |                | Shewhart $\bar{X}$ chart | Fuzzy $\bar{X}$ chart |                |                |
|                        |                          | $\alpha = 0.4$        | $\alpha = 0.6$ | $\alpha = 0.8$ |                          | $\alpha = 0.4$        | $\alpha = 0.6$ | $\alpha = 0.8$ |
| 0.25                   | 60.9939                  | 38.8686               | 45.9998        | 53.1343        | 74.4272                  | 47.0730               | 55.7550        | 64.6926        |
| 0.50                   | 21.9779                  | 11.7383               | 14.6946        | 18.0115        | 25.3817                  | 13.3060               | 16.8254        | 20.7548        |
| 0.75                   | 11.5639                  | 5.7343                | 7.3219         | 9.2302         | 12.9126                  | 6.2558                | 8.0971         | 10.2481        |
| 1.00                   | 7.4842                   | 3.5648                | 4.6290         | 5.8863         | 8.1735                   | 3.8262                | 5.0134         | 6.4022         |
| 1.25                   | 5.4818                   | 2.5890                | 3.3635         | 4.2862         | 5.8945                   | 2.7451                | 3.5822         | 4.6007         |
| 1.50                   | 4.3452                   | 2.0600                | 2.6635         | 3.3918         | 4.6198                   | 2.1642                | 2.7980         | 3.5944         |
| 2.00                   | 3.1515                   | 1.5177                | 1.9386         | 2.4658         | 3.3002                   | 1.5660                | 2.0165         | 2.5698         |

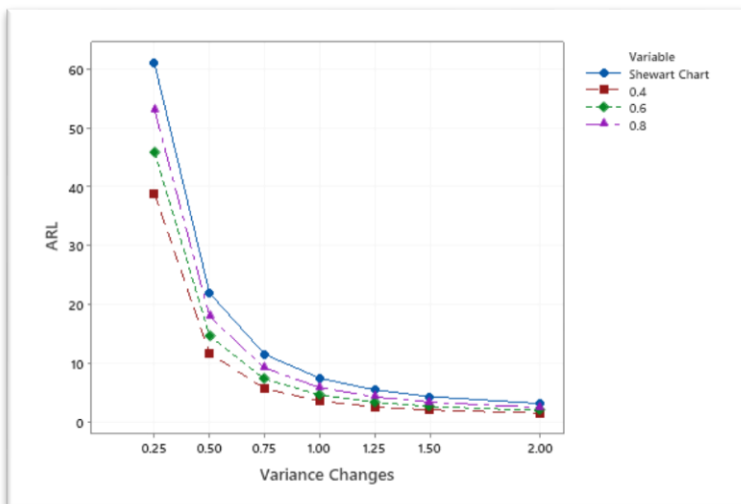


Figure 8. Plot of ARL versus variance changes for Shewhart  $\bar{X}$  chart and fuzzy  $\bar{X}$  charts,  $ARL_0=370$

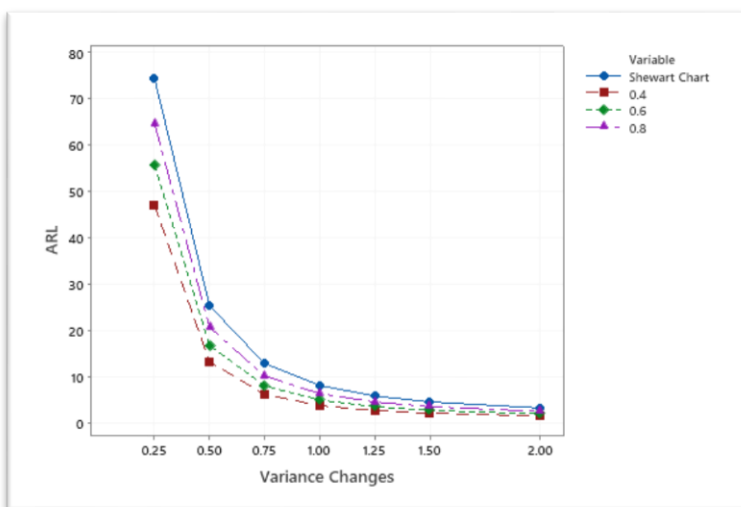


Figure 9. Plot of ARL versus variance changes for Shewhart  $\bar{X}$  chart and fuzzy  $\bar{X}$  charts,  $ARL_0=500$

A summary of the conclusions is listed as follows:

When the process mean shifts are considered, the performance of the fuzzy chart is competitive to Shewhart control chart. Table 2 and Figures 6, 7 show that there are no significant differences between the ARL of Shewhart and fuzzy  $\bar{X}$  control charts. Moreover, the fuzzy  $\bar{X}$  chart performance is not affected by the change of  $\alpha$  and  $ARL_0$ . That is, as  $\alpha$  or  $ARL_0$  increases the ARL of the fuzzy charts decrease slightly.

Table 2 and Figures 8, 9 show that the fuzzy chart is significantly better than the Shewhart chart for all magnitudes of variation changes. All  $ARL_1$  of the fuzzy chart are smaller than the Shewhart chart results. The fuzzy  $\bar{X}$  chart performs better for the lower values of  $\alpha$ . The difference increases as  $\alpha$  decreases.

The fuzzy control chart performance approaches to Shewhart control chart performance as  $\alpha$  increases. When  $\alpha = 1$ , the fuzzy chart is simplified to Shewhart control chart.

The effect of sample size is also investigated for  $n = 15$  by reiterating the simulations and similar tables are observed which give the same conclusions.

#### 4. Conclusion

In this study, we propose a fuzzy control chart approach. The approach effectively combines traditional control chart concept and fuzzy set theory. Based on fuzzy estimation model of population mean and the theory of joint confidence regions for two parameters, the approach is proposed as an extension of Shewhart  $\bar{X}$  and  $S$  control charts. The approach uses  $\alpha$  - cut of fuzzy numbers and can be reduced to Shewhart control chart. A sensitivity study is conducted in which the proposed fuzzy chart and the Shewhart control chart are compared by the performance measure average run length. The results show that the proposed fuzzy control charts detect even small shifts of process mean and changes of variance effectively. Moreover, the fuzzy chart performs significantly better than Shewhart chart, when a change exists in the variance. As there exist a research gap in integrating the fuzzy statistics in quality control, there can be several extensions of the approach; the most noteworthy is to extend the approach for the other traditional control charts. Moreover, sensitizing rules may be adapted or new rules may be proposed for detecting and interpreting the systemic or nonrandom patterns of the fuzzy charts.

#### Acknowledgement

The author received no specific funding for this study.

#### Author Contributions

Nilufer Pekin Alakoc confirms sole responsibility for the study: conception and design, analysis and interpretation of results, and manuscript preparation.

#### Conflicts of Interest

The author declares no conflict of interest.

#### References

- Akhundjanov, S.B. & Pascual, F. (2015). Moving range EWMA control charts for monitoring the Weibull shape parameter. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, 85(9), 1864–1882. DOI: <https://doi.org/10.1080/00949655.2014.907574>
- Al-Refaie, A., Obaidat, A., Fouad, R.H., & Hanayneh, B., (2019). A fuzzy-logic approach for developing variables control charts and process capability indices under linguistic measurements. *Journal of Engineering and Applied Sciences*, 14(6). Retrieved from:

[http://www.arnpjournals.org/jeas/research\\_papers/rp\\_2019/jeas\\_0319\\_7662.pdf](http://www.arnpjournals.org/jeas/research_papers/rp_2019/jeas_0319_7662.pdf)

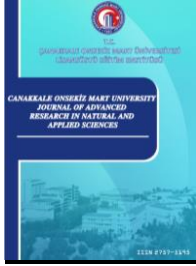
- Amirzadeh, V., Mashinchi, M. & Parchami, A. (2009). Construction of p - charts using degree of nonconformity. *Information Sciences*, 179(1–2), 150–160. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ins.2008.09.010>
- Aslam, M., Bantan, R.A.R. & Khan, N. (2020). Design of NEWMA np control chart for monitoring neutrosophic nonconforming items. *Soft Computing*, 24, 16617–16626. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00500-020-04964-y>
- Atta, A.A., Shoraim, M.H.A., Yahaya, S.S.S., Zain, Z. & Ali, H.A. (2016). Scaled weighted variance S control chart for skewed populations. *Journal of Theoretical and Applied Information Technology*, 91(1), 61–74. Retrieved from: <http://www.jatit.org/volumes/Vol91No1/7Vol91No1.pdf>
- Buckley, J.J. (2006). *Fuzzy Probability and Statistics*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. Retrieved from: <https://www.springer.com/gp/book/9783540308416>
- Chang, S.I. & Aw, C.A. (1996). A neural fuzzy control chart for detecting and classifying process mean shifts. *International Journal of Production Research*, 34(8), 2265–2278. DOI: <https://doi.org/10.1080/00207549608905024>
- Chen, Y.K. & Yeh, C. (2004). An enhancement of DSI  $\bar{X}$  control charts using a fuzzy-genetic approach. *International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 24, 32–40. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00170-003-1706-y>
- Chen, Y.K., Chang, H.H. & Chiu, F.R. (2008). Optimization design of control charts based on minimax decision criterion and fuzzy process shifts. *Expert Systems with Applications*, 35(1–2), 207–213. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2007.06.003>
- Cheng, C. B. (2005). Fuzzy process control: construction of control charts with fuzzy numbers. *Fuzzy Sets and Systems*, 154(2), 287–303. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fss.2005.03.002>
- Chih, H.W. & Kuo, W. (2007). Identification of control chart patterns using wavelet filtering and robust fuzzy clustering. *Journal of Intelligent Manufacturing*, 18, 343–350. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10845-007-0028-6>
- Demirli, K. & Vijayakumar, S. (2010). Fuzzy logic based assignable cause diagnosis using control chart patterns. *Information Sciences*, 180(17), 3258–3272. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ins.2010.05.009>
- Engin, O., Elik, A.C. & Kaya, I. (2008). A fuzzy approach to define sample size for attributes control chart in multistage processes: an application in engine valve manufacturing process. *Applied Soft Computing*, 8(4), 1654–1663. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2008.01.005>
- Ercan Teksen, H. & Anagun, A.S. (2018). Different methods to fuzzy  $\bar{X}$ -R control charts used in production: Interval type-2 fuzzy set example. *Journal of enterprise Information Management*, 31(6), 848–866. DOI: <https://doi.org/10.1108/JEIM-01-2018-0011>
- Faraz, A. & Moghadam, M.B. (2007). Fuzzy control chart a better alternative for Shewhart average chart. *Quality and Quantity*, 41, 375–385. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11135-006-9007-9>
- Faraz, A. & Shapiro, A.F. (2010). An application of fuzzy random variables to control charts. *Fuzzy Sets and Systems*, 161(20), 2684–2694. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fss.2010.05.004>
- Fazel Zarandi, M. H., Alaeddini, A. & Turksen, I.B. (2008). A hybrid fuzzy adaptive sampling - Run rules for Shewhart control charts. *Information Sciences*, 178(4), 1152–1170. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ins.2007.09.028>

- Fazel Zarandi, M.H., Turksen, I.B. & Kashan, H. (2006). Fuzzy control charts for variable and attribute quality characteristic. *Iranian Journal of Fuzzy Systems*, 3(1), 31–44. DOI: <https://dx.doi.org/10.22111/ijfs.2006.429>
- Gulbay, M. & Kahraman, C. (2006). Development of fuzzy process control charts and fuzzy unnatural pattern analyses. *Computational Statistics and Data Analysis*, 51(1), 434–451. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.csda.2006.04.031>
- Gulbay, M. & Kahraman, C. (2007). An alternative approach to fuzzy control charts: direct fuzzy approach. *Information Sciences*, 77(6), 1463–1480. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ins.2006.08.013>
- Gulbay, M., Kahraman, C. & Ruan, D. (2004).  $\alpha$  – Cuts fuzzy control charts for linguistic data. *International Journal of Intelligent Systems*, 19(12), 1173–1196. Retrieved from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/int.20044>
- Hsieh, K.L., Tong, L.I. & Wang, M.C. (2007). The application of control chart for defects and defect clustering in IC manufacturing based on fuzzy theory. *Expert Systems and Applications*, 32(3), 765–776. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2006.01.050>
- Hsu, H.M. & Chen, Y.K. (2001). A fuzzy reasoning based diagnosis system for Xbar control charts. *Journal Intellectual Manufacturing*, 12. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1008903614042>
- Intaramo, R. & Pongpullonsak, A. AUD (2012). Development of fuzzy extreme value theory control charts using  $\alpha$ -cuts for skewed populations. *Applied Mathematical Sciences*, 6(117), 5811–5834. Retrieved from: <http://www.m-hikari.com/ams/ams-2012/ams-117-120-2012/intaramoAMS117-120-2012.pdf>
- Kanagawa, A., Tamaki, F. & Ohta, H. (1993). Control charts for process average and variability based on linguistic data. *Intelligent Journal of Production Research*, 31(4), 913–922. DOI: <https://doi.org/10.1080/00207549308956765>
- Kaya, I., Erdogan, M. & Yildiz, C. (2017). Analysis and control of variability by using fuzzy individual control charts. *Applied Soft Computing*, 51, 370–381. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2016.11.048>
- Mendes, A.D.S., Machado, M.A.G. & Rizol, P.M.S.R., (2019). Fuzzy control chart for monitoring mean and range of univariate processes. *Pesquisa Operacional*, 39(2), 339–357. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0101-7438.2019.039.02.0339>
- Moameni, M., Saghaei, A. & Ghorbani Salnghooch, M. (2012). The effect of measurement error on  $\bar{X} - \bar{R}$  Fuzzy Control Charts. *Engineering, Technology & Applied Science Research*, 2(1), 173–176. DOI: <https://doi.org/10.48084/etasr.127>
- Moheb Alizadeh, H., Arshadi Khamseh, A.R. & Fatemi Ghomi, S.M.T. (2010). Fuzzy development of multivariate variable control charts using the fuzzy likelihood ratio test. *Scientia Iranica*, 17(2), 150–163. Retrieved from: [http://scientiairanica.sharif.edu/article\\_3364.html](http://scientiairanica.sharif.edu/article_3364.html)
- Mojtaba Zabihinpour, S., Arif, M., Tang, S. H. & Azfanizam, A. (2015). Construction of fuzzy Xbar-S control charts with an unbiased estimation of standard deviation for a triangular fuzzy random variable. *Journal of Intelligent Fuzzy Systems*, 28(6), 2735–2747. DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/IFS-151551>
- Mojtaba Zabihinpour, S., Ariffin, M.K.A., Tang S.H. & Azfanizam, A.S. (2014). Fuzzy based approach for monitoring the mean and range of the products quality. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 4(9), 1–7. Retrieved from: [https://www.textroad.com/pdf/JAEBS/J.%20Appl.%20Environ.%20Biol.%20Sci.,%204\(9\)1-7,%202014.pdf](https://www.textroad.com/pdf/JAEBS/J.%20Appl.%20Environ.%20Biol.%20Sci.,%204(9)1-7,%202014.pdf)



- Momeni, F. & Shokri, S. (2019). Nonparametric Shewhart–type quality control charts in fuzzy environment. *International Journal of Applied Operational Research*, 9(3), 28–44. Retrieved from: <http://ijorlu.liau.ac.ir/article-1-581-en.html>
- Montgomery, D.C. (2019). *Introduction to Statistical Quality Control* (8<sup>th</sup> ed.). John Wiley & Sons Inc., NY, USA. Retrieved from: <https://www.wiley.com/en-us/Introduction+to+Statistical+Quality+Control%2C+8th+Edition-p-9781119399308>
- Mood, A.M., Graybill, A.F. & Boes, D.C. (2001). *Introduction to the theory of Statistics* (3<sup>rd</sup> ed.) McGraw-Hill, New York. Retrieved from: <https://www.mheducation.co.in/introduction-to-the-theory-of-statistics-9780070445208-india>
- Morabi, Z.S., Owlia, M.S., Bashiri, M. & Doroudyan, M.H. (2015). Multi-objective design of  $\bar{X}$  control charts with fuzzy process parameters using the hybrid epsilon constraint PSO. *Applied Soft Computing Journal*, 30, 390–399. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2015.01.065>
- Panthong C. & Pongpullponsak, A. (2016). Non-normality and the fuzzy theory for variable parameters control charts. *Thai Journal of Mathematics*, 14(1), 203–213. Retrieved from: <http://thaijmath.in.cmu.ac.th/index.php/thaijmath/article/viewFile/1590/779>
- Pastuizaca Fernandez, M.N., Carrion Garcia, A. & Ruiz Barzola, O. (2015). Multivariate multinomial  $T^2$  control chart using fuzzy approach. *International Journal of Production Research*, 53(7), 2225–2238. DOI: <https://doi.org/10.1080/00207543.2014.983617>
- Pekin Alakoc, N. & Apaydin, A. (2013). Sensitizing rules for fuzzy control charts. *World Academy Science Engineering Technology*, 77, 679–683. Retrieved from: <https://publications.waset.org/429/sensitizing-rules-for-fuzzy-control-charts>
- Pekin Alakoc, N. & Apaydin, A. (2018). A fuzzy control chart approach for attributes and variables. *Engineering Technology and Applied Science Research*, 8(5), 3360–3365. DOI: <https://doi.org/10.48084/etasr.2192>
- Raz, T. & Wang, J.H. (1990). Probabilistic and memberships approaches in the construction of control charts for linguistic data. *Production Planning and Control*, 1(3), 147–157. DOI: <https://doi.org/10.1080/09537289008919311>
- Sadeghpour Gildeh, B. & Shafiee, N. (2015). X-MR control chart for autocorrelated fuzzy data using  $D_{p,q}$ -distance. *International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 18(1), 1047–1054. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00170-015-7199-7>
- Saricicek, I. & Cimen, O. (2011). A new diagnosis system based on fuzzy reasoning to detect mean and/or variance shifts in a Process. *International Journal of Innovative Computing, Information and Control*, 7(12), 6935–6948. Retrieved from: <http://www.ijicic.org/10-08098-1.pdf>
- Senturk, S. & Antucheviciene, J. (2017). Interval type-2 fuzzy c-control charts: Na application in a food company. *Informatica*, 28(2), 269–283. DOI: <https://doi.org/10.15388/Informatica.2017.129>
- Senturk, S. & Erginel, N. (2009). Development of fuzzy  $\tilde{X} - \tilde{R}$  and  $\tilde{X} - \tilde{S}$  control charts using  $\alpha$  - cuts. *Information Sciences*, 179(10), 1542–1551. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ins.2008.09.022>
- Senturk, S., Erginel, N., Kaya, I. & Kahraman, C. (2014). Fuzzy exponentially weighted moving average control chart for univariate data with a real case application. *Applied Soft Computing*, 22, 1–10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2014.04.022>
- Shu, M.H. & Wu, H.C. (2010). Monitoring imprecise fraction of nonconforming items using p control charts. *Journal of Applied Statistics*, 37(8), 1283–1297. DOI: <https://doi.org/10.1080/02664760903030205>

- Shu, M.H. & Wu, H.C. (2011). Fuzzy  $\bar{X}$  and R control charts: fuzzy dominance approach. *Computers & Industrial Engineering*, 61(3), 676–686. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cie.2011.05.001>
- Shu, M.H., Dang, D.C., Nguyen, T.L., Hsu, B.M. & Phan, N.S., (2017). Fuzzy  $\bar{x}$  and  $s$  control charts: a data-adaptability and human-acceptance approach. *Complexity*, 17, DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/4376809>
- Soleymani, P. & Amiri, A. (2017). Fuzzy cause selecting control chart for monitoring multistage processes. *International Journal of Industrial and Systems Engineering*, 25(3), 404–422. DOI: <https://doi.org/10.1504/IJISE.2017.081920>
- Taleb, H., Limam, M. & Hirota, K. (2006). Multivariate fuzzy multinomial control charts. *Quality Technology & Quantitative Management*, 3(4), 437–453. DOI: <https://doi.org/10.1080/16843703.2006.11673125>
- Tannock, J.D.T. (2003). A fuzzy control charting method for individuals. *International Journal of Production Research*, 41(5), 1017–1032. DOI: <https://doi.org/10.1080/0020754021000049808>
- Thaga, K. & Sivasamy, R. (2015). Control chart based on transition probability approach. *Journal of Statistical and Econometric Methods*, 4(2), 61–82. Retrieved from: [http://www.scienpress.com/Upload/JSEM/Vol%204\\_2\\_3.pdf](http://www.scienpress.com/Upload/JSEM/Vol%204_2_3.pdf)
- Wang, D. & Hryniewicz, O. (2015). A fuzzy nonparametric Shewhart chart based on the bootstrap approach. *International Journal of Applied Mathematics and Computer Science*, 25(2), 389–401. DOI: <https://doi.org/10.1515/amcs-2015-0030>
- Wang, D., Li, P. & Yasuda, M. (2014). Construction of fuzzy control charts based on weighted possibilistic mean. *Communications in Statistics—Theory and Methods*, 43(15), 3186–3207. DOI: <https://doi.org/10.1080/03610926.2012.695852>
- Wang, J.H. & Chen, C.H. (1995). Economic statistical np-control chart designs based on fuzzy optimization. *International Journal of Quality and Reliability Management*, 12(1), 88–92. DOI: <https://doi.org/10.1108/02656719510076276>
- Wang, J.H. & Raz, T. (1990). On the construction of control charts using linguistic variables. *Intelligent Journal of Production Research*, 28(3), 477–487. DOI: <https://doi.org/10.1080/00207549008942731>
- Yimnak, K. & Intaramo, R. (2020). An fuzzy scaled weighted variance S control chart for skewed populations. *Thai Journal of Mathematics*, 18(1), 53–62. Retrieved from: <http://thaijmath.in.cmu.ac.th/index.php/thaijmath/article/viewFile/4035/354354600>
- Zadeh, L.A. (1965). Fuzzy sets. *Information and Control*, 8, 338–353. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0019-9958\(65\)90241-X](https://doi.org/10.1016/S0019-9958(65)90241-X)



# Consequence Modelling and Analysis of Methane Explosions: A preliminary Study on Biogas Stations

Müge Ensari Özay<sup>1,\*</sup>, Pelin Güzel<sup>2</sup>, Emine Can<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Occupational Health and Safety, Faculty of Health Sciences, Üsküdar University, Istanbul, Turkey

<sup>2</sup> Faculty of Engineering and Natural Sciences, Istanbul Medeniyet University, Istanbul, Turkey

<sup>3</sup> Department of Physics Engineering, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Istanbul Medeniyet University, Istanbul, Turkey

## Article History

Received: 30.10.2019

Accepted: 03.02.2021

Published: 20.03.2021

## Research Article

**Abstract** – Biomass is one of the most important sources of renewable energy. Biomass resources can be utilized by producing biogas in the biogas stations, which include process equipment operating in critical conditions. In this study, a consequence analysis of a methane gas explosion carried out to estimate the explosion and the toxic threat zones of a biogas station in Turkey. ALOHA and PHAST Software Tools are used to realize an explosion by modelling scenarios and thus to estimate the effects of an explosion just to get an insight on methane gas explosion. By using ALOHA software, two different scenarios as leakage from the biogas tank and flammable chemical escaping directly into the atmosphere are designed and calculated by the Gaussian model. In addition to that, two different explosion scenarios as a leakage scenario from the biogas storage tank and a catastrophic rupture scenario are computed by using the PHAST Software. According to the first scenario results from ALOHA, explosions can cause destruction of buildings, serious injuries and shattering of glasses in the threat zones about 200 m while in the second scenario only shattering of glasses can be seen in 22 m of threat zone. The results from the PHAST show that threat zones do not change significantly at different weather conditions. It is found that the catastrophic rupture has maximum hazard zone limits among all the scenarios. It has been concluded that using different model-based software can be useful to understand possible results of biogas plant explosions.

**Keywords** – ALOHA software, biogas storage tank, explosion, methane gas, occupational health and safety, PHAST software.

## 1. Introduction

Biogas is one of the most important renewable energy in the world. In biogas production plants, organic wastes have been processed and produced electrical energy. The European Biomass Association evaluates that Biomass-based energy in Europe can be increased from 72 million tons in 2004 to 220 Million tons in 2020 (Kotek et al. 2015). The Biogas production amount from animal fertilizer in Turkey is around 3.5 billion m<sup>3</sup>/year (Arıkan, 2008; Köse, 2017). Today, Turkey has eighty-five build biogas plants, however, only thirty-six of them are in-service in several geographical locations. Some of these power plants having higher energy productions are Odayeri Landfill Gas Plant (Istanbul, 34 MW), Mutlular Biomass Energy Plant (Balıkesir, 30 MW), Mamak Landfill Biogas Plant (Ankara, 25 MW), Çadırtepe Biomass Plant (Ankara, 23MW), Sofulu Landfill Biogas Plant (Adana, 16MW), ITC Antalya Biomass Plant, (Antalya, 14MW), Kömürcüoda Landfill Biogas Plant (İstanbul, 14MW) (Bilici, 2019).

<sup>1</sup>  müge.ensariozay@uskudar.edu.tr

<sup>2</sup>  pelin.guzel@medeniyet.edu.tr

<sup>3</sup>  emine.can@medeniyet.edu.tr

\*Corresponding Author

As the number of biogas stations increases, the number of accidents increases in biogas units. More than 800 accidents occurred after 2005 among 13,171 European biogas stations (Kotek et al. 2015). Casson et al., (2016) created a database of 169 biogas accidents and the study showed that almost 12% of the past accident analysed can be classified as major accidents. According to the geographical distribution of 169 accidents, 96% of the accidents happened in Europe (163 over 169), most of the events took place in Germany (76%), while a lower amount were documented in France (11%), Italy (6%), and UK (2%) (Casson et al., 2016).

Generally, chemical accidents can be divided into toxic chemical leaks and explosions caused by fires (Davis, 2014; Krentowski, 2019; Lee, 2019; Okho, 2013). The reasons of biogas plant accidents are identified as five categories: a) leakage in the storage tank and/or in the distribution pipes of the biogas plant, b) fire and explosion as a result of CH<sub>4</sub> leakage, c) release of H<sub>2</sub>S from septic waste, d) high pressure inside the digester due to overflow or freezing of valves, e) environmental contamination by the release of effluent discharge (Kotek et al. 2015). Wang (2017) establishes a leakage risk monitoring and early-warning model for an anaerobic reactor of a biogas station by using modelling software. When an accident happens, its consequences are considered by its destructive force, as well as direct and indirect losses (Zhang, 2019). To reveal and reduce the consequences and the potential damage of explosions, researchers have focused on the flammable gas explosions (Amyotte, 2017; Lv, 2017). Several studies are modelling the consequences of fire, explosion and toxic dispersion by using different tools like PHAST (Process, Hazard, Analysis, Software Tool), ALOHA (Areal Locations of Hazardous Atmospheres, U.S. Protection Agency) and FLACS (Flame Acceleration Software) modelling programs (Dadashzadeh, 2013; Dasgotra, 2018; Hasani, 2016; Inanloo, 2015; Zareei, 2016). PHAST is one of the mostly used process hazard analysis software for process safety management in both design and operation parts. This software is outstanding with its wide applicability of process hazard analysis tool including various release types such as from leaks, pipework, pipelines, ruptures etc. The models in the software are extensively validated especially for process industry hazards. It is also possible to define different hazard types as explosions, fires, toxics and flammable, consider directional environmental effects such as wind or surface roughness. By using this software, exclusion zones and safe distances can be easily defined. ALOHA is another hazard modelling software which is widely used to get an insight on chemical/hazardous material emergencies. It is an open source program and available from the internet site (EPA, 2017). Properties of real or potential chemical/hazardous materials are given as an input to the software and threat zone estimates for different scenarios of hazards can be estimated. Toxic gas clouds, flammable gas clouds, jet fires, pool fires and vapour cloud explosions can be modelled. In the given results, the red threat zone indicates the worst hazard level while the orange and yellow threat zones show the decreasing hazard zones.

In this study, the findings from the PHAST and ALOHA software are compared and combined to get an insight on health and safety problems occurred due to an explosion in a biogas station. In the literature, there are various studies including consequences analysis of hazardous chemicals by using PHAST and ALOHA software. Pandya et al. (2008) studied by the Fourier Amplitude Sensitivity Test to carry out a parametric sensitivity analysis of PHAST atmospheric dispersion modelling for an accidental toxic gas dispersion scenario. They studied the relative influence of uncertainty in independent input parameters on the variation of the model outputs. Several studies are also carried out by using ALOHA to be able to understand the threat of a chemical leakage to the residents in neighbouring area, air quality and occupational safety (Tseng et al., 2012). Tseng and co-workers (2012) investigated the dispersion of three important substances (chlorine, epichlorohydrin and phosgene) due to their critical threat to safety. By using ALOHA software, they were able to discover the threat zones, which demonstrate the scales of a toxic chemical release impact, in three different production plants in Taiwan. In another research, Çetinyokuş (2017) studied consequences analysis of hazardous chemicals which were flammable substance (methane), toxic liquid (ethylene diamine) and toxic gas (methyl chloride) by ALOHA software, and found that atmospheric options, especially wind speed, atmospheric stability class and ground roughness, had significant effects on the effect distances within the

threat zones for the selected three hazardous chemicals. Moreover, Trávníček et al. (2018) examined flare stacks on agricultural biogas plants by ALOHA software, and they found that the methane gas will be diluted more quickly at higher levels than ground level. Recently, Dou and co-workers (2020) evaluate the methane fraction on explosion characteristics of biogas/air mixture in a duct, and found that the PVC film thickness affected the explosion overpressure more, whereas the methane fraction in biogas affected the flame velocity.

Comparison of findings from both ALOHA and PHAST software and additionally Computational Fluid Dynamics (CFD) method is also carried out by various studies. Similarly, to the publications mentioned above, a consequence analysis is carried out for the storage tank of n-Butanol and its release from the tank by ALOHA (Bhattacharya & Kumar, 2015). In this work, the results are also compared with the PHAST software findings. It is suggested that PHAST results seem to be more realistic but the difference between the results are in an acceptable range as  $\pm 10\%$ . It is also possible to evaluate flammability and explosiveness of a stored chemical compound by ALOHA. Derychova and Bernatik carried out a study based on the risk assessment of biogas plants and designed accident scenarios including fire and explosion of biogas mixture in which methane is the major compound (Derychova & Bernatik, 2016). The first scenario is the pipeline leaking from the tank and methane is burning as a jet fire. The results indicate that the affected area is 35 m<sup>2</sup> including lethal zone, zone of 2nd degree burns and zone of injuries. In the second scenario, methane leakage occurs by the leak pipe and leaking methane is not ignited. These two scenarios are mentioned as possible leaks from a biogas tank and the results are critical to diminish the rate of accidents. Carboni and co-workers are investigated the accidental release of several biogas mixtures resulting in flash fire and toxic cloud dispersion and modelled by PHAST and CFD software ANSYS Fluent (Carboni et al., 2020). Here, PHAST software and CFD approach are compared. Even the findings of CFD calculations are reliable by including a much more realistic approach, implementation of plant geometry brings higher computational cost than PHAST.

Biogas is a general term of gas produced by anaerobic fermentation in an organic waste. It is necessary to know the percentage of biogas in a station to model the explosion limits. Although the composition of biogas depends on the introduced organic materials and the process conditions on the biogas station, raw biogas mainly consists of methane (50 mol% to 80 mol%), carbon dioxide (20 mol% to 50 mol%), water vapour (0 mol% to 12 mol%), nitrogen (0 mol% to 5 mol%), oxygen (0 mol% to 2 mol%), hydrogen sulfide (0.01 mol% to 0.04 mol%) and traces of ammonia, hydrogen and higher hydrocarbons (Schoder et al. 2014). The design and technology of biogas plants differ according to the size, function, location, and feedstock of biomass. The biogas stations can be classified as a) family-scale biogas plants (very small scale), b) farm-scale biogas plants (small or medium to large scale), c) centralized/ joint co-digestion plants (medium to large scale) (Al Seadi, 2008). Biogas production is expected to be stable and constant. However, inside the digester, biogas is formed in fluctuating quantities and the demand for biogas can vary during the day. To ensure stable biogas utilization, various types of storage facilities are available. Generally, for industrial type, larger biogas plants, separate external biogas storage tanks are established, and these types of pressurized tanks are made of steel and have pressures between 5 and 250 bar (Al Seadi, 2008). The hazards that may occur as a result of a possible accident and explosion in a biogas plant will change according to its technology and design.

The aim of this study is to analyse the explosion and toxic effects due to potential accidents in a large-scale industrial type biogas station. A large-scale biogas station is chosen to be modelled, since the explosion of such a station will be more destructive than the others. For this purpose, two different modelling programs as ALOHA and PHAST software tools are used to simulate two different scenarios in a biogas plant; a leakage scenario from a biogas tank and flammable chemicals escaping directly into the atmosphere. The properties of a biogas storage tank and its environment are given as inputs to the software. Since major component of a biogas mixture is methane, the calculations are carried out assuming the only component is methane in the tank. Afterward, the explosion hazards of a methane storage tank in a large-scale biogas station are examined.



## 2. Materials and Methods

In this research, the explosion hazards of an external methane storage tank in a large-scale biogas station are demonstrated by two different modelling programs. ALOHA version 5.4.7 Software and PHAST version 7.2 are used to predict different explosion scenarios and thus to estimate the effects of a methane gas explosion.

### 2.1. ALOHA Software

ALOHA is a computer modelling tool to estimate the movement and dispersion of hazardous chemical gases, and to predict the rates at which gases may escape into the atmosphere from broken gas pipes, leaking tanks, and evaporating puddles, and hazardous gas cloud dispersion to the atmosphere after an accidental chemical release ([EPA, 2017](#)). ALOHA can also be used to predict the area where a flammable gas may explode by using the physical characteristics of the released chemical and the real-time circumstances of the release scenario to predict the dispersion of a hazardous gas cloud.

ALOHA software can evaluate the consequences of explosion and atmospheric releases of chemical species parameters by selection of meteorological conditions, rural and urban areas etc. Graphical outputs include a "threat zone" that can be plotted on maps with MARPLOT to display the location of other facilities storing hazardous materials and vulnerable locations ([EPA, 2017](#)).

ALOHA provides for the source options as direct, puddle, tank, or pipe. Puddle option is selected when the source is a liquid puddle of constant radius. The liquid can be either a normal evaporating liquid, or a boiling liquid. Tank option is selected when the source is a horizontal or vertical cylinder, or a spherical tank at ground level with a single hole. The tank initially contains a gas, a liquid, or a liquefied gas. The contents can change phase as a result of temperature and/or pressure changes. Pipe option is selected when the source is a pressurized pipe containing gas with a single hole at ground level. The direct source is a point release and can be either a continuous emission of rate or an instantaneous release of total mass. For a direct release type as instantaneous or continuous release, total mass, mass flow rate, and source height must be provided ([Bhattacharya and Kumar, 2015](#)).

As mentioned above, very detailed description of input properties are given to the software. However, there are some limitations of the software: i. It assumes that the chemical compound is mixed with air as an immediate process, ii. It has no capability to detect the end products, i.e. smoke, particulate matter, radioactive particles. iii. It assumes that the wind speed and wind direction are constant during the simulation run ([Yadav et al., 2020](#)).

### 2.2. PHAST Software

PHAST is a comprehensive hazard analysis package and investigate a chemical process incident from initial release through formation of a cloud or pool to final dispersion calculating concentration, fire radiation, toxicity and explosion overpressure, and catastrophic rupture regions in 3D ([Naemnezhad et al., 2017](#)).

PHAST software can consider the interaction of the flammable cloud and identified of congestion by using TNT equivalency model ([Mannan, 2012](#)), or the Multi-Energy model ([Van den Berg, 1985](#)) or Baker Strehlow Tang model ([Baker et al., 1996](#)).

PHAST generates blast parameters for overpressure and display as contours or in tabular reports and develop combined hazard contours in the explosion modelling software for a range scenarios and hazard types as explosions, fires, toxics and flammable clouds. The program takes into account the directional aspects that can influence the explosion modelling outcome like wind or surface roughness ([DNV GL, 2018](#)).



In PHAST there are limitations in the handling of dispersion modelling for an instantaneous leak. In this case, the vapour dispersed from the tank would be added into the very small instantaneous cloud and the dispersion results would demonstrate the properties of an instantaneous cloud. In order to model a continuous leak, the series of representative vaporization segments are used ([DNV GL., 2018](#)).

### **2.3. Case Study**

ALOHA and PHAST software programs are used as risk modelling tools and designed to assess the development of potential accidents, from the initial leak point, the spread of the hazardous substance, to analyse the explosion and toxic effects. Two different scenarios are evaluated by the Gaussian model for predictions by using ALOHA Software: a) a leakage scenario from biogas tank, b) flammable chemical escaping directly into the atmosphere. In addition to that, two different explosion scenarios are run by PHAST Software Tool a) a leakage scenario from a biogas storage tank, b) a catastrophic rupture scenario.

These software contain several important critical input items to analyse the outcome modelling of accident scenarios. One of the most critical input parameters is represented by weather conditions. Meteorological stability, seasonal temperatures, humidity, wind speed and direction play a very important role in modelling such accidents. In case of ALOHA program, wind speed is selected as 2 meters/second and from South to West. Cloud cover is partly cloudy. The air temperature is 25°C. Stability class selected as B. In case of PHAST program, three different weather conditions are chosen as 2F, 2B and 2D. 2F indicates that wind speed is 2 m/s, and stability class is F means night-time conditions moderate cloudiness and light/moderate wind. 2B shows that wind speed is 2 m/s, and stability class is B means solar insolation is moderate and windy. 2D displays that wind speed is 2 m/s, and stability class is D shows a little sun and high wind overcast or windy night.

Additionally, risk assessment is largely influenced by the amount and type of material involved, which is also an important factor in the calculation of accidents. As shown in [Table 1](#), in both Software, the biogas storage tank contains methane gas at a pressure of 15 bar and a temperature of 25 °C. The tank is made of steel with a 10 m diameter and 12.70 m length. The results of the three modelling programs are presented in graphical forms.

Table 1  
Input Data of ALOHA and PHAST Programs

| Parameters                                     | ALOHA Data  | PHAST Data  |
|--|---|---|
| Local Information                              | Turkey, Istanbul                                    | Turkey, Istanbul                                    |
| Building type / Type of terrain for dispersion | Single storage, unsheltered surroundings            | Land  |
| Material                                       | Methane gas   | Methane gas   |
| Tank type                                      | Pressurized cylindrical vessel                      | Pressurized cylindrical vessel                      |
| Tank diameter                                  | 10 m  | 10 m  |
| Tank length                                    | 12.73 m   | 12.73 m   |
| Tank Volume                                    | 1000 m <sup>3</sup> (700 m <sup>3</sup> , 70% full) | 1000 m <sup>3</sup> (700 m <sup>3</sup> , 70% full) |
| Mass of compound                               | 437 kg (70% full)                                   | 437 kg (70% full)                                   |
| Wind speed, direction / Stability Class        | 2 m/s South to West / B                             | 2F, 2B and 2F                                       |
| Measurement height                             | 3 m above ground                                    | 3 m above ground                                    |
| Ambient Temperature                            | 25 °C   | 25 °C   |
| Humidity                                       | % 50  | % 50  |
| Temperature inside tank                        | 25 °C   | 25 °C   |
| Tank Pressure                                  | 15 bar  | 15 bar  |
| Leak type, dimension                           | Circular opening 25 mm                              | Circular opening 25 mm                              |

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. ALOHA Results

In the ALOHA program, local information for a biogas tank source is chosen as Istanbul, Turkey. Building type is selected as single stored and unsheltered surroundings. Even though biogas is a mixture of gases, methane is selected as a pure chemical due to the limitations of the ALOHA program. ALOHA is designed to model the release and dispersion of pure chemicals and a few select solutions; the property information in its chemical library is not valid for mixtures of chemicals. Since the methane percentage in large scale biogas plants can reach up to 80%, it was decided to use the ALOHA program.

Most of the biogas production plants are of small or medium scale, however the major accidents happened in large scale industrial type biogas stations. For this reason, a tank volume of 1000 m<sup>3</sup> has been chosen. The region of this study was chosen as Istanbul because there are large-scale biogas power plants in Istanbul. In PHAST program, different wind speeds were selected in the study in order to analyse the results of toxic distribution and effects in more detail. Since the region was not selected in PHAST program, the results would not change if a different region was selected. However, in the ALOHA program, a region and city selection are made, and since ALOHA takes the wind situation of that region into account, the result would have changed if another location was selected.

Two different scenarios are run by the Gaussian model for predictions. The first one is a leakage scenario from a biogas tank. The second one is flammable chemicals escaping directly into the atmosphere. The atmospheric conditions envisaged for two of the scenarios are the same. Wind speed is selected as 2 meters/second and

from South to West. Measurement height is 3 m above ground. Ground roughness is an open country. Cloud cover is partly cloudy. The air temperature is 25°C. Stability class is automatically chosen according to date, time, weather conditions, and cloud cover and in these scenarios, it is selected as B. Inversion height option is selected as no inversion. Humidity is chosen 50% as a medium.

Scenario 1 is the leakage of gas from a biogas storage tank containing methane as a flammable gas. During the selection of tank type, the following parameters are given as output. The tank type is a vertical cylinder with 10 m diameter, 12.70 m length, 1000 m<sup>3</sup> by volume. The tank contains methane gas-only and is 70 % full. The temperature of the tank is at 25 °C. The internal tank pressure is 15 bar. Tank pressure unusually high alert is given. Release duration is limited at 1 hour and the maximum average sustained release rate is 45.9 kilograms/minute. The gas is leaking from the tank through a circular hole with a 25 mm diameter and the chemical is not burning as it escapes to the atmosphere. There are three major potential hazards from flammable chemical as it leaks from the tank; a.) Downwind toxic effects, b.) Vapour cloud flash fire, c.) Overpressure (blast force) from a vapour cloud explosion.

In case of the toxic effect area of the vapour cloud, the threat zone is not drawn because the effects of near-field patch lines make dispersion predictions less reliable for short distances. In case of the flammable area of vapour cloud, Figure 1a shows that local areas of flame can occur even though the average concentration is below the lower explosion level (LEL). ALOHA finds the flammable area by using 60% and %10 of the LEL 25m and 62m, respectively. Figure 1b shows the blast area of vapour cloud explosion. The time of vapour cloud ignition is selected as unknown and the vapour cloud is ignited by detonation. The level of congestion is chosen as difficult to walk through (e.g. pipe rack, dense forest). When the overpressure is greater than 8.0 psi, the (red) area with 74 meters' diameter is affected by the destruction of buildings. As the overpressure is greater than 3.5 psi, the (orange) area with 97 meters' diameter is caused by serious injury likely. At the time the overpressure is greater than 1.0 psi, the (yellow) area with 184 meters is affected like shattering glasses.

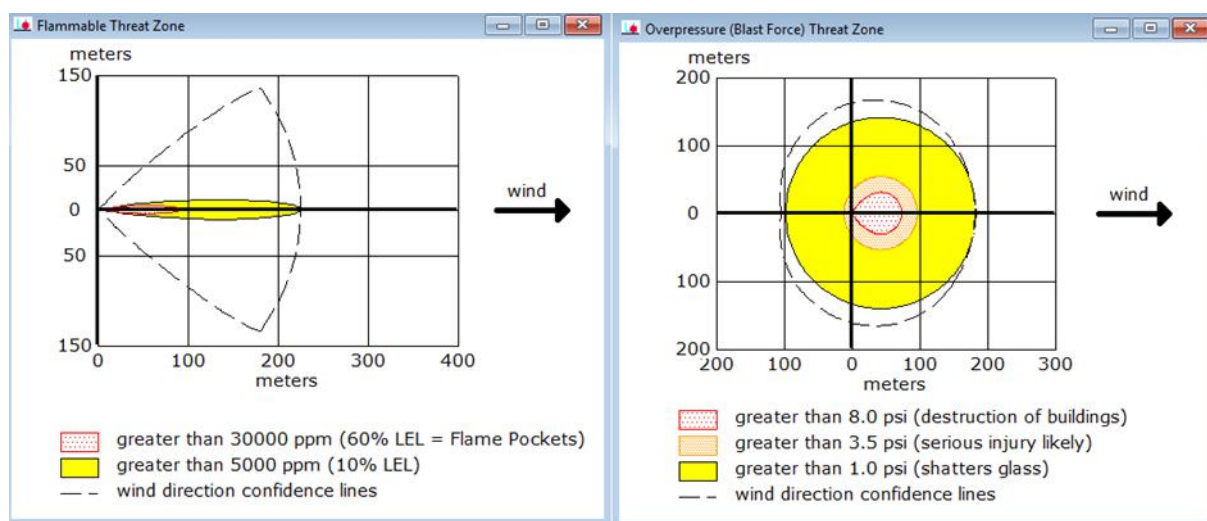


Figure 1. a) Flammable Threat Zone Overpressure, b) Overpressure (Blast Force) Threat Zone for Scenario 1 by ALOHA

Scenario 2 is flammable chemical (methane gas) escaping directly into the atmosphere and the chemical is not on fire. The source height is zero. Release duration is limited at 1 hour and the maximum average sustained release rate is 45.9 kilograms/minute. There are three major potential hazard scenarios; a.) Toxic area of the vapour cloud, b.) Flammable area of the vapour cloud, c.) Blast area of vapour cloud explosion. Figure 2a shows the toxic threat zone in terms of public exposure guideline system like PAC. The maximum distance for PAC-1, PAC-2 and PAC-3 is 52 m., 69m., and 130m., respectively. Figure 2b presents the flammable threat

zone. Local areas of flame can occur even though the average concentration is below the LEL. The simulation finds the flammable area of vapour cloud by using 60% of the LEL as red 271 meters (30000 ppm = 60% LEL = Flame Pockets) and % 10 of the LEL as yellow 600 meters (5000 ppm = 10% LEL). Figure 2c demonstrates the blast force threat zone ignited by spark or flame. The LOC values on red and orange regions do not exceed, so the destruction of buildings or serious injury likely will not happen in this scenario. However, the yellow region shows that an effect like shattering glasses observed in an area of 22 meters' diameter.

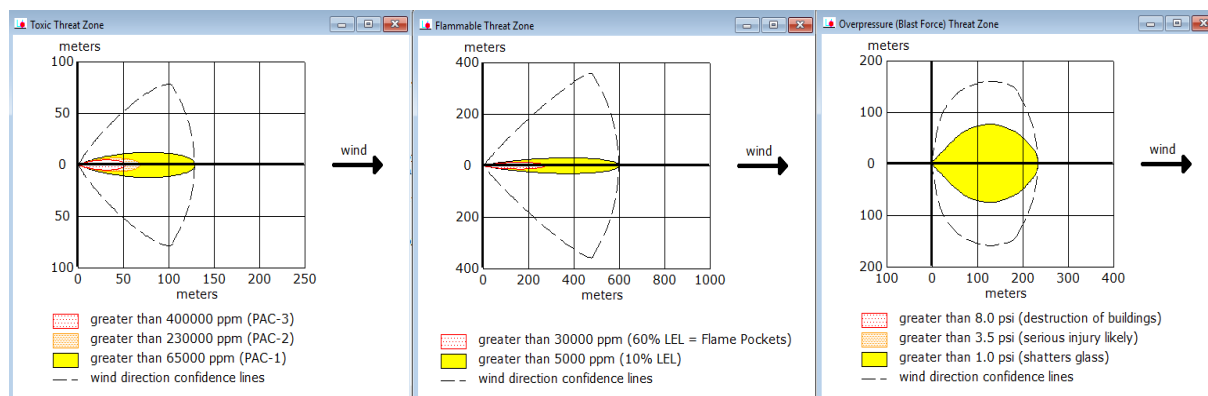


Figure 2. a) Toxic Threat Zone; b) Flammable Treat Zone; c) Overpressure (Blast Force) Treat Zone for Scenario 2 by ALOHA

### 3.1.1. Effect of Ambient Temperature and Wind Speed Analysis

The extreme weather conditions are also considered by ALOHA software in order to understand the effect of these conditions on the explosion results. For this purpose, the worst weather conditions in the last 90 years are gathered from Turkish State Meteorological Service. The investigated weather conditions are given in Supplementary Materials.

The wind speed is taken as about 32 m/s as a worst case of wind speed found in the reference of Turkish State Meteorological Service. In all calculations tank temperature are given as 25°C. The findings indicated that threat zone of vapour cloud is less than 10 m. Flammable area of vapour cloud seems to be depended on the ambient weather condition and ranging between 11 m (30000 ppm) – 31 m (5000 ppm). In all four lowest temperature values no explosion is predicted. However, for the highest temperature conditions the explosion might cause to shatter glasses less than 10 meters of the tank. The findings show that a change in the extreme ambient temperature values might not cause significant difference in the threat zone and flammable area.

### 3.2. PHAST Results

In this study, two different explosion scenarios are designed by PHAST Software Tool. The first one is a leakage scenario from the biogas storage tank. The second one is a catastrophic rupture scenario. The biogas storage tank is chosen as a pressurized vessel filled by methane gas. Three different weather conditions are chosen as 2F, 2B and 2D.

Scenario one is a leakage scenario from the biogas storage tank. Figure 3a demonstrates the maximum radiation at 8.04 m with an intensity of 44.64 kW/m<sup>2</sup>. Figure 3b shows the explosion worst-case radii for dispersion at downwind distance as 29.50m, 28.41m and 28.78m at category 2F, category 2B and category 2D respectively. Even the category 2F has the worst case, the values are very close to each other.

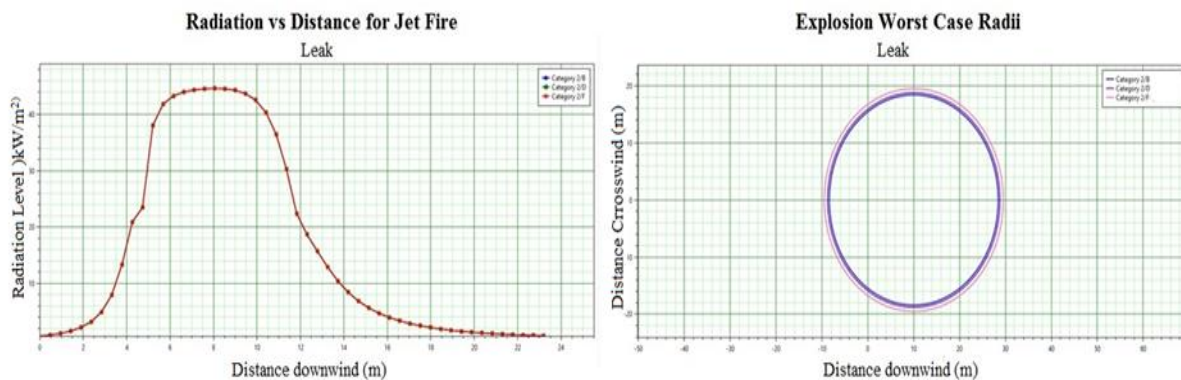


Figure 3. a) Radiation distance for fireball; b) the explosion worst-case radii for dispersion at downwind distance

Scenario two is a catastrophic rupture scenario. Figure 4a displays a maximum cloud footprint in case of catastrophic rupture at three different categories as category 2F (5.072 m<sup>2</sup>), category 2B (4.926 m<sup>2</sup>) and category 2D (5.014 m<sup>2</sup>). Figure 4b shows radiation distance for fireball and maximum radiation is 388kW/m<sup>2</sup> at 8.66m. Figure 4c displays explosion worst-case radii at downwind distance in category 2F (721 m), category 2B (674 m), category 2D (711 m). In this scenario, the worst-case radius is at category 2F.

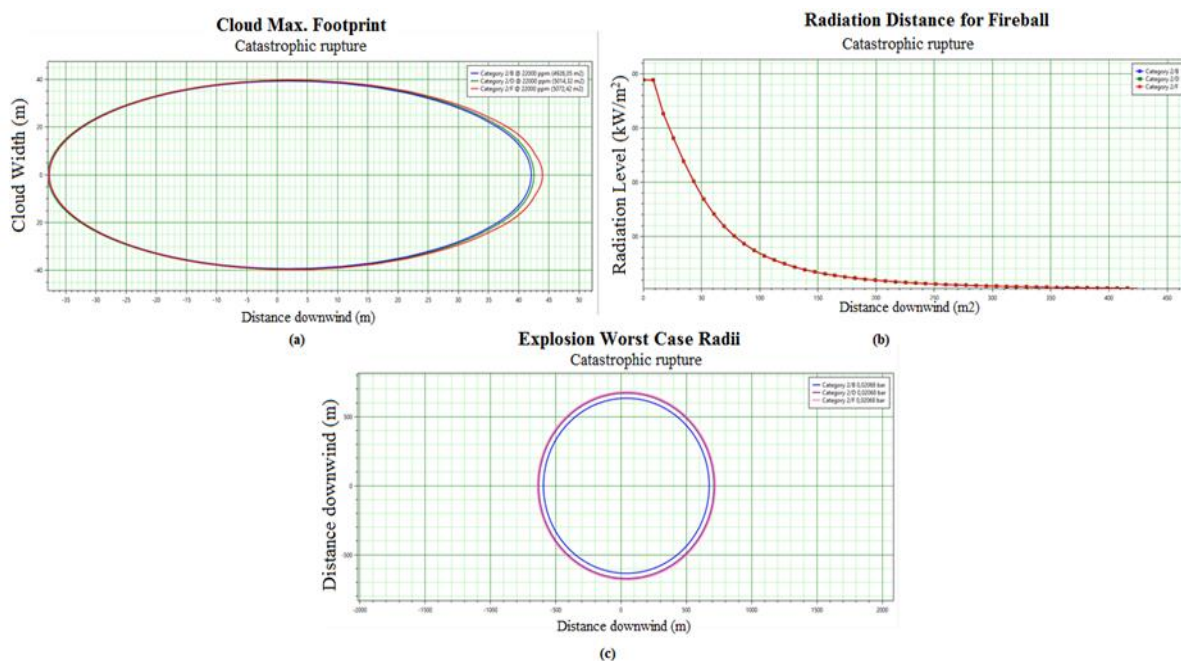


Figure 4. a) Maximum cloud footprint in case of catastrophic rupture; b) radiation distance for fireball; c) explosion worst-case radii

Combining the findings from ALOHA and PHAST provided us to analyse the location, layout and impact range of explosion and dispersion comprehensively. In case of the toxic effect area of vapour cloud in 2B weather conditions, the explosion's worst influence range is approximately 25m by ALOHA and 28m by PHAST Software. The catastrophic rupture scenario is a model in which the tank is destroyed by a quick impact. According to the second scenario of PHAST, a large amount of energy (388 kW/m<sup>2</sup>) is produced at 8.66m for fireball case.



#### 4. Conclusion

Safety in biogas plants is very significant ([Molnarne and Schroeder, 2019](#)). The biogas production plants are known to be responsible for several accidents ([Moreno and Cozzani, 2015](#); [Schroder et al., 2014](#); [Sasso, 2012](#)). The European Commission has assessed the regions of the world that primarily use bioenergy and considers biogas to be a highly flammable mixture ([Casson et al., 2016](#); [Trávníček et al., 2018](#)). The role of safety regulations should be revised and improved since there is a need for the statistical investigation of accidents, consequence modelling and analysis of explosions ([Kotek et al. 2015](#)). Although biogas tank explosions are not common, the results of such kind of explosions are very hazardous. ([Boscolo et al., 2019](#); [Casson et al., 2018](#); [Trávníček et al., 2018](#)). Pietrangeli et al. ([2013](#)) stated that the risk of explosion is particularly high close to overpressure safety devices like digesters and gasholders in a biogas plant. Therefore, in this study, preliminary calculations are carried out to explore effects of possible explosions in a large-scale industrial type biogas station.

According to the ALOHA software results of the leakage scenario from the biogas tank; the explosions may cause dangers like demolition of buildings at 74 m limit, serious injuries at 97 m limit and shattering of glasses at 184 m limit. In the examination of the flammable chemical spreading directly into the atmosphere, the destruction of buildings or serious injury likely will not happen but shattering of glasses will occur within the 22 m limit. Locations where the flammable chemical vapour lower explosion limit is 60% and 10% are observed in the range of 271 and 600 m respectively. In the first scenario of the PHAST software (leakage from the biogas storage tank), the studies performed in three different weather conditions give very close results and it is observed that the danger zone limits are lower than the first scenario of ALOHA. The second scenario of PHAST software belongs to a more serious catastrophic rupture, and the hazard zone limits are observed to be wider than all scenarios. When all the results are examined together, it has been observed that the use of software based on different models will be useful in estimating the impact areas of dangerous explosions that may be encountered in a biogas station.

The explosion modelling programs like ALOHA and PHAST will foresee the consequences of accidents ([Hasani, 2016](#); [Inanloo, 2015](#); [Zareei, 2016](#)). Several difficulties come out during the comparison of the models due to the differences in output values of different software. The geometrical effects of the programs contribute to differences between simulation tools. Buildings, terrain and geometry, in general, will have recirculation zones that will influence the local air movements. Despite the differences, the results of the programs used in this study will be useful for companies in emergency plans, fire departments, civil defence units of municipalities and governments. The explosion modelling software can be used for accident investigations. Another application area of these software could be the determination of dangerous and safe areas in biogas power plants. Thus in emergency drills, the workers could be informed about the determined dangerous areas and how to behave in case of an explosion. Several possible scenarios could be modelled without doing hazardous experiments.

#### Acknowledgement

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### Author Contributions

Müge Ensari Özay: Collected data, designed study, performed software analysis and wrote the paper.

Peln Güzel: Collected data, performed software analysis and wrote the paper.

Emine Can: Conceived and designed the analysis.



## Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Al Seadi, T., Rutz, D., Prassl, H., Köttner, M., Finsterwalder, T., Volk, S., & Janssen, R. (2008). *Biogas Handbook, University of Southern Denmark Esbjerg, Denmark*. Retrieved from <https://www.lemvigbiogas.com/BiogasHandbook.pdf>
- Amyotte, P., & Lupien, C. (2017). Different hazards, similar causes same results. *Loss Prevention Bulletin*, 253, 14–18.
- Arıkan B., (2008). *Organik Evsel Katı Atıklardan Anaerobik Ortamda Biyogaz Üretiminin Verimliliğinin Araştırılması*. (Master's thesis). . Çukurova Üniversitesi, Adana, Turkey. Retrieved from: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>
- Baker, Q.A., Tang, M.J., Scheier, E.A., & Silva, G.J., (1996). Vapour cloud explosion analysis. *Process Safety Progress*, 15 (2), 106-109. DOI: <https://doi.org/10.1002/prs.680150211>
- Bhattacharya, R., & Ganesh Kumar, V. (2015). Consequence analysis for simulation of hazardous chemicals release using ALOHA software. *International Journal of ChemTech Research*, 8(4), 2038-2046.
- Bilici, E. N., (2019). Occupational Health and Safety Management Systems Application in Biogas Plant, Master Thesis, Uskudar University. Retrieved from: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>
- Boscolo, M., Bregant, L., Miani, S., Padoano, E., & Piller, M. (2019). An enquiry into the causes of an explosion accident occurred in a biogas plant. *Process Safety Progress*, 12063. DOI: <https://doi.org/10.1002/prs.12063>
- Carboni, M., Pio, G., Vianello, C., & Salzano, E. (2020). Safety distances for the sour biogas in digestion plants. *Process Safety And Environmental Protection*, 147, 1-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.09.025>
- Casson, M. V., Papisidero, S., Scarponi, G. E., et al., (2016). Analysis of accidents in biogas production and upgrading. *Renewable Energy*, 96, 1127–1134. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.10.017>
- Çetinyokuş, S . (2017). Sonuç analizi ile belirlenen etki mesafeleri üzerine atmosferik seçimlerin etkisi (ALOHA yazılımı). *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17 (1), 209-217. DOI: <https://doi.org/10.5578/fmbd.52776>
- Dadashzadeh, M., Khan, F., Hawboldt, K., & Amyotte, P. (2013). An integrated approach for fire and explosion consequence modelling. *Fire Safety Journal*, 61, 324–337. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.firesaf.2013.09.015>
- Dasgotra, A., Varun Teja, G. V. V., Sharma, A., & Mishra, K. B. (2018). CFD modelling of large-scale flammable cloud dispersion using FLACS. *Journal of Loss Prevention in the Process Industries*, 56, 531–536. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2018.01.001>
- Davis, S. G., Engel, D., Gavelli, F., Hinze, P., & Hansen, O. R. (2014). Advanced methods for determining the origin of vapor cloud explosions case study: The 2006 Danvers explosion investigation. *Fire Technology*, 50(4), 823–850. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10694-012-0305-6>
- Derychova, K., & Bernatik, A. (2016, April). Risk assessment of biogas plants. *Proceedings of the 1st International Conference on Applied Mathematics in Engineering and Reliability*, Ho Chi Minh City, Vietnam.

- DNV GL., (2018). PHAST 3D Explosion Flier. Retrieved from: <https://www.dnvgl.com/software/services/phast/phast-module-3d-explosions.html>
- Dou, Z., Zheng, L., Zheng, K., Pan, R., Yang, W., & Fu, Y., (2020). Effect of film thickness and methane fraction on explosion characteristics of biogas/air mixture in a duct. *Process Safety and Environmental Protection*, 139, 26-35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.04.006>
- EPA. (2017). ALOHA Software. Retrieved from: <https://www.epa.gov/cameo/aloha-software>
- Hasani F., & Nader N., (2016). Consequence modelling and analysis of gas export compression unit using PHAST software, *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 7 (5), 1344-1349.
- Inanloo, B., & Tansel, B. (2015). Explosion impacts during transport of hazardous cargo: GIS-based characterization of overpressure impacts and delineation of flammable zones for ammonia. *Journal of Environmental Management*, 156, 1–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.02.044>
- Kotek, L., Trávníček, P., & Blecha, P. (2015). Accident analysis of european biogas stations. *Chemical Engineering Transactions*, 43, 1933–1938. DOI: <https://doi.org/10.3303/CET1543323>
- Köse, T. E. (2017). Trakya bölgesinde hayvan gübrelerinin biyogaz enerji potansiyelinin belirlenmesi ve sayısal haritaların oluşturulması, *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilim Dergisi*, Denizli
- Krentowski, J., & Ziminski, K. (2019). Consequences of an incorrect assessment of a structure damaged by explosion. *Engineering Failure Analysis*, 101, 135–144. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.engfailanal.2019.03.009>
- Lee, H. E., Yoon, S. J., Sohn, J. R., Huh, D. A., Lee, B. W., & Moon, K. W. (2019). Flammable substances in Korea considering the domino effect: Assessment of safety distance. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(6). DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph16060969>
- Ly, D., Tan, W., Liu, L., Zhu, G., & Peng, L. (2017). Research on maximum explosion overpressure in LNG storage tank areas. *Journal of Loss Prevention in the Process Industries*, 49, 162–170. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2017.06.010>
- Mannan, M. S., (2012). *Lees' Loss Prevention in the Process Industries: Hazard Identification, Assessment and Control*. (4th ed.). Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2009-0-24104-3>
- Molnarne, M., & Schroeder, V. (2019). Hazardous properties of hydrogen and hydrogen containing fuel gases. *Process Safety and Environmental Protection*. 130, 1–5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.07.012>
- Moreno, V.C., & Cozzani, V., 2015. Major accident hazard in bioenergy production. *Journal of Loss Prevention in the Process Industries*, 35, 135–144. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2015.04.004>
- Naemnezhad, A., Isari, A.A., Khayer, E. et al. (2017). Consequence assessment of separator explosion for an oil production platform in south of Iran with PHAST software. *Modelling Earth Systems and Environment*, 3, 43. DOI: <https://doi-org.proxy.uskudar.edu.tr/10.1007/s40808-017-0297-9>
- Okho, P., & Haugen, S. (2013). Maintenance-related major accidents: Classification of cause and case study. *Journal of Loss Prevention and Process Industry*, 26, 1060–1070. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2013.04.002>
- Pandya, N., & Marsden, E. (2008). Toxic release dispersion modelling with PHAST: Parametric sensitivity analysis. *3rd International Conference on Safety & Environment in Process Industry*, Italy.
- Pietrangeli, B., Lauri, R., & Bragatto, P. (2013). Safe operation of biogas plants in Italy. *Chemical Engineering Transactions*. 32, 199–204. DOI: <https://doi.org/10.3303/CET1332034>

- Yadav, R., Chaudhary, S., Yadav, B. P., Varadharajan, S., & Tauseef, S. M. (2020). Assessment of Accidental Release of Ethanol and Its Dangerous Consequences Using ALOHA, *Advances in Industrial Safety*, Springer Singapore.
- Sasso S., Laterza E., & Valenzano. B. (2012). A Study about explosion hazards in presence of an uncontrolled anaerobic digestive process. *Chemical Engineering Transactions*, 26, 135-140. DOI: <https://doi.org/10.3303/CET1226023>
- Schroder, V., Schalau, B., & Molnarne, M. (2014). Explosion protection in biogas and hybrid power plants. *Procedia Engineering*, 84, 259-272. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2014.10.433>
- Trávníček, P., Kotek, L., Nejtek V., Koutný T., Junga P., & Vítěz T. (2018). Quantitative analyses of biogas plant accidents in Europe. *Renewable Energy*, 122, 89–97. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.01.077>
- Tseng, J. M., Su, T. S., & Kuo, C. Y. (2012). Consequence evaluation of toxic chemical releases by ALOHA. *Procedia Engineering*, 45, 384-389. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.08.175>
- Van der Berg, A.C. (1985). The multi-energy method: A framework for vapour cloud explosion blast prediction. *Journal of Hazardous Materials*, 12, 1-10.
- Wang, Y., Zhang, R., Zhang, Z., & Wang, F. (2017). Leakage risk quantitative calculation model and its application for anaerobic reactor. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 77, 152–160. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.04.038>
- Zareei, H., Nikou M. K., & Shariati A. (2016). A consequence analysis of the explosion of spherical tanks containing liquefied petroleum gas (LPG). *Iranian Journal of Oil & Gas Science and Technology*, 5 (3), 32-44.
- Zhang, Q., Zhou, G., Hu, Y., Wang, S., Sun, B., Yin, W., & Guo, F. (2019). Risk evaluation and analysis of a gas tank explosion based on a vapor cloud explosion model: A case study. *Engineering Failure Analysis*, 101, 22–35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.engfailanal.2019.03.003>

## Supplementary Materials

The worst weather conditions in the last 90 years are considered for the calculations carried out by ALOHA software. The weather conditions are given in Table S.1. The weather conditions were taken from the official site of the government (<https://www.mgm.gov.tr/veridegerlendirme/il-ve-ilceler-istatistik.aspx?m=ISTANBUL>).

Table S.1. Input Data for the worst weather conditions in the last 90 years

| Parameters                                     | ALOHA Data  |
|--|---|
| Local Information                              | Turkey, Istanbul  |
| Building type / Type of terrain for dispersion | Single storage, unsheltered surroundings  |
| Material                                       | Methane gas   |
| Tank type                                      | Pressurized cylindrical vessel  |
| Tank diameter                                  | 10 m  |
| Tank length                                    | 12,73 m   |
| Tank Volume                                    | 1000 m <sup>3</sup> (700 m <sup>3</sup> , 70% full)   |
| Mass of compound                               | 437 kg (70% full)   |
| <b>Wind speed, direction / Stability Class</b> | <b>~ 32 m/s South to West / B</b>   |
| Measurement height                             | 3 m above ground  |
| <b>Ambient Temperature</b>                     | <b>Spring: 36.4 °C (Highest), -11.1 °C (Lowest)</b><br><b>Summer: 41.5 °C (Highest), 7.1 °C (Lowest)</b><br><b>Autumn: 39.6 °C (Highest), -7.2 °C (Lowest)</b><br><b>Winter: 25.5 °C (Highest), -16.1 °C (Lowest)</b> |
| Humidity                                       | % 50  |
| Temperature inside tank                        | 25 °C   |
| Tank Pressure                                  | 15 bar  |
| Leak type, dimension                           | Circular opening 25 mm  |

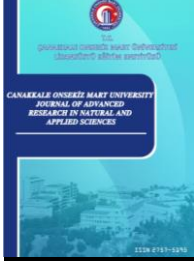
Table S.2. Threat zone information for the worst weather conditions in the last 90 years.

| Condition | Threat Zone of Vapor Cloud | Flammable Area of Vapor Cloud | Overpressure |
|-----------|----------------------------|-------------------------------|--------------|
|-----------|----------------------------|-------------------------------|--------------|

|                                    |   |   |  |
|------------------------------------|---|---|--|
| <b>36.4 °C (Highest in Spring)</b> | less than 10 meters<br>(400000 ppm = PAC-3)<br>less than 10 meters<br>(230000 ppm = PAC-2)<br>less than 10 meters<br>(65000 ppm = PAC-1)<br>Note: Threat zone was not drawn because effects of near-field patchiness make dispersion predictions less reliable for short distances. | 13 meters<br>(30000 ppm = 60% LEL = Flame Pockets)<br>31 meters<br>(5000 ppm = 10% LEL) | LOC (Level of congestion) was never exceeded (8.0 psi = destruction of buildings)<br>LOC was never exceeded (3.5 psi = serious injury likely)<br>less than 10 meters<br>(1.0 psi = shatters glass) |
| <b>-11.1 (Lowest in Spring)</b>    | less than 10 meters<br>(400000 ppm = PAC-3)<br>less than 10 meters<br>(230000 ppm = PAC-2)<br>less than 10 meters<br>(65000 ppm = PAC-1)  | 11 meters<br>(30000 ppm = 60% LEL = Flame Pockets)<br>28 meters<br>(5000 ppm = 10% LEL) | No explosion: no part of the cloud is above the LEL at any time  |
| <b>41.5 °C (Highest in Summer)</b> | less than 10 meters<br>(400000 ppm = PAC-3)<br>less than 10 meters<br>(230000 ppm = PAC-2)<br>less than 10 meters<br>(65000 ppm = PAC-1)  | 13 meters<br>(30000 ppm = 60% LEL = Flame Pockets)<br>31 meters<br>(5000 ppm = 10% LEL) | LOC (Level of congestion) was never exceeded (8.0 psi = destruction of buildings)<br>LOC was never exceeded (3.5 psi = serious injury likely)<br>less than 10 meters<br>(1.0 psi = shatters glass) |
| <b>7.1 °C (Lowest in Summer)</b>   | less than 10 meters<br>(400000 ppm = PAC-3)<br>less than 10 meters<br>(230000 ppm = PAC-2)<br>less than 10 meters<br>(65000 ppm = PAC-1)  | 12 meters<br>(30000 ppm = 60% LEL = Flame Pockets)<br>29 meters<br>(5000 ppm = 10% LEL) | No explosion: no part of the cloud is above the LEL at any time  |
| <b>39.6 °C (Highest in Autumn)</b> | less than 10 meters<br>(400000 ppm = PAC-3)<br>less than 10 meters<br>(230000 ppm = PAC-2)<br>less than 10 meters<br>(65000 ppm = PAC-1)  | 13 meters<br>(30000 ppm = 60% LEL = Flame Pockets)<br>31 meters<br>(5000 ppm = 10% LEL) | LOC (Level of congestion) was never exceeded (8.0 psi = destruction of buildings)<br>LOC was never exceeded (3.5 psi = serious injury likely)<br>less than 10 meters<br>(1.0 psi = shatters glass) |
| <b>-7.2 °C (Lowest in Autumn)</b>  | less than 10 meters<br>(400000 ppm = PAC-3)<br>less than 10 meters<br>(230000 ppm = PAC-2)<br>less than 10 meters<br>(65000 ppm = PAC-1)  | 11 meters<br>(30000 ppm = 60% LEL = Flame Pockets)<br>28 meters<br>(5000 ppm = 10% LEL) | No explosion: no part of the cloud is above the LEL at any time  |
| <b>25.5 °C (Highest in Autumn)</b> | less than 10 meters<br>(400000 ppm = PAC-3)<br>less than 10 meters<br>(230000 ppm = PAC-2)<br>less than 10 meters<br>(65000 ppm = PAC-1)  | 13 meters<br>(30000 ppm = 60% LEL = Flame Pockets)<br>30 meters<br>(5000 ppm = 10% LEL) | LOC (Level of congestion) was never exceeded (8.0 psi = destruction of buildings)<br>LOC was never exceeded (3.5 psi = serious injury likely)<br>less than 10 meters<br>(1.0 psi = shatters glass) |

|                                 |  |  |   |
|---------------------------------|--|--|---|
| <b>-16.1 (Lowest in Autumn)</b> | less than 10 meters<br>(400000 ppm = PAC-3)<br>less than 10 meters<br>(230000 ppm = PAC-2)<br>less than 10 meters<br>(65000 ppm = PAC-1) | 11 meters<br>(30000 ppm = 60% LEL<br>= Flame Pockets)<br>28 meters<br>(5000 ppm = 10% LEL) | No explosion: no part of the cloud is above the LEL at any time |
|---------------------------------|--|--|---|





## Ginkgo biloba Bitki Ekstraktı ile Muamele Edilmiş Kayısların Yapay Yolla Kurutulması ve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi

İrem Akbulut <sup>1\*</sup>, Elif Gürbüz <sup>1</sup>, Ahsen Rayman Ergün <sup>2</sup>, Taner Baysal <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gıda Mühendisliği Bölümü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye

<sup>2</sup>Gıda Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye

### Makale Tarihi

Gönderim: 13.12.2020  
Kabul: 23.02.2021  
Yayın: 20.03.2021

### Araştırma Makalesi

**Öz--***Ginkgo biloba* bitkisi antioksidan, antimikrobiyal ve antialerjenik özelliğe sahip olduğu için tıp ve gıda alanında kullanımı yaygınlaşmaktadır. Ülkemiz için önemli ihracat ürünlerinden kayısının kurutulmasında kükürtleme işlemi yapılmaktadır. Bu çalışmada kayısı kurutulmasında kullanılan kükürt yerine alternatif bir yöntem olarak *Ginkgo biloba* bitki ekstraktının uygulanması amaçlanmıştır. Bu amaçla *Ginkgo biloba* yaprakları farklı derişimdeki çözgenlerle ultras destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılarak ekstrakte edilmiştir. *Ginkgo biloba* ekstaksiyonu için üç farklı çözgen (%75 metanol, %75 etanol ve ultra saf su) ve iki farklı zaman parametresinde (15 ve 30 dakika) ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Toplam flavonoid madde miktarı %75 etanol ve 30 dakikalık ekstraksiyon sonucu en yüksek (756.78 mgQE/L) bulunmuştur. Elde edilen ekstrakttan hazırlanan 2000 ppmlik çözelti iki farklı grup (İzmir ve Iğdır) kayıslara püskürtülmüş ve kayıslar tepsili kurutucuda kurutulmuştur. 21 gün depolama süresince 7 günde bir fiziksel ve mikrobiyolojik analizler yapılmıştır. Mikrobiyolojik analizler sonucu her iki grupta da küf ve maya gelişimi gözlemlenmemiştir. Depolama sonunda renk (L\* 37.70, a\* 13.33, b\* 23.82), su aktivitesi (a<sub>w</sub> 0.50-0.59) ve nem değerleri (%7-14) en iyi korunan grubun İzmir grubu olduğu sonucuna varılmıştır. Iğdır grubu örneklerde ise depolama boyunca çignenebilirlik, sertlik, dayanıklılık gibi tekstürel özellikler İzmir grubu örneklerle kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak kayısı kurutulmasında kükürt dioksit yerine antioksidan özelliği yüksek, doğal ve bitkisel kaynak olan *Ginkgo biloba* ekstraktının kayıslarda kullanımının sanayide uygulanabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler** - Ekstraksiyon, *Ginkgo biloba*, kayısı, tekstür, tepsili kurutucu

## Drying of Apricots Treated with *Ginkgo biloba* Plant Extract and Determination of The Quality Properties

<sup>1</sup>Department of Food Engineering, Institute of Science, Ege University, Izmir, Turkey

<sup>2</sup>Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Ege University, Izmir, Turkey

### Article History

Received: 13.12.2020  
Accepted: 23.02.2021  
Published: 20.03.2021

### Research Article

**Abstract--***Ginkgo biloba* plant is becoming widespread in medicine and food industry because of its antioxidant, antimicrobial and antiallergenic properties. Apricot which is an important export product for our country, the sulfurization process is carried out in the drying process. In this study, it was aimed to apply the extract of *Ginkgo biloba* plant as an alternative to the sulfur in drying. For this purpose, *Ginkgo biloba* leaves were extracted with solvents of different concentrations using ultrasound assisted extraction method. Three different solvents (75% methanol, 75% ethanol and ultrapure water) and two different times (15 and 30 minutes) were applied. Total flavonoids were the highest after 75% ethanol and 30 minutes extraction (756.78 mgQE / L). 2000 ppm solution from the extract was sprayed to samples in two different types (Izmir and Iğdır) before drying in a tray dryer. Physical and microbiological analyses were made during 21 days of storage. As a result mold and yeast growth was not observed in both groups. At the end of storage, İzmir group protected the quality properties better via the color (L \* 37.70, a \* 13.33, b \* 23.82), water activity (a<sub>w</sub> 0.50-0.59) and moisture (7-14%). Iğdır group preserved its textural properties such as chewiness, hardness and resilience better than İzmir group during storage. As a result, it is thought that the use of *Ginkgo biloba* extract, which is a natural and herbal source with high antioxidant properties, in apricots instead of sulfur dioxide, can be applied in the industry.

**Key words** - Apricot, extraction, *Ginkgo biloba*, texture, tray drier

<sup>1</sup> [akbulutirem97@gmail.com](mailto:akbulutirem97@gmail.com)

<sup>2</sup> [elifgurbuz35@windowslive.com](mailto:elifgurbuz35@windowslive.com)

<sup>3</sup> [ahsenrayman@hotmail.com](mailto:ahsenrayman@hotmail.com)

<sup>4</sup> [taner.baysal@ege.edu.tr](mailto:taner.baysal@ege.edu.tr)

\*Sorumlu Yazar / Corresponding Author

## 1. Giriş

Kayısı, *Prunus armeniaca* L. olarak bilinen botanik adı ile *Rosaceae* familyasının *Prunoidae* alt familyasının *Prunus* türü altında sınıflandırılmış olup sert çekirdekli meyveler grubuna dahil klimakterik bir meyve türüdür (Gezer, Haciseferoğulları ve Demir, 2002; Cengiz, 2011). Türkiye’de, kayısı yetiştiriciliği ve kurutulması önemlidir. Ancak kayısının hasat dönemi ve yaş olarak kayısı tüketimi süresi kısadır (Asma, Kan, Birhanlı, Abacı ve Erdoğan, 2007). Meyve hasat döneminin sınırlı olması, meyve solunumunun orta düzeyde olması, meyvelerin uygun depolama koşullarında en fazla 1-4 haftalık bir zaman diliminde depolanabilmesi, meyvelerin dayanıksız ve kolay bozulabilir olması yaş halde tüketimi sınırlandırmaktadır (Çalhan, 2010). Depolama süresini uzatmak, kayıyı mekanik ve mikrobiyolojik hasarlardan korumak amacıyla kurutma işlemi uygulanmaktadır (Karaçalı, 2006).

Altın sarısı renk, kuru kayısı üretiminde en önemli aşamadır. Kurutma yardımcı maddesi olarak sülfite formunda kükürt kullanılmaktadır. Kükürtleme işlemi sırasında kullanılan kükürt; kayıılarda kurutma ve depolama sırasında meydana gelen enzimatik ve enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarını önlemektedir (Uğur, 2015). Ayrıca antioksidan özelliği sayesinde oksidatif bozulmaları önlemekte ve ürün kalitesini olumsuz yönde etkileyen bazı enzimleri (oksidaz, proteaz ve peroksidaz) inhibe etmektedir. Antimikrobiyel özelliği sayesinde de özellikle maya ve küflerin gelişimini engellemede çok önemli katkılara sahiptir. Kuru kayıılarda, izin verilen SO<sub>2</sub> miktarı genelde maksimum 2000 ppm olarak kabul edilmiştir (Anonim, 2013; Codex Alimentarius Commission, 2019). Bu değer ülkelere göre farklılık göstermektedir. Ancak SO<sub>2</sub> miktarı artıkça, ürüne ve kükürtleme işlemi yapan işçiye zarar verdiği yapılan literatür araştırmalarınca kanıtlanmıştır. Tıp alanında göğüs hastalıkları anabilim dalında yapılan bir araştırmada kükürtleme işlemi yapan işçiler üzerinde yaptığı çalışmada, kayısı kurutmasında yardımcı madde olarak kullanılan kükürtün etkisi incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda; SO<sub>2</sub> ye maruz kalan işçilerde, bir takım sağlık sorunları (gözlerde kaşıntı, nefes darlığı, öksürük, burun akıntısı, burun tıkanıklığı, boğazda kaşıntı ve ateş hissi) gözlemlenmiştir (Köksal, Gökırmak, Hasanoğlu, Yıldırım ve Gültek, 2001). Son yıllarda kükürtün bazı sağlık sorunlarına yol açması ve alerjik reaksiyonlara neden olması, dünyada gıdalarda kükürt ve kükürt tuzlarının kullanımının azaltılması ya da yerlerine alternatif koruyucu maddelerinin kullanılması yönünde eğilimler oluşmuştur (Türkyılmaz, 2011).

*Ginkgo biloba*, diğer bir adıyla mabet ağacı; kökenleri Çin’e dayanan ve sağlığa faydalı özellikleri sebebiyle başka birçok bölgede de yetiştirilen tarihi bir ağaçtır (Smith, Maclellan ve Darlington, 1996). *Ginkgo biloba* L., “yaşayan fosil” olarak bilinen *Ginkgoaceae* familyasındaki dünyanın en eski canlı bitkilerinden ve hayatta kalan eşsiz türlerden biridir (Diamond vd., 2000).



Şekil 1. *Ginkgo biloba* bitkisi yaprakları (Karahana, 2017)

Ginkgo yaprağı (Şekil 1), flavonol ve flavon glikozitler, diterpen laktonlar, ginkgolidler, seskiterpenler, demir bazlı süperoksit dismutaz, p-hidroksibenzoik asit, askorbik asit ve kateşin dahil olmak üzere birçok biyolojik aktif madde içerir. Biyoaktif bileşenler, aktif maddeleri ekstrakte etmek, konsantre etmek ve ginkgolik asitler gibi toksik metabolitleri uzaklaştırmak için bir aseton su karışımı kullanan kimyasal bir yöntem ile elde edilir (Rojas, Rojas-Castaneda ve Rojas, 2016).

*Ginkgo biloba* ekstraktları (EGB), *Ginkgo biloba* ağacının farklı bölgelerinden elde edilebilir. *Ginkgo biloba*'nın çeşitli bölümlerde birçok hastalık üzerinde aktif etkiler sağlayan birçok biyoaktif bileşik içerdiği belirtilmiştir (Pereira, Barros ve Ferreira, 2013).

Bu biyoaktif bileşikler sayesinde *G. biloba* ekstraktları (EGB) çeşitli farmakolojik aktiviteleri nedeniyle doğal ilaç olarak büyük ilgi görmüştür (Chen vd., 2017). Ayrıca, insanlarda bilişsel işlevi optimize etmede yeteneği ve kullanımı ile bilinmektedir. Düzenli olarak tüketildiğinde bronşları açan bitki, hatırlamayı kolaylaştırıp, aynı zamanda odak sorununa da çözüm olmaktadır (Rojas vd., 2016). Özellikle Alzheimer hastalığı için önerilen bitki hastalığa yakalanma riskini ciddi oranda azaltmaktadır. Yapılan çalışmalarla *G. biloba*'nın anti diyabetik, anti kanser, anti hipertansif, antimikrobiyal, hepato-koruyucu ve immünestimülatif olarak da etkili olduğunu doğrulamıştır (Mei, Khan, Zeng ve Fu, 2014). Ayrıca *Ginkgo biloba*'nın yapısında bulunan birçok etken maddeden dolayı antioksidan, antiapoptotik, nöroprotektif, antienflamatuar, antialerjik, etkilerinin olduğu kanıtlanmakla birlikte kalp ve beyin gibi organların, dokularındaki dolaşımı arttırdığından dolayı günümüzde yaygın olarak vasküler ve serebral hastalıklarda ilaç olarak kullanılmaktadır. *Ginkgo biloba* bitkisinin gıda üzerine yapılan çalışmaları sınırlıdır. *Ginkgo biloba* ekstraktı daha çok sağlık alanında kullanılmıştır (Yağmurca vd., 2007).

Gıda alanında kullanımına dair sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Örneğin; dondurularak depolanan et uygulamalarında *Ginkgo biloba* ekstraktlarının antioksidan aktivitesi incelenmiştir. Ürünün vakumlu ambalajı ile birleştirildiğinde oksidasyon ürünlerinin oluşumunu yavaşlatmada etkili olduğu görülmüştür (Yavuz, 2018). *Ginkgo biloba* etanol ekstreleri ürün içindeki katı yağların oksidasyon hızını sınırlamıştır. Ekstraktların eklenmesi diğer duyuşsal faktörlerin yanı sıra, köftelerin kokusunu ve tadını önemli ölçüde değiştirmemiştir (Kobus-Cisowska, Flaczyk ve Jeszka, 2010).

Yapılan bir diğer çalışmada buzda depolanan çipura, levrek ve sardalyanın kalitesi üzerine lizozim ve *Ginkgo biloba* bitki ekstraktının etkisi değerlendirilmiştir. Çipura ve levrekte lizozim ve *Ginkgo biloba* ekstraktı raf ömrünü iki gün arttırmıştır. Lizozim ve *Ginkgo biloba* ekstraktı, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Yavuz, 2018).

Malatya kayısının üç farklı çeşidinin kükürtleterek ve kükürtlemeden kurutulan örnekleri ile Aydın incirinin güneşte kurutulmuş örneklerinin antioksidan kapasiteleri araştırılmıştır. Genel olarak kayısı ve incir örneklerinin indirgeme gücü standart olarak kullanılan *Ginkgo biloba*'dan yüksek, askorbik asit ve melatonininden düşük çıkmıştır (Görünmezoğlu, 2008).

Bir başka çalışmada ise Malatya yöresinde kayısı kükürtleme işlemi sırasında çok yüksek konsantrasyonda SO<sub>2</sub> gazına maruz kalınması durumunda beyin ve plazmadaki oksidan-antioksidan parametrelerde yaptığı değişiklikler incelenmiştir. Buna bağlı olarak *Ginkgo biloba* ekstraktının etkisi sıçan modelinde araştırılmıştır. Kontrol grubu hariç bir grup sıçan, kayısı işçilerine benzer şekilde 25 gün süreyle günde ortalama bir saat SO<sub>2</sub> gazına maruz bırakılmıştır. Diğer grup sıçanlarda ise *Ginkgo biloba* ile ilaç tedavisi başlanmış ve bu uygulamaya kayısı islimleme (25 gün) süresi boyunca devam edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen bilgiler ışığında güçlü bir oksidan-antioksidan kaynağı olan *Ginkgo biloba* ekstresinin oluşan oksidatif hasarı belirgin düzeyde önlediği gözlemlenmiştir (Altunışık, 2005).

Bu nedenlerden dolayı bu çalışmada, kükürtlü kayısı kurutulmasına alternatif bir yöntem uygulanması amaçlanmıştır. Bu amaçla yüksek antioksidan içeriği ile dikkat çeken *Ginkgo biloba* bitkisi yaprakları kükürt yerine alternatif olarak kullanılmıştır. Kurutma işleminden önce *Ginkgo biloba* yaprakları için uygun çözgen seçimi yapılmış, ekstraksiyon yöntemi saptanmış, ekstrakt elde edilmiş ve kayıslara püskürtülerek uygulanmış, tepsili kurutucuda kurutulan kayısı örneklerinde fiziksel (nem, su aktivitesi, renk, tekstür) ve mikrobiyolojik analizler (küf ve maya) gerçekleştirilmiştir. İki farklı grup kayısı örnekleri için 21 gün depolama sonucunda kalite özellikleri istatistiksel olarak kıyaslanmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Materyal

Bu çalışmada materyal olarak kurutulmuş *Ginkgo biloba* yaprakları (Arpaş Arifoğlu Pazarlama Dağıtım ve Ticaret A.Ş.) İzmir’de yerel bir marketten temin edilmiştir. Kayısılar (*Prunus armeniaca* L.) yerel bir satıcıdan (İzmir ve Iğdır’da yetiştirilen kayısı çeşitleri) Eylül ayında dondurulmuş olarak tedarik edilmiştir. Kayısılar, kurutma işlemi uygulanana kadar Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Meyve ve Sebze İşleme Pilot Tesisinde -18 °C sıcaklıkta %90 bağıl neme sahip depoda muhafaza edilmiştir. Kurutulmuş *Ginkgo biloba* yapraklarında bulunan fenolik ve flavonoid madde miktarının tanımlanması ve miktarlarının hesaplanmasında kullanılan folin, sodyum karbonat, gallik asit, kuarsetin, sodyum nitrit, sodyum hidroksit, etanol ve ekstraksiyon işlemlerinde kullanılan tüm çözümler (etanol, metanol) TEKKİM Kimya (Türkiye) dan temin edilmiştir. Kullanılan diğer tüm kimyasallar ve reaktifler ticari olarak temin edilebilen yüksek saflıktadır. Mikrobiyolojik analizlerde ise petrifilm (3M™ Petrifilm™ Maya ve Küf Sayım Plakaları, ABD) ve peptonlu su (Peptone water OXOID-CM0009, İngiltere) kullanılmıştır.

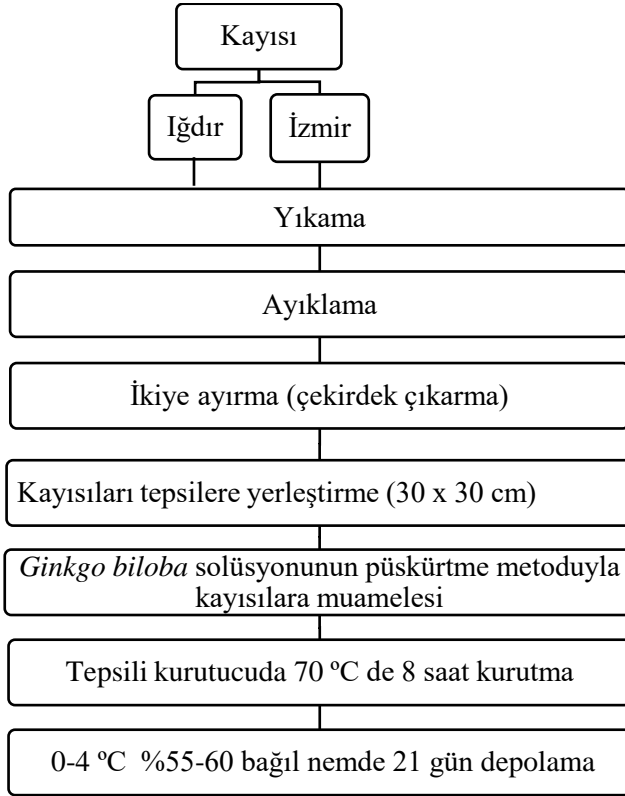
### 2.2. Yöntem

#### 2.2.1. *Ginkgo biloba* Bitki Ekstratının Hazırlanması

Kurutulmuş olarak alınan *Ginkgo biloba* yaprakları laboratuvar tipi bir öğütücü (Sinbo-SCM 2934, Türkiye) ile öğütülmüştür. Ekstraksiyon için çözümler seçimi toplam flavonoid ve fenolik madde miktarına göre yapılmıştır. Fenolik ve flavonoid madde miktarını belirlemek için üç farklı çözümler (%75’lik etanol %75’lik metanol ve ultra saf su) ve iki farklı ekstraksiyon (15 ve 30 dakika) süresinde çalışılmıştır (Karahana, 2017). Sonuç olarak, öğütülen *Ginkgo biloba* yaprakları, %75’lik etanol çözeltisi ile ultrasonik banyo (Everest Ultrasonic, Türkiye) içerisinde 30 dakika boyunca ekstrakte edilmiştir. Bu işlem için 1 gr öğütülmüş *Ginkgo biloba* yaprağına 50 ml çözümler eklenmiştir. Elde edilen ekstraktların sıvı kısmı santrifüj (Hettich Universal 320, Almanya) edilmiştir. Santrifüj edilen örnekler tek katlı süzgeç kağıdından geçirilmiştir. Örnekler analiz edilene kadar buzdolabında +4 °C’de 24 saat saklanmıştır. Çözeltideki etanolü uçurmak için döner evaporatör (Heisenborg, Almanya) kullanılmıştır. Etanol tamamen uçurulduktan sonra çözelti liyofilizatöre konulmadan önce -40 °C’de depolanmıştır. Son olarak santrifüj tüpleri liyofilizatöre (Armfield, FT 33 Vacuum Freeze Drier, İngiltere) konularak içindeki su uzaklaştırılmıştır. Bu işlem ekstrakt toz haline gelene kadar devam etmiştir. 2000 ppm’lik *Ginkgo biloba* solüsyonu saf su ile hazırlanmış, kayısıların üzerine püskürtülmeye hazır hale getirilmiştir.

#### 2.2.2. Kayısıların Kurutulması

Kurutma işleminden bir gün önce +4 °C’ye konulup, çözündürme işlemi başlatılmıştır. Çözündürme işlemi tamamlandıktan sonra kayısılar içilebilir kalitedeki suda yıkanmış, hafif nemi alınan kayısılar ortadan ikiye bölünüp çekirdekleri çıkartılıp çekirdek evi yukarı gelecek şekilde eşit aralıklarla tepsilere dizilmiştir. Dizilen kayısıların üzerine hazırlanan *Ginkgo biloba* solüsyonu 2000 ppm olacak şekilde ayarlanmış ve püskürtme işlemi gerçekleştirilmiştir. Kurutma işlemi için tepsili kurutucu (Eksis TK, Türkiye) kullanılmıştır. Kayısı üretimi akış şeması Şekil 2’de gösterilmektedir.



Şekil 2. Kayısı üretimi akış şeması

### 2.2.3. Analiz yöntemleri

Ekstraksiyon yönteminin seçilmesi, flavonoid ve fenolik madde miktarına göre yapılmıştır. Fenolik ve flavonoid madde miktarını belirlemek için üç farklı çözgen (%75'lik etanol %75'lik metanol ve ultra saf su) ve iki farklı ekstraksiyon süresinde (15 ve 30 dakika) çalışılmıştır. Ayrıca tüm analizler 3 tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

#### Toplam Fenolik Madde Tayini

Toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocaltaeu metoduna göre yapılmıştır. Gallik asidin kalibrasyon eğrisi için stok çözeltilerden gerekli seyreltmeler yapılarak 50-250 ppm konsantrasyon aralığında bir seri çözeltiler hazırlanarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Her bir ekstraktın absorbansı çizilen gallik asit kalibrasyon eğrisinin denkleminde yerine konularak gallik aside eşdeğeri olarak toplam fenolik madde miktarı hesaplanmıştır (Vasco, Ruales ve Kamal-Eldin, 2008).

#### Gallik Asit Standartı Hazırlama

500 ppm'lik 100 ml stok çözeltiler hazırlamak için 0.05 gr gallik asit tartılıp balon jode 100 ml ye kadar etanol ile tamamlanmıştır. Stok çözeltilerinden, kör çözeltiler ve 50, 100, 150, 200, 250 ppm'lik 10 ml'lik çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler vorteks ile homojen hale getirilerek (WiseMix VM-10) 50 ml'lik santrifüj tüplerine 0.5 ml konulmuştur. Üzerlerine 2.5 ml (0.2N) folin eklendi. Örnekler 5 dakika karanlıkta bekletilmiştir. 5 dakika beklemenin ardından üzerlerine 2.5 ml %7.5'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltileri eklenmiştir. Santrifüj tüpleri 25 ml ye kadar ultra saf su ile tamamlandı. Karışım 2 saat karanlıkta bekletilerek 760 nm'de spektrofotometre absorbans değerleri okunmuştur. Elde edilen değerler ile absorbansa karşı konsantrasyona grafiği çizilmiştir (Muzaffar, Dar ve Kumar, 2017).



## Toplam Flavonoid Bileşik Miktarının Belirlenmesi

Toplam flavonoid madde tayini alüminyum şelatlama metoduna göre yapılmıştır. Bu metotta toplam flavonoid madde miktarı 500 ppm'lik 100 ml stok çözelti yardımı çizilen kuersetin standart eğrisinden kuersetine eşdeğer olarak hesaplanmıştır (Ebrahimzadeh, Pourmorad ve Hafezi, 2008).

## Kuersetin Standartı Hazırlama

500 ppm'lik 100 ml stok çözelti hazırlamak için 0.05 gr kuersetin tartılıp balonjojede 100 ml ye kadar etanol ile tamamlanmıştır. Stok çözeltisinden; kör çözelti ve 50, 100, 150, 200, 250 ppm'lik 10 ml'lik çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler karıştırılarak vorteks (WiseMix VM-10) 10 ml'lik santrifüj tüplerine 1 ml eklenmiştir. Üzerine 4 ml lik ultra saf su ve 0.3 ml %5'lik NaNO<sub>2</sub> eklenip 5 dakika karanlıkta bekletilmiştir. 6. dakikada 0.3 ml AlCl<sub>3</sub> eklenip üzerine 2ml NaOH eklenmiştir. Karışım 10 ml ye kadar ultra saf su ile tamamlandı. Örnekler vortekse konularak turuncu-sarımsı bir renk elde edilmiştir. Elde edilen örnekler spektrofotometrede 510 nm de ölçülmüştür (Ebrahimzadeh vd., 2008).

Kurutma işlemi sonrasında, kayısların depolama boyunca fiziksel ve mikrobiyolojik analizleri gerçekleştirilmiştir. Fiziksel analiz olarak renk, tekstür, su aktivitesi ve nem tayinleri; mikrobiyolojik analiz olarak küf ve maya sayımı gerçekleştirilmiştir.

## Renk Analizi

Kurutulmuş kayıslar, Konica Minolta Chroma Meter (CR- 400, Japonya) renk ölçüm cihazı ile renk ölçümleri yapılmıştır. Cihaz standart beyaz çizgiye (Y=93.9, x= 0.313, y=0.321), L\* (aydınlık), a\* (kırmızı-yeşil) ve b\* (mavi-sarı) değerlerine göre kalibre edilmiş, toplam renk farkı ve hue açısı hesaplanmıştır (Denklem 1,2, 3) (Rayman, 2010).

$$\Delta E = \sqrt{[(L^* - L_{ref}^*)^2 + (a^* - a_{ref}^*)^2 + (b^* - b_{ref}^*)^2]} \quad (1)$$

$$\Delta C = \sqrt{[(a^* - a_{ref}^*)^2 + (b^* - b_{ref}^*)^2]} \quad (2)$$

$$\text{Hue angle} = \tan^{-1} \left( \frac{b^*}{a^*} \right) \quad (3)$$

Renk analizinde İzmir grubu için 0. gün renk analizi sonuçları referans olarak belirlenmiştir. Aynı durum İğdir grubu için de geçerlidir.

## Tekstür Analizi

Dokusal özellikler TA-XT doku analizörü (Stable Micro System Co. Ltd., Surrey, İngiltere) ile ölçülmüştür. Ürünün sertliğini belirlemek için 0.25 mm çapında ve sıkıştırma testi moduna sahip küresel paslanmaz çelik test probu kullanılmıştır (Su, Zhang, Zhang, Adhikari, Yang, 2016). Test parametreleri ise şu şekildedir: 0.80 mm/s ön hız, ardından 0.80 mm/s test hızı ve 4 mm/s test sonrası hız ve test mesafesi ön testlerle 3 mm olarak belirlenmiştir. Sertlik (N), elastikiyet (mm), yapışkanlık (birimsiz), sakızimsılık (N), çignenebilirlik (Nmm) ve esneklik (mm) ölçülmüştür (Türkmen, 2019). Üç örnek, her grup için üç kez test edilmiştir. Parametreler, maksimum sıkıştırmada gözlemlenen tepe kuvveti olarak tanımlanmıştır.



### Su Aktivitesi ve Nem Tayini

Tepsi kurutucuda kurutulmuş kayısıların su aktivitesi değerleri,  $\pm 0.001$  hassasiyete sahip su aktivitesi ölçüm cihazı (Testo AG 400, Almanya) kullanılarak belirlenmiştir. Aynı zamanda örneklerin nem miktarları infrared nem cihazında (MOC63u, Shimadzu Inc., Japonya) ölçülmüştür.

### Küf ve Maya Sayımı

Mikrobiyolojik analizler depolama süresi boyunca haftalık olarak tekrarlanmıştır. Örnekler analize alınmadan önce buzdolabında depolanmıştır. Analize alınacak örnekler steril ortamda yaklaşık 10 gram olacak şekilde tartılmıştır. Örnekler, homojen tartım işleminden sonra karıştırıcı poşetlerine aktarılmış ve üzerine 90 mL peptonlu su (Peptone water, OXOID-CM0009) eklenerek karıştırıcıda (Stomacher, 400, İngiltere) homojenize edilmiştir (Ünlütürk ve Turantaş, 2015).

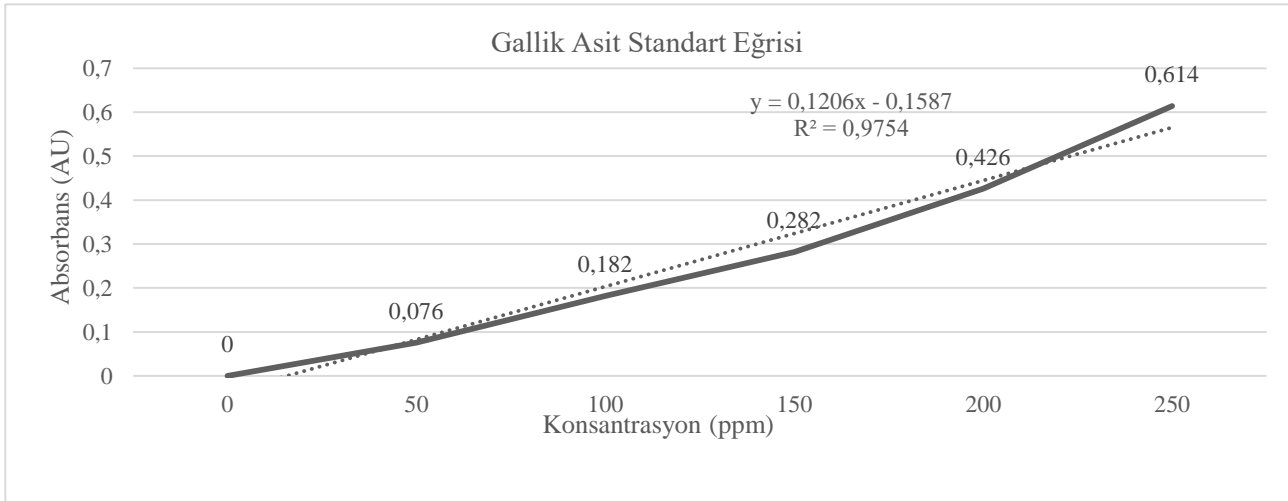
Hazırlanan örnekler  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  ve  $10^{-3}$ 'lük dilüsyonlardan iki paralel olacak şekilde plaklara (3M™ Petrifilm™ Maya ve Küf Sayım Plakaları) ekimi gerçekleştirilmiştir. Plakalar, 25 °C'de 3-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda sayım alınmıştır. Hazırlanan örneklerin bir gramındaki küf ve maya sayısı (kob/g) hesaplanmıştır (Ünlütürk ve Turantaş, 2015; Anonim, 2019b).

### İstatistiksel analiz

İstatistiksel değerlendirmeler %95 güven aralığında varyans analizinden (ANOVA) yararlanılarak SPSS paket programı kullanılarak (SPSS, 2011, 20.0 for Windows Version; SPSS Inc., Chicago, Ill) Duncan çoklu testi ile yapılmıştır.

### 3. Bulgular ve Tartışma

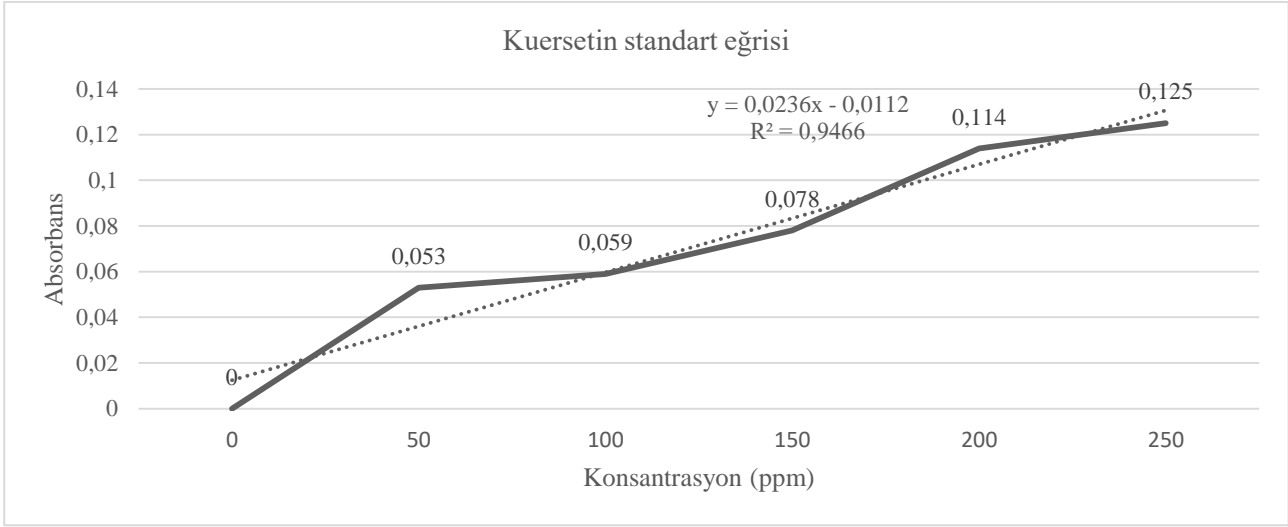
Toz haline getirilen *Ginkgo biloba* bitkisinin fenolik madde miktarını belirlemek için, yapılan analizlerden elde edilen bulgular, gallik asit cinsinden Şekil 3' de, flavonoid madde miktarı için ise kuersetin cinsinden Şekil 4' de verilmiştir.



Şekil 3. Gallik asit standartı eğrisi

Aynı işlemler *Ginkgo biloba*'nın metanol, etanol ve ultra saf su ekstraktlarına uygulanmıştır. Her bir ekstraktın absorbansı, çizilen eğri denkleminde yerine konularak kuersetine eşdeğer toplam flavonoid madde miktarları hesaplanmıştır. Hazırlanan gallik asit standart eğrisinde  $y = 0.1206x - 0.1587$  denklemi bulunmuştur. Kullanılan denklemin  $R^2$  değeri 0.9754'tür. Etanol, metanol ve ultra saf su ile hazırlanan ekstraktların absorbans değerleri bulunan denkleminde y değeri yerine konularak *Ginkgo biloba*'nın gallik asit cinsinden toplam fenolik madde miktarı belirlenmiştir. Bir diğer hazırlanan kuersetin standart eğrisinden ise

$y=0.0236x-0.0112$  denklemi bulunmuştur. Kullanılan denklemin  $R^2$  değeri 0.9466'dır. Etanol, metanol ve ultra saf su ile hazırlanan ekstratların absorbans değerleri bulunan denklemde  $y$  değeri yerine konulup *Ginkgo biloba*'nın kuersetin cinsinden toplam flavonoid madde miktarı belirlenmiştir.



Şekil 4. Kuarsetin standardı eğrisi

Toplam fenolik madde ve flavonoid madde miktarı belirlemek için üç farklı çözgen (%75 etanol, %75 metanol ve ultra saf su) ve iki farklı ekstraksiyon zaman parametresi (15 dk ve 30 dk) denenmiştir. Çalışmada metanolla ekstraksiyon sonucunda en yüksek fenolik madde değerine ulaşılmıştır. Ancak flavonoid madde miktarının en yüksek çıktığı parametere %75 etanol ile ekstraksiyondur. İnsan sağlığı için de daha uygun olan etanol ile ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi seçilmiştir (Karahana, 2017). Toplam flavonoid madde miktarı en yüksek olan %75 lik etanol ile 30 dk ekstraksiyon işlemi optimum olarak seçilmiştir ve ekstraksiyon bu parametrelerde gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sonucuna ait bulgular Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1

Ekstrakt örneklerinin farklı denemelerle toplam flavonoid ve fenolik madde bileşen değerleri

| Çözücüler    | Ekstraksiyon Süresi (dak) | Ekstraksiyon Başlama Sıcaklığı (°C) | Ekstraksiyon Bitiş Sıcaklığı (°C) | Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg GAE/L) | Toplam Flavonoid Madde Miktarı (mg QE/L) |
|--------------|---------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|---|--|
| %75 Etanol   | 15 dak                    | 30 °C                               | 34 °C                             | 545.36±10.36 <sup>d</sup>               | 688.98±11.25 <sup>b</sup>                |
| %75 Etanol   | 30 dak                    | 30.5 °C                             | 39 °C                             | 571.06±10.46 <sup>c</sup>               | 756.78±10.24 <sup>a</sup>                |
| %75 Metanol  | 15 dak                    | 30 °C                               | 34 °C                             | 585.99±10.30 <sup>b</sup>               | 530.09±9.36 <sup>d</sup>                 |
| %75 Metanol  | 30 dak                    | 30.5 °C                             | 39 °C                             | 611.90±7.22 <sup>a</sup>                | 574.57±8.26 <sup>c</sup>                 |
| Ultra Saf Su | 15 dak                    | 30 °C                               | 34 °C                             | 434.24±8.45 <sup>e</sup>                | 318.22±9.55 <sup>f</sup>                 |
| Ultra Saf Su | 30 dak                    | 30.5 °C                             | 39 °C                             | 433.42±5.65 <sup>e</sup>                | 373.31±10.47 <sup>e</sup>                |

\*Aynı sütunda farklı harflerle (<sup>a-f</sup>) ifade edilen değerler arasında  $P \leq 0.05$  düzeyindeki istatistiksel farkı göstermektedir.

Su aktivitesi değerinin, İzmir grubu kayısılarda 0.50-0.59 arasında, Iğdır grubu kayısıların ise 0.70-0.80 değerleri arasında değiştiği görülmüştür. Kurutma işlemi sonrasındaki örneklerin su aktivitesi değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur ( $P \leq 0.05$ ). Nem değerleri ise İzmir grubu kayısılarda

%7 ile %14 arasında, Iğdır grubu kayısılarında ise %21 ile %36 arasında değiştiği gözlemlenmiştir. 8 saat kuruma sonunda İzmir grubu kayısı örneklerinden daha fazla suyun uzaklaştığı belirlenmiştir. Kurutma işleminde iki önemli parametre vardır. Bunlardan biri süre değeri ise nem değeridir. Yapılan çalışmada süre sabit alınıp farklı grup kayısılarında kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu sebeple iki grup aynı sürede kurutulmuş ve farklı nem değeri gözlemlenmiştir. Bu durum farklı grubun farklı kalite özelliğinden kaynaklanmaktadır.

Tüketiciler, meyve ve sebzeleri ilk olarak görselliklerine göre değerlendirmektedirler. Renk, tüketiciye ürünlerin kalitesi hakkında bilgi verir ve ürün hakkında olumlu ilk izlenim oluşturmaktadır. Bu sebeple renk ürün açısından önemlidir (Büyükcan, 2016). Tablo 2 ve Tablo 3' e göre İzmir grubu kayısıların L\* değerleri Iğdır grubuna göre daha yüksektir. L\* değeri depolama süresi boyunca Iğdır grubunda azalma göstermiştir. En az değişime uğrayan grup ise İzmir grubu olmuştur. L\* değerinin giderek artması aydınlık değerini arttırdığını, karanlık değerinin ise azaldığını göstermektedir. Iğdır grubu renk değerlerinde dalgalanmaya sebep olan faktörün; grup ve deneysel hatalardan (yetersiz püskürtme gibi) kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte depolama boyunca fenolik bileşenler renk değişimlerine sebep olmaktadır. Aydınlık değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $P \leq 0.05$ ). Depolama boyunca Iğdır grubu örneklerin aydınlık değerleri azalırken, İzmir grubu örneklerin aydınlık değerlerinin arttığı gözlemlenmiştir. Depolamanın renk değişimine üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $P \leq 0.05$ ). Aynı zamanda 0. gün analizlerinde dışarıdan temin edilmiş kükürtlü kayısıların renk ölçümü yapılmıştır. Bu ölçümler sonucunda 0. gün İzmir grubu renk değerleri (L\* 37.57, a\* 12.60, b\* 29.06) kükürtlü kayısıların renk değerlerine yakın bulunmuştur (L\* 37.97, a\* 5.95, b\* 19.98). Yapılan literatür çalışmalarında; farklı kayısı grupları ve kurutma yöntemleriyle yaptığı çalışmasında elde edilen sonuçlara göre, kayısı çeşitlerinin L\* değerlerinin güneşte kurutmada 31.40-60.80, kükürtleyerek kurutmada 35.25-49.89, dondurarak kurutmada 46.04-65.5 ve mikrodalga kurutmada ise 39.19- 46.68 arasında değiştiği görülmektedir (Karataş, 2014). *Ginkgo biloba* ekstraktı ile kurutulmuş İzmir grubu kayısılarında gözlemlenen L\* değeri literatür çalışmalarında elde edilen kükürtlü kayısı renk sonuçlarına yakın çıkmıştır (L\* 36.45±2.76) (Özkan, 2001).

Tablo 2

İzmir grubu kayısılar için renk analiz sonuçları

| GÜN | L*                       | a*                      | b*                      | $\Delta C$             | $\Delta E$             | °Hue açısı              |
|-----|--------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 0   | 37.57±0.90 <sup>b</sup>  | 12.60±0.10 <sup>c</sup> | 29.06±1.10 <sup>b</sup> | -                      | -                      | -                       |
| 7   | 35.12 ±0.20 <sup>c</sup> | 14.51±0.40 <sup>a</sup> | 29.29±0.10 <sup>b</sup> | 1.93±0.39 <sup>c</sup> | 3.12±0.42 <sup>a</sup> | 63.64±0.70 <sup>b</sup> |
| 14  | 37.70±0.10 <sup>b</sup>  | 13.33±1.90 <sup>b</sup> | 23.82±3.00 <sup>c</sup> | 5.41±4.08 <sup>a</sup> | 5.41±4.08 <sup>b</sup> | 60.42±0.60 <sup>c</sup> |
| 21  | 38.24±1.20 <sup>a</sup>  | 12.77±0.40 <sup>c</sup> | 31.38±2.10 <sup>a</sup> | 3.33±2.08 <sup>b</sup> | 2.50±2.28 <sup>c</sup> | 67.83±0.67 <sup>a</sup> |

\*Aynı sütunda farklı harflerle (<sup>a-d</sup>) ifade edilen değerler günler arasında  $P \leq 0.05$  düzeyindeki istatistiksel farkı göstermektedir.

Tablo 3

Iğdır grubu kayısılar için renk analizi sonuçları

| GÜN | L*                      | a*                      | b*                      | $\Delta C$             | $\Delta E$              | °Hue açısı              |
|-----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0   | 28.08±0.80 <sup>c</sup> | 16.13±1.80 <sup>c</sup> | 13.37±1.70 <sup>b</sup> | -                      | -                       | -                       |
| 7   | 31.51±0.01 <sup>b</sup> | 19.08±0.20 <sup>a</sup> | 19.87±0.70 <sup>a</sup> | 7.14±0.54 <sup>b</sup> | 7.93±0.49 <sup>b</sup>  | 46.15±1.32 <sup>b</sup> |
| 14  | 34.90±0.02 <sup>a</sup> | 18.76±1.10 <sup>b</sup> | 21.75±5.00 <sup>a</sup> | 8.80±1.92 <sup>a</sup> | 11.45±1.57 <sup>a</sup> | 48.68±2.06 <sup>a</sup> |
| 21  | 26.98±0.38 <sup>d</sup> | 13.73±0.20 <sup>d</sup> | 19.64±2.40 <sup>a</sup> | 6.73±2.38 <sup>c</sup> | 6.84±2.26 <sup>c</sup>  | 54.90±3.82 <sup>c</sup> |

\*Aynı sütunda farklı harflerle (<sup>a-d</sup>) ifade edilen değerler günler arasında  $P \leq 0.05$  düzeyindeki istatistiksel farkı göstermektedir.

a\* kırmızılık-yeşillik değeri, b\* ise mavilik-sarılık değeri olup (Altuğ- Onoğur, Elmacı ve Demirağ, 2017), İzmir grubu kayısıların a\* değeri 12.60-14.51 arasında değişirken, Iğdır grubu kayısıların a\* değeri 13.73-

19.08 arasında olduğu saptanmıştır. Bu değerlere göre Iğdır grubunun a\* değeri depolama süresi boyunca, İzmir grubuna göre daha yüksektir. TS- 485'e göre kuru kayısılar açık sarı, sarı, sarı portakal, portakal ve koyu portakal şeklinde renk sıralaması normal kabul edilir (Anonim, 2013). Sonuç olarak Iğdır grubunun renk özelliği TS-485'in belirttiği renk tanımına göre istenen kırmızılık değerine daha az yakındır. Kükürlenerek kurutulmuş kayısı çeşitleri üzerine yapılan bir çalışmada gözlenen a\* değerlerinin 4.15-17.32 arasında değiştiği bulunmuştur. Diğer kurutma yöntemlerinden elde edilen veriler ise; güneşte kurutmada 5.48-20.77, dondurarak kurutmada 5.59-22.01, mikrodalga kurutmada ise 6.76-21.24 arasında değiştiği saptanmıştır (Karataş, 2014).

b\* değeri kayısıların depolama boyunca sarı renginin değişimini göstermektedir. Kayısıların b\* değerleri ise; İzmir grubu için 23.82-31.38, Iğdır grubu için değerler 13.37- 21.75 arasında olduğu saptanmıştır. 21 günlük depolama süresi sonunda en fazla sarılık değişiminin Iğdır grubunda olduğu ve İzmir grubunun b\* değerinin daha yüksek olduğu dolayısıyla daha sarı olduğu, TS-485'in belirttiği renk tanımına yakın olduğu gözlemlenmiştir. Kükürlenerek kurutulmuş kayısı çeşitlerinde saptanan b\* değerleri 15.70-31.88 arasındadır. Diğer kurutma yöntemlerinden elde edilen veriler ise; güneşte kurutmada 9.40-36.93, dondurarak kurutmada 18.50-45.84, mikrodalga kurutmada ise 18.78-38.72 arasında değişmektedir (Karataş, 2014).

Toplam renk farkı ve kroma değerleri her iki grup için de 0. gün renk değerleri referans alınarak hesaplanmış ve L\*, a\*, b\* değerleri değiştikçe artmıştır. Toplam renk farkı ( $\Delta E$ ) depolama süresince İzmir grubu kayısı örnekleri için daha düşük bulunmuştur. Bu da 0. güne göre depolama süresince rengin bu grup örneklerde daha iyi korunduğunu göstermektedir. a\* ve b\* değerlerindeki farklılığın, kurutulmuş kayısıların dondurulmuş olarak temin edilmesi ve kayısılarda çözündürme kaynaklı bazı bölgelerinde renk bozulmalarının sebep olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak; İzmir grubu için 0. günden sonra aydınlık değerinin düştüğü, sonrasında aydınlık değerinin korunduğu düşünülmektedir. a\* değerinin düştüğü, b\* sarılık değerinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum sarı kayısı renginin korunduğunu göstermektedir. Iğdır grubunda ise 0. günden itibaren aydınlık değerinde önce bir miktar artış olduğu, daha sonra aydınlık değerinin düşüşüne geçtiği görülmüştür. Iğdır grubunun aydınlık değerini koruyamadığı gözlemlenmiştir. a\* ve b\* değerlerinde ise bir miktar artış olduktan sonra azaldığı gözlemlenmiştir ( $P \leq 0.05$ ).

Gıdaların duyuşal özellikleri, hissetme veya dokunma algıları ile ilgilidir. Dokusal karakteristikler gıdaların temel özellikleri olarak önem taşımaktadır. Dokunun duyuşal yönden algılanması tüketicinin gıdayı eline almasıyla başlar ve satın alıp almaması konusundaki kararları sonuçlandırır (Altuğ vd., 2017). Tekstür analizlerinde ürünün mekaniksel ve duyuşal özellikleri değerlendirilir (Büyükcın, 2016). *Ginkgo biloba* ekstraktı ile kurutulmuş kayısılarına ait tekstür değerleri Tablo 4 ve 5' de gösterilmiştir.

Tablo 4  
İzmir grubu kayısıların tekstür analizi sonuçları

| İzmir                                | 0.Gün                                  | 7.Gün                         | 14.Gün                        | 21.Gün                        |
|--------------------------------------|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Sertlik (Hardness; N)                | 9804.463±445.00 <sup>a</sup>           | 8183.330±323.320 <sup>a</sup> | 4183.556±249.200 <sup>a</sup> | 10828.75±170.630 <sup>a</sup> |
| Elastikiyet (Springiness; mm)        | 0.761±0.05 <sup>d</sup>                | 0.758±0.087 <sup>d</sup>      | 0.778±0.011 <sup>d</sup>      | 0.569±0.208 <sup>d</sup>      |
| Yapışkanlık (Cohesiveness; birimsiz) | 0.662±0.157 <sup>e</sup>               | 0.655±0.121 <sup>e</sup>      | 0.642±0.040 <sup>e</sup>      | 0.595±0.027 <sup>e</sup>      |
| Sakızimsılık (Gumminess; N)          | 6465.651±287.200 <sup>b</sup>          | 6315.80±254.300 <sup>b</sup>  | 2690.46±328.600 <sup>b</sup>  | 6441.692±192.750 <sup>b</sup> |
| Çiğnenebilirlik (Chewiness; Nmm)     | 4887.385±253.890 <sup>c</sup>          | 3864.25±247.500 <sup>c</sup>  | 2090.674±244.900 <sup>c</sup> | 3685.489±148.930 <sup>c</sup> |
| Esneklik (Resilience; mm)            | 0.257 <sup>a</sup> ±0.064 <sup>f</sup> | 0.245±0.036 <sup>f</sup>      | 0.223±0.021 <sup>f</sup>      | 0.228±0.019 <sup>f</sup>      |

\*Aynı sütunda farklı harflerle (<sup>a-f</sup>) ifade edilen değerler günler arasında  $P \leq 0.05$  düzeyindeki istatistiksel farkı göstermektedir.

Sertlik (hardness) değeri, depolama boyunca İzmir ve Iğdır grubunda kontrol gruplarına göre (0.gün) istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılık göstermektedir ( $P \leq 0.05$ ). Iğdır grubunda depolama süresi boyunca sertlik değeri artmaktadır. Bunun sebebi yüksek solunum, ambalajın tam olarak ürünü koruyamaması ve hücre duvarının daha kolay parçalanması olarak belirtilmiştir (Büyükcan, 2016). TS- 485'e göre kuru kayısının genel özellikleri; etli olmalı, ürün elastiki veya yumuşak etli ve çekirdek yatağı çok az rutubetli olmalıdır (Anonim, 2013). Yapılan tekstür analizleri sonucunda, Iğdır grubu kayısının TS-485'in belirlediği tekstürel özellikleri sağladığı düşünülmektedir. Yapılan başka bir çalışmaya (Horuz ve ark., 2018) göre kayısılar konveksiyonel ve mikrodalga kurutucu ile kurutulmuştur ve Iğdır grubu 70 °C'de konveksiyonel kurutmada sertlik bakımından ( $1826.34 \pm 25.73$ ) bu çalışmadaki Iğdır grubuna yakın sonuçlar elde edilmiştir. Mikrodalga ile kurutmada ise 120 W 70 °C'de bulunan sertlik değerinin çalışmaya benzer sonuçlar ( $1769.95 \pm 110.07$ ) gösterdiği sonucuna varılmıştır. Elastikiyet (springiness), gıdaya uygulanan kuvvet kaldırıldıktan sonra gıdanın önceki haline dönme kapasitesini açıklamakta, yapışkanlık (cohesiveness) ise gıdanın içeriğinde bulunan bağların sağlamlığını göstermektedir (Büyükcan, 2016). Depolama süresi arttıkça her iki tekstürel özellik de azalmaktadır (Tablo 4 ve 5). Elastikiyet ve yapışkanlık değerlerinin ise İzmir grubunda 21 günde diğer günlere göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $P \leq 0.05$ ). Depolama sonrası yapılan tekstür analizlerine göre Iğdır grubunun çiğnenebilmeye gösterdiği direnç İzmir grubuna göre daha fazladır. Depolamanın çiğnenebilirlik (chewiness) üzerine etkisi istatistiksel açıdan önemli bir fark yaratmıştır ( $P \leq 0.05$ ). Salur Can (2018), yaptığı bir çalışmada nem değeri en yüksek (%26.04) olan kükürlenmiş kuru kayısının en yumuşak olarak, en düşük nem içeriğine sahip olanın ise (%20.53) en sert olarak panelistler tarafından değerlendirildiğini bildirmiştir. Bu çıkarıma göre yapılan nem analizinden elde edilen sonuçlar da Iğdır gurubu için (%21-%36) aynı çiğnenebilme özelliğini göstermektedir. Esneklik (resilience), depolama boyunca İzmir grubunda azalırken, Iğdır grubu esnekliğini depolama boyunca korumuştur. Bu durumun grubun kalite özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Mikrodalga ve konveksiyonel kurutucuda kurutulan kayısılar hakkında yapılan bir çalışmaya (Horuz ve ark., 2018) göre 150 W 70 °C'de esneklik değeri ( $0.225 \pm 0.007$ ), Iğdır grubu 7. Gün dayanıklılık değeri ile paralel bir sonuç göstermektedir (Tablo 5).

Tablo 5

Iğdır grubu kayısının tekstür analizi sonuçları

| Iğdır                                | 0.Gün                         | 7.Gün                         | 14.Gün                        | 21.Gün                        |
|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Sertlik (Hardness; N)                | 1065.059±268.412 <sup>a</sup> | 1268.58 ±273.178 <sup>a</sup> | 1842.318±398.300 <sup>a</sup> | 8756.42±111.702 <sup>a</sup>  |
| Elastikiyet (Springiness; mm)        | 0.853±0.053 <sup>d</sup>      | 0.798±0.057 <sup>d</sup>      | 0.761±0.040 <sup>d</sup>      | 0.595± 0.047 <sup>d</sup>     |
| Yapışkanlık (Cohesiveness; birimsiz) | 0.703±0.034 <sup>c</sup>      | 0.687±0.0541 <sup>c</sup>     | 0.618±0.044 <sup>e</sup>      | 0.550± 0.034 <sup>c</sup>     |
| Sakızimsılık (Gumminess; N)          | 748.514±211.287 <sup>b</sup>  | 2256.48 ±126.809 <sup>b</sup> | 1146.435±326.300 <sup>b</sup> | 4812.667±235.000 <sup>b</sup> |
| Çiğnenebilirlik (Chewiness; Nmm)     | 638.185±93.270 <sup>c</sup>   | 796.32 ±155.915 <sup>c</sup>  | 879.188 ±294.609 <sup>c</sup> | 2860.15±287.520 <sup>c</sup>  |
| Esneklik (Resilience; mm)            | 0.239±0.038 <sup>f</sup>      | 0.225±0.0270 <sup>f</sup>     | 0.203±0.0140 <sup>f</sup>     | 0.247±0.031 <sup>f</sup>      |

\*Aynı sütundaki farklı harflerle (<sup>a-f</sup>) ifade edilen değerler günler arasında  $P \leq 0.05$  düzeyindeki istatistiksel farkı göstermektedir.

*Ginkgo biloba* ekstraktı ile yapay kurutucuda kurutulan kayısı örnekleri 21gün boyunca depolanmış ve haftalık olarak maya-küf analizi yapılmıştır. İnkübasyon işlem koşulları 25 °C ve 7 gün olarak belirlenmiştir. Sonuçlar dökme plak yöntemine göre hesaplanmıştır (Ünlütürk ve Turantaş, 2015). Elde edilen sonuçlar Tablo 6 ve Tablo 7'de gösterilmiştir. Kullanılan sayım plakasında mayalar plaka üzerinde küflere göre daha kolay ayırt edilebilmektedir. Mayalar tipik olarak kenarları tanımlı ve odağı olmayan küçük, mavi-yeşil koloniler ile gösterilir. Küfler, dağılan kenarları ve merkez odak noktası olan geniş, değişken renkli koloniler ile gösterilir (Anonim, 2019a).

Tablo 6

İzmir grubu kayısıların küf ve maya sayımı sonuçları

| <b>İZMİR</b> | <b>10<sup>-2</sup> dilisyonunda küf maya analizi sonuçları (kob/ml)</b> |
|--------------|---|
| 0.Gün        | 2.9 x10 <sup>3b</sup>   |
| 7.Gün        | 3.5 x10 <sup>1a</sup>   |
| 14.Gün       | 1.0 x10 <sup>1c</sup>   |
| 21.Gün       | 1.0 x10 <sup>1c</sup>   |

\*Aynı sütundaki farklı harflerle (a-c) ifade edilen değerler günler arasında  $P \leq 0.05$  düzeyindeki istatistiksel farkı göstermektedir.

Tablo 7

Iğdır grubu kayısıların küf ve maya sayımı sonuçları

| <b>İĞDIR</b> | <b>10<sup>-2</sup> dilisyonunda küf maya analizi sonuçları (kob/ml)</b> |
|--------------|---|
| 0.Gün        | 1.7 x 10 <sup>4c</sup>  |
| 7.Gün        | 1.6 x10 <sup>3d</sup>   |
| 14.Gün       | 8.5 x10 <sup>2a</sup>   |
| 21.Gün       | 8.0 x10 <sup>2b</sup>   |

\*Aynı sütundaki farklı harflerle (a-d) ifade edilen değerler günler arasında  $P \leq 0.05$  düzeyindeki istatistiksel farkı göstermektedir.

Türk Gıda Kodeksi (TGK) Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'ne göre kurutulmuş veya dondurulmuş meyveler için verilen limit değerleri  $10^4$  ile  $10^5$ 'dir (Anonim, 2011). Depolama boyunca yapılan küf ve maya sayımlarında dilüsyon faktörleri  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  ve  $10^{-5}$  olacak şekilde belirlenmiştir. Belirlenen değerler TGK Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'nden referans alınmıştır. Yapılan 0. gün analizinde  $10^{-4}$  ve  $10^{-5}$  olacak şekilde hazırlan dilüsyonlarda küf ve maya gözlemlenmemiştir. Bu sebeple daha sonraki günlerde yapılacak analizlerde dilüsyon faktörü düşürülmüştür. İzmir grubunda depolama boyunca küf ve maya sayımında *Ginkgo biloba* ekstraktı ile yapay yolla kurutulmuş kayısı örneklerinde  $2.8 \times 10^3$  log kob/ml azalma gözlemlenmiştir. Genel olarak Iğdır grubunda  $1.6 \times 10^4$  log kob/ml azalma gözlemlenmiştir. *Ginkgo biloba* bitki ekstraktı uygulaması ile 0. gün sonrasında her iki grup kuru kayısı örnekleri için küf ve maya sayısında azalma gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, yapılan mikrobiyolojik analizlerden alınan sayımlara göre bulunan küf maya sayısı kabul edilen limit dahilindedir. Uygulanan ekstraktın antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu göz önünde bulundurulursa depolama boyunca (+4 °C'de) ürünün mikrobiyolojik bozulmaya karşı korunduğu düşünülmektedir.

Literatürde de benzer sonuçlara rastlanılmıştır. Örneğin, Yavuz (2018), buzda depolanan ticari değeri yüksek balık türlerin mevcut kalitesini lizozim ve *Ginkgo biloba* bitki ekstraktı ile iyileştirilmesi ve deniz kaynaklı salgın hastalıklara sebep olabilecek patojenlerin (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) ve bozulmaya neden olan diğer bakterilerin inhibisyonu üzerine bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlarda toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı sonuçlarına göre, *Ginkgo biloba* ekstraktı ile işlem görmüş bütün çipuranın raf ömrü 8 gün olarak belirlenmiştir. Çipura ve levrekte lizozim ve *Ginkgo biloba* ekstraktı raf ömrünü iki gün arttırmıştır. Aynı zamanda lizozim ve *Ginkgo biloba* ekstraktının, salgın hastalıklara sebep olabilecek patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği kanıtlanmıştır.

#### 4. Sonuçlar

Bu çalışmada kükürde alternatif olarak bitkisel bir ekstrakt olan *Ginkgo biloba*'nın iki farklı grup kayısının yapay yolla kurutulması işleminde depolama boyunca fiziksel ve mikrobiyolojik kalite özellikleri incelenmiştir. Fiziksel analiz sonuçlarına göre, depolama boyunca İzmir grubu kayısılar kalite özelliklerini



(nem, su aktivitesi ve renk) daha iyi korumuştur. Mikrobiyolojik analizlerde ise depolama boyunca her iki grupta da küf ve maya gözlemlenmemiştir. Yapılan literatür araştırmalarında *Ginkgo biloba* bitkisi bu alanda daha önce kullanılmamış olması ile çalışma bu konuda öncü niteliktedir. *Ginkgo biloba* uzun yıllardan beri sağlık alanında kullanılmaktadır fakat gıda sanayinde kullanım alanı daha genişlememiştir. Çalışmanın bu konuda yapılan ilk çalışma olması nedeniyle literatüre katkı sağlayacağı ve *Ginkgo biloba* bitkisi ile yapılacak çalışmalara yol gösterici olacağı düşünülmektedir. Ayrıca çalışma günümüz teknolojileriyle uygulanabilir düzeydedir. Tüketicinin bitkisel kaynaklı ürün talebi doğrultusunda kayısı kurutulmasında kimyasal kullanımını azaltılarak *Ginkgo biloba* ile kalite özellikleri yüksek kurutulmuş kayısı üretiminin gerçekleştirilmesi mümkündür.

### Teşekkür

Bu çalışma Tübitak tarafından düzenlenen 2242 Üniversite Öğrencileri Araştırma Proje Yarışması'nda Gıda ve Tarım alanında Konya Bölgesi'nde ikincilik kazanmıştır. Değerlendirme sonucu için Tübitak'a teşekkür ederiz.

### Yazar Katkıları

İrem Akbulut: Analizi planlamış ve tasarlamış, veri toplamış, analizini yapmış ve makaleyi yazmıştır.

Elif Gürbüz: Analizi planlamış ve tasarlamış, veri toplamış, analizini yapmış ve makaleyi yazmıştır.

Ahsen Rayman Ergün: Analizi planlamış, makale içeriğinin düzenini yapmıştır.

Taner Baysal: Projenin yürütücülüğünü yapmıştır.

### Çıkar Çatışması

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmadığı bildirilmiştir.

### Kaynaklar

Altuğ-Onoğur, T., Elmacı, Y. ve Demirağ, K. (2017). *Gıda Kalite Sağlama* (2. bs.). İzmir: Sidas Medya.

Altunışık, C. (2005). *Kayısı islimlemesinde açığa çıkan sülfür dioksit gazına maruz bırakılan sıçanlarda oluşan serebral oksidatif hasara Ginkgo bilobanın etkileri* (Tıpta uzmanlık). Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>

Anonim. (2011). T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği. Erişim adresi: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-6.htm>

Anonim. (2013). Türk Standartları Enstitüsü, TS 485 Kuru Kayısı Standardı.

Anonim. (2019a). Erişim adresi: <https://www.tarimorman.gov.tr/BUGEM/Belgeler/M%C4%B0LL%C4%B0%20TARIM/KAYISI%20ARALIK%20B%C3%9CLTEN%C4%B0.pdf>

Anonim. (2019b). Erişim adresi: [https://www.bimes.com.tr/urunler\\_gida\\_guvenligi\\_3M\\_Petrefilm\\_Kuf\\_Maya\\_Sayim\\_Plakasi.html](https://www.bimes.com.tr/urunler_gida_guvenligi_3M_Petrefilm_Kuf_Maya_Sayim_Plakasi.html)

Asma, B. M., Kan, T., Birhanlı O., Abacı, T. ve Erdoğan, A. (2007). *Çok amaçlı kayısı ıslah projesi*. Türkiye V. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, 4-7 Eylül 2007. Erzurum: 1:145-149.

Büyükcan, B. (2016). *Taze kayısıların kalite özelliklerinin termal olmayan tekniklerle muhafazası ve sayısal görüntüleme ile değerlendirilmesi* (Yüksek lisans tezi). Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>

Cengiz, E. (2011). *Kayısı (Prunus armeniaca L.) ve kayısı çekirdeğinde kuersetinin HPLC-MS ile tayini* (Yüksek lisans tezi). Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>

- Chen, Q.W., Yan, J.P., Meng, X.X., Xu, F., Zhang, W.W., Liao, Y.L. ve Qu, J.W. (2017). Molecular cloning, characterization, and functional analysis of acetyl-CoA Cacetyltransferase and mevalonate kinase genes involved in terpene trilactone biosynthesis from *Ginkgo biloba*. *Molecules*, 22(1), 74. <https://doi.org/10.3390/molecules22010074>
- Codex Alimentarius, (2019). General Standard for Food Additives Codex Standard, Erişim adresi: [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B130-1981%252FCXS\\_130e.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B130-1981%252FCXS_130e.pdf)
- Çalhan, Ö. (2010). *Bazı depolama koşullarının "Roxana" kayısı çeşidinin soğukta muhafazası üzerine etkisi* (Yüksek lisans tezi). Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>
- Diamond, B.J., Shiflett, S.C., Feiwel, N., Matheis, R.J., Noskin, O., Richards, J.A., N.E. ve Schoenberger, N.E. (2000). *Ginkgo biloba* extract: mechanisms and clinical indications. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 81(5), 668–678. [https://doi.org/10.1016/S0003-9993\(00\)90052-2](https://doi.org/10.1016/S0003-9993(00)90052-2)
- Ebrahimzadeh, M. A., Pourmorad, F. ve Hafezi, S. (2008). Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turkish Journal of Biology*, 32(1), 43-49. Erişim adresi: <https://journals.tubitak.gov.tr/biology/issues/biy-08-32-1/biy-32-1-7-0708-8.pdf>
- Gezer, İ., Haciseferoğulları, H. ve Demir F. (2002). Some physical properties of Hacıhaliloğlu apricot pit and its kernel. *Journal of Food Engineering*, 56, 49-57. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00147-4](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00147-4)
- Görünmezoğlu, Ö. (2018). *Kayısı ve incir meyvelerinin antioksidan kapasitelerinin araştırılması* (Yüksek lisans tezi). Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>
- Horuz, E., Bozkurt, H., Karataş, H. ve Maskan, M. (2018). Comparison of quality, bioactive compounds, textural and sensorial properties of hybrid and convection-dried apricots. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(1), 243-256. <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9635-x>
- Karaçalı, İ. (2006). *Bahçe Ürünlerinin Muhafaza ve Pazarlanması* (1.bs.). İzmir: Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.
- Karahan, M.Y. (2017). *Ginkgo biloba* yapraklarından toplam fenoliklerin ve toplam flavonoidlerin ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu (Yüksek lisans tezi). Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>
- Karataş, N. (2014). *Farklı kurutma yöntemlerinin bazı kayısı çeşitlerinin kimyasal ve fiziksel özelliklerine etkisi* (Doktora Tezi). Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>
- Kobus-Cisowska, J., Flaczyk, E. ve Jeszka, M. (2010). Antioxidant activities of *Ginkgo biloba* extracts: Application in freeze stored meat dumplings. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 9, 161–170. [https://www.food.actapol.net/pub/4\\_2\\_2010.pdf](https://www.food.actapol.net/pub/4_2_2010.pdf)
- Köksal, N., Gökirmak, M., Hasanoğlu, H. C., Yıldırım, Z. ve Gültek, A. (2001). Kayısı kükürtlemesi yapan işçilerde sülfür dioksit maruziyetinin solunum sistemi üzerine etkisi, *Türkiye Tıp Dergisi*, 8(2), 56-63. Erişim adresi: [http://ichastaliklaridergisi.org/managete/fu\\_folder/2001-02/2001-8-2-056-063.pdf](http://ichastaliklaridergisi.org/managete/fu_folder/2001-02/2001-8-2-056-063.pdf)
- Mei, Z., Khan, M. A., Zeng, W. ve Fu, J. (2014). DNA fingerprints of living fossil *Ginkgo biloba* by using ISSR and improved RAPD analysis. *Biochemical Systematics and Ecology*, 57, 332–337. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2014.09.007>
- Muzaffar, K., Dar, B. N., ve Kumar, P. (2017). Assessment of nutritional, physicochemical, antioxidant, structural and rheological properties of spray dried tamarind pulp powder. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(2), 746-757. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9444-7>

- Özkan, M. (2001). *Kuru kayıslarda kükürtdioksitin uzaklaştırılma yöntemleri üzerine araştırma* (Doktora tezi). Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>
- Pereira, E., Barros, L. ve Ferreira I.C. (2013). Chemical characterization of *Ginkgo biloba* L. and antioxidant properties of its extracts and dietary supplements. *Industrial Crops and Products*, 51, 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.09.011>
- Rayman, A. (2010). *Havuç suyu üretiminde elektroliz ve mikrodalga uygulamalarının verim ve kalite özellikleri üzerine etkileri* (Yüksek lisans tezi). Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>
- Rojas, C., Rojas-Castaneda, J. ve Rojas, P. (2016). Antioxidant properties of a *ginkgo biloba* leaf extract (egb 761) in animal models of alzheimer's and parkinson's diseases. *Current Topics Nutraceutical Research*, 14(1), 1–16. Erişim adresi: <http://eds.a.ebscohost.com/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=0&sid=b244dfb-942c-479a-b0bc-71cce67322fe%40sessionmgr4008>
- Salur Can, A. (2018). *Farklı düzeylerde kükürlenmiş kuru kayısların organik asit ve karotenoid miktarlarında depolama boyunca meydana gelen değişimin, kayısının rengi ve duyu özellikleri üzerine etkisi* (Yüksek lisans tezi). Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>
- Smith, P. F., MacLennan, K., Darlington, C. L. (1996). The neuroprotective properties of the *Ginkgo biloba* leaf: a review of the possible relationship to platelet activating factor (PAF), *Journal of Ethnopharmacology*, 50, 131-139. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(96\)01379-7](https://doi.org/10.1016/0378-8741(96)01379-7)
- Su, Y., Zhang, M., Zhang, W., Adhikari, B. ve Yang, Z. (2016). Application of novel microwave-assisted vacuum frying to reduce the oil uptake and improve the quality of potato chips. *LWT – Food Science Technology*, 73, 490–497. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.047>
- Türkmen D. (2019). *Farklı ticari rennetlerle üretilen beyaz peynirlerde olgunlaşma sırasında tekstürel, mikroyapısal ve biyokimyasal değişimler* (Yüksek lisans tezi). Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>
- Türkyılmaz, M. (2011). *Düşük düzeylerde kükürlenmiş kuru kayısların değişik sıcaklıklarda depolanması sürecinde fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik niteliklerindeki değişimler* (Doktora Tezi). Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>
- Uğur, Y. (2015). *Kükürlenerek kurutulmuş bazı kayısı çeşitlerinde SO<sub>2</sub>'nin giderilmesinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanımının, kayısının polifenol içeriğine ve antioksidan kapasitesine etkisinin belirlenmesi* (Yüksek lisans tezi). Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>
- Ünlütürk, A. ve Turantaş, F. (2015). *Gıdaların Mikrobiyolojik Analizi* (3. bs.). İzmir: Meta Basım.
- Vasco, C., Ruales, J., ve Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from ecuador. *Food Chemistry*, 111(4), 816–823. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.054>
- Yağmurca, M., Orhan, B., Şahin, Ö., Nacar, A., Yüksel, Ş. ve Narcı, A. (2007). Ratlarda sisplatin ile indüklenmiş böbrek hasarına karşı melatonin ve *Ginkgo biloba* 'nın koruyucu etkileri. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 8(2), 29-34. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/en/pub/kocatepetip/issue/17419/182415>
- Yavuz, A. B. (2018). *Lizozim ve Ginkgo biloba bitki ekstraktı uygulamalarının buzda depolanan ticari balık türlerinde patojen ve bozulma bakterileri üzerine etkisinin incelenmesi* (Doktora tezi). Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>



## Phylogenetic Analysis and Extracellular Enzyme Profiles of Yeast Strains Isolated from Raspberry Fruits

Tülay Turgut Genç<sup>1\*</sup>, Melih Günay<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Arts and Science, Biology, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey

<sup>2</sup>Department of Biology, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey

### Article History

Received: 30.01.2020

Accepted: 30.12.2020

Published: 20.03.2021

### Research Article


**Abstract** – Raspberry fruit contains phenolic compounds, flavones, flavonoids, vitamins, and antioxidant substances that are important properties for health and pharmacological sciences. Edible berries provide also a suitable habitat for the growth of various microorganisms. In this study, yeast biota associated with raspberry fruits was determined by molecular identification techniques. Raspberry fruits were collected from Çanakkale, Gelibolu (Gallipoli). Yeast strains were isolated and then identified by using the analysis of ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gene sequences. The phylogenetic analysis of all yeast strains was carried out by using the MEGA-X phylogenetic analysis tool. The extracellular enzyme profiles of identified yeast species were determined by the API-ZYM kit system. The distribution of yeast species on the raspberry fruits was determined as *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia viticola*, *Aureobasidium pullulans*, and *Metschnikowia pulcherrima*. It was observed that yeast strains belong to *Metschnikowia* genus were dominant on raspberry fruits. All yeast strains in *Metschnikowia* genus showed different enzyme profiles against seven extracellular enzymes. These enzymes may be the discriminatory enzymes for the yeast strains in the *Metschnikowia* genus. When the phylogenetic relationships among all yeast strains were investigated, all strains were divided into two main clades. While the first clade consists of only *Metschnikowia* genus, second clade includes *H. uvarum* and *A. pullulans* yeast species. Our results indicated that restriction patterns and also extracellular enzyme profiles could be utilized for differentiation of yeast strains within the genus. *M. pulcherrima*, *H. uvarum*, and *A. pullulans* can be used for industrial applications for future researches.

**Keywords** – Extracellular enzymes, PCR-RFLP, Raspberry, Yeast biota

## 1. Introduction

Raspberry fruit (*Rubus idaeus* L.) belongs to *Rosacea* family, naturally distributed in Canada, the USA, and Europe (Wang, Laamanen, Uosukainen, & Valkonen, 2005). Raspberry plants can grow about 1000 m altitude and humid regions throughout in northern line of Turkey (Göktaş, 2011). Raspberry fruits contain a great amount of valuable nutrients such as (poly)phenolic compounds, flavones, flavonoids, and vitamins. The phytochemicals and antioxidants contents of raspberry berries are important for diminishing biological oxidative stress in mammalian cells (Kähkönen et al., 1999; Halvorsen et al., 2001; Weber and Liu, 2002). Glycosylated phenol salidoside, one of the bioactive compounds of raspberry fruits, has therapeutic potential as it shows activity against the pathological processes of Huntington's disease (HD) (Kallscheuer et al., 2019). HD is a neurodegenerative disorder caused by the loss of striatal neurons due to the aggregation of huntingtin proteins encoded by the HTT gene (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Many studies were conducted antimicrobial potential of different parts of raspberry fruits (Puupponen-Pimia et al., 2005; Krisch, Galgóczy, Papp, & Vagvolgi, 2009; Riaz, Ahmad, & Rahman, 2011;

<sup>1</sup>  [tturgutgenc@comu.edu.tr](mailto:tturgutgenc@comu.edu.tr)

<sup>2</sup>  [melihgunay@comu.edu.tr](mailto:melihgunay@comu.edu.tr)

\*Corresponding Author

Velićanski, Cvetković, & Markov, 2012). In addition, raspberry fruits are used for wine production, due to having different acids and anthocyanin pigment as well as fructose (Duarte et al., 2010).

Microbial enzymes are utilized in many fields such as biofuel production, animal feeds and, the medical industry. In the food industry, these enzymes are used in mainly dairy products, wine production, and bakery. Microbial enzymes are effective in enhancing the flavor and nutrient values of the products during the fermentation process (Wang, Li, Yang, Yang, & Zhu, 2012). Yeasts are a significant microorganism for determining food microbial quality and producing fermented products. Most of the microbial enzymes were obtained from different yeast species such as *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Geotrichum candidum*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula* spp., *Kluyveromyces marxianus*, *Komagataella pastoris*, *Debaryomyces hansenii*, *Cryptococcus* spp., *Cryptococcus laurentii*, *Sporobolomyces salmonicolor* (Johnson, 2013a, 2013b).

Microbial diversity on raspberry fruits was limited on molds and bacteria in different researches (Tournas & Katsoudas, 2005; Leff & Fierer, 2013). The yeasts associated with raspberry fruits have not been identified and characterized with molecular techniques yet. Therefore, in this research yeast strains were isolated from raspberry fruits collected from Gallipoli, Çanakkale-Province, and identified by using analysis of PCR-RFLP and ITS1-5.8S-ITS2 gene sequences. The phylogenetic analysis of all yeast strains was carried out by using the MEGA-X phylogenetic analysis tool. The extracellular enzyme profiles of yeast strains were determined with the API-ZYM kit system. *Hanseniaspora uvarum*, *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia viticola* and *Metschnikowia pulcherrima* were identified on raspberry fruits. *Metschnikowia* genus was dominated more than half of yeast microbiota on raspberry fruit. All identified *H. uvarum* and *A. pullulans* yeast strains and nine of the isolated *M. pulcherrima* yeast strains were displayed a high level industrially important  $\beta$ -glucosidase activity.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Yeast Strains

Raspberry fruits were collected aseptically from Gelibolu-Turkey (40°51'50" North Latitude, 26°37'20" East longitude) taking into account of ripening period. Raspberry fruits were weighed and homogenized in 2% sodium citrate solution, were spread onto YGC-Agar medium (40 gr/l Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar) including 0.1% sodium propionate. Plates were incubated at 30 °C for 2-3 days, the growing yeast colonies were counted to determine the colony forming units (CFU/gr). Yeast strains, having different colony morphology, were selected randomly and transferred to YEPD medium (10 gr/l Yeast Extract, 20 gr/l Bacto-peptone, 20 gr/l Agar, 2 % Dextrose). After incubation of plates at 30 °C for 2-3 days, the isolated yeast strains were stored at -80°C for further use.

### 2.2. PCR-RFLP Analysis

Genomic DNA extraction of yeast strains was carried out by a previously developed DNA extraction procedure (Sherman, Fink, & Hicks, 1986). ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gene regions of all strains were amplified by using universal primers, ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), for yeast strains and amplification was studied by previously reported conditions (White et al., 1990). PCR products were electrophoresed and the length of PCR amplicons was calculated by Gel-Pro Analyzer v4.0 software. PCR products of ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gene regions were purified GeneJet PCR Purification Kit (Thermo Scientific – K0702) and were digested with Hae III, Hinf I, Msp I, Hha I, and Alu I restriction endonucleases, according to supplier's instructions. The length of restriction fragments was calculated by using Gel-Pro Analyzer v4.0 software The yeast strains were classified with respect to restriction patterns.



### 2.3. Sequencing and Phylogenetic Analysis

PCR products of all yeast strains were sequenced by utilizing the Applied Biotechnologies 3500xl Genetic Analyzer. The attained ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gene sequences were analyzed using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) online tool on NCBI (National Center for Biotechnology Information) webserver. All sequences of ITS1-5.8S-ITS2 region were uploaded to GenBank with the accession numbers MN556577-MN556603. ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequences of all yeast strains were studied by using MEGA-X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) software (Kumar et al., 2018). The nucleotide sequences of the ITS1-5.8S-ITS2 gene region of all yeast strains and two outgroups (*Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia guilliermondii*) were aligned with ClustalW (v1.6) algorithm in MEGA-X. Maximum parsimony tree was constructed by using a bootstrap method and Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) parameters for the determination of phylogenetic relationships of yeast strains. 1000 bootstrap replicates were used to defined branch support and bootstrap values above 50% were given.

### 2.4. Extracellular Enzyme Profiles

Extracellular enzyme profiles of identified yeast strains were determined by using the API-ZYM kit system (Bio-Mérieux, France). API-ZYM kit system is a minimized and semi-quantitative test system and utilized for screening 19 different enzyme activities (Alkaline phosphatase, Esterase (C 4), Esterase Lipase (C 8), Lipase (C 14), Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Cysteine arylamidase, Trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, Acid phosphatase, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase,  $\alpha$ -fucosidase). All yeast strains were grown in YEPD medium at 30 °C for 12 hours with constant shaking (120 rpm/rev). The 65  $\mu$ L from the saturated yeast culture were transferred to each microwells of the API-ZYM strip. The API-ZYM strips were incubated at 37 °C for 4 hours. After that, ZYM A and ZYM B reagents were added to each cupule and all the strips were incubated at room temperature for 5 minutes. Enzyme profiles of yeast strains were defined by a color scalar of API-ZYM kit system (0-5 scalar).

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Identification of Yeast Strains

In our study, the diversity of yeasts species on raspberry fruits has been investigated and the total yeast counts were calculated as  $1.2 \times 10^3$  CFU/gr. Depending on the colony morphology differences twenty-seven yeast strains were selected randomly for further identifications. Yeast strains were classified into five groups according to their colony morphology features such as colony color, colony margin, colony top, etc. (Table 1). The amplification of ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gene region of yeast strains resulted in three PCR groups with the length of ~400bp (18 yeast strains) ~650bp (2 yeast strains) and ~800bp (7 yeast strains) (Table 2). When the yeast strains present in PCR groups and the colony morphology groups were compared, the yeast strains (R-3, R-6, R-23, and R-25) having different colony morphologies localized within the same PCR group.



Table 1  
Grouping of yeast strains according to colony morphologies.

| Group No | Yeast Strains  |
|----------|--|
| 1        | R-1, R-2, R-4, R-5, R-7, R-8, R-9, R-10, R-12a, R-13, R-14, R-15, R-24, R-26 |
| 2        | R-3, R-25  |
| 3        | R-6  |
| 4        | R-11, R-12b, R-16, R-17, R-18, R-19, R-20, R-22, R-23                        |
| 5        | R-21   |

The analysis of the restriction profile of ITS1-5.8S-ITS2 gene region has been used to identify yeast strains isolated from natural sources and to determine strains discrepancy (Carvalho, Meirinho, Estevinho, & Choupina, 2010). Therefore, all yeast strains were cleaved with five restriction enzymes (Hinf I, Hae III, Msp I, Alu I, and Hha I) and were grouped again for the PCR-RFLP analysis (Table 2). The yeast strains in the first PCR group displayed two different restriction profiles. The PCR products of all yeast strains in the first group were not digested with Alu I, and three yeast strains (R-3, R-6, and R-25) were not digested with Msp I restriction enzyme. The yeast strains present in the second PCR groups showed similar restriction patterns with the group members. By means of PCR-RFLP analysis, four different restriction profiles were attained. We assumed that each restriction profile may represent to different yeast strains.

As indicated in previous reports, the colony morphology and/or PCR size alone is not sufficient for distinguishing yeast strains and, the RFLP analysis was essential for discrimination of yeast strains. The PCR-RFLP results of ITS1-5.8S-ITS2 gene region are similar to previous studies which are especially used Hae III, Hinf I and Hha I (Cfo I) restriction endonucleases (Guillamon, Sabate, Barrio, Cano, & Querol, 1998; Rodriguez-Vico, Clemente-Jimenez, Mingorance-Cazorla, Martinez-Rodriguez, & Las Heras-Vazquez, 2003; Romano, Capece, Siesto, & Romaniello, 2009; Gibson et al., 2011). The Hae III, Hinf I, and Hha I restriction pattern of second group members was similar to *M. pulcherrima* yeast species recorded in previous studies (Esteve-Zarzoso, Belloch, Uruburu, & Querol, 1999; Rodriguez-Vico et al., 2003).

Table 2  
PCR-RFLP results of yeast strains

| PCR Length (~bp) | Restriction Profiles | Yeast Strains  | Restriction Product Length (~bp) |             |             |             |                |
|------------------|----------------------|--|----------------------------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
|                  |                      |  | Hae III                          | Hinf I      | Msp I       | Alu I       | Hha I          |
| ~400             | 1                    | R-3, R-6, R-25   | 289-120                          | 215-186     | -           | -           | 217-99-90      |
|                  | 2                    | R-1, R-2, R-4, R-5, R-7, R-8, R-9, R-10, R-12a, R-13, R-14, R-15, R-23, R-24, R-26 | 286-109                          | 192-188     | 224-120-60  | -           | 208-96-90      |
| ~650             | 3                    | R-20, R-22   | 441-150                          | 278-168-129 | 270-184-141 | 387-207     | 183-179-108-94 |
| ~800             | 4                    | R-11, R-12/b, R-16, R-17, R-18, R-19, R-21   | 750                              | 353-184-164 | 743         | 353-184-164 | 331-324        |

In this research, the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gene region of all yeast strains was sequenced. The obtained sequences were analyzed by the BLAST tool on the NCBI web server. The nucleotide sequences of the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gene region were submitted to the GenBank Database on NCBI and attained acces-

sion number for all sequences (Accession Number: MN556577-MN556603) (Table 3). According to the BLAST analysis of ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gene region, all yeast strains displayed 95-100% similarity with their reference yeast strains except the R-4 yeast strain. It was determined that all yeast strains in the first PCR group (~400 bp) were the member of *Metschnikowia* genus. Three yeast strains (R-3, R-6, and R-25) showed 98-99% sequence similarity with *M. viticola* reference yeast strain (KY104213.1). *M. viticola* was firstly isolated from wild grapes (Peter, Tornai-Lehoczki, Suzuki, & Dlauchy, 2005). In our research, *M. viticola* yeast species was recorded first time on raspberry fruits. Also, RFLP profile of *M. viticola* was displayed for the first time in our research. Restriction digestion with Msp I can be used for distinguishing the *M. viticola* species from *M. pulcherrima* yeast species.

All other yeast strains in the first PCR group showed nearly 95% similarity with *M. pulcherrima* reference yeast strain (NR\_164379.1) except R-4 (91% similarity). The taxonomic identification of *M. pulcherrima* yeast strains by comparing their rDNA sequences with those deposited in databases can easily lead to false results. Because of the sequences of *M. pulcherrima* yeast strains were deposited in the database without an expert taxonomic verification. Because of the non-homogenized rDNA repeats and the frequent heterozygosity of barcode genes, the type strains of the species of the *M. pulcherrima* clade are not separated by clear barcode gaps (reviewed in Sipiczki, 2020). The colony morphologies, pigment secretion pattern, and RFLP profile of all identified *M. pulcherrima* yeast species were similar in our research. However, the yeast species defined as *M. pulcherrima* should be analyzed taxonomically, as indicated in Sipiczki's review.

Table 3

Blast analysis of ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gene region.

| Yeast Strains | Similarity (%) | Identified Yeast Strains (Ref. Acc. Number) | GenBank Accession Number |
|---------------|----------------|---|--------------------------|
| R-1           | 97.92%         | <i>M. pulcherrima</i> (NR_164379.1)         | MN556577                 |
| R-2           | 97.33%         | <i>M. pulcherrima</i> (NR_164379.1)         | MN556578                 |
| R-3           | 98.75%         | <i>M. viticola</i> (NR_077083.1)            | MN556579                 |
| R-4           | 91.20%         | <i>M. pulcherrima</i> (NR_164379.1)         | MN556580                 |
| R-5           | 97.80%         | <i>M. pulcherrima</i> (NR_164379.1)         | MN556581                 |
| R-6           | 97.11%         | <i>M. viticola</i> (KY104213.1)             | MN556582                 |
| R-7           | 97.31%         | <i>M. pulcherrima</i> (NR_164379.1)         | MN556583                 |
| R-8           | 97.04%         | <i>M. pulcherrima</i> (NR_164379.1)         | MN556584                 |
| R-9           | 95.54%         | <i>M. pulcherrima</i> (NR_164379.1)         | MN556585                 |
| R-10          | 95.25%         | <i>M. pulcherrima</i> (NR_164379.1)         | MN556586                 |
| R-11          | 99.02%         | <i>H. uvarum</i> (KY103569.1)               | MN556587                 |
| R-12a         | 96.47%         | <i>M. pulcherrima</i> (NR_164379.1)         | MN556588                 |
| R-12b         | 98.88%         | <i>H. uvarum</i> (KY103569.1)               | MN556589                 |
| R-13          | 97.33%         | <i>M. pulcherrima</i> (NR_164379.1)         | MN556590                 |
| R-14          | 96.75%         | <i>M. pulcherrima</i> (NR_164379.1)         | MN556591                 |
| R-15          | 96.75%         | <i>M. pulcherrima</i> (NR_164379.1)         | MN556592                 |
| R-16          | 100.00%        | <i>H. uvarum</i> (KY1035671.1)              | MN556593                 |
| R-17          | 99.25%         | <i>H. uvarum</i> (KY1035671.1)              | MN556594                 |
| R-18          | 100.00%        | <i>H. uvarum</i> (KY1035671.1)              | MN556595                 |
| R-19          | 100.00%        | <i>H. uvarum</i> (KY1035671.1)              | MN556596                 |
| R-20          | 99.42%         | <i>A. pullulans</i> (MG890282.1)            | MN556597                 |
| R-21          | 95.68%         | <i>H. uvarum</i> (KY103569.1)               | MN556598                 |
| R-22          | 98.90%         | <i>A. pullulans</i> (KY552634.1)            | MN556599                 |
| R-23          | 96.44%         | <i>M. pulcherrima</i> (JN229413.1)          | MN556600                 |

|      |        |                                     |          |
|------|--------|-------------------------------------|----------|
| R-24 | 96.78% | <i>M. pulcherrima</i> (NR_164379.1) | MN556601 |
| R-25 | 98.56% | <i>M. viticola</i> (NR_077083.1)    | MN556602 |
| R-26 | 94.97% | <i>M. pulcherrima</i> (NR_164379.1) | MN556603 |

R-20 and R-22 yeast strains present in the second PCR group showed 98-99% sequence similarity with *A. pullulans* yeast species. There is no reference type strain for *A. pullulans* in the GenBank Database on NCBI. Therefore, the highest percent sequence similarity results were given in Table 3 for *A. pullulans* yeast species. Seven yeast strains (R-11, R-12b, R-16, R-17, R-18, R-19, and R-21) in the third PCR group displayed 96-99% sequence similarity with *H. uvarum* reference yeast species (KY103569.1). These results revealed that the restriction endonucleases utilized for RFLP analysis were suitable for the discrimination of yeast strains from each other. The percent distribution of yeast species on the raspberry fruits was determined as 55.6% *M. pulcherrima*, 25.9% *H. uvarum*, 11.1% *M. viticola*, and 7.4% *A. pullulans* (Figure 1). It is observed that yeast strains belong to the *Metschnikowia* genus were dominant on raspberry fruits collected from Gelibolu.

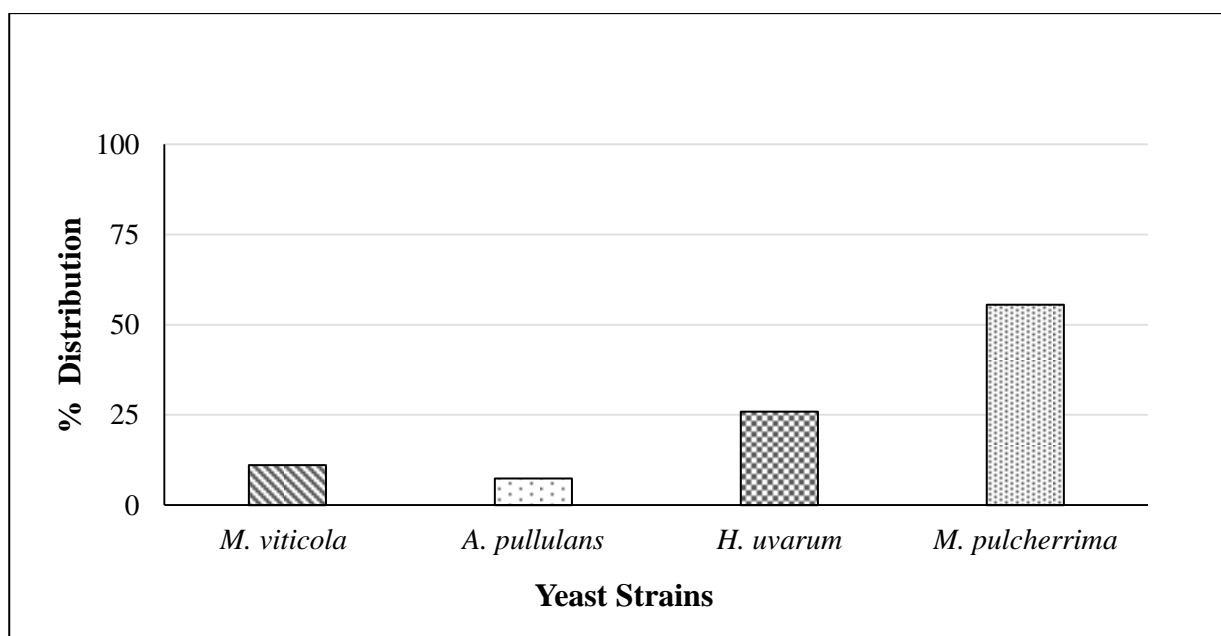


Figure 1. The percent distribution of yeast species on raspberry fruits.

The phylogenetic analysis of all yeast strains was carried out by using the MEGA-X phylogenetic analysis tool. ITS1-5.8S-ITS2 rDNA gene sequences of yeast strains were aligned by the ClustalX v1.6 algorithm and the Maximum parsimony tree was constructed by using default parameters. 1000 bootstrap replicates were used to defined branch support. The percentage of trees is shown next to the branch and frequencies under 50% are not given. *S. cerevisiae* and *P. guilliermondii* yeast species were selected as outgroup. According to the maximum parsimony tree, 27 yeast strains were separated into two main clades. It was determined that the first clade consisted of *Metschnikowia* genus (*M. pulcherrima* and *M. viticola*), the second clade contained *H. uvarum* and *A. pullulans* yeast species (Figure 2). As shown in the MP tree, all *M. pulcherrima* yeast species localized in the first sub-clade. The second sub-clade includes *M. viticola* yeast species that were also discriminated as a different group with RFLP results. The second main clade is divided into two sub-clades. All *H. uvarum* and *A. pullulans* yeast species localized in the third and fourth sub-clades, respectively. These yeast strains also showed two different restriction patterns in the RFLP results. All these results indicated that, RFLP results and MP analysis consistent with each other.

The non-*Saccharomyces* yeast strains are frequently utilized for biotechnological research along with their industrial importance. Yeast strains are generally used for various research, such as biomedical studies, biocontrol agents, bioremediation and fermentation process (Johnson & Echavarri-Erasun, 2011). *M. pulcherrima*, *H. uvarum*, and *A. pullulans* are good antagonists for post-harvest diseases in many fruits. It was reported that these yeast strains have protective features for *Botrytis cinerea*-based diseases (Spadaro, Vola, Piano, & Gullino, 2002; Vero, Garmendia, Gonzalez, Garat, & Wisniewski, 2010; Liu et al., 2010). *A. pullulans* yeast species are used as an indicator for environmental pollutions. The pullulan polysaccharide, produced by *A. pullulans*, have been utilized for different applications, such as the production of commercial capsules for applying diet of diabetic patients (Deshpande, Rale, & Lynch, 1992; Sena, Costelli, Gibson, & Coughlin, 2006; Cheng, Demirci, & Catchmark, 2011). Therefore, the identified yeast species, *M. pulcherrima*, *H. uvarum* and *A. pullulans* could be used for various commercial applications in the future.

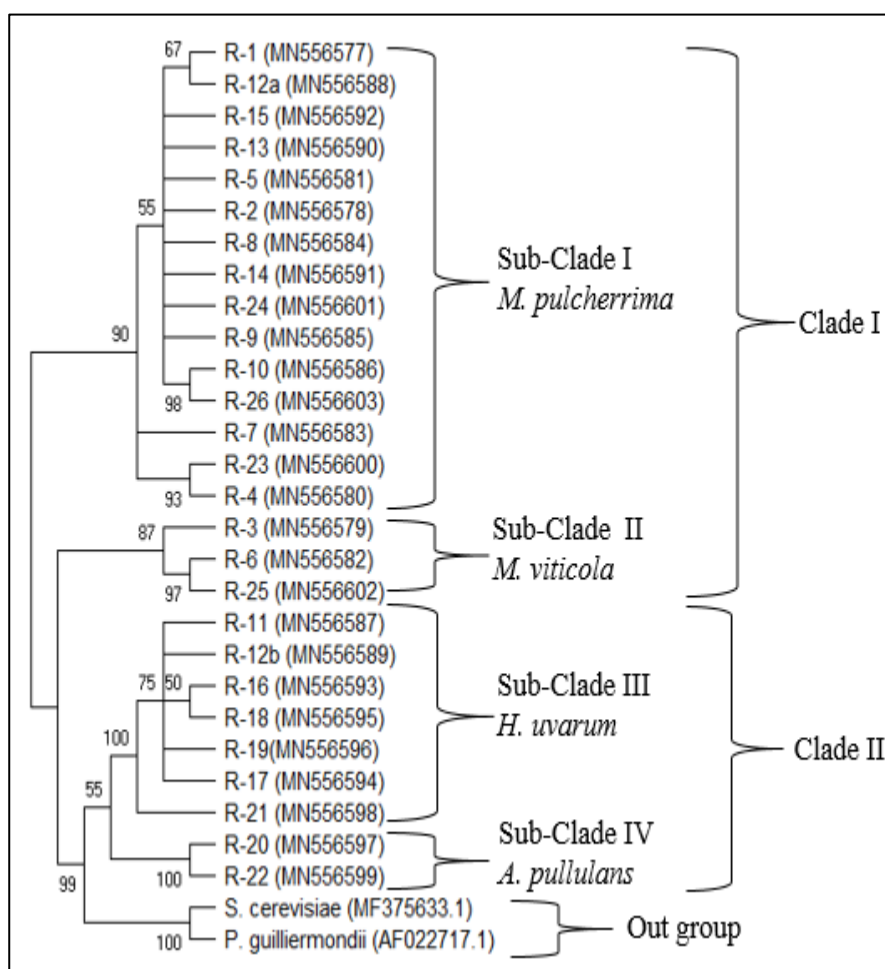


Figure 2. Maximum parsimony tree of yeast strains isolated from raspberry. Maximum parsimony tree of yeast strains isolated from raspberry. MP tree was constructed by using the bootstrap method and Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) parameters in the MEGA-X software. 1000 bootstrap replicates were used to define branch support and above 50% bootstrap values were given. *S. cerevisiae* and *P. guilliermondii* yeast strains were selected as outgroup.

### 3.2. Extracellular Enzyme Profiles

The extracellular enzymes produced by yeast strains were used to obtain various fermented products. Therefore, the extracellular enzyme activities of all identified yeast strains were investigated. The extracellular enzyme profile of yeast strains was analyzed by using the API-ZYM kit system and the results were given in Table 4. The lipase (C-14), trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -

glucuronidase, N-acetyl-glucosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase, and  $\alpha$ -fucosidase activities were not recorded in all yeast strains, so, these results were not given in Table 4. All yeast strains showed high leucine arylamidase activity.

It was shown that *M. viticola*, *H. uvarum* and *A. pullulans* yeast strains have high leucine arylamidase and  $\beta$ -glucosidase enzyme activity. Interestingly, *M. pulcherrima* yeast strains showed two different extracellular enzyme profiles. In the first profile, six *M. pulcherrima* yeast strains (R-1, R-4, R-5, R-7, R-12a, R-26) exhibit moderate levels of enzyme activities given in the table. In the second enzyme profile, *M. pulcherrima* yeast strains (R-2, R-8, R-9, R-10, R-13, R-14, R-15, R-23, R-24) showed a low level of esterase, esterase lipase, acid phosphatase, and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase activity and, high level of  $\beta$ -glucosidase activity. No activity was recorded for the alkaline phosphatase, valine arylamidase, cystine arylamidase, and  $\alpha$ -glucosidase enzymes. The extracellular enzyme profiles are utilized to define and discriminate yeast strains (Garcia-Martos et al., 2001). In our results, *M. pulcherrima* yeast strains have different enzyme activities even if they were identified as the same species.

Table 4

Extracellular enzyme profile of yeast strains determined with API ZYM test

| Yeast Strains  | C | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| <i>M. pulcherrima</i><br>(R-1, R-4, R-5, R-7, R-12a, R-26)                   | 0 | 3 | 3 | 2 | 4 | 4 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2  |
| <i>M. pulcherrima</i><br>(R-2, R-8, R-9, R-10, R-13, R-14, R-15, R-23, R-24) | 0 | 0 | 1 | 1 | 4 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 5  |
| <i>M. viticola</i><br>(R-3, R-6, R-25)                                       | 0 | 0 | 1 | 1 | 4 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 4  |
| <i>H. uvarum</i><br>(R-11, R-12/b, R-16, R-17, R-18, R-19<br>ve R-21 )       | 0 | 0 | 1 | 1 | 4 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 5  |
| <i>A. pullulans</i><br>(R-20, R-22)  | 0 | 0 | 1 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4  |

C, Control; 1: Alkaline Phosphatase; 2: Esterase (C4); 3: Esterase Lipase (C8); 4: Leucine arylamidase; 5: Valine arylamidase; 6: Cystine arylamidase; 7: Acid Phosphatase; 8: Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase; 9:  $\alpha$ -glucosidase; 10:  $\beta$ -glucosidase. Results were expressed on a scale from no activity (0) to maximum activity (5).

*A. pullulans*, *H. uvarum* and some of *M. pulcherrima* yeast strains have  $\beta$ -glucosidase activity.  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21) breaks the  $\beta$ -1-4 glycosidic bond in oligosaccharides. The  $\beta$ -glucosidase enzyme produced by microorganisms contributes to increasing flavor, aroma, and quality of the wine (Esen, 2003). Another enzyme, leucine arylamidase, is used to increase wine quality of aroma and taste (Dodor & Tabatabai, 2007; Delfini & Formica, 2001; Nikolaou, Andrighetto, Lombardi, & Nikolaos, 2007; Nikolaou, Soufleros, Boulopasi, & Tzanetakis, 2006; Fleet, Charoenchai, Henschke, & Todd, 1997). The leucine arylamidase (EC 3.4.11.2), belongs to the aminopeptidase enzyme family, hydrolyzes N-terminal ends of amino acids and, all isolated yeast strains have high leucine arylamidase activity in our research.

#### 4. Conclusion

Yeast strains have generally used for biotechnological surveys, such as pharmacology, medicine, drug, enzyme, and food industry. Therefore, the isolation and identification of yeast species from natural habitats are more significant for manufacturers. In this study, the isolated and identified *M. pulcherrima*, *A. pullulans*, and *H. uvarum* yeast strains are good candidates for different industrial applications. *M. pulcherrima* yeast

species can be used as biocontrol agents to pathogenic microorganisms because of their strong antimicrobial activity. Many antagonistic strains of *Metschnikowia* have been patented and also some *Metschnikowia*-based commercial products were used as fermentation additives and biocontrol agents against plant pathogens and post-harvest diseases (reviewed in Sipiczki, 2020). Similarly, *A. pullulans* yeast species known as black yeast were commercially used for the production of different enzymes (amylase, xylanase, pectinase, etc), and pullulan is the important polysaccharide for the production of biodegradable plastics (reviewed in Gaur et al., 2015). The apiculate yeast species *H. uvarum* (anamorph *Kloeckera apiculata*) are also commercialized as oenological starter cultures for the production of volatile compounds in wine (Masneuf-Pomarede et al., 2016). The identified yeast species in our research, *M. pulcherrima*, *H. uvarum*, and *A. pullulans* could be used for different commercial purposes in the future.

### Acknowledgement

This work was supported by the Office of Scientific Research Projects Coordination at Çanakkale Onsekiz Mart University. Grant number: FYL-2014-110.

### Author Contributions

Tülay Turgut Genç: Conceived and designed the analysis, edited the data, wrote and finalized the paper.

Melih Günay: Performed the experimental studies and obtained the data, wrote the paper.

### Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

- Abbas, A. C. (2006). Production of antioxidants, aromas, colors, flavors, and vitamins by yeasts. In A. Quarel & G. Fleet (Eds.), *Yeasts in Food and Beverages*, vol 2, (pp. 285-334). Springer, Verlag Berlin Heidelberg.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403 – 410. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Carvalho, C. M., Meirinho, S., Estevinho, M. L. F., & Choupina, A. (2010). Yeast species associated with honey: Different identification methods. *Archivos de zootecnia*, 59(225), 103-113. Retrieved from <https://www.uco.es/ucopress/az/index.php/az/article/view/4896/3142>.
- Cheng, C. K., Demirci, A., & Catchmark, M. J. (2011). Pullulan: biosynthesis, production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(1), 29–44. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3477-y>
- Delfini, C., & Formica, J. V. (2001). *Wine microbiology science and technology*. Italy: CRC Press. Marcel Dekker Inc.
- Deshpande, M. S., Rale, V. B., & Lynch, J. M. (1992). *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: A status report. *Enzyme and Microbial Technology*, 14(7), 514–527. DOI: [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(92\)90122-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(92)90122-5)
- Dodor, D. E., & Tabatabai, M. A. (2007). Arylamidase activity as an index of nitrogen mineralization in soils. *Journal Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 38(15-16), 2197-2207. DOI: <https://doi.org/10.1080/00103620701549132>



- Duarte, W. F., Dragone, G., Dias, D. R., Oliveira, J. M., Teixeira, J. A., Almeida de Silva, J. B., & Schwan, R. F. (2010). Fermentative behavior of *Saccharomyces* strains during micro vinification of raspberry juice (*Rubus idaeus* L.). *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 173–182. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.014>
- Esen, A. (2003). Hydrolases;  $\beta$ -Glucosidase. In J. R. Whitaker, A. G. J. Voragen, D. W. S. Wong (Eds.), *Handbook of Food Enzymology* (pp. 791-803), Dekker: New York.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(1), 329–337. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-329>
- Fleet, G. H., Charoenchai, C., Henschke, P. A., & Todd, B. E. N. (1997). Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 3(1), 2–8. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1997.tb00109.x>
- Garcia-Martos, P., Marin, P., Hernandez-Molina, J. M., Garcia-Agudo, L., Aoufi, S., & Mira, J. (2001). Extracellular enzymatic activity in 11 *Cryptococcus* species. *Mycopathologia*, 150(1), 1-4. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1010868223582>
- Gaur, R., Singh, R., Gupta, M. & Gaur, M. K. (2015). *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. *African Journal of Biotechnology*, 9(47), 7989-7997. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB10.948>
- Gibson, B. R., Pham, T., Wimalasena, T., Box, W. G., Koivuranta, K., Storgards, E., & Smart, K. A. (2011). Evaluation of ITS PCR and RFLP for differentiation and identification of brewing yeast and brewery ‘wild’ yeast contaminants. *Journal of The Institute of Brewing*, 117(4), 556–568. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00504.x>
- Göktaş, A. (2011). *Ahududu ve böğürtlen yetiştiriciliği*. Isparta Meyvecilik Araştırma İstasyonu Müdürlüğü, Yayın No: 38. Retrieved from: <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/marem>
- Guillamon, J. M., Sabate, J., Barrio, E., Cano, J., & Querol, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology*, 169(5), 387–392. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002030050587>
- Halvorsen, B. L. K., Holte, M. C. W., Myhrstad, I., Barikmo, E., Hvattum, S. F., Remberg, A. B., Wold Haffner, H., Baugerod, L. F., Andersen, J., Moskaug, D. R., & Blomhoff, J. R. (2001). A Systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *The Journal of Nutrition*, 132(3), 461-471. DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/132.3.461>
- Hierro, N., Gonzalez, A., Mas, A., & Guillamon, J. M. (2004). New PCR-based methods for yeast identification. *Journal of Applied Microbiology*, 97(4), 792–801. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02369.x>
- Johnson, E. A. (2013a). Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts—the Ascomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 503–517. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4497-y>
- Johnson, E. A. (2013b). Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts—the Basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(17), 7563–7577. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5046-z>
- Johnson, E. A., & Echavarri-Erasun, C. (2011). Yeast Biotechnology. In P.C. Kurtzman, J.W. Fell & T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*, (pp. 22-44). Elsevier B.V.
- Kallscheuer, N., Menezes, R., Foito, A., Da Silva, M. H., Braga, A., Dekker, W., Sevillano, D. M., Rosado-Ramos, R., Jardim, C., Oliveira, J., Ferreira, P., Rocha, I., Silva, A. R., Sousa, M., Allwood, J. W.,

- Bott, M., Faria, N., Stewart, D., Ottens, M., Naesby, M., Dos Santos, C. N., & Marienhagen, J. (2019). Identification and microbial production of the raspberry phenol salidroside that is active against Huntington's disease. *Plant Physiology*, 179(3), 969-985. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.18.01074>
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3954-3962. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf9901461>
- Krisch, J., Galgóczy, L., Papp, T., & Vagvolgi, C. (2009). Antimicrobial and antioxidant potential of waste products remaining after juice pressing. *Annals of the Faculty of Engineering Hunedoara-Journal of Engineering*, 8(4), 131-134. Retrieved from: <http://annals.fih.upt.ro/pdf-full/2009/ANNALS-2009-4-26.pdf>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lee, B. H. (1996). *Fundamentals of Food Biotechnology*, VCH Publishers, USA.
- Leff, J. W., & Fierer, N. (2013). Bacterial communities associated with the surfaces of fresh fruits and vegetables. *PLoS ONE*, 8(3), e59310. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059310>
- Liu, H. M., Guo, J., Cheng, Y. J., Liu, P., Long, C. A., & Deng, B. X. (2010). Inhibitory activity of tea polyphenol and *Hanseniaspora uvarum* against *Botrytis cinerea* infections. *Letters in Applied Microbiology*, 51(3), 258-263. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02888.x>
- Lopez, V., Querol, A., Ramon, D., & Fernandez-Espinar, M. T. (2001). A simplified procedure to analyze mitochondrial DNA from industrial yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 68(1-2), 75-81. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00483-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00483-4)
- Masneuf-Pomarede, I., Bely, M., Marullo, P. & Albertin, W. (2016). The genetics of non-conventional wine yeasts: current knowledge and future challenges. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1563. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01563>
- Nikolaou, E., Andrighetto, C., Lombardi, A., & Nikolaos, T. (2007). Heterogeneity in genetic and phenotypic characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from red and white wine fermentation. *Food Control*, 18(11), 1458-1465. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.11.004>
- Nikolaou, E., Soufleros, E. H., Boulompasi, E., & Tzanetakis, N. (2006). Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. *Food Microbiology*, 23(3), 205-211. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.03.004>
- Peter, G., Tornai-Lehoczki, J., Suzuki, M., & Dlačny, D. (2005). *Metschnikowia viticola* sp. nov., a new yeast species from grape. *Antony van Leeuwenhoek*, 87(2), 155-160. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10482-004-2842-6>
- Puupponen-Pimia R., Nohynek, L., Hartmann-Schimidlin, S., Kahkonen, M., Heinonen, M., & Maatta-Riihinen, K. (2005). Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 98(4), 991-1000. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02547.x>
- Riaz, M., Ahmad, M., & Rahman, N. (2011). Antimicrobial screening of fruit, leaves, root, and stem of *Rubus fruticosus*. *Journal of Medicinal Plant Research*, 24(5), 5920-5924. Retrieved from: <https://academicjournals.org/article/article1381913021>
- Rodriguez-Vico, F., Clemente-Jimenez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martinez-Rodriguez, S., & Las Heras-Vazquez, F. J. (2003). Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated

- ed during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology*, 21(2), 149–155. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00063-7)
- Romano, P., Capece, A., Siesto, G., & Romaniello, R. (2009). Restriction analysis of rDNA regions to differentiate non-*Saccharomyces* wine species in mixed cultures. *Journal of Engineering and Technology Research*, 1(4), 068-071. Retrieved from: <http://www.academicjournals.org/JETR>
- Sena, R. F., Costelli, M. C., Gibson, L. H., & Coughlin, R. W. (2006). Enhanced production of pullulan by two strains of *A. pullulans* with different concentrations of soybean oil in sucrose solution in batch fermentations. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 23(4), 507–515. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-66322006000400008>
- Sherman, F., Fink, G. R., & Hicks, J. B. (1986). *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Spadaro, D., Vola, R., Piano, S., & Gullino, M. L. (2002). Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biology and Technology*, 24(2), 123–134. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00172-7](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00172-7)
- Sipiczki, M. (2020). *Metschnikowia pulcherrima* and Related Pulcherrimin-Producing Yeasts: Fuzzy Species Boundaries and Complex Antimicrobial Antagonism. *Microorganisms*, 8(1029), 1-19. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071029>
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72(6), 971-83. DOI: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90585-E](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90585-E)
- Tournas, V. H., Katsoudas, E. (2005). Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus juices. *International Journal of Food Microbiology*, 105(1), 11-17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.002>
- Velićanski, A., Cvetković, D., & Markov, S. (2012). Screening of antibacterial activity of raspberry (*Rubus idaeus* L.) fruit and pomace extracts. *Acta Periodica Technologica*, 43, 305–313. DOI: <https://doi.org/10.2298/APT1243305V>
- Vero, S., Garmendia, G., Gonzalez, M. B., Garat, M. F., & Wisniewski, M. (2009). *Aureobasidium pullulans* as a biocontrol agent of postharvest pathogens of apples in Uruguay. *Biocontrol Science and Technology*, 19(10), 1033-1049. DOI: <https://doi.org/10.1080/09583150903277738>
- Wang, Q., Laamanen, J., Uosukainen, M., & Valkonen Jari, P. T. (2005) Cryopreservation of *In Vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation–vitrification and encapsulation–dehydration. *Plant Cell Reports*, 24(5), 280–288. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0936-x>
- Wang, X., Li, S., Yang, X., Yang, S., & Zhu, M. (2012). Technology prospecting on enzymes: application, marketing, and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2(3), 1-11. DOI: <https://doi.org/10.5936/csbj.201209017>
- Weber, C., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant capacity and anticancer properties of red raspberry. *Acta Horticulturae*, 585, 451–455. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.585.73>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T.J. White (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315-322.), Academic Press, San Diego, California, USA.