

Cilt / Volume: 12, Sayı / Issue: 1

Mart / March, 2022

ISSN 2146-0574

E-ISSN 2536-4618

**FBED / JIST**

Uluslararası Hakemli Dergi / International Peer Reviewed Journal

**İĞDIR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ DERGİSİ**

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



# FBED / JIST

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

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

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



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

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

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

**Basılı ISSN: 2146-0574**

**Elektronik ISSN: 2536-4618**

**Veri Tabanı / Indexed by**

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

**Sahibi / Owner**

Doç. Dr. Ahmet TAN / Assoc. Dr. Ahmet TAN  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü / Graduate Education Institute Director

**Baş Editör / Editor in Chief**

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

**Yardımcı Editörler / Associate Editors**

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

**Danışma Kurulu/ Advisory Board**

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

**Tasarım / Design**

Prof. Dr. Bilal KESKİN  
Arş. Gör. Hasan Kaan KÜÇÜKERDEM  
Arş. Gör. Ramazan TOSUN

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

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

ULUSAL EDITÖRLER KURULU  
NATIONAL EDITORIAL BOARD

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

ULUSLARARASI EDITÖRLER KURULU

INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD

Prof. Dr. Muhammad HANIF, Mathematic Lahore Üniversitesi, Lahore, Pakistan	Assist. Prof. Dr. Christina BENEKI, Dep. of Bus. Admin. Tech. Educ. Inst. of Ionian Islands, Cephalonia, Greece
Prof. Dr. Muhammad SARWAR KHAN, Agri. Biotechnology University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan	Dr. Abdul WAHEED, Animal Science Bahauddin Zakariya University, Multan, Pakistan
Prof. Dr. Tan YANWEN, Economics South China Agricultural University, Guangzhou, China	Dr. Snezana ANDJELKOVIC, Forage Crops Institute for Forage Crops(IFC), Krusevac, Republic of Serbia
Prof. Dr. Abdul WAHID, Department of Botany University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan	Dr. Ferhat ABBAS, Vet- Animal Science, CASVAB University of Balochistan, Balochistan, Pakistan
Prof. Dr. Zafar IQBAL, Veterinary Science University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan	Dr. Naveen KUMAR, Horticulture University of Florida, Florida, USA
Prof. Dr. Khalid JAVED, Dep. of Livestock Prod. University of Vet. & Animal Sciences, Lahore, Pakistan	

DİL EDITÖRLERİ  
LANGUAGE CONSULTANTS

Prof. Dr. Guang Jie ZHAO, Forestry, Beijing Forestry University, China	Dr. Öğr. Üyesi Didem ERDEL, Iğdır Üniversitesi, Iğdır, Türkiye
Prof. Dr. Vaqif ABBASOV, Chemistry, Neft Kimya Prosesleri İnstitutu, Azərbaycan	Uzm. Handan YILDIZ, Milli Eğitim Müdürlüğü, Iğdır, Türkiye
Prof. Dr. Emanuele BOSELLI, Food Science and Technology Free University of Bozen, Bolzano, Italy	Öğr. Gör. Talha YILDIZ, Iğdır Üniversitesi, Iğdır, Türkiye
Prof. Dr. Lenka KOURIMSKA, Food and Nutrition, Czech Uni. of Life Sciences Prague, Suchdol, Czech Republic	

BU SAYININ HAKEM LİSTESİ  
REFEREE LIST IN THIS ISSUE

Prof. Dr. Mahmut HEKİM, Electrical Electronic Engineering	Doç. Dr. İkrım ORAK, Physics
Prof. Dr. Victor NEDZVETSKY, Biology	Doç. Dr. Emre SAYAN, Biology
Prof. Dr. Ercüment GENÇ, Biology	Doç. Dr. Özkan ÖZDEN, Biology
Prof. Dr. Mustafa ATEŞ, Biology	Doç. Dr. Engin NAS, Mechanical Engineering
Prof. Dr. Tanju TEKER, Mechanical Engineering	Doç. Dr. Emrah AYDEMİR, Computer Engineering
Prof. Dr. Serdar Osman YILMAZ, Mechanical Engineering	Doç. Dr. Ümit CEYLAN, Physics
Prof. Dr. Selçuk GÜMÜŞ, Chemistry	Doç. Dr. Halil ATALAY, Mechanical Engineering
Prof. Dr. Mehmet Emin ARICI, Mechanical Engineering	Doç. Dr. Lütfiye ALTAY, Mechanical Engineering
Prof. Dr. Yücel ÖZMEN, Mechanical Engineering	Doç. Dr. Cem Burak YILDIZ, Chemistry
Prof. Dr. Hülya GÜL, Food Engineering	Doç. Dr. Emine Serap AYDEMİR, Field Crops
Prof. Dr. Hayrettin EKİZ, Field Crops	Doç. Dr. Gülşah BENGİSU YAVUZER, Field Crops
Prof. Dr. Tanju TEKER, Mechanical Engineering	Doç. Dr. Cüneyt ÇAĞLAYAN, Chemistry
Prof. Dr. Serdar Osman YILMAZ, Mechanical Engineering	Doç. Dr. Sultan ARSLAN TONTUL, Food Engineering
Prof. Dr. Perihan ÜNAK, Environmental Engineering	Doç. Dr. Yusuf UÇAR, Mathematics
Prof. Dr. Osman KILINÇEKER, Food Engineering	Doç. Dr. Murat ÇAĞLAR, Mathematics
Prof. Dr. Osman KALENDER, Electric Electronic Engineering	Doç. Dr. Murat YAĞMURLU, Mathematics
Prof. Dr. Ayhan İSTANBULLU, Computer Engineering	Doç. Dr. Muhammet KÖSE, Chemistry
Prof. Dr. Seydi DOĞAN, Electric Electronic Engineering	Doç. Dr. Turgay DİNDAROĞLU, Soil Science and Plant Nutrition
Prof. Dr. Hüseyin SERENCAM, Chemistry	Doç. Dr. Ömer ATABEYOĞLU, Landscape Architecture
Prof. Dr. Cahit BALABANLI, Field Crops	Doç. Dr. Ayşe DEMİREL, Soil Science and Plant Nutrition
Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ, Food Engineering	Doç. Dr. Veysel ÇOMAKLI, Chemistry
Prof. Dr. Emine YALÇIN, Biology	Doç. Dr. Serdar MERCAN, Mechanical Engineering
Prof. Dr. Soner SOYLU, Plant Protection	Doç. Dr. Vahap YÖNTEN, Chemistry
Doç. Dr. Şahset İRDEMEZ, Environmental Engineering	Doç. Dr. Ercan YILDIZ, Horticulture
Doç. Dr. Hülya SAİDE ÖZKOÇ, Environmental Engineering	Doç. Dr. Ayşen ÇOLAK, Horticulture
Doç. Dr. Buhara YÜCESAN, Biology	Doç. Dr. Volkan OKATAN, Horticulture
Doç. Dr. Mesut IŞIK, Chemistry	Doç. Dr. Ahmed Nuri KURŞUNLU, Chemistry
Doç. Dr. Bilal NİŞANCI, Chemistry	Dr. Öğr. Üyesi Gamze SAVACI, Forestry Engineering
Doç. Dr. Yusuf KAVUN, Physics	Dr. Öğr. Üyesi Gülen ÖZYAZICI, Field Crops
Doç. Dr. Erdal ÇAÇAN, Field Crops	Dr. Öğr. Üyesi Hakan KAZAN, Mechanical Engineering
Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Burcu ATALAY, Food Engineering	Dr. Öğr. Üyesi İlyas KARASU, Mechanical Engineering
Dr. Öğr. Üyesi İlker AKIN, Chemistry	Dr. Alptekin KISASÖZ, Mechanical Engineering
Dr. Öğr. Üyesi Timur DÜZENLİ, Electrical Electronic Engineering	Dr. Hülya AYKAÇ ÖZEN, Environmental Engineering
Dr. Öğr. Üyesi Osman YÜKSEL, Field Crops	Dr. Öğr. Üyesi Emrah GÜLER, Horticulture
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet İlhan ODABAŞIOĞLU, Horticulture	Dr. Öğr. Üyesi Mine KÖKTÜRK, Fisheries
Dr. Öğr. Üyesi Cüneyt UYAK, Horticulture	Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Mustafa İŞGÖR, Chemistry
Dr. Öğr. Üyesi Meliha ÇETİN KORUKÇU, Chemistry	Dr. Öğr. Üyesi Ekin EKİNCİ, Computer Engineering
Dr. Öğr. Üyesi Engin GÜVENDİ, Forestry Engineering	Dr. Öğr. Üyesi Erdem IŞIK, Mechanical Engineering
Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Nur AY, Computer Engineering	Dr. Öğr. Üyesi Belkis MUCA YİĞİT, Biology

Dr. Öğr. Üyesi Ayşe TÜRKHAN, Chemistry  
Dr. Öğr. Üyesi Deniz DAL, Computer Engineering  
Dr. Öğr. Üyesi Durmuş ÖZDEMİR, Computer Engineering  
Dr. Öğr. Üyesi Gizem CENGİZ GÖKÇE, Landscape  
Architecture  
Dr. Öğr. Üyesi Elif Duygu KAYA, Chemistry  
Dr. Öğr. Üyesi Çetin BAYRAK, Chemistry  
Dr. Öğr. Üyesi Burak ARICIOĞLU, Electric Electronic  
Engineering  
Dr. Öğr. Üyesi İdris KAYNAK, Mechanical Engineering  
Dr. Öğr. Üyesi Sara YASEMİN, Horticulture  
Dr. Öğr. Üyesi Necati YALÇIN, Mechanical Engineering  
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Murat CEYLAN, Food Engineering  
Dr. Öğr. Üyesi Gülşah ELDEN, Mechanical Engineering  
Dr. Öğr. Üyesi Erdem IŞIK, Mechanical Engineering  
Dr. Öğr. Üyesi Günsel BİNGÖL, Biology  
Dr. Öğr. Üyesi Münevver AKSOY, Biology  
Dr. Öğr. Üyesi Burak ALAYLAR, Biology  
Dr. Öğr. Üyesi Sabriye BELGÜZAR, Plant Protection

Dr. Öğr. Üyesi Bahadır AKMAN, Biology  
Dr. Öğr. Üyesi Kenan ÇİFTÇİ, Biology  
Öğr. Gör. Dr. Ali TURAN, Food Engineering  
Öğr. Gör. Aybek YİĞİT, Chemistry  
Öğr. Gör. Dr. Ömer SEVGİLİ, Physics  
Öğr. Gör. Mustafa KARAPINAR, Electric and Electronic  
Engineering  
Arş. Gör. Dr. Gökhan DERVİŞOĞLU, Biyoloji  
Arş. Gör. Dr. Ali Samet BABAOĞLU, Food Engineering  
Arş. Gör. Dr. Selen AKAN, Horticulture  
Arş. Gör. Ali Tahir KARAŞAHİN, Electric Electronic  
Engineering  
Arş. Gör. Ahmet GÖRGÜÇ, Food Engineering  
Dr. Emre AYDEMİR, Computer Engineering  
Dr. Arzu ÖZTÜRK KESEBİR, Molecular Biology and Genetic  
Dr. Sanem AKDENİZ ŞAFAK, Biology  
Dr. Aynur KARAHAN, Plant Protection  
Dr. Nursen ÜSTÜN, Plant Protection

**İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi (FBED)**  
**YAYIN İLKELERİ**

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

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

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

## İÇİNDEKİLER / CONTENTS

### Bahçe Bitkileri/ Horticulture

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Midyat/Mardin Yöresinde Yetiştiriciliği Yapılan Üzüm Çeşitlerinin Etkili Sıcaklık Toplamı İhtiyaçlarının Tespiti  
Determination of Effective Heat Summation Requests of Grape Varieties Cultivated in Midyat/Mardin Region  
Mehmet Settari ÜNAL, Hasan SEZGİN

11

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Şeftali Anacı Üzerine Aşılınmış Bazı Seçilmiş Badem Genotipleri ve Ferragnes Badem Çeşidinin Uyuşma Durumlarının Belirlenmesi  
Determination of Compatibility of Some Selected Almond Genotypes and Ferragnes Almond Cultivar Grafting on Peach Rootstocks  
Hüseyin GÖKTAŞ, Adnan Nurhan YILDIRIM, Civan ÇELİK, Emel KAÇAL

21

#### Derleme Makalesi / Review Article

Virüsten Ari Sarımsak Tohumluğu (*Allium sativum* L.) Üretiminde Meristem Kültürü: Besin Ortamı, Sıcaklık ve Kemoterapi Uygulamalarının Etkisi  
Meristem Culture in Production of Virus Free Garlic (*Allium sativum* L.): The Effect of Nutrient Medium, Thermotherapy and Chemotherapy  
Faika YARALI KARAKAN<sup>1\*</sup>, Berna ERGUN ÇETİN<sup>1</sup>

30

### Bilgisayar Mühendisliği / Computer Engineering

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Classification Vowel-Consonant Letters with Deep Neural Networks in Turkish and Text-Voice Synchronization on a Basis Syllable Size  
Mürsel ÖNDER, Halil İbrahim BAYAT

41

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Yerel İkili Örnek Kullanarak Üç *Lallemantia* Fisch. & C.A. Mey. Türünün Kromozom Sınıflandırmasına Farklı Bir Yaklaşım  
A Different Approach To The Chromosome Classification of Three *Lallemantia* Fisch. & C.A. Mey. Species By Using Local Binary Pattern (LBP)  
İrfan EMRE, Turker TUNCER, Sengul DOĞAN, Murat KURŞAT, Osman GEDİK, Yaşar KIRAN

58

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Derin Öğrenme Modeli ile Yüz İfadelerinden Duygu Tanıma  
Emotion Recognition from Facial Expressions by Deep Learning Model  
Funda AKAR, İsmail AKGÜL

69

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Seri Robot Manipulatöründe Ters Kinematik Problemi Çözmek İçin Kaotik Tabanlı Çiçek Tozlaşma Algoritmasının Uygulanması  
Application of Chaotic Based Flower Pollination Algorithm to Solve Inverse Kinematics Problem in Serial Robot Manipulator  
Zeynep GARİP

80

### Bitki Koruma / Plant Protection

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Antibacterial activity of plant essential oils obtained from Satureja species against *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas citri* subsp. *fuscans*  
Mesude Figen DÖNMEZ, Badel UYSAL ŞAHİN, Ayşe USANMAZ BOZHÜYÜK

91

### Biyoloji / Biology

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Chemical Priming with  $\beta$ -aminobutyric acid (BABA) for Seedling Vigor in Wheat (*Triticum aestivum* L.)  
Nazlı ÖZKURT, Yasemin BEKTAŞ

104

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Morphological and Molecular Identification of Biofilm Forming Fungi from Fish Farms and Fish Benches in Aydın Province  
Bahadır TÖRÜN, H. Halil BIYIK, Esin POYRAZOĞLU

115

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Association of DRD2 Gene C957T Polymorphism with Stuttering in Turkish Population  
Fikriye POLAT, Ayşe AYDIN UYSAL, Burcu YÜKSEL

125

#### Araştırma Makalesi / Research Article

Searching for Versatile Polysaccharide-Degrading Alkali-tolerant or Alkaliphilic *Bacillus* Strains  
Sinan BAYRAM, Mehmet Nuri AYDOĞAN

133



**Araştırma Makalesi / Research Article**

Ksiloz ve Gliserol Ortamlarında Çeşitli Mayaların Lipit Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi  
Determination of Lipid Production Capacities of Various Yeasts in Xylose and Glycerol Media  
Derya BERİKTEN, Emir Zafer HOŞGÜN

142

**Çevre Mühendisliği / Environmental Engineering**

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Hayvansal Atıkların Biyogaz Üretim Potansiyelinin Hesaplanması: İğdir İli Örneği  
Calculation of Biogas Production Potential of Animal Wastes: Example of İğdir Province  
Sevtap TIRINK

152

**Elektrik Elektronik Mühendisliği / Electrical Electronic Engineering**

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Fuzzy Logic PID Design using Genetic Algorithm under Overshoot Constrained Conditions for Heat Exchanger Control  
Murat Erhan ÇİMEN<sup>1</sup>, Zeynep GARİP<sup>2</sup>, Mehmet EMEKLİ<sup>1</sup>, Ali Fuat BOZ<sup>1</sup>

164

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Development of a Multichannel Bioinstrumentation System for Human-Computer Interface Applications  
Poyraz Alper ÖNER, Serkan GÜRKAN, Mustafa KARAPINAR, Seydi DOĞAN

182

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Fotovoltaik Panel Emülatörü Tasarımında Dijital İkiz Kullanımı  
Using Digital Twin in Photovoltaic Panel Emulator Design  
Serkan GÜRKAN, Emre AYTAV

194

**Fizik / Physics**

**Araştırma Makalesi / Research Article**

MOCVD ile büyütülen GaN p-i-n yapısındaki sarı ışık merkezinin elektro-optik ölçümlerle incelenmesi  
Investigation of the yellow light center in GaN p-i-n structure grown by MOCVD with electro-optical measurements  
Neslihan AYARCI KURUOĞLU<sup>1,\*</sup>

207

**Araştırma Makalesi / Research Article**

2-kloro-1-(6-floro-3,4-dihidro-2H-kromen-2yl)ethanon Yapısının Yoğunluk Fonksiyonel Kuramı İle Kimyasal Aktivite Hesaplamaları  
Chemical Activity Calculations with Density Functional Theory of 2-chloro-1-(6-flouro-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl)ethanone  
Zeynep DEMİRCİOĞLU<sup>1\*</sup>, Serap UZUN<sup>2</sup>

217

**Gıda Mühendisliği / Food Engineering**

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Amarant, Karabuğday ve Siyez Katkılı Tavuk Nuggetların Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi  
Determination of Some Characteristics of Chicken Nuggets Added Amaranth, Buckwheat and Einkorn  
Halime ALP, Kubra UNAL, Nuran ERDEM

227

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Piyasada Satışa Sunulan Ayçiçeği Yağı, Mısır Yağı ve Riviera Zeytinyağlarının Saflık Kriterlerinin Belirlenmesi  
Determination of Purity Criteria in Sunflower Oil, Corn Oil and Riviera Olive Oils in the Market  
Ahmet Levent İNANÇ

239

**Derleme Makalesi / Review Article**

Yalancı Tahıllarda Çimlendirme Prosesinin Etkileri  
Effects of Germination Process on Pseudocereals  
Nezahat OLCAY, Mustafa Kürşat DEMİR

252

**Derleme Makalesi / Review Article**

Çam (*Pinus* spp.) Türlerinin Ve Fraksiyonlarının Gıda Takviyesi Ve Tıbbi Bitki Olarak Kullanım Olanakları  
The Potential Uses of Pine (*Pinus* spp.) Species and Their Fractions as Food Supplement and Medicinal Plant  
Müge HENDEK ERTOP<sup>1\*</sup>, Emine İNCEMEHMETOĞLU<sup>2</sup>

266

**Kimya / Chemistry**

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Süstitü Pirazol Karboksilik Asit Sentezi, Siklizasyonu ve Nükleofilik Yer Değiştirme Reaksiyonları  
Synthesis, Cyclization and Nucleophilic Substitution Reactions of Substituted Pyrazole Carboxylic Acid  
İsrafil TOZLU, Volkan TAŞDEMİR, Aycan GÜNER ÇELİK, Hasan GENÇ

279

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Cloning and Expression of Rat Brain Acetylcholinesterase Enzyme in *Escherichia coli*

Ahmet KARAKUS <sup>1</sup> , Hamid CEYLAN <sup>2</sup> , Orhan ERDOGAN <sup>2*</sup>	287
<b>Araştırma Makalesi / Research Article</b> Bazı Kemoterapötik İlaçların İnsan Serumu Paraoksonaz-1 (PON1) Üzerindeki İnhibisyon Etkisinin Araştırılması Investigation of Inhibition Effect of Some Chemotherapeutic Drugs on Human Serum Paraoxonase-1 (PON1) Hakan SÖYÜT <sup>1*</sup> , Yakup ULUTAŞ <sup>2</sup> , Ekrem KÖKSAL <sup>2</sup>	297
<b>Araştırma Makalesi / Research Article</b> Prediction of I-131 Influence in the Aegean Region by Chernobyl Accident Using the Ratio of I-129/I-127 in the Lake Sediments David Alper DİLEK <sup>1</sup> , Ezgi EREN BELGİN <sup>1*</sup> , Gül Asiye AYÇIK <sup>1</sup>	306
<b>Araştırma Makalesi / Research Article</b> Microwave-Assisted Synthesis of Acyclic Imides Nevin ARIKAN ÖLMEZ	317
<b>Araştırma Makalesi / Research Article</b> Schiff Bazlı Fonksiyonelleştirilmiş Yeni Sporopollenin Mikrokapsülünün Sentezi ve Karakterizasyonu ve Cu(II)'nin Etkili Adsorpsiyonu için Kullanımı Synthesis and Characterization of the Schiff Base-on Functionalized Novel Sporopollenin Microcapsule and Its Use for Effective Adsorption of Cu (II) Ali BİLGİÇ	324
<b>Araştırma Makalesi / Research Article</b> Karaağaç ( <i>Ulmus glabra</i> ) ve Dut ( <i>Morus alba</i> ) Talaşı ile Sulu Çözeltilerden Adsorpsiyon Yöntemiyle Rodamin 6G Giderimi Removal of Rhodamine 6G from Aqueous Solutions by Adsorption Method with Elm ( <i>Ulmus glabra</i> ) and Mulberry ( <i>Morus alba</i> ) Sawdust Ceyhun REİS, Duygu ÖZDEŞ, Celal DURAN	337
<b>Araştırma Makalesi / Research Article</b> Sülfonat Grubu İçeren Schiff Bazlı Ligandı ve Geçiş Metal Kompleksleri: Sentezi, Yapısal Karakterizasyonları ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi Sulfonate Group Containing Schiff Base Ligand and Their Transition Metal Complexes: Synthesis, Structural Characterization and Antimicrobial Activity Studies İlyas GÖNÜL	352
<b>Makine Mühendisliği / Mechanical Engineering</b>	
<b>Araştırma Makalesi / Research Article</b> Merkezi Havalandırma Sistemi Mutfak Davlumbazı Verimliliğinin Arttırılması Üzerine Bir Çalışma A Study on Increasing the Efficiency of Central Ventilation System Kitchen Hoods Yusuf ÖZBAKIŞ, Fehmi ERZİNCANLI, Murat ÖZSOY, Levent UĞUR	365
<b>Araştırma Makalesi / Research Article</b> Effect of Different Parameters on the Amount of Obtained Power the Thermoelectric Generator Placed in the Human Living Tissue Fezullah Mertkan ARSLAN, Simge TAŞLICA, Çağan KARAKURT, Gökhan GÜRLEK	378
<b>Araştırma Makalesi / Research Article</b> Thermal Management of Small-Scale Li-ion Battery Module Using Graphite Matrix Composite with Phase Change: Effect of Discharge Rate Mustafa Yusuf YAZICI	389
<b>Araştırma Makalesi / Research Article</b> Açık-Kaynaklı 3B Yazıcılarda Enerji ve Zaman Gereksinimini Azaltmada Etkili Parametrelerin İncelenmesi Examining the Influential Parameters on Reducing both Energy and Time Requirements in Open-Source 3D Printers Volkan KORKUT, Hakan YAVUZ	403
<b>Araştırma Makalesi / Research Article</b> AZ-Mg Alaşımlarının Katılma Çatlama Duyarlılığına Karşı Dolgu Metal ve Alaşım Elemanlarının Etkilerinin Tahmin Edilmesi Estimating the Effects of Filler Metal and Alloying Elements for Against Solidification Cracking Susceptibility of AZ-Mg Alloys Tayfun SOYSAL	412
<b>Derleme Makalesi / Review Article</b> Alüminyum Alaşımlarının Dökümünde Yaygınca Kullanılan Sıvı Metal Temizleme Yöntemlerinin İncelenmesi Investigation of Liquid Metal Cleaning Methods Commonly Used in the Casting of Aluminum Alloys Mehmet TOKATLI, Ferhat SAYDAM, Murat HAL, Abdulhadi KOŞATEPE, Murat ÇOLAK, Çağlar YÜKSEL	423
<b>Matematik / Mathematics</b>	
<b>Araştırma Makalesi / Research Article</b> Numerical Method for Approximate Solution of Fisher's Equation Melike KARTA	435

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

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Evaluating The Transcriptional Regulation of *Cdh1* by Grhl3 in Different Cellular Models  
Neslihan TOYRAN, Hani ALOTAIBI

446

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Cloning and Purification of L-Asparaginase from *Enterobacter carcerogenus*  
Yakup KOLCUOĞLU, Ummuhan ÇAKMAK

455

**Orman Mühendisliği / Forestry Engineering**

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Determination of Carbon, Nitrogen and Phosphorus Stocks and Stoichiometry in Broadleaf Mixed Forest Soil and Litterfall: A case study in Oltu district, Erzurum  
Emre ÇOMAKLI<sup>1</sup>, Adnan BİLGİLİ, Taşkın ÖZTAŞ, Tuğba ÇOMAKLI

464

**Peyzaj Mimarlığı / Landscape Architecture**

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Kentleşmenin Safranbolu (Karabük)'nin Kültürel Peyzaj Değişimi Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi  
Investigation of the Impact of Urbanization on the Cultural Landscape Change of Safranbolu (Karabük)  
Selvinaz Gülçin BOZKURT

476

**Tarım Ekonomisi / Agricultural Economy**

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Organik Ürün Pazarındaki Tüketicilerde Organik Ürün Bilinci: İstanbul ve İzmir İlleri Örneği  
Organic Product Awareness Among Consumers in the Organic Product Market: The Case of Istanbul and Izmir Provinces  
Ayça Nur ŞAHİN DEMİREL, Murad YERCAN

489

**Tarla Bitkileri / Field Crops**

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Bucak Ekolojik Koşullarında İtalyan Çimi (*Lolium multiflorum* L.) Çeşitlerinin Bazı Verim ve Kalite Unsurlarının Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma  
A Research on Determination of Some Yield and Quality Elements of Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) Varieties on Bucak Ecological Conditions  
Emrah ACAR, Cahit BALABANLI, Emre BIÇAKÇI

502

**Araştırma Makalesi / Research Article**

Elazığ Koşullarında İskenderiye Üçgülü ile İtalyan Çimi Karışım Oranlarının Verim ve Kalite Üzerine Etkileri  
The Effects on Yield and Quality of Berseem Clover and Italian Ryegrass Mixture Ratios in Elazığ Conditions  
Mustafa KARADENİZ, Kağan KÖKTEN

509

**Toprak Bilimi ve Bitki Besleme / Soil Science and Plant Nutrition**

**Derleme Makalesi / Review Article**

Meralarda Otlayan Hayvanları Tehdit Eden Çayır Tetanisi Riski  
The Risk of Grass Tetany Threatening Grazing Cattles in Grasslands  
Ülkü YILMAZ

518

**Atıf İçin:** Ünal, M.S., Sezgin, H. Midyat /Mardin Yöresinde Yetiştiriciliği Yapılan Üzüm Çeşitlerinin Etkili Sıcaklık Toplamı İhtiyaçlarının Tespiti. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 11-20.

**To Cite:** Ünal, M.S., Sezgin, H. Determination of Effective Heat Summation Requests of Grape Varieties Cultivated in Midyat/Mardin Region. Journal of the Institute of Science and Technology, 12 (1): 11-20.

## **Midyat /Mardin Yöresinde Yetiştiriciliği Yapılan Üzüm Çeşitlerinin Etkili Sıcaklık Toplamı İhtiyaçlarının Tespiti**

Mehmet Settar ÜNAL, Hasan SEZGİN

**ÖZET:** Bu araştırma; 2019 ve 2020 yıllarında, Mardin ili Midyat yöresinde yetiştirilen bazı yerel üzüm çeşitleri üzerinde yürütülmüştür. Araştırmada çeşitlerin bazı karakterleri, gözlerin sürmesi, çiçek açma, olgunluk başlangıcı ve olum dönemleri, vegetasyon periyodu ve aktif sıcaklık toplamı verileri incelenmiştir. Araştırma sonunda sürme-olum dönemleri arasında hesap edilen aktif sıcaklık toplamının 1275 gd (Hazirani)-2488 gd (Mazrone), gelişme sürelerinin ise 104 gün (Hazirani)-175 gün (Mazrone) arasında değiştiği tespit edilmiştir. EST (*Etkili Sıcaklık Toplamı*) değerleri ve gelişme süreleri; yıl, iklim, arazinin konumu ve toprak yapısı, çeşit özelliği ve hatta bakım işlemlerine göre farklılık göstermiştir. Mardin ilinde yetiştirilebilecek ticari değeri yüksek üzüm çeşitlerini tavsiye ederken araştırma sonucunda belirlenen EST değerlerinin göz önünde bulundurulması gerektiği ve "Sıcak İklim" sınıfına dahil olan Midyat yöresinin iklim yapısının, piyasada sevilen ve tutulan son turfanda sofralık ve kurutmaya uygun üzümler için oldukça elverişli olabileceği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Midyat, bağcılık, üzüm, etkili sıcaklık toplamı, fenoloji

### **Determination of Effective Heat Summation Requests of Grape Varieties Cultivated in Midyat/Mardin Region**

**ABSTRACT:** This study was carried out in 2019 and 2020 on some local grape genotypes grown in Midyat district of Mardin region. In the study, some general characteristics of the varieties such as bud burst, flowering, veraison and maturity periods, growing periods and effective heat summation (EHS) values were examined. In the result, EHS values calculated between bud burst and ripening periods ranged from 1275 degree-days (Hazirani) to 2488 degree-days (Mazrone), and the growing periods ranged from 104 days (Hazirani) to 175 days (Mazrone). EHS (Effective Heat Summation) values and growing periods differed according to year, climate, location and soil structure of the land, variety characteristics and even cultural measures. While recommending grape cultivars high trading worth that can be cultivated in Mardin region, it has been revealed that variety selection should be made by taking into account the EHS worths specified as a result of the study, and that midyat ecology, which is in the "Hot Climate" class, is extremely suitable for late grown table grapes and dried grape cultivars with high trading value.

**Keywords:** Midyat, viticulture, grape, effective heat summation, phenology

<sup>1</sup>Mehmet Settar ÜNAL ([Orcid ID: 0000-0001-5903-0157](https://orcid.org/0000-0001-5903-0157)), Hasan SEZGİN ([Orcid ID: 0000-0002-8929-6595](https://orcid.org/0000-0002-8929-6595)) Şırnak Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Şırnak, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mehmet Settar ÜNAL, e-mail: munal62@hotmail.com

## GİRİŞ

Yetiştiriciliği yapılan asma (*Vitis vinifera* L.), mutedil iklim kuşağı bitkisi olup, Dünya’da her iki yarım kürede de 50. enlem derecesine kadar olan alanlarda yetiştirilmekle beraber kuzey yarım kürede 30°-50°, güney yarım kürede ise 30°-40° enlem derecelerinde en uygun yetiştirme alanlarını bulmuştur (Çelik, 2011).

Ülkemizde 4 009 979 da alandan 4 208 908 ton üzüm elde edilmekte olup, üretim miktarı 4 300 486 ton olan Elma’dan hemen sonra gelmekte ve bu üretimin % 45.51’si sofralık, % 45.52’u kurutmalık ve % 8.97’si de şaraplık olarak değerlendirilmektedir. Bu bağlamda Türkiye alan bakımından % 6’lık oran ile İspanya, Çin, Fransa ve İtalya’dan sonra 5. sırada yer alırken üretimde % 5 oran ile Çin, İtalya, ABD, İspanya ve Fransa’dan sonra 6. sırada bulunmaktadır (FAO, 2020). Yöre olarak ise; Mardin ili bağcılığının gerek üretim alanı (da) ve gerekse üretim miktarı (ton) olarak % 30’dan daha fazlasını teşkil eden Midyat ilçesinde 122 210 da alandan 51 477 ton üzüm elde edilmekte olup, bu miktarın % 30.4’ü sofralık, % 45.3’ü şaraplık ve % 24.3’ü de kurutmalık olarak değerlendirilmektedir (TÜİK, 2020).

Dünyada üzüm, genellikle şaraba işlenerek tüketilirken ülkemizde taze, kuru ya da pekmez, sirke ve salamura yaprak gibi birçok yerel ürünlere işlenerek değerlendirilmektedir (Kiracı, 2021). Yine asma, meyvesi ve yaprakları dışında çekirdekleri ve kabukları da özellikle son yıllarda gıda sanayiinde işlenerek değerlendirilirken omcası da birçok bitkinin yetişemeyeceği kadar fakir ve eğimli alanlarda iyi bir erozyon bitkisi olarak değerlendirilmesi yanı sıra yeni iş sahaları oluşturma bakımından da ayrı bir öneme sahiptir. Görüldüğü üzere asma, diğer birçok bahçe bitkilerinde rastlanmayacak kadar fazla değerlendirme imkanına sahip meyve türlerinden birisi olarak öne çıkmaktadır. Özetle üzüm yetiştiriciliği, Anadolu’da eskiden beri birçok medeniyetin geçim kaynağını teşkil etmiş, hatta folkloründe ve mimari yapılarında bir motif olarak yer almıştır (Cangi ve Yağcı, 2017). Geniş bir adaptasyon sınırlarına sahip olan asma, bu yüzdendir ki Karadeniz Bölgesinin aşırı yağışlı alanları ile Doğu/Orta Anadolu Bölgesinin kısıtlı bir alanı dışında ülkemizin hemen her tarafında ekonomik olarak yetiştirilmektedir.

Zengin bir çeşit/genotip potansiyeline sahip olan ülkemizde üzüm çeşitlerinin hasat zamanları arasında, örtüaltı yetiştiricilik dahil, 4 ay veya daha fazla zaman farkı (Mayıs başı-Ekim ortası) oluşabilmektedir. Bu farklılığın oluşumunda ise ekoloji başta olmak üzere bağ/bahçe yerinin konumu ve kültürel uygulamalar gibi birçok etken de çeşitlerin olgunluk zamanı üzerine etkili olabilmektedir.

Bağcılığın yapıldığı yörelerde iklim yapısının çeşitlerin performansı üzerine yaptığı etkilerinin tespit edilmesi, gelecekte yapılacak çalışmalara azımsanmayacak derecede katkıda bulunması beklenmektedir. EST gibi değerlerin belirlenmesi, bölge ekolojik yapısının mahalli genotiplerin birim alandan alınan ürün miktarı ve niteliğine etkisi ile piyasada sevilen ve tutulan çeşitlerin bölgede yetiştirilip yetiştirilemeyeceği hususunda karar vermede üretici ve diğer ilgililere ışık tutacaktır. Etkili sıcaklık toplamı (EST); bir yörede herhangi bir ürünün ekonomik olarak yetiştirilebilmesi için gereken sıcaklık toplamı olup, her bitki tür ve çeşidi için farklılık gösterir ve bu değerlerin bilinmesi o bitki yetiştiriciliği için büyük önem arz eder.

İklim yapısı itibarı ile her amaç için ve her mevsimde ürününü olgunlaştırabilen üzüm çeşitlerinin yetiştirilmelerine uygun olan Midyat ilçesinde 28 adet yerel üzüm çeşidinin EST ve gelişme süreleri tespit edilmek suretiyle yörelere en uygun olabilecek çeşitleri tavsiye ederek daha rantabl ve ürünü değerlendirme amacına uygun bir yetiştiricilik yapılmasına öncülük yapılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Araştırma; çiftçi şartlarında, 2019-2020 yıllarında, Mardin ili Midyat yöresinde geleneksel olarak (yerli) üzüm yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı Ovabaşı, Yolbaşı ve Adaklı köylerinde yetiştiriciliği yapılan 28 yerel üzüm çeşidi üzerinde yapılmıştır.

İncelemeye alınan çeşitler; Mazrone, Kerkuşi, Zeyti, Benitaht, Şepirze, Korfoki, Siyah korfoki, Pembe korfoki, Sudani, Zeynebi (Lıbdrej), Bilbizek, Heseni, Tayfi, Reşe kewnar (Reşe gurguronek), Reşik (Usvet), Bakari, Imsebek, Siyah imsebek, Sorani, Bızani, Hazirani, Atif, Şıtvı, Verdani, Deyvani, Serdevi, Koher (Kohevi) ve Sincari'dir.

İnceleme yapılan bağlar; farklı yörelerden bulunma yanında yöney, konum (düz-yamaç) ve toprak özellikleri bakımından da farklı bulunmaktadır.

### Yöntem

Çiftçi şartlarında yürütülmüş olan araştırma; 2018 yılında çeşitlerin ampelografik özelliklerinin incelenmesi sırasında her bir çeşitten işaretlenen ve etiketlenen yaklaşık çalışmaya uygun 10 omca üzerinde yürütülmüştür. Söz konusu omcalar; sulama, gübreleme ve uç/tepe alma gibi herhangi bir özel muameleye tabi tutulmamış olup bağcı tarafından mutata işlemler uygulanmış ve çalışma, üzüm çeşitlerinde gözlerin uyanması ile başlayarak yaprakların dökümü (dinlenme) ile sona erdirilmiştir.

Çalışmanın yürütüldüğü köylere dair bazı veriler Çizelge 1'de yer alırken EST değerlerinin hesap edilmesinde kullanılan veriler Mardin Meteoroloji İstasyon Müdürlüğü'nden temin edilen 2 senelik iklim verileri Çizelge 2'de verilmiştir.

**Çizelge 1.** Çalışmaya dahil edilen köylere ait bazı veriler

Coğrafiik veriler	Köyler		
	Yolbaşı	Ovabaşı	Adaklı
Rakım (m)	950 m	940 m	945 m
Koordinatlar	37°42'77.15" enlem K 41°33'83.14" boylam D	37°46'33.48" enlem K 41°18'87.09" boylam D	37°43'40.71" enlem K 41°50'53.71" boylam D

**Çizelge 2.** 2019-2020 yılları Midyat yöresi aylık ve yıllık ortalama sıcaklık verileri (°C)(\*)

	Aylar												
	Ocak	Şubat	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık	Ortalama
<b>2019</b>	3.0	4.8	7.1	10.9	19.8	27.2	28.4	29.6	23.7	18.7	9.8	6.5	<b>3.0</b>
<b>2020</b>	2.4	3.3	9.9	12.8	18.8	25.1	30.2	28.6	26.7	19.2	10.6	5.3	<b>2.4</b>

(\*) Midyat meteoroloji istasyonu Müdürlüğü

Araştırma konusu olan üzüm çeşitlerinde fenolojik dönemlerden gözlerin uyanması, tam çiçeklenme, ben düşme ve hasat tarihleri kayıt altına alınmıştır. Üzüm çeşitlerinin hasat tarihleri (Şekil 1), bağcılarının tecrübe ve alışkanlıkları da göz önünde bulundurularak SÇKM değerleri, salkımlardan tesadüfen alınan tanelerden sıkılarak elde edilen şırada el refraktometre ile ölçülerek tespit edilmiştir. Sofralık üzümlerde erkencilerde % 12-13 lük SÇKM yeterli olurken orta ve geççi çeşitlerde % 17-18 seviyesinde SÇKM miktarı hasat için yeterli görülmektedir. Her çeşidin optimum olgunluk dönemine tat, asitlik, aroma ve renk parametreleri birlikte değerlendirilerek karar verilmektedir (Cangi ve Altun, 2015). Yine gözlerin sürmesi-tam çiçeklenme, tam çiçeklenme-olgunluk başlangıcı ve olgunluk başlangıcı-hasat dönemleri arasında geçen süreler gün olarak da kaydedilmiştir.

Herhangi bir üzüm çeşidinin bir yerde yetişip yetişmeyeceğini tespit etmede faydalanılan en önemli kriterlerden biri de “Etkili Sıcaklık Toplamı”dır. Bağcılık bölgelerinde EST değerlerinin tespiti, o üzüm çeşidinin o yörede yetiştirilebilirliği hakkında değerli bilgiler verir. Yine bağcılığa uygun etkili sıcaklık toplamının alt sınırının 900, üst sınırının 2700 gd olduğu bildirilmiştir (Schwartz, 2003; Cangı ve Demir, 2019). Bu ihtiyacı yüksek olan çeşitler, daha düşük EST’ye sahip olan alanlarda istenilen verim ve kaliteyi oluşturamazlar (Cangı ve Demir, 2019). Her ay için, omcanın gelişme eşiği olarak ele alınan 10 °C’nin üzerindeki sıcaklıklar toplanmak suretiyle gün derece (gd) olarak hesaplanmakla beraber (Çelik ve ark., 1998) çeşitlerin bağ alanlarındaki yaygınlık derecesi ile ürünü kullanma şekilleri ve yapraklarının salamura üretimine elverişlilik durumları da (Ünal, 2018)’e göre ayrıca belirlenmiştir. Buna göre Nisan 2019 ayı EST değeri= $[(Nisan\ ayı\ ortalama\ sıcaklığı(10.9)-Eşik\ sıcaklık\ (10.0)]\ °C \times Gün\ sayısı\ (30\ gün) = 27\ gd$  yapar. Diğer aylar da aynı şekilde hesaplanmaya devam edilir. İşte ortalama sıcaklık değerleri 10 °C’nin üstü olan tüm ayların EST değerleri bu şekilde hesaplanarak o yörenin EST değeri hesaplanmış olur. Ancak EST hesaplanmasında, o ayın sonu değil çeşidin istenen dönemin (Uyanma, Çiçeklenme, Ben düşme gibi) gerçekleşme tarihi dikkate alınmıştır. Araştırmada, yine çeşitlerin dönem dönem EST değerleri yanında, fenolojik dönem gün sayıları da hesaplanmış, çeşitlerin yörede yaygınlık durumu, elde edilen üzümün kullanım şekli ve yapraklarının salamuraya uygunluğu hakkında da bilgi verilmesi uygun görülmüştür.



Şekil 1. Asmada fenolojik dönemler

## BULGULAR ve TARTIŞMA

İki yıl boyunca Midyat yöresinde yürütülen araştırmada, 28 yerel üzüm çeşidi üzerinde yürütülen gözlemler sonrası kaydedilen uyanma, tam çiçeklenme, ben düşme ve olgunlaşma gibi fenolojik dönemlere dair bilgiler Çizelge 3’de verilmiştir.

Bir omcanın mahsulünü olgunlaştırabilmesi için belirli bir toplam sıcaklığa gerek vardır. Etkili sıcaklık toplamının hesaplanmasında omcanın fenolojik gelişme dönemleri, özellikle gözlerin sürmesi-olgunluk tarihi, geç ve ilk donlarla yakından ilgili olduğu için dikkate alınmalıdır (Cangı ve Demir, 2019). Çizelge 3’e bakıldığında, fenolojik dönemlerin gerçekleşme tarihlerinin yıldan yıla ve çeşitten çeşite değiştiği gözlenmekte olup, 2 yıllık araştırmanın sonuçlarına göre fenolojik dönemlerin gerçekleşme tarihleri arasında yıllar itibarı ile de fark görülmüştür. Örneğin; yıllar (2019-20) (Çizelge 3) arasında uyanma döneminde farklılık yaklaşık 10 gün (Zeynebi), tam çiçeklenme döneminde 8 gün (Reşe kewnar), ben düşmede 14 gün (Kerküşü) ve hasat döneminde 16 günü (Reşe kewnar) bulmuştur. Ancak bu farklılıkların ortaya çıkışında bağ yerinin konumu, toprak yapısı ile uygulanan bakım işlemlerinin de etkili olduğunu belirtmekte yarar vardır. Nitekim Ateş ve Uysal (2017) senesinde yürüttükleri bir araştırmada Narinceyi 3 farklı yörede araştırmışlar ve gözlerde sürmenin Tokat (merkez)

ve Nisnar yöresinde 9 Nisanda, Erbaa'da ise 10 Nisanda; Kaya ve Özdemir (2015), Diyarbakır'da yaptıkları araştırmada 2010 senesinde öncelikle uyanmanın Genç Mehmet, Tahannebi ve Tilki kuyruğu üzümü çeşidinde, 2011 senesinde ise Cirbet üzümünde belirlerken Yurtgöl (2021) 2019-20 yıllarında Güçlükonak/Şirnak yöresinde yürütmüş olduğu çalışmada Bılbizeki, Kerkuşi, Tayfi ve Sincari çeşidinde uyanma tarihleri zikredildikleri sıraya göre 3-20/3, 8-19/4, 6-18/4, 14-31/4; Uçaş (2012) yine 2019-20 yıllarında Midyat/Mardin yöresinde yürütmüş olduğu çalışmada aynı çeşitler için uyanma tarihlerini zikredildikleri sırayla 1-20/4, 10-25/4, 20/3-5/4, 10-19/4; Yıldırım (2019) ise 2-17/3, 5-12/4, 13-21/3, 11-29/4 olarak belirlemiştir. Bu durum, diğer fenolojik dönemler için de geçerlidir. Manisa'da 5 değişik üzüm çeşidinde yürütülen bir çalışmada; çiçeklenme döneminin 11-23 Mayıs, olgunluk döneminin ise 3 Ağustos-16 Eylül arasında olduğu bildirilirken (Toprak Özcan ve ark., 2016) Tokat ilinde Narince çeşidinde yürütülen bir çalışmada; tam çiçeklenme döneminin Haziran ayının 1-2. haftasında, olgunluk döneminin ise Eylül ayının 3-4. haftasında gerçekleştiği (Cangi ve ark., 2008), İdil/ŞIRNAK yöresinde yıllar ve çeşitlere göre çiçeklenme dönemi Mayıs ortası-Haziran başı, ben düşme Temmuz-Ağustos ayları ve olgunluk dönemi Ağustos başı-Ekim ortası (Yıldırım, 2019) ve yine Güçlükonak/ŞIRNAK yöresinde ise çiçeklenme dönemi Mayıs ortası-Haziran ortası, ben düşme Haziran sonu-Temmuz ortası-Eylül sonu/Ekim başı (Yurtgöl, 2021); Midyat/MARDİN yöresinde ise çiçeklenme dönemi Mayıs ortası-Haziran başı, ben düşme Temmuz-Ağustos ayları, olgunluk ise Temmuz başı-Ekim ortası (Uçaş, 2021) olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.; Şekil 1.). Görüldüğü üzere gözlerin sürmesi ve tam çiçeklenme dönemleri arasındaki farklılıklar üzüm çeşitleri arasında birbirine daha yakınken olgunluk başlangıcından itibaren bu farklılık (60 gün) artarak hasat zamanında (90 gün) çok daha bariz olmaktadır. Bu çalışmada da, bölgede en erken olgunlaşan Hazirani çeşidi Temmuz başı/ortası'nda hasat edilirken en geç olgunlaşan çeşit olan Mazrone Ekim başı/ortası'nda hasat edilmektedir. Nitekim Şensoy ve ark. (2009), Köse (2014), Kaya ve Özdemir (2015), Cangi ve ark. (2008), Cangi ve Altun (2015), Demir (2019) ve Ünal (2019) gibi farklı araştırmacılar daha önce yürüttükleri çalışmalarda benzeri sonuçları bulmuşlardır. Tarımsal üretim bakımından ise en önemli fenolojik dönemler, don riskinden dolayı, gözlerin sürmesi ile hasat zamanı olduğu için çeşit seçiminde o bölgede oluşan don tarihlerinin dikkate alınması gerekir (Şen, 2008; Ünal, 2019).

Bir başka kıstasta, bir üzüm çeşidinin bir yörede ürününü olgunlaştırıp olgunlaştıramayacağını belirlemede yararlanılan en önemli iklim parametrelerinden birisi de "*Etkili Sıcaklık Toplamı*"dır (Çizelge 4). Bu değer hesaplanmasında, her bir fenolojik dönem için ayrı hesaplama yapılabileceği gibi, gözlerin sürmesinden olgunluğa kadar geçen toplam süre de tespit edilebilir ve bu değer göz önüne alınarak çeşitler hasat dönemlerine göre gruplandırılabilirler. Bir bölgede ekonomik bakımdan üzüm yetiştiriciliği yapılabilmesi için bu rakamın asgari 900 gd olması gerekir (Çelik, 2011; Cangi ve Bekar, 2017). Gelişme döneminin kısa ve düşük sıcaklıkların daha yaygın olduğu alanlarda "*Etkili Sıcaklık Toplamı*"nın çeşit tercihinde göz önünde bulundurulması gerektiği birçok araştırmacı tarafından ifade edilmiştir (Candar ve ark., 2019; Özkan, 2020; Çakır, 2021; Yaşasın, 2021). Özellikle yetiştirme mevsiminin üzüm yetiştiriciliği için risk taşıdığı bölgelerde çeşit seçimi son derece önem arz eder (Şen, 2008; Cangi ve ark., 2008; Kaya ve Özdemir, 2015; Söğüt ve Özdemir, 2015; Küsmüş, 2016; Bekar ve Cangi, 2017; Kılıç ve ark., 2018; Aktürk ve Uzun, 2019; Cangi ve Demir, 2019; Aktürk ve Uzun, 2020; Kokargül ve ark., 2020). Etkili Sıcaklık Toplamı isteği fazla olan, fakat yetiştiriciliğinin yapıldığı yörelerde bu ihtiyacı karşılayamayan çeşitler arzu edilen kalite, ürün miktarı ve gelişmeyi gösteremezler (Şensoy ve ark., 2009; Ünal, 2019).



Çizelge 3. Mardin yöresi üzüm çeşitlerinin fenolojik dönem ve oluşum tarihleri

Köy	Üzüm Çeşitleri	Fenolojik Dönemler							
		Uyanma		Tam çiçeklenme		Ben düşme		Hasat dönemi	
		2019	2020	2019	2020	2019	2020	2019	2020
Ovabaşı	Kerkuşi	10.04.	17.04.	20.05.	03.06.	17.08.	01.09.	26.09.	05.10.
	Zeynebi	25.03.	05.04.	20.05.	29.05.	20.07.	29.07.	25.08.	04.09.
	Benitaht	18.04.	30.04.	25.05.	01.06.	13.08.	21.08.	15.09.	24.09.
	Şepırze	12.04.	24.04.	26.05.	30.05.	15.08.	27.08.	18.09.	30.09.
	Korfoki	15.04.	26.04.	25.05.	29.05.	16.08.	27.08.	20.09.	29.09.
	Siyah korfoki	15.04.	25.04.	20.05.	30.05.	15.08.	25.08.	23.09.	03.10.
	Pembe korfoki	10.04.	25.04.	22.05.	01.06.	15.08.	23.08.	16.09.	27.9.
	Sudani	25.03.	03.04.	21.05.	28.05.	10.07.	20.07.	15.09.	24.09.
	Zeyti	25.03.	03.04.	25.05.	29.05.	17.07.	25.07.	30.08.	13.09.
	Bilbizek	01.04.	13.04.	23.05.	28.05.	17.07.	28.07.	25.08.	05.09.
Yolbaşı	Heseni	13.04.	25.04.	20.05.	27.05.	15.07.	28.07.	30.08.	14.09.
	Tayfi	26.03.	07.04.	24.05.	26.05.	10.08.	19.08.	25.09.	30.09.
	Reşe kewnar	14.04.	25.04.	22.05.	30.05.	17.07.	28.07.	25.08.	11.09.
	Usvet	30.03.	10.04.	19.05.	24.05.	19.07.	30.07.	20.08.	30.08.
	Bakari	28.03.	08.04.	23.05.	29.05.	20.07.	27.07.	20.09.	28.09.
	Imsebek	05.04.	18.04.	21.05.	27.05.	25.06.	05.07.	20.07.	30.07.
	Siyah imsebek	25.03.	02.04.	22.05.	29.05.	26.06.	08.07.	05.08.	22.08.
	Sorani	10.04.	19.04.	24.05.	30.05.	10.07.	18.07.	21.08.	04.09.
	Bizani	08.04.	18.04.	21.05.	27.05.	06.08.	14.08.	10.09.	28.09.
	Hazirani	09.04.	18.04.	19.05.	25.05.	20.06.	30.06.	10.07.	19.07.
Adaklı	Mazruna	15.04.	23.04.	28.05.	05.06.	20.08.	01.09.	07.10.	17.10.
	Şitvi	27.03.	06.04.	21.05.	29.05.	10.08.	21.08.	10.09.	23.09.
	Verdani	27.03.	06.04.	20.05.	27.05.	10.07.	16.07.	24.08.	31.08.
	Deyvani	02.04.	15.04.	20.05.	27.05.	16.07.	22.07.	22.08.	31.08.
	Serdevi	10.04.	19.04.	24.05.	01.06.	20.07.	28.07.	23.08.	03.09.
	Koher	10.04.	19.04.	24.05.	29.05.	10.08.	19.08.	18.09.	30.09.
	Sincari	10.04.	19.04.	20.05.	26.05.	10.08.	19.08.	20.09.	30.09.
	Atif	14.04.	22.04.	20.05.	26.05.	25.06.	31.06.	14.08.	27.08.

Bu değerin hesaplanmasında dikkate alınan gözlerin sürmesi ve hasat zamanları, özellikle ilkbahar geç donlarının ve gelişme döneminin kısa olduğu yörelerde çeşit tercihinde oldukça önem taşır. Nitekim Candar ve ark. (2019), olgunluk tarihi olarak EST'nin 1800 gd'nin altına düşmesi halinde Yayla çeşidinin yeteri kadar olgunlaşmadığını belirtmektedirler. Sensoy ve ark. (2009); çeşitleri etkili sıcaklık toplamı isteğine göre ilk turfanda'dan son turfandaya sınıflandırırken bağcılığa uygun etkili sıcaklık toplamının en az 900 gd olmasını gerektiğini ifade etmişlerdir. Bu bilgiler ışığında Etkili Sıcaklık Toplamı 2752 gd olan yerde tüm üzüm çeşitlerini yetiştirmek mümkündür. Nitekim yörede incelenen çeşitlerden 2488 gd ile azami değere sahip olan Mazrone'nin yörede kolaylıkla yetiştirilebildiği gözlenmektedir (Çizelge 4).

Etkili sıcaklık toplamı açısından çeşitler arasında seneden seneye ya da aynı sene içerisinde değişikliklerin olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 4'ü ele aldığımızda, Hazirani'de 2019 senesinde bu değer 1209 gd olurken 2020 senesinde 1339 gd olarak belirlenmiştir. Şensoy ve ark. (2009)'da yürüttükleri bir araştırmada 420 A anacına aşılınmış Sultani çekirdeksiz üzümünün etkili sıcaklık değerlerini 2005 senesinde 1251.8 gd, 2006 senesinde 1343.6 gd ve 2007 senesinde ise 1210 gd olarak belirlemişlerdir. Ayrıca Kaya ve Özdemir (2015) senesinde Diyarbakır'da yürüttükleri araştırmada bu değeri 2010 senesinde Tahannebi'de 1404.7 gd, Şire'de (Mazrone) 2577.2 gd, 2011 senesinde ise Tahannebi'de 1247.3 gd ve Şire'de 2253.8 gd, Kokargül ve ark. (2019) Malatya ili yerel üzüm çeşidi olan Kureyş'de EST değeri, 2018 yılında 1969 gd, 2019 yılında ise 1945 gd; Ünal (2019) Şırnak (İdil) yöresinde Mazrone üzümünde EST değeri 2017 yılında 2901 gd, 2019 yılında ise 2982 gd; Bekar ve

Cangi (2017) yürüttükleri araştırmada, Narince'de EST'nin Tokat (merkez)'de 1885.91 gd, Erbaa'da 1842.96 gd ve Nisarsar'da 1908.81 gd; Şensoy ve ark. (2009) ise Sultani çekirdeksiz / 420 A'da 1264.5 gd, Sultani çekirdeksiz /110 R de 1363.8 gd; bu çalışmada aynı çeşit/genotip için EST değerleri 2019 senesi için 2442 gd, 2020 senesi için ise 2531 gd olarak belirlenmiş olması çevrenin, kullanılan anaçların ve yılların etkin olduğunu göstermektedir. Çakır (2021)'de bölgelerin sahip oldukları EST'ye göre yapılan sınıflandırmada Midyat yöresi 2752 EST değeri ile "sıcak iklim" sınıfında yer almaktadır.

**Çizelge 4.** Mardin yöresi üzüm çeşitlerinin fenolojik gelişme dönemlerine göre EST değerleri (gd) (Şekil 2)

Üzüm Çeşitleri	Etkili Sıcaklık Toplamı (gd)									
	Uyanma Tam Çiçeklenme			Tam Çiçeklenme Ben düşme			Ben düşme Hasat dönemi			Toplam EST
	2019	2020	Ort.	2019	2020	Ort.	2019	2020	Ort.	2019-2020
Kerküş	214	309	262	1504	1611	1558	611	547	579	2399
Zeynebi	223	325	274	982	1041	1012	674	684	679	1965
Benitaht	256	273	265	1376	1470	1423	539	568	554	2242
Şepirze	271	290	281	1406	1581	1494	541	575	558	2333
Korfoki	259	266	263	1435	1583	1509	548	540	544	2316
Siyah korfoki	210	287	249	1465	1544	1505	609	622	616	2370
Pembe korfoki	234	287	261	1445	1507	1476	513	581	547	2284
Sudani	233	322	278	788	860	824	1162	1180	1171	2273
Zeyti	272	331	302	878	960	919	827	895	861	2082
Bılbızek	252	294	273	898	1022	960	729	722	726	1959
Hasani	252	252	252	890	1023	957	864	722	793	2002
Tayfi	262	293	278	1326	1437	1382	735	706	721	2381
Reşe kewnar	230	278	254	907	1019	963	729	822	776	1993
Usved	213	267	240	974	1085	1030	594	577	586	1856
Bakari	252	317	285	953	1000	977	1046	1159	1103	2365
İmşebek	229	272	251	518	558	538	454	525	490	1279
Siyah imşebek	243	333	288	525	617	571	719	874	797	1656
Sorani	253	295	274	759	817	788	780	907	844	1906
Bizani	226	272	249	1275	1343	1309	607	766	687	2245
Hazirani	205	254	230	452	459	456	552	626	589	1275
Mazrone	288	293	291	1486	1581	1534	668	657	663	2488
Şitvi	233	322	278	1355	1470	1413	529	570	550	2241
Verdani	223	305	264	798	780	789	838	860	849	1902
Devvani	221	280	251	908	901	905	689	759	724	1880
Serdevi	253	304	279	943	1019	981	635	688	662	1922
Koher	253	286	270	1326	1435	1381	639	706	673	2324
Sincari	204	260	232	1365	1437	1401	666	706	686	2319
Atuf	230	254	242	988	278	633	912	1128	1020	1895

Bir yörede ekonomik manada bağcılık yapabilmenin bir başka şartı da gelişme dönemi uzunluğu olup, bunun en az 175 gün olması icap ettiği bildirilmektedir (Çelik, 2011). Bu çalışmada bu bakımdan ortalama 104 gün ile Hazirani en kısa, 175 gün ile yörede en fazla yetiştiriciliği yapılan Mazrone çeşidi en uzun vegetasyon periyoduna sahip olmuştur (Çizelge 5). Araştırılan bağ yörelerinde gelişme süresi ortalamalarının (Nisan-Ekim) 7 ayı (210 gün) bulduğu (Çizelge 1) dikkate alındığında, yörede her mevsimde yetişen üzüm çeşitlerinin yetiştirilebileceği manasına gelmektedir.

Ünal (2019) yaptığı bir çalışmada, gün sayısını Zeynebi'de 143 gün, Bılbızeki'de 156 gün, Sincari'de 156 gün, Tayfi'de 169 gün, Mazrone'de 170 gün ve Kerküş'de 160 gün olarak tespit ederken bu çalışmada (Çizelge 4, 5) söz konusu özellikler aynı sırayla Zeynebi'de 149 gün, Bılbızeki'de 146 gün, Sincari'de 162 gün, Tayfi'de 176 gün, Mazrone'de 175 gün ve Kerküş'de 169 gün; Uçaş (2021) yaptığı bir çalışmada çeşitlerin ortalama gelişme sürelerini Zeynebi'de 150 gün, Bılbızeki'de 150 gün, Sincari'de 155 gün, Tayfi'de 162 gün, Mazrone'de 180 gün ve Kerküş'de 170 gün; Yurtgül (2021), Şırnak (Güçlükönak) yöresinde yaptığı çalışmada gelişme dönemi uzunluğunu Sincari'de 160 gün, Bılbızeki'de 155 gün ve Kerküş'de 170 gün olarak belirlemişlerdir.

Eldeki verileri genel olarak değerlendirecek olursak; EST ve gelişme süresi başta olmak üzere, ele alınan karakterlerin gerçekleşmesinde öncelikle çeşit özelliği başta olmak üzere, iklim parametreleri, bağ arazisinin konumu, toprak yapısı, yükselti, kullanılan anaç, kültürel uygulamalardaki farklılıkların da belli seviyede etki yaptığını belirtmek gerekecektir (Odabaşıoğlu, 2021).

Çizelge 5. incelendiğinde, yörede bağların kapama olmamakla beraber Mazrone, Kerküş ve Zeynebi gibi birkaç çeşidin bağlarda çoğunluğu teşkil ettiğini göstermektedir. Elde edilen ürün; daha ziyade sofralık olarak kullanılmakla birlikte kurutmalık, pekmez-pestil gibi yerel ürünlerin üretimi yanı sıra şarap üretiminde de değerlendirilmektedir. Yöredeki üzüm çeşitleri içerisinde salamura yaprak üretimine elverişli (ince, tüysüz, bütün ve damarsız) çeşitlerin sayısının çok az olduğu gözlenmiştir.

**Çizelge 5.** Üzüm çeşitlerinin fenolojik dönemlere göre gelişme periyodu ve bazı karakterleri (2019-2020) (Şekil 3)

Üzüm çeşitleri	Gelişme periyodu ortalaması (gün)				Yaygınlık durumu	Çeşit özellikleri	
	Gözlerin sürmesi- Tam çiçeklenme	Tam çiçeklenme- Ben düşme	Ben düşme- Olgunluk	Toplam		Değerlendirme şekli	Salamuraya uygunluk
Kerküş	44	88	37	169	Yaygın	Şıralık ve kurutmalık	Uygun
Zeynebi	52	61	36	149	Yaygın	Şıralık ve kurutmalık	Uygun
Benitaht	34	80	33	147	Orta	Şıralık ve kurutmalık	Uygun
Şepirze	41	84	34	159	Az	Kurutmalık ve sofralık	Uygun
Korfoki	37	86	33	156	Az	Şıralık ve sofralık	Uygun değil
Siyah korfoki	36	86	38	160	Az	Şıralık ve sofralık	Uygun değil
Pembe korfoki	39	84	33	156	Az	Şıralık ve sofralık	Uygun değil
Sudani	53	51	65	169	Az	Şıralık –sofralık ve kurutmalık	Uygun değil
Zeyti	56	55	46	157	Orta	Sofralık ve kurutmalık	Uygun değil
Bılbızek	49	58	39	146	Az	Sofralık ve kurutmalık	Uygun değil
Heseni	43	59	42	144	Orta	Sofralık ve kurutmalık	Uygun
Tayfi	52	81	43	176	Orta	Sofralık ve şıralık	Uygun değil
Reşe kewnar	37	57	42	136	Az	Sofralık – şıralık ve kurutmalık	Uygun değil
Usved	47	64	31	142	Az	Sofralık-kurutmalık ve şıralık	Uygun değil
Bakari	52	58	63	173	Az	Sofralık	Uygun
İmşebek	43	37	26	106	Az	sofralık	Uygun değil
Siyah imşebek	55	37	42	134	Az	Sofralık	Uygun değil
Sorani	43	47	45	135	Az	Sofralık	Uygun değil
Bizani	41	77	39	157	Az	Sofralık	Uygun değil
Hazirani	39	34	31	104	Orta	Sofralık	Uygun değil
Mazruna	43	85	47	175	Yaygın	Şıralık ve sofralık	Uygun değil
Şıtvı	52	81	32	165	Az	Sofralık ve şaraplık	Uygun değil
Verdani	51	50	45	146	Az	Sofralık ve şaraplık	Uygun değil
Deyvani	45	56	38	139	Orta	Sofralık ve şıralık	Uygun değil
Serdevi	43	57	35	135	Az	Sofralık	Uygun değil
Koher	42	80	40	162	Az	Sofralık	Uygun
Sincari	38	83	41	162	Az	Sofralık	Uygun
Atf	37	48	54	139	Az	Sofralık ve şaraplık	Uygun değil

## SONUÇ

Bağcılığın yapıldığı yörelerde iklim özelliklerinin çeşitlerin performansı üzerine yaptığı etkilerinin tespit edilmesi, gelecekte yapılacak çalışmalara azımsanmayacak derecede katkıda bulunması beklenmektedir. Bu değerlerin belirlenmesi, bölge ekolojik yapısının mahalli üzüm çeşitlerinin alınan ürün miktarı ve niteliğine tesiri ile piyasada aranan ve tanınan çeşitlerin bölgede yetiştirilip yetiştirilemeyeceği hususunda karar vermede üretici ve diğer ilgililere ışık tutacaktır.

Araştırma sonunda incelenen bütün karakterler yıllara ve çeşitlere göre farklılıklar göstermiş; Mardin ili midyat yöresi şartlarında yetiştiriciliği yapılan üzüm çeşitlerinin EST değerleri ortalamasının 1275 gd (Hazirani) ile 2488 gd (Mazrone), gelişme dönemi uzunluğu ortalamasının ise ortalama 104 gün (Hazirani) ile 175 gün (Mazrone) arasında değiştiği tespit edilmiştir. Midyat yöresinin “Sıcak İklim”

sınıfına dahil olduğu, geçici sofralık ve kurutmada kullanılan üzüm çeşitlerinin rahatlıkla yetişebileceği gözlenmiştir. Pekmez vb. ürünlerin yapımında kullanılan çeşitlerin arzu edilen nitelikte olup olmadığı, hasat zamanında bunların besin değerlerinin ortaya konulması ve üretilecek mahsüllerin fiziksel, kimyasal ve duyuşsal olarak değerlendirilmeleri sonrası anlaşılacağı ifade edilebilir.

İklim yapısı itibarı ile her amaç için ve her mevsimde ürününü olgunlaştırabilen üzüm çeşitlerinin yetişebilmelerine uygun olan Midyat ilçesinde Midyat'ta üreticiler tarafından tercih edilen mahalli üzüm çeşitlerinin tespit edilerek bunlarla yeni bağların kurulması, nitelik ve birim alandan alınacak ürün miktarını artırmaya dönük çalışmaların sıklaştırılmasına gerek vardır. Ayrıca, Suriye ve Irak pazarlarında ticari manada rekabet edebilecek taze tüketime yönelik çeşitlerden oluşan adaptasyon bağlarının vakit kaybetmeden tesis edilmesi önemli olarak görülmektedir.

### Çıkar Çatışması

Yazarların arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmadığı beyan olunur.

### Yazar Katkısı

Yazarların herbiri makaleye eşit olarak katkı sağlamışlardır.

### KAYNAKLAR

- Aktürk B, Uzun Hİ, 2019. Bazı Sofralık Üzüm Çeşitlerinin Antalya'daki Değişik Yörelere Uygunlukları ve Etkili Sıcaklık Toplamı İstekleri. *Mediterranean Agricultural Sciences*(2019) 32(3): 267-273.
- Aktürk B, Uzun Hİ, 2020. Bağcılıkta Etkili Sıcaklık Toplamı Hesaplamasında Kullanılan Farklı Yöntemlerin Karşılaştırılması. *Mediterranean Agricultural Sciences* (2020) 33(2): 159-165.
- Ateş F, Uysal H, 2017. Determinations Of Adaptation Level Of Wine Grape Varieties In Terms Of Climatic Data In Wine Growing Regions Of Turkey. 40th World Congress of Vine and Wine, Bulgaria.
- Bekar T, Cangı R, 2017. Tokat'ta Farklı Ekolojilerde Yetiştirilen Narince Üzüm Çeşidinin Fenolojik Gelişme Evreleri ve Etkili Sıcaklık Toplamı İsteklerinin Belirlenmesi. *Türkiye Teknoloji ve Uygulamalı Bilimler Dergisi*, 1(2): 86-90.
- Candar S, Alço T, Uysal T, Ekiz M, Yayla F, 2019. Karamenüş ve Yayla (*Vitis vinifera* L.) Şaraplık Üzüm Çeşitlerinde Biyoklimatik İsteklerin ve Olgunluk Göstergelerinin Belirlenmesi. *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi (UTYHBD)*, 2019, 5(2): 231-239.
- Cangı R, Şen A, Kılıç D, 2008. Bazı Üzüm Çeşitlerinin Kazova (Tokat-Turhal) Koşullarındaki Fenolojik Özellikleri ile Etkili Sıcaklık Toplamı (EST) İsteklerinin Saptanması. *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*, 2, 45-48.
- Cangı R, Altun M A, 2015. Bazı Önemli Sofralık Üzüm Çeşitlerinin Sakarya/Taraklı Ekolojisine Adaptasyonu. *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*, 8(2): 35-39.
- Cangı R, Yağcı, A, 2017. Bağdan Sofraya Yemeklik Asma Yaprak Üretimi. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi Cilt 6(Kapadokya Ulusal Bağcılık Çalıştay1 Özel Sayı) 137-148 2017.*
- Cangı R, Demir E, 2019. Bazı Üzüm Çeşitlerinin Mecitözü/Çorum Koşullarında Fenolojik Özellikleri ve Etkili Sıcaklık Toplamı (EST) Değerlerinin Belirlenmesi. *Meyvecilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Cilt (Sayı): 6(2): 29-35.*
- Çakır A, 2021. Asma Ekolojisi (Bağcılık/Üzüm Yetiştiriciliği). *Tarım Gündem Dergisi Özel Yayını, Metro Matbaacılık, s.30-43, İzmir-Türkiye.*
- Çelik, H., Ağaoğlu, Y.S., Fidan, Y., Marasallı, B., Söylemezoğlu, G., 1998. Genel Bağcılık. *Sunfidan A.ğ. Mesleki Kitaplar Serisi: 1, 253s., Ankara.*
- Çelik S, 2011. Bağcılık (Ampeloloji). *Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Cilt 1, Tekirdağ-Türkiye.*
- Demir E, 2019. Mecitözü ekolojisinde yetiştirilen bazı üzüm çeşitlerinde optimum hasat zamanlarının belirlenmesi. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.*

- FAO, 2020. Food and Agriculture Organization of the United Nations Official Website. Grape production. <http://www.fao.org/faostat/en/#data> (Erişim tarihi: 12.01.2020).
- Kaya M, Özdemir G, 2015. Bazı Sofralık Üzüm Çeşitlerinin Diyarbakır Koşullarındaki Kalite Özellikleri ile Etkili Sıcaklık Toplamı İsteklerinin Belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi, Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 27(Özel Sayı).
- Kılıç D, Kaya Y, Başaran B, Topal H, Mutlu N, Yağcı A, Cangı R, 2018. Bazı Sofralık Üzüm Çeşitlerinin Tokat Merkez Koşullarına Adaptasyonu. BAHÇE 47 (Özel Sayı 1: Türkiye 9. Bağcılık ve Teknolojileri Sempozyumu): 187-194.
- Kıracı, M.A., 2021. Pratik Bağcılık (Giriş). Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Tekirdağ-Türkiye.
- Kokargül R, Çöçen E, Koç H, Sarıtepe Y, 2020. Kureyş Üzüm (*Vitis vinifera L.*) Çeşidinin Fenolojik, Pomolojik ve Ampelografik Özellikleri. International Journal of Eastern Mediterranean Agricultural Research, 3(1):17-30.
- Köse B, 2014. Phenology and Ripening Of *Vitis Vinifera L.* and *Vitis Labrusca L.* Varieties In The Maritime 324 Climate Of Samsun In Turkey's Black Sea Region. South African Journal of Enology and Viticulture, 35(1): 90-102.
- Küsmüş S, 2016. Malatya İlinde Yetiştirilen Üzüm Çeşitlerinde Etkili Sıcaklık Toplamı ve Optimal Hasat Zamanlarının Belirlenmesi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Odabaşoğlu M.İ., 2021. Semi-Arid Koşullarda Farklı Anaçlar Üzerinde Yetiştirilen Sofralık Üzüm Çeşitlerinin Verim, Kalite ve Çekirdek Özellikleri İle Stoma Morfolojilerinin İncelenmesi
- Özkan A, 2020. Genel Bağcılık. Harman Yayıncılık, s.222., İstanbul-Türkiye.
- Schwartz MD, 2003. Phenology: An intergative En-vironmental Science, Klüwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London
- Söğüt AB, Özdemir G, 2015. Bazı Şaraplık Üzüm Çeşitlerinin Diyarbakır Ekolojisindeki Fenolojik Özellikleri ile Etkili Sıcaklık Toplamı İsteklerinin Belirlenmesi. Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 27, 403-412.
- Şen A, 2008. Kazova (Tokat) Ekolojisinde Yetiştirilen Bazı Üzüm Çeşitlerinde Etkili Sıcaklık Toplamı ve Optimum Hasat Zamanlarının Belirlenmesi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Şensoy RİG, Balta F, Cangı R, 2009. Bazı Sofralık Üzüm Çeşitlerinin Van Ekolojik Koşullarındaki Etkili Sıcaklık Toplamı Değerlerinin Belirlenmesi. Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 13(3): 49-59.
- Toprak Özcan E, Kesgin M, 2016. Bazı Üzüm Çeşitlerinin Manisa Koşullarında Fenolojik Özellikleri ve Etkili Sıcaklık Toplamı (EST) İsteklerinin Belirlenmesi. Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi (Babikon 2015 II. Cilt), 45(2):783-788.
- TÜİK, 2020. <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=tarim-111&dil=1> 12.06.2021
- Uçaş C, 2021. Midyat (Mardin) İlçesinde Bazı Yerel Üzüm Genotipleri ve Ampelografik Özelliklerinin Belirlenmesi, Şırnak Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Ünal MS, 2018. İdil Bölgesi Üzüm Çeşitlerinin Salamura Yaprak Yapımına Uygunluğunun Araştırılması. Şehri Nuh Uluslararası Multidisipliner Çalışmalar Kongresi, 8-9 Eylül 2018, Cizre/ŞIRNAK.
- Ünal MS, 2019. İdil/Şırnak Ekolojisinde Yetiştirilen Yerel Üzüm Çeşitlerinin Etkili Sıcaklık Toplamı İsteklerinin Belirlenmesi. Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi (UTYHBD), 5(1): 46-53.
- Yaşasın AS, 2021. Bağ Tesis Edilecek Yerin Özellikleri Nelerdir (Pratik Bağcılık). Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü, s.33-35, Tekirdağ-Türkiye.
- Yıldırım M, 2019. Şırnak İli İdil İlçesinde Yetiştirilen Üzüm Çeşitlerinin Bazı Ampelografik Özelliklerinin Belirlenmesi, Şırnak Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Yurtgöl C, 2021. Güçlükönak Yerel Üzüm Çeşitlerinin Özellikleri, Uygulanan Bağcılık Tekniği ve Değerlendirme Şekilleri, Şırnak Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

**Atf İçin:** Göktaş H, Yıldırım AN, Çelik C, Kaçal E, 2022. Şeftali Anacı Üzerine Aşılammış Bazı Seçilmiş Badem Genotipleri ve Ferragnes Badem Çeşidinin Uyuşma Durumlarının Belirlenmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 21-29.

**To Cite:** Göktaş H, Yıldırım AN, Çelik C, Kaçal E, 2022. Determination of Compatibility of Some Selected Almond Genotypes and Ferragnes Almond Cultivar Grafting on Peach Rootstocks. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 21-29.

## Şeftali Anacı Üzerine Aşılammış Bazı Seçilmiş Badem Genotipleri ve Ferragnes Badem Çeşidinin Uyuşma Durumlarının Belirlenmesi

Hüseyin GÖKTAŞ<sup>1</sup>, Adnan Nurhan YILDIRIM<sup>1</sup>, Civan ÇELİK<sup>2\*</sup>, Emel KAÇAL<sup>3</sup>

**ÖZET:** Çalışmada selekte edilen bazı ümitvar badem genotipleri (ISP 57 ve ISP 59) ile Ferragnes badem çeşidinin şeftali anacı üzerinde aşı uyuşma durumlarının erken dönemde belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için aşılama 15, 30, 60, 90 ve 120 gün sonra aşı yerinden alınan kesitler, anatomik ve histolojik yönden incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre aşılama 15 gün sonra kallus oluşumunun başladığı, 30 gün sonra kallus oluşumunun daha da geliştiği ve kambiyal farklılaşmanın başladığı gözlenmiştir. Aşılama 90 gün sonra kambiyal devamlılığın sağlandığı ve yeni vasküler dokular ürettiği; 120 gün sonrasında ise tüm aşı kombinasyonlarında kambiyal farklılaşmaların devamlılık kazandığı ve aşı kaynaşmasının gelişmeye devam ettiği görülmüştür. Sonuçta tüm aşı kombinasyonlarında herhangi bir uyuşmazlık belirtisine rastlanmamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Badem, aşı, uyuşmazlık, Ferragnes, genotip

### Determination of Compatibility of Some Selected Almond Genotypes and Ferragnes Almond Cultivar Grafting on Peach Rootstocks

**ABSTRACT:** The present study was carried out to determine rootstock and scion compatibility of the selected almond genotypes, (ISP 57 and ISP 59) and Ferragnes almond cultivar on peach rootstock at early periods after grafting. Sections were taken at 15-120 days after grafting to study anatomical and histological changes occurred at grafting sites. Results revealed that 15 days after grafting callus formation was visible. 30 days after grafting, callus formation further developed and cambial differentiation was started. After 90 days of grafting, cambial differentiation continued to expand and produced new vascular tissues. At 120 days after grafting, cambial differentiation and tissue fusion continued to expand in all grafting combinations. At the end of the study period, almond and peach graftings did not exhibit graft compatibility.

**Keywords:** Almond, grafting, incompatibility, Ferragnes, genotype

<sup>1</sup> Hüseyin GÖKTAŞ ([Orcid ID: 0000-0001-5110-7025](https://orcid.org/0000-0001-5110-7025)), Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Atabey Meslek Yüksekokulu Müdürlüğü, Bitkisel Ve Hayvansal Üretim Bölüm Başkanlığı, Isparta, Türkiye,

<sup>1</sup> Adnan Nurhan YILDIRIM ([Orcid ID: 0000-0003-2526-040X](https://orcid.org/0000-0003-2526-040X)), Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Isparta, Türkiye,

<sup>2</sup> Civan ÇELİK ([Orcid ID: 0000-0002-1696-5902](https://orcid.org/0000-0002-1696-5902)), Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Isparta, Türkiye

<sup>3</sup> Emel KAÇAL ([Orcid ID: 0000-0003-4834-5510](https://orcid.org/0000-0003-4834-5510)), Meyvecilik Araştırma Enstitüsü, Islah ve Genetik Bölümü, Isparta, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Civan ÇELİK, e-mail: civancelik@isparta.edu.tr

Bu çalışma Hüseyin GÖKTAŞ'ın Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

## GİRİŞ

Badem, Dünya’da yetiştiriciliği yapılan sert kabuklu meyveler içerisinde ekonomik değeri en yüksek olan türlerden biridir (Venkatachalam ve Sathe, 2006). Yağ, protein, mineral madde, lif, steroller, fenolik madde ve tokoferol ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ) içeriklerinin yüksek olması (Venkatachalam ve Sathe, 2006; Yada ve ark., 2011; Beyhan ve ark., 2011; Kırbaşlarve ark., 2012) ve farklı tüketim şekillerinin (çiğ, kavrulmuş, blanched, çikolata ve pasta sanayi, ecza ve boya sanayi v.b) olması (Vijeratne ve ark., 2006; Esfahlan ve Jamei, 2012) bademi öne çıkaran özellikler arasında yer almaktadır. Ayrıca, kardiyovasküler ve diğer kronik hastalıkları riskini azaltmada kandaki kötü kolesterol seviyesini düşürmede (LDL), akciğer, pankreas, mide, kolon gibi bir çok kanser tipinin etkisini azaltmada, beyin ve sinir sistemini beslemede, daha iyi yaşam için obezite ve diyabet ile mücadelede etkili şekilde kullanılmaktadır (Arranzve ark., 2008; Ahmad, 2010; Abeve ark., 2010; Bollingve ark., 2010; Chandrasekara ve Shahidi, 2011). Dahası badem yağının antioksidanlarca zengin olması günümüzde güzellik-masaj uzmanları ve aromaterapistlerce doğal yumuşatıcı ve cilt gençleştirici olarak da değerlendirilmektedir (Ahmad, 2010).

Ülkemizde yetiştirilen badem ağaçları sayıca fazla olmasına rağmen verimin düşük olması, yetiştiricilikte belli bir standart olmamasından dolayıdır. Eski badem plantasyonlarının daha çok yabancı ağaçlardan (tohumdan) meydana gelmiş olması, tipler arasında varyasyon görülmesine ve standart bir ürün alınamamasına sebep olmaktadır. Bademin çoğaltılmasında anacın önemi büyüktür. Yetiştiricilikte bazı klon anaçları yanında badem, şeftali, erik ve zerdali gibi tohum anaçları da yoğun olarak kullanılmaktadır. Anaç seçiminde çeşitlerle uyuma, toprak koşulları, su durumu, toprağın nematotla bulaşık olup olmaması rol oynamaktadır. Bu faktörler dikkate alınarak bu anaçların üzerine aşıl原因 çeşitlerle badem bahçesi tesis edilebilmektedir (Gerçekçioğlu ve ark., 2008). Şeftali anacına aşılı fidanlar çabuk büyüme, iyi bir kök yapısı oluşturmakta ve dikildikleri yerde tutma oranı yükselmektedir. Şeftali anaçları ayrıca badem çeşitleri ile genelde iyi bir aşı uyumu göstermektedir. Aşı yerlerinin hemen üstünde bir şişkinlik oluşabilmekte ve sonrasında ise 10-12 yaşından sonra verim düşmeye başlamaktadır (Özçağırın ve ark., 2003). Aşı ile üretim tüm dünyada meyve yetiştiriciliğinde pratik olarak kullanılan bir vejetatif üretim metodudur (Soylu, 1997). Modern meyve yetiştiriciliğinde kullanılmış olduğumuz anaç-kalem kombinasyonları başarılı bir yetiştiricilik için önem taşımaktadır. Birbirlerine çok yakın akraba bitkiler birbirlerine aşılandığı zaman aşı yerinde iyi derecede bir kaynaşma meydana getirmektedir. Bitkiler arasındaki akrabalık derecesi azaldıkça buna bağlı olarak kaynaşma kötü olmaktadır. Bazen anaç ile kalem arasındaki kaynaşma ilk yıllarda normal görüldüğü halde aşıl原因dan bir süre sonra, herhangi bir mekanik etkiyle, anaçla kalemin oldukça düz bir yüzeyle birbirinden ayrıldığı görülebilmektedir. Bazı durumlar da bitki birkaç hafta ya da birkaç yıl normal gelişebilmektedir. Daha sonra kalem kurumakta veya aşı yerinden kırılmaktadır. Bazen de aşı hiç tutmamaktadır. Kaynaşmaya engel olan bu faktörler uyumsuzluk olarak tanımlanmaktadır (Özçağırın, 1974).

Çalışmada, Yıldırım (2007) tarafından selekte edilen bazı Ümitvar badem genotipleri ve Ferragnes badem çeşidinin şeftali anacı üzerinde uyuma durumu değerlendirilmiştir. Kombinasyonlara ait aşı kaynaşmasının gelişimi, farklı zamanlarda aşı yerinden alınan kesitlerin anatomik ve histolojik yönden incelenmesiyle izlenmiştir.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmada bitkisel materyal olarak, Yıldırım (2007) tarafında selekte edilen bazı ümitvar genotipler (ISP 57 ve ISP 59 nolu genotip) ve ekonomik değeri yüksek olan Ferragnes badem çeşidi; anaç olarak ise şeftali anacı kullanılmıştır.

ISP 57 ve ISP 59 genotipleri ile Ferragnes badem çeşidi, şeftali anacı üzerine her kombinasyondan 15'er adet olacak şekilde 2014 yılı şubat ayında yongalı göz aşısı yöntemiyle aşılanmıştır. 2014 yılı vejetasyon periyodunca her kombinasyondan 3'er aşı örneği aşı noktasının 3 cm altından ve üzerinden olacak şekilde kesilmiş ve incelemeler gerçekleştirilinceye kadar (FAA) çözeltisi içerisinde bekletilmiştir. Aşı örneklerinin alınma tarihi Çizelge 1'de sunulmuştur.

Histolojik incelemeler Eğirdir MAREM Histoloji Laboratuvarında yapılmıştır. 15, 30, 60, 90 ve 120 günlük alınan aşı örneklerinin kesitleri mikrotom kullanılarak 25-35 µ kalınlığında olacak şekilde kesilmiş ve boyama işlemine kadar % 70'lik etil alkolde bekletilmiştir. Aşı örneklerinden elde edilen kesitlerin boyanmasında safranin kullanılmıştır. Safranin ile boyanan aşı kombinasyonlarına ait örnekler mikroskopta daha iyi sonuçlar elde edilmesi amacıyla çeşitli alkol serilerinden geçirilmiştir. Bu işlem sonrasında daha önce temizlenmiş ve entellan damlatılmış lam üzerine konularak lamelle kapatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparatlar mikroskopta incelenmiştir.

**Çizelge 1.** Aşı örneklerinin alınma tarihleri

Örnekler	Örnek alma zamanı
15.gün	29.04.2014
30.gün	15.05.2014
60.gün	15.06.2014
90.gün	15.07.2014
120.gün	15.08.2014

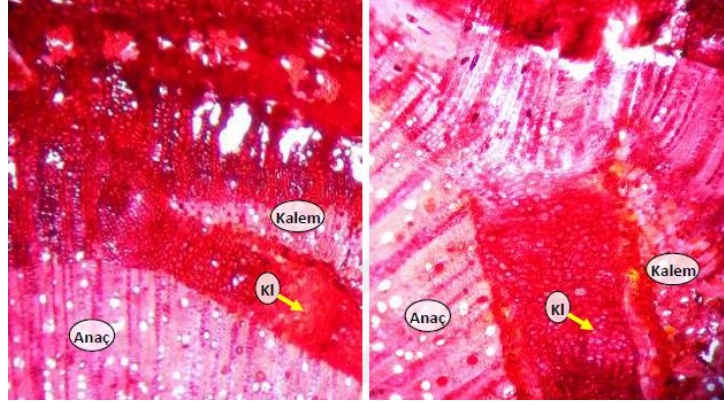
Alınan örneklerin enine kesitlerinde anaç ve kalemin meydana getirdiği kallus dokuların durumu, nekrotik tabakaların durumu, dokuların kaynaşma durumu, kambiyal farklılaşmanın ve yeni iletim dokularının meydana gelişi, anaç ve kalem arasında kambiyal devamlılığın tamamlanması olayları mikroskopla incelenmiştir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

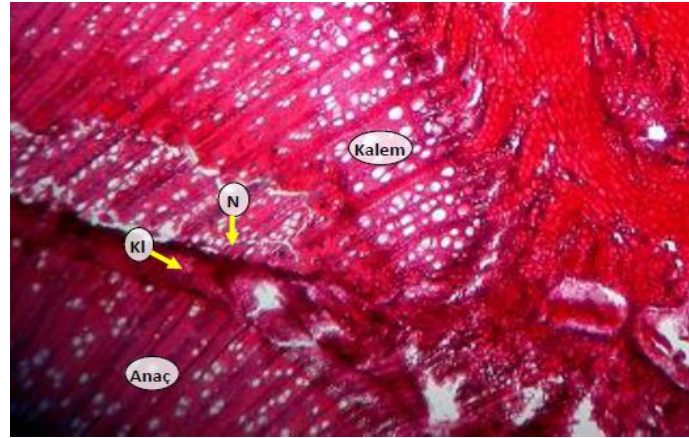
Aşı örneklerinden alınan kesitlerin mikroskopik gözlemlerinde; anaç ile kalem arasındaki kallus dokusunun yapısı ve bu doku içindeki nekrotik tabakaların durumu, kambiyum tabakasının meydana gelişi ve kambiyal devamlılığın oluşumu, kambiyal farklılaşmanın ve yeni iletim dokularının oluşumu, anaç ve kalem kabukları arasındaki nekrotik tabakalar ve dokuların kaynaşma durumları ile odun dokusunun devamlılığı ve yapısı incelenmiştir. Badem/Şeftali aşı kombinasyonlarında aşılardan 15 gün sonra alınan aşı örneklerinde anaç ve kalem arasındaki kesim yüzeyi boyunca zayıf bir kallus dokusu gözlenmiştir. Kallus dokusunun anaçta kaleme göre daha yoğun olduğu tespit edilmiştir. İncelenen enine kesitlerde kambiyal farklılaşmaya rastlanmamıştır. Aşı kombinasyonlarında aşı birleşme bölgesinde oluşan kallus dokusunun anacın ksilemi, kalemin ise meristematik hücrelerden oluşan kambiyum hücrelerinden orjinlendiği görülmüştür. 15. gün aşı örneklerinde genotipler arasında dokusal anlamda herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. ISP 57/Şeftali aşı kombinasyonuna ait 1 aylık aşı örneklerinde kesim yüzeyindeki yaralı dokularda parankima hücrelerinin meydana getirdiği tatminkar bir kallus oluşumu gözlenmiştir (Şekil 1). Bu dönem de kallus tabakasında dokusal farklılaşmaların olduğu ve kallus dokusu içinde yeni ksilem hücrelerinin oluştuğu tespit edilmiştir. ISP 59/Şeftali ve Ferragnes/Şeftali aşı kombinasyonlarında da kallus ve kambiyal hücrelerin gelişimi ISP 57/Şeftali kombinasyonu ile benzerlik göstermiştir. Ayrıca aşı örneklerinde nekrotik alanın yok denecek kadar az olduğu görülmüştür. Aşı kombinasyonlarının 60. gün örneklerinde kaleminde eski ksileme yakın dokularda nekrotik alanlar izlenmiştir. Nekrotik alan ISP 59/Şeftali kombinasyonunda anaç ve kalemin birleşme yüzeyi boyunca uzanmaktadır. Yine bu dönem örneklerinde anaç ve kaleminde yeni ksilem



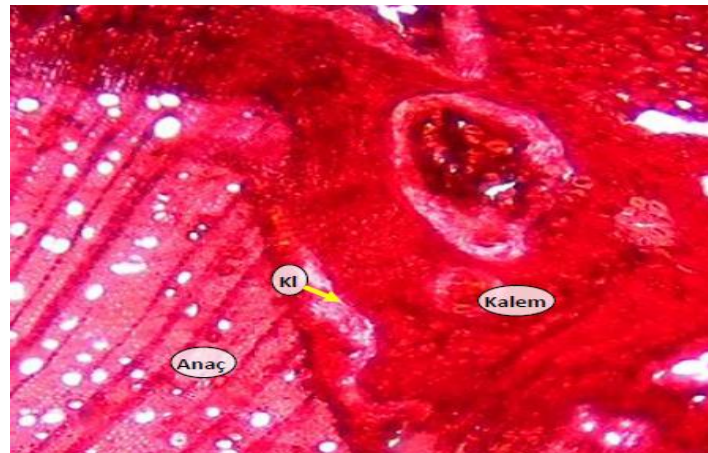
elemanlarının oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 2). Aşılama 3 ay sonra alınan enine kesitlerde, tüm aşı kombinasyonlarında vasküler farklılaşmanın devam ettiği görülmüştür. Ferragnes/Şeftali kombinasyonunun, vasküler farklılaşma bakımından ISP 57/Şeftali ve ISP 59/Şeftali kombinasyonlarına göre daha başarılı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3, 4, 5). Kambiyum tabakası ara ara kesilmekle birlikte devamlı görünümündedir. ISP 59/Şeftali kombinasyonuna ait fotoğraflarda görülen ve nekrotik alan izlenimi bırakan alanlar kesim hatalarından kaynaklanmakta olup dokusal anlamda ölü alanlar bulunmamaktadır.



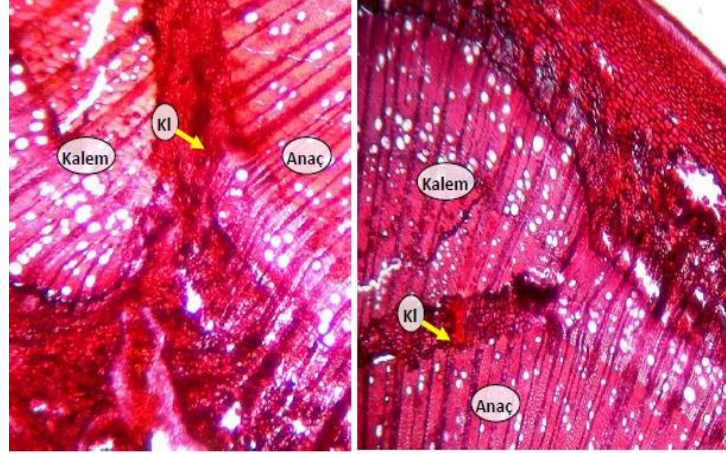
**Şekil 1.** ISP 57/Şeftali aşı kombinasyonunda aşılama 30 gün sonra aşı kaynaşmasının meydana gelişi (Kl:Kallus)



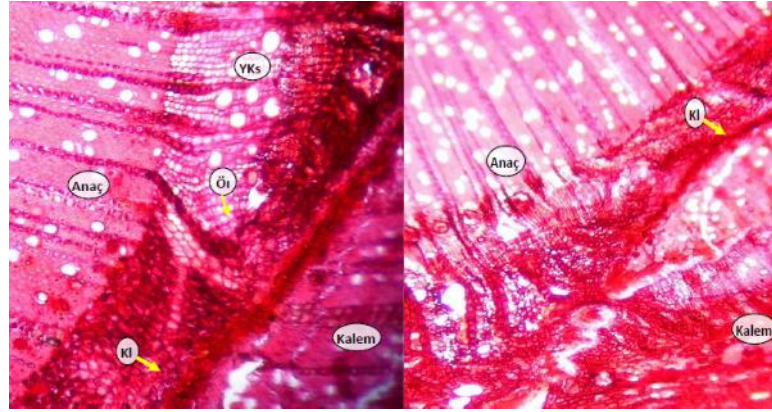
**Şekil 2.** ISP 57/Şeftali aşı kombinasyonunda aşılama 60 gün sonra aşı kaynaşmasının meydana gelişi (Kl:Kallus, N:Nekrotik alan)



**Şekil 3.** ISP 57/Şeftali aşı kombinasyonunda aşılama 90 gün sonra aşı kaynaşmasının meydana gelişi (Kl:Kallus)

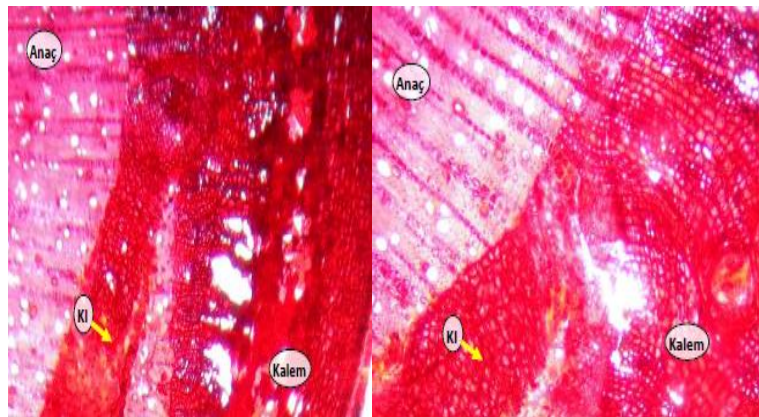


**Şekil 4.** ISP 59/Şeftali aşı kombinasyonunda aşılamadan 90 gün sonra aşı kaynaşmasının meydana gelişi (Kl:Kallus)

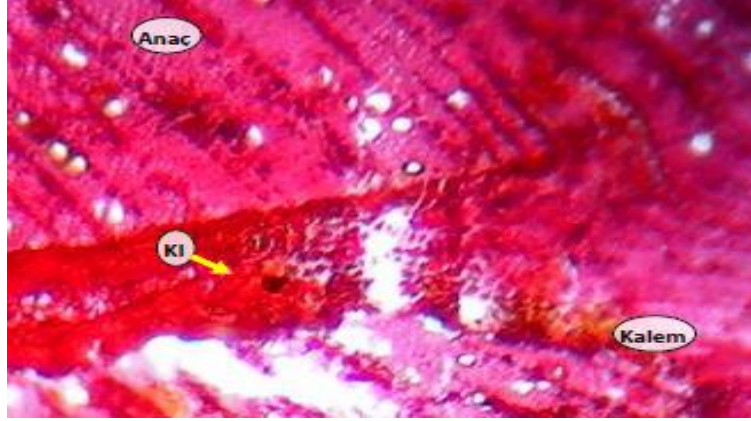


**Şekil 5.** Ferragnes/Şeftali aşı kombinasyonunda aşılamadan 90 gün sonra aşı kaynaşmasının meydana gelişi (Kl:Kallus, Yks:YeniKsilem, Öi:Öz ışıması)

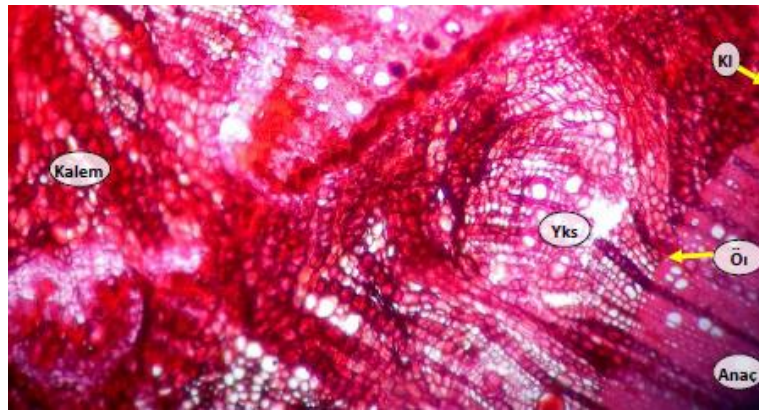
Aşılamadan 4 ay sonra incelenen tüm aşı kombinasyonlarına ait enine kesitlerde, aşılar arasında kallus köprüsünün kurulduğu, kambiyal farklılaşmaların devamlılık kazandığı tespit edilmiştir (Şekil 6, 7, 8). İncelenen kesitlerde aşı kaynaşması yönünden herhangi bir olumsuzluğa rastlanmamıştır. Aşı örneklerinde vasküler farklılaşma devam etmektedir. Ferragnes/Şeftali aşı kombinasyonunda aşı elemanları arasında kaynaşmanın çok iyi olduğu görülmüştür. Vasküler bağlantı büyük oranda gerçekleşmiştir.



**Şekil 6.** ISP 57/Şeftali aşı kombinasyonunda aşılamadan 120 gün sonra aşı kaynaşmasının meydana gelişi (Kl:Kallus)



**Şekil 7.** ISP 59/Şeftali aşı kombinasyonunda aşılamaadan 120 gün sonra aşı kaynaşmasının meydana gelişi (Kl:Kallus)



**Şekil 8.** Ferragnes/Şeftali aşı kombinasyonunda aşılamaadan 120 gün sonra aşı kaynaşmasının meydana gelişi (Kl:Kallus, Yks:YeniKsilem, Ö1:Öz ışını)

İklim koşullarındaki değişkenlik, farklı toprak yapıları, biyotik ve abiyotik stres faktörleri, tüketici talepleri vb. nedenler, meyvecilikte yeni anaç ve çeşitlerin geliştirilmesine yönelik ıslah çalışmalarını sürekli hale getirmektedir. Özellikle uyumsuz olduğu belirlenen veya düşünülen türlerde elde edilen anaç veya çeşitlerin üretime sunulması için öncelikle uyuşma durumlarının belirlenmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada, seleksiyon çalışmaları sonucu elde edilmiş bazı ümitvar badem genotiplerinin ve Ferragnes badem çeşidinin şeftali anacı ile uyuşma durumları incelenmiştir. Aşılama, meyve ağaçlarının vejetatif olarak çoğaltılmasında kullanılan en yaygın çoğaltma metotlarından biridir (Hartmann ve ark., 1997). Aşılama, canlı iki bitki parçasının birlikte, tek ve sürekli komposit bir bitki gibi gelişip büyüyerek bağlanma sanatı olarak ifade edilmektedir. Genetik olarak birbirine yakın türler veya aynı tür içerisindeki bitkiler başarılı olarak aşılanaşmakla birlikte farklı genetik yapıya sahip türlerle yapılan aşılarda aşı başarısı düşüktür (Ermelve ark., 1999). Başarılı bir aşı birleşmesi için anaç ve kalemin kambiyumlarının çakışması gerekir. Aşı birleşmesi, anaç ve kalemden orjinlenen kallus hücrelerinin hızlı bir şekilde bölünmesiyle başlar (Hartmannve ark., 1997). ISP 57/Şeftali, ISP 59/Şeftali ve Ferragnes/Şeftali kombinasyonlarında 15. gün aşı örneklerinde kesim yüzeyi boyunca parankimatik hücrelerin oluşturduğu ve zayıf bir kallus tabakasının meydana geldiği gözlenmiştir. Kallus tabakası aşılamaadan sonraki ilk hafta içinde oluşabilmektedir (Erreave ark., 1994). Nitekim, Pixy anacı üzerine aşılı Thyrinte, Şekerpare ve Hacıhaliloğlu kayısı çeşitlerinde aşılamaadan 15 gün sonra aşı birleşme yerlerinde zayıf bir kallus oluşumunun meydana geldiği (Kankayave ark., 2001) bildirilmiştir. İncelediğimiz aşı örneklerine ait iki haftalık kesitlerde zayıf bir kallus oluşumu gözlenmiştir. Aşı yerinde zayıf kallus oluşumu, aşının kötü yapılmasından ve aşıdan önce ve sonraki bakım şartlarının iyi olmamasından

kaynaklanabilmektedir (Ünal ve Özçağıransım, 1986). 15. gün aşım örneklerinde kambiyal farklılaşma görülmemektedir. Buna karşın Hasanbey kayısı çeşidinde yapılan bir çalışmada, aşılansım 15 gün sonra yeni vasküler dokuların oluştuğu bildirilmiştir (Kankayave ark., 2001). Aşım kombinasyonlarına ait 30 günlük örneklerin enine kesitleri incelendiğinde, anaç ve kalem arasında oluşan kallus tabakasının yoğunluk kazandığı gözlenmiştir. ISP 57/Şeftali aşım kombinasyonunda tatminkar bir kallus oluşumu göze çarpmaktadır. Bu dönem de anaç ve kalem tarafından oluşturulan kallus tabakasında dokusal farklılaşmaların olduğu görülmektedir. Kallus dokusu içinde yeni ksilem hücreleri oluşmuştur. ISP 59/Şeftali ve Ferragnes/Şeftali aşım kombinasyonlarında da kallus ve kambiyal hücrelerin gelişimi ISP 57/Şeftali kombinasyonu ile benzerlik göstermektedir. Aşım örneklerinde nekrotik alan yok denecek kadar azdır. Aşımaların hazırlanması sırasında anaç ve kalemdeki kesim yüzeylerinde bir grup hücre tabakası ölmektedir. Nekrotik alan olarak gözlenen bu yapılar parankimatik hücrelerin bölünmesiyle oluşan kallus tabakası tarafından çoğu zaman absorbe edilmektedir (Hartmannve ark., 1997). Çalışmada incelenen aşım örneklerinde gözlenen nekrotik alanlar yok denecek kadar azdır. Aşım kombinasyonlarının 60. gün örneklerinde kalemde eski ksileme yakın dokularda nekrotik alanlar izlenmiştir. Nekrotik alan ISP 59/Şeftali kombinasyonunda anaç ve kalemin birleşme yüzeyi boyunca uzanmaktadır. Yine bu dönem örneklerinde anaç ve kalemde yeni ksilem elemanlarının oluştuğu görülmektedir. Aşılansım 3 ay sonra alınan enine kesitlerde tüm aşım kombinasyonlarında bir önceki döneme ilişkin dokusal gelişmelerin devam ettiği görülmektedir. Ferragnes/Şeftali kombinasyonu, vasküler farklılaşma bakımından ISP 57/Şeftali ve ISP 59/Şeftali kombinasyonlarına göre daha başarılı olduğu görülmektedir. Kambiyum tabakası ara ara kesilmekle birlikte devamlı görünüme sahip olmuştur. ISP 59/Şeftali kombinasyonuna ait fotoğraflarda görülen ve nekrotik alan izlenimi bırakan alanlar kesim hatalarından kaynaklanmakta olup dokusal anlamda ölü alanlar bulunmamaktadır. Başarılı bir aşım gelişiminde; anaç ve kalemin bağlanması, aşım ara yüzündeki kallus hücrelerinin çoğalması veya kallus köprüsünün oluşumu ve aşım ara yüzünde vasküler farklılaşmanın meydana gelmesi tipik olarak meydana gelen en önemli olaylardır (Hartmann ve ark., 1997). Buna karşın anaç ve kalem arasında vasküler bağlantının sağlanması durumunda bile, başarısız aşım kombinasyonları ortaya çıkabilmektedir (Moore, 1984). Aşılansım 4 ay sonra incelenen tüm aşım kombinasyonlarına ait enine kesitlerde, aşımalar arasında kallus köprüsünün kurulduğu, kambiyal farklılaşmaların devamlılık kazandığı tespit edilmiştir. İncelenen kesitlerde aşım kaynaşması yönünden herhangi bir olumsuzluğa rastlanmamıştır. Benzer bulgular Ünal (1992) tarafından, Nemaguard şeftali anacı üzerine aşılı Teksas badem çeşidinde de belirlenmiştir. Yine Tekintaş ve Dolgun (1996), badem anacı üzerine aşılı J.H. Hale ve Glohaven şeftali çeşitlerinde uyuşmazlığa neden olabilecek herhangi bir olumsuz gelişmenin olmadığını bildirmişlerdir. Aşım örneklerinde vasküler farklılaşmanın devam ettiği görülmektedir.

## SONUÇ

Uyuşmazlık, aşım başarısızlığının en önemli nedenleri arasında sayılmakla beraber, aşılansım sırasında yapılan hatalar, iklim koşulları, hastalık ve zararlılar gibi etmenler de aşım başarısını etkileyen faktörlerdir (Hartmanve ark., 1997). Aşım kombinasyonlarında, anaç ile kalem arasında kallus dokusunun oluşumu, kallus köprüsünün kurulması, nekrotik tabakaların durumu ve vasküler farklılaşma izlenerek kombinasyonun uyuşur ve uyuşmaz olacağı hakkında fikir sahibi olunabilmektedir. Sonuç olarak bu çalışmada incelenen her üç aşım kombinasyonunda aşılansım itibaren yapılan makroskobik ve mikroskobik incelemelerde aşım uyuşmazlığına yönelik herhangi belirtiye rastlanmamıştır. Zayıf aşım birleşmesi ve fidan gelişimi, aşım hataları ve bakım koşulları ile ilgili olmakla birlikte ıslah çalışmaları sonucu elde edilen anaç ve çeşitlerin uyuşma durumlarının uzun dönemde incelenmesi, anaç ve çeşitlerin başarılı bir şekilde kullanılabilmesi açısından gerekli olmaktadır.

**TEŞEKKÜR**

SDÜ BAP Birimi tarafından desteklenmiştir. Bu desteklerinden dolayı SDÜ BAP birimine teşekkür ederiz.

**Çıkar Çatışması**

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

**Yazar Katkısı**

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

**KAYNAKLAR**

- Abe LT, Lajolo FM, Genovese MI, 2010. Comparison of phenol content and antioxidant capacity of nuts. *Food Science and Technology*, 30: 254-259.
- Ahmad, Z, 2010. The uses and properties of almond oil. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 16: 10-12.
- Arranz S, Perez-Jimenez J, Saura-Calixto F, 2008. Antioxidant capacity of walnut (*Juglansregia* L.): contribution of oil and defatted matter. *European Food Research and Technology*, 227: 425-431.
- Beyhan Ö, Aktaş M, Yılmaz N, Şimşek N, Gerçekçiöğlü R, 2011. Determination of fatty acid composition of some important almond (*Prunus amygdalus* L.) varieties selected from Tokat province and eagean region of Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5: 4907-4911.
- Bolling BW, Dolnikowski G, Blumberg JB, Chen CYO, 2010. Polyphenol content and antioxidant activity of California almonds depend on cultivar and harvest year. *Food Chemistry*, 122: 819-825.
- Chandrasekara N, Shahidi F, 2011. Effect of roasting on phenolic content and antioxidant activities of whole cashew nuts, kernels, and testa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 5006-5014.
- Ermel FF, Kervella J, Catesson AM, Poessel JL, 1999. Localized graft incompatibility in pear/quince (*Pyrus communis*/*Cydonia oblonga*) combinations: Multivariate analysis of histological data from 5-month-old grafts. *Tree Physiology*, 19 (10), 645–654.
- Errea P, Treutter D, Feucht W, 1994. Characterization of flavanol-type polyphenols in apricot cultivar and rootstocks. *Advances in Horticultural Science*, 3: 165-169.
- Esfahlan AJ, Jamei R, 2012. Properties of biological activity of ten wild almond (*Prunus amygdalus* L.) species. *Turkish Journal of Biology*, 36: 201-209.
- Gerçekçiöğlü R, Bilginer Ş, Soylu A, 2008. Genel Meyvecilik, Ankara, Nobel Yayınları, No:1280, s. 480, Ankara-Türkiye.
- Hartmann HT, Kester DE, Davies FT, Geneve RL, 1997. Plant propagation principles and practices. Prentice Hall, 8: 417–425.
- Kankaya A, Özyiğit S, Tekintaş FE, Seferoğlu GH, 2001. Bazı erik ve kayısı çeşitlerinin Pixy anacı ile uyumlarının belirlenmesi. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 14-17, Ankara.
- Kırbaşlar FG, Turker G, Özsoy-Güneş Z, Ünal M, Dülger B, Ertaş E, Kızılkaya B, 2012. Evaluation of fatty acid composition, antioxidant and antimicrobial activity, mineral composition and calorie values of some nuts and seeds from Turkey. *Records of Natural Products*, 6: 339-349.
- Moore R, 1984. A model for graft compatibility-incompatibility in higher plants. *American Journal of Botany*, 71 (5), 752–758.
- Özçağırın R, 1974. Meyve Ağaçlarında Anaç ile Kalem Arasındaki Fizyolojik İlişkiler. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No:243, s.45, İzmir-Türkiye.

- Özçağırın R, Ünal A, Özeke E, İsfendiyaroğlu M, 2003. Ilıman İklim Meyveleri (Sert çekirdekli meyveler), Kiraz – Vişne. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 553, s. 159-225, İzmir-Türkiye.
- Soylu A, 1997. Ilıman İklim Meyveleri II. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Notları, No: 72, s. 245, Bursa-Türkiye.
- Tekintaş FE, Dolgun O, 1996. Badem çöğürlerine aşılı bazı şeftali ve nektarin çeşitlerinin uyuşma durumlarının incelenmesi üzerine bir araştırma. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 6(1):51-54.
- Ünal A, 1992. Şeftali Çöğür Anaçlarının Bazı Badem, Kayısı ve Erik Çeşitleriyle Oluşturduğu Aşı Kombinasyonlarında Aşı Yerlerinin Anatomik Yapısının Özellikleriyle İlgili Araştırma. I. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 13-16 Ekim 1992, İzmir- Türkiye.
- Ünal A, Özçağırın R, 1986. Göz aşısında aşı kaynamasının meydana gelişi üzerinde bir araştırma. Doğa Dergisi, 397-407.
- Venkatachalam M, Sathe SK, 2006. Chemical composition of selected edible nut seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 4705-4714.
- Vijeratne SSK, Abou-Zaid MM, Shahidi F, 2006. Antioxidant polyphenols in almond and its coproducts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54:312-318.
- Yada S, Lapsley K, Huang G, 2011. A review of Composition studies of cultivated almonds: macronutrients and micronutrients. Journal of Food Composition and Analysis, 24: 469-480.
- Yıldırım AN, 2007. Isparta Yöresi Bademlerinin (*P.amygdalus L.*) Seleksiyonu. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 168 s. Aydın.

**Atf İçin:** Yaralı Karakan F, Ergun Çetin B, 2022. Virüsten Ari Sarımsak Tohumluğu (*Allium sativum* L.) Üretiminde Meristem Kültürü: Besin Ortamı, Sıcaklık ve Kemoterapi Uygulamalarının Etkisi. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 30-40.

**To Cite:** Yaralı Karakan F, Ergun Cetin B, 2022. Meristem Culture in Production of Virus Free Garlic (*Allium sativum* L.): The Effect of Nutrient Medium, Thermotherapy and Chemotherapy. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 30-40.

## Virüsten Ari Sarımsak Tohumluğu (*Allium sativum* L.) Üretiminde Meristem Kültürü: Besin Ortamı, Sıcaklık ve Kemoterapi Uygulamalarının Etkisi

Faika YARALI KARAKAN<sup>1\*</sup> Berna ERGUN ÇETİN<sup>1</sup>

**ÖZET:** Sarımsak yetiştiriciliğinde verim ve kaliteyi etkileyen en önemli etmenlerinden biri olan ve kimyasal mücadelesi olmayan virüs hastalıkları, diğer hastalık etmenlerine göre daha yıkıcı sonuçlara neden olmaktadır. Genel olarak sarımsak viral kompleksi (GVC) olarak adlandırılan *Allexivirus*, *Potyvirus*, *Potexvirus*, *Carlavirus* ve *Tospovirus* cinslerine ait virüsler sarımsakta zarar yapmaktadır. Virüs hastalıklarının önlenmesinde en etkili yol virüslerin kontrol altına alınmasıdır. Bu amaçla virüsten ari sarımsak tohumluğu kullanılması başlangıç bulaşmasını engellediği için hastalığın yayılmasını da önleyebilmektedir. Virüssüz sarımsak bitkilerinin geleneksel agronomik sistemler aracılığıyla üretilmesi maliyetli ve zordur. Bu sorunların üstesinden gelmek için, *in vitro* koşullarda meristem kültürü yoluyla çoğaltılması, özellikle termoterapi ve kemoterapi gibi uygulamalarla birleştirildiğinde kısa sürede virüssüz sarımsak tohumluğu üretmek için umut verici bir yöntemdir. Bu çalışmada sarımsakta virüsten ari tohumluk üretiminde kullanılan meristem kültürünün uygulanışı, besin ortamının, kültür öncesi veya sırasında yapılan sıcaklık ve kemoterapi gibi ön uygulamaların etkileri incelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Sarımsak, *Allium sativum* L., Meristem kültürü, LYSV, OYDV

### Meristem Culture in Production of Virus Free Garlic (*Allium sativum* L.): The Effect of Nutrient Medium, Thermotherapy and Chemotherapy

**ABSTRACT:** Virus diseases, which are one of the most important factor affecting yield and quality in garlic cultivation and without chemical control, cause more devastating results than other disease factors. Viruses of the genus *Allexivirus*, *Potyvirus*, *Potexvirus*, *Carlavirus* and *Tospovirus* are problematic in garlic production and the viruses are collectively called as Garlic Viral Complex (GVC). The most effective way to prevent viral diseases is to control viruses. For this purpose, the use of virus-free garlic seeds can prevent the spread of the disease, as it prevents the initial contamination. Producing virus-free garlic plants through conventional agronomic systems is expensive and difficult. To overcome these problems, *in vitro* propagation of virus-free plants by meristem culture is a promising method to produce virus-free garlic in a short time, especially when combined with applications such as thermotherapy and chemotherapy. In this study, the application of meristem culture and the effects of pre-treatments used in the production of virus-free garlic, such as nutrient medium, thermotherapy and chemotherapy applied before or during the culture was investigated.

**Keywords:** Garlic, *Allium sativum* L., Meristem culture, LYSV, OYDV

<sup>1</sup>Faika YARALI KARAKAN ([Orcid ID: 0000-0002-2176-8663](https://orcid.org/0000-0002-2176-8663)), Berna ERGUN ÇETİN ([Orcid ID: 0000-0002-6399-0916](https://orcid.org/0000-0002-6399-0916)), Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Kilis, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Faika YARALI KARAKAN, e-mail: faikayarali@gmail.com

## GİRİŞ

*Alliaceae* familyası *Allium* cinsinde yer alan ve antik çağlardan beri insanoğlunun yetiştirdiği en eski kültür bitkilerinden biri olan sarımsak (*Allium sativum* L.), yemeklerde tatlandırıcı olarak kullanılmasının yanı sıra binlerce yıldır çeşitli hastalıkların tedavisinde de kullanılan bir tıbbi bitkidir (Avato ve ark., 1998; Akan, 2014; Petropoulos ve ark., 2018; Sehitoglu ve ark., 2018; Junior ve ark., 2020). Sarımsağın sağlık açısından başvurulan bir kaynak olması eşsiz aroması, allisin (allil2-propenethiosülfinat veya dialliltiyosülfinat), oligosakkaritler, uçucu yağlar, steroid glikozitler, antosiyaninler, flavonoidler, lektinler, prostaglandinler, pektin, adenosin ve vitaminler gibi tıbbi ve nutrasötik özelliklere biyoaktif bileşiklerden kaynaklanmaktadır (Muller ve ark. 2000; Tapiero ve ark., 2004; Lanzotti, 2006; Gimenez ve ark., 2016; Manjunathagowda ve ark., 2017; Akan ve Tuna Gunes, 2021).

Diploid ( $2n=16$ ) kromozom sayısına sahip olan sarımsak sterildir ve generatif yolla tohum meydana getiremez (Pooler ve Simons, 1993; Taskin ve ark., 2013; Ghaemizadeh ve ark. 2014; Pramesh ve Baranwal, 2015; Mahajan, 2016; Manjunathagowda ve ark., 2017). Bu nedenle sarımsak antik çağlardan beri vejetatif olarak dişlerle (klonal) çoğaltılmakta, böylelikle klonlar üreticiler ve toplayıcılar arasında sık sık değiştirilmektedir (Barandiaran ve ark., 1999; Beşirli ve ark., 1999; Roksana ve ark., 2002; Benke ve ark., 2018; Yulianingsih ve ark., 2019). Bu şekilde yapılan üretim klonlarda fenotipik varyasyonların yanı sıra farklı iklimlere adapte olabilen varyasyonların da ortaya çıkarmasının yanı sıra (Barandiaran ve ark., 1999), uzun süre tarlada muhafaza edilen sarımsaklarda, verim ve kalite kayıplarına (Jones ve Mann 1963; Rabinowitch 2004; Perotto ve ark., 2010; Ghaemizadeh ve ark., 2014; Debebe, 2017), vejetatif olarak bulaşan virüslerin çoğalmasına (Walkey ve Antill, 1989; Conci ve Nome, 1991; Conci ve ark., 2005; Parrano ve ark., 2012; Vieira ve ark., 2014, Gimenez ve ark., 2016) ve genotiplerin yok olmasına neden olmaktadır (Asha Devi ve ark., 2007).

Sarımsak yetiştiriciliğinde verim ve kaliteyi etkileyen en önemli hastalık etmenlerinden biri virüs hastalıklarıdır. Virüs hastalıklarının kimyasal mücadelesi olmadığı için diğer hastalık etmenlerine göre daha yıkıcı sonuçlara neden olmaktadır. Genel olarak sarımsak viral kompleksi (GVC) olarak adlandırılan *Allexivirus*, *Potyvirus*, *Potexvirus*, *Carlavirus* ve *Tospovirus* cinslerine ait on altı virüsün sarımsakta zarar yaptığı bildirilmiştir (Manjunathagowda ve ark., 2017). Bu virüsler sarımsak bitkilerinin yapraklarında mozaikleşme, kloritik çizgilenme, beneklenme, kıvrılma, bitki gelişiminde gerileme ve bodurlaşmaya bağlı olarak, küçük baş ve diş oluşumuna neden olduğundan üretimde kayıplara, ürünün kalitesinin ve pazar değerinin düşmesine neden olmaktadır (Conci ve Nome, 1991; Patena ve ark., 2005; Pramesh ve Baranwal, 2015; Gimenez ve ark., 2016; Ayed ve ark., 2018; Murkute ve Gawande, 2018; Yulianingsih ve ark., 2019). *Carlavirus* cinsinde yer alan *Garlic common latent virus* (GarCLV veya GCLV) ve *Shallot latent virus* (SLV), *Allexiviruses* cinsinde yer alan akarlar vasıtasıyla bulaşan mozik virüsleri ve *Potyvirus* cinsinde yer alan *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) ve *Leek yellow stripe virus*, (LYSV) sarımsakta yaklaşık % 40-60 oranında, *Allexiviruses* cinsinde yer alan virüslerin ise yaklaşık % 14-30 oranında verim kaybına sebep olabildikleri bildirilmiştir (Perez ve ark., 2006; Ghaemizadeh ve ark., 2014; Manjunathagowda ve ark., 2017). Bununla beraber Potyvirus ve Carlavirusların sarımsaklarda karışık enfeksiyon şeklinde kendini gösterdiği farklı çalışmalarla ortaya konmuştur (Pena-Iglesias ve Ayuso, 1983, Walkey ve ark., 1987; Bertaccini ve ark., 2004; Fidan, 2010; Taskin ve ark., 2013; Haque ve Hattori, 2017; Manjunathagowda ve ark., 2017).



Virüs hastalıklarının önlenmesinde en etkili yol virüslerin kontrol altına alınmasıdır. Bu amaçla virüsten ari sarımsak tohumluğu kullanılması başlangıç bulaşmasını engellediği için hastalığın yayılmasını da önleyebilmektedir (Yulianingsih ve ark., 2019). Virüssüz sarımsak bitkilerinin geleneksel agronomik sistemler aracılığıyla üretilmesi, viral vektörlerin olmadığı bir bölgede gerçekleştirilmesi gerektiğinden dolayı maliyetli ve zordur. Bu sorunların üstesinden gelmek için, virüssüz bitkilerin *in vitro* koşullarda çoğaltılması, özellikle termoterapi ve kemoterapi gibi uygulamalarla birleştirildiğinde kısa sürede virüssüz sarımsak tohumluğu üretmek için umut verici bir yöntemdir (Conci ve Nome, 1991; Robert ve ark., 1998; Roksana ve ark., 2002; Bertaccini ve ark., 2004; Pramesh ve Baranwal, 2015; Manjunathagowda ve ark., 2017; Yulianingsih ve ark., 2019). Yapılan çalışmalar meristem kültürünün *in vitro*'da virüsten ari bitki elde etmede diğer kültür şekillerinden daha başarılı olduğunu ortaya çıkartmıştır (Walkey ve ark., 1987; Verbeek ve ark., 1995; Robert ve ark., 1998; Taskin ve ark., 2013; Pramesh ve Baranwal, 2015; Gimenez ve ark., 2016; Haque ve Hattori, 2017; Manjunathagowda ve ark., 2017; Ayed ve ark., 2018; Murkute ve Gawande, 2018; Yulianingsih ve ark., 2019).

Bu çalışmada sarımsakta virüsten ari tohumluk üretiminde kullanılan meristem kültürünün uygulanaşı, besin ortamının, kültür öncesi veya sırasında yapılan sıcaklık (termoterapi) ve kemoterapi gibi ön uygulamaların etkileri incelenmiştir.

### Meristem Kültürü

Meristem kültürü, vejetatif olarak çoğaltılan türlerde virüsten ari bitki elde etmede oldukça yaygın kullanılan *in vitro* bir tekniktir. Meristem kültürü yoluyla virüs eliminasyonunun temeli, virüslerden daha hızlı bölünme yeteneğine sahip olan meristematik hücrelerin virüs içermemesine dayanmakta, böylece bu yolla meydana gelen bitkiler de virüslerden ari olmaktadır (Manjunathagowda ve ark., 2017). Meristem kültürü, meristem izolasyonu, besin ortamı ve *in vitro* kültürden önce/sonra yapılan uygulamalar gibi aşamalardan oluşmaktadır (Nome ve ark., 1981; Ghaemizadeh ve ark., 2014; Pramesh ve ark., 2015). Sarımsakta meristematik dokulardan ilk bitkiler Messiaen ve ark., (1970) tarafından elde edilmiştir.

Meristemlerin izole edileceği sarımsak dişlerinin ve meristematik dokuları içeren eksplantların sterilizasyonunda araştırmacılar tarafından farklı yöntemler uygulanmaktadır. Bu yöntemler Çizelge 1'de verilmiştir. Meristemler, sterilizasyon işlemi tamamlanan dişlerden steril kabin içerisinde binoküler mikroskop altında bistüri yardımıyla izole edilmektedir (Verbeek ve ark., 1995; Taskin ve ark., 2013). Meristem kültürü yoluyla bitki rejenerasyonu, meristemin boyutu ile yakından ilgili olup, elde edilen virüsten ari bitki oranı, izole edilen meristemin büyüklüğü ile ters orantılıdır. Bu nedenle meristem kültürü çalışmalarında genellikle bir, iki veya üç yaprak primordiyumuna sahip (Verbeek ve ark., 1995; Bruna, 1997; Robert ve ark., 1998), 0.1 mm (Manjunathagowda ve ark., 2017) ile 0.3- 0.8 mm (Walkey ve ark., 1987; Haque ve ark., 2003; Zahedi ve ark., 2010; Pramesh ve Baranwal, 2015; Gimenez ve ark., 2016) çapındaki meristem eksplantları kullanılmaktadır. İzole edilen meristemler sürgün gelişimi için, steril koşullarda besin ortamıyla doldurulmuş tüplere aktarılarak; sıcaklığı, ışık yoğunluğu ve gün uzunluğu ayarlanmış iklim odalarında kültüre alınmaktadır (Şekil 1). İklim odalarının sıcaklığı 23±2 °C (Robert ve ark., 1998; Walkey ve ark., 1987), 24 °C (Manjunathagowda ve ark., 2017), 25 °C (Conci ve Nome, 1991; Verbeek ve ark., 1995; Taskin ve ark., 2013; Debebe, 2017), 25 ± 2°C (Roksana ve ark., 2002; Pramesh ve Baranwal, 2015) arasında değişirken; ışık yoğunluğu 40 Wm<sup>-2</sup> (Walkey ve ark., 1987), 1500 lüks (Verbeek ve ark., 1995), 2000-3000 lüks (Roksana ve ark., 2002; Taskin ve ark., 2013), 3500 lüks (Bertaccini ve ark., 2004), 5000 lüks (Conci ve Nome, 1991), 16000 lüks (Manjunathagowda ve ark., 2017), 35 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Pramesh ve

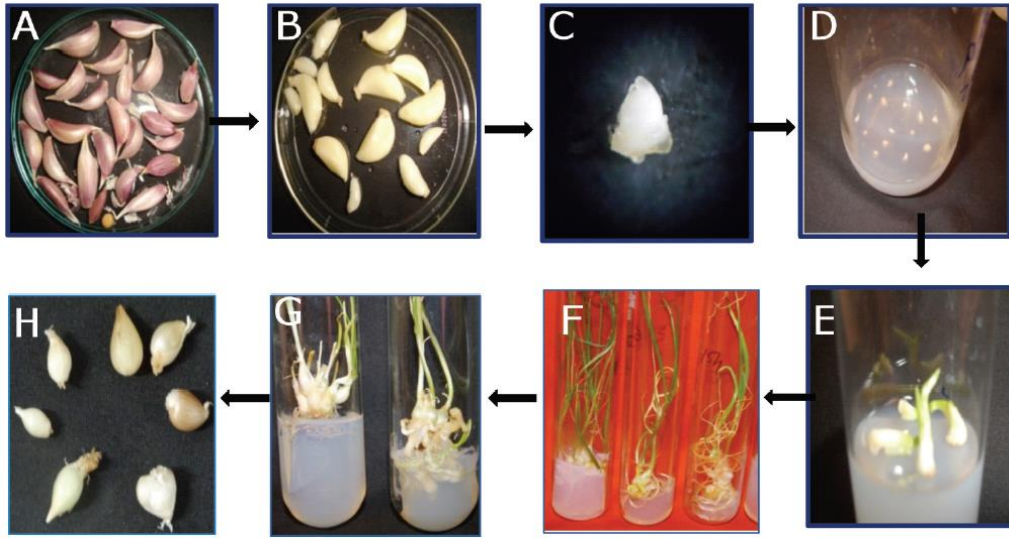
Baranwal, 2015), 46-55  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Robert ve ark., 1998); fotoperiyot ise 16/8 saat (Walkey ve ark., 1987; Moriconi ve ark., 1990; Conci ve Nome, 1991; Verbeek ve ark., 1995; Robert ve ark., 1998; Taskin ve ark., 2013; Pramesh ve Baranwal, 2015; Debebe, 2017), 14/16 saat (Roksana ve ark., 2002) ve 18/6 saat (Manjunathagowda ve ark., 2017) arasında değişmektedir.

Kültürün başlatılmasından 6-8 hafta sonra bitkicikler ortaya çıkmaya başlamaktadır (Conci ve Nome, 1991). Meristemlerden gelişen *in vitro* bitkilerde yapılan virüs testleriyle kültürün başarısı belirlenmektedir.

Meristem kültürü yoluyla elde edilen bitkilerin dış ortam koşullarına alıştırmalarında steril toprak veya toprak/kum karışımı ile doldurulmuş saksı veya polietilen torbalar kullanılmakta, gerekli tüm kültürel işlemlerin yapılacağı büyütme odalarına, sera veya tarla koşullarına transfer edilen ve dış ortam koşullarına alıştıran bitkilerin hayatta kalma oranları gözlemlenmektedir (Roksana ve ark., 2002; Kim ve ark., 2006a). Yapılan çalışmalarda *in vitro* bitkilerin dış ortam koşullarında büyümelerini sürdürmeleri ve canlı kalmaları üzerinde baş büyüklüğünün etkili olduğu, baş büyüklüğü 5 mm'den büyük olan bitkilerin 8 haftalık kültürden sonra % 80 oranında canlılığını sürdürdüğü bildirilmiştir (Kim ve ark., 2006a).

### Çizelge 1. Meristem kültüründe kullanılan sterilizasyon yöntemleri.

Sarımsak dışlerinin sterilizasyonu	Kaynak
%25'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 15 dakika bekletilerek ardından 4-5 defa steril su ile yıkanır.	(Kurul, 2010)
%25'lik sodyum hipoklorit içerisinde 20 dakika bekletildikten sonra 4-5 kez steril su ile yıkanır.	(Taskin ve ark., 2013)
%70'lik etil alkole daldırıldıktan sonra birkaç damla Twin-80 içeren %2.4'lük sodyum hipoklorit çözeltisinde bekletilerek 3 defa steril su ile yıkanır.	(Robert ve ark., 1998)
%70'lik etil alkol içerisinde 10 saniye tutulduktan sonra %1.5'lik sodyum hipoklorit çözeltisi içerisinde 15 dakika bekletilerek 5'er dakika boyunca iki defa steril sudan geçirilir.	(Verbeek ve ark., 1995)
%2'lik sodyum hipoklorit çözeltisi içerisinde 20 dakika bekletildikten sonra üç defa steril su ile yıkanır.	(Debebe, 2017)
%95'lik etil alkolde 30 saniye bekletilir.	(Roksana ve ark., 2002)
%70'lik etil alkol içerisinde 30 saniye tutulduktan sonra 2 damla/100 ml Twin-20 içeren %2'lik sodyum hipoklorit çözeltisi içerisinde 20 dakika bekletilerek en az iki dakika boyunca üç defa steril sudan geçirilir.	(Haque ve ark., 2003)
Musluk suyu altında 30 dakika yıkandıktan sonra 10 dakika boyunca %0.2 (v/v) Tween-20 içeren %2 (v/v) sodyum hipoklorit çözeltisi içerisinde bekletilerek distile su ile beş defa yıkanır.	(Pramesh ve Baranwal, 2015)
<b>Meristematik kısımları içeren eksplantlarının sterilizasyonu</b>	
Meristemler %70'lik etil alkol çözeltisinde 1 dakika bekletildikten sonra, 20 dakika boyunca NaOCl içerisinde tutulur.	(Conci ve Nome, 1991)
%70'lik etanol içerisinde 1 dakika %0,5 aktif klor içeren sodyum hipoklorit çözeltisi içerisinde 20 dakika bekletilir.	(Gimenez ve ark., 2016)
3-4 mm büyüklüğündeki meristem eksplantları %70'lik etanolde 1 dakika bekletilir.	(Pramesh ve Baranwal, 2015)



**Şekil 1.** Meristem kültürünün aşamaları: A-B: Meristemlerin izole edileceği sarımsak dişleri, C: İzole edilen meristem, D: Sürgün oluşumu, E: Sürgün gelişimi, F: Köklenme, G: Baş oluşumu, H: Mikro başlar (Pramesh ve Baranwal, 2015).

### Meristem Kültürü Üzerine Etki Eden Faktörler

#### Besin ortamının bileşimi

Meristem kültürü ile ilgili yapılan çalışmalarda genellikle MS (Murashige ve Skoog, 1962), B<sub>5</sub> (Gamborg ve ark., 1968), BDS (Dunstan ve Short, 1977) ve LS (Linsmaier ve Skoog, 1965) besin ortamları ve bu ortamların modifiye edilmiş şekilleri kullanılmaktadır (Walkey ve ark., 1987; Verbeek ve ark., 1995; Bruna, 1997; Peiwen ve ark., 1997; Roksana ve ark., 2002; Kim ve ark., 2006b; Luciani ve ark., 2006; Haque ve Hattori 2017; Manjunathagowda ve ark., 2017). Çizelge 2’de sarımsakta yapılan meristem kültürü çalışmalarında kullanılan besin ortamları ve büyümeyi düzenleyici maddeler görülmektedir. Besin ortamına ilave edilen büyümeyi düzenleyici maddeler ve çeşitli kimyasalların sarımsakta yapılan meristem kültürü çalışmalarında sürgün ve baş oluşturma üzerine olumlu etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Bu maddeler besin ortamına tek başlarına ilave edilebileceği gibi kombinasyonlar halinde de kullanılabilir. İndüksiyon ortamında oksin ve sitokinlerin birlikte kullanılması, çoğaltma ortamındaki sürgün gelişimini de etkilemektedir (Robert ve ark., 1998). Bunun yanı sıra özellikle kinetin, IBA ve GA<sub>3</sub> çoğaltma oranının korunmasında da etkilidir (Pei-Wen ve ark., 2000). Besin ortamlarına ilave edilen oksin-sitokin kombinasyonlarının, sitokinlerin tek başına kullanıldığı besin ortamlarına göre daha başarılı olduğu bildirilse de sitokinlerin ve oksinlerin tek başlarına kullanılmasının da meristemden bitki gelişimini sağlamada etkili olduğu yapılan çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır (Verbeek ve ark., 1995; Roksana ve ark., 2002). Nitekim; meristemden bitki rejenerasyonu için en iyi ortamın 2 mg L<sup>-1</sup> BA, 0.5 mg L<sup>-1</sup> IBA içeren MS ortamı olduğu (Taskin ve ark., 2013), besin ortamına ilave edilen 2,4-D’nin eksplantlarda kallus oluşumunu artırdığı (Luciani ve ark., 2006), 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA ve 0.1- 0.5 mg L<sup>-1</sup> BA’nın farklılaşma, bitki gelişimi ve yaprak sayısı üzerine olumlu etkide bulunduğu (Zahedi ve ark., 2010) bildirilmiştir. Bu bulguların aksine, büyümeyi düzenleyici maddelerin meristemden sürgün gelişimi üzerine etkisinin olmadığı ve en yüksek rejenerasyon oranının büyümeyi düzenleyici madde içermeyen ortamdan elde edildiği de rapor edilmiştir (Haque ve ark., 2003). Besin ortamının katı veya sıvı oluşu da sürgün gelişimi üzerine etki etmektedir. Bu amaçla Roksana ve ark., (2002) tarafından yapılan çalışmada, sıvı ortamda sürgün gelişiminin daha erken başladığı; sıvı ortamlar arasında en hızlı sürgün gelişiminin 0.5 mg L<sup>-1</sup> 2iP ve 0.25 mg L<sup>-1</sup> NAA içeren ortamdan elde edildiği tespit edilmiştir.

Besin ortamında karbon kaynağı olarak genellikle sakkarozun % 3'lük dozunun kültürün başarısında etkili olduğu bildirilmiştir (Verbeek ve ark., 1995; Roksana ve ark., 2002; Taskin ve ark., 2013; Pramesh ve Baranwal, 2015; Manjunathgowda ve ark., 2021).

Besin ortamının pH'sı ortamda bulunan tuzların çözünürlüğü, enzim ve katalizör aktivitesi dolayısıyla ortamdaki besin maddelerinin ve büyümeyi düzenleyici maddelerin eksplant tarafından kullanılması üzerine etki yapmaktadır (Yaralı ve Yanmaz, 2013). Sarımsakta meristem kültürü ile ilgili yapılan çalışmalarda besin ortamının pH değerinin 5.7 ile 6.2 arasında olması gerektiği bildirilmiştir (Walkey ve ark., 1987; Verbeek ve ark., 1995; Roksana ve ark., 2002; Pramesh ve Baranwal, 2015).

**Çizelge 2.** Sarımsakta meristem kültüründe kullanılan besin ortamları ve büyümeyi düzenleyici maddeler

Besin ortamı	Büyümeyi düzenleyici maddeler	Kaynak
B5	Hormonsuz	(Walkey ve ark., 1987)
	3 mg L <sup>-1</sup> 6-BA, 0.1 mg L <sup>-1</sup> NAA, 0.5 mg L <sup>-1</sup> Kinetin	(Peiwen ve ark., 1997)
	0.5 mg L <sup>-1</sup> 2iP, 0.1 mg L <sup>-1</sup> NAA	(Barandiaran ve ark., 1999)
BDS	0.045 µM 2,4-D, 0.045 µM BA	(Luciani ve ark., 2006)
LS	0.2 mg L <sup>-1</sup> NAA, 5 mg L <sup>-1</sup> 2-iP	(Kim ve ark., 2006a- 2006b)
	0.1 mg L <sup>-1</sup> NAA, 0.1 mg L <sup>-1</sup> Kinetin	(Moriconi ve ark., 1990)
MS	3.0 mg L <sup>-1</sup> 2-iP ve 0.3 mg L <sup>-1</sup> α-NAA	(Conci ve Nome, 1991)
	0.1 mg L <sup>-1</sup> IAA, 0.1 mg L <sup>-1</sup> Kinetin	(Choi ve ark., 1992)
	0.5 mg L <sup>-1</sup> IAA, 5 mg L <sup>-1</sup> BA	(Yasseen ve ark., 1994)
	0.5 mg L <sup>-1</sup> IAA, 10 mg L <sup>-1</sup> BA	(Verbeek ve ark., 1995)
	0.1 µM NAA, 8 µM BA, 0.1 µM NAA	(Robert ve ark., 1998)
	2.5 mg mL <sup>-1</sup> Kinetin, 2.5 mg mL <sup>-1</sup> BA, 2.5 mg mL <sup>-1</sup> 2-iP	(Torres ve ark., 2000)
	1 µM IAA ve 1 µM BA	(Roksana ve ark., 2002)
	0.1 mg L <sup>-1</sup> 2-iP, 0.1 mg L <sup>-1</sup> IBA	(Haque ve ark., 2003)
	0.5 mg L <sup>-1</sup> 2iP ve 0.25 mg L <sup>-1</sup> NAA	(Bertaccini ve ark., 2004)
	1 FM NAA, 10 FM BA	(Zahedi ve ark., 2010)
	0.1 mg L <sup>-1</sup> NAA, 0.5 mg L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub> , 0.5 mg L <sup>-1</sup> TDZ	(Taskin ve ark., 2013)
	0.1 mg L <sup>-1</sup> NAA, 0.1-0.5 mg L <sup>-1</sup> BA	(Gull ve ark., 2014)
	2 mg L <sup>-1</sup> BA, 0.5 mg L <sup>-1</sup> IBA	(Pramesh ve Baranwal, 2015)
	1.5 mg L <sup>-1</sup> Kinetin	(Haque ve Hattori 2017)
	0.4 mg L <sup>-1</sup> Kinetin, 2 mg L <sup>-1</sup> IAA	(Benke ve ark., 2018)
1.0 µM NAA ve 10.0 µM BA	(Murkute ve Gawande, 2018)	
0,5 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D, 0.1 mg L <sup>-1</sup> BAP	(Karjadi ve Gunaeni, 2021)	
1 mg L <sup>-1</sup> Kinetin, 0.1 mg L <sup>-1</sup> NAA	(Manjunathgowda ve ark., 2021)	
2 mg L <sup>-1</sup> IAA, 2 mg L <sup>-1</sup> Kinetin, 0.012 mg L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub>		
0.1 mg L <sup>-1</sup> NAA, 1 mg L <sup>-1</sup> BAP		

### Sıcaklık (termoterapi) uygulamaları

Virüs eliminasyonun etkinliğini arttırmak ve virüsten ari bitki materyali elde etmek için meristem kültürü ile birlikte termoterapi uygulamaları da kullanılmaktadır. Termoterapi uygulamalarıyla virüs eliminasyonunun etkinliği sıcaklığa ve uygulama süresine bağlı olarak değişmektedir. Örneğin; Bruna (1997), tarafından yapılan bir araştırmada elde edilen canlı bitki yüzdesinin termoterapi uygulanan gün sayısına bağlı olarak değiştiği; 48 günlük uygulamada % 95 olan canlı bitki oranının, 75 günlük uygulama sonunda % 62'ye kadar düştüğü bildirmiştir. Yapılan araştırmalarda 37 °C'de 35 gün yapılan termoterapi uygulamasıyla % 90 (Torres ve ark., 2000), 38 °C'de 21 günlük uygulamada % 85, 60 günlük uygulamada %84 (Walkey ve ark., 1987; Debebe, 2017), 36 °C'de 36 gün yapılan uygulamada % 90 (Ghaemizadeh ve ark., 2014) ve 33 °C'de yapılan 25 günlük uygulamada ise %50 oranında virüs eliminasyonunun sağlandığı bildirilmiştir.

Termoterapi uygulamalarının etkinliğinin sarımsak genotipine bağlı olarak da değişiklik gösterdiğini bildiren Zahedi ve ark., (2010), İran ticari sarımsak popülasyonunda yaptıkları çalışmada,

termoterapi uygulamasının başarı yüzdesinin çeşitlere göre % 73 ve % 61 arasında değiştiğini tespit etmişlerdir.

Yüksek sıcaklıkta yapılan uzun süreli uygulamalar virüs eliminasyonu için daha faydalı olmasına rağmen, uzun süre yüksek sıcaklığa maruz kalan eksplantlarda sürgün rejenerasyonunda ve bunu takiben canlı bitki elde etmede olumsuzluklar yaşanabilmektedir (Ghaemizadeh ve ark., 2014). Uygulama sıcaklığının yükseltilmesinin olumsuz sonuçlar verdiğini ifade eden Conci ve Nome (1991), 50 °C'de 5, 15, 20 dakika boyunca yapılan termoterapi uygulamalarının meristemlerden sürgün gelişimini azalttığını, 55 °C'de 10 dakikadan uzun süren uygulamaların sürgün gelişimine engel olduğunu ve 36 °C'de uzun süreli (60 gün) termoterapi uygulamasının ise canlı bitki sayısını azalttığını bildirmiştir. Benzer sonuçlara ulaşılan başka bir çalışmada da, sürgün rejenerasyonun termoterapi uygulamasıyla azaldığı, termoterapi uygulanmayan bitkilerde eksplant başına 9.3 olarak belirlenen sürgün sayısının termoterapi uygulanan bitkilerde 1.0- 2.2 arasında değiştiği ortaya çıkartılmıştır (Robert ve ark., 1998). Yulianingsih ve ark. (2019), tarafından yapılan çalışmada ise, 4 hafta süre ile 25 °C, 28 °C ve 31 °C sıcaklıkta yapılan termoterapi uygulamalarının etkili olmadığı, GCLV'nin termoterapiden sonra mikro sürgünlerde % 64 ile % 91 oranında tespit edildiği bildirilmiştir.

### **Kemoterapi uygulamaları**

Meristem kültürü yoluyla virüssüz bitki elde edebilmek amacıyla başvurulmuş kemoterapi uygulamaları ile ilgili çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Kemoterapi uygulamalarının etkinliğinin sarımsak genotipleri arasında farklılık gösterdiği ve virüs eliminasyonun 25 mg L<sup>-1</sup> ribavirin uygulamasıyla başarıyla gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Kudelkova ve ark., 2016). Bertaccini ve ark., (2004), tarafından yapılan çalışmada ise besin ortamına ilave edilerek uygulanan ribozom önleyici proteinlerin (RIP) PAP-II virüs eliminasyonunda % 100 başarı sağladığı tespit edilmiştir.

### **SONUÇ**

Sarımsak yetiştiriciliğinde verim ve kaliteyi etkileyen en önemli hastalık etmenleri arasında olan ve kimyasal mücadelesi olmayan virüs hastalıkları diğer hastalık etmenlerine göre daha yıkıcı sonuçlar ortaya çıkartmaktadır. Bu virüsler üretimde meydana gelen kayıpların yanı sıra, ürünün kalitesinin ve pazar değerinin de düşmesine neden olmaktadır. Virüs hastalıklarının önlenmesinde en etkili yol virüslerin kontrol altına alınmasıdır. Bu amaçla kullanılan ve *in vitro* bir teknik olan meristem kültürü, laboratuvar koşullarında virüsten ari sarımsak tohumluğu üretiminde ümitvar görülmektedir. Yapılan araştırmalar meristem kültürü ile üretilen virüssüz sarımsak klonlarının daha kaliteli ve daha yüksek verim değerine sahip olduğunu ortaya çıkartmıştır. Meristem kültüründe en fazla tercih edilen besin ortamı MS besin ortamıdır. Oksin, sitokin ve gibberellinler gibi büyümeyi düzenleyici maddeler *in vitro*'da sürgün ve baş oluşumunu teşvik etmek amacıyla besin ortamlarına tek başlarına veya kombinasyonlar halinde eklenmektedir. Virüs eliminasyonunun etkinliğini artırmak amacıyla meristem kültürü ile birlikte termoterapi ve kemoterapi uygulamaları da kullanılmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda ve uzun süreli uygulamalar virüs eliminasyonu için daha faydalı olmasına rağmen, uzun süre yüksek sıcaklığa maruz kalan eksplantlarda sürgün rejenerasyonunda ve bunu takiben canlı bitki elde etmede olumsuzluklar yaşandığı çeşitli araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir. Kemoterapi uygulamalarında ise ribavirin ve ribozom önleyici proteinlerin virüs eliminasyonu üzerinde etkisi başarılı bulunmuştur. Bu çalışma, ekonomik değeri yüksek sebze türlerinden biri olan sarımsakta, virüsten ari tohumluk elde etmede yaygın olarak kullanılan meristem kültürü çalışmalarında araştırmacılara yol gösterici nitelik taşımaktadır.

### **Çıkar Çatışması**

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

### Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

### KAYNAKLAR

- Akan S, 2014. Sarımsak Tüketiminin İnsan Sağlığına Yararları. Akademik Gıda Dergisi, 12(2): 95-100.
- Akan S, Tuna Gunes N, 2021. Potential Effects of Storage Period, Warehouse Locations, and Methyl Jasmonate in Long-Term Stored Garlic Bulbs. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 45(1): 79-90.
- Asha Devi A, Khar A, Lawande KE, 2007. Genotypic Response of Short Day Garlic (*Allium sativum* L.) Accessions to Shoot Multiplication. Journal of Spices and Aromatic Crops, 16: 15-21.
- Avato P, Miccolis V, Tursi F, 1998. Agronomic Evaluation and Essential Oil Content of Garlic (*Allium Sativum* L.) Ecotypes Grown in Southern Italy. Advances in Horticultural Science, 12: 201-204.
- Ayed C, Bayoudh C, Rhimi A, Mezghani N, Haouala F, Dridi BAM, 2018. *In Vitro* Propagation of Tunisian Local Garlic (*Allium Sativum* L.) from Shoot-Tip Culture. Journal of Horticulture and Postharvest Research, 1(2):75-86.
- Barandiaran X, Martin N, Alba C, Rodriguez-Conde MF, Pietro AD, Martin J, 1999. An Efficient Method for The *In Vitro* Management of Multiple Garlic Accessions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 35: 466-469.
- Benke AP, Shelke P, Mahajan V, 2018. Three Step Protocol for Regeneration of Plantlets in Indian Garlic Varieties Using Root Meristem. Indian Journal of Agricultural Research, 52(1): 66-70.
- Bertaccini A, Botti S, Tabanelli D, Dradi G, Fogher C, Previati A, Dare F, 2004. Micropropagation and Establishment of Mite-Borne Virus-Free Garlic (*Allium sativum*), Proc. XXVI IHC-Transplant Production and Stand Establishment, Eds. S. Nicola, J. Nowak and C.S. Vavrina, Acta Hort. 631, ISHS.
- Beşirli G, Yanmaz R, Güçlü D, 1999. Sarımsak Yetiştiriciliğinde Diş İriliğinin Baş İriliği ve Verime Etkisi, Türkiye III. Bahçe Bitkileri Kongresi, 08-12 Eylül 2003, Ankara.
- Bruna A, 1997. Effect of Thermotherapy and Meristem-Tip Culture on Production of Virus-Free Garlic in Chile. Acta Horticulture, 433: 631-634.
- Choi SY, Oh JY, Kim JS, Lim JH, Choi DJ, Lee SB, Choi DU, 1992. Meristem Culture of Garlic (*Allium Sativum* L.) Effects of Growth Regulators Through *In Vitro* Multi-Propagation of Garlic (*Allium sativum*). Research Reports of The Rural Development Administration (Korea Republic), 34 (2): 24-29.
- Conci VC, Nome SF, 1991. Virus Free Garlic (*Allium sativum* L.) Plants Obtained by Thermotherapy and Meristem Tip Culture. Journal of Phytopathology, 132: 186-192.
- Conci VC, Perotto MC, Cafrune E, Lunello P, 2005. Programme for Intensive Production of Virus-Free Garlic Plants. The IVth International Symposium on Edible *Alliaceae* (Ganggsu, L., Ed.). Acta Horticulturae, 688: 195-200.
- Debebe A, 2017. Comparison of Meristem Culture and Heat Therapy to Clean Garlic (*Allium Sativum* L.) Infecting Virus In Ethiopia. Ethiopian Journal of Agricultural Sciences, 27(3): 1-8.

- Dunstan DI, Short KC, 1977. Improved Growth of Tissue Cultures of The Onion, *Allium cepa*. *Physiol Plant*, 41: 70-72.
- Fidan H, 2010. Sarımsak, Soğan ve Pırasadaki Virüs Hastalıklarının Saptanması ve Taşköprü 56 Sarımsak Tipinin En Yaygın Virüse Karşı Reaksiyonunun Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi, Doktora Tezi.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K, 1968. Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. *Experimental Cell Research*, 50: 151-158.
- Ghaemizadeh F, Dashti F, Khodakaramian G, Sarikhani H, 2014. Combination of Stem-Disc Dome Culture and Thermotherapy to Eliminate Allexiviruses and *Onion Yellow Dwarf Virus* from Garlic (*Allium sativum* cv. Hamedan). *Arch Phytopathol Plant Protect*, 47: 499-507.
- Gimenez MD, Yanez-Santoz AN, Paz RC, Quiroga MP, Marfil CF, Conci VC, Garcia-Lampasona SC, 2016. Assessment of Genetic and Epigenetic Changes in Virus-Free Garlic (*Allium Sativum* L.) Plants Obtained by Meristem Culture Followed by *In Vitro* Propagation, *Plant Cell Reports*, 35: 129-141.
- Gull I, Noreen A, Aslan MS, Athar MA, 2014. Comparative Effect of Different Pythohormones on The Micropropagation of *Allium Sativum*. *Pakistan Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 47(1-2): 121-124.
- Haque MS, Hattori K, 2017. Detection of Viruses of Bangladeshi and Japanese Garlic and Their Elimination Through Root Meristem Culture. *Progressive Agriculture*, 28(2): 55-63.
- Haque MS, Wada T, Hattori K, 2003. Shoot Regeneration and Bulblet Formation from Shoot and Root Meristem of Garlic Cv Bangladesh Local. *Asian Journal of Plant Sciences*, 2(1): 23-27.
- Jones HA, Mann LK, 1963. *Onions and Their Allies*, 285, Leonard Hill, London.
- Junior PSPC, Cardosa FP, Martins AD, Buttros VHT, Pasqual M, Dias DR, Schwan JD, 2020. Endophytic Bacteria of Garlic Roots Promote Growth of Micropropagated Meristems. *Microbiological Research*, 241: 126585.
- Karjadi AK, Gunaeni N, 2021. The Influence of Variety and Explant Size on Garlic (*Allium Sativum* L) Proliferation Using Murashige and Skoog Media. *Earth and Environmental Science*, 653: 012-062.
- Kim KS, Jang YS, Nam SS, Choi IH, Bang JK, 2006a. Multiple Shoot Regeneration and Bulblet Formation Through Meristem Culture of Garlic (*Allium sativum* L.) 'Godang'. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*, 24(1): 37-42.
- Kim KS, Song YS, Jang YS, Nam SS, Choi IH, Bang JK, 2006b. Production of Virus-free Bulblets of Garlic (*Allium sativum* L.) by Meristem-Tip Culture of Immature Vegetative Bulbils. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*, 24(4): 441-446.
- Kudelkova M, Ondruikova E, Saskova H, 2016. Elimination of *Garlic Common Latent Virus* by Meristem Culture and Chemotherapy. *Acta Horticulture*, 1113: 233-238.
- Kurul M, 2010. Sarımsakların Meristem Kültürü ile Çoğaltılması ve Virüsten Arınmadaki Etkinliğinin Real-Time PCR ile Belirlenmesi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ABD, Yüksek Lisans Tezi.
- Lanzotti V, 2006. The Analysis of Onion and Garlic. *Journal of Chromatography A*, 1112: 3-22.
- Linsmaier EM, Skoog F, 1965. Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 18: 100-127.

- Luciani GF, Mary AK, Pellegrini C, Curvetto NR, 2006. Effects of Explants and Growth Regulators in Garlic Callus Formation and Plant Regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 87:139-143.
- Mahajan R, 2016. *In Vitro* and Cryopreservation Techniques for Conservation of Snow Mountain Garlic. In *Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants*, (Jain SM ed.). Humana Press, p: 335-346, New York.
- Manjunathagowda DC, J Gopal Archana R, Asiya KR, 2017. Virus-Free Seed Production of Garlic (*Allium sativum* L.): Status and Prospects. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(6): 2446-2456.
- Manjunathagowda DC, Jayaswalla K, Singha M, Sagarb R, Chaturvedib P, Janhavic V, 2021. Thermotherapy of Cloves for *In-Vitro* Mericlone Production for Healthy and Sustainable Management of Garlic (*Allium Sativum* L) Germplasm. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 20(1): 1-5.
- Messiaen CM, Marrov J, Quiot JB, Leclant F, Leroux JP, 1970. Etude Dans Le Sud-Est De La France D' Un Schéma De Sélection Sanitaire De L' Ail Et De L' Échalote. *Comptes Rendus De La 7 Conf. De Pathologie Des Plantes*. C.N.R.A. Montfavet, France. (13) (PDF) Biotechnological Tools For Garlic Propagation And Improvement, 101-103.
- Moriconi DN, Conci VC, Nome SF, 1990. Rapid Multiplication of Garlic (*Allium sativum* L.) *In Vitro*. *Phyton*, Buenos Aires, 51(2): 145-151.
- Muller NTG, Fortes GRL, Nascimento GC, Daniels J, 2000. Meristem Isolation of Garlic (*Allium sativum* L.) Cultivars Sao Marcos and Sao Valentim. *Hortscience*, 35(3): 449.
- Murashige T, Skoog F, 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay With Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Murkute AA, Gawande SJ, 2018. Production of Virus Free Planting Material Through Meristem Culture in Short Day Garlic Cultivars Bhima Omkar and Bhima Purple. *Journal of Environmental Biology*, 39: 286-290.
- Nome SF, Abril A, Racca R 1981. Obtaining Virus-Free Garlic (*Allium sativum* L.) Plants by Apical Meristem Culture. *Phyton* (Buenos Aires), 41(1/2):139-151.
- Parrano L, Afunian M, Pagliaccia D, Douhan G, Vidalakis G, 2012. Characterization of Viruses Associated with Garlic Plants Propagate from Different Reproductive Tissues From Italy and Other Geographic Regions. *Phytopathologia Mediterranea*, 51: 549-565.
- Patena LF, Dolores L M, Bariring1 AL, Alcachupas AL, Laude NP, Barg E, Green SK, Barba R, 2005. Improved Technique for Virus Elimination in and Production of Certified Planting Materials of Garlic (*Allium sativum* L.). *Proc. IS on Hort. in Asian-Pacific Region, Acta Hort.*, 694.
- Pei-Wen PX, Srinives P, Liang YC, 2000. Rapid Multiplication of Virus-Free Garlic by Inflorescence Meristem Culture and Induction of Multi-Bulbils. *Thai Journal of Agricultural Science*, 33 (1/2): 11-20.
- Pena-Iglesias A, Ayuso P, 1983. Characterisation of Spanish Garlic Viruses and Their Elimination By *In Vitro* Shoot Apex Culture. *Acta Horticulture*, 127: 183-193.
- Perez ML, Cordova RZ, Barboza CE, Ramirez MR, Ramirez LJ, Ruiz CS, Silva RL, 2006. First Report of Leek Yellow Stripe Virus in Garlic in The State of Guanajuato, Mexico. *Plant Disease*, 90: 1458-1458.
- Perotto MC, Cafrune EE, Conci VC, 2010. The Effect of Additional Viral Infections on Garlic Plants Initially Infected With Alexiviruses. *European Journal of Plant Pathology*, 126: 489-495.



- Petropoulos SA, Fernandes A, Ntatsi G, Petrotos K, Barros L, Ferreira CFR, 2018. Nutritional Value, Chemical Characterization and Bulb Morphology of Greek Garlic Landraces. *Molekules*, 23(319): 1-14.
- Pooler MR, Simon PW, 1993. Garlic Flowering in Response to Clone, Photoperiod, Growth Temperature and Cold Storage. *Horticultural Science*, 28: 1085-1086.
- Pramesh D, Baranwal VK, 2015. Production of Virus-Free Garlic (*Allium sativum* L.) Through Meristem Tip Culture After Solar or Hot Air Treatment of Cloves. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 90(2): 180-186.
- Rabinowitch HD, 2004. Fertility Restoration Results in Unleashing Ancient Diversity in Garlic. V. Sebze Tarımı Sempozyumu, 21 - 24 Eylül 2004, Çanakkale.
- Robert U, Zel J, Ravnikar M, 1998. Thermotherapy in Virus Elimination from Garlic: Influences on Shoot Multiplication from Meristems and Bulb Formation *In Vitro*. *Scientia Horticulturae*, 73: 193-202.
- Roksana R, Alam MF, Islam R, Hossain MM, 2002. *In vitro* Bulblet Formation from Shoot Apex in Garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Tissue Culture*, 12(1): 11-17.
- Sehitoglu MH, Yarali Karakan F, Kizilkaya B, Öztöpez RO, Gulcin I, 2018. Investigation of Antioxidant Properties and Bioactive Composition of *Allium tuncelianum* ((Kollman) Ozhatay, Matthew & Siraneci) And *Allium sativum* L. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 8: 213-221.
- Tapiero H, Townsend D, Tew K, 2004. Organosulfur Compounds from *Alliaceae* in The Prevention of Human Pathologies. *Biomed Pharmacother*, 58: 183-193.
- Taskin H, Baktemur G, Kurul M, Buyukalaca S, 2013. Use of Tissue Culture Techniques for Producing Virus-Free Plant in Garlic and Their Identification Through Real-Time PCR. *Scientific World Journal*, 2013: 1-5.
- Torres AC, Fajardo TV, Dusi AN, Resende RO, Buso JA, 2000. Shoot Tip Culture and Thermotherapy in Recovering Virus Free Plants of Garlic. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 18(3): 192-195.
- Verbeek M, Dijk P, Peter MA, Well A, 1995. Efficiency of Eradication of Four Viruses From Garlic (*Allium Sativum*) by Meristem-Tip Culture. *European Journal of Plant Pathology*, 101:231-239.
- Vieira RL, Silva ALD, Zaffari GR, Feltrim AL, 2014. *In Vitro* Morphogenesis of Garlic Plants: The Role of Growth Regulators in Bulb Induction and Development. *Biologia Cienc. Rural*, 44(3): 439-445.
- Walkey DGA, Antill DN, 1989. Agronomic Evaluation of Virus-Infected Garlic (*Allium sativum*). *Journal of Horticulture Science*, 64: 3-60.
- Walkey DGA, Weeb MJW, Bolland CJ, Miller A, 1987. Production of Virus-Free Garlic (*Allium sativum* L.) and Shallot (*A. ascalonicum* L.) by Meristem-Tip Culture. *Journal of Horticultural Science*, 62 (2): 211-220.
- Yaralı F, Yanmaz R, 2013. *Allium* Türlerinin Islahında Haplodidi Tekniğinden Yararlanma. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6 (2): 45-52.
- Yasseen MY, Splittstoesser WE, Litz RE, 1994. *In Vitro* Shoot Proliferation and Production of Sets From Garlic and Shallot. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36: 243-247.
- Yulianingsih R, Hidayat SH, Dinarti D, 2019. Elimination of Garlic Common Latent Virus from Garlic Through Meristem Culture and Thermotherapy. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 468(1): 12-28.

Zahedi B, Mosahebi G, Zamani Z, Kashi A, 2010. Elimination of Potyviruses from Two Commercial Iranian Garlic (*Allium Sativum* L.) Populations Through Thermotherapy and by Meristem Tip Culture. Iranian Journal of Plant Protection Science, 41(2): 345-352.

**To Cite:** Onder, M and Bayat, H.I., 2022. Classification vowel-consonant letters with deep neural networks in Turkish and text-voice synchronization on a basis syllable size. Journal of The Institute of Science and Technology (JIST), 12(1): 41-57.

**Classification Vowel-Consonant Letters with Deep Neural Networks in Turkish and Text-Voice Synchronization on a Basis Syllable Size**

Mürsel ÖNDER, Halil İbrahim BAYAT

**ABSTRACT:** In the study, a syllable-scale synchronization study was carried out by considering the grammatical structure of Turkish to emphasize simultaneously the sound and the text. Therefore, it was aimed to classify the vowels and consonants in Turkish within the word. For this purpose, two different Artificial Neural Network (ANN) models were preferred for this classification, and also the Mel-Frequency Cepstrum Coefficients method was preferred for extracting features of voice data. It has been observed that ANNs give the best results with deep learning. Tests were made with different numbers of coefficients in feature extraction. In the first stage of this study, a certain number of recordings were taken from the vowels and consonants in Turkish. Then, their feature was extracted and prepared for the training of networks. The best network structure and parameters were selected as a result of training and test made with different parameters. In this training, networks were asked to distinguish vowels from consonants. Afterward, the vowel-consonant distinction was made among 10 predetermined vectors of words and phrases. Layer-recurrent Neural Network and Pattern Recognition Network achieved an average success of 97.43% and 98.04%, respectively, in deep learning training carried out through the Mathworks Matlab software. Because Pattern Recognition Network achieved 98.82% success in recognizing vowels and 97.27% in recognizing consonants, this network model was preferred in vowel-consonant classification. After the classification process, timing files were created by determining the transition times of the vowels in the word. In the last step, an interface was created on the C# .NET platform for the synchronization process, and a syllabic algorithm was developed in this interface to emphasize the syllable synchronization of the text. Thus, the desired high precision was achieved in the simultaneous highlighting of the words.

**Keywords:** Artificial Neural Networks, Deep Learning, Mel-Frequency Cepstrum Coefficients, Sound-Text Synchronization

<sup>1</sup>Mürsel ÖNDER ([Orcid ID: 0000-0003-4475-3955](https://orcid.org/0000-0003-4475-3955)), Halil İbrahim BAYAT ([Orcid ID: 0000-0002-3014-7113](https://orcid.org/0000-0002-3014-7113)) Gaziosmanpasa University, Department of Mechatronics Engineering, Tokat, Turkey

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Halil İbrahim BAYAT, e-mail: hibrahimbyt@gmail.com

The subject of this article is taken from Halil İbrahim Bayat's master's thesis. Oral presentation was made by Halil İbrahim BAYAT in conference of Mas 14th International European Conference On Mathematics, Engineering, Natural&Medical Sciences.(2021)

## INTRODUCTION

Thanks to the breakthroughs in digital technology, the rapidly developing visual media (Internet, TV, cinema) has an important place in human life. Undoubtedly, one of the most important features of this visual media is the subtitles of these images. Subtitles are important both for language differences and for people with hearing impairments to understand the visual in question. In this study, based on this motivation, a study was carried out to simultaneously highlight the voice and the text belonging to that voice data in the Turkish language. The path followed in this study is quite different and new from the studies done so far. However, some literature studies may be related to the subject of this study:

In the literature, studies on ANNs and voice recognition differ from each other in terms of both the different ANN models and the way the voice data process. Also, there are cases of being independent or dependent on the speaker and independent or dependent from the text. Studies that we think are closely related to our study are as follows: In 1990, Cosi and his colleagues implemented vowel classification for English. They created this study independently of the speaker (Cosi et al, 1990). In these studies, multi-layer ANN was used and they achieved 95% success. In 1994, a study was carried out by Parlaktuna et al. On recognizing vowels and consonants in Turkish within themselves. The study here is independent of the speaker. In the study, vowel-consonant recognition, vowel recognition, and consonant recognition are discussed in three groups. In recognizing vowels and consonants, 84.7%, 91.1%, respectively; an average of 80.1% in recognizing vowels within itself; 50.7% success was achieved in consonants (Parlaktuna et al, 1994). In his study conducted in 1997, Üstün achieved 97.5% success in recognizing vowels in Turkish by using multi-layered ANN (Ustun, 1997). The system is a speaker-dependent system. Yavuz and his friend conducted a study on recognizing vowels in Turkish with the Probability Neural Network in 2010 and achieved 95% success. His work is a speaker-independent system (Yavuz and Topuz, 2010).

In our study; First, the study of distinguishing Turkish vowels from consonants was carried out. The aim here is to find the times of the vowels in the word. Finding the time of the vowel is important as it will give us the time of the syllable in that word. Here, while developing this method, the linguistic structure of Turkish has been taken into consideration. Artificial Neural Networks (ANN) are preferred for this classification. Two different ANN structures have been tested in the study. Appropriate ANN and its parameters were obtained as a result of the tests performed. Before starting the training, Mel-Frequency Cepstrum (MFC) method was applied to the characteristics of 10 different word groups together with vowels and consonants. In the next step, the hyphenation algorithm was developed to show that the word groups are emphasized simultaneously in syllable size. At the last stage, the study was concluded by emphasizing the sound and the text belonging to this sound in the developed interface simultaneously in terms of syllables. There is currently no study conducted following such a path (Bayat, 2020).

The main purpose of this study is to show that such a method can be used to emphasize or synthesize voice-text. Because it is thought that such a study will be beneficial for learning Turkish or for hearing impaired people to follow and comprehend the text of the voice (Yalçın, 2006).

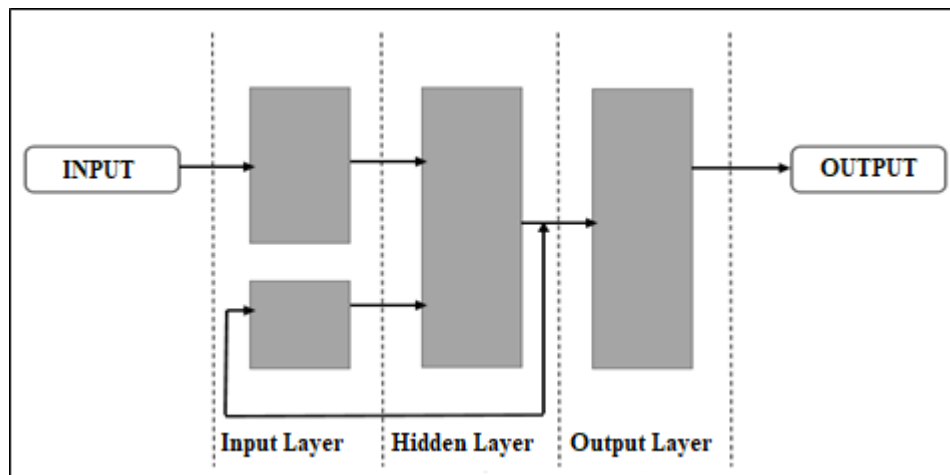
## MATERIALS AND METHODS

In our study, two different ANN models that can be classified as a classifier as dynamic and static were selected: In the ANN training study carried out with the Mathworks Matlab program; Pattern Recognition Network (*static*), one of which is a feed-forward ANN model (Figure 2), and the other with

Layer Recursive ANN model (*dynamic*), which is a different version of Elman Networks (Gupta and Homma, 2004), (Figure 1). MFC method was used to extract the properties of the audio data.

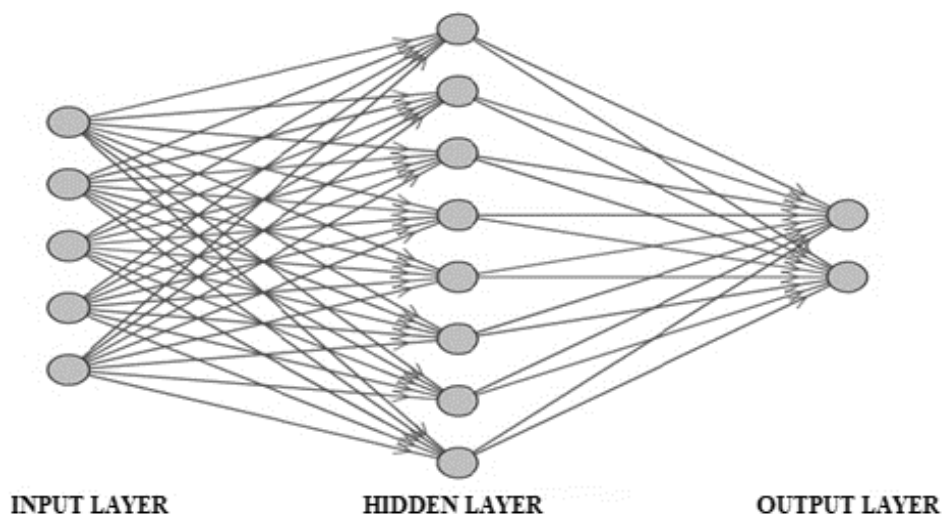
### Artificial Neural Networks

The artificial neural network is a mesh recognition method inspired by the way the human brain processes information. To make a general definition, ANN: Large-scale interconnected networks of simple (usually adaptable) elements and their hierarchical organization aim to interact with real-life objects as the biological nervous system does (Kohonen, 1987; Haykin, 1999). In recent years, ANNs have been showing successful results in establishing relationships between these patterns without recognizing patterns. There are several studies on this subject in the literature



**Figure 1.** Schematic representation of Elman Networks (Bayat, 2020)

ANNs generally consist of the input layer from which input data is received, one hidden layer (the number may increase), and the output layer. Structures of ANNs; It may vary according to learning algorithms and data traffic between layers. For example, while there is a return from the hidden layer output to the input layer in Elman Networks in Figure 1 (Elman, 1990), this is not the case in the multi-layer feed-forward ANN model given in Figure 2. In this study, the performances of these two different ANN models were compared.



**Figure 2.** Schematic representation of Feed Forward ANN (Bayat, 2020)

## Deep Neural Networks

Deep neural networks (DNN) are referred to in the literature as ANN consisting of two or more (usually more than two) hidden layers (Hinton et al, 2006; Bengio, 2012). ANN is depicted as a single hidden layer structure in general terms. However, in complex problems where training data is insufficient and inputs do not contain enough features, this single layer may not perform adequately. The purpose of using multiple layers is to find high-level abstract features from data with low-level features defined (Bengio, 2012). These highly abstract features help to distinguish independent distributions in training data (Bayat, 2020).

Shallow network structures, that is, ANN structures with one or two hidden layers, usually require a large number of neurons to represent their inputs well. As the number of neurons increases, the number of network parameters such as weights and biases will naturally increase, creating a heavy processing burden (Bayat, 2020). This causes large-size operations with many variables to not be represented effectively with shallow network structures (Bengio, 2012).

Another factor that encourages the use of deep learning structure comes from the work of the human brain. While the nerve signal transmits visual information within the body, some measurements have been made to find the distance and time it travels (Bayat, 2020). The results of these measurements showed that even in a simple object recognition process, the number of layers of biological neurons involved in this process is approximately ten (Cakir, 2014).

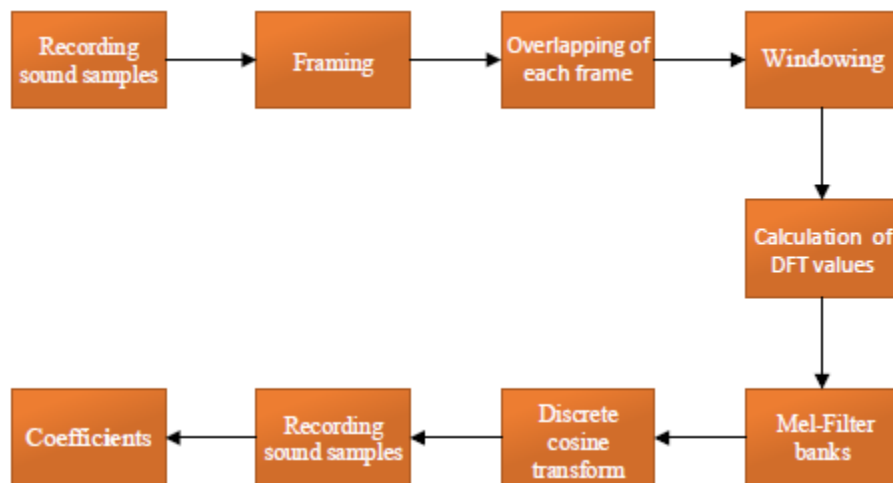
## Feature Extraction

Sound processing is the process of digitizing sound signals and processing them in a computer environment with numerical methods. This process starts with recording the sounds and transferring them to the computer environment. The operations performed in this stage are the efforts to express the sounds numerically in the best way (Bayat, 2020).

Voice recognition is a fundamental pattern recognition problem that has been very popular and wide-ranging in the last half-century. Sound files have a continuous sinusoidal wave structure and new methods are being developed to express certain characteristics within this structure. The common purpose of all these methods is to separate the data in the audio file from the other data in itself and to reveal their unique features. For this, it is very important to extract the feature of the sound file in speech recognition systems (Tiwari, 2010). One of the most powerful methods of extracting the properties of sound data is the MFCC (Mel-Frequency Cepstrum Coefficients) method (Dave, 2013; Bayat, 2020).

Mel frequency cepstrum method; It is a very popular and successful feature extraction method used in speech recognition systems (Meng et al, 2004). This method has been created by modeling the hearing process of the human ear. Studies on the human hearing process have shown that the human ear has high resolution and saturation against low-frequency sounds when compared to high-frequency sounds (Dave, 2013).

MFC coefficients are obtained by going through certain stages. There are many studies conducted with different coefficients in the literature. These coefficients are usually chosen as a result of certain tests or taking into account the characteristics of the audio data. In Figure 3, the steps of obtaining the MFC coefficients are given in a flow.



**Figure 3.** Flow diagram showing the process of obtaining the MFC coefficients (Bayat, 2020).

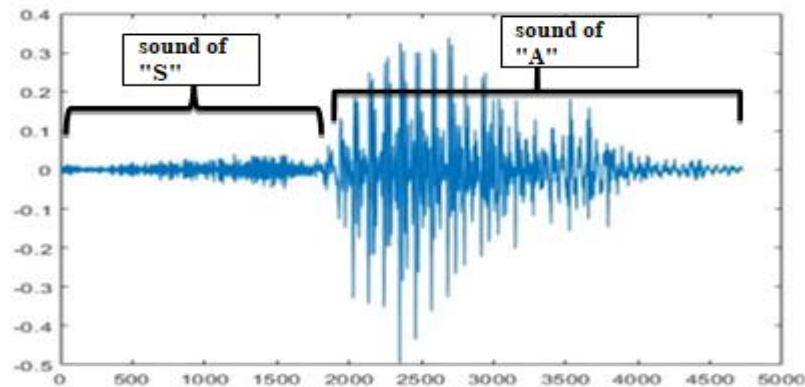
### Materials and Working Framework

The study aims to distinguish the vowels from consonants from 29 letters; 26 different records were taken from each of the vowels and 30 different from the vowels. Records; It has 16-bit PCM and a sampling frequency of 11.025 kHz. In total, 240 records from vowels and 540 records from consonants were obtained. Sample lengths and time intervals of recordings from Turkish vowels and consonants are given in Table 1.

**Table 1.** Sample and time length intervals of sound recordings taken from vowels and consonants

Letters	Sample count range	Length(sec.)	Letters	Sample count range	Length(sec.)
A	2603-2946	0.236-0.267	M	716-3581	0.064-0.324
B	474-544	0.043-0.049	N	876-2503	0.079-0.227
C	494-1166	0.044-0.105	O	2353-3214	0.213-0.291
Ç	1243-2555	0.112-0.231	Ö	2351-2983	0.213-0.271
D	513-601	0.046-0.054	P	442-1968	0.040-0.178
E	2351-3151	0.213-0.285	R	1217-2570	0.110-0.233
F	2051-3209	0.186-0.291	S	1239-2800	0.112-0.254
G	472-858	0.043-0.077	Ş	1124-2652	0.101-0.241
Ğ	1084-2530	0.098-0.229	T	803-1476	0.072-0.133
H	574-2089	0.052-0.189	U	1985-3161	0.177-0.281
I	1995-2988	0.181-0.271	Ü	2195-3103	0.199-0.281
İ	2411-3360	0.218-0.304	V	1135-2565	0.103-0.232
J	1175-2564	0.106-0.232	Y	1046-2122	0.094-0.192
K	794-1622	0.072-0.147	Z	1355-2283	0.123-0.207
L	1007-1787	0.091-0.162			

Approximately 39% of the records were reserved for testing, while the rest were used in training. The records of the letters were taken from a single person and the system was designed as speaker-dependent. The records of the letters were obtained by extracting the letters from syllables so that their characteristics could be better understood and the letters were better picked up in the tests within the word. For example; For the example of the letter "s", the vowels were first and then followed by the vowels (as, es, is, os, üs, üs; sa, se, si, sı, so, so, sü, su) However, it has been separated from these records by removing the letter "s" in such a way that its characteristic is intact.).



**Figure 4.** Graph of “Sa” sound recording

The records were then collected under a single matrix. Each column of the matrix was created to belong to one record of only one letter. The data were first passed through the Hamming windowing function by arranging each with floating frames and with a certain overlap ratio, and then the MFC coefficients were found and rearranged for network training in the same matrix format. The parameters used in the operations are shown in Table 2.

**Table 2.** Parameters used to extract the properties of audio data

Parameters	Selections
Feature Extraction Method	MFCC
Number of Coefficients	17 (In the first stage)
Windowing Function	Hamming
Length of Windowing Function	Up to Frame Size (440)
FFT Degree	512
Overlapping Ratio of Successive Frames	%75
Specified frame size (according to the tests)	440 (0.0399 sec.)

In the study, target matrices were created according to two classifications. Figure 5 shows the representation of the target matrix. The aim here is to distinguish vowels from consonants, as we mentioned earlier.



$$\text{TARGET MATRIX} = \left\{ \begin{array}{c} \text{VOWELS} \\ \hline 111111111111 \dots 111000000000 \dots 000 \\ \hline 000000000000 \dots 000111111111111 \dots 111 \\ \hline \text{CONSONANT} \end{array} \right\}$$

**Figure 5.** Target Matrix

### Interface program and spelling algorithm

At the last stage of the study, the times of the vowels in the word were determined with the appropriate ANN and recorded in text files. These files were read with the interface program developed for simultaneous highlighting of the voice-text. The operation of the interface program is as follows:

1. Read the text file, write the word text on the screen.
2. Break the text of the word into syllables.
3. Select the audio file for the word.
4. Highlight the word and sound file simultaneously.



**Figure 6.** Voice-Text synchronizer interface.

The voice-text synchronizer interface program is given in Figure 6. In this program, after clicking the "Open text file" phrase and selecting the file, the text of the word in question is divided into syllables on the screen. Here, the hyphenation algorithm shown in Figure 7 has been developed to do this.

Considering the words, we use in our daily lives and the voiced text in this study, the spelling performance of up to four syllables was found to be sufficient.

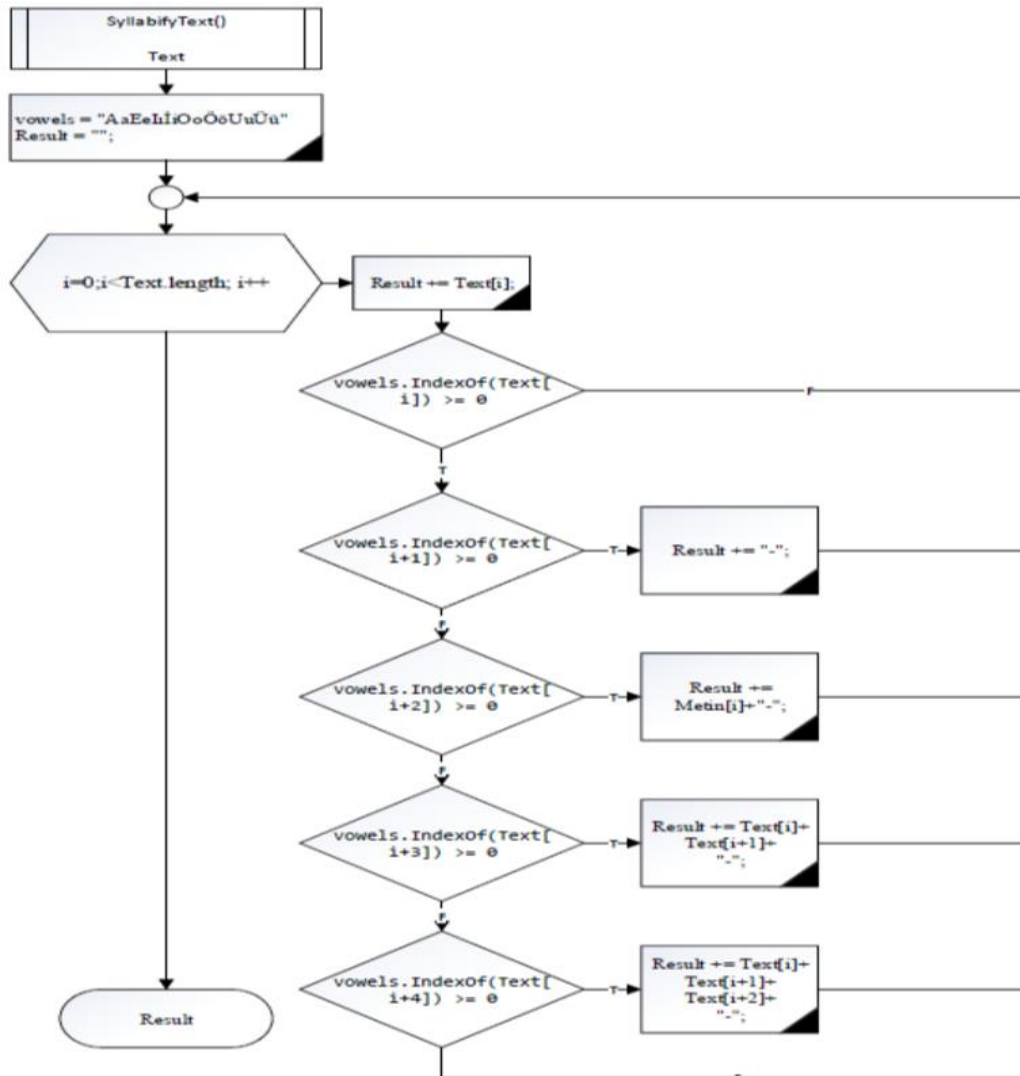


Figure 7. Hyphenation algorithm developed on C # .Net

## RESULTS AND DISCUSSION

### Selection of Network Parameters

The first stage of the study is to conduct lots of training and tests on two different network structures. The aim here is to roughly reveal the parameters in which the two network structures give the best performance. Network structures for one, two, and three hidden layers have been tested with different numbers of neurons and their performance has been tested by tests. Transfer, training, and performance functions for two ANN models are as shown in Table 3.

Table 3. Transfer, training and error functions used in ANN trainings

ANN models	First hidden layer transfer function	Second hidden layer transfer function	Third hidden layer transfer function	Output layer transfer function	Training function	Performance function
Layer-recurrent neural network	Tansig	Tansig	Tansig	Purelin	Trainlm	“cross-entropy”
Pattern recognition network	Tansig	Tansig	Tansig	Softmax	Trainscg	“mean squared error”

As a result of the tests performed with Layer-Recursive and Pattern Recognition Networks with different layers and neuron numbers, the error, sensitivity, accuracy, and special factor are shown in Table 4. Networks have been trained only once. The network structure with the highest network performance was determined in both ANN structures and gradual tests were performed with different MFC coefficients and the performances of the two network structures were compared.

**Table 4.** Layer-Recursive and Pattern Recognition Neural Networks test results

Layer-recurrent neural network	Neurons	Training perform. (mean-square error)	Correct rate	Error rate	Sensitivity	Specificity
One hidden layer	10	0.01484	0.9502	0.0498	0.9491	0.9514
	15	0.0091246	0.9388	0.0612	0.9173	0.9624
	20	0.0095811	0.9592	0.0408	0.9560	0.9624
	25	0.0071028	0.9670	0.0330	0.9623	0.9718
	30	0.0065754	0.9435	0.0565	0.9424	0.9447
	35	0.0053399	0.9575	0.0425	0.9538	0.9612
Two hidden layers	10,5	3.22498e-5	0.9488	0.0512	0.9311	0.9680
	10,10	5.5396e-10	0.9628	0.0372	0.9528	0.9732
	15,5	3.6656e-11	0.9667	0.0333	0.9674	0.9660
	15,10	1.1226e-10	0.9603	0.0397	0.9419	0.9802
	20,5	1.2996e-13	0.9673	0.0327	0.9537	0.9816
	20,10	1.8323e-13	0.9595	0.0405	0.9505	0.9687
	20,15	1.1336e-11	0.9542	0.0458	0.9374	0.9722
	30,5	1.521e-11	0.9670	0.0330	0.9562	0.9783
	30,10	2.8939e-13	0.9637	0.0363	0.9559	0.9716
	30,15	8.7641e-14	0.9597	0.0403	0.9447	0.9758
	30,20	2.486e-10	0.9550	0.0450	0.9375	0.9739
Three hidden layers	10,5,5	1.6007e-14	0.9553	0.0447	0.9437	0.9674
	10,10,5	3.1416e-11	0.9586	0.0414	0.9446	0.9735
	10,10,10	2.9122e-13	0.9382	0.0618	0.9068	0.9746
	20,5,5	6.2002e-15	0.9623	0.0377	0.9543	0.9705
	20,10,5	9.2299e-12	0.9592	0.0408	0.9394	0.9807
	20,10,10	8.444e-12	0.9611	0.0389	0.9587	0.9636
	20,15,10	3.848e-12	0.9690	0.0310	0.9634	0.9746
	20,15,15	2.9957e-15	0.9572	0.0428	0.9430	0.9724
	20,20,10	6.0341e-13	0.9611	0.0389	0.9603	0.9620
	20,20,15	5.177e-14	0.9634	0.0366	0.9524	0.9749
	30,10,5	2.2712e-13	0.9670	0.0330	0.9522	0.9827
	30,10,10	4.6839e-12	0.9561	0.0439	0.9334	0.9812
	30,20,5	1.9102e-10	0.9533	0.0467	0.9344	0.9738
	30,20,10	1.8471e-11	0.9642	0.0358	0.9575	0.9711
	30,20,20	1.1853e-13	0.9665	0.0335	0.9537	0.9799
30,30,10	1.0845e-10	0.9665	0.0335	0.9607	0.9723	
30,30,20	8.4561e-15	0.9544	0.0456	0.9355	0.9749	

Table 4. Layer-Recursive and Pattern Recognition Neural Networks test results (continue)

Pattern recognition network ( <i>trainscg</i> )	Neurons	Training perform. (cross-entropy)	Correct rate	Error rate	Sensitivity	Specificity
One hidden layer	10	9.3562e-07	0.9474	0.0526	0.9263	0.9707
	20	2.902e-07	0.9651	0.0349	0.9570	0.9733
	30	2.52e-07	0.9651	0.0349	0.9506	0.9804
	40	2.7563e-07	0.9709	0.0291	0.9590	0.9834
	50	2.7942e-07	0.9704	0.0296	0.9625	0.9784
	60	1.9065e-07	0.9692	0.0308	0.9624	0.9762
	70	3.04e-07	0.9645	0.0355	0.9481	0.9821
Two hidden layer	20,5	5.9388e-08	0.9631	0.0369	0.9450	0.9826
	20,10	8.6892e-08	0.9679	0.0321	0.9543	0.9822
	20,20	1.5134e-07	0.9665	0.0335	0.9537	0.9799
	30,10	8.5897e-08	0.9648	0.0352	0.9545	0.9755
	30,20	9.8748e-08	0.9723	0.0277	0.9596	0.9857
	40,10	1.0487e-07	0.9679	0.0321	0.9654	0.9703
	40,20	1.0262e-07	0.9651	0.0349	0.9501	0.9810
	40,30	7.774e-08	0.9690	0.0310	0.9619	0.9762
	50,10	1.4472e-07	0.9799	0.0201	0.9787	0.9810
	50,20	1.8098e-07	0.9726	0.0274	0.9637	0.9818
	50,30	6.0268e-08	0.9651	0.0349	0.9511	0.9799
	50,40	9.5682e-08	0.9723	0.0277	0.9704	0.9742
50,50	4.6491e-08	0.9712	0.0288	0.9536	0.9901	
Three hidden layers	20,10,10	2.4129e-08	0.9628	0.0372	0.9479	0.9787
	20,20,10	4.4833e-08	0.9704	0.0296	0.9540	0.9879
	30,10,10	2.9942e-08	0.9681	0.0319	0.9553	0.9816
	30,20,10	5.7483e-08	0.9676	0.0324	0.9557	0.9800
	30,20,20	3.6177e-08	0.9718	0.0282	0.9616	0.9823
	40,10,10	1.6496e-07	0.9589	0.0411	0.9515	0.9666
	40,20,10	4.0654e-08	0.9804	0.0196	0.9730	0.9881
	40,20,20	2.8066e-08	0.9737	0.0263	0.9710	0.9764
	40,30,20	3.4884e-08	0.9740	0.0260	0.9628	0.9857
	40,30,30	2.0738e-08	0.9712	0.0288	0.9595	0.9834
	50,10,10	3.0302e-08	0.9729	0.0271	0.9627	0.9835
	50,20,10	4.2468e-08	0.9754	0.0246	0.9695	0.9814
	50,30,10	2.2659e-07	0.9653	0.0347	0.9591	0.9717
	50,30,20	5.6888e-08	0.9785	0.0215	0.9646	0.9931
	50,30,30	4.5603e-08	0.9631	0.0369	0.9479	0.9792
	50,40,10	3.5215e-08	0.9734	0.0266	0.9653	0.9818
	50,40,20	3.7714e-08	0.9692	0.0308	0.9569	0.9822
	50,40,30	4.0281e-08	0.9679	0.0321	0.9644	0.9713
	50,40,40	3.8336e-08	0.9595	0.0405	0.9490	0.9703
	50,50,10	6.0878e-08	0.9720	0.0280	0.9637	0.9807
50,50,40	3.0435e-08	0.9687	0.0313	0.9529	0.9856	

In the tests performed for two different network structures, the network structures that give the highest performance were subjected to a separate test with different numbers of MFC coefficients and the results were observed. Test results are as shown in Table 5.

**Table 5.** Results of tests with different MFC coefficients

Layer- Recurrent Neural Network (trainlm)	Mfc coefficients	Performance function (mean- square error)	Correct rate	Error rate	Sensitivity	Specificity
Three hidden layers and neurons each of them (25-15-10)	10	2.8799e-12	0.9553	0.0447	0.9624	0.9484
	11	2.9343e-13	0.9561	0.0439	0.9467	0.9658
	12	8.1739e-13	0.9645	0.0355	0.9668	0.9623
	13	5.0523e-14	0.9463	0.0537	0.9554	0.9377
	14	9.9367e-14	0.9486	0.0514	0.9592	0.9384
	15	1.5955e-14	0.9555	0.0445	0.9532	0.9580
	16	1.1181e-14	0.9637	0.0363	0.9539	0.9738
	17	3.848e-12	0.9690	0.0310	0.9634	0.9746
	18	1.812e-09	0.9679	0.0321	0.9603	0.9756
	19	1.0547e-13	0.9743	0.0257	0.9684	0.9802
20	1.471e-13	0.9595	0.0405	0.9461	0.9736	
Pattern Recognition Neural Network (trainscg)	Mfc coefficients	Performance function (cross- entropy)	Correct rate	Error rate	Sensitivity	Specificity
Three hidden layers and neuron each of them (40-20-10)	10	3.2201e-08	0.9536	0.0464	0.9560	0.9512
	11	3.3926e-08	0.9600	0.0400	0.9536	0.9666
	12	4.2466e-08	0.9648	0.0352	0.9595	0.9701
	13	4.0485e-08	0.9637	0.0363	0.9662	0.9612
	14	7.1674e-08	0.9555	0.0445	0.9537	0.9574
	15	3.3127e-08	0.9614	0.0386	0.9650	0.9579
	16	3.0604e-08	0.9651	0.0349	0.9550	0.9755
	17	4.0654e-08	0.9804	0.0196	0.9730	0.9881
	18	3.8866e-08	0.9740	0.0260	0.9633	0.9852
	19	4.5827e-08	0.9732	0.0268	0.9602	0.9868
20	4.1406e-06	0.9732	0.0268	0.9617	0.9851	

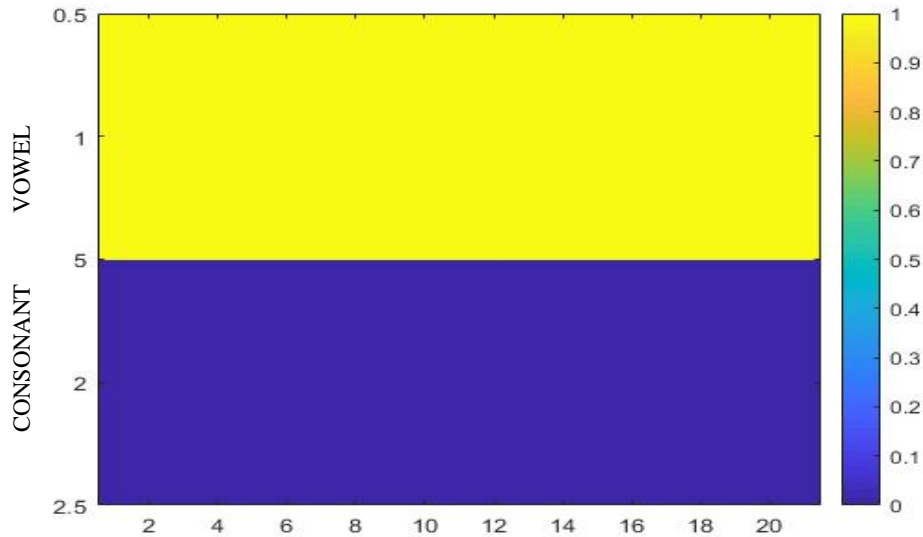
As it can be understood from the table, Pattern Recognition Network gives the best performance with 17 MFC coefficients, while this is 19 in Layer-Recursive ANN. The details of the test results of the Pattern Recognition Network are shown in Table 6. Based on the accuracy values, the Pattern Recognition network was selected for vowel-unvoiced classification within word vectors.

**Table 6.** Statistical performance of the Pattern Recognition Network

Confusion Matrix	Vowels	Consonants	Rate	Total
Vowels	1763	21	%98.82	1784
Consonants	49	1747	%97.27	1796
Rate	%97.30	%98.81	%98.04	-
	Sensitivity	Specificity		
Total	1812	1768	-	3580

### Vowel-Consonant Separation and Determination of Time of Vowel Letters

After choosing the best network structure, the vowel-silent classification study was started for the predetermined words. Word vectors passed through the same signal processing process were inserted into the selected network and subjected to binary classification.



**Figure 8.** Visual printout of the result matrix of the letter "a" sent to the network.

**Table 7.** Result matrix for the letter "a"

Vowel	1	1	1	1	1	1
Consonan	1,08E-09	2,22E-10	2,58E-10	5,72E-10	4,69E-10	1,21E-09

In previous tests, network performance was checked by sending only vowel or consonant letters to networks (Figure 8). As seen in Table 8, the fact that it is shown with "1" in the result matrix shows that the vowel is recognized. In the vocabulary study, words were sent directly to the trained network and an output matrix was obtained according to the approximate values of "1" for vowels and "0" for consonants in the result matrix.

As can be seen in Figure 9 A and B, the results of the word vectors (vowel-consonants) sent to the network separately are evident. The visuals when the "Voice-Text Synchronizer" program developed with the separator works with these words are shown in Figures 10 and 11. Also, it has been observed that this clarity is slightly distorted when a single vector "hello world" audio file is sent to the trained network. But despite this, the time determination could still be made. Because the transition and starting times of vowels can be observed on the result matrix. Figure 12 shows how the starting time of vowels is calculated in the result matrices. In Equation 1, it is stated how it is calculated.

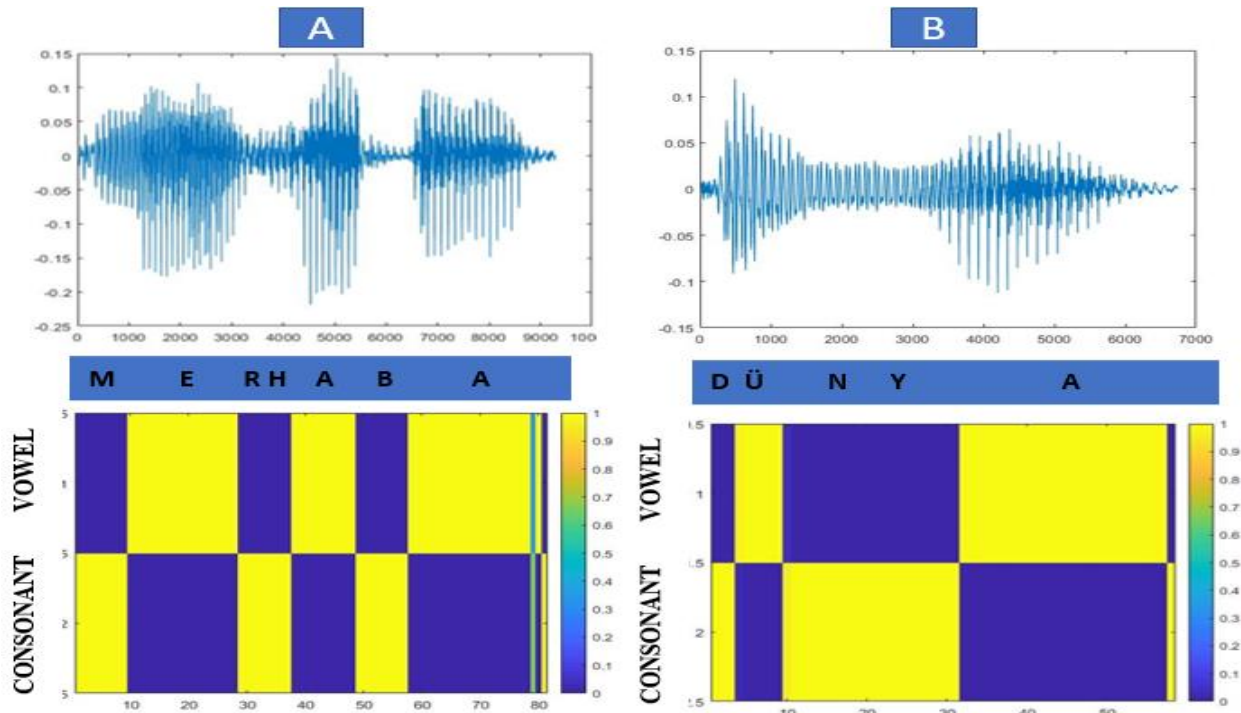


Figure 9. Audio files of the words "Merhaba" which means -hello, (A) and "Dünya", means World in Turkish (B) and graphs of the network output results.



Figure 10. The screenshot of simultaneous emphasis of the sound-text of the word "Merhaba" with the interface program.



Figure 11. The screenshot of the simultaneous emphasis of the word "Dünya"

$$\frac{\text{length of the first frame (sec.)}}{11025} + \frac{(\text{Length of frame} - \text{length of Overlapped frame (sec.)}) \times (\text{number of overlapped frames})}{\left(\frac{440}{11025} - \frac{330}{11025}\right)} \times 9 = 0.1297 \text{ sec.} \quad (1)$$

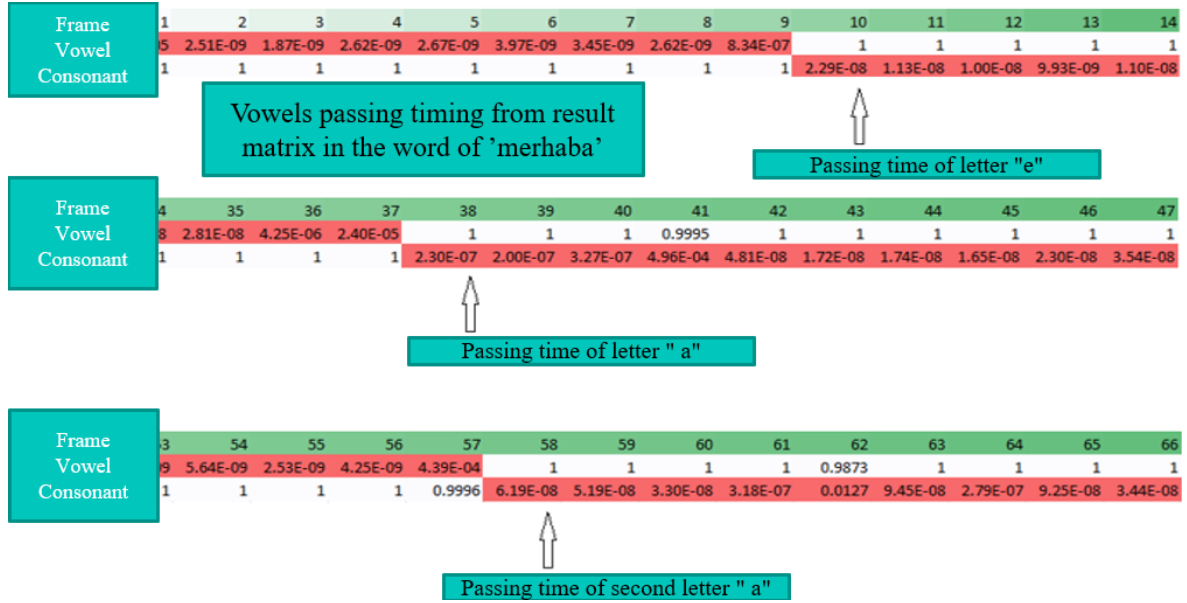


Figure 12. Transition times of vowels in the word "Merhaba".

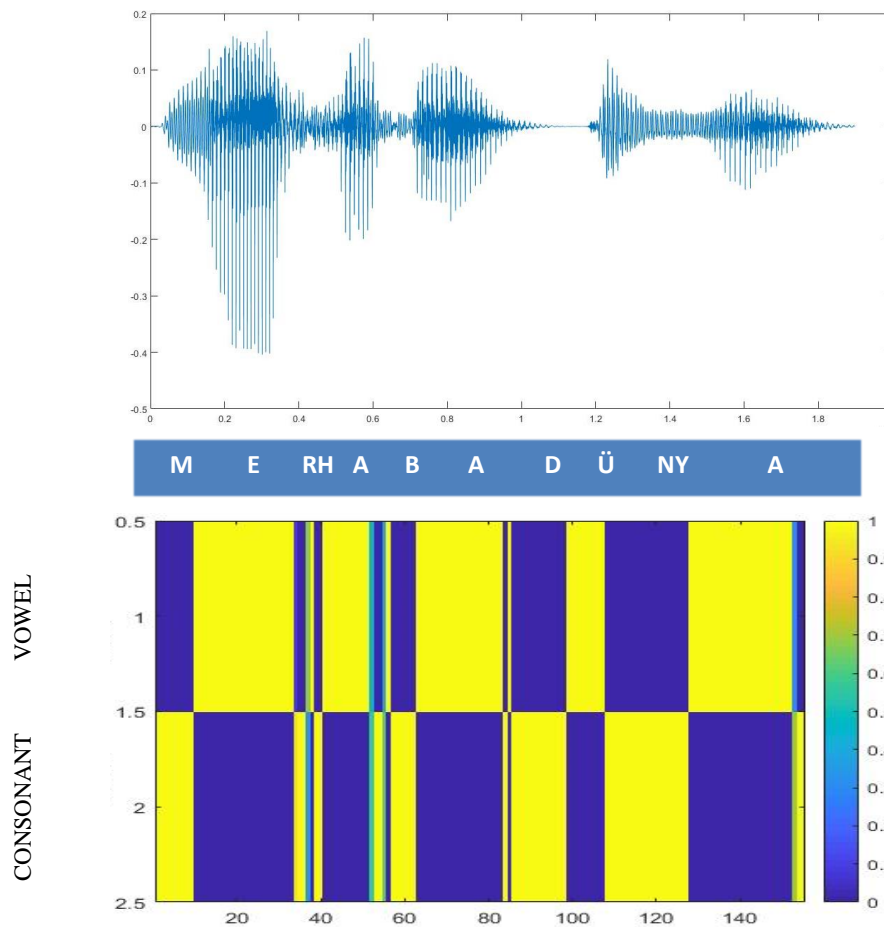


Figure 13. Graphical representation of audio and network outputs belonging to the word group "Merhaba Dünya"



As can be seen in Figure 13, the length of the audio file can be seen as a factor that makes the distinction within the word difficult. Because when the words are handled separately, this clarity is distorted in word groups while facing a clear graphic.

Other words and word groups used during the study are expressed in Table 8. The table includes the vowels in the word and the times of these vowels. The voice-to-text synchronization of all the words (and word groups) shown in the list has been successfully achieved.

**Table 8.** Words and word groups used in the study

Words and phrases	Number of the vowels	Times of voice letters (sec.)
Merhaba	3	0.139-0.419-0.618
Bilim	2	0.199-0.528
Dünya	2	0.099-0.329
Türkiye	3	0.126-0.529-0.752
Vatan	2	0.159-0.558
İstanbul	3	0.069-0.289-0.518
Günaydın	3	0.079-0.279-0.638
Millet	2	0.259-0.738
Cumhuriyet	4	0.089-0.628-0.937-1.167
Özgürlük	3	0.069-0.429-0.858
Ay yıldız	3	0.069-0.439-0.937
Merhaba dünya	5	0.139-0.448-0.678-1.027-1.326

## CONCLUSION

As can be seen in studies with different ANNs, vowels and consonants were defined with an accuracy of 97-99% and gave successful results in tests. Although the tests for the distinction of vowel and consonants based on letters gave very clear and distinct results, the tests conducted with word vectors and especially with word groups remained far from this clarity. One of the biggest reasons for this is that when the network is tested with words, the system falls into the scope of an independent study from the text, that is, the network trained with letters is required to recognize letters with different harmonies within the words (Dede, 2008; Bayat, 2020). Another important reason is that the harmony of the vowels in the words in Turkish is closely related to the difference from word to word and in each vocalization style of the speaker (Kılıc, 2015). For these reasons, it makes it difficult to detect vowels or consonants from words. Vowels were successfully detected in 12 vectors containing words and word groups, and voice-text synchronization was achieved. Since the aim of this study was to show that capturing vowels and syllabic-scale word-sound emphasis can be done simultaneously, no study was conducted with a large word group (Bayat, 2020).

While carrying out all these studies, some ideas were gained about increasing the performance of the system. One of the most important issues in voice recognition systems is the issue of keeping voice recordings and training data as wide and rich as possible (Sirigos et al, 1996). For this reason, the richness of training data and the quality of voice recordings significantly affect network performance (Kılıc, 2015). More advanced ANN models to be used with a discriminator and adaptations of different classifier combinations can be a guide in improving system performance (Vafeiadis et al, 2017). The recently developed hybrid systems suggest that they will pave the way for new solutions and successful results in artificial intelligence problem solving (Wang et al, 2006).

The use of different classifier and sound features can make the system give higher results (Gupta, 2004; Vafeiadis et al, 2017). Operating such a system with high efficiency will pave the way for more efficient creation of phoneme-based speech recognition, phoneme-text or text-sound systems in the future. Such a system contains content that can be utilized in many areas from education to communication. To summarize, the way to synchronize the text of any voice or visual made manually today will be made possible automatically and with high precision (Bayat, 2020).

## ACKNOWLEDGEMENTS

Endless thanks to my mother, Birten BAYAT, who has always supported me throughout my education life.

## Conflict of Interest

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

## Author's Contributions

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

## REFERENCES

- Bayat, H.İ., 2020. Identification of vowel-non vowel letter with artificial neural network and sound-text synchronization at syllable level (Master thesis), Gaziosmanpaşa University, Institute of science and technology, Tokat, Turkey.
- Bengio, Y., 2012. Deep learning of representations for unsupervised and transfer learning. In Proceedings of ICML workshop on unsupervised and transfer learning, pp. 17-36.
- Cakir, E., 2014. Multilabel sound event classification with neural networks. (Master thesis), Tampere University of Technology, Faculty of Computing and Electrical Engineering, Finland.
- Çakır, M.Y., 2017. Real-time high-quality voice recognition. (Master thesis), İstanbul Sabahattin Zaim University, Institute of science and technology, İstanbul, Turkey
- Cosi, P., Bengua, Y. and De Maria, R., 1990. Phonetically-based multi-layered neural networks for vowel classification. *Speech Communication*, 1(9), pp. 15-19.
- Dave, N., 2013. Feature extraction methods LPC, PLP and MFCC in speech recognition. *International journal for advance research in engineering and technology*, 4(1), 5 pp.
- Dede, G., 2008. Speech recognition with artificial neural networks (Master thesis), Ankara University, Institute of science and technology, Ankara, Turkey.
- Elman, L. J., 1990. Finding structure in time. *Cognitive Science*, 2(14), pp. 179-211.
- Güloğlu, T., 2014. Speech recognition for Turkish phonology using wavelet techniques.(Master thesis), Dokuz Eylül University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, İzmir.
- Gupta, M., Jin, L. and Homma, N., 2004. Static and dynamic neural networks: from fundamentals to advanced theory. John Wiley & Sons.
- Haykin, S., 1999. *Neural Networks: A Comprehensive Foundation*, 2nd Edition, Prentice-Hall, pp. 823, Ontario, Canada.
- Hinton, G., Osindero, S. ve Teh, Y. W., 2006. A fast-learning algorithm for deep belief nets. *Neural computation*, 18(7), pp. 1527-1554.
- Kılıç, E., 2015. The effects of Turkish vowel harmony in word recognition. (Master thesis), DePaul University, The Department of Psychology Collage of Science and Health, Chicago, Illinois, USA.

- Kohonen, T., 1987. State of the art in neural computing. In Proceedings, IEEE First International Conference on Neural Networks, pp. 179-190, San Diego, USA
- McCulloch, W. S. and Pitts, W. 1943. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. The bulletin of mathematical biophysics, 5(4), pp. 115-133.
- Meng, Y., Lee, T., Ching, P.C. and Zhu, Y. 2004. Speech recognition on DSP: issue on computational efficiency and performance analysis. Microprocessors and Microsystems, 30(3), pp. 155-164.
- Önder, M., In Printing. Elmas-Hece Engineering in Quran Education
- Parlaktuna, O., Cakici, T., Tora H. and Barkana, A., 1994. Vowel and consonant recognition in Turkish using neural networks toward continuous speech recognition. Mediterranean Electrotechnical Conference, Antalya, Turkey.
- Sirigos, J., V. Darsinos, N. Fakotakis and G. Kokkinakis, 1996. Vowel-non vowel decision using neural networks and rules. Proceedings of Third International Conference on Electronics, Circuits, and Systems, Rodos, Greece.
- Tiwari, V., 2010. MFCC and its application in speaker recognition. International Journal on Emerging Technologies, 1(1), pp. 19-22.
- Üstün, S.V., 1997. Recognition of vowels in Turkish using artificial neural networks. (Master thesis), Yıldız Technical University, Institute of science and technology, İstanbul, Turkey
- Vafeiadis, A., Kalatzis, D., Votis, K., Giakoumis, D., Tzovaras, D., Chen, L. And Hamzaoui, R., 2017, November. Acoustic scene classification: From a hybrid classifier to deep learning.
- Wang, J.C., Wang, J.F., He, K.W. and Hsu, C.S., 2006, July. Environmental sound classification using hybrid SVM/KNN classifier and MPEG-7 audio low-level descriptor. In The 2006 IEEE International Joint Conference on Neural Network Proceedings, pp. 1731-1735
- Yalçın, N., 2006. Developing a software for teaching initial reading writing to class student of primary education using speech recognition technology. (Doctoral thesis), Institute of science and technology, Ankara, Turkey.
- Yavuz, E. and Topuz, V., 2010. Recognition of Turkish vowels by probabilistic neural network using Yule-Walker AR method. International Conference on Hybrid Artificial Intelligence Systems, Berlin, Heidelberg, Germany.

**Atf İçin:** Emre İ, Tuncer T, Dogan S, Kursat M, Gedik O, Kıran Y, 2022. Yerel ikili örnek kullanarak üç *Lallemantia* Fisch. & C.A. Mey. türünün kromozom sınıflandırmasına farklı bir yaklaşım. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12 (1): 58-68.

**To Cite:** Emre İ, Tuncer T, Dogan S, Kursat M, Gedik O, Kıran Y, 2022. A different approach to the chromosome classification of three *Lallemantia* Fisch. & C.A. Mey. species by using local binary pattern (LBP). Journal of the Institute of Science and Technology, 12 (1): 58-68.

## **Yerel İkili Örnek Kullanarak Üç *Lallemantia* Fisch. & C.A. Mey. Türünün Kromozom Sınıflandırmasına Farklı Bir Yaklaşım**

İrfan EMRE<sup>1</sup>, Turker TUNCER<sup>2</sup>, Sengul DOĞAN<sup>2</sup>, Murat KURŞAT<sup>3</sup>, Osman GEDİK<sup>4</sup> and Yaşar KIRAN<sup>5</sup>

**ÖZET:** Geleneksel karyotip çalışmaları, bitki sistematiğinde türlerin konumlarını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak çalışmalar bazen sistematik sorunları çözememektedir. Son yıllarda bilgisayar tabanlı sistemler taksonomik problemlerin çözümüne katkı sağlamada önem kazanmıştır. Bu çalışmanın amacı, mitozdaki kromozom görüntülerine dayalı yerel ikili örüntü doku operatörünü kullanarak üç *Lallemantia* türünü belirlemektir. Yerel ikili örüntü, yerel görüntü modellerini tanımlamak için en güçlü ve kolay uygulanabilir araçlardan biridir. Bu çalışmada mitozun metafaz evresindeki 641 hücrenin mikrofotografı kullanılmıştır. Yerel ikili örüntü, ön işleme, özellik çıkarma, özellik seçme ve sınıflandırmayı içerir. Sınıflandırma aşamasında DT, LD, SVM, KNN, BT ve SNN kullanılmıştır. Bu çalışma, başarı oranı yüzde yüz olduğu için en iyi sınıflandırıcının SNN olduğunu buldu. Ayrıca, üç tür arasındaki benzerliği ölçmek için bir dendrogram oluşturulmuştur. Sonuç olarak, LBP, kromozom görüntülerini kullanarak bitkileri sınıflandırmak için bir araç olarak kabul edilebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Bitki sınıflandırması, kromozom, görüntü işleme, *Lallemantia*, yerel ikili örüntü

### **A Different Approach To The Chromosome Classification of Three *Lallemantia* Fisch. & C.A. Mey. Species By Using Local Binary Pattern (LBP)**

**ABSTRACT:** The traditional karyotype studies are widely used in plant systematics to evaluate the positions of species. However, studies sometimes can not solve systematic problems. In recent years, computer-based systems have gained importance in contributing to the solution of the taxonomical problems. The aim of this study was to identify three *Lallemantia* species by using the LBP (local binary pattern) texture operator based on chromosome images in mitosis. LBP is the one of the most powerful and easily applicable tool for identifying local image patterns. In this study, microphotographs of 641 cells in the metaphase stage of mitosis were used. The LBP involves preprocessing, feature extraction, feature selection, and classification. Decision tree (DT), linear discriminant (LD), support vector machine (SVM), K-nearest neighbor (KNN), bagged tree (BT) and ensemble subspace nearest neighbor (SNN) were used in the classification stage. This study found that the best acting classifier was SNN because achievement rate was one hundred percent. Also, a dendrogram was formed to measure the similarity among the three species. As a result, LBP can be accepted as a tool for classifying plants by using chromosome images.

**Keywords:** Chromosome, image processing, *Lallemantia*, local binary pattern, plant classification.

<sup>1</sup>İrfan EMRE ([Orcid ID:0000-0003-0591-3397](https://orcid.org/0000-0003-0591-3397)), Department of Basic Education, Faculty of Education, Firat University, Elazığ, Turkey

<sup>2</sup>Türker TUNCER ([Orcid ID: 0000-0002-1425-4664](https://orcid.org/0000-0002-1425-4664)), Şengül DOĞAN ([Orcid ID: 0000-0001-9677-5684](https://orcid.org/0000-0001-9677-5684)) Department of Digital Forensics Engineering, Faculty of Technology, Firat University, Elazığ, Turkey

<sup>3</sup>Murat KURŞAT ([Orcid ID: 0000-0002-0861-4213](https://orcid.org/0000-0002-0861-4213)), Faculty of Science and Arts, Department of Biology, Bitlis Eren University, Bitlis, Turkey,

<sup>4</sup>Osman GEDİK ([Orcid ID: 0000-0002-4816-3154](https://orcid.org/0000-0002-4816-3154)), Faculty of Agriculture, Department of Field Crops, Kahramanmaraş Sutçu Imam University, Kahramanmaraş, Turkey,

<sup>5</sup>Yaşar KIRAN ([Orcid ID: 0000-0002-3225-2080](https://orcid.org/0000-0002-3225-2080)), Faculty of Science and Arts, Department of Biology, Firat University, Elazığ, Turkey

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: İrfan EMRE, e-mail: iemre@firat.edu.tr

## INTRODUCTION

Plant identification is a vital process for scientists working in such fields as agronomy, natural products, and bio-conservation (Lee et al., 2017). They use identification keys including some morphological, anatomical, phytochemical, karyological, and molecular characters to describe species (Wang et al., 2014). However, these classical techniques require specialized botanists and are time consuming (Lee et al., 2017; Goyal & Kumar, 2018). Moreover, sometimes these techniques are insufficient for solving taxonomical problems. Therefore, the automatic identification steps based on image features has recently gained in importance (Yigit et al., 2019). Similarly, these systems use many characters that exists in flora including color and shape of leaf, flower, fruit, root and cell type, and tissue or genetic structures (Bhardwaj & Kaur, 2013).

Today, image processing and machine learning have become valuable alternative systems for classifying species among (Lukie et al., 2017). The aim of image processing is to manipulate pixels to obtain the best clarity in the images and to extract target zones by using an input image (Uchida, 2013). Local binary pattern (LBP) is one of the strongest and most popular tools for obtaining local image patterns (Kazak & Koç, 2016; Muthevi & Uppu, 2017; Tuncer and Aydemir, 2020). LBP, proposed by Ojala et al. (2000, 2002), is characterized as a gray scale texture developed from the main texture in local neighborhood pixels (Kaya et al., 2015). In LBP, which is based on the principle of determining a binary number obtained by matching the pixel with its eighth neighbor, 0 is preferred if the neighboring pixel is smaller than the center pixel, while 1 is preferred if it is larger than the center pixel (Zhao et al. 2012; Ozturk & Kurnaz, 2020).

The aim of present study is to classify three *Lallemantia* species grown in Turkey by using LBP based on metaphase chromosome images in mitosis. *Lallemantia* Fisch. & C.A. Mey., a small genus belong to Lamiaceae, is the genus for the case study; it includes five annual and perennial species distributed in the Himalayas, southwestern Asia, and Europe (Kamrani & Riahi, 2018). In Turkey, the genus is represented by three species including *Lallemantia peltata* (L.) Fisch. & Mey., *Lallemantia iberica* (Bieb.) Fisch. & Mey., and *Lallemantia canescens* (L.) Fisch. & Mey. (Davis, 1982; Guner & Aslan, 2012; Ozcan et al., 2014). *L. canescens* is perennial while the *L. peltata* and *L. iberica* species are annual plants (Edmondson, 1982). The *Lallemantia* species in Turkey have  $2n=14$  chromosomes (Ozcan et al., 2014). Detailed chromosome studies are extensively used in comparative cytotaxonomy (Martin et al., 2018). Some studies have used plant leaves by LBP to make a classification (Pahikkala et al., 2015; Grinblat et al., 2016; Saleem et al., 2019), but chromosome images-related studies have not been found. This study was the first to use LBP based on chromosome images to do plant classification, as far as we know. Also, this study was intended to contribute both to plant systematics and image processing studies.

## MATERIALS AND METHODS

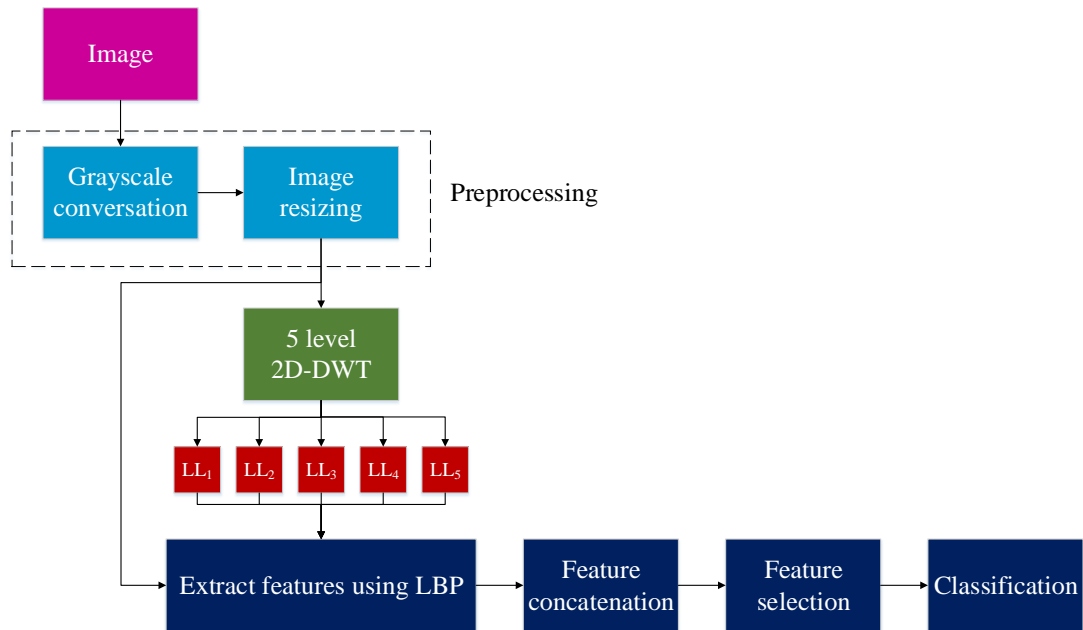
### Dataset

Plant materials were collected from natural habitats, and samples were deposited at the Bitlis Eren University Herbarium (BEUH). A karyological analysis of three *Lallemantia* species was performed according to the method proposed by Elci (1982). Microphotographs of 641 cells in the metaphase stage of mitosis belong to each species were taken using an Olympus BX51 light microscope after the staining process was completed. This study demonstrated that three species of *Lallemantia* had  $2n=14$  chromosomes including median (m) and sub-median (sm) centromeres. The chromosome images of three *Lallemantia* species were then utilized as input for the proposed method. Attributes of the used

dataset are given as follows. The used dataset consisted of three classes. There were 211, 216, and 214 images in the first, second, and third classes (first class, *L. canescens*; second class, *L. peltata*; third class, *L. iberica*), respectively. These images are RGB and JPG, and the size of the images was 3072 x 2304.

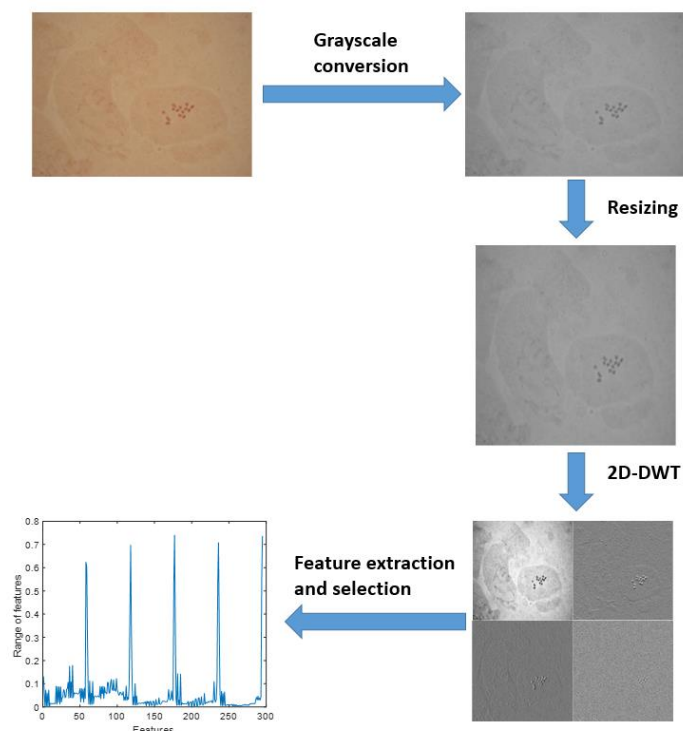
### A Local Binary Pattern (LBP) -Based Multi-Level Learning Model

To distinguish three *Lallemantia* species by using metaphase chromosome images LBP-based multi-level learning model was proposed. The suggested method included preprocessing, feature extraction, feature selection, and classification levels. A block diagram of the suggested learning method is as Figure 1:



**Figure 1.** Schematically explanation of the proposed method.

A pictorial example of this method also is shown in Figure. 2.



**Figure 2.** Pictorial example of the proposed 2D-DWT and LBP based biological image classification

## Preprocessing

The first stage of the method was preprocessing. Three operations were applied to an image in preprocessing stage, gray-scale conversation, image resizing, and five leveled 2D-DWT.

Step 1: Convert RGB image to gray-scale image.

$$gray = R * 0.299 + G * 0.587 + B * 0.114 \quad (1)$$

where  $gray$  was grayscale image and  $R, G$  and  $B$  are the red, green, and blue layers of the RGB image.

Step 2: Resize the grayscale image to a 512 x 512-sized image.

$$gray = imresize(gray, 512 \times 512) \quad (2)$$

where  $imresize$  defines the resizing function.

Step 3: Apply a five-level 2D-DWT to the resized image and obtain  $LL_1, LL_2, LL_3, LL_4$ , and  $LL_5$  sub-bands.

The equations of the five-level DWT method were as follows:

$$[LL_1, LH_1, HL_1, HH_1] = dwt2(gray, haar) \quad (3)$$

$$[LL_2, LH_2, HL_2, HH_2] = dwt2(LL_1, haar) \quad (4)$$

$$[LL_3, LH_3, HL_3, HH_3] = dwt2(LL_2, haar) \quad (5)$$

$$[LL_4, LH_4, HL_4, HH_4] = dwt2(LL_3, haar) \quad (6)$$

$$[LL_5, LH_5, HL_5, HH_5] = dwt2(LL_4, haar) \quad (7)$$

where  $dwt2(.,.)$  2D-DWT,  $LL_i, LH_i, HL_i$ , and  $HH_i$  are  $i^{\text{th}}$  level low-low, low-high, high-low, and high-high sub bands of the image,  $i$  was the number of levels, and  $i = \{1, 2, \dots, 5\}$ .

## Feature Extraction

In this stage, a feature extraction process was performed by using the LBP method. The suggested method was multilevel feature extraction; therefore, the properties were subtracted from the resulting gray-level image and the  $LL_i$  sub bands. The LBP algorithm, the basic building block of the method, was presented in the following section.

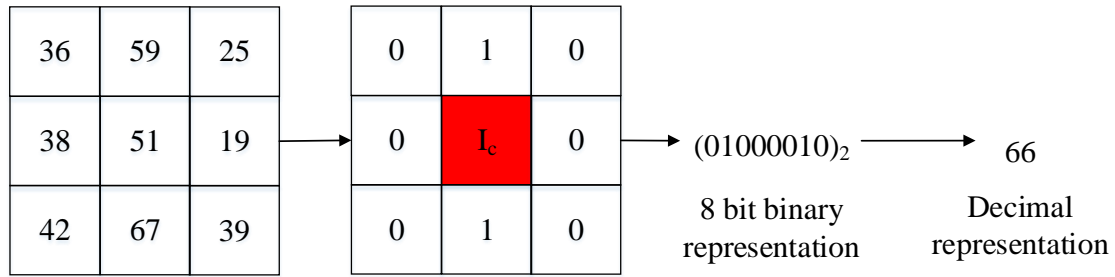
## Local Binary Pattern

LBP is a descriptor, and digital imagery is used to extract features from the digital images (Chang et al., 2013; Lu et al., 2013). This method was proposed by Ojala et al. as an image texture element and is used in many fields (Ojala et al., 2000, 2002). An LBP operator creates a medium for developing a number of descriptors such as dual cross pattern (DCP), local quadruple pattern (LQPAT), and local ternary pattern (LTP) (Liao et al., 2010; Ding et al., 2015; Chakraborty et al., 2017). These methods are called LBP-like descriptors (Berata & Pedrycz, 2013; El-Khadiri et al., 2018). The LBP operator extracts a feature using the basic neighborhood matrix of 3 x 3 dimensions. First, the image was divided into 3 x 3-dimension overlapping blocks, and the binary feature of every block was obtained from the signum function (Hong et al., 2014). The equations of the LBP were presented in Equation 1 and 2.

$$LBP(I_c) = \sum_{i=1}^8 s(I_i - I_c) \times 2^{i-1} \quad (8)$$

$$s(t) = \begin{cases} 1, & t \geq 0 \\ 0, & t < 0 \end{cases} \quad (9)$$

The nominal value given in the example in Figure 3 were obtained by using Equations 1 and 2.



**Figure 3.** Schematic illustration of LBP

Using the steps illustrated in Figure 3, the decimal value of each block was obtained, and the LBP image was obtained by using these values. The histogram of the calculated LBP image was subtracted and used as the histogram property vector. The length of the histogram was  $2^8 = 256$  because every block was encoding with eight bites.

The procedure of the LBP-based feature extraction function was given in Algorithm 1.

**Algorithm 1.** Feature generation procedure of the LBP.

Procedure: $LBPFeatExt(Im)$
Input: Input image ( $Im$ ) with size of $W \times H$
Output: LBP feature ( $feat_{LBP}$ ) with size of 256.
<pre> 1: <math>feat_{LBP} = zeros(1,256)</math>; //Assign LBP features to 0 because LBP is a histogram-based feature extraction method. 2: for <math>s = 1</math> to <math>W - 2</math> do 3:   for <math>d = 1</math> to <math>H - 2</math> do 4:     <math>window = Im(s:s + 2, d:d + 2)</math>; // Windows division. 5:     <math>counter = 1</math>; 6:     <math>LBP(s, d) = 0</math>; // Pixel of the LBP image defining. 7:     for <math>i = 1</math> to 3 do 8:       for <math>j = 1</math> to 3 do 9:         if <math>i \neq 2</math> or <math>j \neq 2</math> then 10:            <math>LBP(s, d) = LBP(s, d) + [window(i, j) \geq window(2,2)] * 2^{8-counter}</math>; 11:            <math>counter = counter + 1</math>; 12:         end if 13:       end for j 14:     end for i 15:     <math>feat_{LBP}(s, d) = feat_{LBP}(s, d) + 1</math>; 16:   end for d 17: end for s </pre>

By using the  $LBPFeatExt$  procedure defined in Algorithm 1, features were generated. This process was mathematically defined below,

$$feat^1 = LBPFeatExt(gray) \quad (10)$$

$$feat^2 = LBPFeatExt(LL_1) \quad (11)$$

$$feat^3 = LBPFeatExt(LL_2) \quad (12)$$

$$feat^4 = LBPFeatExt(LL_3) \quad (13)$$

$$feat^5 = LBPFeatExt(LL_4) \quad (14)$$

$$feat^6 = LBPFeatExt(LL_5) \quad (15)$$

where  $feat^i$  is  $i^{\text{th}}$  level feature with length of 256.



### Feature Concatenation

Six feature vectors with 256 properties were obtained in the feature extraction stage. At this stage, a single final feature vector was calculated by combining the resulting feature vectors. The final feature vector contained 1536 features,

$$feat^{final} = feat^1|feat^2|feat^3|feat^4|feat^5|feat^6 \quad (16)$$

where | was the concatenation operator and  $feat^{final}$  describes the final features.

### Feature Selection

The ReliefF feature selection function is one of the frequently used feature selection and reduction functions in the literature. ReliefF is a function that calculates the weight using the distance metric (Robnik-Šikonja & Kononenka, 2003). ReliefF produces both positive and negative weights. Negative-weighted properties are called unnecessary properties. In this study, feature selection was performed by eliminating negative ReliefF weights.

### Classification

In the classification stage, six classifiers were selected: decision tree (DT), linear discriminant (LD), support vector machine (SVM), K nearest neighbor (KNN), bagged tree (BT), and ensemble subspace nearest neighbor (SNN), respectively (Sun et al., 2007; Garcia-Pedarajas & Ortiz-Bayer, 2009; Nanni & Franco, 2011). These classifiers were run using MATLAB Classification Learner, and the default settings are used. Training and testing were performed using 10-fold cross validation. The main reason for using these classifiers was to show that the extracted features were distinctive because these classifiers are conventional classifiers.

## RESULTS AND DISCUSSION

To obtain the results of the proposed LBP-DWT based method, six conventional classifiers were used, and the results obtained from these classifiers are presented in this section (Reyad et al., 2014). In addition, confusion matrices belonging to each classifier are given in order to clearly show the achievements obtained according to the classes. The most commonly used classification parameter in the literature is accuracy and the accuracy formula is Eq. 17 (Tuncer et al., 2019).

$$CA = \frac{ntp + ntn}{ntp + nfp + ntn + nfn} \quad (17)$$

CA: Classification accuracy

ntp: Number of true positives

ntn: Number of true negatives

nfp: Number of false positives

nfn: Number of false negatives

The calculated CA values are given in Table 1.

**Table 1.** Accuracy values of the proposed DWT-LBP based classification method according to used classifiers

	DT	LD	SVM	KNN	BT	SNN
Accuracy	81.0 %	96.9 %	99.5 %	%99.4	93.9 %	100.0 %

As shown in Table 1, the best performing classifier was SNN which achieved a classification rate of 100.0%. Among these classifiers, DT had the lowest performance rate with an 81.0% yield. The confusion matrices obtained according to classifiers are given in Figure 4.

Decision Tree

True Class	1	172	24	15
	2	22	175	19
	3	17	25	172
		1	2	3
		Predicted class		

Linear Discriminant

True Class	1	208	1	2
	2	2	207	7
	3	3	5	206
		1	2	3
		Predicted class		

Quadratic SVM

True Class	1	210		1
	2		215	1
	3		1	213
		1	2	3
		Predicted class		

Fine KNN

True Class	1	210		1
	2		215	1
	3	1	1	212
		1	2	3
		Predicted class		

Bagged Tree

True Class	1	204	1	6
	2	12	194	10
	3	2	8	204
		1	2	3
		Predicted class		

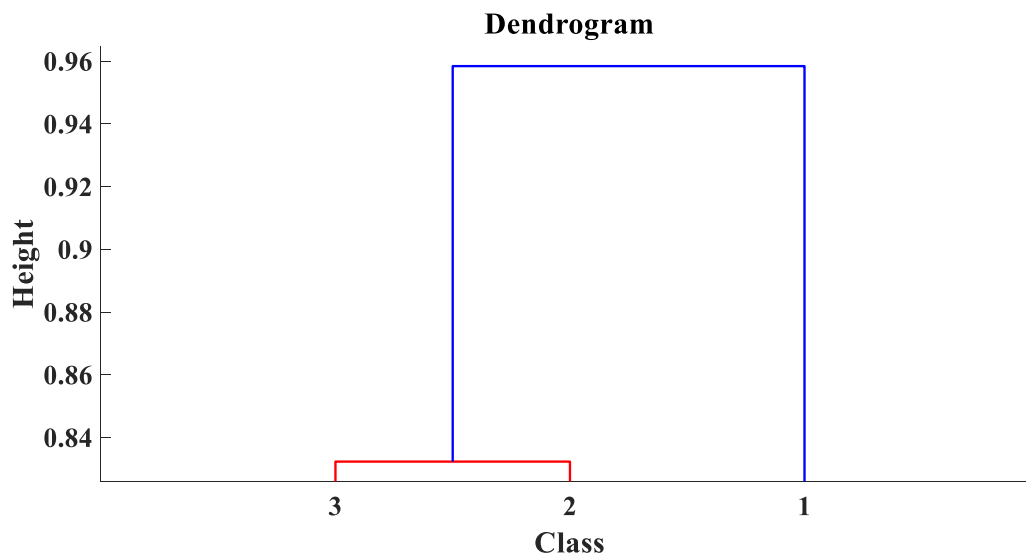
Ensemble Subspace KNN

True Class	1	211		
	2		216	
	3			214
		1	2	3
		Predicted class		

Figure 4. The confusion matrices obtained according to classifiers

Confusion matrices were used to show performance rates by class. The green cells represent correct predictive values while pink cells indicate wrong predictive values. The green cell values in each row and the sum of the values in that row show the performance rate for that class. For example, according to the confusion matrix of the BT, the success rates of the first, second, and third classes was calculated as  $\frac{204}{211}$ ,  $\frac{194}{216}$  and  $\frac{204}{214}$ , respectively.

The similarity of these species were calculated by using the extracted and selected features, and dendrogram graph was constructed. The dendrogram graph is shown in Figure 5 (Seo et al., 2003).



**Figure 5.** Constructed dendrogram of studied *Lallemantia* species by using the extracted and selected features (1: *L. canescens*; 2: *L. peltata* and 3: *L. iberica*)

Morphologically, it has been reported that *L. iberica* is very similar to *L. canescens* because they have an analogous wide bracteole and a dentate calyx and exceed the corolla tube format (Kamrani & Riahi, 2018). *L. canescens* diverges only from *L. iberica* by being perennial (Edmondson, 1982). However, *L. peltata* and *L. iberica* are the annual species with a represented close relationship, and they clustered together, but *L. canescens* placed at a distance in the dendrogram in this study (Figure 4). These results agree with some studies in the literature (Edmondson, 1982; Ozcan et al., 2014; Dolatyari & Kamrani, 2015). Ozcan et al. (2015) showed that *L. peltata* had a more symmetrical karyotype than *L. canescens*, and they indicated that *L. canescens* had a slightly longer total chromosome length than the annual species. Also, Dolatyari & Kamrani (2015) indicated that the total karyotype length of *L. canescens* was slightly lower than that of some annual species, but they found that *Lallemantia* is a karyologically stable genus. Similarly, Dinc et al. (2009) found that the pollen characteristics of the annual species (*L. iberica* and *L. peltata*) were similar. Nonetheless, they determined that the annual *L. iberica* and perennial *L. canescens* have similar nutlet characteristics which are most important morphological feature in the *Lallemantia* in determining the interspecific classification (Dinc et al., 2009). Moreover, results from Koohder et al. (2018) showed that *L. canescens* and *L. iberica* clustered in close proximity while *L. peltata* placed a distinct distance from them according to the pollen morphological analysis. Likewise, Kamrani & Riahi (2018) found that *L. canescens* and *L. iberica* represented a close relationship based on molecular data.

## CONCLUSION

In this study, an LBP based classification method was presented. The aim of the proposed LBP-based multilevel classification method was to create an automated recognition of the *Lallemantia* species by using chromosome images. LBP was utilized as feature extractor, and it generated features from each layer. Then, the generated features were concatenated, and these concatenated features were reduced by using ReliefF. In the classification phase, six conventional classifiers were used to obtain a comprehensive benchmark. According to results, the SNN classifier achieved 100% classification accuracy. In conclusion, the advantages of the method are as follows:

- A high accuracy rate was obtained in biological data by using artificial intelligence.
- By using the proposed method based on this data set, the human factor was eliminated for classification of plant species.
- The proposed method had a high performance level because 100% CA was obtained.
- A quick and simple method was been proposed in this study.
- DWT and LBP methods were shown to be effective methods for solving this problem.
- In this study, both classification and clustering were best performed.
- This study showed that *L. iberica* and *L. peltata* are annual plants different from *L. canescens* which is a perennial plant.

## Conflicts of Interest

The authors declare that no conflicts of interest exist.

## Author's Contributions

The authors declare that they have contributed to the article.

## REFERENCES

- Bereta M, Pedrycz W, 2013. Reformat M. local descriptors and similarity measures for frontal face recognition: A comparative analysis. *Journal of Visual Communication and Image Representation* 24: 1213-31.
- Bhardwaj A, Kaur M, 2013. A review on plant recognition and classification techniques using leaf images. *Int J Eng Trends Technol.*: 86-91.
- Chakraborty S, Singh SK, Chakraborty P, 2017. Local quadruple pattern: A novel descriptor for facial image recognition and retrieval. *Computers & Electrical Engineering* 62: 92-104.
- Chang JD, Chen BH, Tsai CS, 2013. LBP-based fragile watermarking scheme for image tamper detection and recovery. *2013 International Symposium on Next-Generation Electronics IEEE*: 173-6.
- Davis P, 1982. *Flora of Turkey and The East Aegean Island*. Edinburgh University Press 7.
- Dinc M, Munevver P, Dogu S, Yildirimli S, 2009. Micromorphological studies of *Lallemantia* L.(Lamiaceae) species growing in Turkey. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 51: 45-54.
- Ding C, Choi J, Tao D, Davis LS, 2015. Multi-directional multi-level dual-cross patterns for robust face recognition. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 38: 518-531.
- Dolatyari A, & Kamrani A, 2015. Chromosome number and morphology of some accessions of four *Lallemantia* Fisch & CA Mey.(Lamiaceae) species from Iran. *Wulfenia* 2: 127-35.
- Edmondson J, 1982. *Lallemantia* Fisch. & Mey. In: Davis, P. H. (ed.). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh University Press Edinburgh 7: 297-313.
- Elci S, 1982. Research methods and observations in cytogenetics. *Firat University Faculty of Science and Arts Publishing (in Turkish)* 3: 37-85.

- El Khadiri I, Kas M, El Merabet Y, Ruichek Y, Touahni R, 2018. Repulsive-and-attractive local binary gradient contours: New and efficient feature descriptors for texture classification. *Information Sciences* 467: 634-53.
- García-Pedrajas N, Ortiz-Boyer D, 2009. Boosting k-nearest neighbor classifier by means of input space projection. *Expert Systems with Applications* 36: 10570-82.
- Goyal N, Kumar N, 2018. Plant species identification using leaf image retrieval: A study. 2018 *International Conference on Computing, Power and Communication Technologies (GUCON) IEEE*: 405-411.
- Grinblat GL, Uzal LC, Larese MG, Granitto PM, 2016. Deep learning for plant identification using vein morphological patterns. *Computers and Electronics in Agriculture* 127: 418-24.
- Guner A, Aslan S, 2012. Plant lists of Turkey: (vascular plants). Nezahat Gokyigit Botanical Garden Publishing (in Turkish).
- Hong X, Zhao G, Pietikäinen M, Chen X, 2014. Combining LBP difference and feature correlation for texture description. *IEEE Transactions on Image Processing* 23: 2557-68.
- Kamrani A, Riahi M, 2018. Using molecular data to test the monophyly of *Lallemantia* in the subtribe Nepetinae (Menthae, Lamiaceae). *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology* 152: 857-62.
- Kaya Y, Kayci L, Uyar M, 2015. Automatic identification of butterfly species based on local binary patterns and artificial neural network. *Applied Soft Computing* 28: 132-7.
- Kazak N, Koç M, 2016. Performance analysis of spiral neighbourhood topology based local binary patterns in texture recognition. *International Journal of Applied Mathematics, Electronics and Computers* 4(special issue): 383-341.
- Lee SH, Chan CS, Mayo SJ, Remagnino P, 2017. How deep learning extracts and learns leaf features for plant classification. *Pattern Recognition* 71: 1-13.
- Liao WH, 2010. Region description using extended local ternary patterns. 2010 20th International Conference on Pattern Recognition *IEEE*: 1003-1006.
- Lukic M, Tuba E, Tuba M, 2017. Leaf recognition algorithm using support vector machine with Hu moments and local binary patterns. 2017 *IEEE 15th International Symposium on Applied Machine Intelligence and Informatics (SAMI)*: IEEE: 000485-90.
- Luo Y, Wu CM, Zhang Y, 2013. Facial expression recognition based on fusion feature of PCA and LBP with SVM. *Optik-International Journal for Light and Electron Optics* 124: 2767-70.
- Martin E, Yildiz HK, Kahraman A, Binzat OK, Eroglu HE, 2018. Detailed chromosome measurements and karyotype asymmetry of some *Vicia* (Fabaceae) taxa from Turkey. *Caryologia* 71: 224-32.
- Muthevi A, Uppu, RB, 2017. Leaf classification using completed local binary pattern of textures. 2017 *IEEE 7th International Advance Computing Conference (IACC) IEEE*: 870-874.
- Nanni L, Franco A, 2011. Reduced reward-punishment editing for building ensembles of classifiers. *Expert Systems with Application* 38: 2395-2400.
- Ojala T, Pietikäinen M, Mäenpää T, 2000. Gray scale and rotation invariant texture classification with local binary patterns. *European Conference on Computer Vision Springer*: 404-20.
- Ojala T, Pietikäinen M, Mäenpää T, 2002. Multiresolution gray-scale and rotation invariant texture classification with local binary patterns. *IEEE Transactions on Pattern Analysis&Machine Intelligence*: 971-987.
- Ozcan T, Gezer E, Martin E, Dirmenci T, Altinordu, F. 2014. Karyotype analyses on the genus *Lallemantia* Fisch. & CA Mey.(Lamiaceae) from Turkey. *Cytologia* 79: 553-559.
- Ozturk E, Kurnaz C, 2020. Görünüm tabanlı yuz tanıma yöntemleri kullanılarak cinsiyet belirleme. *European Journal of Science and Technology special issue*: 111-120.
- Pahikkala T, Kari K, Mattila H, Lepisto A, Teuhola J, Nevalainen OS, et al. 2015. Classification of plant species from images of overlapping leaves. *Computers and Electronics in Agriculture* 118: 186-92.
- Patterson RF, Savas E, 2016. On P-convergence of four-dimensional weighted sums of double random variables. *Sains Malaysiana* 45(7): 1177-1181.

- Reyad YA, Berbar MA, Hussain M, 2014. Comparison of statistical, LBP, and multi-resolution analysis features for breast mass classification. *Journal of Medical Systems* 38:100.
- Robnik-Šikonja M, Kononenko, I. 2003. Theoretical and empirical analysis of ReliefF and RReliefF. *Machine Learning* 53: 23-69.
- Saleem G, Akhtar M, Ahmed N, Qureshi, W, 2019. Automated analysis of visual leaf shape features for plant classification. *Computers and Electronics in Agriculture* 157: 270-80.
- Sun S, Zhang C, Zhang D, 2007. An experimental evaluation of ensemble methods for EEG signal classification. *Pattern Recognition Letters* 28: 2157-2163.
- Seo J, Bakay M, Zhao P, Chen YW, Clarkson P, Shneiderman B, et al. 2003. Interactive color mosaic and dendrogram displays for signal/noise optimization in microarray data analysis. *2003 International Conference on Multimedia and Expo ICME'03 Proceedings (Cat No 03TH8698) IEEE*: 461.
- Tuncer T, Dogan S, Pławiak P, Acharya UR, 2019. Automated arrhythmia detection using novel hexadecimal local pattern and multilevel wavelet transform with ECG signals. *Knowledge-based Systems* 186: 104923.
- Tuncer T, Aydemir E, 2020. An automated local binary pattern ship identification method by using sound. *Acta Infologica* 2020 4(1):57-63.
- Uchida S, 2013. Image processing and recognition for biological images. *Development, Growth & Differentiation* 55: 523-49.
- Wang X, Liang, J, Guo F, 2014. Feature extraction algorithm based on dual-scale decomposition and local binary descriptors for plant leaf recognition. *Digital Signal Processing* 34: 101-107.
- Yigit E, Sabanci K, Toktas A, Kayabasi A, 2019. A study on visual features of leaves in plant identification using artificial intelligence techniques. *Computers and Electronics in Agriculture* 156: 369-77.
- Zhao Y, Huang DS, Jia W, 2012. Completed local binary count for rotation invariant texture classification. *IEEE Transactions on Image Processing* 21: 4492-4497.

**Atıf İçin:** Akar F, Akgül İ, 2022. Derin Öğrenme Modeli ile Yüz İfadelerinden Duygu Tanıma. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 69-79.

**To Cite:** Akar F, Akgül İ, 2022. Emotion Recognition from Facial Expressions by Deep Learning Model. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 69-79.

## **Derin Öğrenme Modeli ile Yüz İfadelerinden Duygu Tanıma**

Funda AKAR<sup>1\*</sup>, İsmail AKGÜL<sup>1</sup>

**ÖZET:** Yüz ifadesinden duygu tanıma; insan-bilgisayar etkileşimi, duygusal hesaplama vb. gibi birçok bilgisayarla görme alanında uygulanabilen güncel bir araştırma konusudur. Bu çalışmada, KDEF ve PICS veri setleri kullanılarak derin öğrenme ile duygu tanıma yönelik bir uygulama yapılmıştır. Öznitelik çıkarımı için derin öğrenme tekniklerinden olan ve yapay sinir ağları içeren bir yapay zekâ yaklaşımı olan Evrişimsel Sinir Ağı (ESA) kullanılarak yeni bir model geliştirilmiştir. Derin öğrenmenin yüksek başarımı için büyük veri setine ihtiyaç duyulmaktadır. KDEF veri setinde 4900, PICS veri setinde 322 görüntü bulunmaktadır. Bu amaçla öncelikle PICS veri setindeki görüntü sayısının az olmasından dolayı veri artırma yöntemi ile görüntü çoğaltma işlemi uygulanmıştır ve PICS veri seti 4830 görüntüye çıkarılmıştır. Daha sonra bu iki farklı veri seti üzerinde ayrı ayrı eğitim gerçekleştirilerek geliştirilen yeni model test edilmiştir. ESA modellerinden olan VGGNet temel alınarak geliştirilen yeni model ile gerçekleştirilen çalışmada, her bir veri setinde yedi farklı duygu sınıfı (korku, öfke, öğrenme, mutluluk, nötr, üzüntü, şaşırma) ele alınmıştır. Geliştirilen model ile KDEF veri setinin geçerleme kümesinde %97.44, PICS veri setinin geçerleme kümesinde %98.24 doğruluk değerleri elde edilerek yüksek bir başarı oranına ulaşılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Derin öğrenme, evrişimsel sinir ağı, duygu tanıma

### **Emotion Recognition from Facial Expressions by Deep Learning Model**

**ABSTRACT:** Emotion recognition from facial expression is a current research topic that can be applied in the many fields of computer vision, such as human-computer interaction, emotional computing, etc. In this study, an application for emotion recognition through deep learning was made using KDEF and PICS datasets. A new model was established using the convolutional neural network (CNN), an artificial intelligence approach that involves artificial neural networks, which is one of the deep learning techniques for attribute inference. Large datasets are needed for the high performance of deep learning. There are 4900 images in the KDEF dataset and 322 images in the PICS dataset. For this purpose, primarily due to the small number of images in the PICS dataset, image iteration was applied with the data augmentation method, and the PICS dataset was increased to 4830 images. Then, the new model developed by conducting separate training on these two different datasets was tested. Seven different classes of emotion (afraid, angry, disgusted, happy, neutral, sad, surprised) were covered in each dataset in the study conducted with a new model developed based on VGGNet which is one of the CNN models. With the developed model, a high success rate was achieved by obtaining 97.44% accuracy values in the validation set of the KDEF and 98.24% accuracy values in the validation set of the PICS dataset.

**Keywords:** Deep learning, convolutional neural network, emotion recognition

<sup>1</sup>Funda AKAR ([Orcid ID: 0000-0001-9376-8710](https://orcid.org/0000-0001-9376-8710)), İsmail AKGÜL ([Orcid ID: 0000-0003-2689-8675](https://orcid.org/0000-0003-2689-8675)), Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Bilgisayar Mühendisliği Bölümü, Erzincan, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Funda AKAR, e-mail: fakar@erzincan.edu.tr

## GİRİŞ

Yüz ifadesi, insanların günlük iletişimde içsel duyguları ifade etmenin en açık göstergelerinden biridir. Bir kişinin fiziksel veya ruhsal durumu, yüz ifadeleri analiz edilerek elde edilebilir. Bu nedenle yüz ifadesi tanıma; otopilot, insan-bilgisayar etkileşimi, tıbbi tedavi ve yüz ifadesi ile alakalı diğer alanlarda büyük öneme sahiptir ve giderek daha önemli bir araştırma yönü haline gelmiştir. Yüz ifadesinden duygu tanıma, otizm ve şizofreninin belirlenmesi, uyku bir sürücünün saptanması, alzheimer hastalığı veya şizofreninin erken aşamalarında anormalliklerin belirlenmesi ve suç tahmin sistemleri gibi çeşitli uygulamalar için kullanılmıştır (Mehta ve ark., 2019). Ayrıca yüz ifadeleri eğitim alanını uygulamalarında da kullanılmaktadır (Özdemir ve Karaman, 2017).

Otomatik duygu tanımanın kullanımı; dijital reklam, çevrimiçi oyunlar, müşterilerin geri bildirim değerlendirmesi, sağlık hizmetleri gibi çeşitli akıllı sistemlerde (e-sağlık, öğrenme, turizm için öneri, akıllı şehir, akıllı konuşma vb.) büyük bir potansiyele sahiptir. Bu sistemlerin çoğu metin veya ifade verilerine dayanmaktadır (Hossain ve Muhammad, 2019).

Makine öğrenmesinde, çeşitli yüz ifadesi tanıma algoritmaları önerilmiştir. Ancak görüntülerdeki karmaşıklık, çeşitlilik, üst üste gelme, aydınlatma problemleri ve yüz ifadesi tanımadaki diğer zorluklar nedeniyle, pratik uygulamalardaki tanıma doğruluğu hala tatmin edici değildir (J. Li ve ark., 2020).

Son yıllarda sinir ağlarında derin öğrenme, etkili modeller ortaya çıkaran çok sayıda derin öğrenme mimarisine yol açmış ve çeşitli alanlarda çok büyük başarılar elde etmiştir (Fayek ve ark., 2017). Bu alanlardan biri olan yüz ifadelerini tanıma, bilgisayarlı görme ve yapay zekâ alanında önemli bir role sahiptir (Dandıl ve Özdemir, 2019). Derin öğrenme, duygu tanıma problemleri için sınıflandırma verimliliği konusunda gerçek bir umut vadetmiştir (Ruiz-Garcia ve ark., 2016). Özellikle derin evrişimli ağlar görüntülerin, videoların, konuşmanın ve sesin işlenmesinde çığır açmıştır, yinelenen ağlar ise metin ve konuşma gibi sıralı verilere ışık tutmuştur. 2000'lerin başından beri, ConvNets, görüntülerdeki nesnelerin ve bölgelerin algılanması, bölümlendirilmesi ve tanınması için büyük bir başarıyla uygulanmaktadır. Bunlara örnek olarak trafik işareti tanıma, biyolojik görüntülerin özellikle konektomikler için bölümlere ayrılması ve doğal görüntülerde yüzlerin, metinlerin, yayaların ve insan vücutlarının tespiti gibi etiketlenmiş verilerin nispeten fazla olduğu uygulamalar, otonom robotlar, otonom araçlar verilebilir. ConvNets'in yakın zamandaki uygulamalı en büyük başarısı yüz tanımadır (Lecun ve ark., 2015).

Dandıl ve Özdemir 2019 yılında yaptıkları çalışmada klasik evrişimsel sinir ağı AlexNet ile gerçek zamanlı video karelerinden yüz ifadeleri temelinde bir duygu tanıma sistemi önermiştir (Dandıl ve Özdemir, 2019). Chen ve ark. 2015 yılında yaptıkları çalışmada resim görüntülerinden duygu sınıflandırması yapmak için kullandıkları otomatik öğrenen evrişimsel sinir ağı (ESA) ile elle hazırlanmış özelliklere dayanan geleneksel yöntemlerden daha iyi performans almışlardır (Chen ve ark., 2015). Yapılan çalışmalar ESA'nın duygu tanıma özelliği çıkarmak için kullanılabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada, derin öğrenme tekniklerinden olan evrişimsel sinir ağı kullanılarak yüz ifadelerini içeren görüntüler üzerinden bir duygu tanıma modeli önerilmiştir. Önerilen model klasik evrişimsel sinir ağlarından olan VGGNet temel alınarak yeniden oluşturulmuş bir modeldir. KDEF ve PICS veri setlerinden elde edilen görüntüler; korku, öfke, iğrenme, mutluluk, nötr, üzüntü, şaşırma olmak üzere yedi duygu için sınıflandırılmıştır. Kullanılan veri setleri ayrı ayrı ESA ile oluşturulan model ile eğitilmiştir.

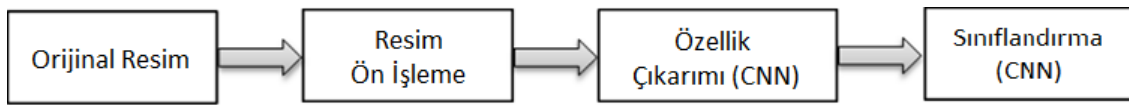


Çalışmanın geri kalanı aşağıdaki gibi yapılandırılmıştır. Bölüm 2’de veri seti ve ön işleme, geliştirilen ESA modeli, kullanılan ortam ve kütüphaneler hakkında bilgiler verilmiştir. Bölüm 3’te deneysel sonuçlar verilmiştir. Bölüm 4’te çalışma sonuçlandırılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Veri Seti ve Ön İşleme

Bu çalışmanın amacı, çeşitli görüntü türlerindeki farklı yüz ifadelerini otomatik olarak ve doğru bir şekilde tanıyan bir tanıma modeli tasarlamaktır. Genel olarak yüz ifadesi tanıma süreci; 1) resimlerin ön işlenmesi, 2) yüz ifadelerinin özellik çıkarımı ve 3) yüz ifadelerinin sınıflandırılması adımlarından oluşur. Yüz görüntüsünün ön işlemde geçirilmesi, yüz ifadesi tanımda önemli bir adım olarak kabul edilir (Eng ve ark., 2019). Önerilen yöntemin akış diyagramı Şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1. Önerilen yöntemin akış diyagramı

Resim ön işleme adımında, öncelikle orijinal boyuttaki resimlerde OpenCV CropFace görüntü işleme tekniği kullanılarak gözlerin konumu tespit edilip yüz bölgesinin, kaşların hemen üstünden ve çene hizasından olacak şekilde Python kodu ile kesilerek resimler otomatik olarak yeniden boyutlandırılmıştır. Daha sonra tüm resimler 96\*96 piksel boyutunda gri seviyeye normalize edilmiştir. Son olarak Evrişimsel Sinir Ağı kullanılarak özellik çıkarımı ve sınıflandırma yapılmıştır. Evrişimsel Sinir Ağı Modeli Bölüm 2.2 de anlatılmıştır.

Duygu analizi konusunda kullanılan birçok veri seti bulunmaktadır. Çalışmada kolay erişilebilir ve kullanıma açık olduğu için kontrollü ortamlarda hazırlanmış KDEF (Lundqvist ve ark., 1998) ve PICS-Pain Expressions (Hancock, 2008) veri setleri kullanılmıştır. KDEF veri seti fazla sayıda görüntü içermesi bakımından derin öğrenme yöntemine uygun olduğu düşünülerek seçilmiştir. Daha az sayıda görüntü içeren PICS veri seti ise görüntü artırma yönteminin de uygulanıp sonuca etkisinin görülmesi amacıyla tercih edilmiştir.

### KDEF veri seti ve ön işleme

Karolinska Directed Emotional Faces (KDEF) veri seti, insan yüz ifadelerini içeren toplam 4900 resimden oluşmaktadır. Resim kümesi; 7 temel duygusal ifade (korku, öfke, iğrenme, mutluluk, nötr, üzüntü, şaşırma) sergileyen 20-30 yaş arası sakal, bıyık, küpe, gözlük ve görünür bir makyaj olmayan özel gri tişörtler giymiş 35 kadın ve 35 erkek olmak üzere toplam 70 kişi içermektedir. Her duygu ifadesi 5 farklı açıdan (tam sol, yarım sol, düz, yarım sağ, tam sağ) iki kez (A serisi, B serisi) görüntülenmiştir. Veri seti; boyutu 562\*762 piksel, çözünürlüğü 72 \* 72 dpi olan renkli 32 bit jpeg uzantılı resimlerden oluşmaktadır (Lundqvist ve ark., 1998).

Çalışmada KDEF veri setinde yer alan toplam 4900 resmin tamamı kullanılmıştır. Ele alınan resimler, gözlerin lokasyonu dikkate alınarak python kodu ile yüz hatlarını alacak şekilde 96\*96 piksel olarak yeniden boyutlandırılmış ve gri seviyeye (8 bit) dönüştürülmüştür. Bu ön işlemde sonra KDEF veri setine ait resimler ait olduğu duygunun altında etiketlenerek gruplandırılmıştır. Böylece çalışmada kullanılacak birinci veri seti oluşturulmuştur (Şekil 2).



Şekil 2. KDEF veri setinde 7 duyguya ait farklı açılardan görüntülenmiş a) Orijinal ve b) Ön İşlenmiş örnek resimler

### PICS-Pain Expressions veri seti ve ön işleme

Psychological Image Collection at Stirling (PICS) veri seti, 2D insan yüz ifadelerini içeren toplam 599 resimden oluşmaktadır. Resim kümesi; 7 temel duygusal ifadeye (korku, öfke, iğrenme, mutluluk, nötr, üzüntü, şaşırma) ek olarak 10 ağır ifadesi sergileyen farklı kıyafetler giymiş 13 kadın ve 10 erkek olmak üzere toplam 23 kişi içermektedir. Her duygu ifadesi tam karşıdan iki kez görüntülenmiştir. Veri seti; boyutu 720\*576 piksel, çözünürlüğü 72\*72 dpi olan renkli 24 bit jpeg uzantılı resimlerden oluşmaktadır (Hancock, 2008).

PICS veri setinde ağır içeren resimler çıkarılarak, 7 temel duygusal ifade içeren tek açıdan iki kez görüntülenmiş resimler alınarak her duygu için 46 (23 kişi, 2 kez) resim kullanılmıştır. Bu veri setinde kullanılan resimler de KDEF veri setindeki gibi, gözlerin lokasyonu dikkate alınarak python kodu ile yüz hatlarını alacak şekilde 96\*96 piksel olarak yeniden boyutlandırılmış ve gri seviyeye (8 bit) dönüştürülmüştür. Derin öğrenme kullanılarak duygu tanımayı gerçekleştirebilmek için veri setinde yeterli sayıda görüntünün olması gerekmektedir. Ağın iyi bir genelleme becerisine ulaşmasını sağlamak için yeterli eğitim verisi gereklidir. Ancak, PICS gibi halka açık veri setlerinin çoğunda eğitim için yeterli sayıda görüntü bulunmamaktadır. Veri miktarının az olması aşırı uyum sorununa ve ağın ezberlemesine yol açabilir. Bu nedenle veri artırma işlemi, yüz ifadesi tanıma için önemlidir (Huang ve ark., 2019; Shorten ve Khoshgoftaar, 2019; J. Li ve ark., 2020; S. Li ve Deng, 2020).

PICS veri setindeki resim sayısının az olmasından dolayı, bu çalışmada yetersiz verinin neden olduğu aşırı uyum ve ezberleme sorununu gidermek amacıyla, ağı eğitmek için veri artırma yöntemi kullanılmıştır. Veri artırma işleminde; 15 derece döndürme, yüzde 5 oranında genişliği kaydırma, yüksekliği kaydırma, kesme, yakınlaştırma ve yatayda döndürme yöntemleri farklı kombinasyonlarla uygulanmıştır. Şekil 3'te görüldüğü üzere her resimden 14 tane görüntü çoğaltılarak toplam 15 resim elde edilmiştir. Dolayısıyla her duygu için 690 resim elde edilerek, 7 duygu için toplam 4830 resim ele alınmıştır. Veri artırma ön işlemleri bittikten sonra PICS veri setine ait resimler ait olduğu duygunun altında etiketlenerek gruplandırılmıştır. Böylece çalışmada kullanılacak ikinci veri seti oluşturulmuştur (Şekil 4).



Şekil 3. PICS veri setine uygulanan veri artırma yöntemi sonucunda elde edilen Artırılmış örnek resimler



Şekil 4. PICS veri setinde 7 duyguya ait Orijinal ve Ön İşlenmiş örnek resimler

### Evrişimsel Sinir Ağı (ESA) Modeli

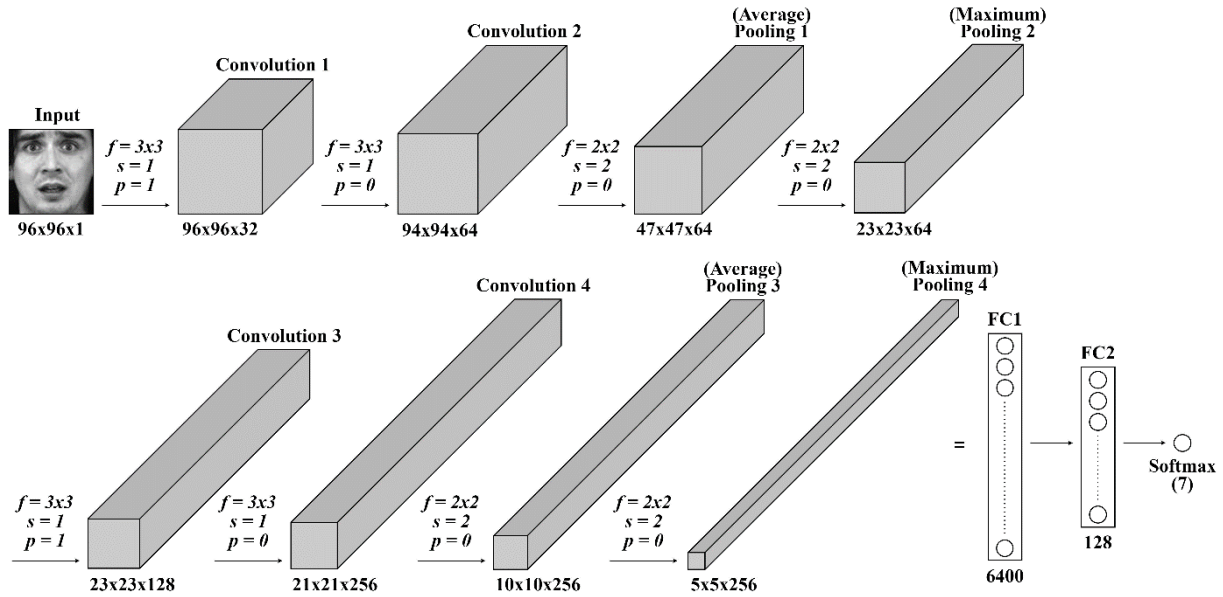
Derin modellerin sağlam ve soyut öznitelikler çıkarabildiği iyi bilinmektedir (Xu ve ark., 2015). Son yıllarda bilgisayarlı görüde en yaygın kullanılan derin öğrenme modellerinden biri ESA'dır (Altan, 2019). Derin öğrenme ve bilgisayarlı görüde temel oluşturan ESA, 1998 yılında Yann LeCun ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Yann LeCun ve arkadaşları çok katmanlı ileri beslemeli yapay sinir ağlarının bir alt türü olan ESA kullanarak oluşturdukları LeNet-5 modeli ile rakamları sınıflandırmışlardır (LeCun ve ark., 1998). 1998 yılından sonra 2012 yılına kadar ESA konusunda fazla bir ilerleme gerçekleşmemiştir. ESA'nın temelini oluşturan LeNet-5 modelinden sonra bilgisayarların kapasite olarak gelişmesinden dolayı temel bileşenleri birbirine benzer olan AlexNet (Krizhevsky ve ark., 2012), VGGNet (Simonyan ve Zisserman, 2014), GoogLeNet (Szegedy ve ark., 2015) ve ResNet (He ve ark., 2016) modelleri geliştirilmiştir.

2012 yılında AlexNet'in başarısından bu yana ESA'larda kayda değer gelişmeler olmuştur (Gu ve ark., 2018). Böylece bilgisayarlı görü alanında ESA sayesinde derin öğrenmenin önemli katkı sağladığı yeni modeller geliştirilmiştir. Çalışmamızda VGGNet modelinin "2 evrişim 1 ortaklama" mantığı temel alınarak yeni bir model geliştirilmiştir. Yeni geliştirilen ESA modeli Şekil 5'te gösterilmiştir.

Şekil 5'te gösterilen modelde 4 Evrişim (Convolution), iki Ortalama (Average) ve iki Maksimum (Maximum) olmak üzere 4 Ortaklama (Pooling) katmanı bulunmaktadır. 3 Unutma (Droupout), 5 Doğrusallaştırılmış Lineer Birim (ReLu-Rectified Linear Unit), 2 Tam Bağlantı (Fully Connected) ve 1 Çıkış (Softmax) katmanı ile model toplam 19 katmandan oluşmaktadır. Modeldeki toplam parametre sayısı 1.208.071'dir.

Modelin yapısı incelendiğinde; gri formatta gelen giriş görüntüsüne 2 evrişim katmanı ve 2 ortaklama (1 ortalama, 1 maksimum) katmanı uygulanır. Her maksimum ortaklama katmanından sonra %50 unutma işlemi gerçekleştirilir. Unutma katmanı sayesinde ağız ezberlemesinin önüne geçilmiş olur. 2 evrişim, 2 ortaklama ve 1 unutma işlemi farklı parametrelerle (f, s, p) ve farklı filtre kanal sayılarıyla 2 defa tekrarlanır. Evrişim katmanlarındaki filtre kanal sayıları sırasıyla (32, 64) ve (128, 256) şeklindedir. Evrişim ve ortaklama katmanları tamamlandıktan sonra düzleştirme ve tam bağlantı katmanı ile nöronlar bir dizi haline getirilir. Düzleştirme işlemi sonucunda tam bağlantı (FC1) katmanı oluşturularak 6400 nöron elde edilir. Düzleştirme işlemi ardından tam bağlantı (FC2) yapılarak nöron sayısı 128'e düşürülür. Tam bağlantı işlemlerinden sonra %50 unutma işlemi gerçekleştirilir. En sonunda

Softmax ile 7 sınıflı bir çıkış elde edilir. Modelin evrişim katmanlarında ReLu, çıkış katmanında Softmax aktivasyon fonksiyonu kullanılmıştır.



Şekil 5. Yeni geliştirilen ESA modeli (f: filtre boyutu, s: kaydırma, p: piksel ekleme, FC: tam bağlantı)

### Kullanılan Ortam ve Kütüphaneler

ESA modeli ile duygu analizi için yapılan deneyler; Intel Core i7-5700HQ 2.7 GHz işlemci, NVIDIA Geforce GTX 960M ekran kartı ve 16GB RAM özelliklerine sahip bir dizüstü bilgisayarda gerçekleştirilmiştir. Program kodları Windows 10 işletim sistemi üzerinde Python programlama dilinin 3.6 sürümü ile Keras, NumPy, Matplotlib, PIL, Os, OpenCV, Sklearn ve Imageio kütüphaneleri kullanılarak yazılmıştır. Python kodları Anaconda programının Spyder 4.1.4 arayüzü ile derlenmiştir.

### BULGULAR VE TARTIŞMA

Veri sayısına bağlı olarak veri seti eğitim, test ve geçerleme olarak bölünebilir. Veri sayısı çok fazla olmayan veri setlerinde test ve geçerleme için daha büyük oranda ayırma yapılabilir. KDEF ve PICS veri setlerindeki veri sayıları dikkate alınarak veri seti %60 eğitim, %20 test ve %20 geçerleme veri kümesi olmak üzere üçe bölünmüştür. Ağın eğitimi sırasında eğitim ve test veri kümeleri kullanılmış, ağın eğitimi bittikten sonra modelin eğitim sırasında hiç görmediği geçerleme veri kümesiyle başarımlar elde edilmiştir. Çizelge 1’de KDEF ve PICS veri setlerinin kümelerindeki görüntülerin dağılımları gösterilmiştir.

Çizelge 1. Veri setlerinin eğitim-test-geçerleme kümelerindeki görüntü sayıları

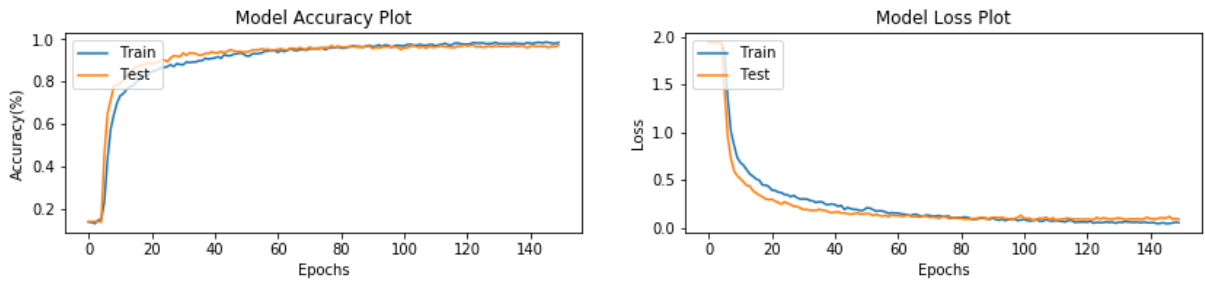
Veri Seti	Eğitim	Test	Geçerleme	Toplam
KDEF	2940	980	980	4900
PICS	2898	966	966	4830

Geliştirilen ağın eğitimi sırasında KDEF ve PICS veri setlerindeki eğitim başarımlarını karşılaştırmak için iki veri setinde de aynı parametreler kullanılmıştır. En yüksek doğruluk oranına ulaşmak için epoch (eğitim tur sayısı), mini batch size (her bir iterasyonda alınan küme boyutu), dropout (unutma), aktivasyon fonksiyonu ve optimizasyon algoritması parametreleri Çizelge 2’de gösterildiği gibi belirlenmiştir.

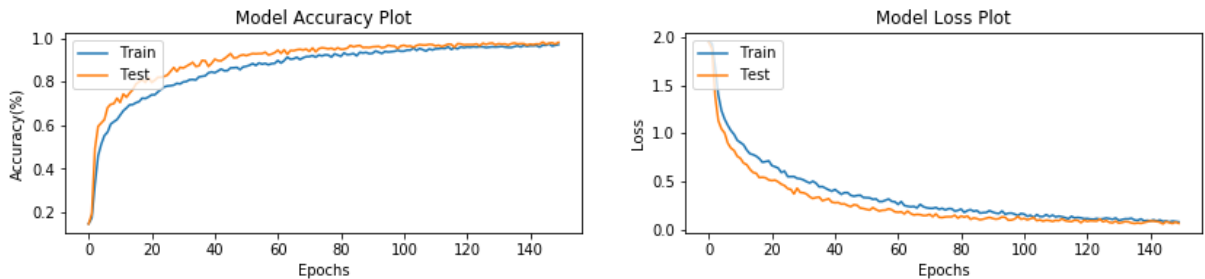
Çizelge 2. Eğitim parametreleri

Parametre	Değer
Epoch	150
Mini Batch Size	32
Dropout	0.5
Aktivasyon Fonksiyonu	ReLu
Optimizasyon Algoritması	Adamax

Şekil 6'da KDEF veri seti, Şekil 7'de ise PICS veri seti ile ESA modelinin eğitim (train) ve test veri kümesiyle eğitilmesi sırasında elde edilen doğruluk (accuracy) oranı ve kayıp (loss) değeri grafiksel olarak gösterilmiştir. Grafikler incelendiğinde; her iki veri setinde de ilk iterasyonlardan (epoch) itibaren ağırlık hızlı bir şekilde öğrendiği, 100 iterasyondan sonra iniş çıkışlardan da anlaşıldığı üzere ağırlık öğrenmeye devam ettiği ve 140 iterasyonun sonunda %98 civarında bir eğitimin gerçekleştiği görülmektedir.



Şekil 6. KDEF veri seti ile eğitilen ESA modelinin doğruluk ve kayıp grafiği



Şekil 7. PICS veri seti ile eğitilen ESA modelinin doğruluk ve kayıp grafiği

Çizelge 3'te KDEF ve PICS veri setleri üzerinde yapılan eğitim sonucunda elde edilen başarımlar gösterilmiştir. Çizelge incelendiğinde; KDEF veri setinde eğitim verisinin %98.5 oranında öğrenildiği görülürken, test verisine göre öğrenme oranı %97.24 ve eğitime katılmayan geçerleme verisine göre 0.106 gibi düşük kayıpla başarımlar oranı %97.44 olarak elde edilmiştir. PICS veri setinde ise eğitim verisinin %97.14 oranında öğrenildiği görülürken, test verisine göre öğrenme oranı %98.14 ve eğitime katılmayan geçerleme verisine göre 0.061 gibi daha düşük bir kayıpla başarımlar oranı %98.24 olarak elde edilmiştir.

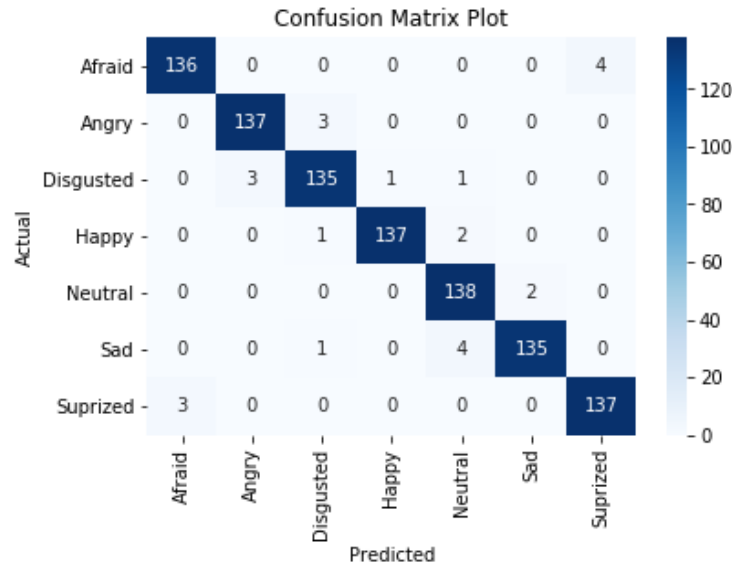
Çizelge 3. Veri setlerine ait başarımlar ve kayıp oranları

Veri Seti	Başarımlar/Kayıp	Eğitim	Test	Geçerleme
KDEF	Başarımlar (%)	98.50	97.24	97.44
	Kayıp	0.052	0.089	0.106
PICS	Başarımlar (%)	97.14	98.14	98.24
	Kayıp	0.081	0.066	0.061

Çalışma sonucunda, hem 4900 görüntü bulunan KDEF veri setinde hem de veri artırma yöntemiyle 4830 görüntüye çıkarılan PICS veri setinde yüksek oranda öğrenme gerçekleşmiştir. İki veri seti

karşılaştırıldığında; birbirine yakın olmakla beraber, PICS veri seti KDEF veri setine göre %0.8 oranında daha yüksek sınıflandırma başarısına sahip olmuştur.

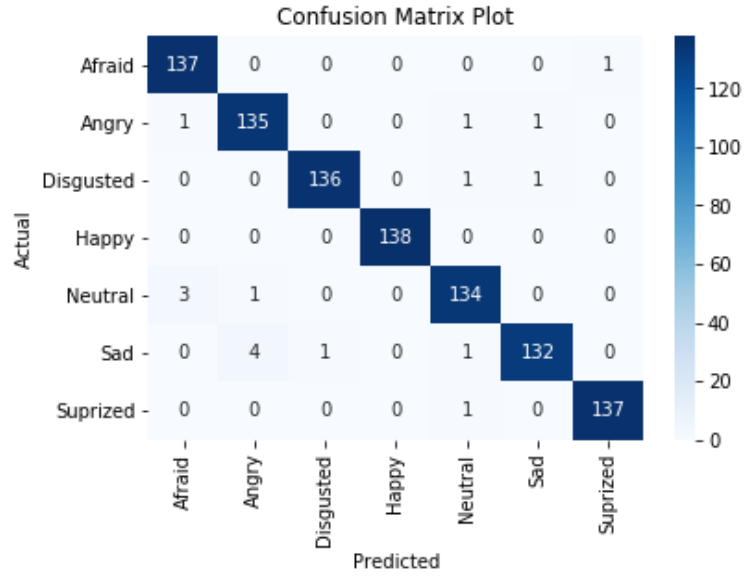
Evrişimsel Sinir Ağının hiç görmediği %20'lik geçerleme kümesinde KDEF veri seti için 980 görüntü bulunmaktadır. Dolayısıyla her bir duyguya ait 140 ar görüntü üzerinden elde edilen karışıklık matrisi (confusion matrix) Şekil 8'de gösterilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere en başarılı sonuçlar sırasıyla nötr (%98.57), öfke, mutluluk ve şaşırma (%97.86) duygu sınıflarında, en başarısız sonuç ise iğrenme ve üzüntü (%96.43) duygu sınıflarında elde edilmiştir. En çok karıştırılan duygu sınıfları %2.86 ile korku-şaşıрма ve üzüntü-nötr olmuştur. Bunu %2.14 ile öfke-iğrenme, iğrenme-öfke ve şaşırma-korku sınıfları izlemektedir. En az karıştırılan duygu sınıfları olarak; %0.71 ile iğrenme-mutluluk, iğrenme-nötr, mutluluk-iğrenme ve üzüntü-iğrenme göze çarpmaktadır.



**Şekil 8.** KDEF veri setinin geçerleme kümesine ait karışıklık matrisi (afraid: korkmuş, angry: kızgın, disgusted: iğrenmiş, happy: mutlu, neutral: nötr, sad: üzgün, suprized: şaşkın)

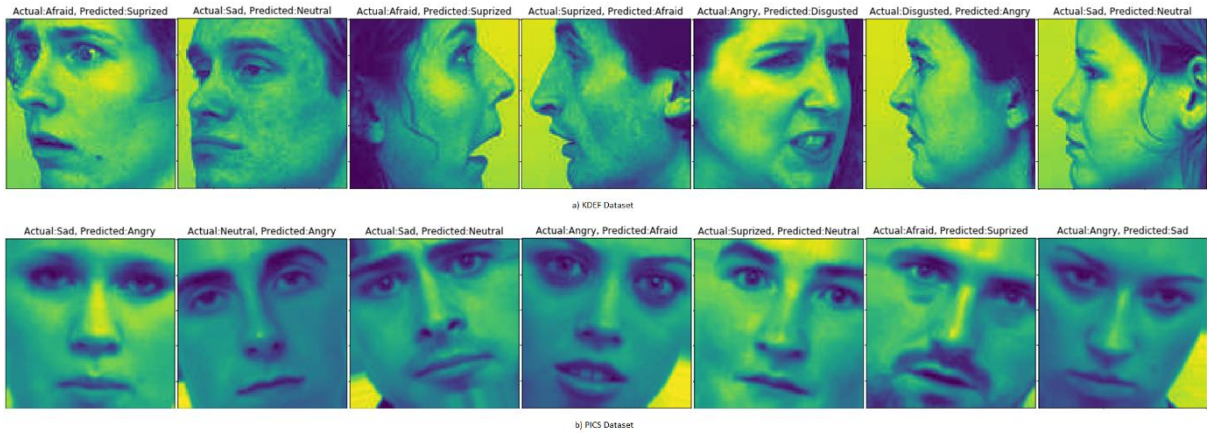
Calvo ve Lundqvist (Calvo ve Lundqvist, 2008) tarafından KDEF veri seti üzerine yapılan çalışmada her bir duygu ifadesi için kimlik doğruluğu, hata türleri ve reaksiyon süreleri ölçümleri yapılmıştır. Elde ettikleri sonuçlara göre en çok karıştırılan duygu sınıfları olarak sırasıyla; şaşırma-korku, korku-şaşıрма, iğrenme-öfke, üzüntü-iğrenme, öfke-iğrenme ve üzüntü-korku sınıflarını vermişlerdir. Ayrıca mutluluk ve nötr duygu sınıflarının en az karıştırılan ve en hızlı cevap alınan sınıf olduğunu da ifade etmişlerdir. Bu durum bu çalışmadan elde edilen sonuçları da doğrular niteliktedir.

Evrişimsel Sinir Ağının hiç görmediği %20'lik geçerleme kümesinde PICS veri seti için 966 görüntü bulunmaktadır. Dolayısıyla her bir duyguya ait 138 ar görüntü üzerinden elde edilen karışıklık matrisi Şekil 9'de gösterilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere en başarılı sonuç %100 ile mutluluk duygu sınıfında elde edilmiştir. Bunu sırasıyla %99.28 ile korku ve şaşırma duygu sınıfları izlemiştir. En başarısız sonuç ise üzüntü (%95.65) ve nötr (%97.1) duygu sınıflarında elde edilmiştir. En çok karıştırılan duygu sınıfları %2.9 ile üzüntü-öfke ve %2.17 ile nötr-korku olmuştur. Diğer korku sınıfları %0.72 gibi oldukça düşük oranda başka bir duygu sınıfı ile karıştırılmıştır.



**Şekil 9.** PICS veri setinin geçerleme kümesine ait karışıklık matrisi (afraid: korkmuş, angry: kızgın, disgusted: iğrenmiş, happy: mutlu, neutral: nötr, sad: üzgün, suprized: şaşkın)

Çalışma sonucunda hatalı duygu sınıflandırması yapılan resimlere ait örnekler Şekil 10'da verilmiştir. KDEF veri setinde 5 yönden çekilen resimler arasından önden çekilmiş olan resimlerde hiç hata yapılmadığı göze çarpmaktadır. PICS veri setinde tüm resimler tek yönden çekilmiş, orijinal resimlerde hata oranı çok düşük olup hatalı tanınan resimler çoğunlukla artırılmış resimlerdir.



**Şekil 10.** KDEF ve PICS veri setlerine ait hatalı sınıflandırma yapılan resimlere örnekler (actual: gerçek, predicted: tahmin)

Önerilen modelin aynı veri setlerini kullanarak duygu analizi yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırılması Çizelge 4'te gösterilmiştir. Çizelge incelendiğinde, Xu ve ark. (2015) dört farklı verisetinden oluşturdukları verisetini derin evrişimli ağlardan (ConvNets) transfer özelliklerine dayanan bir model ile eğiterek %81.5, Ruiz-Garcia ve ark. (2016) ve Koç ve Özdemir (2019) ise çalışmamızda kullandığımız KDEF verisetini önerdikleri evrişimli sinir ağlarıyla eğiterek sırasıyla %96.93 ve %96.46 başarı oranı elde etmişlerdir. Çalışmamızda önerilen evrişimli sinir ağı modelinin hem evrişimli sinir ağı kullanan hem de farklı sınıflandırıcı kullanan diğer çalışmalara göre daha iyi sonuçlar verdiği görülmektedir.

**Çizelge 4.** Önerilen çalışma ile aynı veri setlerini kullanan çalışmaların karşılaştırılması.

Yazar	Veri Seti	Sınıflandırıcı	Başarım Oranı (%)
(Xu ve ark., 2015)	KDEF, PICS, CK+, JAFFE	CNN “ConvNets”	81.50
(Ruiz-Garcia ve ark., 2016)		CNN	96.93
(Eng ve ark., 2019)	KDEF	SVM	80.95
(Koç ve Özdemir, 2019)		CNN “ResNet101”	96.46
(Ahmad ve ark., 2013)		Haar	90.65
(Irtija ve ark., 2018)	PICS	SVM	84.00
(Lu ve ark., 2019)		SVM	97.33
<b>Önerilen Model</b>	<b>KDEF PICS</b>	<b>CNN</b>	<b>97.44 98.24</b>

## SONUÇ

Bu çalışmada, yeni geliştirilen bir Evrişimsel Sinir Ağı (ESA) modeli ile insan yüz ifadesinden duygu tanıma yönelik bir uygulama yapılmıştır. Duygusal ifadelerin klasik yöntemlere göre daha başarılı bir şekilde sınıflandırılması amacıyla derin öğrenme yöntemlerinden ESA kullanılmıştır. Geliştirilen modeli test etmek için iki farklı veri setindeki yedi farklı nesne sınıfına ait görüntüler kullanılmıştır. Derin öğrenme yöntemlerinin en önemli avantajı sınıflandırmada kullanılacak özniteliklerin otomatik olarak çıkarılmasıdır. Bu avantajın yanında yüksek işlem gücüne sahip donanım ihtiyacı vardır. Çalışmada kullanılan donanım alt yapısı kısıtlarından dolayı veri setlerindeki görüntü boyutları küçültülmüştür. Ayrıca veri setlerinden PICS veri setindeki görüntü yetersizliğinden dolayı veri artırma yöntemi ile görüntü sayısı artırılmıştır. Veri setlerindeki eğitim ve test veri kümelerine göre model eğitildikten sonra, ağın hiç görmediği geçerleme veri kümesine göre başarımların tespiti yapılmıştır. Başarımların modelin doğruluk değerlerine göre elde edilmiştir.

Test sonuçlarına göre; KDEF veri setinin geçerleme veri kümesindeki 980 görüntüde duygu tanıma başarımları %97.44, PICS veri setinin geçerleme veri kümesindeki 966 görüntüde duygu tanıma başarımları %98.24 olarak belirlenmiştir. Modelin performansını test etmek için kullanılan iki farklı veri setinde de yüksek başarımlar elde edilmiştir. En yüksek başarımlar %98.24 doğruluk oranı ile PICS veri setinden elde edilmiştir.

Sonraki çalışmalarda modelin daha fazla duygusal ifade içeren daha büyük veri setleriyle veya duygusal ifade içermeyen farklı veri setleriyle eğitilmesi faydalı olacaktır. Donanım alt yapısı kısıtlarından dolayı bu çalışmadaki sınırlılıkların giderilerek yeni denemeler yapılarak modelin geliştirilmesi düşünülmektedir. Ayrıca veri setindeki görüntülerin ön işlenmesinden kaynaklı oluşabilecek kayıpların önüne geçmek amacıyla ve işlem gücünü arttırmak amacıyla önerilen sistemin paralelleştirilmesi düşünülebilir.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları, aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.



**KAYNAKLAR**

- Ahmad F, Najam A, Ahmed Z, 2013. Image-based Face Detection and Recognition: “State of the Art.”. ArXiv Preprint ArXiv: 1302.6379.
- Altan G, 2019. DeepGraphNet: Grafiklerin Sınıflandırılmasında Derin Öğrenme Modelleri. *European Journal of Science and Technology*, October: 319–329. <https://doi.org/10.31590/ejosat.638256>
- Calvo MG, Lundqvist D, 2008. Facial expressions of emotion (KDEF): Identification under different display-duration conditions. *Behavior Research Methods*, 40(1): 109–115. <https://doi.org/10.3758/BRM.40.1.109>
- Chen M, Lu Z, Jan PA, 2015. Learning deep features for image emotion classification. 2015 IEEE International Conference on Image Processing (ICIP), 4491–4495.
- Dandil E, Özdemir R, 2019. Real-time Facial Emotion Classification Using Deep Learning. *DATA SCIENCE AND APPLICATIONS*, 2(1): 13–17.
- Eng SK, Ali H, Cheah AY, Chong YF, 2019. Facial expression recognition in JAFFE and KDEF Datasets using histogram of oriented gradients and support vector machine. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 705(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/705/1/012031>
- Fayek HM, Lech M, Cavedon L, 2017. Evaluating deep learning architectures for Speech Emotion Recognition. *Neural Networks*, 92: 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.neunet.2017.02.013>
- Gu J, Wang Z, Kuen J, Ma L, Shahroudy A, Shuai B, Liu T, Wang X, Wang G, Cai J, Chen T, 2018. Recent advances in convolutional neural networks. *Pattern Recognition*, 77: 354–377. <https://doi.org/10.1016/j.patcog.2017.10.013>
- Hancock P, 2008. Psychological image collection at stirling (pics). Web Address: <Http://Pics.Psych.Stir.Ac.Uk>.
- He K, Zhang X, Ren S, Sun J, 2016. Deep Residual Learning for Image Recognition Kaiming. *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*. <https://doi.org/10.1002/chin.200650130>
- Hossain MS, Muhammad G, 2019. Emotion recognition using deep learning approach from audio–visual emotional big data. *Information Fusion*, 49: 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.inffus.2018.09.008>
- Huang Y, Chen F, Lv S, Wang X, 2019. Facial expression recognition: A survey. *Symmetry*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/sym11101189>
- Irtija N, Sami M, Ahad MAR, 2018. Fatigue detection using facial landmarks. *Joint Conference ISASE-MAICS 2018 - 4th International Symposium on Affective Science and Engineering 2018, and the 29th Modern Artificial Intelligence and Cognitive Science Conference*, 1–6. <https://doi.org/10.5057/isase.2018-c000041>
- Koç M, Özdemir R, 2019. Yeni Bir Veri Kümesi (RidNet) Kullanarak Kontrolsüz Ortamda Yüz İfadesi Tanımının Derin Öğrenme Yöntemleri ile İyileştirilmesi. *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 6(2): 384–396. <https://doi.org/10.35193/bseufbd.645138>
- Krizhevsky A, Sutskever I, Hinton GE, 2012. ImageNet Classification with Deep Convolutional Neural Networks. *Advances in Neural Information Processing Systems*, 1097–1105. <https://doi.org/10.1201/9781420010749>
- Lecun Y, Bengio Y, Hinton G, 2015. Deep learning. *Nature*, 521(7553): 436–444. <https://doi.org/10.1038/nature14539>
- LeCun Y, Bottou L, Bengio Y, Haffner P, 1998. Gradient-based Learning Applied to Document Recognition. *Proceedings of the IEEE*, 86(11): 2278–2323. <https://doi.org/10.1109/5.726791>
- Li J, Jin K, Zhou D, Kubota N, Ju Z, 2020. Attention mechanism-based CNN for facial expression recognition. *Neurocomputing*, 411: 340–350. <https://doi.org/10.1016/j.neucom.2020.06.014>
- Li S, Deng W, 2020. Deep Facial Expression Recognition: A Survey. *IEEE Transactions on Affective Computing*, 3045(c): 1–20. <https://doi.org/10.1109/TAFFC.2020.2981446>
- Lu Y, Wang S, Zhao W, 2019. Facial expression recognition based on discrete separable shearlet transform and feature selection. *Algorithms*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/a12010011>
- Lundqvist D, Flykt A, Öhman A, 1998. The Karolinska directed emotional faces (KDEF). CD ROM from Department of Clinical Neuroscience, Psychology Section, Karolinska Institutet 91(630): 2–2.
- Mehta D, Siddiqui MFH, Javaid AY, 2019. Recognition of emotion intensities using machine learning algorithms: A comparative study. *Sensors (Switzerland)*, 19(8): 1–24. <https://doi.org/10.3390/s19081897>
- Özdemir, D, Karaman, S, 2017. Investigating interactions between students with mild mental retardation and humanoid robot in terms of feedback types. *Eğitim ve Bilim*, 42(191).
- Ruiz-Garcia A, Elshaw M, Altahhan A, Palade V, 2016. Deep learning for emotion recognition in faces. *International Conference on Artificial Neural Networks Springer*, 38–46. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-44781-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-44781-0_5)
- Shorten C, Khoshgoftaar TM, 2019. A survey on Image Data Augmentation for Deep Learning. *Journal of Big Data*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40537-019-0197-0>
- Simonyan K, Zisserman A, 2014. Very deep convolutional networks for large-scale image recognition. ArXiv Preprint ArXiv: 1409.1556.
- Szegedy C, Liu W, Jia Y, Sermanet P, Reed S, Anguelov D, Erhan D, Vanhoucke V, Rabinovich A, 2015. Going Deeper with Convolutions. *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*. <https://doi.org/10.1002/jctb.4820>
- Xu M, Cheng W, Zhao Q, Ma L, Xu F, 2015. Facial expression recognition based on transfer learning from deep convolutional networks. 2015 11th International Conference on Natural Computation (ICNC). *IEEE*, 702–708. <https://doi.org/10.1109/ICNC.2015.7378076>

**Atf İçin:** Garip Z, 2022. Seri Robot Manipülâtöründe Ters Kinematik Problemi Çözmek İçin Kaotik Tabanlı Çiçek Tozlaşma Algoritmasının Uygulanması, 12(1): 80-90.

**To Cite:** Garip Z, 2022. Application of Chaotic Based Flower Pollination Algorithm to Solve Inverse Kinematics Problem in Serial Robot Manipulator, Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 80-90.

## Seri Robot Manipülâtöründe Ters Kinematik Problemi Çözmek İçin Kaotik Tabanlı Çiçek Tozlaşma Algoritmasının Uygulanması

Zeynep GARİP

**ÖZET:** Ters kinematik problemlerinin çözümü, seri robot manipülâtörlerinin temel problemlerinden biridir. Bu çalışmada, 7 serbestlik dereceli bir seri manipülâtörün ters kinematik problemini çözme karmaşıklığını en aza indirmek için kaotik tabanlı bir algoritma geliştirilmiştir. Henon kaotik harita ile modifiye edilen çiçek tozlaşma algoritması kullanılarak orijinal algoritmanın global ve lokal arama özelliklerinin etkinliği artırılması amaçlanmıştır. Simülasyon çalışmaları için, modifiye edilmiş algoritmaların performansını doğrulamak için metre cinsinden P1[-25 100 50], P2 [50 - 25 75] ve P3 [50 - 25 75] olmak üzere üç farklı istenen konum vektörü seçilmiştir. Ayrıca bu algoritmalar son efektörün konum hatası ve çözüm süresine göre karşılaştırılmıştır. Simülasyon sonuçları, seri robot manipülâtörünün ters kinematik çözümleri için kaotik tabanlı algoritmaların etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Robot manipülâtörü, kaotik harita, çiçek tozlaşma algoritması, konum hatası

### Application of Chaotic Based Flower Pollination Algorithm to Solve Inverse Kinematics Problem in Serial Robot Manipulator

**ABSTRACT:** The solution of inverse kinematics problems is one of the main problems for serial robot manipulators. In this study, a chaotic-based algorithm has been developed to minimize the complexity of solving the inverse kinematics problem of a series manipulator with 7 degrees of freedom. It is aimed to increase the efficiency of the global and local search features of the original algorithm using the flower pollination algorithm modified with the Henon chaotic map. For the simulation studies, to verify performance of modified algorithms, three different desired position vectors are selected as P1 [-25 100 50], P2 [24 50 100] and P3 [-30 30 80] in meter. In addition, these algorithms were compared according to the end-effector position error and the solution time. The simulation results showed that the chaotic-based algorithms can be effectively used for the inverse kinematic solutions of the serial robot manipulator.

**Keywords:** Robot manipulator, chaotic map, flower pollination algorithm, position error

<sup>1</sup>Zeynep GARİP ([Orcid ID: 0000-0002-0420-8541](https://orcid.org/0000-0002-0420-8541)), Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Teknoloji Fakültesi, Bilgisayar Mühendisliği Bölümü, Sakarya, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Zeynep GARİP, e-mail: zbatik@subu.edu.tr

## GİRİŞ

Günümüzde teknolojik gelişmelere paralel olarak, robot kolu manipülatörleri tüm sektörlerde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Endüstriyel sistemlerde ve teknik uygulamalarda seri manipülatörlerin insanlar gibi farklı işler yapabilmeleri beklenmektedir. Çalışma alanı belirleme, dinamik analiz ve yörünge oluşturma gibi kullanım amaçlarına ve yerlerine göre yüksek serbestlik derecelerine sahip seri manipülatörler tasarlanmaktadır (Hwang ve ark., 2017; Toz, 2017). Yedi veya daha fazla serbestlik derecesine sahip robot kolları geleneksel altı serbestlik derecesine sahip robot kollarına göre önemli ölçüde el becerisi ve çok yönlülük sağlamaktadır (Seraji ve ark., 1993).

Endüstride kullanılan seri manipülatörlerin ileri ve ters kinematik çözümleri kontrol sürecinin temel parçasıdır. Robotik manipülatörün ileri kinematiği uç efektörün konumunu ve yönünü tanımlar. Ters kinematik ise önceden konumu belirlenmiş uç efektörün konumuna karşılık gelen eklem konumlarının belirlenmesidir (Karpinska ve ark., 2012). Robot manipülatörlerin ters kinematik çözümünde analitik ve sayısal yöntemler kullanılmaktadır. Analitik yöntemlerin çözümü zor olsa da hızlı sonuçlar vermektedir. Bunun yanında analitik yöntemlerle gerçekleştirilen çözüm tüm manipülatörleri kapsamamaktadır. Sayısal yöntemlerde ise ters kinematiğin hesaplanması zor ve yavaştır. Ayrıca bu yöntemler robot manipülatörlerinin gerçek zamanlı kontrolünde yeterli değildir (Zhang ve Xiao, 2019). Son zamanlarda meta-sezgisel algoritmalar birçok araştırma ve uygulama alanında başarıyla uygulanmaktadır. Meta-sezgisel algoritma kullanılarak seri manipülatörün hareket ve yörünge planlaması yapıldığında matematiksel olarak kolay modellenmesi ve daha az hesaplama gerektirmektedir. Bu sebeplerden dolayı bu algoritmalar Ateş Böceği Algoritması (ABO), Parçacık Sürü Optimizasyonu (PSO), Kuantum tabanlı Parçacık Sürü Optimizasyonu (KPSO), Yapay Arı Koloni (YAK), Karınca Aslanı Optimizasyon (KAO), Harmoni Arama Algoritması (HAA), Yer Çekim Algoritması (YÇA), Öğretme-Öğrenme Tabanlı Optimizasyon (ÖÖTO) ve Genetik Algoritma (GA) gibi sezgisel algoritmalar robot manipülatörün ters kinematik çözümünde kullanılmaya başlanmıştır (Dereli ve ark., 2019; Jha ve ark., 2017). Ayrıca meta-sezgisel algoritmalar, seri manipülatörlerin ters kinematik çözümünde matematiksel yöntemlerle karşılaştırıldığında daha etkili ve başarılı olduğu kanıtlanmıştır (El-Sherbiny ve ark., 2018).

Dereli ve ark., (2019) 7 serbestlik derecesine sahip robot kolunun ters kinematik analizi ateş böceği algoritması kullanarak gerçekleştirmiştir. Diğer bir çalışmalarında ise kuantum davranışlı parçacık sürü optimizasyonu ile bu sistemin doğruluğunu ve etkinliğini göstermişlerdir. Ayrıca geliştirdikleri algoritmanın performansını PSO, YAK ve ABO algoritmaları ile ölçmüşlerdir. Zhang ve ark., (2019) tarafından lojistik kaotik harita ile yapay arı koloni algoritması birleştirilerek yeni bir algoritma geliştirmişlerdir. Bu algoritma ile Cyton Gamma 300 robot manipülatörünün ters kinematik hesaplamasını yapmışlardır. Wang ve ark., (2010) 7 serbestlik dereceli manipülatörün ters kinematik çözümü kapalı döngü algoritması ile çözmüşlerdir. Algoritmanın doğruluğu simülasyon ve deneysel çalışmalarla sağlanmıştır. Huang ve ark. (2012) 7 eksenli robot manipülatörlerinin ters kinematik problemini daha etkin bir şekilde çözmek için bir PSO algoritması geliştirmişlerdir. Tabandeh ve ark. (2010) geliştirdikleri genetik algoritmayı 4 eksenli uzaysal, 6 eksenli uzaysal ve 7 eksenli kinematik konfigürasyona sahip robot manipülatörlerinin ters kinematik çoklu çözümünde kullanmışlardır. Durmuş ve ark. (2011) altı eksenli robot manipülatörün ters kinematik çözümü için PSO ve HAA algoritmaları ile gerçekleştirmişlerdir. Köker (2013) son efektördeki hatayı en aza indirmek için altı eksenli bir Stanford robot manipülatörünün ters kinematik problemini çözmek amacıyla yapay sinir ağı ve genetik algoritmayı hibrit bir şekilde kullanmıştır. Toz (2017) altı serbestlik dereceli ve eklem kaçıklıklı bileklikli bir seri robot manipülatörünün ters kinematik problemi KAO algoritmasıyla

çözümlemiştir. Jha ve ark. (2017) tarafından 5 eksenli robot manipülörünün uç efektörünün konumunu ve açısal hatayı tespit etmek amacıyla TLBO ve GA algoritmalarını kullanmıştır. El-Sherbiny ve ark. (2018) tarafından bilgi tabanlı yapay arı koloni algoritma tabanlı 5 eksenli robot kolunun ters kinematik problemini çözmüşlerdir. Ayyıldız ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada konveyör bandında çalışma yetisine sahip 4 serbestlik derecesine sahip seri robot manipülörünün ters kinematik probleminin optimizasyonu GA, PSO, QPSO, YÇA algoritmalarıyla gerçekleştirmiştir.

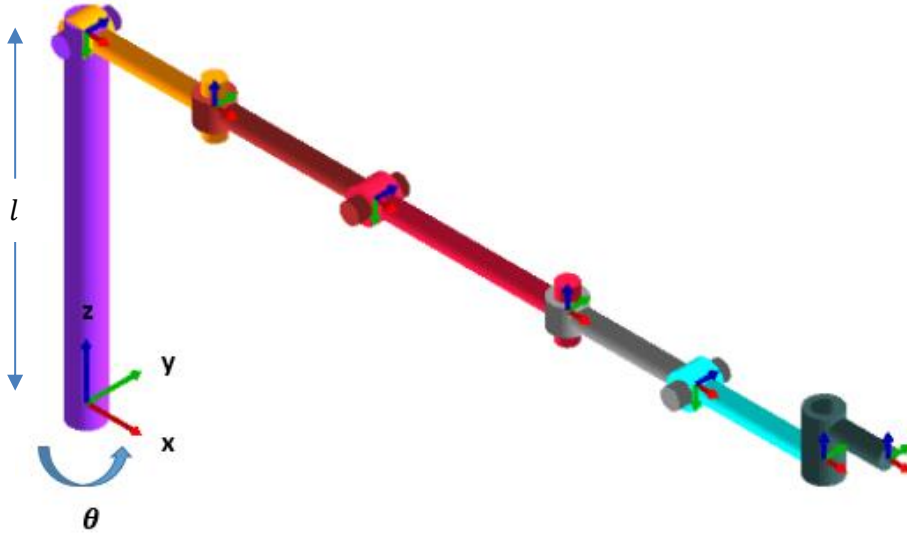
Bu çalışmada çiçek tozlaşma algoritması (ÇTA) ve kaos optimizasyon tekniklerine odaklanılmıştır. ÇTA'nın seçilmesinin sebebi hem global hem de yerel arama uzayını desteklemesidir. Ayrıca algoritmanın kullandığı parametre sayısı da azdır. Buna rağmen algoritma yerel arama yaparken performansını sergileyememektedir. Bu sebepten dolayı kaos optimizasyonu, yerel aramada optimum noktaya yakınsamasını önlemek amacıyla kullanılmaktadır. Kaos optimizasyonun temeli kaotik haritalar ile algoritmadaki rastgele parametrelerin tutarlılık ve doğruluklarını geliştirmek amacıyla bir hibritleşmeye dayanmaktadır (Yousri ve ark., 2019). Bu makalede 7 serbestlik derecesine sahip seri robot manipülörünün ters kinematik optimizasyon problemini çözmek amacıyla kaotik tabanlı algoritmalar önerilmiştir. ÇTA ve henon kaotik harita birleştirilerek 3 farklı hibrit algoritma önerilmiştir. Bu algoritmalar Henon Kaotik tabanlı Çiçek Tozlaşma Algoritması 1 (KÇTA 1) , Henon Kaotik tabanlı Çiçek Tozlaşma Algoritması 2 (KÇTA 2) ve Henon Kaotik tabanlı Çiçek Tozlaşma Algoritması 3 (KÇTA 3) olarak adlandırılmıştır. Henon kaotik harita global ve yerel aramadaki dengeyi sağlama ve yerel aramada lokal bir noktaya takılmasını önlemede kullanılmıştır. Algoritmaların performansı üç farklı seçilmiş hedef noktası belirlenerek konum hatası ve çözüm süresi bakımından değerlendirilmiştir.

## MATERYAL VE METOT

### 7 Eksenli Manipülörün Kinematik Modeli

7 eksenli robotik manipülör, nesneleri bir konumdan diğer konuma taşıma ve nesne yakalama gibi özelliklere sahiptir. 7 eksenli robotik manipülörün kontrolü ileri veya ters kinematik modelleme ile sağlanmaktadır. Ters kinematik problemi son efektörün konumunu bulmak amacıyla ileri kinematik denklemleri kullanılarak çözülür. 7 serbestlik derecesine sahip robotun son efektör pozisyonunu tahmin etmede genellikle Denavit-Hartenberg yöntemi (DH) tercih edilmektedir. DH yöntemi seri manipülörü tanımlamak ve hareketlerini modellemek amacıyla kullanılmaktadır. DH, koordinat çerçeveleri, prosedürlerini ve son bölüm manipülör için türetilmiş ileri kinematik denklemlerini göstermektedir. Şekil 1'de verilen robot manipülöre göre DH kinematik model oluşturulmuştur.

Homojen transformasyon matrisi Eşitlik 1 ile ifade edilmektedir. Seri robot manipülörünün dönüşüm matrisleri DH parametrelerinden elde edilmektedir. Çizelge 1'de listelen DH parametreleri  $a_i, \alpha_i, d_i$  ve  $\theta_i$  sırasıyla bağlantı uzunluğu, bağlantı açısı, bağlantı ofset ve ekleme açılarını temsil etmektedir. Şekil 1'de verilen robotik manipülörün DH parametrelerine ve Eşitlik 1'e göre bitişik link koordinat çerçevelerinin dönüşüm matrisleri elde edilmektedir. Eşitlik 3, Eşitlik 2'de bulunan altı dönüşüm matrisinin çarpımı ile elde edilmektedir. Eşitlik 1-2'deki DH parametrelerinde  $s\theta_i, c\theta_i, sai - 1$  ve  $cai - 1$  sırasıyla  $\sin \theta_i, \cos \theta_i, \sin \alpha_i - 1$  ve  $\cos \alpha_i - 1$ 'ün kısaltmasını vermektedir. Uzunluklar metre ve açılar ise derece olarak verilmiştir.



Şekil 1. 7 eksenli seri robot manipülör

$${}^{i-1}T(\theta_i) = \begin{bmatrix} c\theta_i & -ca_i s\theta_i & sa_i s\theta_i & a_i c\theta_i \\ s\theta_i & ca_i c\theta_i & -c\theta_i sa_i & a_i s\theta_i \\ 0 & sa_i & ca_i & d_i \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (1)$$

$${}^0T = \begin{bmatrix} c\theta_1 & 0 & -s\theta_1 & 0 \\ s\theta_1 & 0 & c\theta_1 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & l_1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}, {}^1T = \begin{bmatrix} c\theta_2 & 0 & s\theta_2 & l_2 c\theta_2 \\ s\theta_2 & 0 & -c\theta_2 & l_2 s\theta_2 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix},$$

$${}^2T = \begin{bmatrix} c\theta_3 & 0 & -s\theta_3 & l_3 c\theta_3 \\ s\theta_3 & 0 & c\theta_3 & l_3 s\theta_3 \\ 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}, {}^3T = \begin{bmatrix} c\theta_4 & 0 & s\theta_4 & l_4 c\theta_4 \\ s\theta_4 & 0 & -c\theta_4 & l_4 s\theta_4 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix},$$

$${}^4T = \begin{bmatrix} c\theta_5 & 0 & -s\theta_5 & l_5 c\theta_5 \\ s\theta_5 & 0 & c\theta_5 & l_5 s\theta_5 \\ 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}, {}^5T = \begin{bmatrix} c\theta_6 & -s\theta_6 & 0 & l_6 c\theta_6 \\ s\theta_6 & c\theta_6 & 0 & l_6 s\theta_6 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix},$$

$${}^6T = \begin{bmatrix} c\theta_7 & -s\theta_7 & 0 & l_7 c\theta_7 \\ s\theta_7 & c\theta_7 & 0 & l_7 s\theta_7 \\ 0 & 0 & 1 & d_7 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (2)$$

$${}^0T = {}^0T(\theta_1) {}^1T(\theta_2) {}^2T(\theta_3) {}^3T(\theta_4) {}^4T(\theta_5) {}^5T(\theta_6) {}^6T(\theta_7) = \begin{bmatrix} n_x & o_x & a_x & P_x \\ n_y & o_y & a_y & P_y \\ n_z & o_z & a_z & P_z \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (3)$$

${}^0T$  manipülörün ileri kinematik denklemini oluşturmaktadır.  $(Px, Py, Pz)$  ve  $(n, o, a)$  ise sırasıyla uç efektörün taban koordinatındaki konumu ve yönüdür.

### Optimizasyon Performansının Formülasyonu

ÇTA tabanlı ters kinematik denklemlerin hesaplanmasında her bir polen 7 eksenli seri robot manipülörünün eklem değişkenler  $(\theta_1^\circ, \theta_2^\circ, \theta_3^\circ, \theta_4^\circ, \theta_5^\circ, \theta_6^\circ, \theta_7^\circ)$  kümesini kapsamaktadır. Optimal çözüm sağlanabilmesi için son efektörün hedef konuma ulaşması optimal ayarlamalarla elde edilir.

7 eksenli seri robot manipülöründe, robot kolunun başlangıç noktasından hedef noktaya varana kadar birçok varış yolu vardır. Bu noktada önemli olan konu uygunluk fonksiyonuyla

manipülörün hedefe minimum hatayla varmasıdır. Matematiksel model D-H parametreleri ve tüm eklem değişkenlerinin aralıkları kullanılarak oluşturulur. Elde edilen vektör ile hedef konum vektörü arasındaki uzaklık hata olarak kabul edildiğinden dolayı hatayı en aza indirmek için amaç fonksiyonu (Eşitlik 4) tanımlanmıştır.

$$E_r = \sqrt{(P_x - P'_x)^2 + (P_y - P'_y)^2 + (P_z - P'_z)^2} \quad (4)$$

Eşitlik 4'te verilen  $P'_x, P'_y, P'_z$  hesaplanacak konumları  $P_x, P_y, P_z$  son efektörün hedef konumu ve  $E_r$  ise P ve P' arasındaki hatayı temsil etmektedir. Bu çalışmanın amacı  $E_r$  hata değerinin minimize edilmesidir.

### Kaotik harita ile ÇTA'nın Geliştirilmesi

ÇTA arama kabiliyetini arttırmak amacıyla bu çalışmada optimizasyon problemi olarak sayılan ters kinematik denklemlerini çözmek amacıyla rasgele sayı üreteçlerin yerine Henon ayrık kaotik harita dizileri tercih edilmiştir. Bu kaotik haritanın performansı Çimen ve ark. (2021) tarafından yapılan çalışmada test fonksiyonları kullanılarak yapılmıştır ve istatistiksel sonuçlara göre Henon tabanlı çiçek tozlaşma algoritması etkin olduğu görülmüştür. Bu sebepten dolayı robot manipülörün ters kinematiklerinin çözmek amacıyla Henon kaotik tabanlı çiçek tozlaşma algoritması tercih edilmiştir.

ÇTA, popülasyon temelli global bir optimizasyon algoritmasıdır (Yang, 2012). Algoritmanın sözde kodu Algoritma 1'de verilmiştir. ÇTA'da, tozlaşma sürecinin özelliği, tozlaşma davranışı ve çiçek sabitliğinin göz önünde bulundurularak dört kurala indirgenmiştir.

1. Biyotik tozlaşma, polenlerin tozlayıcı tarafından taşındığı çapraz tozlanma işlemidir. Bu durum global bir tozlaşma sürecidir ve tozlayıcıların hareketi Lévy uçuşuna uymaktadır.
2. Abiyotik veya kendi kendine tozlaşma aynı bitki veya çiçeğin tozlaştırıcı olmadan yaptığı işlemidir. Polen taşıma mesafesi genellikle biyotik tozlaşmadan daha kısa olduğundan, bu işlem yerel tozlaşma olarak bilinir.
3. Tozlayıcılar, belirli çiçek türlerine eğilimi olan çiçek kararlılığı geliştirebilir. Çiçek sabiti üreme olasılığına eşdeğerdir. Bu olasılık, ilişkili çiçeklerin benzerliği ile orantılıdır.
4. Bir anahtar olasılığı;  $p \in [0, 1]$  tozlaşma tipini kontrol etmek için kullanılır. Bu kurallara göre, iki farklı arama tekniği (yerel ve global) kullanılabilir. Yerel arama uygulayarak, mevcut olanların çevresinde en iyi çözümler bulunur. Buna ek olarak, global tozlaşma esasen yerel bir optimum çözümde sıkışıp kalmayı önler.

#### Algoritma 1: ÇTA'sın sözde kodu

```

1: Amaç Fonksiyonu  $f(x)$ ,  $x(x_1, x_2, \dots, x_n)$ 
2: Rasgele başlangıç popülasyonu üret
3: Başlangıç popülasyonundaki en iyi( $g^*$ ) çözümü hesapla
4: Olasılık parametresini belirle  $p \in [0,1]$ 
5: while t<maksimum iterasyon
6:   for i=1:n
7:     if rand<p then
8:       Global tozlaşma :  $x_i^{t+1} = x_i^t + \gamma L(\lambda)(g^* - x_i^t)$ 
9:     else
10:      Yerel tozlaşma :  $x_i^{t+1} = x_i^t + rand \times (g^* - x_i^t)$ 
11:    end if
12:  Yeni çözümleri değerlendir
13:  Popülasyondaki kötü çözümleri daha iyileri ile güncelle
14:  end for
15:  En iyi çözümü( $g^*$ ) seç
16: end while

```

Henon kaotik haritanın matematiksel modeli Eşitlik 5'te verilmiştir. Henon haritasının kaotik davranışı  $a$  ve  $b$  parametrelerine bağlıdır. Bu çalışmada kullanılan sistemde  $a = 1,4$  ve  $b = 0,3$  parametre değerleri seçilmiştir (Henon, 1976).

Eşitlik	Sınırlar	Harita
$x_{n+1} = 1 - ax_n^2 + by_n \quad (5)$ $y_{n+1} = x_n$	$a = 1,4$ $b = 0,3$	

Şekil 2. Henon Kaotik Harita.

KÇTA, ÇTA'nın tozlaşma sürecinin özelliğini kapsayan kurallar göz önünde bulundurularak geliştirilmiş ve orijinal algoritmanın performansının artırılması amaçlanmaktadır. ÇTA'da global ve yerel tozlaşma operatörleri bulunmaktadır. KÇTA'da orijinal ÇTA'dan farklı olarak global veya yerel operatörün hangisinin seçileceği kaotik bir dizi ile belirlenerek KÇTA 1 algoritması oluşturulmuştur. Sözde kodda 7.satırdaki *rand* sayı dizisi kaotik harita (if *kaotikhenondizisi* <  $p$ ) ile değiştirilmiştir. KÇTA 2 algoritmasında ise lokal tozlaşmadaki sağlayan rastgeliliği sağlayan dizi kaotik dizi ( $x^{t+1} = x_i^t + \text{kaotikhenondizisi}(x_j^t - x_k^t)$ ) ile güncellenmiştir. Son olarak KÇTA 3 ise KÇTA 1 ve KÇTA 2 algoritmalarındaki değişikliklerinin birleşiminden oluşmaktadır.

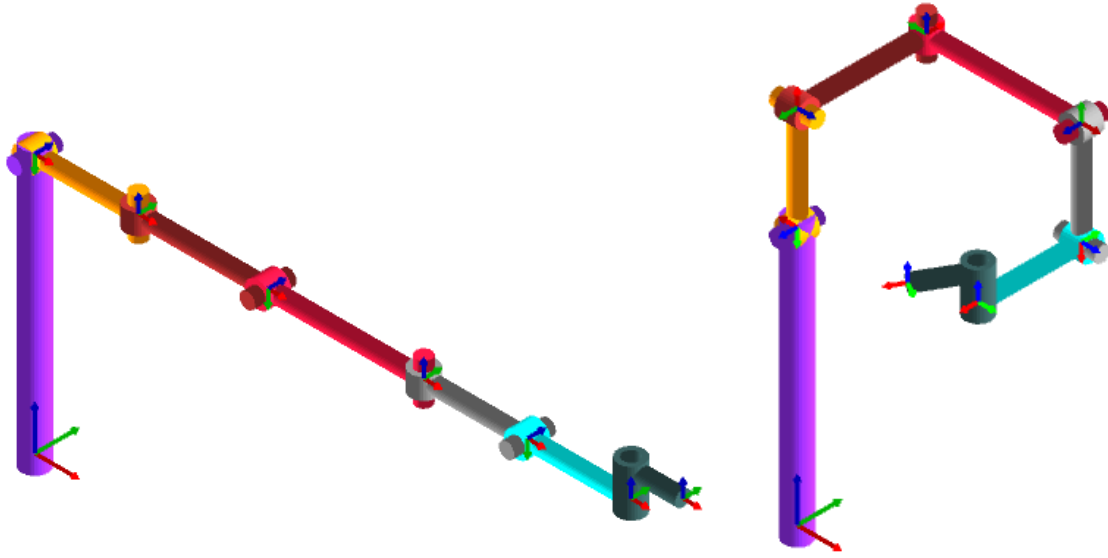
## BULGULAR VE TARTIŞMA

Kaotik tabanlı çiçek tozlaşma algoritmalarının performansı test etmek amacıyla 7 eksenli seri robot manipülörünün ters kinematik problemi kullanılmıştır. Bu çalışmada son efektörün pozisyonu rasgele olarak seçilmiştir. Çizelge 1'de manipülörün bağlantı parametreleri verilmiştir.

Çizelge 1. Robot manipülörün DH parametreleri (Dereli ve ark., 2019).

$i$	$a_i(m)$	$a_i(^{\circ})$	$d_i(m)$	$\theta_i(^{\circ})(Range)$
1	0	-90	11=0.5	$-180 < \theta_1 < 180$
2	12=0.2	90	0	$-90 < \theta_2 < 30$
3	13=0.25	-90	0	$-90 < \theta_3 < 120$
4	14=0.3	90	0	$-90 < \theta_4 < 90$
5	15=0.2	-90	0	$-90 < \theta_5 < 90$
6	16=0.2	0	0	$-90 < \theta_6 < 60$
7	17=0.1	0	d7=0.05	$-30 < \theta_7 < 70$

Algoritmalarda popülasyon sayısı 20, olasılık oranı 0.8 ve maksimum iterasyon sayısı 1000 olarak belirlenmiştir. Durdurma kriteri olarak maksimum iterasyon sayısı baz alınacaktır. Son efektörün konumu doğru bir şekilde değerlendirmek amacıyla her bir algoritma 20 kez çalıştırılmıştır. Çizelge 2'de son efektörün üç farklı hedef konumları ve ters kinematik çözümleri karşılaştırmalı olarak listelenmiştir. Bu konumlar [-25, 100, 50], [24 50 100] ve [-30 30 80] metre cinsinden belirlenmiştir. Şekil 1'de verilen robot manipülörüne Çizelge 1'de verilen DH parametreleri uygulandığında elde edilen konum Şekil 3'teki gibidir.



Şekil 3. Robot manipülörün DH parametrelerine göre başlangıç ve son konumu

Belirlenen hedef konumlarına ( $P_1, P_2$  ve  $P_3$ ) göre yapılan ters kinematik analiz sonuçlarından elde edilen eksen açıları Çizelge 2'de listelenmektedir. Geliştirilen yöntemlerle elde edilen optimal çözüme karşılık gelen son efektörlerin konumları Çizelge 3'de ve konum hatası ve çözüm süreleri Çizelge 4'te listelenmiştir. Çizelge 4'e göre  $P_1$  ve  $P_2$  hedef konumlarında KÇTA 1,  $P_3$  hedef konumunda ise KÇTA 3 minimum hatayı vermektedir.

Çizelge 2. Hedef noktalara göre belirlenen optimum açı değerleri

Hedef Konumlar ( $P_x, P_y, P_z$ )	Algoritma	Açılar						
		$\theta_1$	$\theta_2$	$\theta_3$	$\theta_4$	$\theta_5$	$\theta_6$	$\theta_7$
P1 [-25 100 50]	ÇTA	71.8426	19.7792	34.2324	-51.8039	10.4909	56.9951	38.4093
	KÇTA 1	117.2145	-8.7678	12.6976	3.4830	-72.5359	9.5174	56.0692
	KÇTA 2	176.4837	0.0020	-88.0058	8.6462	3.5588	-46.4904	66.6128
	KÇTA 3	159.3749	5.4173	-51.2830	-22.6370	-42.8438	30.6860	46.7986
P2 [24 50 100]	ÇTA	55.6247	-10.8454	-18.7128	-24.2542	82.0030	-89.9687	7.7394
	KÇTA 1	129.1541	-21.1367	-79.4326	-87.7720	27.8990	88.2270	51.1116
	KÇTA 2	-179.5297	-89.9667	-77.0423	-88.6275	89.4984	88.3994	16.3489
	KÇTA 3	-173.9151	-86.5484	-76.0532	-6.6792	67.7784	-89.6369	-30.0000
P3 [-30 30 80]	ÇTA	30.8102	17.4824	118.5780	-76.5699	63.2843	80.8483	80.1078
	KÇTA 1	177.4396	28.3518	-23.1185	-89.9194	-78.0442	-88.1116	88.1929
	KÇTA 2	140.4795	29.9979	118.5559	-90.0000	-15.1437	-89.9756	-21.4159
	KÇTA 3	124.6548	-75.8700	-73.6553	84.9244	74.2148	84.3397	16.8002

Çizelge 3. Son efektörün konumları, konum hatası ve çözüm süresi

Hedef Konumlar ( $P_x, P_y, P_z$ )	Algoritma	Açılar		
		$P_x$	$P_y$	$P_z$
P1 [-25 100 50]	ÇTA	-24.8955	99.9983	49.9483
	KÇTA 1	-24.9975	100.0037	49.9970
	KÇTA 2	-25.0098	99.9976	49.9992
	KÇTA 3	-24.9985	100.0078	49.9996
P2 [24 50 100]	ÇTA	24.0037	50.0029	99.9870
	KÇTA 1	23.9996	50.0010	99.9996



## Seri Robot Manipülöründe Ters Kinematik Problemi Çözmek İçin Kaotik Tabanlı Çiçek Tozlaşma Algoritmasının Uygulanması

	KÇTA 2	24.0015	49.9997	100.0007
	KÇTA 3	23.9940	49.9970	99.9905
P3	ÇTA	-29.9966	30.0024	80.0036
[-30 30 80]	KÇTA 1	-29.9977	29.9985	80.0020
	KÇTA 2	-30.0013	30.0002	80.0027
	KÇTA 3	-30.0003	29.9977	79.9988

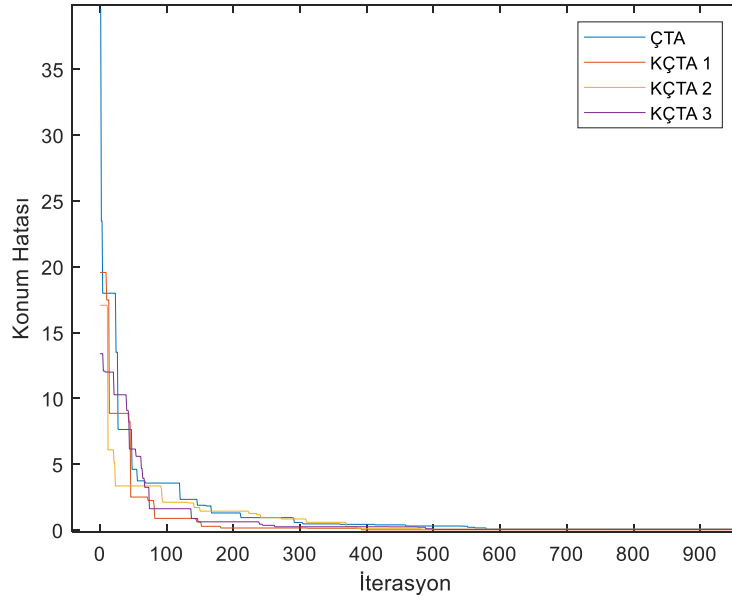
Çizelge 4. Son efektörün hedef konumlarına göre konum hatası('m') ve çözüm süresi(s)

$(P_x, P_y, P_z)$	Algoritma	ÇTA	KÇTA 1	KÇTA 2	KÇTA 3
P1	Konum Hatası	0.1166	<b>0.0054</b>	0.0101	0.0079
[-25 100 50]	Çözüm Süresi	1.1508	2.2042	2.3212	2.2658
P2	Konum Hatası	0.0138	<b>0.0012</b>	0.0017	0.0117
[24 50 100]	Çözüm Süresi	1.6515	2.3856	1.2280	0.5883
P3	Konum Hatası	0.0055	0.0034	0.0030	<b>0.0026</b>
[-30 30 80]	Çözüm Süresi	1.2522	2.2349	2.4782	2.4024

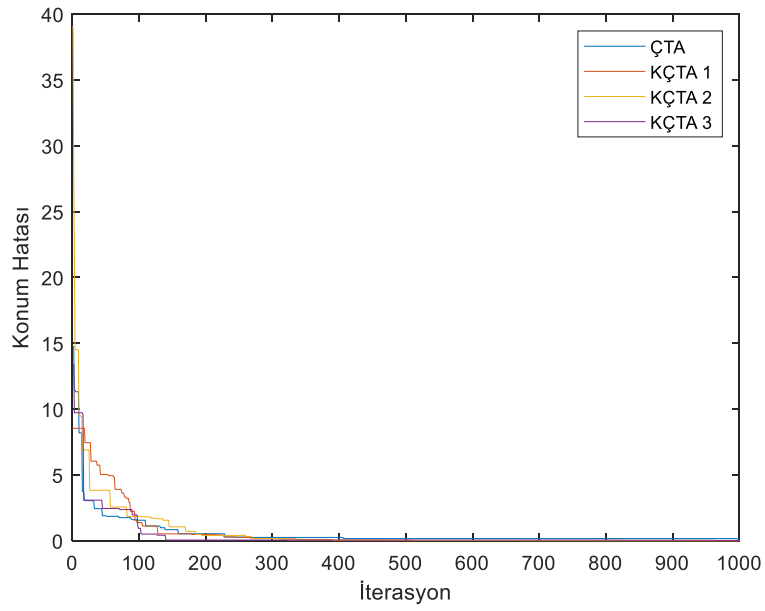
Çizelge 5. P1, P2 ve P3 için algoritmaların karşılaştırmalı sonuçları

Hedef Konumlar $(P_x, P_y, P_z)$	Algoritma	Min	Mak	Ort	Standart sapma
P1 [-25, 100, 50]	ÇTA	0.0166	0.1185	0.0564	0.0302
	KÇTA 1	<b>0.0054</b>	0.0810	0.0407	<b>0.0218</b>
	KÇTA 2	0.0101	0.0994	0.0577	0.0251
	KÇTA 3	0.0079	0.1005	<b>0.0390</b>	0.0244
P2 [24 50 100]	ÇTA	0.0138	0.0808	0.0447	0.0223
	KÇTA 1	<b>0.0012</b>	0.0665	<b>0.0241</b>	<b>0.0175</b>
	KÇTA 2	0.0017	0.1036	0.0333	0.0296
	KÇTA 3	0.0117	0.0714	0.0400	0.0194
P3 [-30 30 80]	ÇTA	0.0055	0.0586	0.0293	0.0155
	KÇTA 1	0.0034	0.0416	0.0141	0.0110
	KÇTA 2	0.0030	0.0371	0.0157	<b>0.0099</b>
	KÇTA 3	<b>0.0026</b>	0.0512	<b>0.0138</b>	0.0115

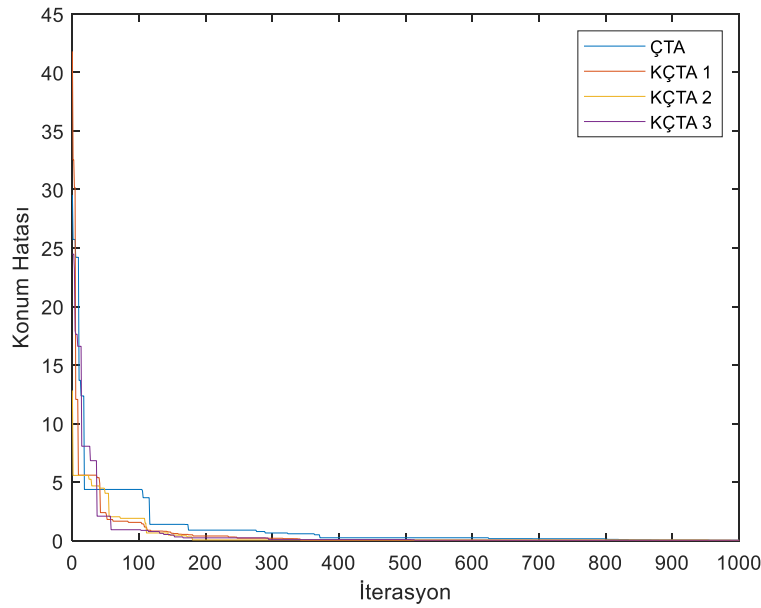
Çizelge 5'te optimal fonksiyonun istatistiksel sonuçları listelenmiştir. Bu çizelgeye göre üç farklı hedef noktası göz önünde bulundurulduğunda kaotik tabanlı algoritmalar orijinal algoritmaya göre daha iyi sonuçlar vermiştir. P1 [-25, 100, 50] ve P2 [24 50 100] hedef konumlarına sahip son efektör incelendiğinde KÇTA 1 algoritması diğer algoritmalara göre en iyi performansa sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca standart sapma değeri de en küçük değere sahip olduğundan problem çözme kalitesinde daha kararlı olduğunu göstermektedir. P3[-30 30 80] hedef konumu incelendiğinde KÇTA 3 algoritmasının minimum ve ortalama performans değerlerinde en iyi sonuçları verdiği görülmektedir. Standart sapma değerinde ise KÇTA 2 algoritmasında elde edilen sonuçlar arasında farklılık olmadığı görülmektedir. Sonuç olarak Çizelge 4'te rapor edilen sonuçlar önerilen kaotik tabanlı çiçek tozlaşma algoritmalarının etkinliğini göstermektedir. Ortalama konum hatasının P1 için 0.0390 ("m"), P2 için 0.0241("m") son olarak P3 için ise 0.0138("m") değerlerinde gerçekleştiği görülmektedir.



Şekil 4. Son efektörün P1[-25, 100, 50] hedef konumuna göre iterasyon boyunca konum hatası



Şekil 5. Son efektörün P2 [24 50 100] hedef konumuna göre iterasyon boyunca konum hatası



**Şekil 6.** Son efektörün P3[-30 30 80] hedef konumuna göre iterasyon boyunca konum hatası

Geliştirilen algoritmalarla son efektörün hedef konumuna göre elde edilen eklem açıları kullanılarak iterasyon boyunca hesaplanan konum hataları Şekil 4-6'da gösterilmektedir. Algoritmaların maksimum iterasyon sayısı 1000 olarak belirlense bile belirli bir iterasyon değerinden sonra çözüm geliştirilememiştir. Bu grafikler incelendiğinde son efektörün P1[-25, 100, 50], P2 [24 50 100] hedef konumlarına ulaşmada KÇTA 1 algoritması, P3[-30 30 80] hedef konumunda ise KÇTA 2 algoritmasının performansının daha iyi olduğu görülmektedir.

## SONUÇ

Bu çalışmada 7 eksenli seri robot manipülörün ters kinematik problemin çözümü sağlanmıştır. Problem geliştirilen üç farklı kaotik tabanlı algoritma (KÇTA 1, KÇTA 2 ve KÇTA 3) ve orijinal ÇTA kullanılarak çözülmüştür. Algoritmalar belirlenen manipülörün üç farklı son efektör konumuna göre ulaşabilmesi için gerekli açıları belirlemiştir. Ayrıca minimum, maksimum, ortalama konum hataları, çözüm süreleri ve standart sapma performans kriteri belirlenmiştir. Sonuç olarak gerçekleştirilen tüm simülasyon sonuçlarına göre kaotik tabanlı algoritmaların başarılı olduğu görülmüştür. Ek olarak kaotik tabanlı algoritmaların manipülörün ters kinematik çözümüne uygun olduğu görülmüştür.

## Çıkar Çatışması

Makalenin planlanması, yürütülmesi ve yazılması sırasında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederim.

## Yazar Katkısı

Makalenin planlanmasının, yürütülmesinin ve yazılmasının makalenin tek yazarı olarak tarafımdan yapıldığını beyan ederim

## KAYNAKLAR

- Ayyıldız M, Çetinkaya K, 2016. Comparison of four different heuristic optimization algorithms for the inverse kinematics solution of a real 4-DOF serial robot manipulator. *Neural Computing and Applications*, 27: 825–836.
- Çimen ME, Garip, ZB, Boz AF, 2021. Chaotic flower pollination algorithm based optimal PID controller design for a buck converter. *Analog Integrated Circuits and Signal Processing*, 107: 281–298.

- Dereli S, Köker R, 2019. A meta-heuristic proposal for inverse kinematics solution of 7-DOF serial robotic manipulator: quantum behaved particle swarm algorithm. *Artificial Intelligence Review*.
- Dereli S, Köker R, 2019. Calculation of the inverse kinematics solution of the 7-DOF redundant robot manipulator by the firefly algorithm and statistical analysis of the results in terms of speed and accuracy. *Inverse Problems in Science and Engineering*.
- Durmuş B, Temurtaş H, Gün A, 2011. An Inverse Kinematics Solution using Particle Swarm Optimization. *IATS*.
- El-Sherbiny A, Elhosseini MA, Haikal AY, 2018. A comparative study of soft computing methods to solve inverse kinematics problem. *Ain Shams Engineering Journal*, 9(4):2535-2548.
- Hénon MA, 1976. Two-Dimensional Mapping With a Strange Attractor. *The Theory of Chaotic Attractors*. Springer, 94–102.
- Huang H, Chen C, Wang P, 2012. Particle Swarm Optimization for Solving the Inverse Kinematics of 7-DOF Robotic Manipulators. *IEEE International Conference on System*.
- Hwang S, Kim H, Choi Y, Shin K, Han C, 2017. Design Optimization Method for 7 DOF Robot Manipulator Using Performance Indices. *International Journal Of Precision Engineering And Manufacturing*, 18(3): 293-299.
- Jha P, Bibhuti Bhusan Biswal, 2017. Optimization Approach for Inverse Kinematic Solution, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.71409. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/57605>
- Karpinska J, Tchon K, Janiak M, 2012. Approximation of Jacobian Inverse Kinematics Algorithms: Differential Geometric vs. Variational Approach. *Journal of Intelligent and Robotic Systems*, 68:211–224.
- Köker R, 2013. A genetic algorithm approach to a neural-network-based inverse kinematics solution of robotic manipulators based on error minimization. *Information Sciences*, 222: 528-543.
- Seraji H, Long MK, Lee TS, 1993. Motion Control of 7-DOF Arms: The Configuration Control Approach. *IEEE Transactions On Robotics And Automation*, 9(2).
- Tabandeh S, Melek WW, Clark CM, 2010. An adaptive niching genetic algorithm approach for generating multiple solutions of serial manipulator inverse kinematics with applications to modular robots. *Robotica*, 28: 493–507.
- Toz M, 2017. Inverse Kinematic Solution Of A 6 Dof Serial Robot Manipulator With Offset Wrist By Using ALO Algorithm. *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences*, 8(2): 81-90.
- Wang J, Li Y, Zhao X, 2010. Inverse Kinematics and Control of a 7-DOF Redundant Manipulator Based on the Closed-Loop Algorithm. *International Journal of Advanced Robotic Systems*, 7(4):1-10.
- Yang XS, 2012. Flower pollination algorithm for global optimization. *Unconventional Computation and Natural Computation*, 240–249.
- Yousri D, AbdelAty AM, Said LA, Elwakil AS, Maundy B, Ahmed G. Radwan, 2019. Chaotic Flower Pollination and Grey Wolf Algorithms for parameter extraction of bio-impedance models. *Applied Soft Computing Journal* 75: 750–774.
- Zhang L, Xiao N, 2019. A novel artificial bee colony algorithm for inverse kinematics calculation of 7-DOF serial manipulators. *Soft Computing*, 23: 3269–3277.

**To Cite:** Dönmez Yeşildağ F, Uysal Şahin B, Usanmaz Bozhüyük A, 2022. Antibacterial activity of plant essential oils obtained from *Satureja* species against *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas citri* subsp. *fuscans*, Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 91-103.

**Antibacterial activity of plant essential oils obtained from *Satureja* species against *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas citri* subsp. *fuscans***

Mesude Figen DÖNMEZ<sup>1,\*</sup>, Badel UYSAL ŞAHİN<sup>1</sup>, Ayşe USANMAZ BOZHÜYÜK<sup>1</sup>

**ABSTRACT:** In this study, the antibacterial effects of essential oils obtained from different *Satureja* species (*Satureja cuneifolia* Ten., *Satureja spicigera* (C. Koch) Boiss., *Satureja thymbra* L., *Satureja hortensis* L. and *Satureja cilicica* P.H. Davis) against *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (Smith) Vauterin and *Xanthomonas citri* subsp. *fuscans* (Burkholder) Starr & Burkholder, which cause common leaf blight in bean plant, were tested. Essential oils were found to significantly inhibit the growth of bacterial strains of both disease agents *in vitro*, and the lowest concentrations that prevent bacterial growth were determined for both pathogens. The effects of essential oil applications on seed germination, number of infected cotyledons and disease severity were also evaluated. It was determined that essential oils of *S. cuneifolia* and *S. spicigera* has no negative effects on seed germination while essential oils of *S. hortensis*, *S. thymbra* and *S. cilicica* caused a little decrease in seed germination compared to the control. As a result of *S. cuneifolia* + pathogen and *S. spicigera* + pathogen applications, no infected cotyledons were detected, and it was determined that the disease development caused by two pathogens was prevented by 100%.

**Keywords:** Essential oil, *Satureja* spp., antibacterial activity, *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas citri* subsp. *fuscans*, bean

<sup>1</sup>Mesude Figen DÖNMEZ ([Orcid ID: 0000-0002-7992-8252](https://orcid.org/0000-0002-7992-8252)), Badel UYSAL ŞAHİN ([Orcid ID: 0000-0003-4061-769X](https://orcid.org/0000-0003-4061-769X)), Ayşe USANMAZ BOZHÜYÜK ([Orcid ID: 0000-0003-2450-6850](https://orcid.org/0000-0003-2450-6850)) İğdır Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, İğdir, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mesude Figen DÖNMEZ, e-mail: mesude.figen.donmez@igdir.edu.tr

## INTRODUCTION

Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is an economically important legume plant cultivated in many parts of the world (Yu et al., 2000; Popovic et al., 2012). It is one of the most consumed legumes in the world due to its rich nutritional and protein content. Plant residues of bean are used in the animal feed industry, plays a role in soil improvement and is widely grown due to its adaptation to different climatic conditions and its diversity (Ofuya and Akhidue, 2005; Voisin et al., 2014).

Bean production is limited by various biotic and abiotic factors (Mourice and Tryphone, 2012; Beebe et al., 2013). Common leaf blight, caused by seed-borne *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (Smith) Vauterin (Xpp) and *Xanthomonas citri* subsp. *fuscans* (Burkholder) Starr & Burkholder (Xcf) (Chen et al., 2018) are a highly-devastating diseases commonly seen around the world. It is one of the main biotic factors affecting the yield of beans and causes yield losses ranging from of 10-45% on average in the bean production (Gillard et al., 2009; Popović et al., 2010; Francisco et al., 2013). Depending on the density of the inoculum, host sensitivity and environmental conditions that support the progression of the disease, the yield loss can reach 100% (Opio et al., 1996). The presence of *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas citri* subsp. *fuscans* in Turkey has been reported by early studies. (Demir and Gundagdu, 1994; Kahveci and Maden, 1994; Dönmez 2004; Bastas and Sahin, 2017). Bean bacterial pathogens also cause serious yield and quality losses in bean production in Turkey (Bastas and Sahin, 2017).

Both pathogens cause the same symptom in leaves, stems, pods and seeds of the plants. However, Xcf is reported to be more aggressive (Opio et al., 1996). The disease begins in the form of spots that have absorbed water on the underside of the leaves. Later, the center of the stains dries up and turns brown, and a narrow, thin lemony-yellow halo is observed around the stains. Over time, the lesions expand irregularly and the spots combine to turn into a sign of blight (Agrios, 2005). The disease symptom is seen as water-absorbed sunken areas on the stem and these areas grow and expand as reddish lines. Affected stem often crack and water-soaked cankers appear around these cracks (Belete and Bastas, 2017). Symptoms in pods are generally circular, slightly-sunken and dark red-brown in color. The pathogen is found in the seed coat or hilum, and causes a buttery-yellow- or brown-colored symptom in white bean seeds. The seeds affected by the disease shrink and show weak germination. In humid weather, a yellowish bacterial exudate forms on the pod, leaf and stem that dries later (Saettler, 1991; Schwartz et al., 2005; Okechukwu and Ekpo 2008).

In preventing the loss of yield and quality caused by the disease, it is important to apply methods that reduce inoculum, such as knowing host pathogen interaction, using pathogen-free seeds, crop rotation, use of resistant cultivars, eradication of weeds and removal of plant residues (Asensio-S-Manzanera et al., 2006; Zanatta et al., 2007; Bozkurt and Soylu, 2011). However, the facts that the pathogen is seed-borne, proliferating very rapidly and spreading makes it difficult to control the disease, and as a result, chemical control is seen as the most effective method, and many pesticides are used worldwide (Finizio and Villa, 2002). However, as the potency of pesticides is enriched, the strength of their side effects is increasing day by day. The unconscious use of pesticides has a great role in environmental pollution and disturbance of natural balance as well as the ensuing human, plant and animal health problems in recent years (Brent, 2004; Padovani et al., 2004; Garcês et al., 2020). In addition, the resistance developed by pathogens against pesticides and the formation of new breeds pose a serious problem and no results can be obtained from the chemical control methods (Carmona et al., 2018; Rangasamy et al., 2018). Today, as consumers become more aware of the environmental and human health hazards associated with chemical applications, the demand for organic products increases

dramatically, as a result of which the global agriculture industry is experiencing a major shift towards organic agriculture. At this point, there is a growing interest in biological approaches to be applied in disease control and the potential of using plant-based essential oils instead of drugs that cause resistance in pathogens is considered (Popoola et al., 2016; Ganiyu et al., 2017). Among many plant genera and species belonging to Lamiaceae family, plants in which thymol or carvacrol are prominent in terms of essential oil components are generally known as thyme around the world and are used for such purposes (Baser, 2001; Baydar, 2007). In Turkey, about 15 plant species (*Origanum*, *Thymus*, *Thymbra*, *Satureja* and *Coridothymus*) are known as thyme and they are utilized in several purposes. 38 *Thymus* species (52% endemic), 23 *Origanum* species (65% endemic), 14 *Satureja* species (28% endemic), 2 *Thymbra* species and 1 *Coridothymus* species are deployed in different regions of Turkey (Baser, 1994; Baydar and Arabacı, 2013). In very recent study, antibacterial properties of essential oils and extracts obtained from several *Satureja* spp. such as *Satureja cuneifolia*, *Satureja spicigera*, *Satureja thymbra*, *Satureja hortensis* and *Satureja cilicica* against bean halo blight disease agent *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and bean bacterial wilt disease agent *Curtobacterium flaccumfaciens* subsp. *flaccumfaciens* which led to significant losses in yield and quality on beans was investigated (Dönmez et al., 2020).

In this study, the antibacterial activity of the essential oils obtained from *Satureja cuneifolia* Ten., *Satureja spicigera* (C. Koch) Boiss., *Satureja thymbra* L., *Satureja hortensis* L. and *Satureja cilicica* P. H. Davis against Xpp. and Xcf., which causes significant yield losses and decreased seed quality in bean, were studied *in vitro* and *in vivo*.

## MATERIALS AND METHODS

### Material

#### Pathogen strains and plant species used in the study

Total of 20 pathogen strains, available at the bacterial culture collection of Asst. Prof. M. F. Donmez at Iğdır University, 10 belonging to Xpp and 10 belonging to Xcf, were used in the study. As plant material, thyme (*Satureja cuneifolia* Ten), Trabzon thyme (*Satureja spicigera* (C. Koch) Boiss.), lemon thyme (*Satureja thymbra* L.), rock thyme (*Satureja hortensis* L.) and pointed (sivri) thyme (*Satureja cilicica* PH Davis.) species were used. As plant material, thyme (*Satureja cuneifolia* Ten) and pointed (sivri) thyme (*Satureja cilicica* PH Davis.) from Konya Selçuklu; Trabzon thyme (*Satureja spicigera* (C. Koch) Boiss.) from Trabzon Maçka; lemon thyme (*Satureja thymbra* L.) from Antalya Demre; rock thyme (*Satureja hortensis* L.) from Erzurum Şenkaya species were used and plants were collected during flowering between June and September in the 2014-2015 years.

#### Plant essential oils

Plants were dried in shady environments without sunlight, then were ground in a grinding mill and powdered, and then stored under cool storage conditions by putting them in cloth bags. Essential oils of dried plant samples (500 gr) were obtained by hydrodistillation method at 3-4 hours using the Clevenger apparatus (EM1000/CE). The essential oils obtained were dried on anhydrous sodium sulphate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Essential oils were obtained stored a closed vial at 4 °C until used for bioassays.

### Method

#### Determination of antibacterial activities of essential oils

The bacterial strains were grown in Trypticase Soy Agar (TSA) growth medium and bacterial concentration was adjusted to  $10^8$  cells / mL<sup>-1</sup> (OD:  $A_{660\text{nm}} = 0.15$ , Spectrophotometer, Thermo). Then, 100 µl of the suspensions were transferred to TSA medium, and homogeneously spread on the TSA

medium with a sterile glass drumstick. After drying the nutrient media in a sterile cabinet for 10 minutes, Oxoid standard (blank) discs (6 mm) were impregnated with essential oils (10 µl / disc) were placed at equal intervals and 1 per petri dish. The prepared petri dishes were incubated at 28 °C for 24-48 hours. Then the radius (inhibition zone) of the bacteria-free zone around the discs was measured in mm. sdH<sub>2</sub>O was used as negative control while metilmicin (30mg) was used as positive control.

### **Determination of the effect of essential oil applications on seed germination and the number of Xpp and Xcf infected cotyledons *in vitro***

The Aras 98 bean seeds were surface disinfected by washing in sterile water for 30 minutes, then soaked in 95% ethyl alcohol for 5 minutes and then washed in sterile water again for removing the ethyl alcohol. Subsequently, it was kept in 10% bleach for 5 more minutes and washed 5 times in sterile water and left to dry. 2 ml from each essential oil solutions prepared in different concentrations (1/5, 1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/125, 1/250, 1/500 and 1/1000 v / v) by using 10% DMSO solution were transferred to test tubes. Then, 100 µl of the 24-hour mixed bacterial strain solution (10<sup>8</sup> cells mL<sup>-1</sup>, grown in Nutrient Broth (NB; Lab-lemco powder 1 g, yeast extract 2 g, peptone 5 g, sodium chloride 5 g, dH<sub>2</sub>O 1 L. pH 7.4 ± 0.2) was added to these tubes. 40 seeds were added to beaker (200 ml) and these beakers were incubated for 24 hours in a hematological shaker (150 rpm) and essential oil (2 ml for each seed, total 80 ml) and pathogenic bacteria (mix of pathogen strains, 100 µl for each seed, total 4 ml) were inoculated to seed. Then the seeds were left to dry on petri dishes with sterile blotting paper. The seeds were transferred to TSA nutrients with 10 seeds placed per petri dish. The petri dishes were covered with parafilm and incubated at 28 °C for 5-10 days. Essential oil was used as negative control while bacterial solution was used as positive control. The seeds covered with the pathogen were transferred to petri dishes with blotter paper placed on the bottom and the blotter papers were saturated with sterile water and the seeds were allowed to germinate at room temperature. Petries were covered with parafilm and the number of seeds germinated was recorded daily. At the end of the 20th day, the cotyledon leaves were examined and the number of infected outlets was recorded.

### **Determination of the effect of essential oils on common leaf blight disease *in vivo***

Parallel to the petri trials, the seeds (Aras 98) infected with pathogen and treated with essential oil were transferred to pots and grown under greenhouse conditions (90% humidity and 24–28 °C), and were observed to record the number of germinating plants and disease severity. A scale of 1-5 was used to determine the severity of the disease (1: No disease; 2: 25% of plants are diseased; 3: 50% of plants are diseased; 4: 75% of plants are diseased; 5: All plants are diseased) (Schaad 1994). Distilled water was used as negative control and mix of Xpp/Xcf strain as positive control and applications were replicated three times.

### **Statistical analysis**

The measurement values obtained were analysed with ANOVA using the SPSS (version 17) statistical program and the differences between the applications were determined by using Duncan's Multiple Range Test ( $p \leq 0.05$ ).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### ***In vitro* Antibacterial Activity of Essential Oils**

When the results of the study were evaluated, it was determined that essential oils formed inhibition zones on the tested bacteria at different rates (Figures 1A and B). *S. spicigera* essential oil was determined to have very strong bactericidal effect on strains Xpp 145, Xpp 442 and Xpp 538, while the



Antibacterial activity of plant essential oils obtained from *Satureja* species against *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas citri* subsp. *fuscans*

essential oil obtained from *S. cilicica* strains has the same effect on Xpp 442 and Xpp 538. Among tested essential oils, the largest zone against Xpp was obtained from *S. cuneifolia* essential oil application with 22.90 mm (Table 1). There were significant differences between essential oils and bacterial strains used.

**Table 1.** Antibacterial effects of essential oils of *Satureja* species on the growth of Xpp strains

Bacterial strains	Essential oils of <i>Satureja</i> species and inhibition zones formed (mm)				
	<i>S. cuneifolia</i>	<i>S. spicigera</i>	<i>S. thymbra</i>	<i>S. hortensis</i>	<i>S. cilicica</i>
Xpp 120	21.47 b	13.20 e	17.99 a	15.44 e	11.46 h
Xpp 124	14.49 g	12.93 f	10.47 j	8.13 j	13.61 g
Xpp 135	20.43 d	19.91 b	17.01 b	18.90 a	15.47 e
Xpp 145	14.12 i	NG	15.43 e	16.76 d	13.88 f
Xpp 256	20.58 c	14.63 d	13.05 g	12.86 i	15.83 c
Xpp 305	14.18 h	11.02 g	15.42 d	14.24 h	15.56 d
Xpp 406	18.63 f	17.32 c	15.66 c	15.10 f	16.62 a
Xpp 436	19.96 d	20.61 a	12.45 h	17.63 c	16.37 b
Xpp 442	22.90 a	NG*	14.77 f	14.59 g	NG
Xpp 538	19.68 e	NG	12.28 i	18.88 b	NG
Control	0.0 j	0.0 h	0.0 k	0.0 k	0.0 i

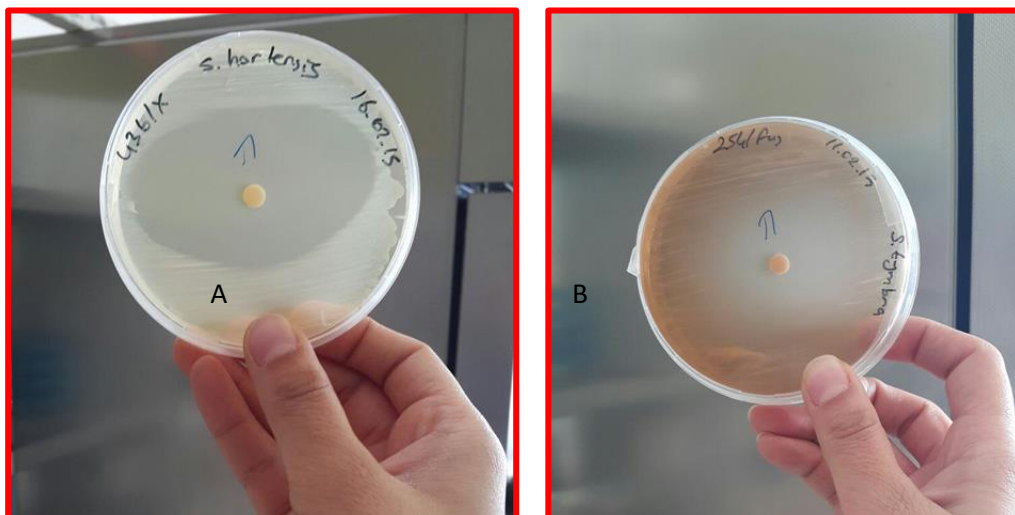
\*NG; No Growth indicating strong antibacterial activity

It was determined that *S. cuneifolia* essential oil has also strong bactericidal effect on Xcf 264, Xcf 491 and Xcf 498, while *S. spicigera* essential oil has a bactericidal effect on strains Xcf 253, Xcf 264, Xcf 266, Xcf 490, Xcf 491, Xcf 495 and Xcf 498, and the essential oil obtained from *S. cilicica* has a bactericidal effect on Xcf 265, Xcf 266 and Xcf 498. Among tested essential oils, the highest inhibition zones were caused by *S. hortensis* against Xcf 253 strains with an inhibition zone of a radius of 21.58 mm which was followed by *S. spicigera* against Xcf 265 with an inhibition zone of 18.29 mm and against Xcf 275 with a zone of 18.12 mm (Table 2), respectively.

**Table 2.** Antibacterial effects of essential oils belonging to *Satureja* species on the growth of Xcf strains

Pathogen Bacteria	Essential oils of <i>Satureja</i> species and Inhibition Zones Formed (mm)				
	<i>S. cuneifolia</i>	<i>S. spicigera</i>	<i>S. thymbra</i>	<i>S. hortensis</i>	<i>S. cilicica</i>
Xcf 253	17.63 b	NG*	15.91 b	21.58 a	17.68 a
Xcf 254	17.75 a	11.11 c	16.07 a	16.96 e	11.3 g
Xcf 264	NG	0.0 d	13.37 g	18.48 b	14.79 e
Xcf 265	15.84 c	18.29 a	11.21 h	11.91 i	NG
Xcf 266	11.69 e	NG	14.92 e	16.38 f	NG
Xcf 275	12.29 d	18.12 b	14.73 f	17.42 d	15.35 d
Xcf 490	11.48 f	NG	15.23 d	13.84 g	13.35 f
Xcf 491	NG	NG	15.66 c	17.56 c	17.04 b
Xcf 495	8.56 g	NG	8.88 i	12.40 h	15.39 c
Xcf 498	NG	NG	7.58 j	11.65 j	NG
Control	0.0 h	0.0 d	0.0 k	0.0 k	0.0 h

\*NG; No Growth indicating strong antibacterial activity



**Figure 1.** The antibacterial effect of *S. hortensis* L. essential oil on Xpp growth (A) and the effect of *S. thymbra* essential oil on Xcf growth (B) as shown inhibition zones around discs (arrow)

Antibacterial activity of plant essential oils obtained from *Satureja* species against *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas citri* subsp. *fuscans***Minimal Inhibition Concentrations (MIC) of Essential Oils belonging to *Satureja* Species**

The lowest concentration values at which essential oils inhibit the growth of 20 strains of two pathogens are indicated in Tables 3, 4, 5, and 6. MIC in which *Satureja hortensis* essential oil inhibits bean pathogens was determined as 62.5 µl for Xcf, 15.63 and 31.25 µl for Xpp (Table 3).

**Table 3.** MIC values of *Satureja hortensis* essential oil on Xpp and Xcf strains

	<i>Satureja hortensis</i>						MIC
	500 µl	250 µl	125 µl	62.5 µl	31.25 µl	15.63 µl	
253/fus	21.46*	10.28	8.4	7.22	-	-	62.5
254/fus	35.74	10.78	7.7	7.04	-	-	62.5
264/fus	42.66	14.64	8.7	8.66	-	-	62.5
265/fus	16.48	8.66	9.04	7.72	-	-	62.5
266/fus	32.68	11.32	8.54	7.14	-	-	62.5
275/fus	18.96	12.22	9.18	8.14	-	-	62.5
490/fus	8.44	8.18	8.22	7.26	-	-	62.5
491/fus	28.88	10	8.9	7.68	-	-	62.5
495/fus	34.98	21.98	8.54	7.04	-	-	62.5
498/fus	13.78	8.68	8.58	7.86	-	-	62.5
120/Xpp	80	80	80	80	80	80	15.63
124/Xpp	38.94	15.04	9.06	8.54	8.14	-	31.25
135/Xpp	36.04	20.96	10.48	8.22	7.66	-	31.25
145/Xpp	39.14	22.06	9.48	8.52	7.92	-	31.25
256/Xpp	40.78	15.18	8.9	8.84	7.7	-	31.25
305/Xpp	21.60	20	9.74	9.44	8.5	-	31.25
406/Xpp	31.46	18.48	9.1	8.9	7.36	-	31.25
442/Xpp	36.38	15.48	9.46	8.04	7.62	-	31.25
436/Xpp	29.74	12.14	9.04	8.4	7.54	-	31.25
538/Xpp	34.70	12.18	8.68	8.24	7.62	-	31.25

\*: Inhibition zone value (r/mm)

MIC values of *Satureja thymbra* essential oil was determined to be between 15,63 and 500 µl for Xcf and between 15,63 and 250 µl for Xpp (Table 4).

**Table 4.** MIC values of *Satureja thymbra* essential oil on Xpp and Xcf strains

	<i>Satureja thymbra</i>						MIC
	500 µl	250 µl	125 µl	62.5 µl	31.25 µl	15.63 µl	
253/fus	36.56*	-	-	-	-	-	500
254/fus	14.92	10.3	6.86	-	-	-	125
264/fus	-	-	-	-	-	-	15.63
265/fus	9.92	8.44	7.7	6.92	6.98	6.56	15.63
266/fus	7.54	7.14	6.7	6.86	8.74	-	125
275/fus	16.92	9.34	6.66	6.7	8.04	6.3	15.63
490/fus	38.80	9.96	6.52	-	-	-	125
491/fus	29.60	13.32	10.16	8.02	9.04	9.08	62.5
495/fus	10.94	8.18	6.94	-	6.88	7.58	31.25
498/fus	27.36	13.32	11.58	8.06	8.12	6.66	15.63
120/Xpp	27.34	13	-	-	-	-	250
124/Xpp	17.48	11.8	8.44	-	-	-	125
135/Xpp	39.24	36	12.42	-	-	-	125
145/Xpp	27.50	12.4	7.22	7.2	6.72	6.4	15.63
256/Xpp	40.24	10.88	7.58	-	-	-	125
305/Xpp	32.60	11.6	8.26	6.84	-	15.63	31.25
406/Xpp	28.64	9.18	-	-	-	-	250
442/Xpp	34.66	14.12	-	-	-	-	250
436/Xpp	16.14	10.84	6.98	7.22	-	6.3	15.63
538/Xpp	88.86	69.16	29.38	15.08	-	-	62.5

\*: Inhibition zone value (r/mm)

When MIC results of *Satureja cuneifolia* essential oil were evaluated, MIC values for Xcf strains were recorded as 31,25 - 62,5 - 125, 250 and 500 µl, while MIC values for Xpp strains were recorded as 15,63, 31,25 - 125 µl (Table 5).

Antibacterial activity of plant essential oils obtained from *Satureja* species against *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas citri* subsp. *fuscans*Table 5. MIC values of *Satureja cuneifolia* essential oil on Xpp and Xcf strains

<i>Satureja cuneifolia</i>							
	500 µl	250 µl	125 µl	62.5 µl	31.25 µl	15.63 µl	MIC
253/fus	19.56*	-	-	-	-	-	500
254/fus	8.70	7	-	-	-	-	250
264/fus	17.22	9.6	7.34	7	-	-	62.5
265/fus	-	-	-	-	-	-	15.63
266/fus	15.12	10.04	8.22	-	-	-	125
275/fus	29.06	9.86	9.02	8.3	8.04	7.48	15.63
490/fus	12.48	8.5	8.02	7.84	7.92	7.48	15.63
491/fus	23.14	15.42	9.28	8.98	8.12	8.1	15.63
495/fus	14.30	14.06	8.18	8.74	8.56	8.6	125
498/fus	14.24	9.34	-	-	-	-	250
120/Xpp	12.92	12.88	12.54	8.74	10.98	13.14	62.25
124/Xpp	27.00	14.04	8.94	8.5	7.7	7.42	15.63
135/Xpp	37.40	14.96	9.54	8.84	8.32	8.28	15.63
145/Xpp	19.26	10.14	9.34	8.72	8.28	7.8	15.63
256/Xpp	20.48	19.62	8.96	8.16	7.28	-	31.25
305/Xpp	22.24	14	9	8.2	8.04	7.8	15.63
406/Xpp	48.46	25.08	15.34	13.36	10.98	10.56	15.63
442/Xpp	38.84	18.54	12.54	9.34	8.42	8.6	31.25
436/Xpp	16.38	10.62	8.66	8.36	8.4	7.4	15.63
538/Xpp	14.18	11.26	9.44	8.62	7.86	-	31.25

\*: Inhibition zone value (r/mm)

MIC value of *Satureja spicigera* essential oil against Xcf strains was determined to be between 15,63 and 62,5 µl. This value was found as 31,25 – 500 µl for Xpp strains (Table 6).

Table 6. MIC values of *Satureja spicigera* essential oil on Xpp and Xcf strains

<i>Satureja spicigera</i>							
	500 µl	250 µl	125 µl	62.5 µl	31.25 µl	15.63 µl	MIC
253/fus	27.04*	-	-	-	-	-	500
254/fus	20.38	-	-	-	-	-	500
264/fus	39.22	8.24	7.74	-	-	-	125
265/fus	38.72	7.1	-	-	-	-	250
266/fus	30.74	12.14	7.58	-	-	-	125
275/fus	35.98	25.22	7.92	-	-	-	125
490/fus	12.88	10.06	8.24	7.02	-	-	62.5
491/fus	34.62	8.78	8.3	-	-	-	125
495/fus	32.26	8.26	7.2	-	-	-	125
498/fus	44.94	10.52	7.64	7.44	7.24	-	31.25
120/Xpp	47.78	22	21	20.3	9.7	8.3	15.63
124/Xpp	37.60	29.2	11.48	9.12	8.38	8.1	15.63
135/Xpp	35.96	19.78	17.7	13.68	8.88	8.36	15.63
145/Xpp	30.62	29.14	12.88	8.08	7.36	7.1	15.63
256/Xpp	43.18	33.4	9.74	8.6	7.6	-	31.25
305/Xpp	31.58	31.42	12.6	10.9	9.38	8.36	15.63
406/Xpp	34.92	24.32	9.2	9.48	8.02	6.64	15.63
442/Xpp	47.02	25.08	11.48	-	-	-	125
436/Xpp	37.22	33.06	10.6	8.54	7.9	7.16	15.63
538/Xpp	51.88	38.42	11.24	9.56	8.28	7.7	15.63

\*: Inhibition zone value (r/mm)

The MIC value of *Satureja cilicica* essential oil on Xcf, one of the bean pathogens, was found between 15.63 and 62.5 µl. It has been noted that the oil inhibits the development of Xpp pathogens by forming a zone at a concentration of 31.25-500 µl (Table 7).

Table 7. MIC values of *Satureja cilicica* essential oil on Xpp and Xcf strains

<i>Satureja cilicica</i>							
	500 µl	250 µl	125 µl	62.5 µl	31.25 µl	15.63 µl	MIC
253/fus	28.00*	19.9	15.18	9.74	7.22	-	31.25
254/fus	24.04	15.6	8.56	7.46	8.38	-	62.5
264/fus	-	-	-	-	-	-	15.63
265/fus	38.28	9.54	8.52	8.24	8.24	-	31.25
266/fus	15.82	11	9.22	7.7	7.36	-	31.25
275/fus	45.44	11.22	9.38	8.82	7.26	-	31.25
490/fus	11.46	8.48	8.86	8.7	8.06	7.82	15.63
491/fus	31.42	11.04	8.36	7.92	-	-	62.5
495/fus	29.98	10.18	8.98	8.6	8.4	-	31.25

Antibacterial activity of plant essential oils obtained from *Satureja* species against *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas citri* subsp. *fuscans*Table 7. MIC values of *Satureja cilicica* essential oil on Xpp and Xcf strains (continue)

	<i>Satureja cilicica</i>						MIC
	500 µl	250 µl	125 µl	62.5 µl	31.25 µl	15.63 µl	
498/fus	-	-	-	-	-	-	15.63
120/Xpp	47.36	37.44	35.1	21.02	14.24	14.12	15.63
124/Xpp	17.16	-	-	-	-	-	500
135/Xpp	19.64	11.4	8.74	-	-	-	125
145/Xpp	10.46	7.82	-	-	-	-	250
256/Xpp	13.98	9.02	8.26	7.20	-	-	62.5
305/Xpp	50.08	34.78	31.8	-	-	-	125
406/Xpp	32.76	13.3	-	-	-	-	250
442/Xpp	27.72	22.1	-	-	-	-	250
436/Xpp	24.32	13.08	8.62	7.40	6.58	-	31.25

\*: Inhibition zone value (r/mm)

The Effects of Essential Oil Applications on Seed Germination and the Number of Infected Cotyledons *in vitro*

The disinfected seeds were first treated with mixed bacterial strains, then treated with essential oils (contact effect) and transferred to petri dishes containing NA. In the petri trials, it was observed that the seeds were failed to germinate due to the phytotoxic effect of the essential oils on treated seed. For this reason, the seeds were exposed to the volatile effect of essential oil by adding 10 µl of essential oil in the blotter papers fixed on the lid of the petri dishes. It was determined that the essential oils of *S. cuneifolia* and *S. spicigera* did not adversely affect the seed germination, and the same number of seeds germinated with the control group. *S. hortensis*, *S. thymbra* and *S. cilicica* essential oils were found to cause a little decrease in seed germination compared to control. No bacterial disease developments were observed on pathogen inoculated seeds and treated with *S. cuneifolia* and *S. spicigera* essential oils. In pathogen applications, infected cotyledon emergence was recorded as 100% for Xpp and Xcf (Tables 8 and 9).

Table 8. The effects of essential oils belonging to *Satureja* species on the numbers of germinated seeds and Xpp infected cotyledons

Applications	Number of Infected Cotyledons	Number of Germinated Plants
Xpp*** + <i>S. cuneifolia</i>	0.0 ± 0.0 a	10.0 ± 0.0 f
Xpp + <i>S. spicigera</i>	0.0* ± 0.0 a**	9.50 ± 0.0 e
Xpp + <i>S. thymbra</i>	1.0 ± 0.0 b	7.75 ± 0.35 c
Xpp + <i>S. hortensis</i>	1.0 ± 0.0 b	7.0 ± 0.0 b
Xpp + <i>S. cilicica</i>	1.0 ± 0.0 b	8.75 ± 0.35 d
<i>S. cuneifolia</i>	0.0 ± 0.0 a	10.0 ± 0.0 f
<i>S. spicigera</i>	0.0 ± 0.0 a	10.0 ± 0.0 f
<i>S. thymbra</i>	0.0 ± 0.0 a	7.0 ± 0.0 b
<i>S. hortensis</i>	0.0 ± 0.0 a	6.0 ± 0.0 a
<i>S. cilicica</i>	0.0 ± 0.0 a	8.0 ± 0.0 c
Negative Control	0.0 ± 0.0 a	10.0 ± 0.0 f
Positive Control (Mix of Xpp strains)	9.0 ± 0.0 c	9.0 ± 0.0 d

\*Values are the averages of 3 replicates, \*\*There are no statistically significant differences between values expressed with the same letters according to Duncan's Multiple Range Test ( $p \leq 0.05$ ), \*\*\* Xpp inoculum was prepared as mixture of Xpp strainsTable 9. The effects of essential oils belonging to *Satureja* species on the numbers of germinated seeds and infected cotyledons

Applications	Number of Infected Cotyledons	Number of Germinated Plants
Xcf ***+ <i>S. cuneifolia</i>	0.0* ± 0.0 a**	10.0 ± 0.0 d
Xcf + <i>S. spicigera</i>	0.0 ± 0.0 a	10.0 ± 0.0 d
Xcf + <i>S. thymbra</i>	1.0 ± 0.0 b	7.0 ± 0.0 b
Xcf + <i>S. hortensis</i>	2.0 ± 0.0 c	6.0 ± 0.0 a
Xcf + <i>S. cilicica</i>	2.0 ± 0.0 c	8.0 ± 0.0 c
<i>S. cuneifolia</i>	0.0 ± 0.0 a	10.0 ± 0.0 d
<i>S. spicigera</i>	0.0 ± 0.0 a	10.0 ± 0.0 d
<i>S. thymbra</i>	0.0 ± 0.0 a	7.0 ± 0.0 b
<i>S. hortensis</i>	0.0 ± 0.0 a	6.0 ± 0.0 a
<i>S. cilicica</i>	0.0 ± 0.0 a	8.0 ± 0.0 c
Negative Control	0.0 ± 0.0 a	10.0 ± 0.0 d
Positive Control (Mix of Xcf strains)	8.0 ± 0.0 d	8.0 ± 0.0 c

\*Values are the averages of 3 replicates, \*\*There are no statistically significant differences between values expressed with the same letters according to Duncan's Multiple Range Test ( $p \leq 0.05$ ), \*\*\* Xcf inoculum was prepared as mixture of Xcf strains

### The Effects of Essential Oils on Common Leaf Blight Disease *in vivo*

Symptoms caused by pathogens in pot trials were also evaluated according to a disease scale of 1-5. No disease development was observed in negative control (sterile water- sprayed) in all treatments and only plants treated with essential oil of five *Satureja* species. In pathogen inoculated control treatments, disease severity value caused by Xpp strain was 3.25, while the disease severity values on Xpp + *S. thymbra* treatment was 2.0, Xpp + *S. hortensis* treatment was 1.25, and Xcp + *S. cilicia* treatment was 2.25. No disease was detected in treated with *S. cuneifolia* and *S. spicigera* plants which were infected with Xpp (Table 10).

**Table 10.** The effects of essential oils belonging to *Satureja* species on the numbers of germinated seeds and disease severity caused by mixed Xpp strain

Applications	Disease Severity Index	Number of Germinated Plants
Xpp*** + <i>S. cuneifolia</i>	1.0* ± 0.0 a**	8.75 ± 0.0 c
Xpp + <i>S. spicigera</i>	1.0 ± 0.0 a	9.50 ± 0.0 d
Xpp + <i>S. thymbra</i>	2.0 ± 0.0 c	7.75 ± 0.35 b
Xpp + <i>S. hortensis</i>	1.25 ± 0.0 b	8.0 ± 0.0 b
Xpp + <i>S. cilicia</i>	2.25 ± 0.0 d	8.75 ± 0.35 c
<i>S. cuneifolia</i>	1.0 ± 0.0 a	9.0 ± 0.0 c
<i>S. spicigera</i>	1.0 ± 0.0 a	9.0 ± 0.0 c
<i>S. thymbra</i>	1.0 ± 0.0 a	7.0 ± 0.0 a
<i>S. hortensis</i>	1.0 ± 0.0 a	9.0 ± 0.0 c
<i>S. cilicia</i>	1.0 ± 0.0 a	7.0 ± 0.0 a
Negative Control	1.0 ± 0.0 a	8.0 ± 0.0 b
Positive Control (Mix of Xpp strains)	3.25 ± 0.0 e	8.0 ± 0.0 b

\*Values are the averages of 3 replicates

\*\*There are no statistically significant differences between values expressed with the same letters according to Duncan's Multiple Range Test (p<0.05)

\*\*\*Xpp inoculum was prepared as mixture of Xpp strains

While the disease severity caused by Xcf treated plant was found to be 4.25 in the experiment, it was determined that essential oils of *S. cuneifolia*, *S. hortensis* and *S. spicigera* prevented the development of the disease completely and the disease had not been observed in the plants treatments. The disease severity values of Xcf + *S. thymbra* and *S. cilicia* were determined as 2.75 and 1.75, respectively (Table 11).

**Table 11.** The effects of essential oils belonging to *Satureja* species on the numbers of germinated seeds and disease severity caused by mixed Xcf strain

Applications	Disease Severity Index	Number of Germinated Plants
Xcf ***+ <i>S. cuneifolia</i>	1.0* ± 0.0 a**	8.75 ± 0.0 d
Xcf + <i>S. spicigera</i>	1.0 ± 0.0 a	9.13 ± 0.17 e
Xcf + <i>S. thymbra</i>	2.75 ± 0.0 c	7.75 ± 0.35 b
Xcf + <i>S. hortensis</i>	1.00 ± 0.0 b	7.0 ± 0.0 a
Xcf + <i>S. cilicia</i>	1.75 ± 0.0 b	8.75 ± 0.35 d
<i>S. cuneifolia</i>	1.0 ± 0.0 a	9.0 ± 0.0 de
<i>S. spicigera</i>	1.0 ± 0.0 a	9.0 ± 0.0 de
<i>S. thymbra</i>	1.0 ± 0.0 a	7.0 ± 0.0 a
<i>S. hortensis</i>	1.0 ± 0.0 a	9.0 ± 0.0 de
<i>S. cilicia</i>	1.0 ± 0.0 a	7.0 ± 0.0 a
Negative Control	1.0 ± 0.0 a	8.0 ± 0.0 c
Positive Control (Mix of Xcf strains)	4.25 ± 0.0 d	7.0 ± 0.0 a

\*Values are the averages of 3 replicates

\*\*There are no statistically significant differences between values expressed with the same letters according to Duncan's Multiple Range Test (p<0.05)

\*\*\* Xcf inoculum was prepared as mixture of Xcf strains

It has been determined in many previously completed studies that the essential oils or extracts of many plant species included in the genus *Origanum*, *Thymus*, *Salvia*, *Satureja* and *Artemisia* show antimicrobial activity against fungal and bacterial disease agents (Pradhanang et al., 2003; Baydar et al., 2004; Skočibušić et al., 2006; Kokoskova and Pavela 2005; Sefidkon et al., 2007; Soyly et al., 2009; Soyly et al., 2010; Mengulluoglu and Soyly, 2012; Sureshjani et al., 2013; Alexa et al., 2018; Bozkurt et al., 2020; Kara et al., 2020).

Sökmen et al. (2004) found that the vegetable oil obtained from *Origanum acutidens* showed antimicrobial effects against 77% of 35 bacteria species and 67% of 18 fungus species. Sahin et al. (2004) reported that the vegetable oil obtained from the *Origanum vulgare* spp. *vulgare* plant collected from the Eastern Anatolia region showed antimicrobial effects against many bacteria and fungi species that are important in the food industry and medicine (infectious diseases), and that this plant can be used in the food industry and pharmacology industry as a natural preservative. Kızıl and Uyar (2006) determined that *Thymus kotschyianus*, *Satureja hortensis*, *Origanum onites* and *Thymbra spicata* species are effective against some fungal and bacterial species that cause disease in plants. Karaman et al. (2001) stated that the vegetable oil obtained from the *Thymus revolutus* plant and its components showed varying degrees of antimicrobial effect against 11 bacteria and 4 fungus species in different concentrations and even some concentrations prevent the growth of microorganisms more effectively than different antibiotics used commonly as standard options. Antibacterial properties of essential oils derived from several plant species such as thyme (*Thymbra spicata* L. subsp. *spicata* and *Thymus serpyllum* L.), origanum (*Origanum majorana* L.), mint (*Mentha spicata* L.), fennel (*Foeniculum vulgare*), lavender (*Lavandula stoechas* L. subsp. *stoechas*), lemon balm (*Melissa officinalis* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and basil (*Ocimum basilicum* L.) were investigated and significant antibacterial activities reported against seedborne plant pathogenic bacterium, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, gall forming bacterial disease agents such as *Rhizobium radiobacter*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* and *P. savastanoi* pv. *nerii* disease agents (Soylu et al., 2009; Mengülluoğlu and Soyulu, 2012; Bozkurt et al., 2020). Gormez et al. (2016) evaluated the antibacterial effect of *Origanum rotundifolium* essential oil against 20 plant pathogens and found that it showed a significant effect. Božik et al. (2017) reported that the essential oils obtained from 4 aromatic plants (*Cinnamomum zeylanicum*, *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* and *Syzygium aromaticum*) exhibit antibacterial activity against plant pathogens *Pectobacterium* spp. and *Pseudomonas* spp. species with the most effective result determined in cinnamon essential oil.

In antimicrobial studies of essential oils, different levels of activity of the same plant species against the same organism have been reported by several researchers. It is stated that this difference may be stemming from the variety of the plant, its genetic structure, the plant component used, the time of its harvest, the ecological conditions in the growing environment, the methods of obtaining essential oil, the characteristics of the microorganisms tested, the content of the nutrient medium, pH and temperature. The literature review shows that the results obtained in this study are in line with the results of other researchers. All the data obtained as a result of the study indicate that the essential oils of the *Satureja* species have the potential to be used as an antimicrobial in the control of plant bacterial diseases.

## CONCLUSION

Plants produce phytochemicals that protect them from various environmental stresses. Most of the phytochemicals have antimicrobial activity and affect membrane lipids by interacting with the pathogen membrane. Therefore, the potential of essential oils obtained from plants to be used instead of pesticides is quite high.

In this study, it was determined that essential oils belonging to *Satureja* species significantly prevent the development of Xpp and Xcf strains *in vitro*, while essential oils of especially *S. cuneifolia* and *S. spicigera* plants prevent disease development 100% *in vivo* experiments. The fact that the essential oils of these plant species are highly effective against bacteria shows that they can be used as an

environmentally-friendly application as part of the integrated control of bacterial pathogens. However, detailed research should be done on the practical use of essential oils, their mechanism of action, their effectiveness in different conditions, and their toxicity, and efforts should be made to expand the range of such applications.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to express their gratitude to Scientific Research Projects Unit of Iğdir University for their support for the project numbered 2014-FBE-B01.

## Conflict of Interest

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

## Author's Contributions

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

## REFERENCES

- Agrios GN, 2005. Plant Pathology (5th edn). Academic Press, San Diego, USA.
- Alexa E, Danciu C, Cocan I, Negrea M, Morar A, Obistioiu D, Radulov I, 2018. Chemical Composition and Antimicrobial Potential of *Satureja Hortensis* L. in Fresh Cow Cheese. Journal of Food Quality, Article ID 8424035, 10 pages <https://doi.org/10.1155/2018/8424035>.
- Asensio-S-Manzanera CM, Asensio C, Singh SP, 2006. Gamete Selection for Resistance to Common and Halo Bacterial Blights In Dry Bean Intergene Pool Populations. Crop Science, (46): 131–135.
- Baser KHC, 1994. Essential Oils of Lamiaceae from Turkey: Recent Results. Lamiales Newsletter, (3): 6-11.
- Baser KHC, 2001. Her Derde Deva Bir Bitki Kekik. Bilim ve Teknik, Mayıs, 74-77s.
- Bastas KK, Sahin F, 2017. Evaluation of seedborne bacterial pathogens on common bean cultivars grown in central Anatolia region, Turkey. European Journal of Plant Pathology, 147: 239-253.
- Baydar H, 2007. Tıbbi, Aromatik ve Keyf Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını, ISBN: 9757929794, 9789757929796, s216.
- Baydar H, Arabacı O, 2013. Türkiye'nin Kekik Üretim Merkezi Olan Denizli'de Kültür Kekikinin (*Origanum onites* L.) Tarımsal ve Teknolojik Özellikleri. Türkiye 10. Tarla Bitkileri Kongresi, 10-13 Eylül 2013, Konya.
- Baydar H, Sağdıç O, Özkan G, Karadoğan T, 2004. Antibacterial Activity and Composition of Essential Oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* Species with Commercial Importance in Turkey. Food Control, 15 (3): 169-172.
- Beebe S, Rao I, Blair M, Acosta J, 2013. Phenotyping Common Beans for Adaptation to Drought. Frontiers in Physiology, (4): 35.
- Belete T, Bastas KK, 2017. Common Bacterial Blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) of Beans with Special Focus on Ethiopian Condition. Journal of Plant Pathology & Microbiology, (8):3.
- Božik M, Nový P, Klouček P, 2017. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Cinnamon*, *Thyme*, *Oregano* and *Clove* Essential Oils Against Plant Pathogenic Bacteria. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis, 65(4): 1129-1134.
- Bozkurt İA, Soylu S, 2011. Determination of responses of different bean cultivars against races of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, causal agent of halo blight of bean. Euphytica, 179:417-425.
- Bozkurt İA, Soylu S, Kara M, Soylu EM, 2020. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils Isolated from Medicinal Plants against Gall Forming Plant Pathogenic Bacterial Disease Agents. KSU Tarım ve Doğa Derg., 23: 1474-1482.
- Brent RL, 2004. Utilization of Animal Studies to Determine the Effects and Human Risks of Environmental Toxicants (Drugs, Chemicals, And Physical Agents). Pediatrics, 113(Supplement 3): 984-995.
- Carmona M, Reis EM, Sautuna F, 2018. Fungal resistance to fungicides in field crops: A growing problem worldwide. In book: Fungicides. Perspectives, Resistance Management and Risk Assessment. pp.149-192. Edition: 1stChapter: Fungal resistance to fungicides in field crops: a growing problem worldwide. Publisher: Nova Science Publishers, Inc. New York Editors: Pérez-Rodríguez P, Soto-Gómez D, De La Calle.

- Chen NW, Serres-Giardi L, Ruh M, Briand M, Bonneau S, Darrasse A, Jacques MA, 2018. Horizontal Gene Transfer Plays a Major Role in The Pathological Convergence of *Xanthomonas* lineages on common bean. BMC genomics, 19 (1): 606.
- Demir G, Gündođdu M, 1994. Bacterial Diseases of Food Legumes in Aegean Region of Turkey and Effectivity of Some Seed Treatments Against Bean Halo Blight. Journal of Turkish Phytopathology, 23(2): 57-66.
- Dönmez MF, Şahin BU, Bozhüyük AU, 2020. *Satureja* Türlerinden Elde Edilen Uçucu Yağ ve Ekstrelerinin Fasulyede Bakteriyel Patojenlere Karşı Antibakteriyel Etkisi. Journal of Agriculture 3(2): 57-70.
- Dönmez, M.F., 2004. Erzurum ve Erzincan İllerinde Fasulye Bitkisinde Görülen Bakteriyel Hastalık Etmenlerinin Tanılanması ve *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*ye Karşı Çeşitli Fasulye Genotip/ Varyetelerinin Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 297.
- Finizio A, Villa S, 2002. Environmental Risk Assessment for Pesticides: A Tool for Decision Making. Environmental Impact Assessment Review, 22(3): 235-248.
- Francisco FN, Gallegos MG, Ochoa FYM, Hernández CFD, Benavides MA, Castillo RF, 2013. Aspectos Fundamentales Del Tizón Común Bacteriano (*Xanthomonas axonopodis phaseoli* Smith): Características, Patogenicidad Y Control. Revista Mexicana de Fitopatología, 31(2): 147-160.
- Ganiyu SA, Popoola AR, Owolade OF, Fatona KA, 2017. Control of Common Bacterial Blight Disease of Cowpea (*Vigna unguiculata* L.] Walp) with Certain Plant Extracts in Abeokuta, Nigeria. Journal of Crop Improvement, 31 (3): 280-288.
- Garcês A, Pires I, Rodrigues P, 2020. Teratological Effects of Pesticides in Vertebrates: A Review. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 55 (1): 75-89.
- Gillard CL, Conner RL, Howard RJ, Pauls KP, Shaw L, 2009. The performance of dry bean cultivars with and without common bacterial blight resistance in field studies across Canada. Canadian Journal of Plant Science, 89 (2): 405-410.
- Gormez A, Bozari S, Yanmis D, Gulluce M, Agar G, Sahin F, 2016. The Use of Essential Oils of *Origanum Rotundifolium* as Antimicrobial Agent Against Plant Pathogenic Bacteria. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 19 (3): 656-663.
- Kahveci E, Maden S, 1994. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* by bacteriophages, Journal of Turkish Phytopathology 23: 79-85.
- Kara M, Soylu S, Türkmen M, Kaya DA, 2020. Determination and antifungal activities of laurel and fennel essential oils against fungal disease agents of cypress seedlings. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, 17: 264-275.
- Karaman S, Digrak M, Ravid U, Ilcim A, 2001. Antibacterial and Antifungal Activity of the Essential Oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. Journal of Ethnopharmacology, 76 (2): 183-186.
- Kızıll S, Uyar F, 2006. Antimicrobial Activities of Some Thyme (*Thymus*, *Satureja*, *Origanum* and *Thymbra*) Species Against Important Plant Pathogens, Asian Journal of Chemistry, 18 (2): 1455.
- Kokoskova B, Pavela R, 2005. Effectivity of Essential Oils Against *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*, the Causal Agent of Bacterial Blight on *Geranium*. 1st International Symposium on Biological Control of Bacterial Diseases in Darmstadt, Germany, 23rd -26th October, 2005.
- Mengülluoglu M, Soylu S, 2012. Antibacterial activities of essential oils from several medicinal plants against the seed-borne bacterial disease agent *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Research on Crops 13:641-646.
- Mourice SK, Tryphone GM, 2012. Evaluation of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotypes for Adaptation to Low Phosphorus. ISRN Agronomy, Article ID 309614, doi:10.5402/2012/309614.
- Ofuya ZM, Akhidue V, 2005. The Role of Pulses in Human Nutrition: A Review. Journal of Applied Sciences and Environmental Management, 9 (3): 99-104.
- Okechukwu RU, Ekpo EJA, 2008. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola* in Infested Soil, Cowpea Seed and Cowpea Debris. Tropical Agriculture Research and Extension 11: 43-48.
- Opio AF, Allen DJ, Teri JM, 1996. Pathogenic Variation in The Casual Agent of Common Bacterial Blight in *Phaseolus* Common Bean. Plant Pathology, 45: 1126-1133.
- Padovani L, Trevisan M, Capri E, 2004. A Calculation Procedure to Assess Potential Environmental Risk of Pesticides at The Farm Level. Ecological Indicators, 4 (2): 111-123.
- Popoola AR, Ganiyu SA., Awotide OG, Oduwaye AO, 2016. Plant Extracts as Seed Dressing to Control Bacterial Blight of Long-Staple Cotton Seedlings. Journal of Crop Improvement, 30 (1): 84-94.
- Popović T, Balaž J, Nikolić Z, Starović M, Gavrilović V, Aleksić G, Živković S, 2010. Detection and identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on bean seed collected in Serbia. African Journal of Agricultural Research, 5(19): 2730-2736.



- Popovic T, Starovic M, Aleksic G, Zivkovic S, Josic D, Ignjatov M, Milovanović P, 2012. Response of Different Beans Against Common Bacterial Blight Disease Caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 18(5): 701-707.
- Pradhanang PM, Momol MJ, Olsun SM, 2003. Effects of plant essential oils on *Ralstonia solanaceum* Population Density and Bacterial Wilt Incidence in Tomato, Plant Disease., 87: 423-427.
- Rangasamy K, Athiappan M, Devarajan N, Samykannu G, Parray JA, Aruljothi KN, Abd\_Allah EF, 2018. Pesticide Degrading Natural Multidrug Resistance Bacterial Flora. Microbial Pathogenesis, 114: 304-310.
- Saettler AW, 1991. Common Bacterial Blight. In: Compendium of bean diseases. In: Hall R (Ed). APS Press, USA.
- Sahin F, Güllüce M, Daferera D, Sökmen A, Sökmen M, Polissiou M, Agar G, Özer H, 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. Food control, 15 (7): 549-557.
- Schaad NW, 1994. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS Press p164.
- Schwartz HF, Steadman JR, Hall R, 2005. Compendium of bean diseases (2nd edn), APS Press, USA.
- Sefidkon F, Sadeghzadeh L, Teymouri M, Asgari F, Ahmadi S, 2007. Antimicrobial Effects of the Essential Oils of Two *Satureja* Species (*S. Khuzistanica* Jamzad and *S. Bachtiarica* Bunge) in Two Harvesting Time. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 2 (36): 174-182.
- Skočibušić M, Bezić N., & Dunkić V, 2006. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. Food Chemistry, 96(1): 20-28.
- Sökmen A, Gulluce M, Akpulat HA, Daferera D, Tepe B, Polissiou M, Sokmen M, Sahin F, 2004. The in Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oils and Metanol Extracts of Endemic *Thymus spathulifolius*, Food Control, 5 (8): 627-634.
- Soylu EM, Kurt Ş, Soylu S. 2010. In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. International Journal of Food Microbiology 143:183-189.
- Soylu S, Evrendilek GA, Soylu EM, 2009. Chemical compositions and antibacterial activities of bitter fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *vulgare*) and dill (*Anethum graveolens* L.) essential oils against the growth of food-borne and seed-borne plant pathogenic bacteria. Italian Journal of Food Science 21:347-355.
- Sureshjani MH, Yazdi FT, Mortazavi A, Shahidi F, Behbahani BA, 2013. Antimicrobial Effect of *Satureja bachtiarica* extracts aqueous and ethanolic on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Scientific Journal of Biological Sciences, 2 (2): 24-31.
- Voisin AS, Guéguen J, Huyghe C, Jeuffroy MH, Magrini MB, Meynard JM, Pelzer E, 2014. Legumes for Feed, Food, Biomaterials and Bioenergy in Europe: a review. Agronomy for Sustainable Development, 34 (2): 361-380.
- Yu K, Park SJ, Poysa V, 2000. Marker-assisted Selection of Common Beans for Resistance to Common Bacterial Blight: Efficacy and Economics. Plant Breeding, 119 (5): 411-415.
- Zanatta ZG, Moura AB, Maia LC, Santos AS, 2007. Bioassay for selection of biocontroller bacteria against bean common blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*). Brazilian Journal of Microbiology, 38 (3): 511-515.

**Atf İçin:** Ozkurt N, Bektaş Y, 2022. Chemical Priming with  $\beta$ -aminobutyric acid (BABA) for Seedling Vigor in Wheat (*Triticum aestivum* L.). Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 104-114.

**To Cite:** Ozkurt N, Bektaş Y, 2022. Chemical Priming with  $\beta$ -aminobutyric acid (BABA) for Seedling Vigor in Wheat (*Triticum aestivum* L.). Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 104-114.

## Chemical Priming with $\beta$ -aminobutyric acid (BABA) for Seedling Vigor in Wheat (*Triticum aestivum* L.)

Nazlı ÖZKURT<sup>1</sup>, Yasemin BEKTAŞ<sup>1\*</sup>

**ABSTRACT:** To achieve efficiency in seedling development, the seed must germinate quickly and homogeneously. Pre-sowing applications such as priming are practiced to eliminate or reduce the negative effects of environmental factors through germination and seedling development. This allows to reach a higher germination rate, yield, and desired plant density, especially by protecting against biotic and abiotic stresses. This study was carried out to examine the effects of pre-sowing seed applications on seedling growth and vigor of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Three different doses of  $\beta$ -amino-n-butyric acid (BABA) were used as seed priming agents and Dimethyl sulfoxide (DMSO) as control groups. The study was carried out according to the completely randomized factorial design with three replications and ten plants per replication. As a result of priming applications, significantly higher values in the number of roots, longest root length, total root length, average root length and shoot fresh weight were obtained compared to control. Our results, for the first time, showed that seed priming with BABA had a promoting effect on many aspects of early seedling growth in bread wheat. This is a preliminary study to understand the mechanism of seed priming and its effects on germination and root growth in wheat. Further studies may shed light on the molecular mechanisms of BABA or other compounds as seed priming agents, benefits for abiotic and biotic stress tolerance, and good stand establishment at the seedling or later stages.

**Keywords:**  $\beta$ -amino-n-butyric acid, root growth, seed priming

<sup>1</sup>Nazlı ÖZKURT ([Orcid ID: 0000-0003-4064-3740](https://orcid.org/0000-0003-4064-3740)), Yasemin BEKTAŞ ([Orcid ID: 0000-0002-6884-2234](https://orcid.org/0000-0002-6884-2234)), Siirt Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Siirt, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Yasemin BEKTAŞ, e-mail: yasemin.bektas@siirt.edu.tr

## INTRODUCTION

Bread wheat is one of the most produced and consumed food sources from past to present (Hawkesford et al., 2013). With the global production of more than 760 million tons (FAOSTAT, 2019), wheat is one of three main staple crops with maize and rice as carbohydrate and protein sources for the global population, which is estimated to reach 9 billion by 2050. Therefore, wheat yield should be increased continuously to meet the nutritional and calorie needs (Ray et al., 2013).

New varieties that are adapted to environmental fluctuations, have high yield and quality, and show rapid development, are aimed to be developed for continuously increased consumer demand (Godfray et al., 2010). Increased production also depends on crop stand establishment and homogeneous growth. One of the pre-requisites for homogeneity is healthy germination and seedling vigor. Once seeds are sowed, water absorption from the soil takes a significant time. In this period, seeds may face some abiotic and/or biotic stresses such as high temperature, light intensity, salinity, oxygen, water, soil quality, heavy metal toxicity, and pathogens. All of these stresses can have a great effect on seed germination and stand establishment (Gökçöl et al., 2018).

The application called “seed priming, seed applications, or pre-application” is an old, simple but effective method to improve germination ratio and speed, stand establishment, yield, and resistance to biotic and abiotic stress conditions. This application is based on the progress of germination phases; (I) imbibition, (II) transition, (III) growth, and ends at phase II before the radicle protrudes from the seed coat (Bose et al., 2018). Initially, priming allows the seed to absorb water rapidly in phase I, and that results in the resume of some activities such as respiration and protein synthesis. The following phase, transition, is associated with a slow increase in seed water content and physiological activities related to germination. Various cellular and biochemical events such as the translation of new RNA, and changes in soluble sugars contents, begin in phase II (Bose et al., 2018). Since seed priming allows controlled water uptake to the seed and prevents germination and radicle emergence, it is called a pre-sowing application (Heydecker et al., 1978; Karakurt et al., 2010). Hydropriming, chemical priming, osmopriming, hormone priming, halopriming, and nutrient priming are some of the seed priming techniques that have been used (Ashraf et al., 2018).

Priming applications have various physiological effects on the seed and different results may occur at different moisture and application levels (Taylor, 1997; Elkoca, 2007). Priming applications contribute to the optimum use of storage assimilates, enzyme activities involved in germination and help seeds to quickly adapt/respond to unfavorable environmental conditions (Demir et al., 1994; Elkoca, 2007). Therefore, it has been used successfully in agriculture to accelerate the germination process (Nouman et al., 2012; Aghbolaghi et al., 2014; Bagheri, 2014; Lara et al., 2014; Bose et al., 2018).

Germination and seedling emergence are strongly linked to plant genetics and the development of roots. The seeds of some plant species show different developmental curves in response to different environmental factors. Genotypes with a rapid rooting potential become advantageous to overcome stress conditions from seedling through anthesis (Kaya, 2008). Therefore, it is important to understand the detailed rooting characteristics of priming applied seeds for further stress research such as drought, salt, heat, etc. Understanding seedling growth characteristics of primed seeds can provide novel information to researchers to build up a hypothesis in response to environmental challenges as well as deep down to the molecular mechanism of priming in plants.

Seed priming agents such as nutrients, hormones, chemicals, and microorganisms are reported to increase plant growth, productivity, and stress tolerance (Banerjee and Roychoudhury, 2018; Lal et al., 2018). Moreover, various organic or synthetic compounds such as; sodium, potassium, magnesium,  $\beta$ -

aminobutyric acid (BABA), high molecular weight polyethylene glycol (PEG) 6000 or PEG 8000, inorganic salts, glycerol, or sucrose were used for seed priming applications (Karakurt et al., 2010).

$\beta$ -aminobutyric acid is a non-protein amino acid and one of the potent plant defense inducers. Previous studies reported that the application of BABA in *Arabidopsis* gives a fast and strong response to stress (Zimmerli et al., 2008; Jisha et al., 2016). Also, other studies showed that foliar or root drenching application of BABA induces resistance against various pathogens, insects, and nematodes as well as resistance to abiotic stresses on various plant species. Some research also demonstrated that BABA can be used as a seed-priming agent and it can improve plant development as well as response to biotic and abiotic stress conditions (Cohen et al., 2016; Dawood, 2018). Exogenous application of BABA to wheat seedlings induced resistance against *S. avenae* (Cao et al., 2014) and nematodes (Oka and Cohen, 2001; Cohen et al., 2016). Moreover, 100  $\mu$ M BABA was applied to soil to test its effect under soil drying conditions on two spring wheat cultivars. BABA application increased drought-induced abscisic acid accumulation and water use efficiency on mild soil drying, and at the severe stress level, BABA increased ROS production and antioxidant defense enzyme production (Du et al., 2012). BABA was used as a seed priming agent to understand its effects on physiological and proteomic changes under salt-stressed conditions in two barley lines. According to results, BABA application increased relative water content and exhibited different proteomic patterns including root proteins compared to control. Upregulation of antioxidant enzymes, PR proteins, and chaperons demonstrated the induction and effect of BABA on salt stress tolerance (Mostek et al., 2016). Yin et al. (2021) combined Chitooligosaccharide with BABA and showed that seed priming with this compound induces drought tolerance activity on wheat and regulates changes in drought tolerance-related metabolites. We could not find any other related research that tested the activity of BABA as a seed priming agent on wheat. And since BABA is a promising agent for seed priming and abiotic stress responses, especially for drought tolerance, our study aimed; 1) to examine the effects of BABA as a seed priming agent on wheat seedlings, 2) to track root growth parameters deeply with image analysis, and 3) to reveal the effects on root and shoot biomass allocation, and seedling vigor in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). This study provides a detailed dissection of seedling root development on bread wheat under seed-priming conditions and provides preliminary data for further in-depth molecular studies.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

In this study, bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar Bezostaja 1 was used as the plant material. To determine the effects of priming applications on the seedling development of bread wheat, BABA (kindly provided by Dr. Ahmet Akköprü Van Yüzüncü yıl University, Department of Plant Protection) and Dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Aldrich) was used as the solvent. Seeds were surface sterilized with 5% NaOCl for 5 minutes and with 70% ethanol for 1 minute. Sterilized seeds were washed five times with sterile water. Three different doses of BABA (11 mM, 18 mM, and 25 mM) and DMSO (0.2%) as the control group were applied to the seeds in test tubes for 24 hours. After 24 hours of priming agent or control applications, seeds were washed under tap water and dried gently. Then primed seeds were put into Petri dishes for germination.

### Experimental design

The modified cigar roll method was used for the evaluation of seedling traits (Zhu et al., 2006; Acikbas et al., 2021). Germinated seeds were transplanted into germination papers (60 x 40 cm) as ten seeds per germination paper. Another layer of germination paper of the same size was used to cover the seeds. Each set was rolled and transferred into beakers filled with sterile water. Seedlings were grown

for 15 days under laboratory conditions (25-27°C average temperature, and 14 hours/10 hours (light/dark)) in Siirt University, Faculty of Agriculture. At the end of the fifteenth day, each seedling was scanned with a handheld scanner (Iscan portable mini scanner) at 300 DPI image quality. Image analysis was performed in a PC environment using ImageJ image processing software (Rueden et al., 2017). For seedling root characteristics; the number of roots (NOR), the longest root length (LonRL), total root length (TRL), average root length (aRL), number of lateral roots (NOLatR), plant height (PH), shoot fresh weight (SFW), root fresh weight (RFW), shoot dry weight (SDW) and root dry weight (RDW) were examined. Ratios of SFW/RFW and SDW/RDW were calculated to observe biomass allocation in primed seeds.

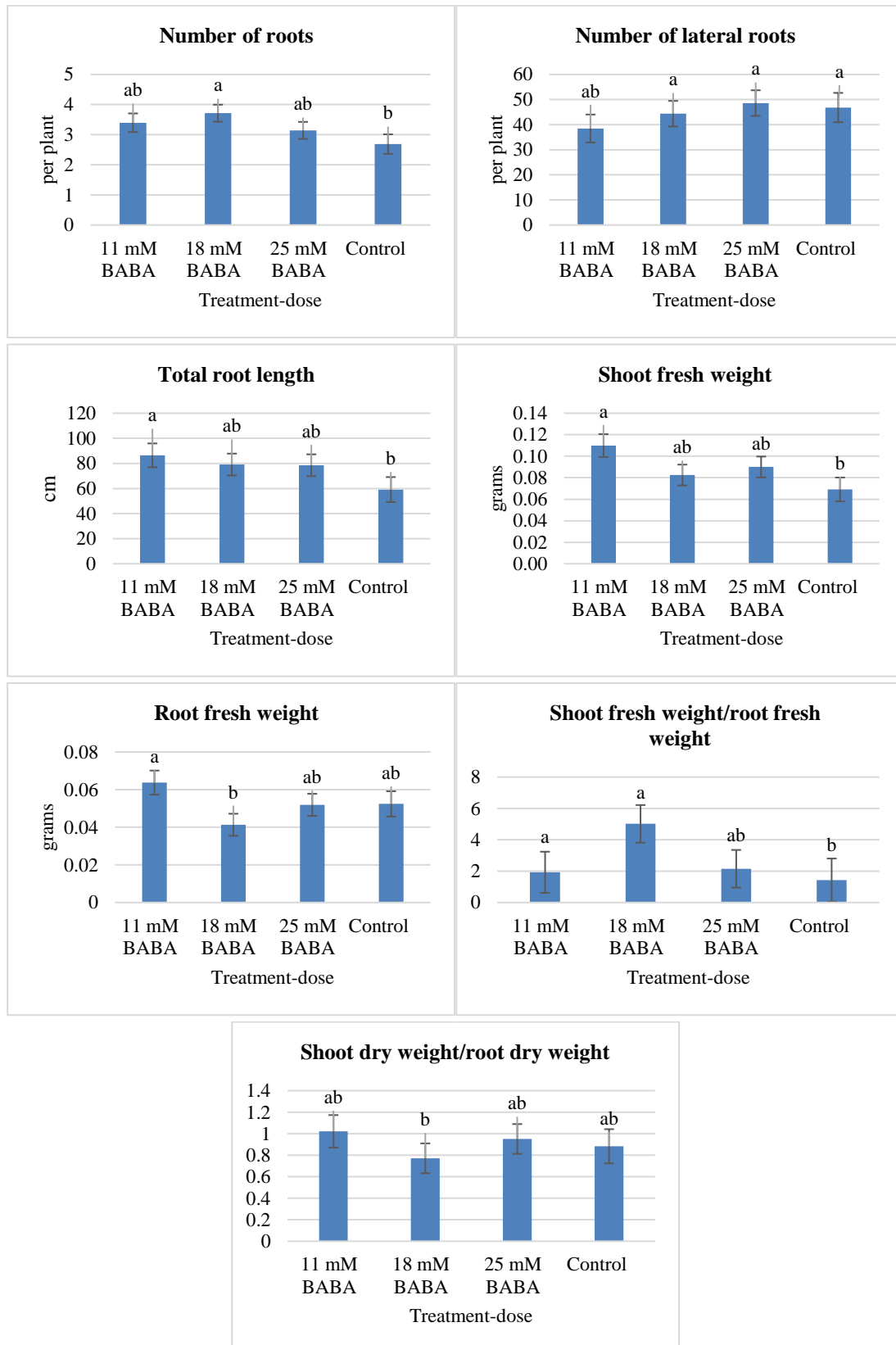
### Statistical analysis

Statistix 10 software (Analytical Software, Tallahassee, FL) was used for statistical analysis. The results were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and multiple comparison was done with the Least Significant Difference (LSD) test. The correlation was analyzed by simple correlation (Pearson) analysis (Steel et al., 1997). The study was carried out according to the completely randomized factorial design with three replications and ten plants per replication.

## RESULTS AND DISCUSSION

To achieve earliness and good stand establishment, seeds of a given genotype must germinate in a short time and be as homogeneous as possible. Soil structure and abiotic stresses cause heterogeneity in germination. Climate change also has a significant impact on germination and seedling development in crops. Seed priming aims to shorten the time between sowing and emergence to eliminate the problems that occur during sowing and seedling emergence such as low or high temperature, salinity, drought, and pathogens (Özkaynak et al., 2020). This eventually contributes to a better germination rate, yield, and improves tolerance against biotic and abiotic stresses.

The effect of three different doses of BABA on wheat seedling growth and root development was evaluated in this study. Wheat seeds were immersed into 11-, 18-, and 25-mM BABA or 0.2% DMSO solutions for 24 hours and germinated in Petri dishes immediately. According to results, the effects of priming with BABA on root development were found statistically significant ( $p < 0.05$ ) (Figure 1), and different doses had different effects on growth parameters. As a result of BABA applications, significantly higher values were observed in NOR, LonRL, aRL, PH, SFW, SDW, RDW, SFW/RFW, and SDW/RDW parameters compared to control. On the other hand, the effects of priming on NOLatR and RFW were contradictory compared to control (Table 1).



**Figure 1.** The effects of priming applications (11 mM, 18 mM, and 25 mM BABA) and control on the number of roots (NOR), number of lateral roots (NOLatR), total root length (TRL), shoot fresh weight (SFW), root fresh weight (RFW), SFW/RFW ratio, and shoot dry weight (SDW)/root dry weight (RDW) ratio. The difference between the means in the same group with the same letter is not statistically significant at  $p < 0.05$ .

As a result of the priming with 11-, 18-, or 25-mM BABA, it was seen that 18 mM BABA caused the highest increase in NOR (3.71 roots plant<sup>-1</sup>) by 37.92% compared to the control (2.69 roots plant<sup>-1</sup>). In terms of the LonRL, 25 mM BABA showed an increase of 22.15% compared to the control. Considering the TRL, all priming applications showed an increase compared to control. 11 mM BABA developed 46.16% longer roots compared to control. There was a 22.54% increase in the aRL in 25 mM BABA compared to control. When the effects of priming applications on plant height were examined, it was seen that 25 mM BABA provided 16.68% longer plants compared to control (Table 1).

**Table 1:** Means and percent differences of each trait compared to control

Treatment	NOR plant <sup>-1</sup> *	%	NOLatR plant <sup>-1</sup> *	%	LonRL (cm)	%	TRL (cm)*	%	aRL (cm)	%	PH (cm)	%
11mM BABA	3.40	26.39	38.46	-17.86	28.26	19.89	86.41	46.16	24.06	18.93	12.05	3.08
18 mM BABA	3.71	37.92	44.38	-5.21	27.77	17.82	79.10	33.79	20.99	3.76	11.82	1.11
25 mM BABA	3.14	16.73	48.61	3.82	28.79	22.15	78.51	32.80	24.79	22.54	13.64	16.68
Control	2.69	0.00	46.82	0.00	23.57	0.00	59.12	0.00	20.23	0.00	11.69	0.00
Treatment	SFW (g)*	%	RFW (g)*	%	SDW (g)	%	RDW (g)	%	SFW/RFW:	%	SDW/RDW*	%
11mM BABA	0.1099	59.04	0.0637	21.56	0.0119	30.77	0.0126	10.53	1.9268	34.93	1.0215	15.69
18mM BABA	0.0825	19.39	0.0413	-21.18	0.0094	3.30	0.0126	10.53	5.0154	251.22	0.7711	-12.67
25 mM BABA	0.09	30.25	0.0519	-0.95	0.0105	15.38	0.012	5.26	2.1522	50.71	0.9508	7.68
Control	0.0691	0.00	0.0524	0.00	0.0091	0.00	0.0114	0.00	1.428	0.00	0.883	0.00

NOR: Number of roots; LonRL: Longest root length; TRL: Total root length; aRL: Average root length; PH: Plant height; PH/RL: Plant height/root length ratio; SFW: Shoot fresh weight; RFW: Root fresh weight; SDW: Shoot dry weight; RDW: Root dry weight; SFW/RFW: Shoot fresh weight/root fresh weight ratio; SDW/RDW: Shoot dry weight/root dry weight ratio. %: difference compared to control. \*: significant at  $p < 0.05$

When similar priming practices were examined in the literature, Jisha et al. (2016) investigated the effect of seed priming with BABA on the growth of rice seedlings grown under stress-free and stressed (NaCl/PEG-6000) conditions. Under stressed conditions, primed rice seedlings had better stress tolerance compared to control. Priming with BABA provided a significant increase in seedling growth and development compared to the control group under both stressed and normal growth conditions. Our observations with BABA priming were similar to Jisha et al. (2016), except, we did not apply stress. Martínez-Aguilar et al. (2021), on the other hand, tested the effect of treatment with 2,6 dichloroisonicotinic acid (INA) on resistance against *Pseudomonas syringae* pv in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). They reported that the treatment of seeds with INA contributed to its growth and was effective in defense and had an intergenerational effect. Li et al. (2019) used a chitosan application to investigate the effects of chitosan nanoparticles on seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). They found that chitosan nanoparticles had a growth-promoting effect at 5  $\mu\text{g/mL}$  application dose. They found that the effects of chitosan nanoparticles on wheat germination and seedling growth were positive. These results highlight the promising role of seed priming agents in agricultural practices. Several priming agents, such as salicylic acid (SA) have some commercial use, while most of the rest are still at the experimental stage. Priming has the potential to become a common pre-sowing practice in agriculture.

When we compared priming doses for above and below-ground biomass allocation, 11 mM BABA reached the highest shoot biomass compared to the control with an increase of 59.04% in SFW. The SFW values ranged between 0.0691 g (control) and 0.1099 g (11 mM BABA) applications. (Table 1). On the other hand, when RFW were compared, only 11 mM BABA showed a 21.56% increase compared to control, and the other two doses had lower RFW values compared to control. The lowest values for RFW were observed in the 18 mM BABA application. Shoot dry weight followed the SFW and 11 mM

BABA increased SDW by 30.77% compared to control. At RDW, 11- and 18-mM BABA formed 10.53% more biomass than the control. Goswami et al. (2013) examined the effect of BABA treatment of rice seeds to withstand stress conditions. They reported a significant increase in seedling growth and development at three different concentrations of BABA. In a similar study, Kulak et al. (2021), investigated the seed priming application with SA on plant growth and essential oil composition in basil (*Ocimum basilicum* L.) grown under drought-stressed conditions. Seeds were treated with 0.05- and 0.1-mM SA concentrations. They reported increased shoot length, diameter, and dry weight, the number of branches and leaves in plants treated with SA. Jelali et al. (2021) studied the growth, root acidification, and photosynthetic performance of *Sulla carnosa* plants when treated with SA and hydrogen peroxide. Under non-primed conditions, plant growth and chlorophyll concentrations decreased due to Fe deficiency. They reported that an advantageous effect on the growth of the plant was observed in SA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> application under Fe deficiency. Anosheh et al. (2011) examined the effect of chemical priming on seed viability of hybrid maize (*Zea mays* L.) with Urea and KNO<sub>3</sub> under abiotic stress conditions. They observed that the growth and development of maize plants under stressful conditions were enhanced by priming. Even though mostly preliminary, the above reports and our results clearly show the positive effects of seed priming on plant growth and stress tolerance. There is a need for follow-up studies, under various soil and environmental conditions.

To evaluate the relationships between the traits evaluated, a simple correlation analysis was performed (Table 2). Significant positive correlations were obtained between NOlatR and LonRL (0.35), TRL (0.45), and aRL (0.41). Similarly, a strong positive correlation was observed between LonRL and TRL (0.70) and aRL (0.80). On the other hand, the PH/RL ratio was in a negative correlation with NOR (-0.33), LonRL (-0.84), TRL (-0.46), and aRL (-0.57). The NOR was positively correlated with LonRL (0.42) and TRL (0.70). The results suggest a close association between root system traits. Root systems tend to behave as a system not trait by trait. Therefore, these correlations are expected outcomes of such studies (Bektas et al., 2016).

**Table 2:** Correlation (Pearson) coefficients between length, and biomass traits

	NOR (plant <sup>-1</sup> )	NOlatR (plant <sup>-1</sup> )	LonRL (cm)	TRL (cm)	aRL (cm)	PH (cm)
NOlatR	0.19					
LonRL	<b>0.42</b>	<b>0.35</b>				
TRL	<b>0.70</b>	<b>0.45</b>	<b>0.70</b>			
aRL	0.11	<b>0.41</b>	<b>0.80</b>	<b>0.66</b>		
PH	0.02	0.02	-0.05	-0.03	0.01	
PH/RL	<b>-0.33</b>	-0.15	<b>-0.84</b>	<b>-0.46</b>	<b>-0.57</b>	<b>0.31</b>
	SFW (g)	RFW (g)	SDW (g)	RDW (g)	SFW/RFW	
RFW	<b>0.59</b>					
SDW	0.07	0.11				
RDW	0.07	0.14	0.23			
SFW/RFW	-0.13	<b>-0.36</b>	-0.06	0.04		
SDW/RDW	0.07	0.02	<b>0.64</b>	<b>-0.51</b>	-0.07	

NOR: Number of roots; LonRL: Longest root length; TRL: Total root length; aRL: Average root length; PH: Plant height; PH/RL: Plant height/root length ratio; SFW: Shoot fresh weight; RFW: Root fresh weight; SDW: Shoot dry weight; RDW: Root dry weight; SFW/RFW: Shoot fresh weight/root fresh weight ratio; SDW/RDW: Shoot dry weight/root dry weight ratio. Significant at  $p < 0.05$

While seed priming has a promising aspect for improving seedling emergence, germination uniformity, and resistance to different stress conditions, its detailed molecular mechanisms and/or gene expressions are still not fully understood. Some research provides a clue about its mechanism though. A summary of current findings related to the molecular mechanism of seed priming is shown in Table 3.



Accordingly, the protein analysis and transcriptome profiling were mostly tested with Osmopriming activity with PEG on some plants such as Arabidopsis, Brassica, rice, and wheat. The results suggest that seed priming affects the molecular downstream of the plant and induces development and stress-related mechanisms. Drought stress is one of the most important abiotic stress that plants face. Root characteristics and architecture are one of the most important factors that plants can use to improve drought resistance. Therefore understanding the role of seed priming on root development gave us preliminary results to shed light on its downstream mechanisms and relation to the drought stress response.

**Table 3:** Molecular finding of seed priming research

Plant material	Application	Molecular findings	Conclusion	Reference
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hydropriming with water Osmopriming with PEG 6000 solution	74 proteins were identified on different phases of seed germination and priming such as cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase protein	For the seed priming and germination process, some protein might be used to characterize priming treatments and seed vigor.	(Gallardo et al., 2001)
<i>Brassica oleracea</i>	Osmopriming with PEG 6000 solution	By priming application; many genes as well as ribosomal proteins, heat shock proteins, etc. were up/down-regulated.	Many genes differentially expressed in different phases of germination, osmopriming, and different drying regimes	(Soeda et al., 2005)
<i>Triticum aestivum</i>	Seeds treated with H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> under salinity stress	Two heat-stable (stress) proteins with 32 and 52 kDa molecular masses were expressed	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> treated induced expression of stress proteins and improve seedling growth under salt stress.	(Wahid et al., 2007)
<i>Oryza sativa</i>	seed priming with polyethylene glycol under nano-ZnO stress	<i>APXa</i> , <i>APXb</i> , <i>CATa</i> , <i>CATb</i> , <i>CATc</i> , <i>SOD1</i> , <i>SOD2</i> , and <i>SOD3</i> genes were down-regulated	Seed priming with PEG reduced the toxic effects of stress, it also enhanced the cell structure	(Salah et al., 2015)
<i>Brassica napus</i>	Osmopriming with PEG 6000 solution	952 genes and 75 proteins were identified with roles in the regulation of metabolism, cell cycle, protein synthesis, and storage proteins, etc.	All phases of osmopriming rely on complex biochemical processes and express different genes and proteins.	(Kubala et al., 2015)
<i>Oryza sativa</i>	Selenium priming salicylic acid priming on submergence stress	2371 transcripts for Se and 2405 for SA were identified with roles in cellular and metabolic activities such as carbohydrate and nitrogen compound metabolism	Seed priming may induce submergence tolerance.	(Hussain et al., 2016)
<i>Brassica napus</i>	Osmopriming with PEG 6000 solution Salt Priming	One miRNA family (miR172) was upregulated and six microRNA families (miR156, miR169, miR860, miR399, miR171, and miR395) were significantly downregulated.	miRNA plays important role in seed germination and regulation of hormone synthesis under stress conditions.	(Jian et al., 2016)
<i>Oryza sativa</i>	Seeds treated with spermine/spermidine under salinity stress	Spermine/spermidine priming up-regulated stress-response genes and membrane Na <sup>+</sup> efflux pumps.	Seed priming can improve plant on salt stress conditions.	(Paul and Roychoudhury, 2017)
<i>Triticum aestivum</i>	Priming with $\beta$ -aminobutyric acid-modified chitooligosaccharide derivative	Traumatic acid and indol-3-lactic acid pathways were activated. Also photosynthesis as well as stabilization of cell membrane induced and demonstrated promising results for drought stress.	These inducers may be used for an effective drought resistance induction.	(Yin et al., 2021)

## CONCLUSION

In this study, we evaluated plant seedling development and vigor, using three different concentrations (11, 18, and 25 mM) of BABA. Significantly higher values in NOR (16.73-37.92%), LonRL (17.82-22.15%), TRL (32.80-46.16%), aRL (3.76-22.54%), and in SFW (19.39-59.04%) were obtained compared to control. Although BABA has been studied very little in priming and seedling root-shoot development studies, it may have an important place in the future. According to significant increases obtained in seedling growth with priming application, BABA may have a commercially important place and high seedling growth efficiency can be achieved with a small amount of chemical application.

## Conflict of Interest

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

## Author's Contributions

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

## REFERENCES

- Acikbas S, Ozyazici MA, Bektas H, 2021. The effect of salinity on root architecture in forage pea (*Pisum sativum* ssp. *arvense* L.). *Legume Research*, 44(4): 407-412.
- Aghbolaghi MA, Ansari OM, Sedghi MO, 2014. The effect of salicylic acid and gibberellic acid on germination characteristics and changes of antioxidant enzymes under accelerated aging in sunflower (*Helianthus annuus*). *Iranian Journal of Seed Science and Technology*, 4;3(1).
- Anosheh HP, Sadeghi H, Emam Y, 2011. Chemical priming with urea and KNO<sub>3</sub> enhances maize hybrids (*Zea mays* L.) seed viability under abiotic stress. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 14(4):289-295.
- Ashraf MA, Akbar A, Askari SH, Iqbal M, Rasheed R, Hussain I, 2018. Recent advances in abiotic stress tolerance of plants through chemical priming: an overview. *Advances in Seed Priming*. Rakshit A, Singh HB. Springer Singapore: 51-79.
- Bagheri MZ, 2014. The effect of maize priming on germination characteristics, catalase and peroxidase enzyme activity and total protein content under salt stress. *International Journal of Biosciences*, 4(2):104-12.
- Banerjee A, Roychoudhury A, 2018. Seed priming technology in the amelioration of salinity stress in plants. In: *Advances in seed priming*. Springer, pp 81-93
- Bektas H, Hohn CE, Waines JG, 2016. Root and shoot traits of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) landraces and cultivars. *Euphytica*, 212(2):297-311.
- Bose B, Kumar M, Singhal R, Mondal S, 2018. Impact of seed priming on the modulation of physico-chemical and molecular processes during germination, growth, and development of crops. In: A R, H. S (eds) *Advances in seed priming*. Springer, Singapore.
- Cao HH, Zhang M, Zhao H, Zhang Y, Wang XX, Guo SS, Zhang ZF, Liu TX, 2014. Deciphering the mechanism of  $\beta$ -aminobutyric acid-induced resistance in wheat to the grain aphid, *Sitobion avenae*. *PloS one* 9 (3):e91768.
- Cohen Y, Vaknin M, Mauch-Mani B, 2016. BABA-induced resistance: milestones along a 55-year journey. *Phytoparasitica*, 44 (4):513-538.
- Dawood MG, 2018. Stimulating plant tolerance against abiotic stress through seed priming. In: *Advances in seed priming*. Springer, pp 147-183

- Demir I, Ellialtioglu S, Tipirdamaz R, 1994. The effect of different priming treatments on reparability of aged eggplant seeds. In International Symposium on Agrotechnics and Storage of Vegetable and Ornamental Seeds, 362:205-212.
- Du YL, Wang Z-Y, Fan JW, Turner NC, Wang T, Li FM, 2012.  $\beta$ -Aminobutyric acid increases abscisic acid accumulation and desiccation tolerance and decreases water use but fails to improve grain yield in two spring wheat cultivars under soil drying. *Journal of Experimental Botany*, 63 (13):4849-4860.
- Elkoca E, 2007. Priming: ekim öncesi tohum uygulamaları. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 38(1):113-120.
- FAOSTAT, 2019. Food, Agriculture Organization of the United, Nations. Rome, Italy: Food, Agriculture Organization of the United, Nations.
- Gallardo K, Job C, Groot SPC, Puype M, Demol H, Vandekerckhove JI, Job D, 2001. Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming. *Plant Physiology*, 126 (2):835-848
- Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C, 2010. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327 (5967):812-818.
- Gökçöl A, Duman İ, 2018. Kapari tohumlarının çimlenmesinin iyileştirilmesinde farklı tohum uygulamalarının etkisinin belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 55(4):71-80.
- Goswami A, Banerjee R, Raha S, 2013. Drought resistance in rice seedlings conferred by seed priming. *Protoplasma*, 250(5):1115-1129.
- Hawkesford MJ, Araus J-L, Park R, Calderini D, Miralles D, Shen T, Zhang J, Parry MAJ, 2013. Prospects of doubling global wheat yields. *Food and Energy Security*, 2 (1):34-48.
- Heydecker W, Gibbins BM, 1978. The 'priming' of seeds. [Conference paper]. *Acta Horticulturae*, (Netherlands). no. 83.
- Hussain S, Yin H, Peng S, Khan FA, Khan F, Sameeullah M, Hussain HA, Huang J, Cui K, Nie L, 2016. Comparative transcriptional profiling of primed and non-primed rice seedlings under submergence stress. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1125.
- Jelali N, Youssef RB, Boukari N, Zorrig W, Dhifi W, Abdelly C, 2021. Salicylic acid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seed priming alleviates Fe deficiency through the modulation of growth, root acidification capacity and photosynthetic performance in *Sulla carnosia*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 159:392-399.
- Jian H, Wang J, Wang T, Wei L, Li J, Liu L, 2016. Identification of rapeseed microRNAs involved in early stage seed germination under salt and drought stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7(658).
- Jisha KC, Puthur JT, 2016. Seed priming with BABA ( $\beta$ -amino butyric acid): a cost-effective method of abiotic stress tolerance in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Protoplasma*, 253(2):277-289.
- Karakurt H, Aslantaş R, Eşitken A, 2010. Tohum çimlenmesi ve bitki büyümesi üzerinde etkili olan çevresel faktörler ve bazı ön uygulamalar. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 24(2):115-128.
- Kubala S, Garczarska M, Wojtyła Ł, Clippe A, Kosmala A, Żmieńko A, Lutts S, Quinet M, 2015. Deciphering priming-induced improvement of rapeseed (*Brassica napus* L.) germination through an integrated transcriptomic and proteomic approach. *Plant Science*, 231:94-113.
- Kulak M, Jorrín-Novo JV, Romero-Rodríguez MC, Yildirim ED, Gul F, Karaman S, 2021. Seed priming with salicylic acid on plant growth and essential oil composition in basil (*Ocimum basilicum* L.) plants grown under water stress conditions. *Industrial Crops and Products*, 161:113235.
- Lal SK, Kumar S, Sheri V, Mehta S, Varakumar P, Ram B, Borphukan B, James D, Fartyal D, Reddy MK, 2018. Seed priming: an emerging technology to impart abiotic stress tolerance in crop plants. In: *Advances in Seed Priming*. Rakshit A, Singh HB. Springer Singapore: pp 41-50
- Lara TS, Lira JM, Rodrigues AC, Rakocevi M, Alvarenga AA. 2014. Potassium nitrate priming affects the activity of nitrate reductase and antioxidant enzymes in tomato germination. *Journal of Agricultural Science*, 6(2):72.

- Li R, He J, Xie H, Wang W, Bose SK, Sun Y, Hu J, Yin H, 2019. Effects of chitosan nanoparticles on seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *International Journal of Biological Macromolecules*, 126:91-100.
- Martínez-Aguilar K, Hernández-Chávez JL, Alvarez-Venegas R, 2021. Priming of seeds with INA and its transgenerational effect in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *Plant Science* 305:110834.
- Mostek A, Börner A, Weidner S, 2016 Comparative proteomic analysis of  $\beta$ -aminobutyric acid-mediated alleviation of salt stress in barley. *Plant Physiology and Biochemistry*, 99:150-161.
- Nouman W, Siddiqui MT, Basra SM, Afzal I, Rehman HU, 2012. Enhancement of emergence potential and stand establishment of *Moringa oleifera* Lam. by seed priming. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 36(2):227-35.
- Oka Y, Cohen Y, 2001. Induced resistance to cyst and root-knot nematodes in cereals by DL- $\beta$ -amino-n-butyric acid. *European Journal of Plant Pathology*, 107 (2):219-227
- Özkaynak E, Orhan Y, Kargın İ, Tuncel M, 2020. Biber ve domates tohumlarında organik priming uygulamaları. *Black Sea Journal of Agriculture*, 3(4):301-307.
- Paul S, Roychoudhury A, 2017. Effect of seed priming with spermine/spermidine on transcriptional regulation of stress-responsive genes in salt-stressed seedlings of an aromatic rice cultivar. *Plant Gene*, 11:133-142.
- Ray DK, Mueller ND, West PC, Foley JA, 2013. Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PLoS ONE*, 8:e66428.
- Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, Eliceiri KW, 2017. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18(1):1-26.
- Salah SM, Yajing G, Dongdong C, Jie L, Aamir N, Qijuan H, Weimin H, Mingyu N, Jin H, 2015. Seed priming with polyethylene glycol regulating the physiological and molecular mechanism in rice (*Oryza sativa* L.) under nano-ZnO stress. *Scientific Reports*, 5 (1).
- Soeda Y, Konings MCJM, Vorst O, van Houwelingen AMML, Stoopen GM, Maliepaard CA, Kodde J, Bino RJ, Groot SPC, van der Geest AHM, 2005. Gene expression programs during *Brassica oleracea* seed maturation, osmopriming, and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. *Plant physiology*, 137 (1):354-368.
- Steel RGD, Torrie JH, Dickey DA, 1997. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach, McGraw-Hill, New York.
- Taylor AG, 1997. Seed storage germination and quality. In: Wien HC, (ed.) *The physiology of vegetable Crops*. CAB International, Wallingford, U.K, 1-36.
- Wahid A, Perveen M, Gelani S, Basra SMA, 2007. Pretreatment of seed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> improves salt tolerance of wheat seedlings by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins. *Journal of Plant Physiology*, 164 (3):283-294.
- Yin X, Liu S, Qin Y, Xing R, Li K, Yu C, Chen X, Li P, 2021. Metabonomics analysis of drought resistance of wheat seedlings induced by  $\beta$ -aminobutyric acid-modified chitoooligosaccharide derivative. *Carbohydrate Polymers*, 272:118437.
- Zhu J, Mickelson SM, Kaeppler SM, Lynch JP, 2006. Detection of quantitative trait loci for seminal root traits in maize (*Zea mays* L.) seedlings grown under differential phosphorus levels. *Theoretical and Applied Genetics*, 113(1):1-10.
- Zimmerli L, Hou BH, Tsai CH, Jakab G, Mauch-Mani B, Somerville S, 2008. The xenobiotic  $\beta$ -aminobutyric acid enhances *Arabidopsis* thermotolerance. *The Plant Journal*, 53(1):144-156.

**Atf için:** Törün B, Bıyık H.H, Poyrazoğlu E. 2022. Morphological and Molecular Identification of Biofilm Forming Fungi from Fish Farms and Fish Benches in Aydın Province. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 12(1): 115-124.

**To Cite:** Törün B, Bıyık H.H, Poyrazoğlu E. 2022. Morphological and Molecular Identification of Biofilm Forming Fungi from Fish Farms and Fish Benches in Aydın Province. Journal of the Institute of Science and Technology. 12(1): 115-124.

**Morphological and Molecular Identification of Biofilm Forming Fungi from Fish Farms and Fish Benches in Aydın Province**

Bahadır TÖRÜN<sup>1\*</sup>, H. Halil BIYIK<sup>1</sup>, Esin POYRAZOĞLU<sup>1</sup>

**ABSTRACT:** Biofilm formation is one of the major problems in many industries. The marine environment is rich in nutrients for microbial growth. It also makes it easier for microorganisms to form biofilms. This study aims to identify biofilm-forming fungi in the marine environment and assess their ability to form biofilm. We identified biofilm-forming fungi species using morphological and molecular methods. ITS regions were used for molecular identification. The qualitative assessment of biofilms was carried out using the Petri dish method, and quantitative measurements of biofilms were carried out using the microplate method. We identified 69 isolates; 37 were yeast, and 32 of them were fungi. Only ten of them were found to have biofilm. Most of them were adherents, and only two of them were strong adherents. Biofilms can have positive or negative effects on fish health. Identifying biofilm-forming agents will help us identify the nature of the effect. Microorganisms that have positive effects can be used as biocontrol agents.

**Keywords:** Biofilm, Fungi, ITS, Seabass, Seabream

<sup>1</sup>Bahadır TÖRÜN ([Orcid ID: 0000-0001-5142-1882](https://orcid.org/0000-0001-5142-1882)), H. Halil BIYIK ([Orcid ID: 0000-0003-0258-054X](https://orcid.org/0000-0003-0258-054X)), Esin POYRAZOĞLU ([Orcid ID: 0000-0002-3921-5362](https://orcid.org/0000-0002-3921-5362)) Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Aydın, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Bahadır TÖRÜN, e-mail: bahadrtrn@gmail.com

## INTRODUCTION

Most aquatic fungi do not cause disease in fish. In addition, most pathogenic fungi are free-living and pose no threat. However, biofilms, bacterial or fungal, provide a suitable and protective environment for potential pathogens (Turgay et al, 2019). Most of the aquatic fungi get their nutrients by decomposing organic matter (Chouldhury et al, 2013). They mostly cause secondary infections in immunocompromised fish (Roberts, 2012). *Oomycetes* are most common group of fungal pathogens (Chouldhury et al, 2013). Genus *Saprolegnia* is the most common fungal pathogen of fishes both in fresh and saltwater (Gaikowski et al, 2003; Dinçtürk et al, 2018).

A biofilm is a community of microorganisms surrounded by an extracellular polymeric substance attached to each other and to the surface (Vert et al, 2012). Biofilm communities can contain one or more species. If a biofilm contains more than one species, they are called polymicrobial biofilms (Broden et al, 2005). The biofilm protects sterilizer agents, antimicrobials, environmental factors, and other biological agents such as phages (Connel et al, 2010).

Because it contains excessive feed and fish excrement, a controlled water environment is suitable for microbial growth. In addition, surfaces such as tanks and pipes are ideal for biofilm formation. There are several studies on biofilm formation in aquaculture (Kuranasagar et al, 1996; You et al, 2007; Wietz et al, 2009; Pandey et al, 2014; Santhakumari et al, 2016; Cai and Arias, 2017; Arankumar et al, 2020). However, most of the research focuses on bacterial biofilms. Studies also show that fungal species can also produce biofilms (Imamura et al, 2008; Costa-Orlandi et al, 2014; Sardi et al, 2015; Gonzales-Ramirez et al, 2016). Some research has focused on the beneficial effects / use of biofilms in aquaculture (Panigrahi and Azad, 2007; Wesselling et al, 2015; Barnharst et al, 2015).

This study aims to identify biofilm-forming fungi in aquatic environments. A better understanding of these organisms can provide us with useful information for solving some of the problems in aquaculture. Our research focuses on cultured organisms because we want to conduct in vitro biofilm formation tests with each organism.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Samples were taken from fish farm hatcheries and fish stalls in Aydın province in 2017. Samples were taken under aseptic conditions from skin and gills of fishes, tank and pipe surfaces of sea bass (*Dicentrarchus labrax*), and sea bream (*Sparus aurata*) cultures and stalls.

### Isolation and identification

Samples were taken with a sterile swab and stored in 0,9 % saline water until arrival to the laboratory. Series of dilutions ranging from  $10^0$ - $10^{-4}$  were prepared (Koch, 1883). Rose-Bengal Chloramphenicol Agar was used as the first culture medium. Isolation of the individual organisms was performed on Potato Dextrose Agar. Cultures were incubated at 27 °C for 2 to 7 days. Colonies were examined in size (mm), shape, color, exudation, and pigmentation. Their microscopic properties were examined under stereomicroscope and light microscope. Fungi were identified at the genus level using Barnett (2003) "Illustrated genera of imperfect fungi". For yeasts, only molecular identification was performed.

Genomic DNA isolation was made according to the 2X CTAB DNA isolation method (Doyle and Doyle, 1987). Molecular identification of the isolates performed with rDNA ITS regions. For yeasts ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') and ITS2 (5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3') primers, and fungi ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') and ITS4 (5'-TCC TCC GCT GCT

TAT TGA TAT GC-3') were used (Op de Beeck, 2014). The amplification protocol consisted of initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 35 cycles with denaturation 94 °C for 30 s, annealing 58 °C for 30 s, and extension 72 °C for 60 s. The reaction was completed with a 72 °C 10 min final extension step. Fermantas 2X PCR Master Mix was used as PCR components. PCR products were sent to sequencing (GATC, Germany). Obtained ITS sequences were aligned with the ones in the GenBank using BLASTn software (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Phylogenetic analysis was made according to maximum likelihood with MEGA X software.

### Biofilm tests

Two methods were used for biofilm formation: petri method for qualitative and microplate method for quantitative.

For qualitative tests isolates were inoculated on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) for 24 hours. Ten milliliters of Sabouraud dextrose broth (SDB) was poured into Petri dishes, and the fungal colony was transferred from SDA to SDB. Incubated for 24 hours at 37 °C. After incubation, the broth from petri dishes was discarded and washed twice with 5 ml distilled water. Petri dishes were then stained with 2% safranin. After one minute, the Petri dishes were washed with 5 ml of distilled water to remove excess dye and allowed to dry at room temperature. Petri dishes were examined under a microscope. The presence of fungal cells and hyphae covering all areas was accepted as positive for the biofilm, while sparse areas of fungus or the absence of fungi were considered negative (Costa-Orlandi et al, 2014).

For quantitative tests biofilm formation was measured according to Christensen et al. (1985) with modifications. Fresh strains with 0.5 McFarland turbidity were obtained and suspended with 0.9% (w / v) Saline. Then, 1 ml of the prepared suspensions were transferred to 9 ml tubes containing SDB and incubated at 37 °C for 24 hours. After incubation, 150 µL of suspension was taken from each tube and transferred in triplicate to a 96-well polystyrene microtiter plate. Plates were incubated at 37 °C for 48 hours. After incubation, the liquid medium was discarded, the wells were washed 3 times with distilled water and allowed to dry. Then 150 µl of crystal violet solution (0.5% v / v) was dispensed into the wells and incubated at room temperature for 45 minutes. After incubation, the wells were washed 3 more times with distilled water and dried. 150 µl ethanol: acetic acid (95: 5) was added to the wells and incubated for 10 minutes. Then 100 µl of liquid from each well was transferred to a new microtiter plate and the absorbance was determined at 570 nm on a spectrophotometer. Sterile distilled water was used as negative control and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain was used as positive control. Strains with optical density values above 0.240 were considered strong adhesion, strains with 0.120-0.240 were considered adhesion, and strains 0.120 and below were considered negative.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Isolation and identification

We isolated a total of 69 fungal species. Thirty-seven of these are yeasts and 32 of them are fungi (Table 1 and 2). Among these 69 isolates, 17 different genera were found.

**Table 1.** List of fungal species

Sample Name	Species	% Similarity
K4	<i>Penicillium glabrum</i>	98%
K5	<i>Aspergillus flavus</i>	95%
K7	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	94%
K17	<i>Penicillium urticae</i>	99%
K19	<i>Aspergillus cristatus</i>	96%
K21	<i>Cladosporium cladosporioides</i> 2	97%
K22	<i>Trichosporon lactis</i>	96%

**Table 1.** List of fungal species (continue)

K23	<i>Aspergillus amstelodami</i>	99%
K24	<i>Apiotrichum montevidense</i>	95%
K25	<i>Pyrenochaeta quercina</i>	99%
K26	<i>Penicillium chrysogenum</i>	98%
K27	<i>Cutaneotrichosporon jirovecii</i>	99%
K29	<i>Trichosporon lactis</i>	97%
K30	<i>Cladosporium macrocarpum</i>	98%
K31	<i>Penicillium dravuni</i>	98%
K32	<i>Ramichloridium apiculatum</i>	98%
K33	<i>Cladosporium cladosporioides</i> 3	97%
K34	<i>Trichosporon lactis</i> 2	99%
K35	<i>Trichosporon sp.</i>	98%
K36	<i>Penicillium brevicompactum</i>	97%
K37	<i>Trichosporon lactis</i> 2	98%
K38	<i>Alternaria tenuissima</i>	93%
K39	<i>Alternaria tenuissima</i> 2	98%
K40	<i>Cladosporium cladosporioides</i> 4	99%
K41	<i>Cladosporium velox</i>	99%
K45	<i>Alternaria tenuissima</i> 3	99%
K48	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	99%
K49	<i>Penicillium spinulosum</i>	100%
K50	<i>Penicillium antarcticum</i>	96%
K51	<i>Aspergillus amstelodami</i>	99%
L8	<i>Cladosporium macrocarpum</i>	97%
L9	<i>Trichoderma citrinoviride</i> 2	99%

**Table 2.** List of yeast species

Sample Name	Species	% Similarity
L1	<i>Rhodotorula babjevae</i>	99%
L2	<i>Rhodotorula babjevae</i> 2	99%
L3	<i>Rhodosporidium sphaerocarpum</i>	97%
L5	<i>Candida zeylanoides</i>	98%
L6	<i>Candida zeylanoides</i> 2	99%
L7	<i>Candida zeylanoides</i> 3	99%
L11	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	98%
L12	<i>Hanseniaspora uvarum</i> 2	87%
L14	<i>Rhodotorula diobovata</i>	99%
L15	<i>Rhodosporidium sphaerocarpum</i>	97%
L16	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	99%
L17	<i>Rhodotorula sphaerocarpa</i>	99%
L19	<i>Candida zeylanoides</i> 4	99%
L20	<i>Debaryomyces sp.</i>	98%
L21	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	97%
L22	<i>Candida zeylanoides</i> strain 5	97%
L23	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 2	99%
L24	<i>Debaryomyces hansenii</i>	99%
L25	<i>Candida galli</i> 1	98%
L27	<i>Candida galli</i> 2	96%
L28	<i>Candida zeylanoides</i> 5	98%
L30	<i>Candida atlantica</i>	97%
L33	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 3	98%
L34	<i>Candida zeylanoides</i> 6	99%
L35	<i>Candida atlantica</i> 2	98%



**Table 2.** List of yeast species (continue)

L36	<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	97%
L37	<i>Rhodospordium sp.</i>	97%
L38	<i>Debaryomyces hansenii 2</i>	99%
L39	<i>Debaryomyces hansenii 3</i>	99%
L40	<i>Debaryomyces hansenii 4</i>	99%
L41	<i>Debaryomyces hansenii 5</i>	99%
L42	<i>Yarrowia galli</i>	98%
L45	<i>Candida zeylanoides 7</i>	99%
K3	<i>Candida galli 3</i>	99%
K16	<i>Candida galli 4</i>	99%
K18	<i>Candida galli 5</i>	99%
K47	<i>Exophiala xenobiotica</i>	99%

Phylogenetic analysis was made with MEGA X software according to the maximum likelihood method. Phylogenetic tree obtained for fungi and yeast species were shown in Figure 1 and 2.

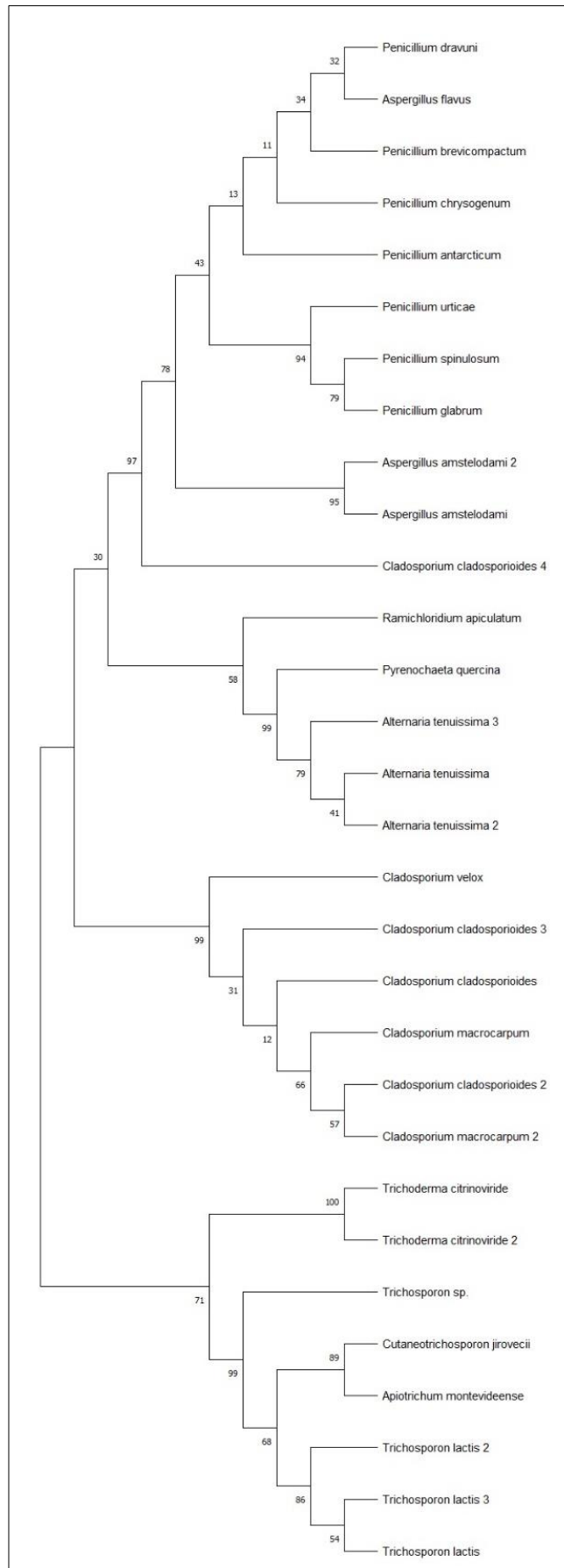
In our study, we found only 14,5 % of the fungal species are forming biofilms. Although this number seems low, combined with other biotic and abiotic factors, they might become important for fish and human health. A previous study about the fungal diversity of marine biofilms in the Gulf of Mexico has similar findings with our study with regards to fungal diversity (Salamone et al, 2016). All of the fungi we isolated belong to facultative marine genera: "those from freshwater or terrestrial milieus able to grow in the marine environment" (Kohlmayer, 1974). None of our isolates are considered fish pathogens but *Candida* species are known human pathogens (Caldarone and Clancy, 2011). Some of the species were also reported as plant pathogens (Luque et al, 2000; Miao and Qian, 2005). These human and plant pathogens probably came from the staff. There are aquaculture engineers but most of the staff are seasonal workers from surrounding villages. Most of them are not careful with their personal hygiene and almost all of them works in their farms. Miao and Qian (2005) studied the antagonistic antimicrobial activity of marine fungi and bacteria from marine biofilms. They found most of the fungal isolates inhibited at least one bacteria. We also found *Alternaria*, *Trichoderma* and *Cladosporium* genera which they found antibacterial properties. Siqueira and Lima (2013) showed *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium* and *Penicilium* genera are capable of forming biofilms in aquatic environments (Siquiera and Lima, 2013). We also showed *Alternaria* and *Aspergillus* genera can form biofilms.

Most of the species are from fish stalls. In farms fish tanks are cleaned daily. This is the possible reason of low numbers of species from fish farm. Also in fish farms same people does the maintenance of tanks while fish stalls were visited by a large number of people daily. *Candida* species came from both fish farm and fish stalls. Also *Aspergillus* and *Penicilium* species were both present in fish farms and fish stalls. *Exophiala xenobiotica*, *Yarrowia galli* were found in fish farm and *Cystofilobasidium infirmominiatum*, *Hanseniaspora uvarum* were found in fish stalls.

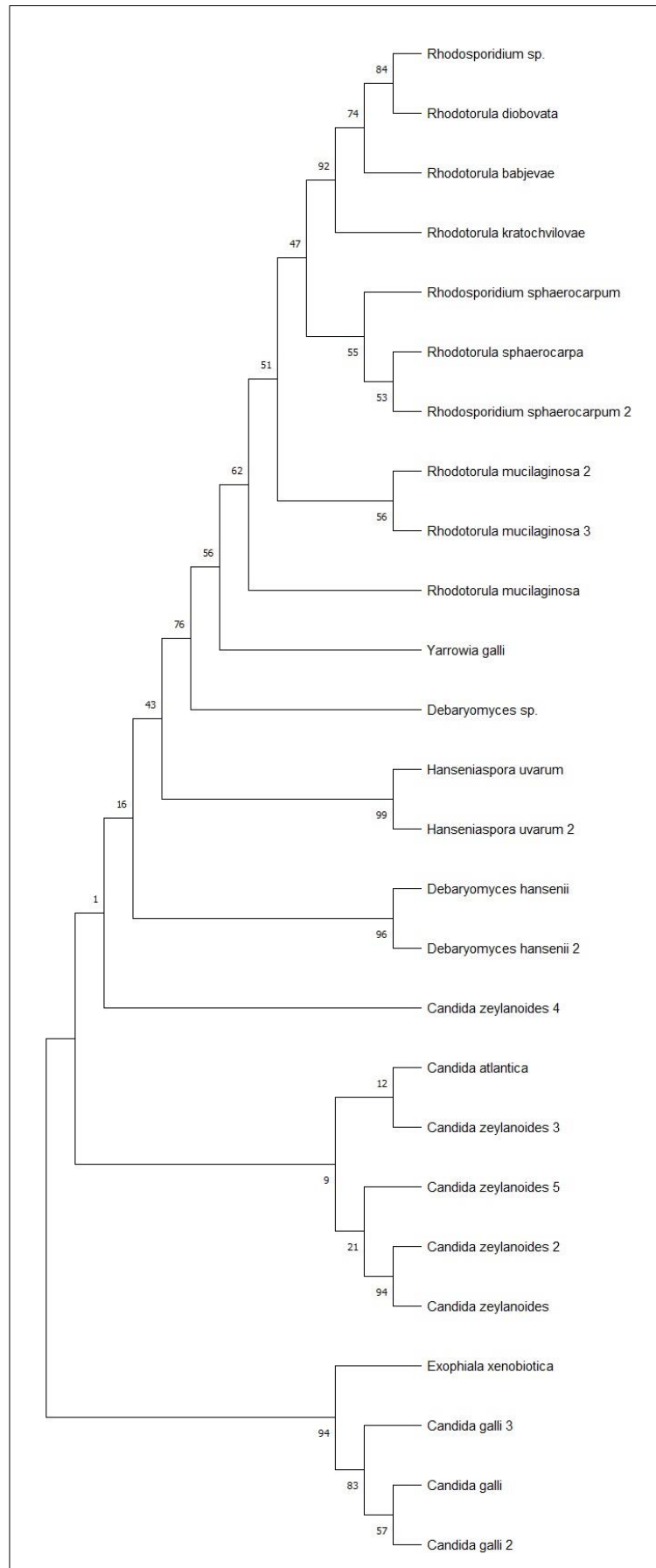
### Biofilm tests

We found only 10 isolates biofilm positive among 69 isolates and 17 different genera. Biofilm results were given in Table 3.

The majority of the species are moderate adherent. Two of the species are strong adherent and two of them are weak adherent. This will affect the removal of biofilms from surfaces. Strong adherent species will be harder to remove from the surfaces.



**Figure.1.** Phylogenetic tree of fungi species. Evolutionary analysis by Maximum Likelihood method. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method and Tamura 3-parameter model. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X.



**Figure 2.** Phylogenetic tree of yeast species. Evolutionary analysis by Maximum Likelihood method. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method and Tamura-Nei model. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X.

**Table 3.** Biofilm forming isolates and their adherence

No	Name	Adherence
1	<i>Aspergillus flavus</i>	Adherent
2	<i>Aspergillus amstelodami</i>	Adherent
3	<i>Alternaria tenuissima</i>	Weak adherent
4	<i>Trichosporon lactis</i>	Weak adherent
5	<i>Candida galli</i>	Strong adherent
6	<i>Candida zeylanoides</i>	Strong adherent
7	<i>Exophiala xenobiotica</i>	Adherent
8	<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	Adheran
9	<i>Rhodosporidium sphaerocarpum</i>	Adherent
10	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Adherent

From these ten biofilm forming species only one belongs to fish farm, *Exophiala xenobiotica*, other species comes from fish stalls.

There is a complicated relationship between microorganisms and their environment. This is an intriguing subject to study. Biofilms are one of the most sophisticated structures of the microbial world. This study identifies fungal communities of marine environments and tests their biofilm capabilities. We provide initial data for some biofilm-forming fungi in marine environments.

A metagenomic study can give us the list of all organisms but in this study, we focused on culturable species because we wanted to simulate biofilm formation *in-vitro*. Our study only assesses the biofilm-forming capabilities of cultured species. Further studies must be done for uncultured species and their roles in biofilms.

## CONCLUSION

There is a complex relationship between microorganisms and their environment. Biofilms are one of the most complex structures in the microbial world. This study identifies fungal communities in the marine environment and tests their biofilm capacity. We provide baseline data for some biofilm-forming fungi in the marine environment.

Although there are not many fungal pathogens reported for fish, their presence can affect pathogens. This effect can be positive or negative depending on the situation. By forming biofilms fungi can accommodate and protect pathogens. This could emerge disease and prolong treatments causing time loss and financial loss. Prolonged treatments can result in multidrug resistant strains of pathogens. If we know the type and the strength of the biofilm we can take necessary precautions to avoid unwanted situations. Further studies are needed to identify which biofilm communities have positive or negative effects. If positive biofilm communities are stimulated, they can be used as biological control agents.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was conducted in Aydın Adnan Menderes University, Faculty of Science and Literature, Biology Department, Microbiology Laboratory with the support of the Scientific Research Department (Project No: FEF-17025). We would like to thank M.Sc. Mehmet Ali Yörükce and M.Sc. Fatma Yaman for their contributions.

## Conflict of Interest

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

## Author's Contributions

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

## REFERENCES

- Arunkumar M, Lewis-Oscar F, Thajuddin N, Pugazhendhi A, Nithya C, 2020. *In vitro* and *in vivo* biofilm forming *Vibrio* sp: A significant threat in aquaculture. *Process Biochemistry* 94:213-223.
- Barnett H.L, 2003. Illustrated genera of Imperfect fungi. Burgess Publishing Company Minneapolis-USA.
- Barnharst T, Rajendran A, Hu B, 2018. Bioremediation of synthetic intensive aquaculture wastewater by a novel feed-grade composite biofilm. *Int Biodeterior and Biodegradation* 126:131–142.
- Brogden K. A, Guthmiller J. M, Taylor C. E, 2005. Human polymicrobial infections. *The Lancet* 365(9455):253-255.
- Cai W, Arias, CR, 2017. Biofilm formation on aquaculture substrates by selected bacterial fish pathogens. *Journal of Aquatic Animal Health*, 29(2): 95–104.
- Calderone RA, Clancy C J, 2011. *Candida* and candidiasis. American Society for Microbiology Press Baltimore-USA.
- Choudhury GT, Singh SK, Parhi J, Barman D, Das B. 2014. Common Fungal Diseases of Fish: A Review. *Environment and Ecology*. 32. 450-456.
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JA, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM et al, 1985. Adherence of coagulase negative staphylococci to plastic tissue cultures: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6): 906-1006.
- Connell JL, Wessel AK, Parsek MR, Ellington AD, Whiteley M, Shear JB, 2010. Probing prokaryotic social behaviors with bacterial “lobster traps”. *MBio* 1(4):1-8.
- Costa-Orlandi CB, Sardi JC, Santos CT, Fusco-Almeida AM, 2014. In vitro characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. *Biofouling* 30(6):719-727.
- Dinçtürk E., Tanrıkul T.T., Türk Çulha S. 2018. Fungal and Bacterial Co-Infection of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758) in a Recirculating Aquaculture System: *Saprolegnia parasitica* and *Aeromonas hydrophila*. *Aquatic Sciences and Engineering*, 33(3): 67-71
- Doyle J.J, Doyle J. L, 1987. Isolation of Plant DNA From Fresh Tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Gaikowski M. P., Rach J. J., Drobish M., Hamilton J., Harder T., Lee L. A., Moen C., Moore A. 2003. Efficacy of hydrogen peroxide in controlling mortality associated with saprolegniasis on walleye, white sucker, and paddlefish eggs. *North American Journal of Aquaculture* 65(4), 349-355.
- Gonzalez-Ramirez AI, Ramirez-Granillo A, Medina-Canales MG, Rodriguez-Tovar AV, 2016. Analysis and description of the stages of *Aspergillus fumigatus* biofilm formation using scanning electron microscopy. *BMC Microbiology*, 16(1): 243.
- Imamura Y, Chandra J, Mukherjee PK, Lattif AA, Szczotka-Flynn LB, Pearlman E, Lass JH, O'Donnell K, GMA, 2008. *Fusarium* and *Candida albicans* biofilms on soft contact lenses: Model development, influence of lens type, and susceptibility to lens care solutions. *AAC*, 51(1): 171-182.
- Karunasagar I, Otta S. K, Karunasagar I, 1996. Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. *Aquaculture* 140(3):241–245.
- Koch R, 1999. Über die neuen Untersuchungsmethoden zum Nachweis der Mikrokosmen in Boden, Luft und Wasser. Vortrag auf dem XI. Deutschen Ärztetagen Berlin. Vereinsblatt für Deutschland, Kommissions-Verlag von F. C. W. Vogel, Leipzig 137:274-284.
- Kohlmeyer J, 1974. On the definition and taxonomy of higher marine fungi. *Veroff. Inst. Meerforsh. Bremerhaven. Suppl*, 5: 263–286.
- Luque J, Parladé J, Pera J, 2000. Pathogenicity of fungi isolated from *Quercus suber* in Catalonia (NE Spain). *Forest Pathology* 30(5): 247-263.
- Miao L, Qian PY, 2005. Antagonistic antimicrobial activity of marine fungi and bacteria isolated from marine biofilm and seawaters of Hong Kong. *Aquatic Microbial Ecology* 38: 231–238.
- Op De Beeck M, Lievens B, Busschaert P, Declerck S, Vangronsveld J, et al, 2014. Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies. *PlosOne*. 9(6): e97629.
- Pandey P. K, Bharti, V, Kumar K, 2014. Biofilm in aquaculture production. *African Journal of Microbiological Research* 8(13):1434–1443.
- Panigrahi A, Azad, IS, 2007. Microbial intervention for better fish health in aquaculture: the Indian scenario. *Fish Physiology and Biochemistry* 33(4):429-440.
- Roberts RJ. 2012. *Fish pathology*. 4th ed. Wiley- Blackwell, USA.
- Romano C, Valenti L, Miracco C, Alessandrini C, Paccagnini E, Faggi E, Difonzo E. M, 1997. Two cases of cutaneous phaeohyphomycosis by *Alternaria alternata* and *Alternaria tenuissima*. *Mycopathologia*, 137(2):65–74.

- Salamone A. L, Robicheau B. M, Walker A. K, 2016. Fungal diversity of marine biofilms on artificial reefs in the north-central Gulf of Mexico. *Botanica Marina* 59(5): 291–305.
- Santhakumari S, Kannappan A, Pandian S. K, Thajuddin N, Rajendran R. B, Ravi A. V, 2016. Inhibitory effect of marine cyanobacterial extract on biofilm formation and virulence factor production of bacterial pathogens causing vibriosis in aquaculture. *Journal of Applied Phycology* 28(1):313-324.
- Sardi JC, Pitangui NS, Voltan AR, Braz JD, Machado MP, Fusco Almeida AM, 2015. In vitro *Paracoccidioides brasiliensis* biofilm and gene expression of adhesins and hydrolytic enzymes. *Virulence*, 6(6):642-651
- Siqueira VM, Lima N, 2013. Biofilm Formation by Filamentous Fungi Recovered from a Water System. *Journal of Mycology* Article ID 152941.
- Turgay E, Stenium T, Colguhoun D, Karataş S, 2019. Environmental biofilm communities associated with early-stage common dentex (*Dentex dentex*) culture. *Journal of Applied Microbiology* 126(4):1032-1043.
- Vert M, Doi Y, Hellwich K. H, Hess M, Hodge P, Kubisa P, et al, 2012. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations). *Pure Applied Chemistry* 84(2):377-410.
- Wesseling W, Wittka S, Kroll S, Soltmann C, Kegler P, Kunzmann A, Lohmeyer M, 2015. Functionalised ceramic spawning tiles with probiotic *Pseudoalteromonas* biofilms designed for clownfish aquaculture *Aquaculture* 446:57–66.
- Wietz M, Hall M. R, Høj L, 2009. Effects of seawater ozonation on biofilm development in aquaculture tanks. *Systematic and Applied Microbiology* 32(4):266–277.
- You J, Xue X, Cao L, Lu X, Wang J, Zhang L, Zhou S, 2007. Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76(5):1137-1144.

### Association of DRD2 Gene C957T Polymorphism with Stuttering in Turkish Population

Fikriye POLAT, Ayşe AYDIN UYSAL, Burcu YÜKSEL

**ABSTRACT:** This study aims to evaluate the association of DRD2 gene C957T polymorphism with stuttering within Turkish children who stutter. The sample of the study included 121 children between the ages of 5-16, 44 children with stuttering and 77 typically developing children. The genomic DNA's were extracted from the saliva of the individuals. The genotyping of DRD2 C957T was carried out using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. The relationship between genotypes and stuttering was examined through logistic regression analysis. In the study, it was determined that distributions of allele frequencies and the DRD2 gene C957T polymorphism were not significantly different from the control group (OR 0.762; CI 0.458-1.267, p=0.304). The genotype distributions of the DRD2 gene were estimated for CT (OR 1.103; CI 0.443-2.743, p=0.833) and TT (OR 0.868; CI 0.306-2.461; P=0.791). The genotype distributions of DRD2 C957T polymorphism were not statistically significant for additive, dominant, recessive, and codominant models between study groups. As a result, the polymorphic feature of the alleles and genotypes for the DRD2 gene C957T in Turkish children who stutter were analyzed, and it was detected that the differences between CWS and CWNS groups were not significant.

**Keywords:** Stuttering, DRD2, rs6277, Turkish population

<sup>1</sup> Fikriye POLAT ([Orcid ID: 0000-0002-5414-2501](https://orcid.org/0000-0002-5414-2501)), Kocaeli University, Faculty of Education Department of Mathematics and Science education, Kocaeli, Turkey

<sup>2</sup> Ayşe AYDIN UYSAL ([Orcid ID: 0000-0002-3689-7628](https://orcid.org/0000-0002-3689-7628)), Kocaeli University, Faculty of Education, Department of Special Education, Kocaeli, Turkey

<sup>3</sup> Burcu YÜKSEL ([Orcid ID: 0000-0001-8691-6447](https://orcid.org/0000-0001-8691-6447)), Kocaeli University, Vocational School of Health Services, Kocaeli, Turkey

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Fikriye POLAT, e-mail: fikriyepolat@gmail.com

**ETHICS COMMITTEE APPROVAL:** KÜ GOKAEK 2019/174

## INTRODUCTION

Developmental stuttering is a common condition characterized by involuntary sound, syllable, word and phrase repetitions, blocks, and prolongations which disrupt the efficient flow of speech and leads to psychosocial difficulties (Guitar, 2006). It usually begins between the ages of 2-5 and affects more males than females. 5% of people are reported to stutter during part of their lives (Mansson, 2000). Its incidence across all age groups is 0.72% since every 4 out of 5 children recover it spontaneously (Craig et al., 2002).

Although the exact etiology of stuttering has not been yet elucidated, there is substantial research demonstrated by family (Raza et al., 2012, Raza et al., 2013), twin (Howie, 1981; Felsenfeld et al., 2000; Ooki 2005; Dworzynski et al., 2007, Fagnani et al., 2011; Rautakoski et al., 2012) and adoption studies (Felsenfeld and Plomin, 1997) that genetic components have a role in. Although the heritable factors in stuttering are reported to be strong, the exact mode of transmission is unknown yet.

While defining the premotor circuits in the 'dual premotor stuttering hypothesis', Alm (2014) divided circuits into two: the medial system (basal ganglia and complementary motor area) and the lateral system cerebellum and lateral premotor cortex. According to this model, the medial system is responsible for controlling speech initiation signals. In contrast, the lateral system is thought to be involved in motor activation in response to externally cued sensory input, and the movements are performed with attention. Basal ganglia are suggested to help supplementer the motor area by providing internal timing cues to initiate self-initiated speech movements. So, the medial and basal ganglia are thought to be disturbed in people who stutter while the lateral system is intact.

Dopamine is a key neurotransmitter of the basal ganglia and thought to have a major role in fine motor movements (Lan et al., 2009). When the dopamine-excess theory of stuttering is considered, an unusual rise in cerebral dopaminergic activity may be effecting stuttering. PET scanning studies (Wu et al., 1997) reveal that dopaminergic activity in people who stutter is 50-200% higher than controls. It is anticipated that the most intense dopamine innervation in the brain is taken by basal ganglia's striatum and in the pharmacological studies and it has been seen that the medications, which inhibit type D2 dopamine receptors (D2Rs), impair stuttering systems (Brady, 1991; Stager et al., 2005; Tran et al., 2008).

A molecular case-control study by Lan et al. (2009) explored the role of dopaminergic polymorphisms in Han Chinese people who stutter. Results of the research revealed that the C allele of the *dopamine D2 receptor* (DRD2) C957T polymorphism (rs6277) on chromosome 11q23 may exemplify the enhanced susceptibility for developmental stuttering. In a larger sample, Kang et al. (2012) studied the association between stuttering and SNPs that reside in (*DRD2*) gene in Brazilian and western European people who stutter and their sex-matched controls. However, their data did not support the previous findings of Lan et al., claiming that the C allele of rs6277 is associated with stuttering. In a later study, Montag et al. (2012) investigated the association between personality trait neuroticism and the DRD2 C957T (rs6277) in Caucasian people who stutter. Consistent with Kang et al.'s findings, no connection was discovered among stuttering and polymorphism on the DRD2 gene by the authors. However, carriers of the CC and the CT genotype in their sample are reported to have significantly higher neuroticism scores (Montag et al., 2012).

There is not any study exploring the role of stuttering candidate genes in Turkish people who stutter. Thus, this initial study aims to explore the potential associations of dopaminergic gene DRD2 and stuttering within Turkish-speaking children who stutter.



## MATERIALS AND METHODS

### Participants

Participants were 44 Turkish children who stuttered (CWS) who had clinical diagnoses from the Kocaeli University Hospital, Child and Adolescent Psychiatry Unit, Speech and Language Therapy Clinic. All participants were diagnosed by experienced speech and language therapists based on a detailed clinical interview and Stuttering Severity Instrument IV (SSI-4) at the first session. The experimental group included 44 CWS (34 boys, 10 girls) aged between 5.00 and 16 (8.65±2.54). The participants had no any other speech or language problem nor had any history of neurological, psychiatric, or hearing disorder had received any therapy for stuttering or had any learning problem. 75% of the children had a positive family history of stuttering.

The control group of the sample included a total of 77 children aged 5-14 years and were accessed by contacting the schools in the same city. Inclusion criteria for the control group participating in the study were not having the diagnosis of an accompanying psychiatric or neurological condition, not having speech and language problems and not using drugs likely to affect cognitive processes (Pellowski and Conture, 2002), which was obtained through a demographic data form.

Ethical approval for the study was obtained from the Kocaeli University Ethical Board of Noninterventional Research (KÜ GOKAEK 2019/174). The study was designed and conducted in accordance with Helsinki Declaration. Informed consent was obtained from the parents of the children accepting to participate in the study.

### Instruments

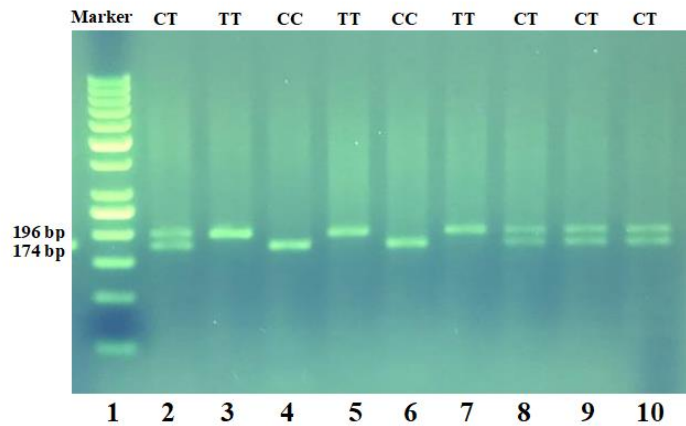
Stuttering Severity Instrument Version 4: The Turkish version of Stuttering Severity Instrument (SSI-4) (Mutlu, 2015) was administered to all of the participants by a speech and language therapist to determine the severity of stuttering.

### Isolation of DNA

DNA isolation was performed from the saliva using the EURx GeneMATRIX Tissue&Bacterial DNA Purification Kit following the procedures recommended by the company. DNA concentrations of the samples were measured using the Qubit 2.0 Fluorometer kit (Invitrogen, America).

### Polymerase Chain Reaction and RFLP

PCR amplified the DRD2 gene C957T genotypes with the primers 5'-ACCACGGTCTCCACAGCACTCT-3' (forward 1), 5'-ACCATGGTCTCCACAGCACTCT-3' (forward 2), and 5'-ATGGCGAGCATCTGAGTGGCT-3' (reverse) (Mohammadi et al., 2018). PCR steps were involved: 5 minutes at 95 °C (pre-denaturation), 40 cycles at 95 °C for 30 s (denaturation), 30 s at 62 °C (annealing), 30 s at 72 °C (extension), and 7 min at 72 °C (final extension). PCR product size was predicted as 196 bp. The PCR products were digested with Taq 1 (ER0671, Thermo Fisher Scientific Inc), PCR products were digested at 65 °C for an hour, followed by electrophoresis on 3% high-resolution agarose gel (100 V for 75 minutes) and visualized with a UV transilluminator by using Safe-T staining (ethidium bromide alternative) with the purpose of detecting the DNA bands. The wild-type allele "C" encapsulated two particles, 174 bp and 22 bp. When the 196 bp particle subsisted uncut, the polymorphic variant T was discovered (Figure 1).



**Figure 1.** High-resolution agarose gel electrophoresis model of the RFLP outputs of DRD2 C957T polymorphism. While column 1 demonstrates a 50-bp DNA molecular marker, column 2,8,9 and 10 illustrates the CT genotype, columns 3, 5, and 7 demonstrate the TT genotype, and columns 4 and 6 indicate the CC genotype, columns 2-5 pertain to the CWS and columns 6-10 pertain to the CWNS.

RFLP refers to Restriction particle length polymorphism; while CWS, refers to Children who stuttered; and finally CWNS, as Children who did not stutter.

### Data Analysis

The genotype and allele frequencies of the DRD2 C957T polymorphism were examined for Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) via a chi-square test. Deviations from HWE were investigated by means of Michael H. Court's (2005-2008) online calculator. Statistical analysis of demographic features was performed via chi-square test and Man Whitney U test by using SPSS version 20. For the DRD2 gene C957T polymorphism, unconditional logistic regression was used to calculate odds ratios (OR) in 95% confidence intervals (95% CI) for CWS.  $P < 0.05$  value was considered statistically significant.

### RESULTS AND DISCUSSION

In this study, we examined 44 CWS patients and 77 CWNS well-person controls. Table 1 shows the allele and the genotype frequencies of the DRD2 gene C957T polymorphism in CWS and CWNS. No aberration was beheld from the Hardy-Weinberg equilibrium for both CWS and CWNS, when the genotype frequencies of this polymorphism were evaluated ( $p > 0.05$ ). For the C957T polymorphism of the DRD2 gene according to the additive model, in the CWS group, 11 patients (25%) were CC genotype, 21 patients (48%) were TC genotype, and 12 patients (27%) were TT genotype; in the CWNS group, 19 healthy individuals (25%) were CC genotype, 40 individuals (52%) were CT genotype, and 18 individuals (23%) were TT genotype. For the DRD2 SNP, we detected that CT genotype versus CC genotype resulted in the odds ratio of 1.103 fold, but the ratio was not statistically significant ( $p = 0.833$ ). The dominant model, which compares the combined the genotypes of CT+TT with the CC genotype, was not statistically different between the CWS and CWNS groups ( $p > 0.05$ ). At the same time, the recessive model (CC+CT genotype combination versus TT genotype) and the codominant model (CC+TT genotype combination versus CT genotype) were not statistically significant (respectively,  $p = 0.633$  and  $p = 0.655$ ) between both groups. When the allelic frequencies of the DRD2 rs6277 are considered, there were no discrepancy between the CWS and CWNS groups in the Turkish population ( $p > 0.05$ ) (Table 2).

**Table 1.** Descriptive Statistics Regarding Demographic Features of participants

Groups	Female n (%)	Male n (%)	p value	Age (y) mean $\pm$ SD	p value
CWS	10 (23)	34 (77)	1.000	8.65 $\pm$ 2.54	0.703
CWNS	18 (23)	59 (77)		8.68 $\pm$ 2.23	

CWS: Children with stuttering, CWNS: Children with nonstuttering, n: Number of participants

**Table 2.** Distribution of the genotype and allele frequencies of DRD2 C957T polymorphism in CWS and CWNS subjects.

DRD2 C957T		CWS (n= 44) n (%)	CWNS (n=77) n (%)	p value	OR CI (95%)
Additive	CC	11 (25)	19 (25)	-	-
	CT	21 (48)	40 (52)	0.833	1.103 (0.443-2.743)
	TT	12 (27)	18 (23)	0.791	0.868 (0.306-2.461)
Dominant	CC	11 (25)	19 (25)	0.968	1.018 (0.432-2.397)
	CT+TT	33 (75)	58 (75)		
Recessive	CC+CT	32 (73)	59 (77)	0.633	0.814 (0.349-1.899)
	TT	12 (27)	18 (23)		
Codominant	CC+TT	23 (52)	37 (48)	0.655	1.184 (0.564-2.485)
	CT	21 (48)	40 (52)		
Alleles	C	43 (44)	78 (51)	0.304	0,762 (0.458-1.267)
	T	55 (56)	76 (49)		

CWS: Children with stuttering, CWNS: Children with nonstuttering, n: Number of participants

The first genetic studies on stuttering are carried between 1924-1939 and mainly focused on family incidence. Scientists for over 80 years have used family pedigrees and twin studies to investigate the inheritance of stuttering and determined that it tends to cluster in families (Kraft, 2010). In the early 2000s, with the advancement of technology, specific genes in stuttering disease began to be investigated using blood samples (Kraft, 2010).

Studies on the stuttering estimate that it is compatible with the family history of stuttering. Twin studies confirm these findings. Also, male relatives actually have a higher risk than female relatives (Kraft, 2010; Perez and Stoeckle, 2016). Linkage analysis has shown that the disease may be associated with changes in some regions on chromosomes 9, 10, 12, 13, 15, and 18. (Shugart et al., 2004; Riaz et al., 2005; Suresh et al. 2006; Wittke-Thomps et al., 2007, Domingues et al., 2014).

DRD2 polymorphism has been found to be associated with a severe risk of alcoholism (Noble, 1998). The A1 variation of the DRD2 gene has also been found with a higher rate in alcoholics, drug abusers, smokers, and other addictive, compulsive or impulsive diseases. (Kraft, 2010). This gene affects dopamine receptors and reinforces repetitive behaviours in an individual. Genetic examination of the DRD2 gene, a prevalent dopamine receptor in the brain, has shown that the frequency of a specific allele in adults who stutter (AWS) is increased (Lan et al., 2009). However, this finding could not be obtained in later studies.

Stuttering affecting fluency is a neurobiological disease that is predicted to be inherited, and its prevalence among adults is around 1% (Dworzynski et al., 2007; Kang et al., 2011). Pharmacological and neurobiological findings show that the neurotransmitter dopamine and the basal ganglia may play an important role in stuttering, whose etiology is not understood yet and the pathogenesis is still unknown. (Wu et al., 1995; Maguire et al., 2004; Alm, 2004). The first genetic study in this area was conducted by Lan et al. (2009) in the Han Chinese people who stutter. They reported that the C allele of

the DRD2 C957T polymorphism found in 11q23 could be a possible element in the development of a speech disorder such as stuttering in their research (Lan et al., 2009). Human DRD2 C957T polymorphism regulates DRD2 availability in the striatum. Individuals with the CC genotype show the lowest D2 receptor affinity (Hirvonen et al., 2004). Montag et al. (2012) investigated the role of the DRD2 gene C957T polymorphism in neuroticism in stutterer. They found that personality traits such as neuroticism and biomarkers such as rs6277 SNPs on the DRD2 gene would deeply understand stuttering (Montag et al., 2012).

Investigating the connection between developmental stuttering in children and the levels of serum homovanillic acid (HVA), DRD2 rs6277, and solute carrier family with 6 members 3 (SLC6A3) human dopamine transporter (hDAT) rs28364997 polymorphisms in a study on the Iranian Kurdish population, Mohammadi et al. (2018) detected that the difference of the allele frequencies of DRD2 C957T between the CW and the CWNS was tenuous. On the contrary, the TT genotype frequency was statistically higher among the CWS ( $p=0.02$ ,  $OR=2.25$ ,  $95\% CI=1.03-4.90$ ). They indicated that DRD2 C957T polymorphism might be a risk factor for the development of stuttering there among their inhabitant (Mohammadi et al., 2018).

In the investigations on the association of the DRD2 gene C957T polymorphism and stuttering in different populations, while the C allele in Han Chinese population and TT genotype in the Iran population is statistically significant (Lan et al., 2009; Mohammadi et al., 2018), it was stated that no relation was found in Brazilian, Western European (Kang et al., 2012), Caucasian (Montag et al., 2012) and Iranian populations (Mohammadi et al., 2018).

Consistent with the results of studies conducted in Brazil, Western Europe, and Caucasian populations, we could not find any statistically significant findings between Turkish people who stutter and the DRD2 gene rs6277 polymorphism in both genotype and allele frequencies.

Indeed, Kraft (2010) stated that the role of the DRD2 gene in individuals who stutter would below. In Kraft's (2010) study, Fatty acid desaturase 2 (FADS2, rs7119667, 11q12-q13.1) gene, located on the same chromosome with the DRD2 gene, was found to be important, and in addition to the FADS2 gene, 8 more genes associated with stuttering were detected.

## CONCLUSION

Stuttering is a developmental speech disorder that usually starts between the ages of 2-5, and it is known that more than one factor plays a role in its onset and course. The familial pedigrees, twin studies, and GWAS studies reveal that stuttering may have a genetic basis. However, there are very few studies to shed light on the genetic basis of this disease. Due to the Covid 19 pandemic, we had to suspend the DNA isolations we obtained from the saliva sample in stuttering individuals. This situation constituted the limitation of our study, and therefore it remained a pilot study. We still wanted to publish and share the data we have obtained up to this stage.

In conclusion, in our study, we investigated the relationship between stutterers and the DRD2 gene C957T polymorphism in the Turkish population. We could not obtain a statistically significant result between the DRD2 gene rs6277 polymorphism and CWS. The relationship between the DRD2 gene and stuttering, with different results in different populations, should be reassessed with a larger population sample, along with other genes suggested in the literature. This study is the first genetic polymorphism study on stuttering in Turkish society. There are no genetic studies on speech and language disorders in Turkish society. In addition to the DRD2 gene, the extraction of FOXP2, GNPTAB, SPCH1, CNTNAP2, ATP2C2, CMIP genetic profiles, which are thought to be related to these diseases, will contribute to the literature of our country.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the Scientific Research Project Unit of Kocaeli University (Project number: FHD-2020-2173).

**Conflict of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Authors' Contribution:** All authors have contributed in experimental study and writing of the manuscript equally.

**Ethics Committee Approval:** Prior to data collection research, KÜ GOKAEK Non-Interventional Ethics Committee permission numbered 2019/174 was granted and MoNE and Governorship approvals dated 19.06.2019 and decree no: 2019/10.11 were obtained.

## REFERENCES

- Guitar B, 2006. *Stuttering: An Integrated Approach to Its Nature and Treatment* (3th ed.). Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia, PA.
- Mansson, H, 2000. Childhood Stuttering: Incidence and Development. *Journal of Fluency Disord*, 25; 47-57.
- Craig A, Hancock K, Tran Y, Craig M, Peters K, 2002. Epidemiology of Stuttering in The Community Across The Entire Life Span. *Journal of Speech, Language and Hearing Research*, 45(6):1097-1105.
- Raza MH, Amjad R, Riazuddin S, Drayna D, 2012. Studies in a Consanguineous Family Reveal a Novel Locus for Stuttering on Chromosome 16q. *Human Genetics*, 131(2):311-313.
- Raza MH, Gertz EM, Mundorff J, Lukong J, Kuster J et al., 2013. Linkage Analysis of a Large African Family Segregating Stuttering Suggests Polygenic Inheritance. *Human Genetics*, 132:385-396.
- Howie PM, 1981. Concordance for Stuttering in Monozygotic and Dizygotic Twin Pairs. *Journal of Speech, Language and Hearing Research*, 24:317-321.
- Felsenfeld S, Kirk KM, Zhu G, Statham DJ, Neale MC et al., 2000. A Study of The Genetic and Environmental Etiology of Stuttering in a Selected Twin Sample. *Behavior Genetics*, 30:359–366.
- Ooki S, 2005. Genetic and Environmental Influences on Stuttering and Tics in Japanese Twin Children. *Twin Research and Human Genetics: the official journal of the International Society for Twin Studies*, 8:69–75.
- Dworzynski K, Remington A, Rijdsdijk F, Howell P, Plomin R, 2007. Genetic Etiology in Cases of Recovered and Persistent Stuttering in an Unselected, Longitudinal Sample of Young Twins. *American Journal of Speech-Language Pathology*, 16:169-178.
- Fagnani C, Fibiger S, Skytthe A, Hjelmborg JV, 2011. Heritability and Environmental Effects for Self-Reported Periods with Stuttering: A Twin Study from Denmark. *Logopedics, Phoniatrics Vocology*, 36(3):114-120.
- Rautakoski P, Hannus T, Simberg S, Sandnabba NK, Santtila P, 2012. Genetic and Environmental Effects on Stuttering: A Twin Study from Finland. *Journal of Fluency Disorders*, 37(3):202-10.
- Felsenfeld S, Plomin R, 1997. Epidemiological and Offspring Analyses of Developmental Speech Disorders Using Data from the Colorado Adoption Project. *Journal of Speech, Language and Hearing Research*, 40:778-91.
- Alm PA, 2004. Stuttering and the Basal Ganglia Circuits: a Critical Review of Possible Relations. *Journal of Communication Disorders*, 37:325–369.
- Alm PA, 2005. On the Causal Mechanisms of Stuttering. Lund University <http://theses.lub.lu.se/postgrad/> (Printed)
- Lan J, Song M, Pan C, Zhuang G, Wang Y, Ma W, Chu Q, Lai Q, Xu F, Li Y, Liu L, Wang W, 2009. Association Between Dopaminergic Genes (SLC6A3 And DRD2) and Stuttering Among Han Chinese. *Journal of Human Genetics*, 54(8):457-60.
- Wu JC, Maguire G, Riley G, Lee A, Keator D, et al., 1997. Increased Dopamine Activity Associated with Stuttering. *Neuroreport*, 8(3):767-70.
- Brady JP, 1991. The Pharmacology of Stuttering: A Critical Review. *The American Journal of Psychiatry*, 148(10):1309-16.
- Stager SV, Calis K, Grothe D, Bloch M, Berensen NM, Smith PJ, Braun A, 2005. Treatment with Medications Affecting Dopaminergic and Serotonergic Mechanisms: Effects on Fluency and Anxiety in Persons Who Stutter. *Journal of Fluency Disorders*, 30(4):319-35.
- Tran NL, Maguire GA, Franklin DL, Riley GD, 2008. Case Report of Aripiprazole for Persistent Developmental Stuttering. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 28(4):470-2.

- Kang C, Domingues BS, Sainz E, Domingues CE, Drayna D, et al., 2011. Evaluation of the Association Between Polymorphisms at The DRD2 Locus and Stuttering. *Journal of Human Genetics*, 56(6):472-3.
- Montag C, Bleek B, Faber J, Reuter M, 2012. The Role of the DRD2 C957T Polymorphism in Neuroticism in Persons Who Stutter and Healthy Controls. *Neuroreport*, 23(4):246-50.
- Pellowski MW, Conture EG, 2002. Characteristics of Speech Disfluency and Stuttering Behaviors in 3- and 4-Year-Old Children. *Journal of Speech, Language and Hearing Research*, 45(1):20-34.
- Mutlu, A, 2015. Kekemelik Şiddetini Değerlendirme Aracının (Stuttering Severity Instrument 4) 6-16 Yaş Okul Çağı Çocuklarda Türkçe Uyarlaması. Gazi University, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Master's Thesis (Printed).
- Mohammadi H, Joghataei MT, Rahimi Z, Faghihi F, Farhangdoost H, 2018. Relationship between Serum Homovanillic Acid, DRD2 C957T (rs6277), and hDAT A559V (rs28364997) Polymorphisms and Developmental Stuttering. *Journal of Communication Disorders*, 76:37-46.
- Kraft SJ, 2010. Genome-wide association study of persistent developmental stuttering. Doctora thesis. University of Illinois, <http://hdl.handle.net/2142/17054> (Printed).
- Perez HR, Stoeckle JH, 2016. Stuttering: Clinical and Research Update. *Canadian Family Physician*, 62(6):479-84.
- Shugart YY, Mundorff J, Kilshaw J, Doheny K, Doan B, Wanyee J, Green ED, Drayna D, 2004. Results of a Genome-Wide Linkage Scan For Stuttering. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 124A(2):133-5.
- Suresh R, Ambrose N, Roe C, Pluzhnikov A, Wittke-Thompson JK, Ng MC, Wu X, Cook EH, Lundstrom C, Garsten M, Ezrati R, Yairi E, Cox NJ, 2006. New Complexities in The Genetics of Stuttering: Significant Sex-Specific Linkage Signals. *American Journal of Human Genetics*, 78(4):554-63.
- Riaz N, Steinberg S, Ahmad J, Pluzhnikov A, Riazuddin S, Cox NJ, Drayna D, 2005. Genomewide Significant Linkage to Stuttering on Chromosome 12. *American Journal of Human Genetics*, 76(4):647-51.
- Wittke-Thompson JK, Ambrose N, Yairi E, Roe C, Cook EH, et al., 2007. Genetic Studies of Stuttering in a Founder Population. *Journal of Fluency Disorders*, 32(1):33-50.
- Domingues CE, Olivera CM, Oliveira BV, Juste FS, Andrade CR, Giacheti CM, Moretti-Ferreira D, Drayna D, 2014. A Genetic Linkage Study in Brazil Identifies a New Locus for Persistent Developmental Stuttering on Chromosome 10. *Genetics and Molecular Research*, 24;13(1):2094-2101
- Noble EP, 1998. The D2 Dopamine Receptor Gene: A Review of Association Studies in Alcoholism and Phenotypes. *Alcohol*, 16(Suppl1):33-45.
- Wu JC, Maguire G, Riley G, Fallon J, LaCasse L, et al., 1995. A Positron Emission Tomography [18F] Deoxyglucose Study of Developmental Stuttering. *NeuroReport*, 6:501-505.
- Maguire GA, Riley GD, Franklin DL, Maguire ME, Nguyen CT, et al., 2004. Olanzapine in the Treatment of Developmental Stuttering: A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Annals of Clinical Psychiatry*, 16:63-67.
- Hirvonen M, Laakso A, Nagren K, Rinne JO, Pohjalainen T, Hietala J, 2004. C957T Polymorphism of the Dopamine D2 Receptor (DRD2) Gene Affects Striatal DRD2 Availability *in Vivo*. *Molecular Psychiatry*, 9: 1060-1061.

**Atf İçin:** Bayram S, Aydoğan MN, 2021. Çok Yönlü Polisakkarit Ayrıştırıcı Alkali-toleranslı veya Alkalifilik *Bacillus* Suşlarının Aranması. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 133-141.

**To Cite:** Bayram S, Aydoğan MN, 2021. Searching for Versatile Polysaccharide-Degrading Alkali-tolerant or Alkaliphilic *Bacillus* Strains. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 133-141.

## Searching for Versatile Polysaccharide-Degrading Alkali-tolerant or Alkaliphilic *Bacillus* Strains

Sinan BAYRAM<sup>1</sup>, Mehmet Nuri AYDOĞAN<sup>2</sup>

**ABSTRACT:** The plant-derived polysaccharides (Cellulose, xylose and amylose, etc.) are the most abundant renewable raw materials in nature. Cellulose and xylose are the predominant carbohydrate polymer components of the plant cell walls and the most abundant biopolymers in the world. Another plant-derived polysaccharide, starch is found in plant tubers, roots and seed endosperms as a major carbohydrate reserve. In this study, it was aimed to find multi-enzyme producer bacteria strains in terms of industrially important enzymes such as cellulase, xylanase and amylase. For this purpose, isolated *Bacillus* strains from different samples were qualitatively evaluated for cellulase, xylanase and amylase enzyme production potentials. The isolates that have the highest enzyme activity were selected for biochemical tests, molecular and phenotypic characterization. As a result of these characterization process, SB57, SB104, SB155, SB178, SB197 and SB199 strains were identified as *Bacillus pumilus* and SB118, SB138 strains were identified as *Bacillus safensis*. In addition to these strains, SB120 and SB147 strains were identified as *Bacillus aerius* and *Bacillus licheniformis* respectively. 16S rDNA sequence analysis results of these *Bacillus* strains were deposited in NCBI GenBank® under accession number KT371465 - KT371474 respectively.

**Keywords:** *Bacillus*, Alkali-tolerant, Alkaliphilic, cellulase, xylanase, amylase

<sup>1</sup>Sinan BAYRAM ([Orcid ID: 0000-0002-2156-1566](https://orcid.org/0000-0002-2156-1566)), Bayburt Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetleri ve Teknikler Bölümü, Bayburt, Türkiye

<sup>2</sup> Mehmet Nuri AYDOĞAN ([Orcid ID: 0000-0001-7518-4746](https://orcid.org/0000-0001-7518-4746)), Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Erzurum, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Sinan BAYRAM, e-mail: [sbayram@bayburt.edu.tr](mailto:sbayram@bayburt.edu.tr)

\*Bu makale Sinan BAYRAM'ın doktora tezinden üretilmiştir.

## INTRODUCTION

Enzymes are biological catalysts that accelerate or catalyze, chemical reactions in living organisms. These biological catalysts, which can only be synthesized by living organisms, regulate reactions outside the cell as well as within the cell (Kagan and Li, 2003). The use of enzymes in daily life is nearly as old as the history of the civilization. Humans have been unwittingly benefited from the catalytic properties of enzymes for thousands of years in many processes such as the fermentation of bread, yogurt and cheese, the production of various alcoholic beverages and leather tanning (Kirk, 2002; Cherry and Fidantsef, 2003). It is reported that, the enzyme market reached annually 5.5 billion dollars in 2018, all over the world and it is estimated that this figure will reach 7 billion dollars by 2023 (Mishra et al., 2020).

Cellulose, which is one of the basic components of the cell wall in plants, is undoubtedly of great importance among the most abundant structural polysaccharides in nature. According to calculations made from various sources, plants are reported to produce 180 billion tons of cellulose on a global scale each year (Taylor, 2007) and therefore undoubtedly cellulose is one of the most abundant renewable energy sources in the world (Reese and Mandels, 1984; Coughlan, 1985).

Cellulose is formed by the linear bonding of approximately 15000 glucose units with  $\beta$  1-4 glycosidic bonds. Since it can be fermented and used as a substrate in biotechnological applications, cellulose is accepted as the most abundant carbon source in the world. Enzymes involved in hydrolysis of cellulose are called "cellulase" (Li et al., 2019). It is stated that three different enzymes act synergistically in the conversion of cellulose to  $\beta$ -glucose. In this process, the enzymes that use cellulose as a substrate are endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.91) and  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21) (Podrepšek et al., 2019).

Xylans are the second most abundant polysaccharide in nature made from units of xylose that are found in plant cell walls and some algae. Xylanases are a class of hydrolytic enzymes which randomly cleave the linear polysaccharide  $\beta$ -1,4-xylan into xylose (Hammed et al., 2013). Xylanases are glycosidases (*O*-glycoside hydrolases, EC 3.2.1.x) which are capable of cleaving the  $\beta$ -1,4 backbone of the complex plant cell wall polysaccharide xylan (Collins et al., 2005). Because of their catalytic properties, xylanases are widely used for industrial purposes including juice clarification, bioethanol production, dough processing, textile manufacturing, paper bleaching and feed additive etc. Selected strains to produce xylanase enzyme on industrial scales are generally isolated from plant pathogens. The xylanases used in industrial production are mostly isolated from bacterial and fungal strains (Beg et al., 2001; Chen et al., 2015; Saadat, 2017). In the food industry, xylanases are used for clarifying fruit juices and reducing viscosity. In the production of wine, xylanase enzyme is also used for increasing quality and clarification of maceration liquid. The xylanase enzyme is used to increase extraction efficiency, product quality and process performance in corn oil and olive oil production (Bhat, 2000).

The main purpose of using xylanase enzyme in the production of dough and bakery products is arabinoxylan, which is found in cereals and constitutes approximately 60-70% of the grain. Arabinoxylan that is the target substrate of the xylanase is about 60-70% of the cereal flour (Aehle, 2006). The use of xylanase enzyme in the production of doughs and bakery products increases the dough strength and at the same time gives the dough elasticity properties. These processes make it easier to knead the dough and increase the quality of the dough (Bhat, 2000; Dutron et al., 2011).

In the production process of feeds of farm animals such as poultry, pigs and ruminants, the xylanase enzyme has a great importance. The xylanase enzyme is used to reduce polysaccharide content, which is found in products such as barley and wheat, which are mostly used in feed production, and



which is difficult to digest. With the use of xylanase, the digestibility of animal feeds is increased and as a result, the meat and milk yield is increased in animals (Bhat, 2000; Mathlouthi et al., 2003). In addition, in the textile industry, the xylanase enzymes are widely used in the process of pooling industrially important herbal products such as linen, ramie and hemp (Sharma, 1987; Prade, 1995; Beg et al., 2001).

As an important storage polysaccharide starch is a polymer made up of glucose units connected by glycosidic bonds and is generally found in seeds, roots and tubers of large plants. There are two different types of glucose polymers in the starch: amylose and amylopectin. In amylose, which makes up approximately 30% of starch,  $\alpha$  1-4 glycosidic bonds are seen, while amylopectin, which makes up about 70%, has  $\alpha$ 1-6 glycosidic bonds (Barsby et al., 2001). Starch has a very complex structure and two different enzyme groups take part in the separation of starch into oligosaccharides and smaller building blocks. Endohydrolases (Endo-acting) and exohydrolases (Exo-acting) (Polaina and MacCabe, 2007). Among the commercially used enzymes, amylases have an important place. Amylase enzyme is used in many industrial fields such as food, textile, pharmaceutical, paper and detergent industries. The first use of this enzyme as a pharmaceutical supplement was in 1984 for the treatment of digestive disorders (Gupta et al., 2003; Debarati et al., 2014).

Alkaliphiles are a group of extremophilic microorganisms that grow optimally in alkaline environments at pH values above 9.0. Alkaline enzymes produced by alkaliphilic microorganisms are used in many fields such as detergent industry, tanning of the leather, food industry, cosmetics and pharmacology (Horikoshi, 1999).

In this study, alkaliphyl and alkalitolerant *Bacillus* strains has been isolated from different origins and these strains has been investigated for cellulose, xylanase and amylase enzyme production potentials. The strains with the highest enzyme activity were selected for physiological, biochemical and morphological and molecular characterization procedures. Based on the information obtained from these results, isolates were registered in the NCBI database.

## MATERIALS AND METHODS

### Isolation of Bacterial Strains

The microorganisms used in this study were isolated from different sources. For this purpose, soil samples were taken from the rhizosphere and the surface, in addition, rotten fruit samples, decaying plants and paper samples were used for purification of microorganisms. The samples taken from nature were transferred to sterilized 50 mL falcon tubes and brought to the laboratory. Samples diluted by serial dilution using physiological saline in the laboratory were inoculated into appropriate media (Ghadiri et al., 2021).

### Qualitative determination of cellulase enzyme activity

PYC (Peptone, yeast and carboxy-methyl cellulose) medium (pH: 9.0) was used to determine the cellulase enzyme activity of isolated *Bacillus* strains (Figure 1a). For this purpose, microorganisms were inoculated in a straight line on the prepared solid PYC medium which was composed of 10.0 g L<sup>-1</sup> carboxy-methyl cellulose (CMC), 5.0 g L<sup>-1</sup> peptone, 5.0 g L<sup>-1</sup> yeast extract, 1.0 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 15.0 g L<sup>-1</sup> agar-agar. All isolates were incubated for 72 h at 30 °C. At the end of the incubation period, 3 mL, 0.1% Congo red was added to the media and waited for 20 minutes and staining was performed in this way. After the staining process, 5mL, 1M NaCl was added in order to remove the dye from the medium and waited for 15 minutes. Yellow zones were observed around microorganisms capable of degrading cellulose and these bacteria were recorded as cellulase positive (Kim et al., 2005; Nelson et al., 2021).

### Qualitative determination of xylanase enzyme activity

All isolates were incubated in xylan medium (pH: 9.0) was composed of 5.0 g L<sup>-1</sup> oat spelt xylan, 5.0 g L<sup>-1</sup> peptone, 1.0 g L<sup>-1</sup> yeast extract, 1.0 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.0 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 15.0 g L<sup>-1</sup> agar-agar. After these *Bacillus* strains were inoculated in a straight line on the prepared solid media, they were left to incubate at 30 °C for 72 hours. Then, plates were flooded with 0.1% Congo red (Sigma-Aldrich) for 15 min. Finally, 10 mL, 1 M NaCl was added to the medium and waited for 15 minutes to de-staining (Figure 1b). Strains showing discoloration around the samples were selected as xylanase positive bacteria (Teather and Wood, 1982; Bozoglu et al., 2015).

### Qualitative determination of amylase enzyme activity

To determine the amylase enzyme activity of isolated *Bacillus* strains, M9 Starch agar (pH: 9.0) was used (Figure 1c). All isolates were incubated in M9 Starch agar (pH: 9.0) was composed of 10.0 g L<sup>-1</sup> soluble starch, 3.0 g L<sup>-1</sup> peptone, 6.0 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3.0 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.0 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, 0.5 g L<sup>-1</sup> NaCl, 0.24 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.24 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 15.0 g L<sup>-1</sup> agar-agar). After the microorganisms were inoculated in a straight line on the prepared solid media, they were left to incubate at 30 °C for 72 hours. At the end of the incubation period, the media are stained with iodine vapor. After this process, while the starch-containing medium was dyed dark blue, colorless zones were observed around the microorganisms capable of degrading starch and these bacteria were recorded as amylase positive (Hols et al., 1994; Al-Dhabi et al., 2020).

### Physiological, Biochemical and Morphological Characterization of *Bacillus* strains

In order to carry out the physiological, biochemical and morphological characterization of the enzyme producer *Bacillus* strains, features such as endospore formation, colony color, catalase activity, gram stain and motility etc. were determined (Table 1 and figure 1d) (Harley and Prescott, 2002; Whitman et al., 2012).

### Isolation of Total Genomic DNA and PCR amplification of 16S rDNA

Total genomic DNA extraction procedures was modified from Wilson (2001). The isolated DNA pellets were dissolved 100 mL of TE buffer and stored at -20 °C until being used (Figure 2a). Before the amplification process, in order to perform the reaction, a 50 µl master mix was prepared for each sample. For this purpose, 2 µL of extracted genomic DNA was added to 48 µL of mastermix for the PCR reaction mixture (Figure 2b). Universal primers 27F and 1492R were used in this amplification process. PCR amplification process of 16S rRNA was carried out with small modification described by Bayram (2021). Then, the 16S rRNA nucleotide sequence analysis results of these *Bacillus* strains were determined (Macrogen, Korea). The nucleotide sequences of the 16S rRNA amplicons were subjected to BLAST analysis with the NCBI GenBank® database. The sequence analysis results of these *Bacillus* strains have been deposited in GenBank® Data Library (Table 1).

## RESULTS AND DISCUSSION

*Bacillus* are endospore-forming, gram-positive, rod shape aerobic bacteria and this genus are known as a one of the most important industrial enzyme sources (Gordon et al., 1973; Turnbull et al., 1991; Nicholson, 2002; Merghni et al., 2014). In this study, it has been investigated xylanase cellulase and amylase enzyme activities of alkalophil and alkaline-tolerant *Bacillus* strains isolated from different origins (Figure 1). Among the isolated strains, 10 strains were observed to have enzyme activity in terms of cellulase, xylanase and amylase enzymes, and these strains were selected for 16S rDNA sequence analysis. Sequence analysis results are given in table 1.

It is seen that there are numerous studies in the literature about industrial enzyme production with the use of microorganisms (Adrio and Demain, 2014; Singh et al., 2016; Naureen, 2021). In a study conducted by Ariffin et al., (2014) the cellulase enzyme production potential of the local isolate *Bacillus pumilus* EB3 was evaluated (Ariffin et al., 2014). In that study, after determining the enzyme activity qualitatively, the cellulase enzyme was purified and characterized by anion exchange chromatography. It has been stated by the researchers that the purified carboxymethyl cellulase enzyme had a molecular weight range of 30-65 kDa and the optimum temperature is 60 °C and the optimum pH value is 6.0.

In a study conducted by Thite et al., (2020) different agrowaste biomasses such as wheat bran and citrus peel were used as fermentation substrates. In this study, the xylanolytic and pectinolytic enzyme activities of *Bacillus safensis* M35 and *Bacillus altitudinis* J208 strains were evaluated by the Central Composite Design of Response Surface Method. As a result of these assays, the content of optimized production medium (OPM) was determined as 1.57% wheat bran and 1.26% citrus peel. Xylanolytic and pectinolytic enzyme activities for *Bacillus safensis* M35 strain were determined as 15.10 U and 411.58 U, respectively.

**Table 1.** Physiological, biochemical and morphological and molecular characterization results of *Bacillus* strains

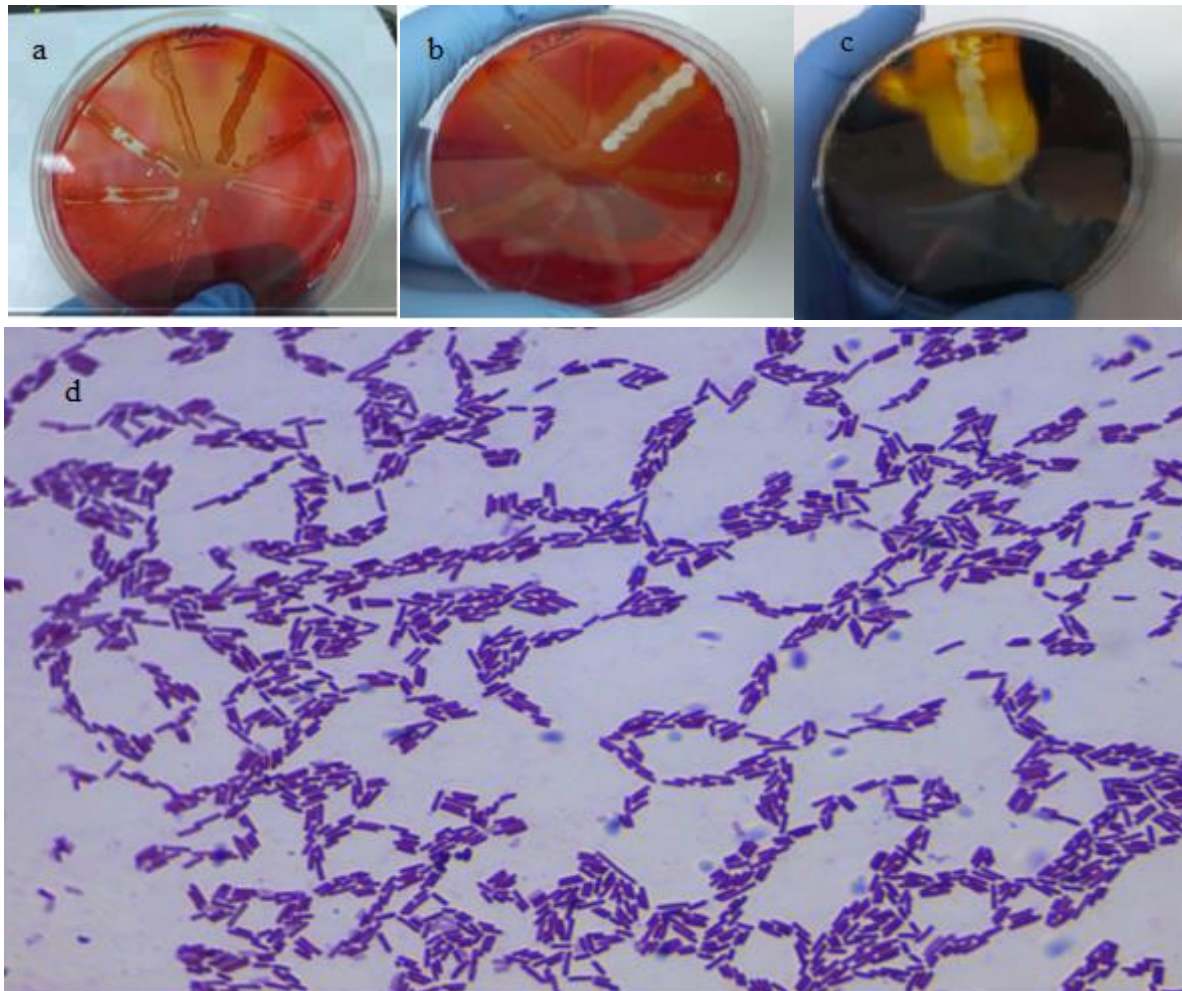
No	Strain	Species	Morphology	Gram Stain	Catalase	Endospore formation		Accession Number	Enzyme Activity
						Formation	Location		
1	SB57	<i>B. pumilus</i>	Rod-shaped	Gram +	Catalase +	+	Subterminal	KT371465	Xylanase
2	SB104	<i>B. pumilus</i>	Rod-shaped	Gram +	Catalase +	+	Subterminal	KT371466	Cellulase
3	SB118	<i>B. safensis</i>	Rod-shaped	Gram +	Catalase +	+	Terminal	KT371467	Xylanase
4	SB120	<i>B. aerius</i>	Rod-shaped	Gram +	Catalase +	+	Terminal	KT371468	Cellulase
5	SB138	<i>B. safensis</i>	Rod-shaped	Gram +	Catalase +	+	Subterminal	KT371469	Cellulase
6	SB147	<i>B. licheniformis</i>	Rod-shaped	Gram +	Catalase +	+	Terminal	KT371470	Cellulase
7	SB155	<i>B. pumilus</i>	Rod-shaped	Gram +	Catalase +	+	Subterminal	KT371471	Amylase
8	SB178	<i>B. pumilus</i>	Rod-shaped	Gram +	Catalase +	+	Subterminal	KT371472	Amylase
9	SB197	<i>B. pumilus</i>	Rod-shaped	Gram +	Catalase +	+	Subterminal	KT371473	Cellulase
10	SB199	<i>B. pumilus</i>	Rod-shaped	Gram +	Catalase +	+	Subterminal	KT371474	Xylanase

In a study performed by Nelson et al., (2021), the cellulolytic capacities of *Bacillus* strains isolated from the intestinal flora of *Schistocerca gregaria* were investigated. The cellulase enzyme activities of these isolated bacteria were determined by zone clearance assay, and the Index Cellulolytic Activity values (ICA values) of *Bacillus safensis* strain MED1 and *Bacillus safensis* strain CACO strains were determined as  $1.146 \pm 0.109$  and  $0.8442 \pm 0.09203$ , respectively.

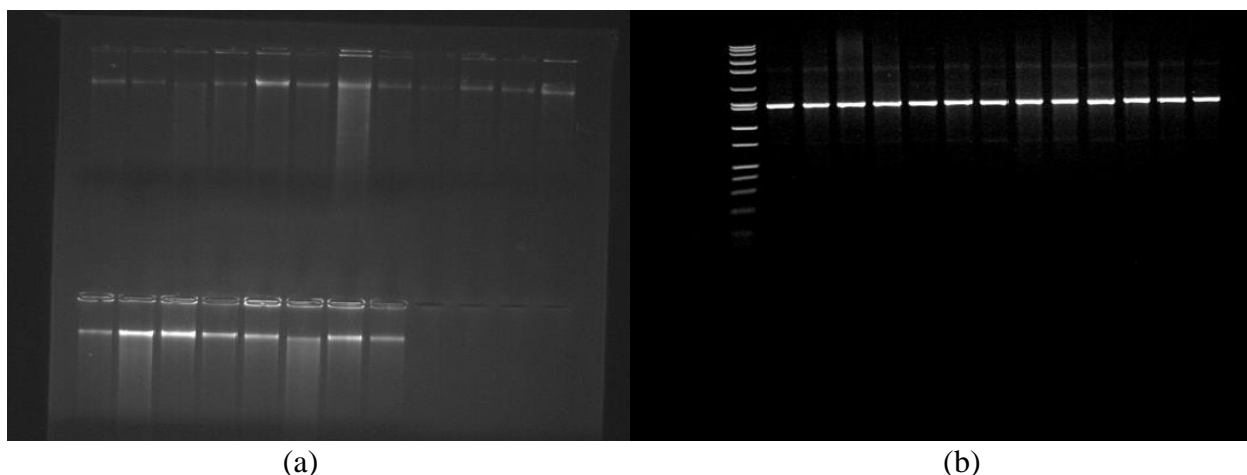
In another study conducted by Yoon et al., (2014), it was aimed to isolation and identification of xylanolytic bacteria from *Ceratotherium simum* feces. It has been stated that *Bacillus pumilus* H10-1 strain had the highest xylanase activity among isolated 67 strains and the optimum conditions are pH 9 at 30°C and the incubation period is 7 days (Yoon et al., 2014).

In addition, in a study conducted by Ayansina et al., (2017) amylase enzyme activities of microorganisms isolated from Cassava shells were determined and the amylase enzyme partially purified from these isolated microorganisms was characterized. In that study, compared to other microorganisms, *Bacillus pumilus* was found to have the highest amylase enzyme activity (44.6 units mL<sup>-1</sup> on day 3).

In addition to these studies, cellulase enzyme activities of thermophilic bacteria isolated from West Coast hot spring in Rat-nagiri District of Maharashtra (India) were determined by Shajahan et al., (2017). In that study, optimal conditions were determined for *Bacillus licheniformis* NCIM5556 strain using the response surface methodology (RSM) and it was reported that the highest cellulase enzyme production in a 7 L volume fermentor was determined as 42.99 IU mL<sup>-1</sup> (Shajahan et al., 2017).



**Figure 1.** Qualitative determination of bacterial cellulase (a), xylanase (b) amylase (c) enzyme activities and immersion image of a *Bacillus* strain (d)



**Figure 2.** Agarose gel electrophoresis image of genomic DNA (a) and agarose gel electrophoresis image of 16S rDNA (b)

## CONCLUSION

In this presented study, isolated alkaliphil and alkalitolerant *Bacillus* strains from various sources such as soil and decaying vegetation have been evaluated for cellulase, xylanase and amylase enzyme activity. In this way, industrial enzyme production potentials (cellulase, xylanase and amylase) of these *Bacillus* strains were qualitatively evaluated. During these processes, it was aimed to find versatile polysaccharide degrading alkali-tolerant or alkaliphilic *Bacillus* strains. Enzyme activities were evaluated qualitatively and the bacterial strains observed in the largest zone were selected for 16S rDNA sequence analysis. Among these strains, 6 *Bacillus pumilus*, 2 *Bacillus safensis*, 1 *Bacillus licheniformis* and 1 *Bacillus aerius* were identified. The obtained results were evaluated and among these isolated strains, no strain was found showing high activity in terms of two or more enzymes. Finally, sequence analysis results of these strains have been deposited in NCBI GenBank® Data Library under accession number KT371465 - KT371474 respectively. Following this study, it is planned to partial purification of these enzymes, determining the molecular weights and determine the stability against parameters such as pH and temperature in future studies.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study is a part of PhD dissertation written by Sinan BAYRAM (Doctoral Programme of Atatürk University, Science Institute, Erzurum).

## Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

## Author's Contributions

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

## REFERENCES

- Adrio JL, Demain AL, 2014. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1): 117-139.
- Aehle W, 2007. *Enzymes in industry: production and applications*. John Wiley & Sons. Hoboken, NJ, USA.
- Al-Dhabi NA, Esmail GA, Ghilan AKM, Arasu MV, Duraipandiyani V, Ponmurugan K, 2020. Isolation and purification of starch hydrolysing amylase from *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-46 obtained from the Jazan region of Saudi Arabia with industrial applications. *Journal of King Saud University-Science*, 32(1): 1226-1232.
- Ariffin H, Abdullah N, Umi-Kalsom MS, Shirai Y, Hassan, MA, 2006. Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. *International Journal of Engineering Technologies*, 3(1): 47-53.
- Ayansina ADV, Adelaja AO, Mohammed SSD, 2017. Characterization of amylase from some *Aspergillus* and *Bacillus* species associated with cassava waste peels. *Advances in Microbiology*, 7(04): 80.
- Barsby TL, Donald AM, Frazier PJ, 2001. *Starch: Advances in structure and function*. Royal Society of Chemistry. Cambridge. UK.
- Bayram S, 2021. Production, purification, and characterization of *Streptomyces* sp. strain MPPS2 extracellular pyomelanin pigment. *Archives of Microbiology*, 203: 4419–4426 <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02437-w>
- Beg Q, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS, 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(3-4): 326-338.
- Bhat MK, 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology advances*, 18(5): 355-383.
- Bozoglu C, Hundur S, Alaylar B, Karadayi M, Gulluce M, 2015. Isolation and Molecular Characterization of Thermophilic Bacteria with Xylanase Activity from Thermal Springs in Erzurum. *Journal of Life Sciences and Technologies*, 3(1): 32-36

- Chen CC, Ko TP, Huang JW, Guo RT, 2015. Heat-and Alkaline-Stable Xylanases: Application, Protein Structure and Engineering. *ChemBioEng Reviews*, 2(2): 95-106.
- Cherry JR, Fidantsef AL, 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current opinion in biotechnology*, 14(4): 438-443.
- Collins T, Gerday C, Feller G, 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS microbiology reviews*, 29(1): 3-23.
- Coughlan MP, 1985. Cellulose hydrolysis: the potential, the problems and relevant research at Galway. *Biochemical Society Transactions*, 13 (2): 405–406. <https://doi.org/10.1042/bst0130405>
- Debarati H, Paswan KA, Abhik C, Ethina B, Malini B, 2014. Characterization and cell immobilization of a potent amylase producing mesophilic soil bacteria *Bacillus cereus* strain BRSC-S-A26MB. *Journal of Mycopathological Research*, 52(1): 11-19.
- Dutron A, Georis J, Genot B, Dauvrin T, Collins T, Hoyoux A, Feller G, 2012. Use of family 8 enzymes with xylanolytic activity in baking. Granted Patents US8192772 (2012), EP1549147B1 (2011), CN1681392B (2010), DE60336153 D1 (2011), CA 2498014C (2011), ES2360942 (2011), DE60336153D1 (2011) Gordon RE, Haynes WC, Pang CHN, 1973. The genus *Bacillus* (No. 427). Agricultural Research Service, US Department of Agriculture.
- Ghadiri E, Naghavi NS, Ghaedi K, 2021. Gene Production and Characterization of *Bacillus Subtilis* Cellulase Collected from Central-Northern Iran Forests. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 91: 543–548.
- Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B, 2003. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process biochemistry*, 38(11): 1599-1616.
- Hammed AM, Jaswir I, Amid A, Alam Z, Asiyani-H, TT, Ramli N, 2013. Enzymatic hydrolysis of plants and algae for extraction of bioactive compounds. *Food Reviews International*, 29(4): 352-370.
- Harley JP, Prescott LM, 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology*, 5th ed. New York: McGraw-Hill Press, p466.
- Hols P, Ferain T, Garmyn D, Bernard N, Delcour J, 1994. Use of homologous expression-secretion signals and vector-free stable chromosomal integration in engineering of *Lactobacillus plantarum* for alpha-amylase and levanase expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(5): 1401-1413.
- Horikoshi K, 1999. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63(4): 735-750.
- Kagan HM, Li W, 2003. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *Journal of cellular biochemistry*, 88(4):660-672.
- Kim JY, Hur SH, Hong JH, 2005. Purification and characterization of an alkaline cellulase from a newly isolated alkaliphilic *Bacillus sp.* HSH-810. *Biotechnology letters*, 27(5): 313-316.
- Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC, 2002. Industrial enzyme applications. *Current opinion in biotechnology*, 13(4): 345-351.
- Li X, Xu Q, Shen H, Guo Y, Wu M, Peng Y, Xie H, 2019. Capturing CO<sub>2</sub> to reversible ionic liquids for dissolution pretreatment of cellulose towards enhanced enzymatic hydrolysis. *Carbohydrate polymers*, 204: 50-58.
- Mathlouthi N, Juin H, Larbier M, 2003. Effect of xylanase and  $\beta$ -glucanase supplementation of wheat-or wheat-and barley-based diets on the performance of male turkeys. *British poultry science*, 44(2): 291-298.
- Merghni A, Leban N, Behi A, Bakhrouf A, 2014. Evaluation of the probiotic properties of *Bacillus spp.* strains isolated from Tunisian hypersaline environments. *African journal of microbiology research*, 8(4): 398-405.
- Mishra P, Mishra J, Dwivedi SK, Arora NK, 2020. Microbial Enzymes in Biocontrol of Phytopathogens. In *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries* (pp. 259-285). Springer, Singapore.
- Naureen I, 2021. A Review on Microbial Enzymes, Synthesis, Biological Role, Current Applications and Future Perspectives. *Scholars Bulletin*, 7(3): 44-48.
- Nelson K, Muge E, Wamalwa B, 2021. Cellulolytic *Bacillus* species isolated from the gut of the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Scientific African*, 11, e00665. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00665>

- Nicholson WL, 2002. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. Cellular and Molecular Life Sciences, 59(3): 410-416.
- Podrepšek GH, Knez Ž, Leitgeb M, 2019. Activation of cellulase cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) in scCO<sub>2</sub>. The Journal of Supercritical Fluids, 154: 104629.
- Polaina J, MacCabe AP, 2007. Industrial enzymes. (pp. 531-547). Dordrecht: Springer.
- Prade RA, 1995. Xylanases: from biology to biotechnology. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 13: 100–131.
- Reese ET, Mandels M, 1984. Rolling with the times: production and applications of *Trichoderma reesei* cellulase. In Annual reports on fermentation processes. 7: 1-20
- Saadat F, 2017. A review on chimeric xylanases: methods and conditions. 3 Biotech, 7(1): 67.
- Shajahan S, Moorthy IG, Sivakumar N, Selvakumar G, 2017. Statistical modeling and optimization of cellulase production by *Bacillus licheniformis* NCIM 5556 isolated from the hot spring, Maharashtra, India. Journal of King Saud University-Science, 29(3): 302-310.
- Sharma HSS, 1987. Enzymatic degradation of residual noncellulosic polysaccharides present on dew-retted flax fibers. Applied Microbiology and Biotechnology, 26: 2714–2723.
- Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK, 2016. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 Biotech, 6(2): 1-15. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>
- Taylor NG, 2007. Identification of cellulose synthase AtCesA7 (IRX3) in vivo phosphorylation sites—a potential role in regulating protein degradation. Plant molecular biology, 64(1): 161-171.
- Teather RM, Wood PJ, 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Applied and environmental microbiology, 43(4): 777-780.
- Thite VS, Nerurkar AS, Baxi NN, 2020. Optimization of concurrent production of xylanolytic and pectinolytic enzymes by *Bacillus safensis* M35 and *Bacillus altitudinis* J208 using agro-industrial biomass through Response Surface Methodology. Scientific reports, 10(1): 1-12.
- Turnbull PC, Kramer JM, Melling J, 1991. *Bacillus*. Manual of clinical microbiology, 5: 296-303.
- Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki KI, 2012. Bergey's manual of systematic bacteriology: The Actinobacteria. Springer. New York. USA
- Wilson, K. (2001). Preparation of genomic DNA from bacteria. Current protocols in molecular biology, 56(1): 2-4.
- Yoon YM, An GH, Kim JK, Ahn SH, Cha YL, Yang J, Choi IH. 2014. Xylanase activity of *Bacillus pumilus* H10-1 isolated from *Ceratotherium simum* feces. Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal, 29(5): 316-322.

**Atf İçin:** Berikten D, Hoşgün EZ, 2022. Ksiloz ve Gliserol Ortamlarında Çeşitli Mayaların Lipit Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 142-151.

**To Cite:** Berikten D, Hoşgün EZ, 2022. Determination of Lipid Production Capacities of Various Yeasts in Xylose and Glycerol Media. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 142-151.

## Ksiloz ve Gliserol Ortamlarında Çeşitli Mayaların Lipit Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi

Derya BERİKTEN<sup>1\*</sup>, Emir Zafer HOŞGÜN<sup>2</sup>

**ÖZET:** Biyodizel, fosil yakıtlara alternatif ve çevre dostu bir yakıt olarak dikkatleri üzerine çekmektedir. Biyodizelin, mikrobiyal yağlardan sürdürülebilir ve düşük maliyetli karbon kaynaklarının kullanılması ile daha ekonomik olarak üretilebileceği düşünülmektedir. Atık veya yan ürün olarak sıklıkla karşımıza çıkan gliserol ve ksiloz mikrobiyal lipitlerin düşük maliyetli üretimi için uygun karbon kaynakları arasında yer almaktadır. Bu çalışmada, yedi farklı maya türünden (*Rhodotorula mucilaginosa*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clavispora lusitaniae*, *Pichia fermentans*, *P. cactophila*, *Yarrowia lipolytica*) oluşan 12 maya izolatının tek karbon kaynağı olarak ksiloz veya gliserolü kullanma ve kimyasal olarak tanımlanmış bir ortamda lipit biriktirme yetenekleri karakterize edilmiştir. İzolatların tamamının test edilen üretim ortamlarında lipit üretme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak izolatlardan *Y. lipolytica* (%81.34) ve *P. fermentans* 1 (%79.11) ksiloz içeren fermentasyon ortamında, *P. fermentans* 2 (%98.90) ve *Y. lipolytica* (%94.62) ise gliserol içeren fermentasyon ortamında en yüksek lipit miktarı elde edilen türlerdir. Her iki üretim ortamında da lipit miktarında en yüksek sonuçlar *Y. lipolytica* izolatı ile elde edilmiştir. Sonuçlar, tüm izolatların gliserol ve ksiloz üzerinde büyüme kabiliyetine sahip olduğunu ve özellikle *Y. lipolytica*'nın ikinci nesil biyodizel üretimi için kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Maya, lipit, ksiloz, gliserol, fermentasyon, biyodizel

### Determination of Lipid Production Capacities of Various Yeasts in Xylose and Glycerol Media

**ABSTRACT:** Biodiesel attracts attention as an alternative and environmentally friendly fuel to fossil fuels. It is thought that biodiesel can be produced more economically by using sustainable and low-cost carbon sources from microbial oils. Glycerol and xylose, which are frequently encountered as waste materials or by-products, are suitable carbon sources for the low-cost production of microbial lipids. 12 yeast isolates from seven yeast species (*Rhodotorula mucilaginosa*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clavispora lusitaniae*, *Pichia fermentans*, *P. cactophila*, *Yarrowia lipolytica*) were characterized for their ability to use xylose or glycerol as the sole carbon source and to accumulate lipid in a chemically defined medium. All of the isolates were found to be capable of producing lipids in the production mediums tested. However, *Y. lipolytica* (81.34%) and *P. fermentans* 1 (79.11%) of the isolates are the species with the highest lipid content in fermentation medium containing xylose, and *P. fermentans* 2 (98.90%) and *Y. lipolytica* (94.62%) in fermentation medium containing glycerol. obtained species. In both production media, the highest results in lipid content were obtained with *Y. lipolytica* isolate. The results showed that all isolates have the ability to grow on glycerol and xylose, and especially *Y. lipolytica* has the potential to be used for second generation biodiesel production.

**Keywords:** Yeast, lipid, xylose, glycerol, fermentation, biodiesel

<sup>1</sup> Derya BERİKTEN ([Orcid ID: 0000-0002-8672-4813](https://orcid.org/0000-0002-8672-4813)), Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Uygulama ve Araştırma Merkezi, Kütahya, Türkiye

<sup>2</sup> Emir Zafer HOŞGÜN ([Orcid ID: 0000-0002-3810-701X](https://orcid.org/0000-0002-3810-701X)), Eskişehir Teknik Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Eskişehir, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Derya BERİKTEN, e-mail: derya.berikten@ksbu.edu.tr



## GİRİŞ

Biyodizel, düşük toksisitesi, biyolojik olarak parçalanabilirliği ve motorlu taşıtlarda kullanıldığında egzoz gazında düşük konsantrasyonlarda küçük partikül madde ve SO<sub>2</sub> içermemesi nedeniyle alternatif ve çevre dostu bir yakıt olarak dikkatleri üzerine çekmiştir (Areesirisuk ve ark., 2015). Biyodizel üretmek için çeşitli mikrobiyal yağlar kullanılabilir. Günümüzde biyodizel, genellikle bitkisel yağlarda bulunan triaçilgliseridlerden (TAG'ler) üretilmektedir. Biyodizel, mikrobiyal yağlardan sürdürülebilir ve daha ekonomik olarak üretilirse, fosil yakıtların yerini daha kolay alabileceği düşünülmektedir (Thanapimmetha ve ark., 2019).

Bir yağ asidi bileşimi olan mikrobiyal lipitler, birinci nesil biyodizel üretimi için alternatif bir hammadde kaynağıdır (Chang ve ark., 2013). Heterojen mikroorganizmalar grubu olan lipit üreten mikroorganizmalara örnek olarak algler, bakteriler, küfler ve mayalar verilebilir. Lipit üretiminde küfler ve mayalar, farklı karbon kaynaklarından beslenebildikleri ve büyüme sürelerinin kısa olması nedeniyle bu mikroorganizmalar arasında yaygın olarak tercih edilmektedir (Ma ve ark., 2018). Karmaşık kimyasal bileşime sahip lipitlerin kimyasal bileşimleri, mikrobiyal türlere ve büyüme koşullarına bağlıdır. Palmitik, stearik, oleik ve linoleik asitler, mikrobiyal lipitlerde bulunan tipik yağ asitleridir (Doan ve ark., 2021).

Mikrobiyal lipitlerin üretimi için düşük maliyetli karbon kaynaklarının kullanılması, üretim maliyetin düşürülmesi açısından önemlidir. Bu sayede yenilenebilir enerji üretimi, fosil yakıt üretimi ile rekabet edebilir hale gelebilecektir (Hashem ve ark., 2021). Son yıllarda lignoselülozik biyorafineri sayısının artmasıyla birlikte mikrobiyal lipit üretimi için lignoselülozik hidrolizatlar, ham gliserol, melas, atık pişirme yağı, atık su ve hayvan veya bitki yemi atıkları gibi düşük maliyetli substratların değerlendirilmesi önem kazanmıştır (Díaz-Fernández et al 2019). Ayrıca, biyo-dizel ve oleokimyasal üretim tesisleri ile biyo-etanol ve/veya alkollü içecek üretim tesisleri tarafından önemli miktarlarda gliserol içeren su atık olarak üretilebilmektedir. Bu nedenle, ham gliserol, miktarı giderek artan, ilgi çekici bir endüstriyel atık haline gelmiştir (Diamantopoulou ve ark., 2020). Ksiloz ve glikoz doğal ortamlarda yaygın olarak bulunan, lignoselülozik biyokütlenin ve yenilenebilir hammadde kaynağı olan selüloz ile hemiselülozun hidrolizi sonucu açığa çıkan temel şekerlerdir. Ayrıca, bu şekerler düşük maliyetli olmaları nedeniyle sıvı yakıt üretimi için alternatif hammadde kaynağıdır. Şekerleri lipitlere dönüştürmek için düşük maliyetli işlemler tercih edilmektedir (Yamada ve ark., 2017). Bu karbonhidratlar, topraktan veya diğer doğal kaynaklardan izole edilen yağ üreticisi mayalar tarafından fermente edilerek bileşimi bitkisel yağ benzeyen ve biyodizele dönüştürülebilir bazı mikrobiyal yağları üretmek için kullanılabilirler (Pan ve ark., 2009; Li ve ark., 2011).

Son yıllarda, genetik stabilite, çevresel adaptasyon ve özel biyoteknolojik nitelikler gibi önemli özelliklere sahip olmalarından dolayı lipit üretimi de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik üretim süreçlerinde farklı ortamlardan izole edilen yeni mayalara olan ilgi önemli ölçüde artmıştır (Maina ve ark., 2017; Filippousi ve ark., 2019). Ayrıca bu yabancı tip mayalarla çeşitli fermantasyon süreçlerinde elde edilen ilginç sonuçlar (Berikten ve ark., 2021; Filippousi ve ark., 2019; Taccari ve ark., 2012), yeni izole edilen mayalarla yapılan tarama çalışmalarının lipit üretimi açısından çok önemli olduğunu düşündürmektedir. Son birkaç yılda, lipit üreticisi mayalar tarafından gliserol veya ksilozdan lipit birikimine odaklanan makaleler yayınlanmıştır (Diamantopoulou ve ark., 2020; Díaz-Fernández ve ark., 2019; Yamada ve ark., 2017; Sriwongchai ve ark., 2013), ancak yeni izole edilmiş yağ üreticisi maya türlerinin bu iki substratta karşılaştırmalı taramasına ilişkin sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmada, biyodizel endüstrisinin bir yan ürünü olan gliserol ve lignoselülozik biyorafineri yan ürünü olan ksilozun biyodizel üretiminde kullanılabilirliğinin artırılmasına yönelik olarak bu ucuz karbon

kaynaklarını metabolize ederek lipit üretme potansiyeli olan yeni türlerin tespit edilmesi için yabancı tip mayaların taranması ve lipit üretimlerinin karakterizasyonu amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Mikroorganizmalar

Bu çalışmada çeşitli boza örneklerinden izole edilmiş olan ve önceki bir çalışmamızda (Berikten ve ark., 2021) ITS ve 26S rDNA'nın D1/D2 bölgelerinin dizilenmesi yoluyla tanımlanan 12 maya izolatu (*Rhodotorula mucilaginosa* 1-2-3-4, *Wickerhamomyces anomalus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clavispora lusitaniae*, *Pichia fermentans* 1-2-3, *Pichia cactophila*, *Yarrowia lipolytica*) kullanılmıştır.

### Mayaların gliserol ve ksiloz ortamında yağ üretim potansiyellerinin taranması

Maya izolatları, Sudan Black B boyama tekniği (Kitcha ve Cheirsilp, 2011) ile kalitatif analiz yoluyla tek karbon kaynağı olarak gliserol veya ksiloz içeren katı besiyerinde gelişen kolonilerinden lipit üretme yetenekleri açısından taranmıştır. Taze maya kültürleri, gliserol petripleri [g/L. Yeast nitrogen base amino asitler, ammonium sulfate içermeyen (YNB w/o aa-AS) - 1.67, gliserol - 50, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> - 5, agar - 20] (Sriwongchai ve ark., 2013) ve ksiloz petripleri [g/L: ksiloz - 20, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O -0.5, yeast extract - 0.5, Agar - 20] (Pan ve ark., 2009) üzerine bir öze dolusu ekilmiştir. Petri kapları 30 °C'de iki gün inkübe edildikten sonra her iki ortamda büyüyen maya kültürlerinden hazırlanan preparatlar Sudan Black B tekniği ile boyanmıştır. Hazırlanan preparatlar, faz kontrast mikroskopunda 100X'lik objektif altında incelenmiştir. Hücre içinde mavi veya grimsi renkli lipit globüllerinin varlığı pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Pozitif sonuç alınan maya suşları lipit üretimi için kullanılmıştır.

### Lipit üretimi

İnokulum kültür, Yeast Ekstrakt Pepton Dekstroz (YPD) agar üzerindeki geliştirilen maya kolonilerden bir öze dolusu hücre alınıp 125 ml YPD broth'a (inokulum ortamı) aktarılacak ve 150 rpm, 28 °C'de 72 saat inkübe edilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan inokulum kültürlerinden 1 mL, gliserol fermentasyon ortamı [g/L. Yeast nitrogen base amino asitler, ammonium sulfate içermeyen (YNB w/o aa-AS) - 1.67, gliserol - 50, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> - 5] (Sriwongchai ve ark., 2013) ve ksiloz fermentasyon ortamı [g/L: ksiloz - 40, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O -0.5, yeast extract - 0.5] (Pan ve ark., 2009) olarak hazırlanan 50 şer mL'lik ortamlara ilave edilmiştir. Karışımlar 28 °C'de 180 rpm'de çalkalanarak 4 gün boyunca inkübe edilmiştir. Deneylerde kullanılan tüm kimyasallar Merck Millipore'dan satın alınmıştır. Hücre kuru ağırlığı, lipit ekstraksiyonu ile lipit kuru ağırlığı ve fermentasyon sonrasında besiyerinde kalan gliserol ve ksiloz konsantrasyonu tayini aşağıdaki yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Tüm deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

### Maya kuru ağırlığının belirlenmesi

Kültürlerin 2 mL'si 5000xg'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pelet iki kez 5 mL distile su ile yıkanmıştır ve 60 °C'de sabit ağırlığa gelene kadar (yaklaşık olarak 24 saat) kurutulmuştur. Kuru hücre ağırlığı gravimetrik olarak belirlenmiştir (Pan ve ark., 2009).

### Lipit bileşiklerinin ekstraksiyonu

Toplam lipitler, tam lipit ekstraksiyonuna izin veren hızlı bir prosedür ile elde edilmiştir. 50 mL hücre kültürleri 5000xg'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Maya peletleri iki kez distile su ile yıkandıktan sonra, içerisine 10 mL 4 M HCl ilave edilerek 60 °C'de 1-2 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra asitle hidrolize edilmiş maya peletleri, 20 mL kloroform/metanol solüsyonu (1:1) ile oda sıcaklığında 2-3 saat karıştırılmıştır. Karışımlar, sulu ve organik fazları ayırmak için 2000xg'de 5 dakika santrifüjlenmiştir.

Lipitleri içeren alt fazlar, bir pastör pipeti ile alınarak kurumaya bırakılmıştır. Kuru lipit ağırlığı gravimetrik olarak belirlenmiştir (Pan ve ark., 2009).

### **Gliserol ve ksiloz konsantrasyonunun belirlenmesi ve lipit üretim parametrelerinin hesaplanması**

Kültür ortamındaki kalan gliserol ve ksiloz konsantrasyonu yüksek basınç sıvı kromatografi (HPLC) yöntemi ile miktarlarının belirlenmesi çalışmalarında dörtlü pompa, refraktif indeks dedektör, otomatik enjeksiyon ünitesi ve kolon fırınından oluşan Agilent 1100 serisi HPLC sistemi kullanılmıştır. Analizler 60 °C de Aminex HPX 87H kolonda (300 mm x 7.8 mm, Biorad, Hercules/USA) gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon hacmi 20 µL dir. Hareketli faz olarak 0,6 mL/dk akış hızında 0.005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kullanılmıştır. Analiz süresi toplam 60 dakikadır. Gliserol (Sigma Aldrich, %99) standardı 0.2-8 mg/mL derişim aralığında, ksiloz (Sigma Aldrich, %99) standardı ise 0.2-4 mg/mL derişim aralığında hazırlanarak kalibrasyon doğruları hazırlanmış ve bu kalibrasyon doğrularına bağlı olarak örneklerin gliserol ve ksiloz derişimleri hesaplanmıştır (Sluiter ve ark., 2008).

Besiyerinde kullanılmadan kalan ksiloz ve gliserol miktarları kullanılarak mikroorganizmaların metabolize ettikleri ksiloz ve gliserol miktarları hesaplanmıştır. Biyokütle (g/L) ve lipit miktarı (g/L) ile bu sonuçlar kullanılarak lipit yüzdeleri hesaplanmıştır. Lipit miktarı (g/L)x1 g gliserol/ kalan gliserol miktarı (g/L) ve lipit miktarı (g/L)x1 g ksiloz/ kalan ksiloz miktarı (g/L) kullanılarak lipit verimi hesaplanmıştır.

### **İstatiksel Analiz**

Mikrobiyal lipit üretiminde yapılan analizlerin sonuçları en az üç deneyin ortalaması olarak ve standart sapmaları (±) ile birlikte verilmiştir. Yöntemlerin ve uygulanan proseslerin karşılaştırılmasında alınan verilere, Statgraphics 3.1 istatistik programı kullanılarak tekyönlü ANOVA testi uygulanmış ve gruplar arasındaki farklılıkların anlamlılık testleri,  $\alpha=0.95$  güven aralığında en küçük anlamlı fark (Least Significant Differences) testi uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

## **BULGULAR VE TARTIŞMA**

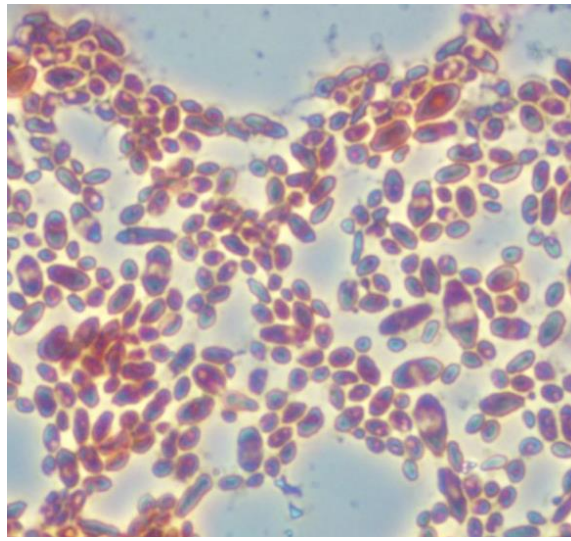
### **Yağ üreticisi mayaların belirlenmesi**

Maya izolatları gliserol ve ksiloz içeren katı besiyeri ortamda geliştirildikten sonra ve lipit üreten türlerin seçilmesi için Sudan Black B boyaması yapılmıştır. Sudan Black B boyaması sonucunda (Şekil 1) test edilen 12 maya izolatının tamamının her iki ortamda da lipit ürettikleri belirlenmiştir (Çizelge 1). Gerçekleştirilen boyama yöntemine göre *Rhodotorula mucilaginosa* 2 ksiloz ortamı için *Pichia fermentans* 3 ve *Yarrowia lipolytica* ise gliserol ortamı için hücreleri içerisinde en çok lipit damlası gözlenen türler olarak belirlenmiştir. Bu teknik, hücresel lipit içeriği hakkında kesin bir bilgi vermese de kısmen test edilen maya kolonilerinin lipit biriktirme yeteneği hakkında hızlı bir şekilde fikir sahibi olunmasını sağlamaktadır. Kitcha ve Cheirsilp (2011) yapmış oldukları çalışmada 889 adet maya izolatının lipit üretim yeteneğine sahip olup olmadıklarını Sudan Black B boyaması ile belirlemişler ve 23 izolatın potansiyel lipit üreticisi olduklarını ortaya koyarak bizim çalışmamızda olduğu gibi hızlı bir tarama gerçekleştirmişlerdir.

**Çizelge 1.** Sudan Black B boyama ile lipit üretiminin değerlendirilmesi

Maya türü	Yağ damlaları/Ksiloz ortamı	Yağ damlaları/Gliserol ortamı
<i>Pichia fermentans</i> 1	++	+
<i>Pichia fermentans</i> 2	+/-	++
<i>Pichia fermentans</i> 3	++	+++
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 1	++	++
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 2	+++	++
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 3	+	+
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 4	+	++
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	+/-	+
<i>Clavispora lusitaniae</i>	++	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+
<i>Yarrowia lipolytica</i>	+	+++
<i>Pichia cactophila</i>	+	++

(Not: hücre içerisindeki yağ damlalarının yoğunluğu +/- nadir, + sınırlı, ++ az yoğun, +++ çok yoğun)

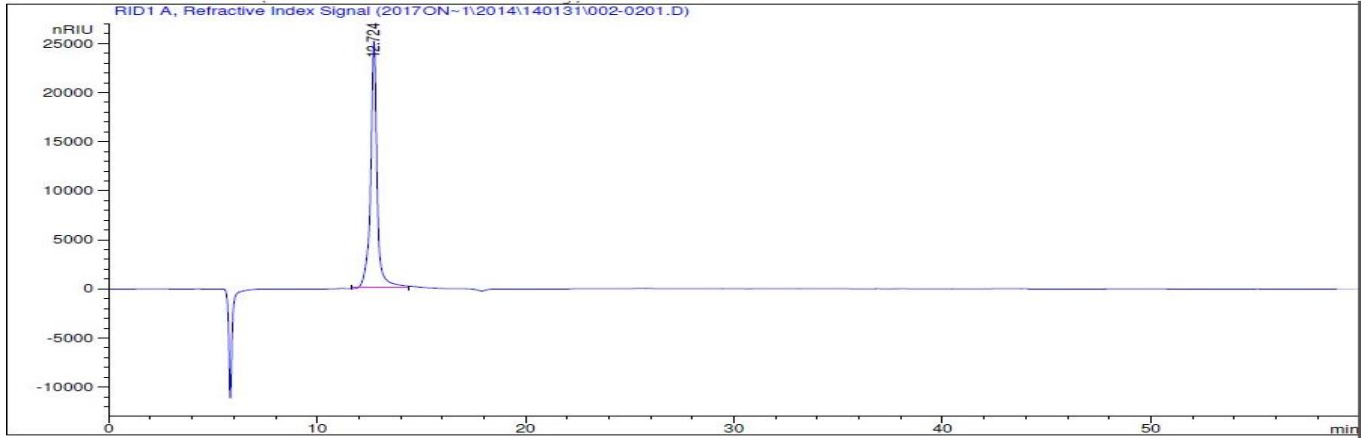


**Şekil 1.** *Pichia cactophila*'nın gliserol ortamında lipit üretiminin Sudan Black B boyama ile mikroskopik görüntüsü [Faz kontrast mikroskobu (Nikon Eclipse 80i) ve immersiyon objektifi (100x)]

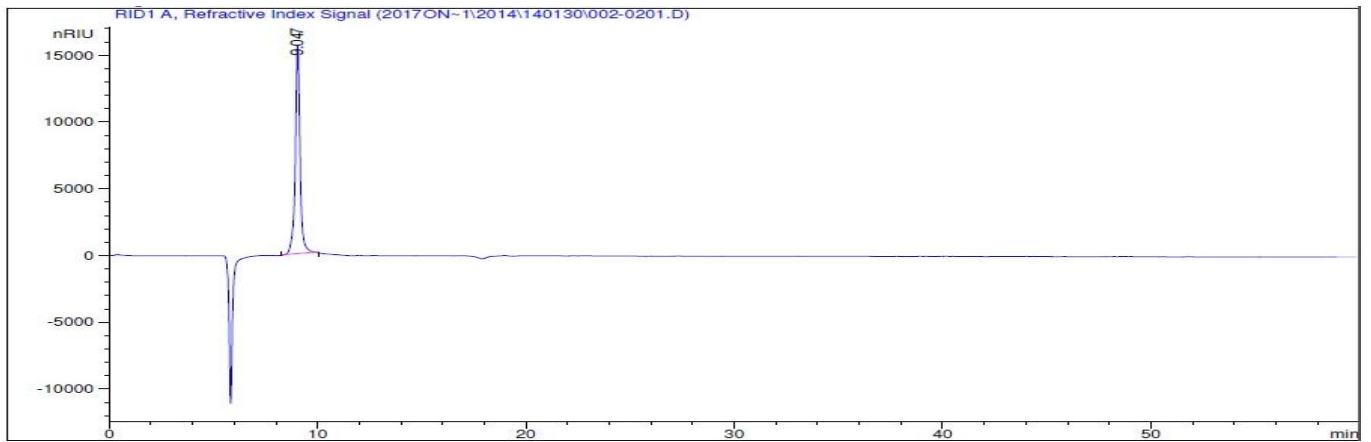
### Lipit üretiminin değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan 12 maya izolatının lipit taraması ile tamamının her iki ortamda da lipit ürettiklerinin belirlenmesi sonucunda lipit üretiminin karakterizasyonu için fermantasyon ortamlarına gelişimleri ile hazırlanmış olan hücreler kullanılarak lipit ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Her bir maya kültürü iki farklı besiyeri ortamından elde edilen hücrelerin biyokütleleri, lipit yüzdeleri, lipit içeriği ve lipit verimi dahil olmak üzere Çizelge 2-3'te listelenen bir dizi parametre için karakterize edilmiştir.

Lipit üretimi sonrasında hücrelerin ayrılması neticesinde arta kalan besiyeri numunelerinde kalan gliserolün ve ksilozun analizi NREL metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Gliserol ve ksiloz standartları için elde edilen HPLC kromatogramları ve kalibrasyon denklemleri Şekil 2 ve 3'te verilmiştir. HPLC ile elde edilen sonuçlara göre besiyeri içerisinde mikroorganizmaların metabolize etmedikleri ksiloz ve gliserol miktarları belirlenmiştir. Mikroorganizmaların kullandıkları ksiloz ve gliserol miktarı, lipit kuru ağırlığı ve maya kuru ağırlıkları kullanılarak hesaplamalar yapılmış ve Çizelge 2'de ksiloz fermantasyon ortamında, Çizelge 3'te ise gliserol fermantasyon ortamında üretilen tüm suşların biyokütle ve lipit karakterizasyon parametreleri verilmiştir.



**Şekil 2.** Gliserol standartı için HPLC kromatogramı (Gliserol RT=12.7, kalibrasyon denklemi  $y=199317x - 7851$ )



**Şekil 3.** Ksiloz standartı için HPLC kromatogramı (Ksiloz RT=9.05, kalibrasyon denklemi  $y=229300x - 3288$ )

Lignoselülozik malzemelerin hidrolizinin birincil bileşeni olan ksilozun lipit üretiminde kullanımı, ksilozun tam olarak metabolize edilememesinden dolayı araştırılması devam eden önemli bir sorun haline gelmiştir. Yağ üreticisi mayalar, ksiloz ve glikozu aynı anda kullanabildikleri için endüstriyel uygulamalarda önemli beklentilere sahiptirler (Pan ve ark., 2009). İzolatlardan *Yarrowia lipolytica* (%81.34) ve *Pichia fermentans* 1 (%79.11) ksiloz içeren fermentasyon ortamında en yüksek lipit yüzdesi elde edilen türlerdir. Tarama ile lipit üretimleri belirlenen 12 maya izolatından ksiloz fermentasyon ortamında az veya çok lipit eldesinin gerçekleştirilmiş olması taramanın doğruluğunun göstergesidir. *Yarrowia lipolytica* 'dan %81.34 ile en yüksek lipit içeriği elde edilirken *Pichia fermentans* 2'den 0.84 g/L olarak en yüksek lipit verimi belirlenmiştir.

Dört günlük inkübasyon sonrasında besiyerinde kullanılmadan kalan ksiloz analizi yapılmıştır ve analiz sonucu çoğu mikroorganizmanın besiyerine ilave edilmiş olan ksilozun çok az kısmını kullanabildiklerini göstermiştir (Çizelge 2). Yalnızca *Clavispora lusitaniae* besiyerine konulan ksilozun büyük bir bölümünü (34.84g/L) kullanmıştır. Ancak, kullanılan ksilozu lipitlere dönüştürmede yüksek bir oran (%7.69) elde edilememiştir. İleride ksiloz ortamında lipit üretimi için seçilecek olan mayalarda yapılacak optimizasyon çalışmaları ile ksiloz kullanım oranının artırılabilirliği düşünülmektedir. Bunun yanında besiyeri ortamında fermentasyon sonrasında karbon kaynağının kalmış olması hücrel lipitlerin lipit dışı yapıların sentezinde henüz kullanılmadığını da göstermektedir (Fakas ve ark., 2007). Lipit katsayısına bakıldığında *Pichia fermentans* 1'in 0.79 g /g ksiloz ile en yüksek 1 g ksiloz başına üretilen lipit miktarını verdiği görülmüştür. Bu miktar benzer 20 yağ üreticisi mayanın ksiloz üzerindeki lipit

üretimlerinin karakterize edildiği bir çalışmada en yüksek lipit kat sayısı olarak elde edilen 0.15 g/g ksiloz miktarının oldukça üzerindedir (Pan ve ark., 2009).

12 izolattan *Pichia fermentans* 2 (%98.90) ve *Yarrowia lipolytica* (%94.62) gliserol içeren fermentasyon ortamında en yüksek lipit katsayısı ile yüksek lipit yüzde değeri elde edilen türlerdir. Çizelge 3, gliserol fermentasyon ortamında üretilen tüm suşların biyokütle ve lipit verim parametrelerini göstermektedir. Tarama ile lipit üretimleri belirlenen 12 maya izolatından elde edilen en düşük lipit yüzdesinin (%19.18) olması taramanın doğruluğunun göstergesidir. *Pichia fermentans* 2 'nin %98.90 lipit içeriği ve 12,86 g/L lipit verimi (12 g/L biyokütle) verdiği belirlenmiştir. Gliserol ortamında yüksek lipit birikimi ve ayrıca yüksek lipit verimi, atık ham gliserol ile yapılacak lipit üretim çalışmalarında *Pichia fermentans* 2'nin kullanılabilirliğini göstermiştir.

Gliserolden lipit üretiminde çalışmada test edilen mayaların kullanılabilirliğini göstermek için, çalışmanın lipit üretim sonuçları ile tek karbon kaynağı olarak ham gliserol kullanan diğer mikroorganizmalar karşılaştırılmıştır. *Yarrowia lipolytica* ATCC 20460'ın fermentasyondan sonra biyokütlesi, lipit içeriği ve lipit miktarı sırasıyla 11.6 g/L, %31 ve 3.6 g/L olarak belirlenmiştir (Sestric ve ark., 2014). Fermentasyondan sonra *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509'un biyokütlesi, lipit içeriği ve lipit miktarı sırasıyla 29.2 g/L, %26.0 ve 7.7 g/L olmuştur (Leiva-Candia ve ark., 2015). *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159'un biyokütlesi, lipit içeriği, lipit miktarı ve lipit verimi sırasıyla 8.17 g/L, %53, 4.3 g/L ve %7 dir (Saenge ve ark., 2011). 8 günlük fermentasyondan sonra *Trichosporon fermentans* ve *Trichosporon cutaneum*'un biyokütlesi, lipit içeriği, lipit miktarı ve lipit verimi sırasıyla 16.0 g/L, %32.4, 5.2 g/L, %16.5 ve 17.4 g/L, %32.2, 5.6 g/L, %17.0 olmuştur (Liu ve ark., 2017). Bu çalışmada kullanılan 12 izolatın biyokütle ve lipit verim parametreleri, yukarıdaki çalışmalardaki suşlarınkilere yakın veya daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu çalışmadaki suşlar ile tek karbon kaynağı olarak ham gliserolün kullanılacağı lipit üretim çalışmalarında üretim parametrelerinin optimizasyonu sonrasında verimli sonuçların alınabileceğini göstermiştir.

**Çizelge 2.** Ksiloz üretim ortamında lipit karakterizasyon sonuçları

Maya türü	Kuru hücre ağırlığı (mg)	Biyokütle (g/L)	Lipit kuru ağırlıkları (mg)	Lipit verimi (g/L)	Kullanılan ksiloz miktarı (g/L)	% lipit	Lipit katsayısı (g lipit/g ksiloz)
<i>Pichia fermentans</i> 1	2±0.14	1±0.07	34±1.94	0.79±0.05	1.00±0.09	79.11 <sup>b</sup> ±1.04	0.79 <sup>e</sup> ±0.026
<i>Pichia fermentans</i> 2	14±0.73	7±0.36	36±0.76	0.84±0.02	17.45±1.26	11.97 <sup>d</sup> ±0.37	0.05 <sup>c</sup> ±0.002
<i>Pichia fermentans</i> 3	10±0.53	5±0.27	27±0.86	0.63±0.02	19.80±0.65	12.57 <sup>d</sup> ±0.26	0.03 <sup>b</sup> ±0.001
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 1	10±1.10	5±0.55	47±3.43	1.09±0.08	18.03±0.96	21.92 <sup>f</sup> ±0.82	0.06 <sup>cd</sup> ±0.001
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 2	8±0.62	4±0.31	33±1.42	0.77±0.03	14.13±0.62	19.22 <sup>e</sup> ±0.66	0.054 <sup>cd</sup> ±0.001
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 3	7±0.70	3.5±0.35	34±2.99	0.79±0.07	14.95±1.23	22.61 <sup>f</sup> ±0.27	0.053 <sup>cd</sup> ±0.001
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 4	15±0.50	7.5±0.25	39±1.87	0.91±0.04	14.38±0.91	12.09 <sup>d</sup> ±0.18	0.06 <sup>e</sup> ±0.001
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	9±0.65	4.5±0.32	3±0.33	0.07±0.01	17.65±0.78	1.55 <sup>a</sup> ±0.06	0.004 <sup>a</sup> ±0.0001
<i>Clavispora lusitaniae</i>	26±0.83	13±0.42	43±2.37	1±0.06	34.84±1.46	7.69 <sup>c</sup> ±0.18	0.03 <sup>b</sup> ±0.001
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4±0.22	2±0.11	22±1.96	0.51±0.05	4.42±0.30	25.55 <sup>e</sup> ±0.87	0.12 <sup>f</sup> ±0.002
<i>Yarrowia lipolytica</i>	2±0.05	1±0.03	35±2.38	0.81±0.06	13.80±0.52	81.34 <sup>b</sup> ±3.34	0.06 <sup>cd</sup> ±0.002
<i>Pichia cactophila</i>	14.6±1.12	7.3±0.56	11±0.44	0.26±0.01	18.46±1.02	3.51 <sup>b</sup> ±0.3	0.01 <sup>a</sup> ±0.0001

Not: ortalama değerler ± standart sapmaları ile verilmiştir. Aynı parametrenin farklı etkilerindeki farklı harfler ortalama değerler arasında anlamlı bir (p<0.05) fark olduğunu göstermektedir.

Yağ üreticisi mayalar tek hücre yağlarının (SCO) üretimi için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu biyoproseslerin ekonomik hale getirilmesi, karbon veya azot kaynakları olarak sıfır veya negatif değerli atık substratların kullanımında daha elverişli hale gelmektedir. Çalışmamızda kullanılan hem ksiloz hem de gliserol çeşitli üretim süreçlerinde ortaya çıkan değerli atıklar arasında yer almaktadır. Lipit yüzdeleri açısından değerlendirildiğinde her iki üretim ortamında da en yüksek sonuçlar *Yarrowia lipolytica* izolatu ile elde edilmiştir. *Y. lipolytica* türünün yağ üreticisi (oleaginous) olduğu pek çok çalışma ile gösterilmiştir (Sestric ve ark., 2014; Ageitos ve ark., 2011). Bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlar hem bunu doğrulamış hem de bu mikroorganizma ile karbon kaynağı olarak ksiloz ve gliserol içeren ortamlarda gerçekleştirilecek lipit üretim çalışmalarında kullanılabileceğini göstermiştir.

**Çizelge 3.** Gliserol üretim ortamında lipit karakterizasyon sonuçları

Maya türü	Kuru hücre ağırlığı (mg)	Biyokütle (g/L)	Lipit kuru ağırlıkları (mg)	Lipit verimi (g/L)	Kullanılan gliserol miktarı (g/L)	% lipit	Lipit katsayısı (g lipit/g gliserol)
<i>Pichia fermentans</i> 1	27±0.67	13.5±0.34	52±1.66	2.97±0.10	27.13±0.95	22.01 <sup>abc</sup> ±0.15	0.11 <sup>a</sup> ±0.0003
<i>Pichia fermentans</i> 2	24±1.85	12±0.92	225±15.30	12.86±0.87	16.82±0.74	107.19 <sup>b</sup> ±0.97	0.76 <sup>d</sup> ±0.018b
<i>Pichia fermentans</i> 3	19±1.05	9.5±0.52	60±3.42	3.43±0.20	12.80±0.87	36.09 <sup>e</sup> ±0.07	0.27 <sup>b</sup> ±0.003
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 1	13±0.59	6.5±0.29	56±2.24	3.2±0.13	7.37±0.55	49.24 <sup>f</sup> ±0.25	0.44 <sup>c</sup> ±0.015
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 2	26±1.17	13±0.59	59±6.49	3.37±0.37	12.35±0.93	25.88 <sup>c</sup> ±1.69	0.27 <sup>b</sup> ±0.01
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 3	25±1.75	12.5±0.88	42±3.74	2.4±0.21	17.94±1.61	19.18 <sup>d</sup> ±0.37	0.13 <sup>a</sup> ±0.001
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 4	21±2.31	10.5±1.16	56±3.08	3.2±0.18	13.27±0.70	30.60 <sup>a</sup> ±1.70	0.24 <sup>b</sup> ±0.001
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	31±0.84	15.5±0.42	63±2.71	3.6±0.15	32.89±1.25	23.22 <sup>bc</sup> ±0.37	0.11 <sup>a</sup> ±0.001
<i>Clavispora lusitanae</i>	28±0.92	14±0.46	55±2.64	3.14±0.15	25.20±1.59	22.44 <sup>abc</sup> ±0.34	0.13 <sup>a</sup> ±0.002
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27±0.89	13.5±0.45	49±4.31	2.8±0.25	20.93±1.32	20.72 <sup>ab</sup> ±1.14	0.13 <sup>a</sup> ±0.003
<i>Yarrowia lipolytica</i>	6.80 ±0.68	3.40±0.34	56±1.18	3.20±0.07	1.84±0.15	94.62 <sup>e</sup> ±7.52	1.74 <sup>e</sup> ±0.107
<i>Pichia cactophila</i>	28±0.76	14±0.38	75±5.47	4.29±0.31	17.40±0.66	30.59 <sup>d</sup> ±1.41	0.25 <sup>b</sup> ±0.009

Not: ortalama değerler ± standart sapmaları ile verilmiştir. Aynı parametrenin farklı etkilerindeki farklı harfler ortalama değerler arasında anlamlı bir ( $p<0.05$ ) fark olduğunu gösterir.

## SONUÇ

Bu çalışmada, tek karbon kaynağı olarak gliserolu veya ksilozu metabolize eden yağ üreticisi mayaların belirlenmesi ve lipit üretimlerinin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Test edilen 12 maya suşunun tamamının potansiyel lipit üreticileri oldukları belirlenmiştir. Biyodizel endüstrisinin bir yan ürünü olan ham gliserol ve lignoselülozik biyorafineri yan ürünü olan ksilozun biyodizel üretiminde kullanılabilirliğin artırılması için bu karbon kaynaklarını metabolize ederek lipit üretme potansiyeli olan mikroorganizmaların taranması oldukça önemlidir. Potansiyel lipit üreticisi mayaların taranması, tanımlanması ve lipit üretiminin karakterizasyonu, mikrobiyal biyodizel üretiminin ilk aşamasıdır. Yabani tip mayalar kullanılarak yapılmış olan bu tarama çalışması ile bu iki ucuz karbon kaynağının katma değeri yüksek bir ürüne mikrobiyal dönüşümünün ilk ve en önemli basamağı gerçekleştirilerek, bu dönüşümde kullanılacak yeni türlerin tespitine çalışılmıştır. Ksiloz ve gliserolden lipit üretimini artırmak için, gelecekteki araştırmaların mayalar tarafından lipit üretimi için fermantasyon koşullarının optimizasyonu ve lipit üretici türlerin verimini arttırmak için mutogenez, genetik mühendisliği çalışmalarına yoğunlaşması gerektiğini düşünmekteyiz. Bu çalışmadan elde edilen tüm sonuçlar, biyodizel üretiminde kullanılacak mikrobiyal lipitleri sentezleyecek alternatif mikroorganizmaların

bulunması için yağ üreticisi mikroorganizmaların taranmasının önemli olduğunu ve çalışmada kullanılmış olan 12 maya suşunun bu anlamda potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.

### Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

### Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

### KAYNAKLAR

- Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, Villa TG, 2011. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90: 1219-1227.
- Areesirisuk A, Yen TB, Chiu CH, Liu CH, Guo JH, 2015. Optimization on yeast lipid production of *psuedozyma* sp. with response surface methodology for biodiesel manufacturing. *Journal of Advanced Agricultural Technologies*, 2(1): 13-18.
- Berikten D, Hoşgün EZ, Gökdal Otuzbiroğlu A, Bozan B, Kıvanç M, 2021. Lipid Production from Crude Glycerol by Newly Isolated Oleaginous Yeasts: Strain Selection, Molecular Identification and Fatty Acid Analysis. *Waste and Biomass Valorization*, 12: 5461–5470.
- Chang YH, Chang KS, Hsu CL, Chuang LT, Chen CY, Huang FY, Jang HD, 2013. A comparative study on batch and fed-batch cultures of oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in glucose-based media and corn cob hydrolysate for microbial oil production. *Fuel*, 105: 711-717.
- Diamantopoulou P, Filippousi R, Antoniou D, Varfi E, Xenopoulos E, Sarris D, Papanikolaou S, 2020. Production of added-value microbial metabolites during growth of yeast strains on media composed of biodiesel-derived crude glycerol and glycerol/xylose blends. *FEMS Microbiology Letters*, 1;367(10): fnaa063.
- Díaz-Fernández D, Aguiar TQ, Martín VI, Romaní A, Silva R, Domingues L, Revuelta JL, Jiménez A, 2019. Microbial lipids from industrial wastes using xylose-utilizing *Ashbya gossypii* strains. *Bioresource Technology*, 293: 122054.
- Doan HT, Nguyen PTM, Tran TT, Nguyen TK, Tran MD, Nguyen DB, 2021. Optimizing lime pretreatment of rice straw for biolipid production using oleaginous microorganisms. *Chemosphere*, 269: 129390.
- Fakas S, Galiotou-Panayotou M, Papanikolaou S, Komaitis M, Aggelis G, 2007. Compositional shifts in lipid fractions during lipid turnover in *Cunninghamella echinulata*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 1321–1327.
- Filippousi R, Antoniou D, Tryfinopoulou P, Nisiotou AA, Nychas GJ, Koutinas AA, Papanikolaou S, 2019. Isolation, identification and screening of yeasts towards their ability to assimilate biodiesel-derived crude glycerol: microbial production of polyols, endopolysaccharides and lipid. *Journal of Applied Microbiology*, 127(4): 1080-1100.
- Hashem AH, Suleiman WB, Abu-Elrish GM, El-Sheikh HH, 2021. Consolidated Bioprocessing of Sugarcane Bagasse to Microbial Oil by Newly Isolated Oleaginous Fungus: *Mortierella wolfii*. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 46(1): 199-211.
- Kitcha S, Cheirsilp B, 2011. Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as carbon source. *Energy Procedia*, 9: 274-282.
- Leiva-Candia DE, Tsakona S, Kopsahelis N, Garcia IL, Papanikolaou S, Dorado MP, Koutinas AA, 2015. Biorefining of by-product streams from sunflower-based biodiesel production plants for



- integrated synthesis of microbial oil and value-added co-products. *Bioresource Technology*, 190: 57–65.
- Li S, Feng S, Li Z, Xu H, Yu Y, Qiao D, Cao Y, 2011. Isolation, identification and characterization of oleaginous fungi from the soil of Qinghai Plateau that utilize D-xylose. *African Journal of Microbiology Research*, 5(15): 2075-2081.
- Liu L, Hu Y, Lou W, Li N, Wu H, Zong M, 2017. Use of crude glycerol as sole carbon source for microbial lipid production by oleaginous yeasts. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 182: 495–510.
- Ma Y, Gao Z, Wang Q, Liu Y, 2018. Biodiesels from microbial oils: opportunity and challenges. *Bioresource technology*, 263: 631-641.
- Maina S, Pateraki C, Kopsahelis N, Paramithiotis S, Drosinos EH, Papanikolaou S, Koutinas AA, 2017. Microbial oil production from various carbon sources by newly isolated oleaginous yeasts. *Engineering in Life Sciences*, 17: 333–344.
- Miao Z, Tian X, Liang W, He Y, Wang G, 2020. Bioconversion of corncob hydrolysate into microbial lipid by an oleaginous yeast *Rhodotorula taiwanensis* AM2352 for biodiesel production. *Renewable Energy*, 161: 91-97.
- Pan LX, Yang DF, Shao L, Li W, Chen GG, Liang ZQ, 2009. Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid-producing capacities. *Food technology and Biotechnology*, 47(2): 215-220.
- Saenge C, Cheirsilp B, Suksaroge TT, Bourtoom T, 2011. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry*, 46: 210–218.
- Sestric R, Munch G, Cicek N, Sparling R, Levin DB, 2014. Growth and neutral lipid synthesis by *Yarrowia lipolytica* on various carbon substrates under nutrient-sufficient and nutrient-limited conditions. *Bioresource Technology*, 164: 41–46.
- Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, 2008. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. laboratory analytical procedure (LAP), Technical Report NREL/TP-510-42623.
- Sriwongchai S, Pokethitiyook P, Kruatrachue M, Bajwa KP, Lee H, 2013. Screening of selected oleaginous yeasts for lipid production from glycerol and some factors which affect lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains. *Journal of Microbiology. Biotechnology and Food Sciences*, 2(5): 2344-2348.
- Taccari M, Canonico L, Comitini F, Mannazzu I, Ciani M, 2012. Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. *Bioresource Technology*, 110: 488-495.
- Thanapimmetha A, Peawsuphon N, Chisti Y, Saisriyoot M, Srinophakun P, 2019. Lipid production by the yeast *Lipomyces starkeyi* grown on sugars and oil palm empty fruit bunch hydrolysate. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 209715996: 1-14.
- Yamada R, Yamauchi A, Kashihara T, Ogino H, 2017. Evaluation of lipid production from xylose and glucose/xylose mixed sugar in various oleaginous yeasts and improvement of lipid production by UV mutagenesis. *Biochemical Engineering Journal*, 128: 76-82.

**Atf İçin:** Tırınk S, 2022. Hayvansal Atıkların Biyogaz Üretim Potansiyelinin Hesaplanması: İğdır İli Örneği. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 152-163.

**To Cite:** Tırınk S, 2022. Calculation of Biogas Production Potential of Animal Wastes: Example of İğdır Province. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 152-163.

## **Hayvansal Atıkların Biyogaz Üretim Potansiyelinin Hesaplanması: İğdır İli Örneği**

Sevta TIRINK<sup>1\*</sup>

**ÖZET:** Tüm dünyada artan enerji talebini karşılamak ve çevre sorunlarını azaltmak amacıyla yenilenebilir enerji kaynaklarına olan talep her geçen gün artmaktadır. Bu kaynaklardan biri olan biyogaz enerjisi açısından ülkemiz zengin bir biyokütle potansiyeline sahiptir. Çalışmada, İğdır ili ve ilçelerindeki hayvan işletmelerinden kaynaklanan atık miktarlarından biyogaz enerji potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla yerel ölçüde sürdürülebilir çözümlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. 2020 yılına ait İğdır ili geneli için büyükbaş, küçükbaş ve kümes hayvan sayıları sırasıyla 157 426; 1 279 203 ve 265 173 adettir. Hayvan gübresinden yıllık üretilebilecek biyogaz potansiyeli 43 952 304 m<sup>3</sup>, ısı enerji miktarı 1 032 879 GJ ve elektrik enerji miktarı 114 716 MWh olarak hesaplanmıştır. İğdır ili için yıllık en yüksek elektrik üretim potansiyeline sahip olduğu Merkez ilçesinde 55 367 MWh ve en düşük elektrik üretim potansiyeline sahip olduğu Karakoyunlu ilçesinde 15 366 MWh elektrik enerjisi üretilebileceği hesaplanmıştır. Ayrıca İğdır genelinde fosil yakıt yerine yenilenebilir enerji kaynaklarından biri olan biyogaz enerjisinin kullanılması ile yıllık 78 465 ton karbondioksit emisyon salınımı engellenerek karbon tasarrufu sağlanabileceği hesaplanmıştır. Özellikle sera gazı emisyonlarının neden olduğu küresel ısınmanın temiz enerji kaynakları kullanılarak azaltılması gerekmektedir. Çevre dostu olan bu tesislerin kurulması ile çevre problemlerine neden olan organik atıkların değerlendirilerek zararsız hale getirilmesine ve sera gazı emisyonlarının azaltılmasına katkı sağlayacaktır. Ayrıca bu tesislerden üretilecek olan enerji ile doğal kaynaklar korunacak ve ülke ekonomisine katkı sağlayarak sürdürülebilir kalkınmayı destekleyecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyogaz, karbondioksit emisyonlarını azaltma, elektrik enerjisi, gübre, iklim değişikliği, arçgis

### **Calculation of Biogas Production Potential of Animal Wastes: Example of İğdır Province**

**ABSTRACT:** All over the world, the demand for renewable energy sources is increasing day by day both to meet the increasing energy demand and to reduce environmental problems. Our country has a rich biomass potential in terms of biogas energy, which is one of these resources. In study, it is aimed to develop locally sustainable solutions by determining the biogas energy potential from the waste amount resulting from animal enterprises in İğdır province and its districts. The number of cattle, small ruminant and poultry for the province of İğdır for 2020 is 157 426; 1 279 203 and 265 173, respectively. Biogas amount that can be produced annually from the manure of animals is calculated as 43 952 304 m<sup>3</sup>, the amount of heat energy as 1 032 879 GJ and the amount of electrical energy as 114 716 MWh. It has been determined that in the central district where it has the highest annual electricity generation potential for İğdır province, 55 367 MWh and in the Karakoyunlu district where it has the lowest electricity generation potential, it has been determined that 15 366 MWh electricity can be produced. In addition, it has been calculated that by using biogas energy, which is one of the renewable energy sources, instead of fossil fuels throughout İğdır, it is calculated that carbon savings can be achieved by preventing the emission of 78 465 tons of carbon dioxide emissions annually. In particular, global warming caused by greenhouse gas emissions should be reduced by using clean energy sources. With the establishment of these environmentally friendly facilities, organic wastes that cause environmental problems will be evaluated and made harmless and greenhouse gas emissions will be reduced. In addition, the energy produced from these facilities will protect natural resources and support sustainable development by contributing to the national economy.

**Keywords:** Biogas, reduce carbon dioxide emissions, electric power, fertilizer, climate change, arçgis.

<sup>1</sup>Sevta TIRINK ([Orcid ID: 0000-0003-0123-0054](https://orcid.org/0000-0003-0123-0054)), İğdır Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Çevre Sağlığı Programı, İğdır, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Sevta TIRINK, e-mail: sevtatirink@gmail.com

## GİRİŞ

Dünya nüfusunun zamanla hızlı bir şekilde artması, sanayileşmenin yeni boyutlar kazanması ve insanların yaşama standardını yükseltme istekleri, enerjiye olan gereksinimi arttırmıştır. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de enerjiye olan talep artış göstermektedir (Taşova, 2019; Taşova ve Yazarel, 2019). Bu artan enerji taleplerini karşılamak için ağırlıklı olarak kömür, petrol, doğalgaz gibi fosil kaynaklar kullanılmaktadır. Ancak bu kaynakların yenilenme hızlarının düşük ve miktar olarak talebi karşılamada yetersiz olmaları nedeniyle hızla tüketilmeleri söz konusudur. Ayrıca bu kaynakların fazla kullanımı özellikle hava kirliliğini oluşturması, ozon tabakasındaki incelmeyi arttırması, küresel ısınmayı hızlandırması ve asit yağmurlarının oluşması gibi çevresel problemlere neden olmaktadır. Günümüzde birçok araştırmacı bu kaynakların daha verimli kullanılması için yeni teknolojiler ve buluşlar geliştirmeye çalışırken, diğer taraftan da çevreyle dost, kaynakları sınırsız sayılabilecek olan yenilenebilir enerjinin kullanılması ve değerlendirilmesi konusunda çalışmalar yapmaktadır (Sözer ve ark., 2016).

Yenilenebilir enerji kaynakları (güneş enerjisi, jeotermal, hidroenerji, rüzgâr enerjisi ve biyokütle gibi) ile çevre dostu üretim sağlanabilmektedir (Argun ve ark., 2016). Bu kaynaklar karbondioksit (CO<sub>2</sub>) emisyonlarının azalmasına katkı sağlayarak çevrenin korunmasına yardımcı olmaktadır. Ayrıca yerli ve kısa sürede yenilenebilir kaynaklar olmaları sebebiyle ülkenin enerjide dışa bağımlılığının azaltılmasını ve yeni istihdam alanlarının oluşmasını sağlamaktadır (Aktaş ve ark., 2015). Ülkemiz yenilenebilir enerji kaynakları bakımından zengin bir potansiyele sahip olduğundan kaynakların etkili bir şekilde kullanılması büyük önem taşımaktadır.

Yenilenebilir enerji kaynakları arasında yer alan biyokütle enerjisi, üretimdeki teşviklerden dolayı son yıllarda giderek uygulaması artmaktadır. Biyokütle enerji kaynaklarından elde edilen yakıtlardan biri olan biyogaz, organik esaslı atıkların anaerobik ortamda fermantasyonu sonucu ortaya çıkan gaz karışımıdır. Biyogaz, kokusuz, renksiz, havadan hafif, parlak mavi bir alevle yanan ve içeriğinde yaklaşık olarak %55-75 metan (CH<sub>4</sub>), %24-44 karbondioksit (CO<sub>2</sub>) ve çok az miktarlarda oksijen (O<sub>2</sub>), hidrojen (H<sub>2</sub>), azot (N<sub>2</sub>), hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S), amonyak (NH<sub>3</sub>) ve karbon monoksit (CO) bulunan gaz karışımıdır (Ardıç ve Taner, 2014; Aybek ve ark., 2015; Dağtekin ve ark., 2019). Biyogaz üretimi için yeterli organik madde, yeterli bakteri, uygun anaerobik ortam ve uygun ortam ısı olması gereken önemli parametreleri oluşturmaktadır. Biyogazın içeriği, fermantasyon mikroorganizmaları vasıtasıyla organik maddenin sindirim süresine, atığın türüne ve biyogaz üretiminin işletme şartlarına bağlı olarak değişiklik gösterirken, biyogazın enerji verimliliği ise pH, sıcaklık ve iyi karıştırılma gibi parametrelerin uygun olmasına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Yetiş ve ark., 2019). Bu parametreler dikkate alınarak biyogaz sistemlerinin işletilmesi gerekmektedir.

Tüm dünyada ve Türkiye’de hayvansal atıkların uygun bir şekilde depolanmaması önemli çevre problemlerinin oluşmasına neden olabilmektedir. Bu atıkların sağlıksız depolama koşulları nedeniyle; kötü koku oluşumuna, zararlı canlıların çoğalmalarına, yüzeysel ve yeraltı su kaynaklarının kirlenmesine, yüzeysel su kaynaklarında ötrofikasyonun oluşmasına, yeraltı ve yüzeysel su kaynakları potansiyelinin azalmasına, türlerin yok olmasına, direkt tarım arazilerine verilmesiyle ürün kalitesinin azalmasına, sera gazı emisyonlarının artmasına, küresel iklim değişikliğine neden olması gibi doğrudan ya da dolaylı olarak etkileri söz konusudur (Tırink, 2021). Bu nedenle bu tür atıkların araziye uygulanıncaya kadar çevre problemleri yaratmayacak şekilde gerekli tedbirler alınarak muhafaza edilmesi gerekmektedir. Atıklara uygulanan havalandırma, biyogaz üretimi, kompost yapma ve kurutma gibi işlemler, bu tür atıkların çevreye daha az zarar vermesine neden olacaktır. Ayrıca atıklara uygulanan işlemler ile arıkların tarlada organik gübre olarak daha etkin kullanılmasıyla oluşturabileceği çevre problemlerinde önemli ölçüde azalma söz konusu olacaktır (Karaman, 2006).

Biyogaz tesislerinin kurulması, hayvansal atıkların canlılara, su ve toprak kaynaklarına olan olumsuz etkileri azaltılarak ekonomik fayda sağlamaktadır (Boyacı ve ark., 2011). Nihayetinde, üretilen biyogaz sayesinde fosil yakıtlardan kaynaklanan çevre kirliliği azaltılarak sera gazı emisyon yayılımının önlenmesine ve enerji tasarrufu sağlayarak sürdürülebilir kalkınmanın desteklenmesine olanak sağlayacaktır (Yetiş ve ark., 2019).

Dünya geneline bakıldığında Türkiye, tarım ve hayvancılık alanında önemli bir konumdadır. Ülkemizdeki biyogaz enerji potansiyeli, tarımsal alanların, hayvan potansiyelinin, tarım ve hayvancılıkla ilgilenen nüfusun yüksek olmasından dolayı önemli bir enerji kaynağı potansiyelini oluşturmaktadır (Çağlayan ve Koçer, 2014; Seyhan ve ark., 2018; Dağtekin ve ark., 2019). Bu sebeplerden dolayı ülkemizdeki biyogaz enerji potansiyelinin değerlendirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmanın amacı, Iğdır ilinde bulunan hayvansal üretimden oluşan gübrelerin biyogaz enerji potansiyelini belirlemektir ve ilçelerdeki potansiyel dağılımını haritalamaktır. Ayrıca ülke politikaları ve ekonomik sürdürülebilirlik açısından biyogaz enerji potansiyeli ile elde edilebilecek güç miktarı belirlenmelidir. Çalışma kapsamında öncelikle 2020 yılı için Iğdır ilinde bulunan, büyükbaş, küçükbaş ve kanatlı hayvan sayıları tespit edilmiştir. Daha sonra bu hayvanların günlük oluşturdukları yaş gübre miktarları baz alınarak üretilen günlük ve yıllık yaş gübre miktarları hesaplanmıştır. Sonrasında hayvanların oluşturmuş olduğu gübrelerin biyogaz üretim potansiyelleri ve biyogazın ısıl eşdeğerliğine göre üretilebilecek elektrik miktarları hesaplanarak belirlenmiştir. Üretilecek elektrik miktarına göre fosil yakıt kullanımından kaynaklanan emisyon miktarları göz önüne alınarak biyogaz üretimi sayesinde CO<sub>2</sub> salınımindan ne kadar azalma gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca bu hesaplamalar sonrasında bir Coğrafi Bilgi Sistemi (GIS) programı olan ArcGIS kullanılarak Iğdır ili ve ilçelerindeki potansiyel dağılımların haritalanması yapılmış ve haritalar sayesinde ilçelerdeki potansiyel dağılımın daha net görünmesi sağlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada, Iğdır ili ve ilçelerindeki hayvansal atık kaynaklı biyogaz enerji potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla hayvan sayısı verileri Türkiye İstatistik Kurumunun (TÜİK) 31.12.2020 yılı verileri kullanılmıştır (TÜİK, 2020).

TÜİK verileri kullanılarak Iğdır ilinin ilçelerine göre hayvan sayısı dağılımı analiz edilmiştir. Hayvansal atıklardan toplanabilecek yaş atık miktarları hesaplanarak biyogaz üretim potansiyelinin hesaplamaları gerçekleştirilmiştir.

### Çalışma Alanı

Iğdır ili, Türkiye'nin üç ülkeye (Nahçıvan Özerk Cumhuriyeti, İran ve Ermenistan) sınırı olan Türkiye'nin Doğu Anadolu Bölgesi'nde yer alan bir ilidir. Bu ilin idare alanının doğu ve güneydoğusunda Nahçıvan Özerk Cumhuriyeti ve İran, kuzeyinde Ermenistan, güneyinde Ağrı ili, batı ve kuzeybatısında ise Kars ili yer almaktadır. Yüzölçümü 3 588 km<sup>2</sup>'lik bir alana sahip ve Iğdır Ovasının ortalama rakımı 800-900 m arasında değişmektedir. Iğdır ilinde Merkez ilçe ile 4 ilçe, 7 belde ve 162 köy bulunmaktadır. Bu ilçeler Iğdır (Merkez), Tuzluca, Aralık ve Karakoyunlu ilçeleridir (Şekil 1). Iğdır ili ve çevresi Türkiye ve Doğu Anadolu ölçüsünde kendine özgü iklim özellikleri ile yazları sıcak ve kurak, kışları ılıman bir iklime sahiptir (Aras ve Tekay, 2018). Ayrıca tarım ve hayvancılık bölgenin temel geçim kaynağını oluşturmaktadır.



Şekil 1. Iğdır ili ve ilçeleri

### Biyogaz Potansiyelinin Belirlenmesi

Gübre üretimi hayvanların beslenme yoğunluğuna ve besin türüne, su içme sıklığına göre çok değişken olabilmektedir (Kocabay, 2019). Iğdır ilinin biyogaz potansiyelinin hesaplanması için daha önce yapılan çalışmalar incelenmiştir. Biyogaz potansiyelini belirlemek için bu çalışmalardan yararlanarak bazı kabuller kullanılmıştır. Literatürde öngörülen değerler Çizelge 1'deki en küçük ve en büyük değer aralıkları baz alınarak belirlenmiştir (Omer ve Fadalla, 2003; Koçer ve ark., 2006; Avcioğlu ve ark., 2013; Aktaş ve ark., 2015; Ilgar, 2016; Salihoğlu ve ark., 2019). Hesaplamalarda belirtilen aralıklardaki katsayı değerlerinin dışına çıkılmamıştır (Çizelge 2).

### Çizelge 1. Hayvan cinslerine göre atık oluşum değer aralıkları

Kabul Parametreleri	Büyükbaş Hayvan (BBH)	Küçükbaş Hayvan (KBH)	Kümes Hayvanı (KH)
Canlı hayvan ağırlığı (kg)	135-800	30-75	1.5-12
Yaş gübre oluşumu (%)	5-6	4-5	3-4
Yaş gübre üretim miktarı (kg gün <sup>-1</sup> )	6-48	1.2-3.75	0.045-0.48
Kuru madde içeriği (%)	5-25	30-36	10-90
Uçucu kuru madde (%)	75-85	20-81	60-80
Kullanılabilirlik (%)	25-65	13	99
Biyogaz eşdeğerliği (m <sup>3</sup> (ton*UKM) <sup>-1</sup> )	200-350	100-310	310-650

Iğdır iline ait hayvansal atık kaynaklı biyogaz potansiyelinin hesabı için toplam yaş gübre miktarı (T<sub>YGM</sub>) aşağıdaki denklem ile hesaplanmıştır.

$$T_{YGM} = A_{CH} * Y_{CHA} \quad (1)$$

Burada T<sub>YGM</sub> toplam yaş gübre miktarını (kg (gün\*hayvan)<sup>-1</sup>), A<sub>CH</sub> hayvan türüne göre canlı hayvan ağırlığını (kg) göstermektedir. Y<sub>CHA</sub> hayvan türüne göre canlı hayvan ağırlığının yüzdesini (%) ifade etmektedir. Hayvanlarda yaş gübre üretim potansiyeli hayvanın kilosuna, cinsine, yaşına, cinsiyetine, beslenme türüne ve bulunduğu bölgenin iklim koşullarına göre değişiklik gösterebilmektedir. Ancak bu çalışmada Eşitlik 1 ve literatür değerleri (Çizelge 1) dikkate alınarak yaş gübre üretim miktarı BBH için 27 kg gün<sup>-1</sup>, KBH için 2.48 kg gün<sup>-1</sup> ve KH için 0.26 kg gün<sup>-1</sup> olacağı kabul edilmiştir.

Hayvanların merada oldukları süre boyunca hayvan atıkları toplanamayacağı ve tesisin sürekli işletilebilmesi için hammadde probleminin yaşanmaması amacıyla hesaplamada gübrenin tamamı kullanılmamaktadır. Bu sebepten dolayı toplam kullanılabilir yaş gübre miktarı ( $T_{KYGM}$ );

$$T_{KYGM} = T_{YGM} * Y_{KG} \quad (2)$$

şeklinde hesaplanmaktadır. Burada  $T_{KYGM}$  toplam kullanılabilir yaş gübre miktarını (ton gün<sup>-1</sup>),  $Y_{KG}$  hayvan türüne göre kullanılabilir gübre (%) oranını ifade etmektedir. Bu değer BBH için %65, KBH için %13 ve KH için %99 alınmıştır. Literatürde hayvan türüne bağlı biyogaz katsayısı kabulünde gübrenin kuru veya yaş olma durumuna göre iki farklı kabul kullanılmaktadır (Altıkat ve Çelik, 2012; Kaya ve Öztürk, 2012; Çağlayan ve Koçer, 2014; Ilgar, 2016; Baran ve ark., 2017; Doruk ve Bozdeveci, 2017; Şenol ve ark., 2017; Bayrak Işık ve Polat, 2018; Bulut ve Canbaz, 2019; Görgülü, 2019; Kocabay, 2019; Salihoğlu ve ark., 2019, Yağlı ve Yıldız, 2019; Yetiş ve ark., 2019; Ay ve Kaya, 2020). Yaş gübre hayvanın katı dışkısı, idrarı ve bulunduğu alanın yıkama sularını da içermektedir. Bu yüzden yaş gübrenin biyogaz elde edilebilecek kuru içeriğinin hesaplanması gerekmektedir. Dolayısıyla toplam kuru gübre miktarı ( $T_{KGM}$ );

$$T_{KGM} = T_{YGM} * Y_{KM} * Y_{UKM} \quad (3)$$

şeklinde hesaplanmaktadır. Burada  $T_{KGM}$  toplam kuru gübre miktarını (ton\*UKM gün<sup>-1</sup>),  $Y_{KM}$  hayvan türüne göre değişen hayvansal atıklardaki kuru madde (%) oranını göstermektedir. Bu değer BBH için %5-25 arasında, KBH için %30 ve KH için %10-90 arasında alınmaktadır.  $Y_{UKM}$  hayvan türüne göre uçucu kuru madde (%) oranıdır. Hayvan türüne bağlı oluşan 1 ton toplam kuru gübre miktarından BBH için 200-300 m<sup>3</sup> (ton\*UKM)<sup>-1</sup> arasında, KBH için 100-350 m<sup>3</sup> (ton\*UKM)<sup>-1</sup> arasında ve KH için 310-650 m<sup>3</sup> (ton\*UKM)<sup>-1</sup> arasında biyogaz elde edilebilmektedir (Seyhan ve Badem, 2018; Salihoğlu ve ark., 2019, Yağlı ve Yıldız, 2019). Hayvan türüne bağlı oluşan 1 ton toplam yaş gübre miktarından BBH için 33 m<sup>3</sup> ton<sup>-1</sup>, KBH için 58 m<sup>3</sup> ton<sup>-1</sup> ve KH için 78 m<sup>3</sup> ton<sup>-1</sup> biyogaz elde edilebilmektedir (Altıkat ve Çelik, 2012; Kaya ve Öztürk, 2012; Çağlayan ve Koçer, 2014; Ilgar, 2016; Baran ve ark., 2017; Doruk ve Bozdeveci, 2017; Şenol ve ark., 2017; Bayrak Işık ve Polat, 2018; Bulut ve Canbaz, 2019; Görgülü, 2019; Kocabay, 2019; Yetiş ve ark., 2019; Ay ve Kaya, 2020). Bu çalışmada biyogaz potansiyelinin hesaplanması için yaş gübre kabulündeki katsayılar kullanılmıştır. Yıllık toplam yaş gübre potansiyeli ( $T_{YGP}$ );

$$T_{YGP} = T_{KYGM} * N_{CH} * 365/1000 \quad (4)$$

eşitliği ile hesaplanmaktadır. Bu eşitlikte  $N_{CH}$  hayvan sayısını ifade etmektedir. Yıllık biyogaz miktarı ( $T_{Biyogaz}$ );

$$T_{Biyogaz} = T_{YGM} * M_B \quad (5)$$

şeklinde hesaplanmaktadır. Burada  $T_{Biyogaz}$  yıllık oluşan biyogaz miktarını (m<sup>3</sup> yıl<sup>-1</sup>),  $M_B$  hayvan türüne bağlı 1 ton yaş gübreden elde edilen biyogaz miktarını göstermektedir. Bu değer BBH için 33 m<sup>3</sup> ton<sup>-1</sup>, KBH için 58 m<sup>3</sup> ton<sup>-1</sup> ve KH için 78 m<sup>3</sup> ton<sup>-1</sup> alınmıştır. Biyogaz %50- 70 arasında metan gazı içermektedir. Biyogazdan üretilebilecek enerji miktarı ( $E_{ısı}$ );

$$E_{ısı} = T_{Biyogaz} * E_B \quad (6)$$

şeklinde hesaplanmaktadır. Burada  $E_{ısı}$  yıllık oluşan biyogaz miktarından elde edilecek enerjinin ısı değerini (MJ yıl<sup>-1</sup>) ve  $E_B$  biyogazın ısı değerini (MJ m<sup>-3</sup>) ifade etmektedir. Oluşan biyogazın içeriğindeki metan oranına göre ısı değeri 20-27 MJ m<sup>-3</sup> arasında değişiklik göstermektedir (Eryaşar ve Koçar 2009; Bond ve Templeton, 2011; Kaya ve Öztürk, 2012; Ayhan, 2015). Bu sebepten dolayı 1 m<sup>3</sup> biyogazın ısı değeri 23.5 MJ m<sup>-3</sup> olarak kabul edilmiştir. Biyogazın 23.5 MJ ısı değerinin elektrik enerjisi eşdeğeri 6.53 kWh değerindedir (1 kWh = 3.6 MJ). Biyogazdan elektrik enerjisi üretilebilmesi için kojenerasyon sisteminde yakılarak mekanik enerjiye dönüştürülmektedir. Kojenerasyon sisteminin elektriksel verimleri %35-40 aralığında değişmektedir. Bu değer %40 alınmış ve bu verimle çalışan

kojenerasyon sistemi için 1 m<sup>3</sup> biyogazın elektriksel eşdeğeri 2.61 kWh olarak kabul edilmiştir. Toz kömürün yakılmasıyla 1 kWh elektrik üretimi için ortalama sera gazı emisyonu 710 gCO<sub>2</sub> olurken, biyogazın yakılması için bu değer ortalama 26 gCO<sub>2</sub>'dir (Melikoglu, 2013). Bu sayede hayvansal atıklardan biyogaz elde edilmesi ile yılda ne kadar CO<sub>2</sub> salınımının engellenebileceğini hesaplamak için iki değer arasındaki fark alınarak 684 g kWh<sup>-1</sup> katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır. Biyogaz potansiyelinin hesaplanmasında kullanılacak olan kabuller Çizelge 2'de özetlenmiştir.

**Çizelge 2.** Hayvan cinslerine göre kullanılan kabuller

Kullanılan Kabuller	BBH	KBH	KH
Toplam yaş gübre miktarı- T <sub>YGM</sub> - (kg gün.hayvan <sup>-1</sup> )	27	2.48	0.26
Kullanılabilirlik- Y <sub>KG</sub> - (%)	65	13	99
Yaş gübreden elde edilen biyogaz oranı- M <sub>B</sub> - (m <sup>3</sup> ton <sup>-1</sup> )	33	58	78
Enerji ısısal değeri – E <sub>ısı</sub> - (MJ m <sup>-3</sup> )	23.5	23.5	23.5
Elektrik enerji değeri – (kWh yıl <sup>-1</sup> )	2.63	2.63	2.63
Engellenen CO <sub>2</sub> salımı değeri (g kWh <sup>-1</sup> )	684	684	684

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Iğdır iline ait hayvansal atıklardan kaynaklanan biyogaz potansiyelinin hesaplanabilmesi için il genelindeki hayvan sayıları ve hayvanlardan toplanabilecek toplam yaş atık miktarı hesaplanmıştır. Daha sonra biyogaz için kullanılabilir yaş gübre miktarları belirlenmiştir. Ardından biyogaz potansiyeli hesaplanarak gazın ısısal ve elektriksel eşdeğerliği oluşturulmuştur. Ayrıca yenilenebilir enerji kaynaklarından biri olan biyogaz enerjisinin kullanılması ile elde edilecek elektrik enerjisinden CO<sub>2</sub> salınımını ne kadar azaltacağı hesaplanmıştır. Belirlenen değerlere göre Iğdır ili 2020 yılı toplam canlı hayvan sayısından yola çıkarak ve belirtilen kabullerin yapılmasıyla gübre miktarı, elde edilecek biyogaz miktarı, enerji potansiyeli ve engellenecek CO<sub>2</sub> emisyon salınımı belirlenmiştir.

Çalışma kapsamında öncelikle 2020 yılı için Iğdır ilinde TÜİK verilerine göre, Büyükbaş hayvan (BBH) olarak sığırlar (yerli-kültür-melez), küçükbaş hayvan (KBH) olarak koyun ve keçi, kümes hayvanı (KH) olarak da yumurta tavuğu, hindi, kaz, ördek ve beç tavuğu sayıları referans alınmış ve canlı hayvan sayıları verilmiştir (Çizelge 3).

**Çizelge 3.** 2020 yılına ait Iğdır ili ve ilçelerindeki canlı hayvan sayıları

İlçe Adı	Hayvan Sayısı			Toplam
	BBH	KBH	KH	
Merkez	69 966	742 193	185 250	997 409
Aralık	28 268	225 273	20 380	273 921
Karakoyunlu	23 102	134 977	11 283	169 362
Tuzluca	36 090	176 760	48 260	261 110
<b>Toplam</b>	<b>157 426</b>	<b>1 279 203</b>	<b>265 173</b>	<b>1 701 802</b>

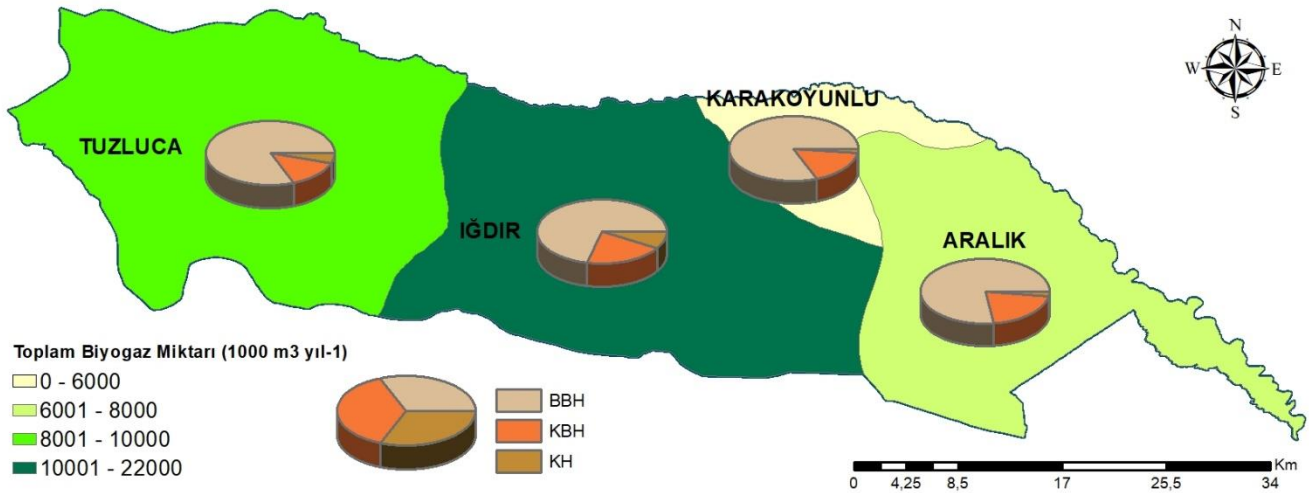
Çizelge 3'te görüldüğü gibi Iğdır ilinde, BBH varlığının en fazla olduğu ilçe %44'lik oran ile Merkez ilçesidir. BBH varlığının en az olduğu ilçe ise %15'lik oran ile Karakoyunlu ilçesidir. Bu ilde, KBH varlığının en fazla olduğu ilçe %58'lik oran ile Merkez ilçesi olarak belirlenmiştir. KBH varlığının en az olduğu ilçe ise %10'luk oran ile Karakoyunlu ilçesidir. Ayrıca bu ilde, KH varlığının en fazla olduğu ilçe %70'lik oran ile Merkez ilçesi olduğu tespit edilmiştir. KH varlığının en az olduğu ilçe ise %4'lük oran ile Karakoyunlu ilçesidir. Iğdır ili ve ilçelerindeki hayvan sayıları incelendiğinde KBH yetiştiriciliğinin daha yüksek orana sahip olduğu görülmektedir.

İldeki canlı hayvan sayılarına göre toplam yaş gübre potansiyeli (Eşitlik 4) ve elde edilecek biyogaz miktarı (Eşitlik 5) tespit edilmiştir (Çizelge 4).

**Çizelge 4.** Iğdır ili ve ilçelerine ait BBH, KBH ve KH atıklarından elde edilecek yaş gübre ve biyogaz potansiyeli

İlçe Adı	Hayvan Cinsi	Hayvan Miktarı (adet)	Toplam Yaş Gübre Potansiyeli -TYGP- (ton yıl <sup>-1</sup> )	Toplam	Biyogaz Miktarı (m <sup>3</sup> yıl <sup>-1</sup> )	Toplam
Merkez	BBH	69 966	448 184.705	552 927.431	14 790 095.249	21 213 261.824
	KBH	742 193	87 338.303		5 065 621.601	
	KH	185 250	17 404.423		1 357 544.975	
Aralık	BBH	28 268	18 1077.741	209 501.688	5 975 565.453	7 662 448.802
	KBH	225 273	26 509.226		1 537 535.082	
	KH	20 380	1 914.721		149 348.268	
Karakoyunlu	BBH	23 102	147 985.637	164 929.239	4 883 526.005	5 887 455.937
	KBH	134 977	15 883.553		921 246.100	
	KH	11 283	1 060.049		82 683.832	
Tuzluca	BBH	36 090	231 183.518	256 518.003	7 629 056.078	9 189 137.714
	KBH	176 760	20 800.410		1 206 423.766	
	KH	48 260	4 534.075		353 657.870	
<b>Toplam</b>		<b>1 701 802</b>		<b>1 183 876.360</b>		<b>43 952 304.278</b>

Yıllık kullanılabilir olan yaş gübre miktarı toplamı 1 183 876.360 ton ve bu miktarın %85'i BBH kaynaklı olduğu hesaplanmıştır. Şekil 2'te Iğdır ili ilçelerine göre hayvansal kaynaklı biyogaz potansiyelinin en yüksek olan ilçe Merkez ilçesinde olduğu görülmektedir. Elde edilebilecek bu enerji potansiyelinin %76'sı BBH'lardan, %20'si KBH'lardan ve %4'ü de KH'lardan olduğu belirlenmiştir.

**Şekil 2.** Iğdır ili ilçelerine göre biyogaz enerji potansiyeli

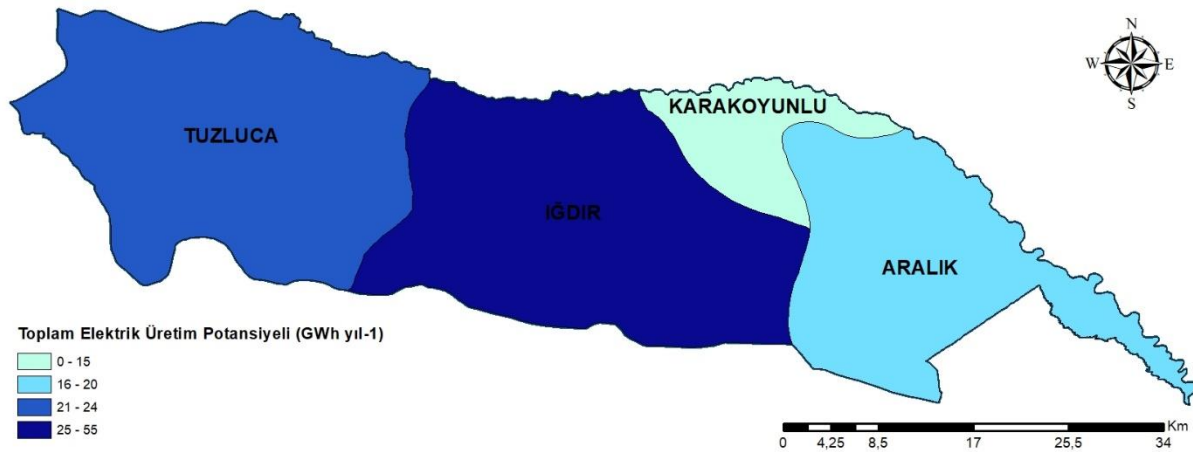
Yıllık toplam biyogaz potansiyelinin hesaplanmasının ardından elde edilebilecek olan biyogazın ısıl eşdeğeri Eşitlik 6 ve elektriksel eşdeğerlikleri ise Çizelge 2'deki kabuller kullanılarak hesaplanmıştır. Iğdır ili genelinde biyogazdan üretilebilecek yıllık toplam elektrik üretim potansiyeli 114 715 514.164 kWh yıl<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. TÜİK verilerine göre 2020 yılı Iğdır ili toplam nüfus sayısı 201 314 kişidir. Iğdır ili kişi başına toplam elektrik tüketim miktarı 1 001 kWh yıl<sup>-1</sup>'dir. Bu değerler dikkate alındığında 2020 yılında tüketilen elektrik miktarı yaklaşık 2 001 515 314 kWh'dir. Iğdır iline yapılacak biyogaz tesisi sayesinde ilin %57'lik elektrik ihtiyacı karşılanabilecektir.



Çizelge 5. Iğdır ili ve ilçelerine ait BBH, KBH ve KH atıklarından elde edilecek enerji potansiyeli ve engellenen CO<sub>2</sub> salınımı

İlçe Adı	Hayvan Cinsi	Enerji Isıl Değeri		Elektrik Enerjisi Değeri		Engellenen CO <sub>2</sub> Salımı	
		(MJ yıl <sup>-1</sup> )	Toplam	(kWh yıl <sup>-1</sup> )	Toplam	Değeri (ton yıl <sup>-1</sup> )	Toplam
Merkez	BBH	347 567 238.340		38 602 148.599		26 403.869	
	KBH	119 042 107.627	498 511 652.867	13 221 272.379	55 366 613.361	9 043.350	37 870.764
	KH	31 902 306.901		3 543 192.383		2 423.543	
Aralık	BBH	140 425 788.146		15 596 225.832		10 667.818	
	KBH	36 132 074.422	180 067 546.857	4 012 966.563	19 998 991.374	2 744.869	13 679.310
	KH	3 509 684.290		389 798.979		266.622	
Karakoyunlu	BBH	114 762 861.106		12 746 002.872		8 718.265	
	KBH	21 649 283.355	138 355 214.522	2 404 452.322	15 366 259.996	1 644.645	10 510.522
	KH	1 943 070.061		215 804.802		147.610	
Tuzluca	BBH	179 282 817.821		19 911 836.362		13 619.696	
	KBH	28 350 958.503	215 944 736.276	3 148 766.029	23 983 649.433	2 153.755	16 404.816
	KH	8 310 959.952		923 047.041		631.364	
<b>Toplam</b>			<b>1 032 879 150.522</b>		<b>114 715 514.164</b>		<b>78 465.412</b>

Iğdır ilinde elektrik üretim enerji potansiyeli en düşük Karakoyunlu ilçesinde belirlenmişken en yüksek %48 oranında Merkez ilçedir (Şekil 3).

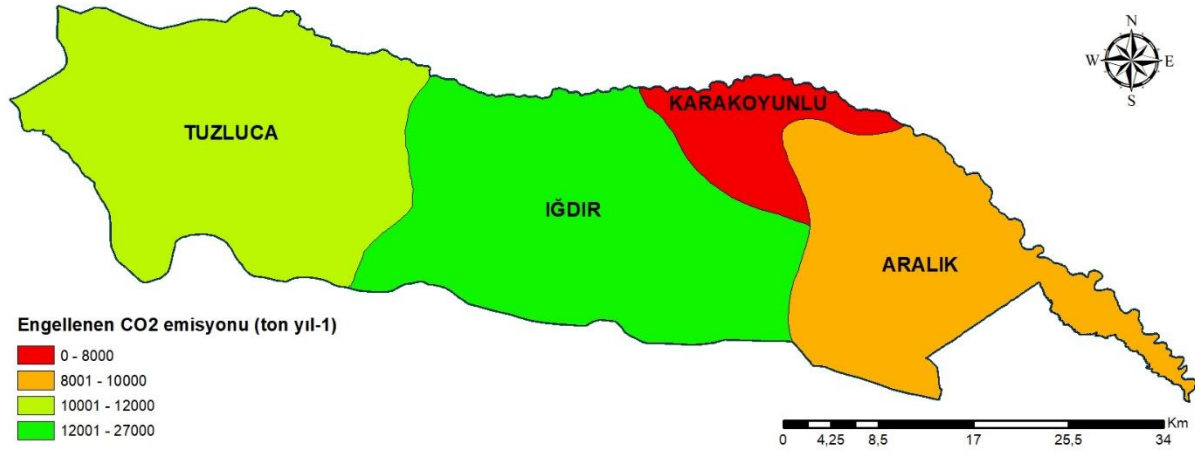


Şekil 3. Iğdır ili ilçelerine göre elektrik üretim potansiyeli

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde farklı sayıdaki hayvan varlıklarından yararlanarak teorik olarak biyogaz potansiyeli ve üretilebilecek enerji değerleri hesaplanabilmektedir. Bu çalışmalarda yıllık olarak; Çevik (2016) Çanakkale ilinin biyogaz potansiyelini 60 793 963 m<sup>3</sup> ve elektrik enerji potansiyelini 156 848 426.42 kWh; Boyacı (2017) Kırşehir ilinin biyogaz potansiyelini 14 855 273 m<sup>3</sup> ve elektrik enerji potansiyelini 69 819 781 kWh; Aksu (2019) Amasya ilinin biyogaz potansiyelini yaklaşık 35.9 milyon m<sup>3</sup> ve elektrik enerji potansiyelini 90.474 milyon kWh; Konuk (2019) Tokat ilinin biyogaz potansiyelini yaklaşık 49.2 milyon m<sup>3</sup> ve elektrik enerji potansiyelini 124 042 MWh; Gökdoğan (2019) Isparta ilinin biyogaz potansiyelini 22 366 468.22 m<sup>3</sup> ve elektrik enerji potansiyelini 105 122 400.65 kWh; Bulut ve Canbaz (2019) Sivas ilinin biyogaz potansiyelini 52 391 785 m<sup>3</sup> ve elektrik enerji potansiyelini 246.2 GWh; Akbay ve Kumbur (2020), Mersin ilinin biyogaz potansiyelini yaklaşık 60 milyon m<sup>3</sup> ve elektrik enerji potansiyelini 280 GWh; Seyhan ve Badem (2021), Erzincan ilinin biyogaz potansiyelini 15 511 011 m<sup>3</sup> ve elektrik enerji potansiyelini 38 025 864 kWh olarak hesaplamışlardır. Literatürde verilen çalışma sonuçları ile bu çalışmada elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında sonuçların uyumlu olduğu görülmektedir.

İl genelinde tasarruf edilecek olan 1 kWh elektriğe karşılık olarak 684 gCO<sub>2</sub> salınımının azaltılabileceği düşünüldüğünde hayvansal atıklardan biyogaz elde edilmesi ile yılda 78 465 ton CO<sub>2</sub>

salınımının engellenebileceği belirlenmiştir. Bu sayede küresel ısınma konusunda en önemli gazlardan biri olan CO<sub>2</sub> salınımının engellenmesi için biyogazın önemli avantaja sahip olduğu görülmektedir. İlçelere göre engellenen CO<sub>2</sub> emisyon miktarının dağılım haritası incelendiğinde en fazla CO<sub>2</sub> emisyonunun engellenmesine katkı sağlayan ilçe %48'lik oran ile Merkez ilçesi olduğu ve daha sonra sırasıyla Tuzluca ilçesi, Aralık ilçesi ve Karakoyunlu ilçeleri olduğu görülmektedir (Şekil 4).



Şekil 4. Iğdır ili ilçelerine göre engellenen CO<sub>2</sub> emisyonu oranları

Tırink (2021) çalışmasında Iğdır il genelindeki yayılı kirletici yüklerinin tespiti amacıyla 2019 yılına ait büyükbaş hayvan, küçükbaş hayvan ve kümes hayvan sayıları sırasıyla 159 926; 1 149 668 ve 116 916 adet olduğu ve bu hayvanların yıllık oluşturduğu yayılı kirletici yüklerinden toplam azot miktarını 2 509.697 ton yıl<sup>-1</sup> ve toplam fosfor miktarını ise 203.521 ton yıl<sup>-1</sup> olduğunu belirtmiştir. Çalışmamız 2019 yılı verileri ile karşılaştırıldığında, 2020 yılındaki hayvan sayılarında %19'luk bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Belirlenen artışa göre çevreye verilen kirlilik miktarlarında da artış olduğu söylenebilir. Bu nedenle kurulacak bir biyogaz tesisi sayesinde; kirlilik yüklerini engellemek hem küresel iklim değişikliğinin oluşmasında önemli bir gaz olan CO<sub>2</sub> emisyonlarının biyogaz enerjisi kullanılarak fosil yakıtlara olan talebi azaltacak hem de Iğdır iline ekonomik katkı ve istihdam alanları sağlayacaktır.

## SONUÇ

2020 yılı için Iğdır ilindeki canlı hayvan sayıları kullanılarak biyogaz potansiyeli araştırılmıştır. Iğdır ili 2020 yılı toplam 1 701 802 adet canlı hayvandan (%75 BBH, %16 KBH ve %9 KH) oluşan hayvansal kaynaklı atık miktarı yıllık 1 183 876.360 ton kullanılabilir yaş gübre, 43 952 304.278 m<sup>3</sup> biyogaz, 1 032 879 150.522 MJ'luk enerji potansiyeli ve 114 715 514.164 kWh'lik elektrik enerji potansiyeli elde edilebileceği görülmüştür.

Dünya nüfusunun hızla artması ile enerjiye olan talepte de artış söz konusudur. Günümüzde doğal kaynak olan fosil yakıtların hızla tükendiği, küresel ısınma ve iklim değişikliğinin tehlikeli boyutlara ulaştığı, temiz enerji kaynaklarına olan ihtiyaç daha fazla önem kazanmıştır. Kyoto protokolü ve Paris iklim sözleşmesi ile CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub>, SF<sub>6</sub>, HFCs ve PFCs gibi sera gazlarının azaltılması gerekliliği bir gerçektir. Ersoy (2017), sera gazlarından olan CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> ve N<sub>2</sub>O gibi gazlar tarım ve hayvancılık faaliyetleri sonucu oluşumları söz konusu olduğunu ifade etmiştir. Biyogaz tesislerin yapılması ile gaz emisyonların yayılmasının önüne geçilerek, küresel ısınmanın ilerleyişinin azaltılmasına katkı sağlanacaktır.

Bu çalışmada hesaplanan biyogaz enerjisi; evlerde, yemek pişirme, aydınlanma ve ısınma, sanayide, elektrik ve ısı enerjisi elde edilmesi, tarım da ise sera ısıtmada kullanılabilir. Ayrıca il

genelinde fosil yakıt kullanımı yerine yenilenebilir enerji kaynaklarından biri olan biyogaz enerjisinin kullanılması ile elde edilecek elektrik enerjisinden yıllık 78 465 ton CO<sub>2</sub> emisyon salınımı azaltılmasına bağlı karbon tasarrufu sağlanabilecektir. Biyogaz tesislerin kurulması ile hayvansal atıkların kontrollü bir şekilde bertarafı sonucunda çevreye vereceği zararlar (koku, yayılı kirlilik yükü, CO<sub>2</sub> gibi) minimum düzeye indirilmiş ve enerji elde edilmesi sonucunda oluşan fermente edilmiş hayvansal gübrelerin organik gübre olarak da tarım arazilerinde değerlendirilmesine imkân sağlanmış olunacaktır. Ayrıca tarım ve hayvancılığın geliştirilmesine ve yaygınlaştırılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Sonuç olarak bu tesislerin kurulması ile hem geleneksel enerji kaynaklarının sebep olduğu emisyonlar azaltılmış olacak hem de sürdürülebilir kalkınmaya destek olacaktır.

### Çıkar Çatışması

Makalenin planlanması, yürütülmesi ve yazılması sırasında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederim.

### Yazar Katkısı

Makalenin planlanmasının, yürütülmesinin ve yazılmasının makalenin tek yazarı olarak tarafımdan yapıldığını beyan ederim.

### KAYNAKLAR

- Akbay HEG, Kumbur H, 2020. Determination of Biogas Potential of Livestock Manure: A Case Study from Mersin Province. *Academic Platform Journal of Engineering and Science*, 8 (2): 295-303.
- Aksu Y, 2019. Amasya ilindeki hayvansal atıkların biyogaz potansiyelinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Aktaş T, Özer B, Soyak G, Ertürk MC, 2015. Tekirdağ İli'nde Hayvansal Atık Kaynaklı Biyogazdan Elektrik Üretim Potansiyelinin Belirlenmesi. *Tarım Makinaları Bilimi Dergisi*, 11 (1): 69-74.
- Altıkat S, Çelik A, 2012. Iğdır İlinin Hayvansal Atık Kaynaklı Biyogaz Potansiyeli. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2 (1): 61-66.
- Aras E, Tekay N, 2018. Çevre ve Şehircilik Bakanlığı Iğdır İli 2018 Yılı çevre durum raporu. T.C. Iğdır Valiliği Çevre ve Şehircilik İl Müdürlüğü, [https://webdosya.csb.gov.tr/db/ced/icerikler/igdr\\_r\\_cdr2018-20190930172121.pdf](https://webdosya.csb.gov.tr/db/ced/icerikler/igdr_r_cdr2018-20190930172121.pdf) (Erişim Tarihi 20.11.2021).
- Ardıç İ, Taner F, 2014. Biokütleden Biyogaz Üretimi I. Anaerobik Arıtımın Temelleri, [https://www.emo.org.tr/ekler/14101ec47c52b48\\_ek.pdf](https://www.emo.org.tr/ekler/14101ec47c52b48_ek.pdf) (Erişim Tarihi 20.11.2021).
- Argun YA, Doğru S, Altıkat A, Bingül Z, 2016. Renewable Energy Sources of TRA2 Region (Iğdır, Kars, Ardahan and Ağrı) for Sustainable Development. *International Energy & Engineering Conference (UEMK)*, 13-14 October, Gaziantep/ TURKEY.
- Avcıoğlu AO, Çolak A, Türker U, 2013. Türkiye'nin Tavuk Atıklarından Biyogaz Potansiyeli. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 10 (1): 21-28.
- Ay ÖF, Kaya A, 2020. Kahramanmaraş İlinin Hayvansal Atık Kaynaklı Biyogaz Potansiyeli. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10 (4): 2822-2830.
- Aybek A, Üçok S, İspir S, Bilgili ME, 2015. Türkiye'de Kullanılabilir Hayvansal Gübre ve Tahıl Sap Atıklarının Biyogaz ve Enerji Potansiyelinin Belirlenerek Sayısal Haritalarının Oluşturulması. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 12 (3): 109-120.
- Ayhan A, 2015. Biogas Production Potential from Animal Manure of Bursa Province. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 29 (2): 47-53.
- Baran M, Lüle F, Gökdoğan O, 2017. Adıyaman İlinin Hayvansal Atıklardan Elde Edilebilecek Enerji Potansiyeli. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 4 (3): 245-249.

- Bayrak Işık EH, Polat F, 2018. The Biogas Potential That Can Be Obtained from The Animal Wastes of Tokat Province. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, 7 (3): 93-100.
- Bond T, Templeton MR, 2011. History and Future of Domestic Biogas Plants in The Developing World. *Energy For Sustainable Development*, 15 (4): 347-354.
- Bozacı S, 2017. Kırşehir İlinin Hayvansal Atık Kaynaklı Biyogaz Potansiyelinin Belirlenmesi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 4 (4): 447-455.
- Bozacı S, Akyüz A, Kükürtçü M, 2011. Büyükbaş Hayvan Barınaklarında Gübrenin Yarattığı Çevre Kirliliği ve Çözüm Olanakları. *International Journal of Agricultural and Natural Sciences*, 4 (1): 49-55.
- Bulut AP, Canbaz GT, 2019. Hayvan Atıklarından Sivas İli Biyogaz Potansiyelinin Araştırılması. *Karalmas Science and Engineering Journal*, 9 (1): 1-10.
- Çağlayan GH, Koçer NN, 2014. Muş İlinde Hayvan Potansiyelinin Değerlendirilerek Biyogaz Üretiminin Araştırılması. *Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2 (1): 215-220.
- Çevik A, 2016. Çanakkale İli'ndeki hayvansal atıkların biyogaz potansiyelinin değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, Çanakkale.
- Dağtekin M, Aybek A, Bilgili ME, 2019. Adana ve Mersin'de Bulunan Etlik Piliç Kümeslerinde Oluşan Gübrenin Biyogaz ve Elektrik Üretim Potansiyelinin Belirlenmesi. *Çukurova Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 34 (2): 9-22.
- Doruk İ, Bozdeveci A, 2017. Denizli İlinin Kırsal Kesimlerinde Hayvansal Kaynaklı Atıklardan Biyogaz Potansiyelinin Belirlenmesi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7 (3): 181-186.
- Ersoy AE, 2017. Türkiye'nin Hayvansal Gübre Kaynaklı Sera Gazı Emisyonları Durumu ve Biyogaz Enerjisi Potansiyeli, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış).
- Eryaşar A, Koçar G, 2009. Biyogazın Mevcut Isıtma Sistemlerinde Kullanılabilme Olanakları. *Engineer & The Machinery Magazine*, 50 (590): 10-16.
- Gökdoğan O, 2019. Isparta İlinin Hayvansal Atıklarından Elde Edilebilecek Enerjinin Sera Isıtmasında Kullanımı. *Akademia Doğa ve İnsan Bilimleri Dergisi*, 5(1): 27-34.
- Görgülü S, 2019. Burdur İlinin Hayvansal ve Bazı Tarımsal Atık Kaynaklı Biyogaz Potansiyelinin Belirlenmesi. *El-Cezeri Journal of Science and Engineering*, 6 (3): 543-557.
- İlgar R, 2016. Hayvan Varlığına Göre Çanakkale Biyogaz Potansiyelinin Tespitine Yönelik Bir Çalışma. *Eastern Geographical Review*, 21 (35): 89-106.
- Karaman S, 2006. Hayvansal Üretimden Kaynaklanan Çevre Sorunları ve Çözüm Olanakları. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9 (2): 133-139.
- Kaya D, Öztürk HH, 2012. Biyogaz Teknolojisi: Üretim-Kullanım-Projeleme, Umuttepe Yayınları, İzmit/Kocaeli, 253.
- Kocabey S, 2019. Balıkesir İli İçin Hayvansal Atık Kaynaklı Biyogaz Potansiyelinin Belirlenmesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (17): 234-243.
- Koçer NN, Öner C, Sugözü İ, 2006. Türkiye'de Hayvancılık Potansiyeli ve Biyogaz Üretimi. *Fırat Üniversitesi Doğu Araştırmaları Dergisi* 4 (2): 17-20.
- Konuk M, 2019. Tokat ilindeki hayvansal atıkların biyogaz potansiyelinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Melikoglu M, 2013. Vision 2023: Feasibility analysis of Turkey's renewable energy projection. *Renewable Energy*, 50:570-575.
- Omer A, Fadalla Y, 2003. Biogas Energy Technology in Sudan. *Renewable Energy*, 28 (3): 499-507.

- Salihoğlu NK, Teksoy A, Altan K, 2019. Büyükbaş ve Küçükbaş Hayvan Atıklarından Biyogaz Üretim Potansiyelinin Belirlenmesi: Balıkesir İli Örneği. Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 8 (1): 31-47.
- Seyhan AK ve Badem A, 2021. Erzincan ili hayvansal atık kaynaklı biyogaz potansiyelinin değerlendirilmesine yönelik biyogaz tesisi senaryoları. Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(1): 245-256.
- Seyhan AK, Badem A, 2018. Erzincan İlindeki Hayvansal Atıkların Biyogaz Potansiyelinin Araştırılması. Academic Platform Journal Of Engineering And Science, 6 (1): 25-35.
- Sözer S, Kabaş Ö, Ünal İ, 2016. Biyogaz Üretimini Arttırmada Kullanılan Ön İşlemlere Bir Bakış. Tarım Makinaları Bilimi Dergisi, 12 (3): 171-176.
- Şenol H, Elibol EA, Açıkel Ü, Şenol M, 2017. Biyogaz Üretimi İçin Ankara'nın Başlıca Organik Atık Kaynakları. Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 6 (2): 15-28.
- Taşova M, 2019. Tokat-Erbaa İlçesindeki Hayvansal Kaynaklı Atıkların Enerji Potansiyel Değerlerinin Belirlenmesi. TÜBAV Bilim Dergisi, 12 (1): 14-19.
- Taşova M, Yazarel S, 2019. Yozgat İli Hayvansal Kaynaklı Atıkların Biyogaz ve Enerji Potansiyellerinin Belirlenmesi. International Journal of Life Sciences And Biotechnology, 2 (1): 16-24.
- Teker GN, Yılmaz A, 2018. Dokuz Eylül Üniversitesi Tinaztepe Kampüsü İnşaat-Çevre Mühendisliği Bölümleri-İşletme Fakültesi Binaları Enerji Etüt Raporu. Setaş Enerji San. Tic. Ltd. Şti., <http://www.iklimin.org/wp-content/uploads/2018/01/4-Seta%C5%9F-Enerji-Verimlili%C4%9Fi-Et%C3%BCd%C3%BC-Raporu.pdf> (Erişim Tarihi 20.11.2021).
- Tırınk S, 2021. Iğdır İli ve İlçelerindeki Hayvansal Atıkların Çevresel Etkileri ve Yayılı Kirletici Yükü Hesabı. Black Sea Journal of Engineering and Science, 4 (2): 43-50.
- TÜİK, 2020. Türkiye İstatistik kurumu (TÜİK) veri tabanı, <https://tuikweb.tuik.gov.tr/> (Erişim Tarihi 20.11.2021).
- Yağlı H, Yıldız K, 2019. Hayvan Gübresinden Biyogaz Üretim Potansiyelinin Belirlenmesi: Adana İli Örnek Hesaplama. Çukurova Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, 34 (3): 35-48.
- Yetiş AD, Gazigil L, Yetiş R, Çelikezen B, 2019. Hayvansal Atık Kaynaklı Biyogaz Potansiyeli: Bitlis Örneği. Akademik Platform Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi, 7 (1): 74-78.

**Atf İçin:** Çimen ME, Garip Z, Emekli M, Boz AF, 2022. Isı Eşanjörünün Aşım Kısıtı Altındaki Kontrolü için Genetik Algoritma Kullanarak Bulanık Pıd Denetleyisinin Tasarımı. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 164-181.

**To Cite:** Çimen ME, Garip Z, Emekli M, Boz AF, 2022 Fuzzy Logic PID Design using Genetic Algorithm under Overshoot Constrained Conditions for Heat Exchanger Control. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 164-181.

## Fuzzy Logic PID Design using Genetic Algorithm under Overshoot Constrained Conditions for Heat Exchanger Control

Murat Erhan ÇİMEN<sup>\*1</sup>, Zeynep GARİP<sup>2</sup>, Mehmet EMEKLİ<sup>1</sup>, Ali Fuat BOZ<sup>1</sup>

**ABSTRACT:** In this study, a controller design was carried out for the heat exchanger, which is widely used in the industry. Firstly, Zeigler Nichols step, Zeigler Nichols frequency, AMIGO step and AMIGO frequency methods were used for the PID controller in the control of this system. Then, using the mathematical model of the heat exchanger system, 2%, 5% and 10% overshoot constraints were added to the ISE performance criteria, and controller designs were realized with genetic algorithm. In addition, two different topologies were used for the fuzzy PID controller in the controller design. The results obtained were examined and it was seen that the design realized with fuzzy logic for this study could be improved more. However, topologies designed with fuzzy logic have obtained better results than classical PID controllers and the classical PID designed study in the literature.

**Keywords:** Heat exchanger, genetic algorithm, fuzzy pid, constrained optimization

<sup>1</sup> Murat Erhan ÇİMEN ([Orcid ID: 0000-0002-1793-485X](https://orcid.org/0000-0002-1793-485X)), Mehmet EMEKLİ ([Orcid ID: 0000-0001-9917-7057](https://orcid.org/0000-0001-9917-7057)), Ali Fuat BOZ ([Orcid ID: 0000-0001-6575-7678](https://orcid.org/0000-0001-6575-7678)), Sakarya University of Applied Sciences, Faculty of Technology, Department of Electrical and Electronic Engineering, Sakarya, Turkey

<sup>2</sup> Zeynep GARİP ([Orcid ID: 0000-0002-0420-8541](https://orcid.org/0000-0002-0420-8541)), Sakarya University of Applied Sciences, Faculty of Technology, Department of Computer Engineering, Sakarya, Turkey

**\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Murat Erhan ÇİMEN, e-mail: muratcimen@subu.edu.tr

## INTRODUCTION

Chemical processes have an important place in the industry as they are used a lot in areas such as medicine, milk, food, air conditioning-refrigerator-cooling and petroleum, which meet the basic needs of human beings. For this reason, it is also important to control the devices used in chemical processes. One of these devices of the chemical processes is heat exchangers. Heat exchangers are devices that transfer the temperature of the fluid given to the inlet to the outlet by decreasing or increasing it. Especially, heat exchangers used in chemical processes are preferred because they can be designed in many different sizes, they are high efficiency and low cost. In heat exchangers, the speed, temperature and pressure of the fluid are controlled in order to achieve the desired quality in the production of chemical products. In addition, it is desired to keep the heat value of the fluid taken from the output of the system constant in case of disturbance to the system or under changing conditions. Many different control techniques have been applied in the control of the heat exchanger, and the most common is PID controllers.

In particular, there is on-off control, which is widely used in the control of refrigerators, which is one of the thermal systems (Hamid et al., 2009; Mraz 2001). This method is based on operating the cooler with the help of a thermostat. If the temperature of the refrigerator is not at the desired value, the refrigerator is tried to be cooled. Otherwise, the system does not apply any check marks. Hamid et al. used a PID controller to control the temperature of the refrigerator (Hamid et al., 2009). Tridianto et al. carried out their study with a cascaded PID controller in the control of Shell and tube heat exchanger system (Tridianto et al., 2017). Subsequently they performed the Heat Exchanger control with PID in their study and examined its dynamic effects (Tridianto et al., 2017). Khare et al. carried out the design of PID and Internal Mode Control under the control of the heat exchanger and compared their results (Khare et al., 2010). Padhee et. al. used the autotuning technique for the recognition of the Heat Exchanger System and designed a controller with the Zeigler Nichols method. In addition to PID, they added feedforward and designed it in feedforward-PID. In addition to these, they also designed the Internal Model Controller and compared the results of all of them (Padhee et al., 2011). Isa et al. carried out a PID controller design using the M-Constrained Integral Gain Optimization (MIGO) method for the heat exchanger. They examined the effect of sampling time (Isa et al., 2014). In addition, Vasickaninová et al. performed the control of the heat exchanger system with PID as well as artificial neural networks predictive control (Vasičkaninová et al., 2011). Apart from these, Khames et al. carried out the control of the heat exchanger by using the sliding mode control method, which is one of the non-linear control methods (Khames et al., 2020). Soesanti et al., in their study, directly controlled the heat exchanger system with a takagi sugeno-based fuzzy-based control (Soesanti et al., 2019). Kishore et al., on the other hand, carried out the control of the system by using the PI fuzzy structure in the control of the heat exchanger. As a result, they compared fuzzy logic controller and PI based fuzzy logic control of this structure (Kishore et al., 2013). Kesavan et al. also performed a PID-based control under the control of the heat exchanger. They are designed with the Particle Swarm optimization algorithm of the PID controller. They compared their results with internal Model Controller (Kesavan et al., 2016). Reddy, on the other hand, performed the control of the heat exchanger with a PID-based fuzzy logic controller in their study. They used Genetic algorithm to determine the parameters of the controller (Reddy et al., 2020).

In this study, the control of the heat exchanger is designed classically and fuzzy logic based controllers. Classically designed PID controllers are designed according to Zeigler Nichols step, Zeigler Nichols frequency, AMIGO PID step and frequency methods. Then, using genetic algorithm, PID

controller design was carried out according to ISE performance criteria. After that, fuzzy logic was performed with PID controllers according to ISE performance criteria by using genetic algorithm. A similar study exists for fuzzy logic based PID. However, in the study of Reddy and his friend (Reddy et al., 2020), information such as fuzzy logic controller topology and fuzzy logic membership functions and rule table have not been expressed clearly. For this reason, the simulation study on fuzzy PID that Reddy et al. have done could not be applied in this study. For this reason, only the results with the classical PID could be compared. In addition, in this study, the topologies for the fuzzy logic-based controller are given clearly to contribute to the studies in the literature. In addition, Zeigler Nichols and AMIGO methods are compared for classical PID controller design in controlling the heat exchanger. In addition, the originality of this study; The overshoot is added to the objective criterion with a penalty function as a constraint at certain desired values, and a fuzzy-based PID controller is designed for different topologies using genetic algorithms. This is applied to the heat exchanger, which is a very common system in the industry.

In the 2nd Section of this study, the modeling of the heat exchanger is given in the materials and methods section. PID and Fuzzy PID controller, purpose criterion, Genetic Algorithm and Controller design are given as the basis. In 3rd Section, the results obtained in the control of the heat exchanger are given and the results are analyzed and discussed in detail. In the 4th Section, conclusion is given.

## MATERIALS AND METHODS

### Heat Exchanger Model

Heat exchangers are probably used in many places in industry such as food, cleaning, medicine, dairy, food, air conditioning-refrigerator-refrigeration and petroleum. In the chemical process industry, the shell and tube heat exchanger is usually encountered (Kesavan et al., 2016; Kishore et al., 2013; Soesanti et al., 2019). A shell and a number of tubes make up this sort of heat exchanger. Heat is transferred from hot to cold fluid using a heat exchanger system. The structure of the heat exchanger system is depicted in Figure 1.

The cold fluid reservoir is connected to the tube inlet by the tube inlet pump, and the hot fluid reservoir is connected to the shell inlet by the shell inlet pump. The cold fluid passes through the tube, while the hot fluid passes through the heat exchanger's shell. The flow rate of hot and cold fluid determines the rate of heat transfer between the shell and tube. The temperature of the tube outlet is controlled by adjusting the flow rate of the shell inlet. The controller sends a command to the shell inlet pump, which regulates the flow rate depending on the tube outlet temperature (Padhee et al., 2011; Tridianto et al., 2017). Generally it was rather difficult to obtain an accurate model with the present method (Reddy et al., 2020). Thus most of the chemical processes are modelled first order system or second order system due to complexity.



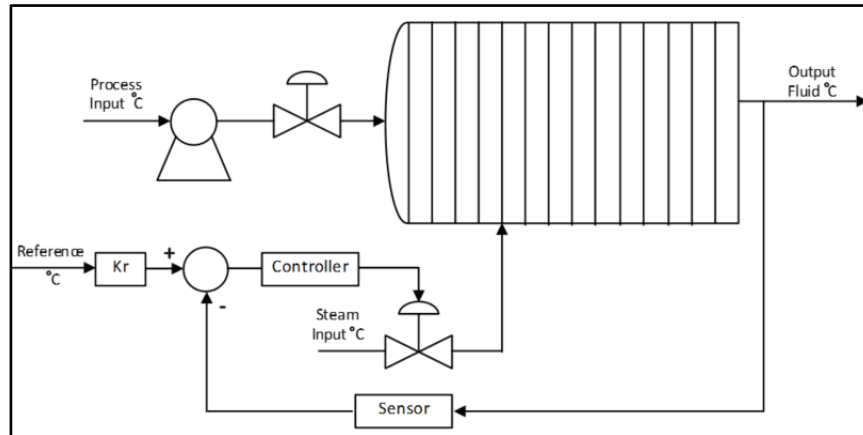


Figure 1. Heat Exchanger System Control Diagram

For simplicity, each structure is modeled as a first-order system. So Plant model is given as in Equation 1. Valve changes system dynamic and its model is given as in Equation 2. Sensor' model is given as in Equation 3 (Reddy et al., 2020). The control block structure of the heat exchanger to be controlled is given in Figure 2.  $K_r$  given in the system is an actuator coefficient and its value is taken as 0.16 (Reddy et al., 2020).

$$G_{plant} = \frac{50}{30s+1} \quad (1)$$

$$G_{valve} = 0.13 \times \frac{0.75}{3s+1} \quad (2)$$

$$G_{sensor} = \frac{0.16}{10s+1} \quad (3)$$

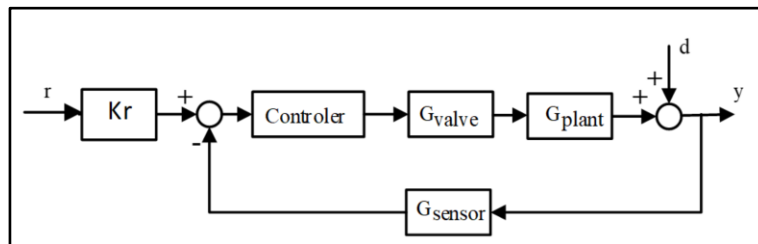


Figure 2. Control block structure of heat exchanger

### PID controller

The most common type of controller encountered in controlling systems in industry is the PID controller type. It was proposed by studies by Ziegler and Nichols in the mid-19th century (Ziegler and Nichols, 1942; Ziegler and Nichols, 1943). In the proposed methods, the controller design was carried out from the reaction of the system to the step input. The other method they suggest is the frequency method. In this method, the closed loop gain of the system is increased, allowing the system to oscillate, and a controller design has been carried out according to the oscillation response of the system. These methods are still being developed and recently AMIGO step and AMIGO frequency methods have also been proposed (Åström and Häggglund, 2004; Häggglund and Åström, 2002). In addition to these technique, the PID controller can be designed according to an objective function with metaheuristic algorithms (Boz et al., 2017a; Boz et al., 2017a; Çimen et al., 2019; Çimen et al., 2017; Çimen et al., 2021a; Rajagopal et al., 2021; Yılmaz et al., 2021). Generally this controller has a three parameters that are Proportional constant ( $K_P$ ), Integral constant ( $K_I$ ), and Derivative constant ( $K_D$ ).

$$G_{PID} = K_P + K_I \frac{1}{s} + K_D s \quad (4)$$

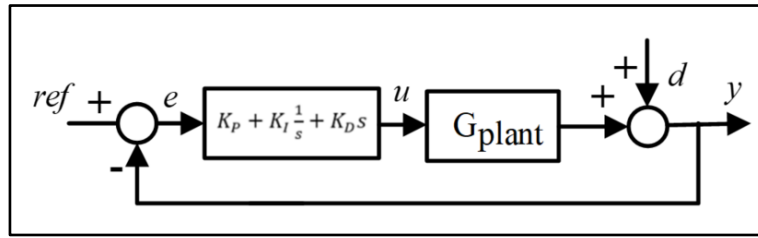


Figure 3. Control block diagram of heat exchanger

### Fuzzy PID controller

Fuzzy logic was first introduced in 1964 by Lotfi A. Zadeh, an Azerbaijani scientist. Fuzzy logic inferences work with fuzzy sets (Zadeh, 1996). While classical sets use only bivalent membership values, fuzzy sets expand by using intermediate values as the concept of partial membership (Peçe, et. al., 2020). Fuzzy sets are widely used most effectively to quantify verbal expressions. This feature also makes fuzzy logic inferences more effective. The operation of a simple fuzzy inference mechanism is illustrated in Figure 4 (Cihan et al., 2008; Kaplan et al. 2020).

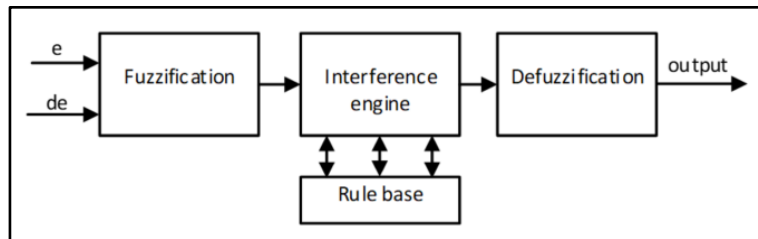
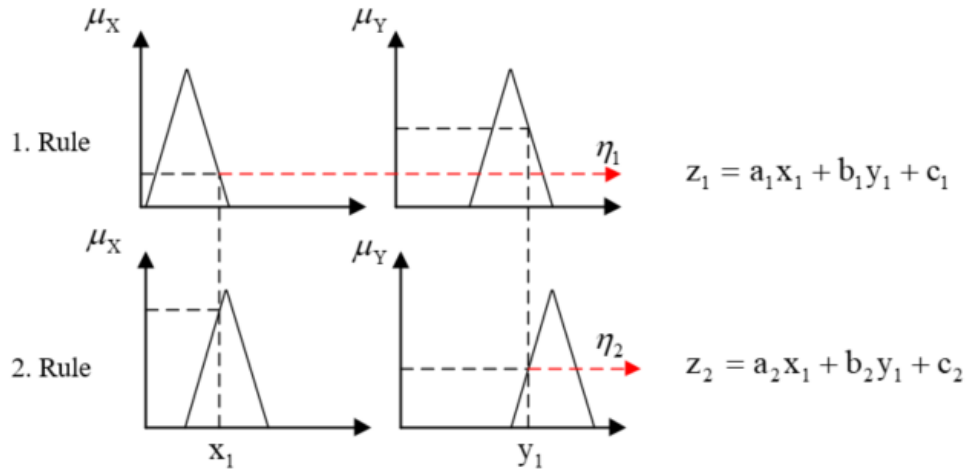


Figure 4. Fuzzy logic inference scheme

In the literature, there are Type 1 and Type 2 fuzzy inference structures using Mamdani and Takagi-Sugeno structures. In this study, Takagi-Sugeno method in Type 1 structure was preferred due to its ease of processing. In order to produce fuzzy inference in the Mamdani and Takagi-Sugeno structure, the inputs must be fuzzied. As shown in Figure 4, the inputs should be fuzzied first. Then, inference should be made according to the rule table and then defuzzification should be done. In Figure 5, an example fuzzy inference structure is given for Takagi-Sugeno. Input membership functions are given in triangular form and there are  $x$  and  $y$  inputs. The  $x$  inputs are blurred with the  $\mu_X$  fuzzy set, while the  $y$  inputs are blurred with the  $\mu_Y$  fuzzy set. The output membership function is associated with the determined polynomial membership functions. In the 1st rule, the minimum value  $\eta_1$  of the value produced from the fuzzy sets  $\mu_X$  and  $\mu_Y$  is determined. Then the  $z_1$  value is determined. The same operations are performed for all rules as in Equation 5. Then the output is determined by taking the average of these values as in Equation 6.

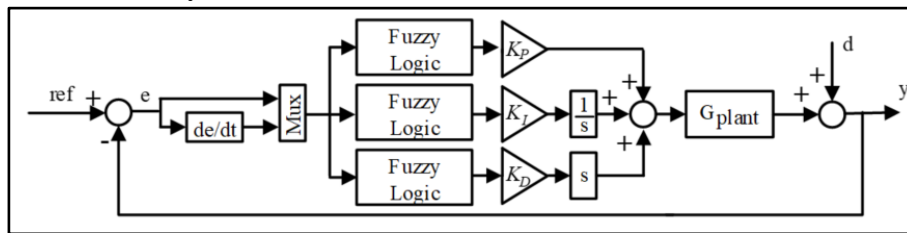
$$z_i = \mu_X(X_1) \cap \mu_Y(Y_1) \quad 5$$

$$z_{output} = \frac{\sum_{i=1}^n z_i \eta_i}{\sum_{i=1}^n \eta_i} \quad 6$$



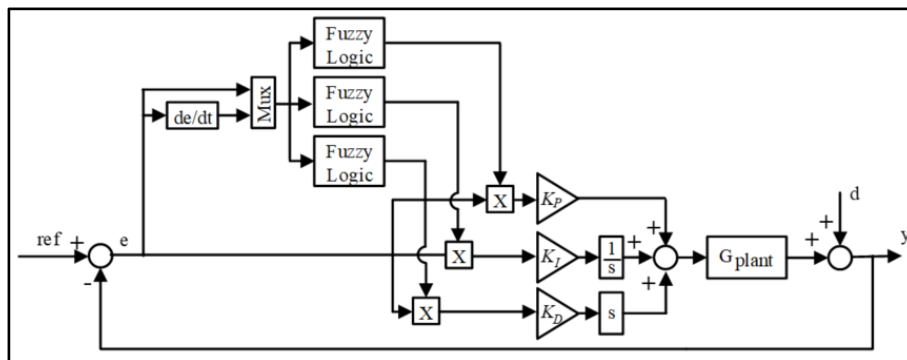
**Figure 5.** Takagi-Sugeno fuzzy inference system

In particular, fuzzy logic has been successful in overcoming the difficulties in nonlinear system modeling and control. For this reason, it has found a wide variety of uses in the field of control engineering. Fuzzy controllers can have very different inputs and very different outputs used to control the system, depending on the system to be controlled (Gül et al., 2021). A simple fuzzy-PID controller structure is shown in Figure 6. In this controller, both the error and the change of the error are taken as input. Since different situations may occur for different systems, a sufficient number of appropriate control inputs should be determined. Each fuzzy logic produces an output value and a control output is produced for system control by means of these values (Cihan et al., 2008).



**Figure 6.** Fuzzy PID control diagram

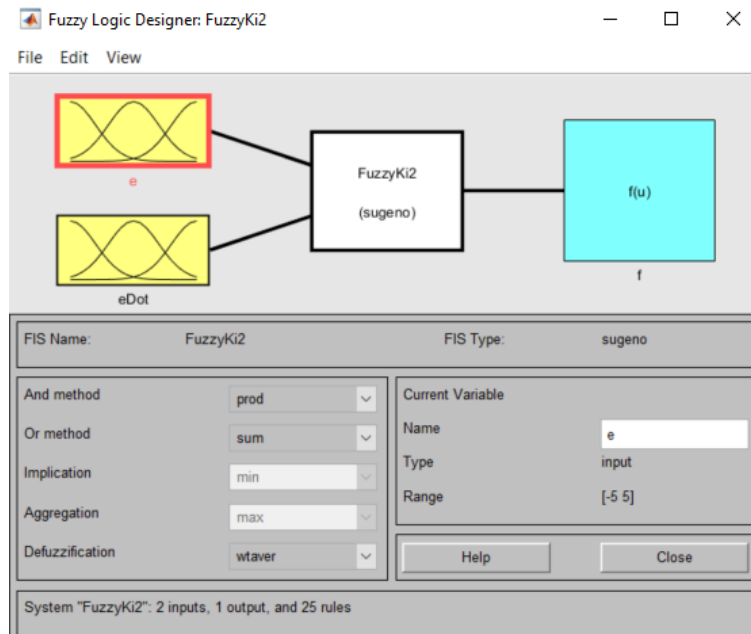
In the structure given in Figure 7, the signal coming to the PID block is produced directly from fuzzy logic structures. This requires the output of the fuzzy logic to produce values in a very wide range. Instead, in this study, a topology will be used in which the control signal will be generated by adjusting the error signal coming to the inputs of the control parameters. This topology is given in Figure 7.



**Figure 7.** PID control diagram weighted with Fuzzy Logic

Five triangular membership functions are used for the temperature error ( $e$ ) to be used to control the system. Five triangular memberships were used for the derivative error ( $eDot$ ) of the temperature, which is the other input value to be used. Fixed membership function is used in its output. In this way,

fuzzy logic is made singleton. The membership functions values of temperature error ( $e$ ) used in fuzzy sets are Negative Large (NL), Negative Small (NS), Zero (ZR), Positive Large (PL), Positive Small (PS). Parameters of ( $e$ ) membership functions have been determined by genetic algorithm in the range of  $[-5, 5]$ . The membership functions values of derivative error of temperature ( $eDot$ ) used in fuzzy sets are Negative Large (NL), Negative Small (NS), Zero (ZR), Positive Large (PL), Positive Small (PS). Parameters of membership functions ( $eDot$ ) have been determined by genetic algorithm in the range of  $[-1,1]$ . Ranges of  $eDot$  is smaller than  $e$  because time constant of the system is high, that is, system response speed is at low level. On the outputs, Positive Large (PL) is constant 1, Positive Small (PS) is constant 0.5 and Zero (ZR) is constant 0 membership functions are used. The reason why negative constant values are not used in output membership functions; It is possible to prevent the system from entering a possible instability when the controller parameters are weighted with a negative weight. All details about membership function parameters are depicted in Table 6 and Table 8 before each applications. Because these parameters are only valid on the relevant control system. Nevertheless, general fuzzy logic structure of the system used in Matlab is given in Figure 8. In Figure 8, inputs and outputs fuzzy inference structure is given.



**Figure 8.** Fuzzy logic interference

A rule table is needed in order to process the fuzzy error and error variation input in fuzzy membership functions and to obtain the appropriate control output from the output membership function in Figure 8. The rule table created for the five-variable case in this study is given in Table 1.

In the created rule table, the “ $e$ ” parameter shows the error and the “ $eDot$ ” parameter shows the change of the error. In this study, that is depicted at Figure 8, the and operator is used as prod in the rule firing method in fuzzy logic control design and the output membership functions are constant values. In Figure 8, the average method was used for defuzzification.

In this study, PID controller with fuzzy logic is used to control the heat exchanger. Since there may be different topologies when fuzzy logic and PID controller are combined, only two different topologies are applied in this study. One of them is the topology where fuzzy logic is applied to the  $K_p$  value as shown in Figure 9. The second topology is the fuzzy logic topology of the  $K_i$  value given in Figure 10.

**Table 1.** Fuzzy logic rule table

e/de	NL	NS	ZR	PS	PL
NL	PL	PL	PL	PL	PL
NS	PS	PS	PS	PS	PL
ZR	PS	PS	ZR	PS	PS
PS	PS	PS	PS	PS	PL
PL	PL	PL	PL	PL	PL

### Objective Function and Penalty Function

The objective function or fitness function in an optimization problem is a real-valued function whose value is to be either maximized or minimized with regard to a set of possible solution. The objective function is an indispensable part of all optimization problems, starting from our daily life and involving inextricably complex problems. For example, in an intercity journey, it is an objective function to adjust the speed with minimum risk and minimum fuel consumption. On the other hand, completing the journey of the same vehicle in the shortest time is also a different objective function. Optimization is made over the objective function by using variables such as adjusting the speed and taking a break to fulfill this purpose. When the objective function is considered, it is definitely found in places such as Corporate Finance, Investments Production Distribution Purchasing Human Resources, Airlines and Trucking Oil and Gas, Agriculture, Electric Power, Financial Services, where optimization is available. There are many constraints in achieving these goals. An exemplary unimodal objective function to be minimized in the simplest way is given in Figure 11a. An example of a multimodal objective function with more than one local point is given in Figure 11b. However, since everything can be a constraint in real life, Figure 11c and Figure 11d are given to express the constraints in these functions. The minimum values of these two functions did not change under the constraints, but the problems became constrained problems (Çimen et al., 2021b; Garip et al., 2021). Therefore, when constraints are added to the objective function, it becomes a constrained optimization problem.

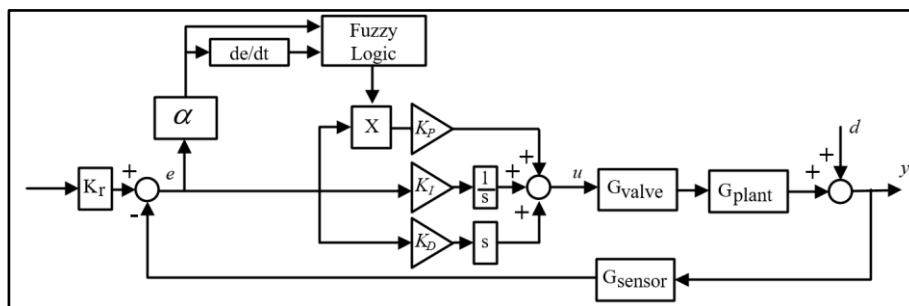


Figure 9. PID controller topology with fuzzed  $K_p$

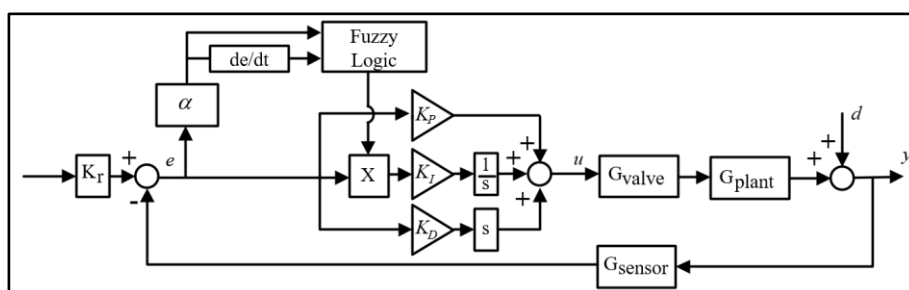
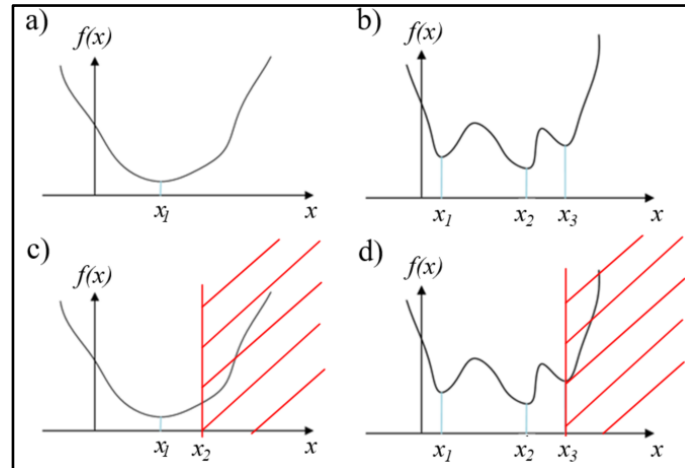


Figure 10. PID controller topology with fuzzed  $K_i$

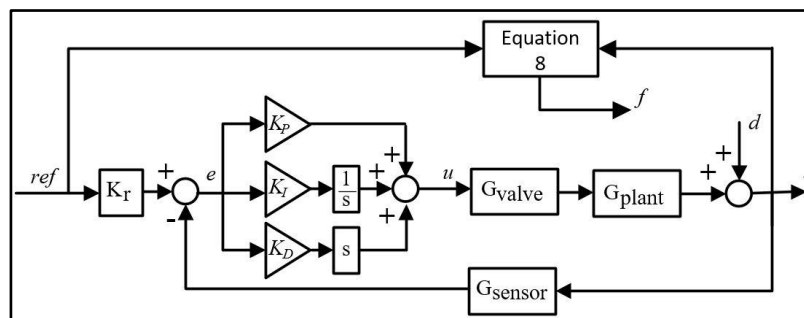


**Figure 11.** a) unimodal, b) multimodal c) constrained unimodal d) constrained multimodal objective functions

In this study, it is desired to minimize the Integral Square Error (ISE) that is an error between the system response and the reference signal. This equation is given in Equation 7. In addition, an overshoot constraint will be added to the system as it is desired that the overflow remains at a certain level in the system. The overshoot will be accomplished by adding a penalty function to the objective function. This process is given in Equation 8. Therefore, the block diagram for a system to be designed with a PID controller is given in Figure 12. According to the value of the error signal ( $e$ ), the controller generates a control signal ( $u$ ) is applied to the system and the system responds ( $y$ ). Depending on the system response and the reference, a value is generated from Equation 8 with an objective function. The objective is to minimize the value obtained from the objective function for the controller design problem.

$$ISE = \int (ref - y)^2 dt \quad (7)$$

$$f = \begin{cases} ISE & \text{Overshoot is acceptable} \\ ISE + 10^5 & \text{other} \end{cases} \quad (8)$$

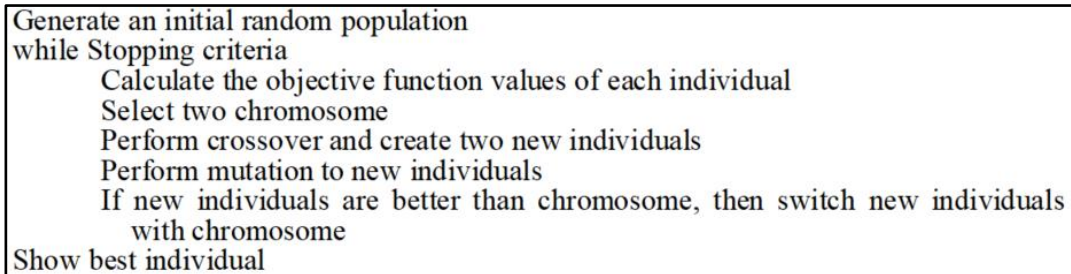


**Figure 12.** Obtaining the objective function value obtained according to the parameters of the PID controller used of the heat exchanger according to equation 8

### Genetic Algorithm

Genetic algorithm is an algorithm designed by inspired by the sequence of genes and chromosomes and developed for solving difficult problems (Çimen et al., 2017). Chromosomes are created by coding the parameters of the problem studied in the first stage of genetic algorithms. An initial population of these chromosomes is then created. Each chromosome in the population is a candidate for solving the problem. Then, some chromosomes are selected from the population and better chromosomes are tried to be obtained by applying "crossover" and "mutation" genetic operators based on genetic processes in nature. With successive iterations, new generations are created and the fitness values of these new

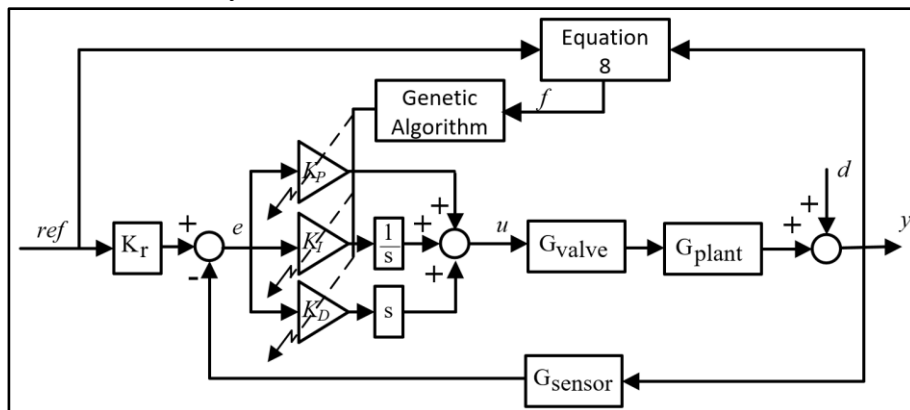
generations are compared with those in the population. Chromosomes with better fitness values among the chromosomes in the new generations are included in the population. In this way, the chromosomes in the population renew themselves with better chromosomes in an evolutionary process. This process continues until the number of new generations reaches a certain number or until there is a certain amount of improvement in fitness values in the population (Çolak, 2010; Mirjalili, 2019; Sourabh et al., 2021). Pseudocode of this algorithm is given in Figure 13.



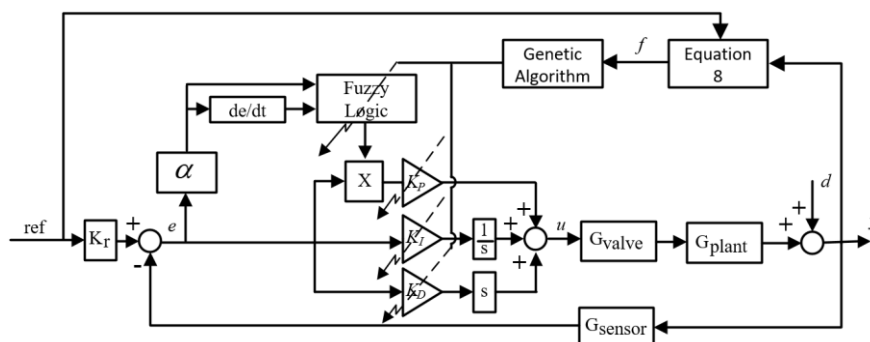
**Figure 13.** Pseudocode of genetic algorithm

### Controller Design

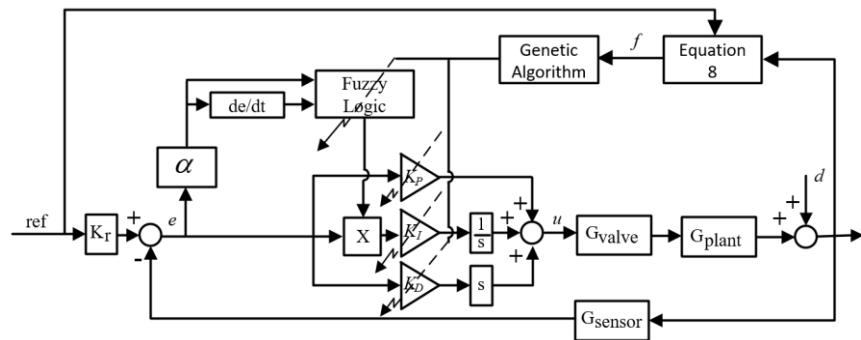
The general structure in Figure 14 is used to design the controller for the heat exchanger. In this structure, the design of the PID controller with Genetic Algorithm is shown, since it is basic. In this method in which the genetic algorithm is run, PID parameters are tried to be determined so that Equation 8 is the minimum for all population values. The fuzzy PID structure is also similar. Controller design was carried out by adding fuzzy logic block structures as in Figure 15 and Figure 16. The error signal ( $e$ ) that enters the fuzzy logic is multiplied by  $\alpha$  to decrease the input value of fuzzy logic. This  $\alpha$  value was determined as 0.1 in the study.



**Figure 14.** Determination of PID controller parameters used in the control of the heat exchanger by genetic algorithm



**Figure 15.** Determination of PID controller with fuzzy  $K_p$  parameters used in the control of the heat exchanger by genetic algorithm



**Figure 16.** Determination of PID controller with fuzzy  $K_i$  parameters used in the control of the heat exchanger by genetic algorithm

## RESULTS AND DISCUSSION

All simulation studies were performed on a computer with Intel (R) Core (TM) i5-3470 CPU @ 3.20 Ghz, 64 Bit, 8 GB RAM in Windows 10 operating system. The simulation run time of Heat exchanger is chosen as 400 sec and the set point temperature is kept at 90°C. Firstly PID controller are designs by using Zeigler Nichols Step method, Zeigler Nichols frequency method, AMIGO step method and AMIGO frequency method. Secondly, by using a Genetic Algorithm, PID controller designs are conducted with regard to for each 2%, 5% and 10% overshoots constrained. Then, Fuzzy PID controllers for two topology are designed by using Genetic Algorithm for Heat Exchanger System with regard to for each 2%, 5% and 10% overshoots constrained. Since Genetic Algorithm was used, its parameter values are given in Table 2. In addition, the parameters of the variables to be determined in the Genetic Algorithm are given in Table 3. The results are given in Table 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10. Best results in in Tables in terms of optimization are written bold. While Table 4-9 presents individual results with respect to control, Table 10 summaries all results considered, that enable us to see from a wider perspective.

**Table 2.** Genetic Algorithm parameters

Constituent	Value or Method
Population size	100
Maximum iteration	500
Crossover	0.8
Mutation	0.01
Selection	Stochastic Uniform

**Table 3.** Parameters ranges to be optimized in Genetic Algorithm

PID Parameter	Range of PID Parameter	e Membership Function	Range of Triangle Membership Function Parameter	eDot Membership Function	Range of Triangle Membership Function Parameter
<b>Kp</b>	[0 1000]	NL	[-5 5]	NL	[-1 1]
<b>Ki</b>	[0 2]	NS	[-5 5]	NS	[-1 1]
<b>Kd</b>	[0 1000]	ZR	[-5 5]	ZR	[-1 1]
		PS	[-5 5]	PS	[-1 1]
		PL	[-5 5]	PL	[-1 1]

### Classical PID Design

First, the results obtained when the controller was designed with classical methods are given in Table 4. As can be seen from the table, the performance values give high results classically. In addition, when Figure 15 is examined, it has given results in a way that supports this result. When we look at the classical methods, it is seen that it is very high in general and the sitting time is high. However, when



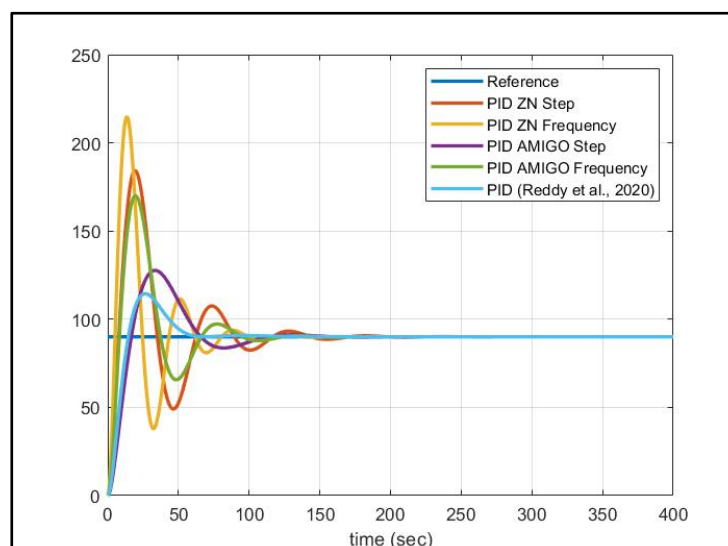
the Controller obtained in (Reddy et al., 2020)'s study is used, it has been observed that it gives better results than classical methods.

**Table 4.** Controller parameters and objective function values designed with a classical PID controller

	<b>Kp</b>	<b>Ki</b>	<b>Kd</b>	<b>Overshoot</b>	<b>Settling Time (sec)</b>	<b>ISE</b>
<b>Zeigler Nichold Step Response</b>	23.1826	1.6559	85.8419	104.67%	137	3 048.6424
<b>Zeigler Nichold Frequence</b>	44.0842	3.0614	158.7030	138.67%	95	<b>2 293.7730</b>
<b>AMIGO Step Response</b>	9.6012	0.4508	32.9506	41.89%	104.5	3 128.7820
<b>AMIGO Step Frequence</b>	22.5568	22.5568	94.7950	88.89%	111.5	2 667.6512
<b>PID (Reddy et al., 2020)</b>	13.25	0.36	56.25	<b>27.11%</b>	<b>56</b>	2 505.9090

### PID design with overshoot constraint by using genetic algorithm

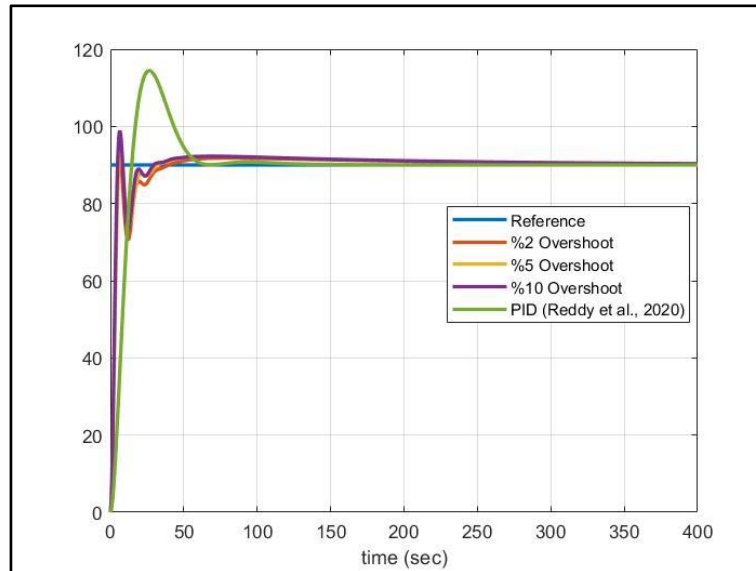
The results obtained when the PID controller designed by using Genetic Algorithm by adding the overshoot constraint, are given in Table 5. As can be seen from the table, it is seen that the objective function value decreases as the overshoot constraint value softens. The obtained settling time for the designed controllers is also given in the table. Since settling time is not considered as a constraint in this study, it is given only as one of the results. Therefore, the comparison was generally made on the objective function. In addition, it was observed that the duration of the simulation decreased with the increase in the overshoot constraint softens. The reason for this is that although the maximum number of iterations is constant since the constraints direct the search space first, it has been seen that making the constraints more difficult increases the time in the solution. However, as the constraints are eased, it is seen that the objective function value, which is the minimum value, decreases even more. Therefore, as the constraints change, a different optimal solution has been found, so the objective function value and the controller parameters have changed. On the other hand, the results obtained are given in Figure 18. When the results were examined, all results gave the expected results as they met the constraints. However, in the constrained condition, 10% exceeding gave the best result in terms of the overshoot constraint. As it can be understood from here, a lower objective function value can be found in the absence of an overshoot. In addition, it has been seen that it produces better results than the classical PID controller result obtained in (Reddy et al., 2020).



**Figure 17.** System responses of PID methods designed for heat exchanger control

**Table 5.** PID controller results with overshoot constrained designed with genetic algorithm

Overshoot Constraint	Kp	Ki	Kd	Overshoot	Settling Time (sec)	Processing Time (sec)	ISE	Objective Function Value
2%	69	0.3711	930.2710	1.98%	83.5	3 119.6	1772.2	1772.2
5%	65	0.4109	830.7716	4.86%	120.5	2 086.2	1730.3	1730.3
10%	75	0.4477	932.5324	9.85%	118.5	<b>678.6</b>	<b>1647</b>	<b>1647</b>

**Figure 18.** System responses of the PID controller designed with GA for the control of the heat exchanger

### Design of PID controller that is included overshoot constraint and Fuzzy Kp using genetic algorithm

The results obtained when PID controller with overshoot Fuzzy Kp was designed with genetic algorithm are given in Table 6 and Table 7. As can be seen from the Table 7, it is seen that the objective function value decreases as the overshoot constraint value softens. The obtained settling times for the designed controllers are also given in the table. Since settling time is not considered as a constraint in this study, it is given only as one of the results. Therefore, the comparison was generally made on the objective function. In addition, it was observed that the duration of the simulation decreased with the increase in the overshoot constraint softens. The reason for this is that although the maximum number of iterations is constant since the constraints direct the search space first, it has been seen that making the constraints more difficult increases the time in the solution. However, as the constraints are eased, it is seen that the objective function value, which is the minimum value, decreases even more. Therefore, as the constraints change, a different optimal solution has been found, so the objective function value and the controller parameters have changed. On the other hand, the results obtained are given in Figure 19. When the results were examined, all results gave the expected results as they met the constraints. However, in the constrained condition, 10% exceeding gave the best result in terms of the objective function value. As it can be understood from here, a lower objective function value can be found in the absence of an overshoot. In addition, it was seen that the results with PID controller with Fuzzy Kp containing 5% and 10% overshoot constraint designed by genetic algorithm produced better results than the classical PID controller results obtained in (Reddy et al., 2020).

**Table 6.** Results of PID controller design that is included overshoot constraint and fuzzy Ki using genetic algorithm

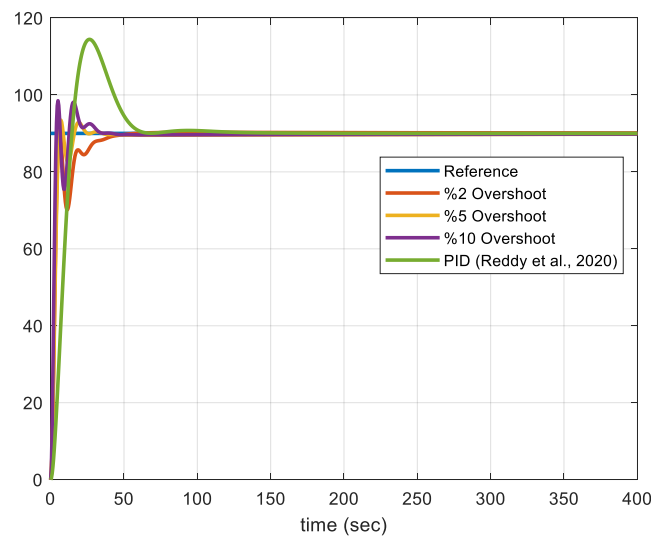
Overshoot Constraint	e Input Membership functions				
	NL	NS	ZR	PS	PL
2%	[-5 -5 -0.3452]	[-5 -0.3452 1.342]	[-0.3452 1.342 2.115]	[1.342 2.115 5]	[2.115 5 5]
5%	[-5 -5 -0.1559]	[-5 -0.1559 2.782]	[-0.1559 2.782 3.549]	[2.782 3.549 5]	[3.549 5 5]
10%	[-5 -5 -3.085]	[-5 -3.085 1.479]	[-3.085 1.479 1.677]	[1.479 1.677 5]	[1.677 5 5]
Overshoot Constraint	eDot Input Membership functions				
	NL	NS	ZR	PS	PL
2%	[-1 -1 -0.702]	[-1 -0.702 -0.5346]	[-0.702 -0.5346 -0.03991]	[-0.5346 -0.03991 1]	[-0.03991 1 1]
5%	[-1 -1 -0.5745]	[-1 -0.5745 -0.1723]	[-0.5745 -0.1723 0.2739]	[-0.1723 0.2739 1]	[0.2739 1 1]
10%	[-1 -1 -0.1958]	[-1 -0.1958 -0.1739]	[-0.1958 -0.1739 0.03285]	[-0.1739 0.03285 1]	[0.03285 1 1]
Overshoot Constraint	Output Membership functions				
	NL	NS	ZR	PS	PL
2%	-	-	0	0.5	1
5%	-	-	0	0.5	1
10%	-	-	0	0.5	1

### Design of PID controller that is included overshoot constraint and Fuzzy Ki using genetic algorithm

The results obtained when PID controller with overshoot Fuzzy Ki was designed with genetic algorithm are given in Table 8 and Table 9. As can be seen from the Table 9, it is seen that the objective function value decreases as the overshoot constraint value softens. The obtained settling times for the designed controllers are also given in the table. Since settling time is not considered as a constraint in this study, it is given only as one of the results. Therefore, the comparison was generally made on the objective function. In addition, it was observed that the duration of the simulation decreased with the increase in the overshoot constraint softens. The reason for this is that although the maximum number of iterations is constant since the constraints direct the search space first, it has been seen that making the constraints more difficult increases the time in the solution. However, as the constraints are eased, it is seen that the objective function value, which is the minimum value, decreases even more. Therefore, as the constraints change, a different optimal solution has been found, so the objective function value and the controller parameters have changed. On the other hand, the results obtained are given in Figure 20. When the results were examined, all results gave the expected results as they met the constraints. However, in the constrained condition, 10% exceeding gave the best result in terms of the objective function value. As it can be understood from here, a lower objective function value can be found in the absence of an overshoot. In addition, it was seen that the results with PID controller with Fuzzy Ki containing overshoot constraints designed by genetic algorithm produced better results than the classical PID controller results obtained in (Reddy et al., 2020).

**Table 7.** Results of PID controller design that is included overshoot constraint and fuzzy Ki using genetic algorithm

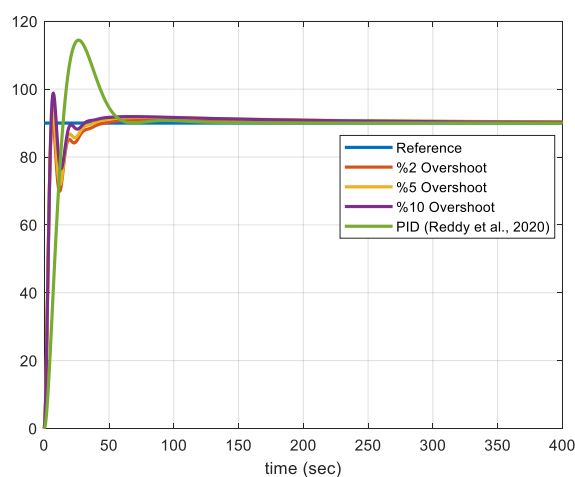
Overshoot Constraint	Kp	Ki	Kd	$\alpha$	Overshoot	Settling Time (sec)	Processing Time (sec)	ISE	Objective Function Value
2%	143	0.2730	911.3536	0.1	<b>0.18%</b>	24.5	<b>6 658.005</b>	1 759. 8742	1 759. 8742
5%	208	0.2508	824.8791	0.1	3.81%	<b>15</b>	22 665.8313	1 629.5293	1 629.5293
10%	276	0.2777	807.8062	0.1	9.94%	18.5	25 417.0475	<b>1 465.7174</b>	<b>1 465.7174</b>



**Figure 19.** System responses of PID controller design that is included overshoot constraint and fuzzy Kp using genetic algorithm

**Table 8.** Results of PID controller design that is included overshoot constraint and fuzzy Ki using genetic algorithm

Overshoot Constraint	e Input Membership functions				
	NL	NS	ZR	PS	PL
2%	[-5 -5 -4.109]	[-5 -4.109 -0.09518]	[-4.109 -0.09518 0.4757]	[-0.09518 0.4757 5]	[0.4757 5 5]
5%	[-5 -5 0.2501]	[-5 0.2501 0.7231]	[0.2501 0.7231 1.484]	[0.7231 1.484 5]	[1.484 5 5]
10%	[-5 -5 0.1114]	[-5 0.1114 0.1892]	[0.1114 0.1892 0.7133]	[0.1892 0.7133 5]	[0.7133 5 5]
	eDot Input Membership functions				
	NL	NS	ZR	PS	PL
2%	[-1 -1 -0.425]	[-1 -0.425 -0.3268]	[-0.425 -0.3268 0.05124]	[-0.3268 0.05124 1]	[0.05124 1 1]
5%	[-1 -1 -0.6435]	[-1 -0.6435 -0.6017]	[-0.6435 -0.6017 -0.4445]	[-0.6017 -0.4445 1]	[-0.4445 1 1]
10%	[-1 -1 -0.3325]	[-1 -0.3325 0.1082]	[-0.3325 0.1082 0.1354]	[0.1082 0.1354 1]	[0.1354 1 1]
	Output Membership functions				
	NL	NS	ZR	PS	PL
2%	-	-	0	0.5	1
5%	-	-	0	0.5	1
10%	-	-	0	0.5	1



**Figure 20.** System responses of PID controller design that is included overshoot constraint and fuzzy Ki using genetic algorithm

Table 10 is given in order to evaluate the obtained results more collectively. In this table, the ISE value obtained among the unconstrained results obtained is 2 505.9090 in the study of Reddy. However, PID+Genetic results performed under constrained conditions produced better results than unconstrained results. Because the constrained condition includes the unconstrained condition. When the constrained conditions are examined, it is seen that the PID controller with fuzzy K<sub>p</sub> optimized with the genetic algorithm always gives the best results.

**Table 9.** Results of PID controller design that is included overshoot constraint and fuzzy Ki using genetic algorithm

Overshoot Constraint	K <sub>p</sub>	K <sub>i</sub>	K <sub>d</sub>	$\alpha$	Overshoot	Settling Time (sec)	Processing Time (sec)	ISE	Objective Function Value
2%	70	0.6003	948.8063	0.1	1.80%	25.5	22 045.4023	1 776.0171	1 776.0171
5%	70	0.5872	910.1589	0.1	4.85%	17.5	24 224.0464	1 725.8108	1 725.8108
10%	67	0.8774	812.3448	0.1	9.84%	17	27 020.5598	1 651.6018	1 651.6018

**Table 10.** Comparison of Controller Results with respect to objective function (ISE+constraint violation)

Overshoot Constraint	Zeigler Nichold Step Response	Zeigler Nichold Frequence Response	AMIGO Step Response	AMIGO Frequence Response	PID (Reddy et al., 2020)	PID + Genetic	PID with Fuzzy K <sub>p</sub> + Genetic	PID with Fuzzy Ki + Genetic
No Constraint	3 048.642	2 293.7730	3 128.7820	2 667.6512	2 505.9090	-	-	-
2%	Violation occurs	Violation occurs	Violation occurs	Violation occurs	Violation occurs	1772.2	1 759. 8742	1 776.0171
5%	Violation occurs	Vioalation occurs	Vioalation occurs	Vioalation occurs	Violation occurs	1730.3	1 629.5293	1 725.8108
10%	Violation occurs	Violation occurs	Violation occurs	Violation occurs	Violation occurs	1647	1 465.7174	1 651.6018

## CONCLUSION

In this study, Zeigler Nichols step, Zeigler Nichols frequency, AMIGO step and AMIGO frequency methods are used for the PID controller in the control of the heat exchanger. Then, two different topologies were used for the Fuzzy PID controller to be used in the control of the heat exchanger. As the originality of the study, both PID and Fuzzy PID controllers were designed with genetic algorithm by adding different overshoot constraints to according to the ISE performance. When the results were examined, it is seen that the PID controller with Fuzzy K<sub>p</sub> optimized by genetic algorithm gives better results than other methods. In further work, the authors will design controllers using Type 2 fuzzy logic.

## Conflict of Interest

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

## Author's Contributions

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

## REFERENCES

- Åström KJ, Häggglund T, 2004. Revisiting The Ziegler-Nichols Tuning Rules For PI Control—Part II The Frequency Response Method. *Asian Journal of Control*, 6(4): 469–82.

- Boz AF, Çimen ME, 2017a. An Interface Design for Controlling Dead Time Systems Using PSO, CS and FA Algorithms. International Advanced Technologies Symposium (IATS'17), 19-22 October, Elazığ, Turkey.
- Boz AF, Çimen ME, 2017b. PID Controller Design Using Improved FireFly Algorithm. International Advanced Technologies Symposium (IATS'17), 19-22 October, Elazığ, Turkey.
- Cihan A, Karakuzu C, 2002. Bulanık-PID Kontrolör Parametrelerinin Diferansiyel Gelişim Algoritması İle En Uygunlaması. ELECO 2008 Elektrik-Elektronik-Bilgisayar Mühendisliği Sempozyumu, 26-30 Kasım, Bursa, Türkiye.
- Çimen ME, Boyraz ÖF, Pala MA, Boz AF, Yıldız MZ, 2019. Ölü Zamanlı Sistemlerde Kullanılan Smith Predictor İçin Balina Sürüsü Optimizasyonu İle PID Tasarımı. Academic Perspective Procedia 2(3): 583–92.
- Çimen ME, Boz AF, 2017. İkinci Dereceden Ölü Zamanlı ve Geri Tepmeli Sistem Parametrelerinin, Röle Testi ve PSO, CS, FA Algoritmaları İle Belirlenmesi. Gazi Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, 34(1): 461–78.
- Çimen ME, Garip Z, Boz AF, 2021a. Chaotic Flower Pollination Algorithm Based Optimal PID Controller Design for a Buck Converter. Analog Integrated Circuits and Signal Processing, 107(2): 281–98.
- Çimen ME, Garip Z, Boz AF, 2021b. Comparison of Metaheuristic Optimization Algorithms with a New Modified Deb Feasibility Constraint Handling Technique. Turkish Journal of Electrical Engineering and Computer Science.
- Çolak S, 2010. Genetik Algoritmalar Yardımı İle Gezgin Satıcı Probleminin Çözümü Üzerine Bir Uygulama. Ç.Ü. Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi, 19(3): 423–38.
- Garip Z, Çimen ME, Boz AF, 2021. Application of Harris Hawks and Whale Optimization Algorithm with Constraint Handling Techniques: A Comparative Study. Journal of Intelligent Systems: Theory and Applications, 4(2): 76–85.
- Gül V, Şahin S, 2021. Kesintisiz Güç Kaynağı Çıkış Gücü Düzenlemesi İçin Bulanık Mantık ve Kazanç Çizelgesi Uyarlanırlı Tabanlı PI Kontrolörlerin Performans Karşılaştırılması. Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi, 24: 416–20.
- Hägglund T, Åström KJ, 2002. Revisiting the Ziegler-Nichols Tuning Rules for PI Control. Asian Journal of Control, 4(4): 364–80.
- Hamid AHN, Mahanijah K, Yahaya FH, 2009. Application of PID Controller in Controlling Refrigerator Temperature. International Colloquium on Signal Processing & Its Applications, 378–84, Malaysia.
- Isa AI, Hamza MF, 2014. Effect of Sampling Time on PID Controller Design for a Heat Exchanger System. IEEE 6th International Conference on Adaptive Science & Technology (ICAST), Ota, Nigeria.
- Kaplan K, Kuncan M, Polat H, Tepe H, Ertunç HM, 2020. PID ve Bulanık Mantık Tabanlı DC Motorun Gerçek Zamanlı Konum Kontrolü. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 10(2): 900–916.
- Katoch S, Chauhan SS, Kumar V, 2021. A Review on Genetic Algorithm: Past, Present, and Future. Multimedia Tools and Applications, 80(5): 8091–8126.
- Kesavan E, Gowrhaman N, Tharani S, Manoharan S, Arunkumar E, 2016. A Publication of IIETA Design and Implementation of Internal Model Control and Particle Swarm Optimization Based PID for Heat Exchanger System, 34(3): 386–90.

- Khames A, Lesewed AA, Al-mathnani AO, 2020. Synthesis of Sliding Mode Control for Heat Exchanger. Third International Conference on Technical Sciences (ICST2020), 28 – 30 November 2020, Tripoli, Libya.
- Khare BK, Singh Y, 2010. PID Control of Heat Exchanger System. International Journal of Computer Applications, 8(6): 22–27.
- Kishore K, Jalalu G, Sumalatha, A, Prasanti K, 2013. Control of Heat Exchanger Using Hybrid Fuzzy-PI. International Journal of Engineering Research and Applications (IJERA), 3(4): 1396–1400.
- Mirjalili S, 2019. Genetic Algorithm. Evolutionary algorithms and neural networks: 43–55.
- Mraz M, 2001. The Design of Intelligent Control of a Kitchen Refrigerator. Mathematics and computers in simulation, 56(3): 259–67.
- Padhee S, Khare YB, Singh Y, 2011. Internal Model Based PID Control of Shell and Tube Heat Exchanger System. IEEE Technology Students' Symposium, Kharagpur, India, 14-16 January, 297–302.
- Peçe F, Yazar E, Karabay S. 2020. PID ve Bulanık Mantık Kontrol Sistemleri İle İki Tekerlekli Kendini Dengeleyebilen Robotik Sistem Tasarımı. Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 3(1): 99–108.
- Rajagopal K, Çimen ME, Jafari S, Singh JP, Roy BK, Akmeser OM, Akgül A, 2021. A Family of Circulant Megastable Chaotic Oscillators, Its Application for the Detection of a Feeble Signal and PID Controller for Time-Delay Systems by Using Chaotic SCA Algorithm. Chaos, Solitons and Fractals 148 (May): 110992. <https://doi.org/10.1016/j.chaos.2021.110992>.
- Reddy CS, Balaji K, 2020. A Genetic Algorithm (GA)-PID Controller for Temperature Control in Shell and Tube Heat Exchanger. 1st International Conference on Computational Engineering and Material Science (ICCEMS - 2020) 17-18 July, Karnataka, India.
- Soesanti I, Syahputra R, 2019. A Fuzzy Logic Controller Approach for Controlling Heat Exchanger Temperature. Journal of Electrical Technology UMY, 3(4): 117–24.
- Trafczynski M, Markowski M, Alabrudzinski S, Urbaniec K, 2016. The Influence of Fouling on the Dynamic Behavior of PID-Controlled Heat Exchangers. Applied Thermal Engineering, 109: 727–38.
- Tridianto, Erik et al. 2017. Cascaded PID Temperature Controller for FOPDT Model of Shell-and-Tube Heat Exchanger Based on Matlab / Simulink. International Electronics Symposium on Engineering Technology and Applications (IES-ETA), 26-27 September, Surabaya, Indonesia 185–91.
- Vasičkaninová A, Bakošová M, Mészáros A, Klemeš, JK Vasi, Anna, Monika B, 2011. Neural Network Predictive Control of a Heat Exchanger. Applied Thermal Engineering, 31(13): 2094–2100.
- Yılmaz M, Can K, Başçı A, 2021. PI+Feed Forward Controller Tuning Based on Genetic Algorithm for Liquid Level Control of Coupled-Tank System. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 11(2): 1014–26.
- Zadeh LA, 1996. Fuzzy Sets. Fuzzy sets, fuzzy logic, and fuzzy systems: 394–432.
- Ziegler JG, Nichols NB, 1942. Optimum Settings for Automatic Controllers. ASME 64(11).
- Ziegler JG, Nichols NB, 1943. Process Lags in Automatic Control Circuits. ASME 65(5): 433–43.

To Cite: Öner PA, Gürkan S, Karapınar M, Doğan S, 2022. Development of a Multichannel Bioinstrumentation System for Human-Computer Interface Applications. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 182-193.

## Development of a Multichannel Bioinstrumentation System for Human-Computer Interface Applications

Poyraz Alper ÖNER<sup>1</sup>, Serkan GÜRKAN<sup>2\*</sup>, Mustafa KARAPINAR<sup>2</sup>, Seydi DOĞAN<sup>1</sup>

**ABSTRACT:** A multi-channel measurement system used to measure electrocardiogram (ECG), electroencephalogram (EEG), electromyogram (EMG) and electrooculogram (EOG) biosignals has been designed and prototyped. The designed system has 16 configurable measurement channels. Of the 16 channels the developed system has, 8 have been designed for EEG, 2 for EMG, 2 for EOG, 1 for ECG measurements, the remaining 3 have been reserved as backup channels. In circuit design, biosignal amplifier design principles have been applied by taking into account the characteristics of the biosignal to be measured for each channel, such as bandwidth, frequency, amplitude, noise level. Modules such as instrumentation amplifier, filter, DC suppression unit, amplifier, DC level determination unit, analog-digital converter, optical isolation unit, power supply have been designed to perform biosignal measurements through these channels. Biosignals measured by the developed system can be shifted to the desired threshold level with the help of the analog output reference voltage, converted to digital data 10-bit resolution and transferred to the computer environment in real time. The data transferred to the computer can be used in C#, Excel, MATLAB, and LabVIEW platforms. The novelty of the developed system is that any of the four desired biosignal types can be measured from any channel. In addition, another feature of the system is that it can work with real-time data without being dependent on the databases serving for human-computer interface applications. In experimental studies with some researchers for the performance tests of the system, ECG, EEG, EMG and EOG signals have been recorded with different module configurations, and signal processing stages were carried out to be used for human-computer applications.

**Keywords:** Biomedical engineering, biosignal measurement, biomedical instrumentation, human-computer interfaces, human-machine interfaces, embedded systems

<sup>1</sup> Poyraz Alper ÖNER ([Orcid ID: 0000-0001-5490-4599](https://orcid.org/0000-0001-5490-4599)), Seydi DOĞAN ([Orcid ID: 0000-0001-9785-4990](https://orcid.org/0000-0001-9785-4990)), Balıkesir University, Faculty of engineering, Department of Electrical and Electronics Engineering, Balıkesir, Türkiye

<sup>2</sup> Serkan GÜRKAN ([Orcid ID: 0000-0003-2229-3361](https://orcid.org/0000-0003-2229-3361)), Mustafa KARAPINAR ([Orcid ID: 0000-0002-1953-6804](https://orcid.org/0000-0002-1953-6804)), National Defence University, Army NCO Vocational School, Department of Electronics and Communication, Balıkesir, Türkiye

\*Corresponding Author: Serkan GÜRKAN, e-mail: sgurkan@msu.edu.tr

\*Bu çalışma PAÖ'in Doktora tezinden üretilmiştir.



## INTRODUCTION

Human-computer interface (HCI) refers to a general expression used for methods that allow people to interact with computer programs (Zhang, 2010). When HCI concept is examined in detail, research areas such as the human-machine interface (HMI) and the brain-computer interface (BCI) are also important topics encountered in the literature (Usakli and Gurkan, 2010).

HCI applications are mainly carried out with electroencephalogram (EEG), electromyogram (EMG) and electrooculogram (EOG) based biosignals (Gordleeva et al., 2020; Li et al., 2020; Martínez-Cerveró et al., 2020; Ramakrishnan et al., 2020; Teng et al., 2020). Especially in EEG-based HCI systems, studies of the detection of ECG, EOG and EMG components (artifacts) and their removal from the EEG signal have been reported in the literature (Hu et al., 2015). By means of HCI applications using biosignals, paralyzed patients who have lost their speaking and movement abilities can be offered the opportunity to meet their basic needs on their own (Usakli et al., 2018; Chang, 2019). In addition, prostheses can be developed to replace the damaged limbs of some patients (Farooq et al., 2019), and channels can be created through which motor neuron patients (amyotrophic lateral sclerosis - ALS) can communicate with their environment (Usakli and Gurkan, 2010; Bozomitu et al., 2019). In parallel with the increase in the average human life expectancy, both the number of paralyzed patients in the society and the number of HCI applications aimed at improving the quality of life of patients are increasing. For example, wheelchair control, computer game applications, computer mouse control applications, virtual keyboard applications are some of the biosignal based HCI applications that have been implemented in recent years (Usakli and Gurkan, 2010; Usakli et al., 2011; Li et al., 2020).

A researcher working in the field of HCI applications may have to use different measurement equipment for the biosignals to be measured. For example, in a wheelchair application, the equipment/hardware needed to evaluate EEG and EMG signals together will be different from the equipment/hardware needed to evaluate EOG and EMG signals together. As a result of this, the costs of the studies to be carried out will increase and extra time will be spent solving the compatibility problems between the equipment/hardware.

Although there have been given EEG, EMG, EOG, EEG-EMG, EOG-EMG-based biosignal data capture applications developed for commercial or academic purposes in the literature, there isn't any study that allows the simultaneous evaluation of EEG, EMG, EOG and ECG biosignals together (Collins et al., 2016; Balamurugan et al., 2020; Teng et al., 2020). Researchers working in the field of biosignal processing and HCI may also prefer to work with data they have purchased from database banks or accessed from open-source databases, due to difficulties and costs of obtaining biosignals from different sources (Cavanagh et al., 2017).

It is obvious how useful the fixed platform-variable module structure is encountered in Arduino and Raspberry Pi platforms which their usages have become widespread in the last decade (Montironi et al., 2017; Papazoglou, 2018; Uyanik and Catalbas, 2018; Perenc et al., 2019). It is possible to develop a wide range of applications from simple to complex with these platforms used in many fields from student level to engineer level. In addition, it is possible to implement a large number of applications in many different fields at low cost with the help of modules that work in harmony with these platforms and perform different functions. The main motivation in this study is the idea that the fixed processor-variable module structure will also be useful for other HCI studies.

In this study, a system using a fixed measurement platform and a configurable module structure was proposed in which EEG, EMG, EOG, ECG biosignals can be measured and transferred to a computer environment simultaneously and in real time. In this way, it has been possible to develop a

large number of HCI applications by using biosignals obtained from different sources. It is generally encountered two basic elements such as biosignal data capture and signal processing, when HCI studies are examined. In this study, it has been mainly focused on a multi-channel biosignal data capture part rather than signal processing. It is possible to obtain real biosignal data at low costs and quickly by using this developed measurement system. Of the 16 channels the developed system has, 8 have been designed for EEG, 2 for EMG, 2 for EOG, 1 for ECG measurements, the remaining 3 have been reserved as backup channels. Although such a channel allocation has been made, the desired biosignal measurement can be performed from the desired channel by making appropriate electrode connections and module configurations.

In circuit design, biosignal amplifier design principles have been applied by taking into account the characteristics of the biosignal to be measured for each channel, such as bandwidth, amplitude, noise level, etc. The safety of the person whose biosignal measurement will be done has been taken into consideration as the main priority at each stage of the design. The analog data received from the amplifier outputs are sent to an analog output unit to be used in applications. This analog data is also sent to another unit to give digital output when it exceeds a reference value set by the researcher. In this unit, the analog data is converted to 10-bit digital data and sent to the digital output terminals. The digital data obtained from the channels are evaluated with the help of a microcontroller and transferred to the computer by optical isolation. Using this prototype, many types of data can be obtained that researchers may need in biosignal based HCI applications. The data transferred to the computer can be used in C#, Excel, MATLAB, and LabVIEW platforms. As a result, bio-signals can be sent to another external unit in digital format or in original analog form by using various transferring methods such as fiber optic, USB, or Bluetooth. Although the definitions are made for HCI applications in this study, the proposed system can also be used for HMI and BCI applications.

## MATERIALS AND METHODS

The block diagram and some images of the developed system for multi-channel HCI applications have been given in Figure 1 and Figure 2, respectively. As can be seen from the block diagram given in Figure 1, it can be easily understood that the signals received by the electrodes are amplified to the required levels by the biosignal amplifiers, transferred to the microcontroller unit by providing optical insulation, and the data collected from all measurement channels are transferred to the computer with time sharing. The original (analog) signals of each channel are also transferred to the system output panel with Bayonet Neill-Concelman (BNC) connectors. In the system, analog outputs without optical insulation are applied to voltage comparators, providing digital outputs above the desired threshold level, and the resulting threshold outputs are transferred to the system panel with BNC connectors. The analog outputs of all measuring channels are connected to parallel type analog to digital converters. The digital data corresponding to the analog level of the desired channel can be used with a resolution of 10 bits, thanks to the address path and bus created in the D-type connector on the system panel.

For user safety, measurement circuits and recording-imaging units are isolated from each other using an optical insulator. Analog data obtained from the optical isolator output are transferred to BNC connectors for each channel and are also connected to the fiber optic (F/O) outputs by the developed analog-to-optical converter. Optically isolated analog data obtained from all channels are evaluated in the microcontroller unit and transferred to a computer with time sharing. In addition, digital and optical data of all channels are serially transferred to two different outputs with the help of the microcontroller unit. Thanks to this developed system, it is possible to access many data types that will be needed in HCI

applications via any connection type. The developed system can be used in computer aided applications as well as in applications that do not require computer support.

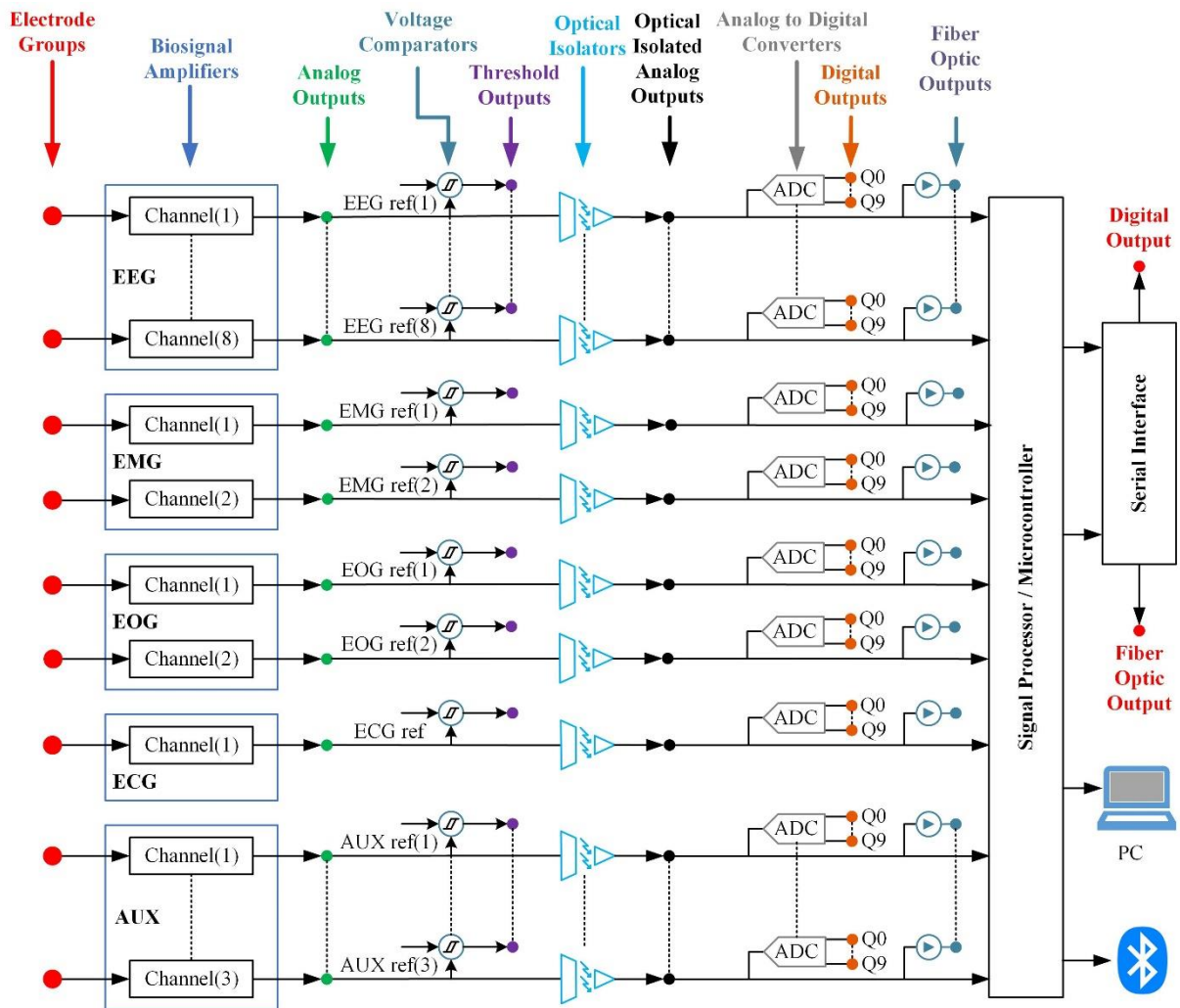


Figure 1. The block diagram of the developed system



Figure 2. Some images of the developed system for multi-channel HCI applications

As can be seen in Figure 2, the system back panel has been arranged for electrode connections and energy input. All signal outputs and computer connection sockets are available on the front panel. When the inside of the system case is examined, there are three main units in it. The first of the units is the power circuit that converts the mains voltage into DC voltage levels to be used in the system. The second unit, called "application development unit" where biosignal measurement applications can be developed,

contains 20 cascaded sockets. The energies of the application modules and their connections between each other are made with the help of these sockets. Biosignal amplifiers can be developed by mounting portable circuits developed in this study to module sockets, and these can be used for bioinstrumentation studies. The third unit is the microcontroller unit.

The most commonly preferred instrumentation amplifier being used in biosignal amplifiers, 2<sup>nd</sup> order low pass filter (LPF), 4<sup>th</sup> order LPF, 50 Hz notch filter, non-inverting amplifier, DC coupler, DC drift remover and optical transmitter modules have been designed for use in the application development unit.

### Design Principles of Application Development Modules

There are some similarities in the processes such as EEG, EMG, EOG, ECG to get biosignals with the help of electrodes and making useful data by amplifying them. The methods given in the literature for the measurement of these signals have been searched and eight different modules have been designed to be used in experimental studies. The circuit schematic diagrams of the designed modules have been given in Figure 3.

One of the most critical and important components for biosignal measurement systems is undoubtedly instrumentation amplifiers. In the designed system, AD620 instrumentation amplifier has been preferred. The circuit diagram and appearance of the instrumentation amplifier module has been given in Figure 3a. The voltage gain of the module (G) can be calculated by Equation (1). Since R1 is a constant value resistance (1 K $\Omega$ ), the G value varies between 5.49 and 50.4 according to the value that RV1 takes between 0 and 10 K $\Omega$ .

$$G = \frac{49400}{R_1 + R_{V1}} + 1 \quad (1)$$

A 2<sup>nd</sup> order (20 dB/dec) LPF module that circuit diagram and appearance are given in Figure 3b has been designed to be used in the system. The cutoff frequency ( $f_c$ ) of the module is calculated to be 49.41 Hz using Equation (2).

$$f_c = \frac{1}{2\pi\sqrt{R_1 R_2 C_1 C_2}} \quad (2)$$

A 4<sup>th</sup> order (40 dB/dec) LPF module that circuit diagram and appearance are given in Figure 3c has been designed to be used in the system. The  $f_c$  of the module has been calculated to be 49.41 Hz as done in the previous LPF.

The DC coupler module is designed to suppress DC levels occurring between components in the system during measurements. The circuit diagram and appearance of the designed module have been given in Figure 3d. As can be seen in the figure, an active high-pass filter with a cutoff frequency of 0.33 Hz is encountered.

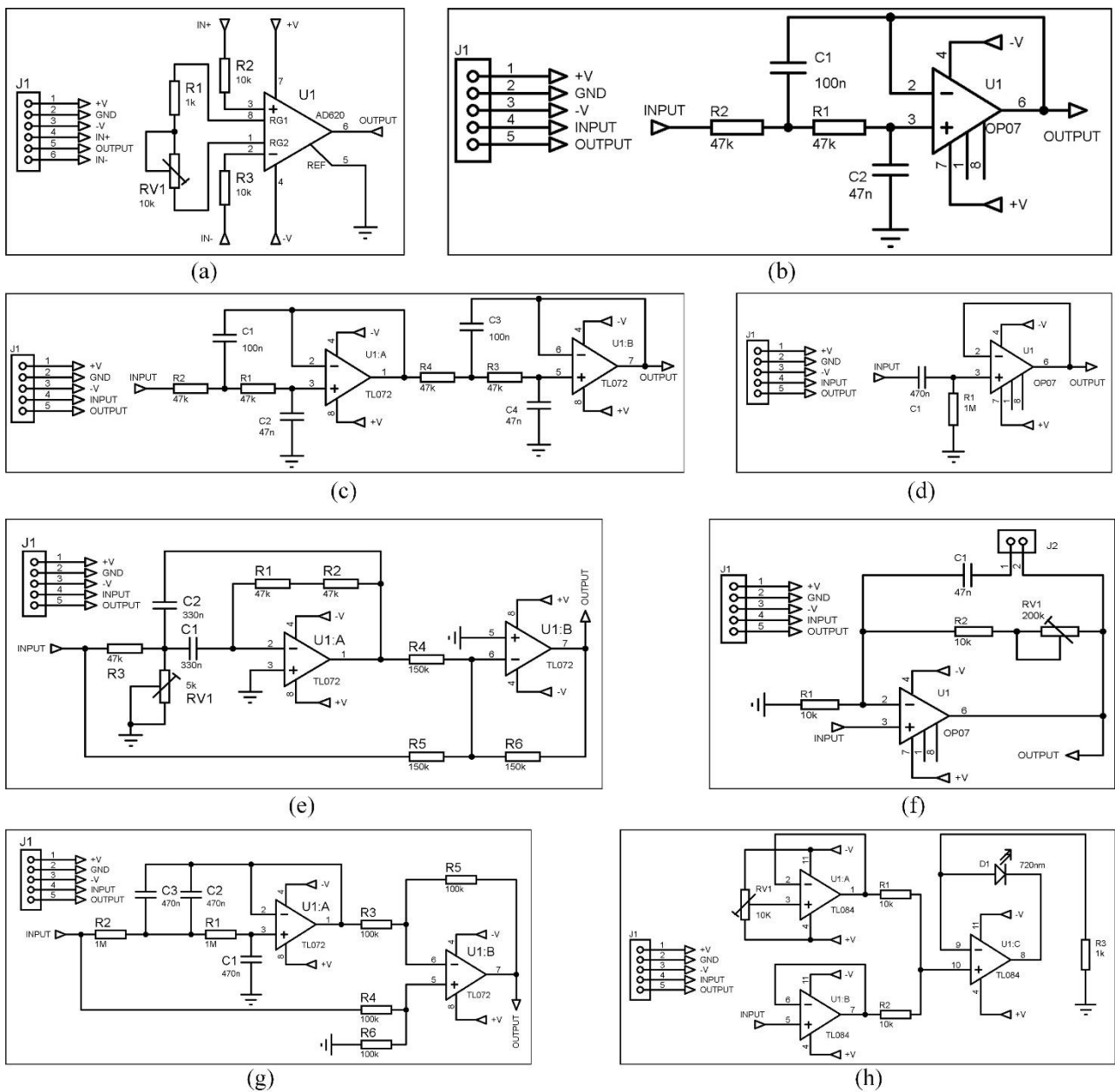
In the system, a narrow band 50 Hz notch filter module has been designed to suppress 50 Hz noises originating from the electrical network. The circuit diagram and appearance of the designed module have been given in Figure 3e. The quality factor (Q) and bandwidth (BW) of the module are 4.87 Hz and 10.26 Hz, respectively.

The designed non-inverting amplifier module has adjustable voltage gain, and this gain value can be changed between 2 and 22. The circuit diagram and appearance of the module have been given in Figure 3f. When the jumper J2 in the module is open circuit, standard non-inverting amplifier operation is performed. When J2 is short-circuited, a non-inverting LPF of which gain can be adjusted in the range of 2 - 22 and the cutoff frequencies between 15.4 Hz - 338.8 Hz is obtained.

The DC drift remover module, like the DC coupler module, has been designed to suppress the DC levels occurred between units during measurements. While the DC coupler module operates on the

principle of high pass filter, the DC drift remover module operates as a low pass filter. The circuit diagram, block diagram and appearance of the designed DC drift remover module have been given in Figure 3g. As can be seen in the figure, it is seen that the input signal is first passed through a 0.22 Hz low pass filter. This signal obtained at the filter output can be described as the DC component in the input signal. Then, the DC component is removed from the input signal with the help of a differential amplifier, and it means that the DC component in the input signal is suppressed.

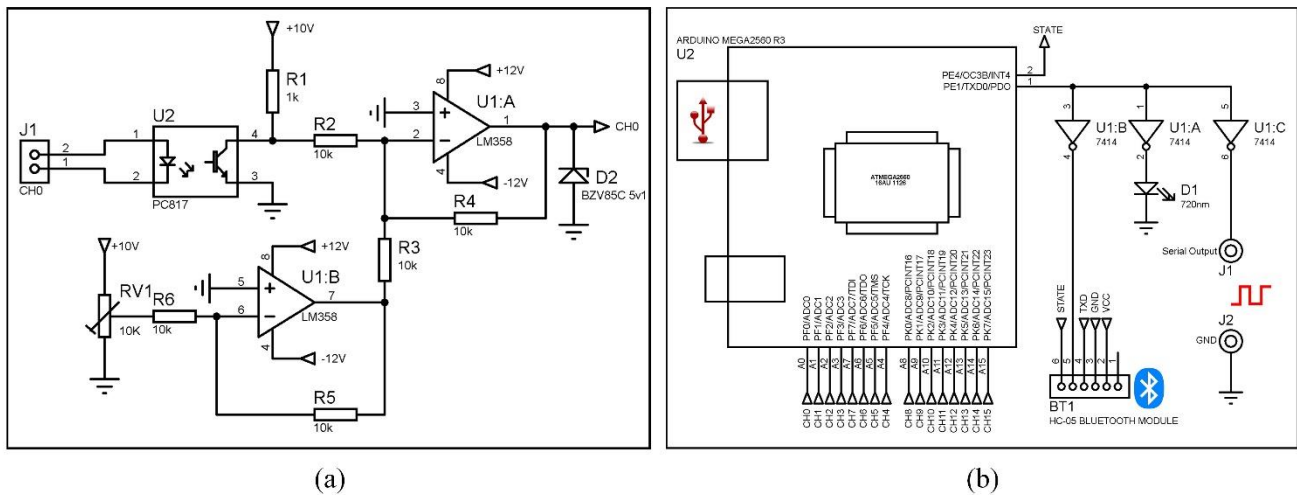
Optical isolator module allows analog signals obtained in measurements to be carried by fiber optic cable by converting them to light. The circuit diagram and appearance of the designed module have been given in Figure 3h. As can be seen in this figure, it is understood that the brightness of the 720nm wavelength light source varies according to the input voltage of U1:B. For  $\pm 5$  V voltage values applied from the module input, the current passing through the 720 nm light source varies in the range of 10 mA - 30 mA. Thus, the analog signal is converted into an optical signal.



**Figure 3.** Circuit schematic diagrams of the designed modules **a)** Instrumentation amplifier, **b)** 2<sup>th</sup> order low pass filter, **c)** 4<sup>th</sup> order low pass filter, **d)** DC coupler, **e)** 50 Hz notch filter, **f)** Noninverting amplifier, **g)** DC drift remover, **h)** Optical transmitter

## Microcontroller Unit

The microcontroller unit collects and evaluates the analog signals obtained in the application development unit and performs the necessary operations for transmission to the computer via the front panel communication terminals. The circuit schematic diagrams of the designed microcontroller unit have been given in Figure 4.



**Figure 4.** Circuit schematic diagrams of the designed microcontroller unit **a)** Optical isolator, **b)** Data format converter

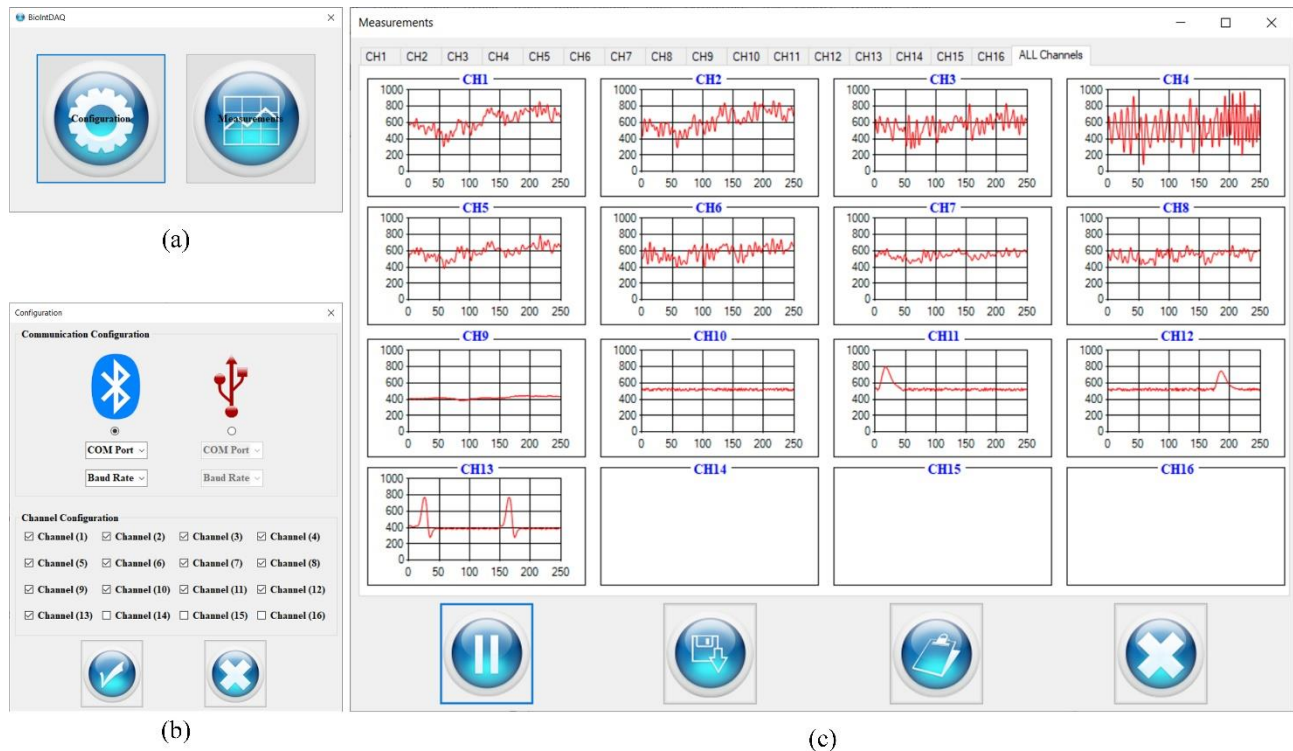
The first function of the microcontroller unit is to optically isolate the analog signals obtained in the application development unit and the communication terminals from each other. All amplified biosignals coming from the application development unit to the microcontroller pass through an opto-coupler based isolator. The circuit diagram of one of the opto-coupler based insulators designed for each channel has been given in Figure 4a. The optical isolator circuit is used together with the optical transmitter circuit, and the D1 light source in Figure 3h and the component J2 in Figure 4a are mutually connected. Thanks to this structure, an optically isolated analog signal is obtained at the CH0 output in Figure 4a.

Another process performed in the microcontroller unit is to produce 10-bit digital data for each of the 16 analog channels. An Atmega2560 has been used in the microcontroller unit for this process. Analog data applied to the A0-A15 analog inputs of the Atmega2560 are converted into 10bit digital data. The digital conversion for which analog input will be determined by the address data applied to the B0-B3 digital inputs. 10-bit digital data obtained as a result of analog-to-digital conversion are transferred to A0-A7 and C0-C1 digital outputs of Atmega2560. There is a D type connector on the front panel of the system for 4-bit address input and 10-bit digital output.

The last process performed in the microcontroller unit is to obtain the data formats needed for the data transfer channels. A circuit part designed for this process in the microcontroller unit has been given in Figure 4b. As can be seen in this figure, isolated analog data of all channels are applied to the analog inputs of Atmega2560. Analog data of each channel is converted to serial digital data format in the Atmega2560 microcontroller and transferred to the USB port and TX0 pin. Serial digital data obtained from the TX0 pin is then applied to three Schmitt Triggers. By using the "U1:A" Schmitt Trigger with a 720 nm light source, the optical form of the serial data is obtained. "U1:C" output is directly transferred to the front panel of the system and provides electrical serial digital data. "U1:B" output is connected to a Bluetooth module. Thus, biosignal data can be transferred to a computer wired or wirelessly using the USB port or Bluetooth module.

## User Interface Software

A user interface software has been designed to transfer the data collected in the system to the computer. Visual C# has been preferred for the interface software and the developed interface has been named as "BioInstDAQ". BioInstDAQ consists of three menus: "Main Menu", "Configuration Menu" and "Measurements Menu" and their screenshot images have been given in Figure 5.



**Figure 5.** User interface software menus (a) Main menu, (b) Configuration menu, (c) Measurements menu

"Main Menu" is the start menu and is used for switching between these menus. "Configuration Menu" is used for determining the connection type, connection port, connection speed and measurement channels. The menu where signals belonging to all channels can be displayed and recorded is the Measurement Menu. In this menu, the signals for the channels can be displayed individually or collectively. The digital data of the obtained biological signals can be saved in the computer in text (.txt) format. This recorded data can be used in platforms such as C #, Excel, MATLAB and LabVIEW.

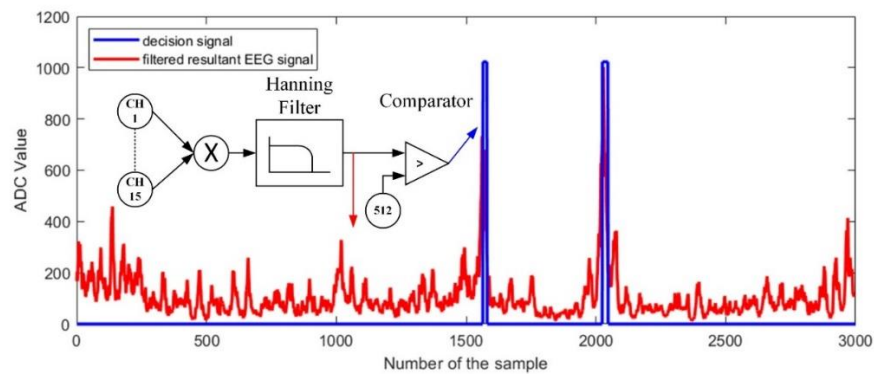
## RESULTS AND DISCUSSION

After testing all channels of the designed system, experimental studies have been carried out with a group of researchers working biomedical engineering field to test the system functions. In these studies, researchers carried out biosignal measurement obtained from different sources and have been asked to evaluate the signals they recorded.

### Measurement and Evaluation of EEG Signals

In this experimental study called "Task 1", the researchers were given the task of establishing the necessary configuration for measuring the EEG signals, and they were asked to record the EEG signals obtained as a result of the right-fist clenching movement. Then, they were asked to determine the moment of fist-clenching using signal processing techniques. The filtered resultant EEG signal obtained from the measurement channels and the MATLAB printout showing the detection of the fist-clenching moment are given in Figure 6. In this study, Ag-AgCl electrodes were used for the measurements, three

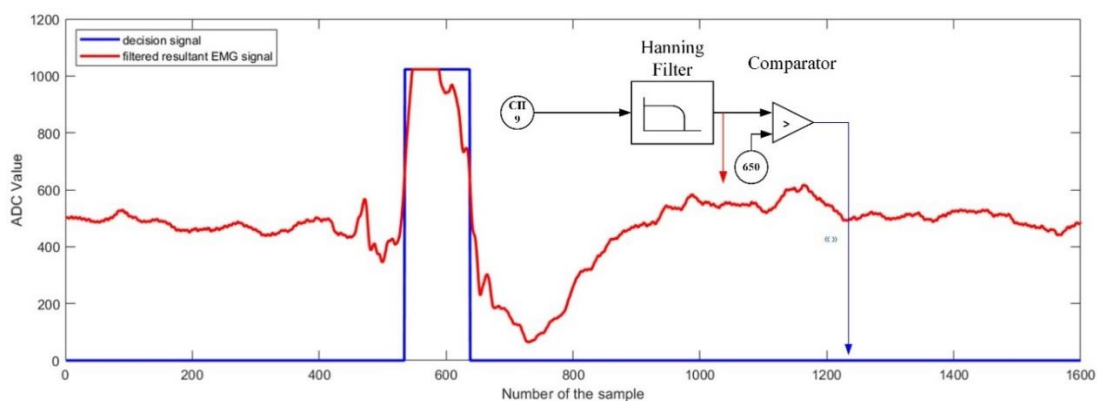
Laplacian derivations were preferred for the placement of the electrodes, and the center electrodes were placed at the C3, C4 and Cz points. The reference electrode was placed in the left mastoid and the ground electrode in the right mastoid. As a result of the measurements conducted via 15 channels, it is observed that the EEG signals can be measured successfully, the obtained EEG signals are compatible with those given in the literature, and the moment of fist-clenching can be detected. Results clearly show that the obtained signals can be used in HCI and BCI systems (Hu et al., 2015; Collins et al., 2016; Cavanagh et al., 2017; Gordleeva et al., 2020; Hooda et al., 2020).



**Figure 6.** EEG signal and detection the moment of the fist-clenching for "Task 1"

### Measurement and Evaluation of EMG Signals

In this experimental study called "Task 2", the researchers were given the task of establishing the necessary configuration for measuring EMG signals, and they were asked to record the EMG signals obtained as a result of the left-fist clenching movement. Then, they were asked to determine the moment of fist-clenching with signal processing techniques. The EMG signal obtained from the measurement channel and the MATLAB printout showing the detection of the fist-clenching moment have been given in Figure 7. As a result of the measurements conducted via single channel, it is observed that EMG signals can be measured successfully. The obtained EMG signals are compatible with those given in the literature, and the fist clenching movement can be detected. Results clearly show that the obtained signals can be used in HCI systems (Hu et al., 2015; Farooq et al., 2019; Gordleeva et al., 2020).

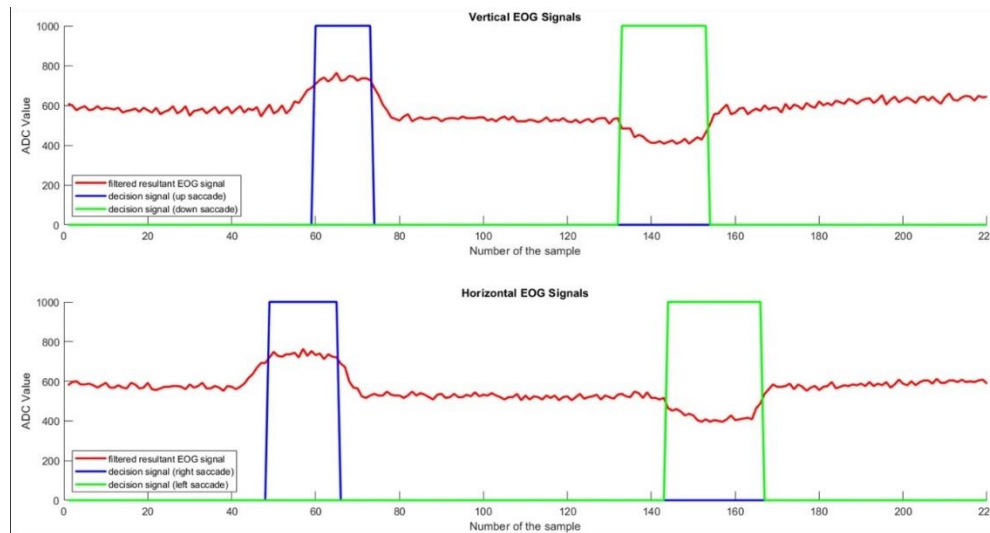


**Figure 7.** EMG signal and detection the moment of the fist-clenching in "Task 2"

### Measurement and Evaluation of EOG Signals

In this experimental study called "Task 3", researchers were given the task of establishing the necessary configuration for measuring EOG signals, and they were asked to detect upward, downward, left and right movements of the eye using signal processing techniques. The EOG signals obtained from the measurement channels and the MATLAB printout showing the detection of eye movements have been given in Figure 8.



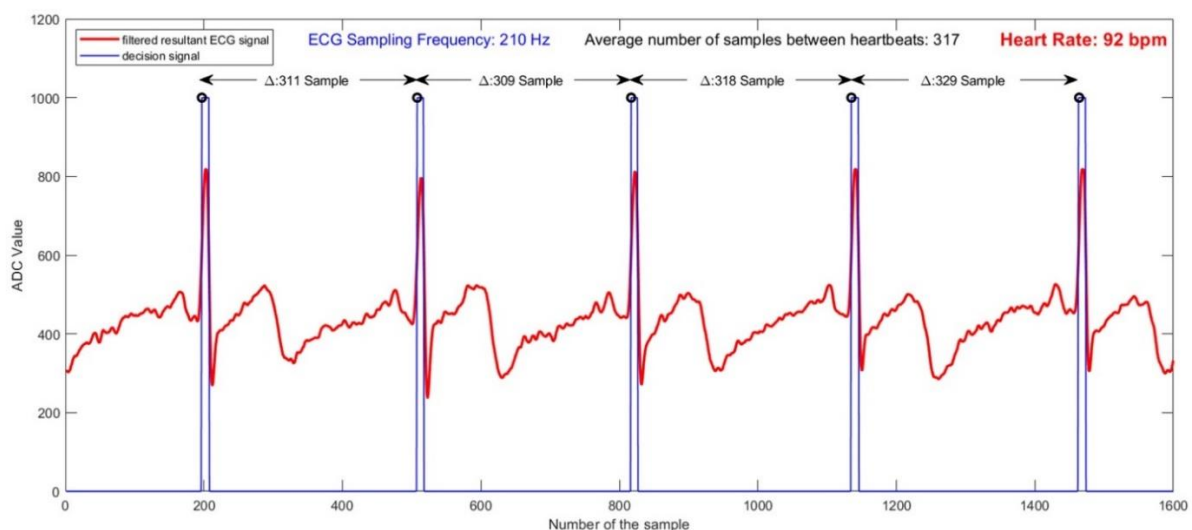


**Figure 8.** EOG signals and detection of the eye moments for "Task 3"

Ag-AgCl electrodes were used for the measurements and as a result of the measurements conducted with these electrodes via two channels, it is observed that the EOG signals can be measured successfully, the obtained EOG signals are compatible with those given in the literature, and eye movements can be detected. Results clearly show that the obtained signals can be used in HCI systems (Usakli and Gurkan, 2010; Hu et al., 2015; Usakli et al., 2018; Martínez-Cerveró et al., 2020).

### Measurement and Evaluation of ECG Signals

In this experimental study called "Task 4", the researchers were given the task of establishing the necessary configuration for measuring ECG signals, and they were asked to determine the heart rate per minute using signal processing techniques. The ECG signals obtained from the measurement channels and the MATLAB printout showing the heart rates have been given in Figure 9. Left foot was taken as reference in measurements, and right and left arm derivations were used. As a result of single channel measurements, it is observed that ECG signals can be measured successfully, heartbeats can be detected, and the obtained ECG signals are compatible with those given in the literature. Results clearly show that the obtained signals can be used in HCI systems (Kashou et al., 2020; Panganiban et al., 2021).



**Figure 9.** ECG signals and detection of the heartbeats for "Task 4"

## CONCLUSION

In this study, a multi-channel biosignal measurement system has been designed and prototyped to be used in biomedical engineering schools and laboratories where HCI researches are conducted. Experimental studies have been conducted with a group of 6 researchers using this designed system. It has been shown that the measurement of basic biological signals such as EEG, EMG, EOG and ECG is possible by this system having 16-channels. Of the 16 channels the developed system has, 8 have been designed for EEG, 2 for EMG, 2 for EOG, 1 for ECG measurements, the remaining 3 have been reserved as backup channels. The designed system has the output types needed for the development of HCI, HMI and BCI systems. All channels have a configurable hardware structure with the designed development modules, and it is possible for develop HCI applications. The fact that biosignals recorded in experimental studies with a group of 6 researchers are compatible with those given in the literature shows that the system works correctly and fulfills its function. In addition, it is possible that many new studies can be published in the literature both by evaluating the relationships between biosignals obtained from different sources and by developing new HCI applications.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Balıkesir University Research Fund (project number 2017/169). Authors would like to thank to Turkish Academy of Sciences (TUBA) for partial support.

## Conflict of Interest

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

## Author's Contributions

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

## REFERENCES

- Balamurugan B, Mullai M, Soundararajan S, Selvakanmani S, Arun D, 2020. Brain-computer interface for assessment of mental efforts in e-learning using the nonmarkovian queueing model. *Computer Applications in Engineering Education*, 29(2):394–410.
- Bozomitu RG, Păsărică A, Tărniceriu D, Rotariu C, 2019. Development of an Eye Tracking-Based Human-Computer Interface for Real-Time Applications. *Sensors*, 19(16):3630.
- Cavanagh JF, Napolitano A, Wu C, Mueen A, 2017. The Patient Repository for EEG Data + Computational Tools (PRED+CT). *Frontiers in neuroinformatics*, 11:67.
- Chang W-D, 2019. Electrooculograms for Human-Computer Interaction: A Review. *Sensors*, 19(12):2690.
- Collins T, Woolley SI, Rawson NC, Haroon L, 2016. Final-year projects using open source OpenEEG. *Computer Applications in Engineering Education*, 24(1):156–164.
- Farooq U, Ghani U, Usama SA, Neelum YS, 2019. {EMG} control of a 3D printed myo electric prosthetic hand. {IOP} Conference Series: Materials Science and Engineering, 635:12022.
- Gordleeva SY, Lobov SA, Grigorev NA, Savosenkov AO, Shamshin MO, Lukoyanov M V, Khoruzhko MA, Kazantsev VB, 2020. Real-Time EEG-EMG Human-Machine Interface-Based Control System for a Lower-Limb Exoskeleton. *IEEE Access*, 8:84070–84081.
- Hooda N, Das R, Kumar N, 2020. Fusion of EEG and EMG signals for classification of unilateral foot movements. *Biomedical Signal Processing and Control*, 60:101990.
- Hu J, Wang C, Wu M, Du Y, He Y, She J, 2015. Removal of EOG and EMG artifacts from EEG using combination of functional link neural network and adaptive neural fuzzy inference system.

Neurocomputing, 151:278–287.

- Kashou AH, Ko W-Y, Attia ZI, Cohen MS, Friedman PA, Noseworthy PA, 2020. A comprehensive artificial intelligence-enabled electrocardiogram interpretation program. *Cardiovascular Digital Health Journal*, 1(2):62–70.
- Li K, Ramkumar S, Thimmiaraja J, Diwakaran S, 2020. Optimized artificial neural network based performance analysis of wheelchair movement for ALS patients. *Artificial Intelligence in Medicine*, 102:101754.
- Martínez-Cerveró J, Ardali MK, Jaramillo-Gonzalez A, Wu S, Tonin A, Birbaumer N, Chaudhary U, 2020. Open Software/Hardware Platform for Human-Computer Interface Based on Electrooculography (EOG) Signal Classification. *Sensors*, 20(9):2443.
- Montironi MA, Qian B, Cheng HH, 2017. Development and application of the ChArduino toolkit for teaching how to program Arduino boards through the C/C++ interpreter Ch. *Computer Applications in Engineering Education*, 25(6):1053–1065.
- Panganiban EB, Paglinawan AC, Chung WY, Paa GLS, 2021. ECG diagnostic support system (EDSS): A deep learning neural network based classification system for detecting ECG abnormal rhythms from a low-powered wearable biosensors. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 31:100398.
- Papazoglou PM, 2018. A hybrid simulation platform for learning microprocessors. *Computer Applications in Engineering Education*, 26(3):655–674.
- Perenc I, Jaworski T, Duch P, 2019. Teaching programming using dedicated Arduino Educational Board. *Computer Applications in Engineering Education*, 27(4):943–954.
- Ramakrishnan J, Mavaluru D, Sakthivel RS, Alqahtani AS, Mubarakali A, Retnadhas M, 2020. Brain-computer interface for amyotrophic lateral sclerosis patients using deep learning network. *Neural Computing and Applications*, 2020(5):1–15.
- Teng G, He Y, Zhao H, Liu D, Xiao J, Ramkumar S, 2020. Design and Development of Human Computer Interface Using Electrooculogram with Deep Learning. *Artificial Intelligence in Medicine*, 102:101765.
- Usakli AB, Gurkan S, 2010. Design of a Novel Efficient Human-Computer Interface: An Electrooculogram Based Virtual Keyboard. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, 59(8):2099–2108.
- Usakli AB, Susac A, Gurkan S, 2011. Fast face recognition: Eye blink as a reliable behavioral response. *Neuroscience Letters*, 504(1):49–52.
- Usakli AB, Gurkan S, Gurkan G, Kaya A, 2018. A novel EOG-based wireless rapid communication device for people with motor neuron diseases. *Journal of Medical Engineering & Technology*, 42(6):420–425.
- Uyanik I, Catalbas B, 2018. A low-cost feedback control systems laboratory setup via Arduino-Simulink interface. *Computer Applications in Engineering Education*, 26(3):718–726.
- Zhang P, 2010. Human-machine interfaces. *Advanced Industrial Control Technology*, 2010(1):527–555.

**Atf İçin:** Gürkan S, Aytav E, 2022. Fotovoltaik Panel Emülatörü Tasarımında Dijital İkiz Kullanımı. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 194-206.

**To Cite:** Gürkan S, Aytav E, 2022. Using Digital Twin in Photovoltaic Panel Emulator Design. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 194-206.

## **Fotovoltaik Panel Emülatörü Tasarımında Dijital İkiz Kullanımı**

Serkan GÜRKAN<sup>1\*</sup>, Emre AYTAV<sup>2</sup>

**ÖZET:** Fotovoltaik paneller ile gerçekleştirilen uygulamalı eğitimlerde karşılaşılan problemlerden birisi de uygulanacak ışığın kaynağıdır. Güneşin günün her vaktinde istenen şiddette olmaması ve meteorolojik olaylar nedeniyle dış ortamda doğal ışık kullanarak eğitim yapmak oldukça zordur. Kapalı ortamlardaki uygulamalı eğitimlerde ise panele doğal güneş ışığı uygulamak yerine büyük hacimli ve güç gereksinimi fazla olan yapay ışık kaynakları kullanmak en sık tercih edilen yöntemdir. Fotovoltaik paneller ile aynı elektriksel özelliklere sahip bir emülatör ile doğal veya yapay ışık kaynağına ihtiyaç duymadan düşük maliyetler ile uygulamalı eğitimler gerçekleştirilebilir. Bu çalışmada, önemli bir yenilenebilir enerji kaynağı olan fotovoltaik hücrenin tek diyotlu modeli esas alınarak bir fotovoltaik panel emülatörü tasarlanmıştır; düşük maliyetli, deneysel çalışmalar için ışık kaynağına ihtiyaç duymayan, öğrencilerde psikomotor ve bilişsel davranışların geliştirilebileceği prototip bir sistem ortaya çıkarılmıştır. Emülatörün tasarımı için ticari maksatlı üretilen bir fotovoltaik panel referans alınmış ve elektriksel özellikleri tespit edilmiştir. Tasarlanan emülatörün doğrulanmasında kullanılmak üzere referans panel için dijital ikiz oluşturulmuştur. Geliştirilen emülatörde; güneşlenme miktarı 50 W m<sup>-2</sup> ile 1000 W m<sup>-2</sup> aralığında, panel sıcaklığı 0 °C ile 80 °C aralığında bilgisayar aracılığı ile değiştirilebilir. Emülatörde 10 W maksimum güç hedeflenmiş, %0.1 hata ile 10.01 W maksimum güç elde edilmiştir. Geliştirilen emülatörün dijital ikizi ile yapılan doğrulanmasında elde edilen elektriksel verilerin, referans panelin elektriksel verileri ile uyumlu olduğu görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Dijital ikiz, FV panel, FV panel emülatörü, enerji teknolojileri, yenilenebilir enerji

### **Using Digital Twin in Photovoltaic Panel Emulator Design**

**ABSTRACT:** One of the problems encountered in training with photovoltaic panels is the source of light to be applied. It is difficult to train with natural light due to the fact that the sun is not at the desired intensity at all times of the day and meteorological events. In training in indoor environments, instead of applying natural sunlight to the panel, using artificial light sources with large volumes and high power requirements is the most preferred method. With an emulator with the same electrical characteristics as photovoltaic panels, practical training can be carried out at low costs without the need for natural or artificial light sources. In this study, a photovoltaic panel emulator was designed based on the single diode model of the photovoltaic cell, and a prototype system has been revealed that does not need a light source in experimental studies and can improve psychomotor behaviors on students. The electrical properties of a commercially produced photovoltaic panel were taken as reference for the design of the emulator. A digital twin has been created for the reference panel to be used in the verification of the designed emulator. In the developed emulator; the amount of sun exposure and the panel temperature can be changed by computer. In the emulator, 10W maximum power was targeted, and 10.01W has been obtained with an error of 0.1%. In the verification of the developed emulator with its digital twin, it has been seen that the electrical data obtained were compatible with the electrical data of the reference panel.

**Keywords:** Digital twin, PV panel, PV panel emulator, energy technologies, renewable energy

<sup>1</sup>Serkan GÜRKAN ([Orcid ID: 0000-0003-2229-3361](https://orcid.org/0000-0003-2229-3361)), Milli Savunma Üniversitesi, Kara Astsubay MYO, Elektronik Haberleşme Teknolojisi Bölümü, Balıkesir, Türkiye

<sup>2</sup>Emre AYTAV ([Orcid ID: 0000-0003-4296-6703](https://orcid.org/0000-0003-4296-6703)), Milli Savunma Üniversitesi, Kara Harp Okulu, Makine Mühendisliği Bölümü, Ankara, Türkiye

**\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Serkan GÜRKAN, e-mail: sgurkan@msu.edu.tr

## GİRİŞ

Giderek artan dünya nüfusu, sanayi alanındaki gelişmeler ve teknolojik aygıtların kullanımının her geçen gün artması enerjiye olan gereksinimi de artırmaktadır. Enerji, kişisel maksatlı kullanımdan sanayi kullanımına kadar geniş bir yelpazede en temel girdi olarak karşımıza çıkmaktadır. Tüm bu gelişmeler dünyada enerji tüketiminin yılda ortalama %4-5 artmasına sebep olmaktadır (Aydın, 2014; Kaya ve ark., 2018). Günümüzde enerji elde etmek için kullanılan kaynaklar arasında yenilenebilir enerji, nükleer enerji, kömür, doğalgaz, petrol ve hidroelektrik enerji sayılabilir. 2019 yılında, dünyadaki enerji tüketiminin kaynaklar bazındaki dağılımı; %33.1 petrol, %24.2 doğalgaz, %27 kömür, %5 yenilenebilir enerji, %6.4 hidroelektrik, %4.3 nükleer enerji şeklinde gerçekleşmiştir (Anonim, 2020). Bu değerlere göre 2019 yılında dünyada tüketilen enerjinin %84.3'ü fosil yakıtlardan elde edilmiştir. Dünyada yenilenebilir enerji kaynaklarından üretilen enerji miktarları incelendiğinde, 2009 yılında 636.7 terawatt saat<sup>-1</sup> olan üretimin 2019 yılında 2805.5 terawatt saat<sup>-1</sup> olarak gerçekleştiği ve 4.4 kat arttığı görülmektedir (Anonim, 2020). Dünyadaki yenilenebilir enerji kaynaklarının çeşitliliğini, verimliliğini ve miktarını arttırmaya yönelik ulusal ve uluslararası birçok çalışma yapılmaktadır.

Fosil enerji rezervlerinin yetersizliği, enerjiye olan yüksek gereksinim ve barındırdığı yüksek potansiyel nedeniyle yenilenebilir enerji Türkiye için önemli bir enerji kaynağıdır (Gençer ve ark., 2009; Bayramoğlu, 2018; Kaya ve ark., 2018; Yılmaz ve Öziç, 2018; Kavcıoğlu, 2019;).

Hidro, güneş, rüzgâr, jeotermal, biyokütle ve hidrojen enerjileri günümüzde en sık kullanılan yenilenebilir enerji kaynaklarıdır. Bunların içerisinde güneşten elde edilen enerji birçok sektörde kullanım alanı bulmaktadır. Elde edilmesi, depolanması ve işletilmesi noktasında sağladığı avantajlar nedeniyle sık tercih edilen yenilenebilir enerji kaynaklarından. Güneşten aldığı enerjiyi elektrik enerjisine çeviren kaynakların en küçük yapısına fotovoltaik (FV) hücre denir. FV hücreler güneş tarafından yayınlanan termal radyasyona maruz kaldığında termal enerji soğurular ve DC elektrik enerjisi elde edilir. FV hücrelerin boyutu küçük, verebileceği DC gerilim ve enerjisi düşüktür. Bu hücrelerin seri ve paralel bağlanmasıyla bir dizi meydana getirilerek FV panel elde edilir (Tagare, 2011). Elde edilen enerjinin doğrudan depolanabilmesi ve kullanılabilmesi FV panellerin en önemli avantajlarından.

Yenilenebilir enerji kaynaklarından elde edilen enerjinin üretilen toplam enerji miktarındaki payının artırılmasında ve bu enerji kaynaklarına geçiş aşamasında; sistemlerin tasarlanması, enerjinin dağıtımı, işletme ve bakım-onarım faaliyetlerinin idamesi için nitelikli personele ihtiyaç duyulmaktadır (Alqahtani ve ark., 2018). Nitelikli teknik personel yetiştirilmesi için yenilenebilir enerji alanında eğitim veren kurumlardaki ders müfredatlarının düzenlenmesi ve yeni eğitim-öğretim materyallerinin geliştirilmesi önem kazanmaktadır (Kacan, 2015).

Literatür araştırıldığında FV panellerin öğretimine yönelik yapılan şu çalışmalar ile karşılaşılmıştır. Bilgisayar ortamında ticari bir FV panelin FV hücre modeli ile modellendiği çalışmada, elde edilen modelin FV sistem tasarımlarında ve genel sistem simülasyonu çalışmalarında kullanılabilmesi belirtilmiştir (İşen ve Koçhan, 2020). Yenilenebilir enerji mühendisliği eğitime yönelik gerçekleştirilen bir diğer çalışmada güneşlenme ve açık devre gerilim değerleri kademeli ayarlanabilen bilgisayar destekli bir FV emülatör sistemi geliştirilmiştir (Gürkan ve ark., 2020). İki farklı firmanın FV panellere yönelik eğitimlerde kullanılmak üzere ticari maksatlı geliştirdikleri deney donanımlarında 2 adet FV panel kullanılmış, deneysel çalışmalarda ihtiyaç duyulan ışık halojen lambalar vasıtasıyla sağlanmıştır (Anonim, 2019; Anonim, 2021).

Özellikle ticari maksatlı üretilen FV panel eğitim donanımlarında deneysel çalışma gerçekleştirmek için ya doğrudan güneş ışığına ya da yapay ışık kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır.

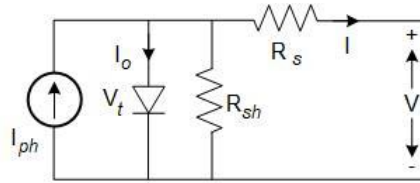
Doğrudan güneş ışığı ile yapılan deneysel çalışmalarda zamana ve mevsimsel değişimlere bağlı olarak kısıtlamalar söz konusu olmakta, eğitimler neticesinde oluşturulmak istenen davranışların kısmen kazandırılmaması gibi problemler yaşanabilmektedir. Yapay ışık kaynakları ile gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda ise ihtiyaç duyulan güneşlenme miktarını elde edebilmek için yüksek güçlü aydınlatma dizilerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada; güneş ışığı veya harici ışık kaynağına ihtiyaç duymadan, deneysel çalışmalarda FV panelin yerine kullanılacak bir FV panel emülatörün tasarımı gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında TERA Solar TRP-010B (Anonim, 2018) FV panelin dijital ikizi oluşturularak bu panel ile benzer elektriksel özelliklere sahip bir FV emülatör tasarımı gerçekleştirilmiştir. FV emülatörün elektriksel özelliklerini doğrulamak ve değerlendirmek için dijital ikiz yöntemi kullanılmıştır. Geliştirilen FV emülatörde, güneşlenme miktarı ve sıcaklık değerleri sürekli ayarlanabilmektedir. Güneşlenme parametresi  $50 \text{ W m}^{-2}$  ile  $1000 \text{ W m}^{-2}$  (%5 - %100), sıcaklık parametresi ise  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  ile  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  aralığında değiştirilebilmektedir.

## MATERYAL VE METOT

### FV Hücrenin Tek Diyot Modeli

FV hücrelerin elektriksel karakteristiğinin belirlenmesinde ve davranışlarının incelenmesinde yararlanılan tek diyot ve çift diyot modelleri bulunmasına karşın, tek diyot modeli en yaygın kullanılanıdır (Can, 2013). Bir FV hücrenin tek diyot modeline ait eşdeğer devre Şekil 1’de, devrenin çıkış akımını hesaplamada kullanılan eşitlik ise Eşitlik 1’de verilmiştir. Eşitlik 1’de;  $I$ : FV hücre çıkış akımı (A),  $I_{ph}$ : ışık kaynaklı akım (A),  $I_o$ : diyot ileri yön doyumu akımı (A),  $V$ : FV hücre çıkış gerilimi (V),  $R_{sh}$ : paralel kaçak akım direnci ( $\Omega$ ),  $R_s$ : Hücre iç direnci ile bağlantı dirençleri ( $\Omega$ ),  $V_t$ : termal gerilimdir (V).  $V_t$  ise Eşitlik 2’deki gibi hesaplanabilir. Eşitlik 2’de;  $N_s$ : hücre sayısı,  $n$ : diyot ideallik faktörü,  $k_b$ : Boltzman sabiti ( $1.38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ ),  $T$ : çalışma sıcaklığı (K),  $q$ : bir elektron yüküdür ( $-1.6 \times 10^{-19}$ ).



Şekil 1. FV hücrenin tek diyot modeli eşdeğer devresi

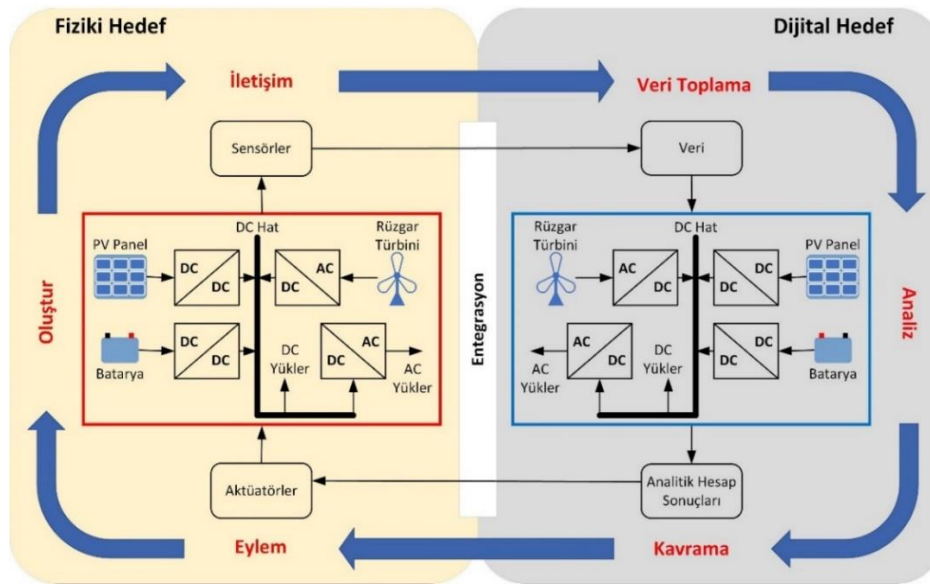
$$I = I_{ph} - I_o \cdot \left( e^{\frac{V+R_s I}{V_t}} - 1 \right) - \frac{V+R_s I}{R_{sh}} \quad (1)$$

$$V_t = \frac{N_s \cdot n \cdot k_b \cdot T}{q} \quad (2)$$

### Dijital İkiz

Dijital ikiz kavramı NASA’nın Apollo programına dayanmaktadır (Rosen ve ark., 2015). Apollo programı kapsamında özdeş iki uzay aracı geliştirilmiş, görevler esnasında uzay koşullarını oluşturabilmek için yeryüzünde bırakılan araca “Dijital İkiz” denmiştir (Shangguan ve ark., 2020). İkiz araç genellikle görev öncesi hazırlıklar için eğitim maksadıyla kullanılmıştır. İkiz aracın temel görevi, uzay aracının durumunu yansıtmak ve tahmin etmek, böylece acil durumlarda uzay yörüngesindeki astronotlara en doğru kararları vermeleri için yardımcı olmaktır. 2002 yılında Dr. Micheal Grieves tarafından ilk defa kullanılan dijital ikiz kavramının 2006 yılında kavramsal temelleri atılmıştır (Grieves, 2006, 2016; Kumaş ve Erol, 2021). Veri toplama, sinyal işleme, modelleme, benzetim ve diğer dijital teknolojilerin gelişmesiyle dijital ikiz kavramı daha somut bir hale gelmiştir. Dijital ikiz; ayrılabilir, yeniden üretilebilir, aktarılabilir, değiştirilebilir, silinebilir ve tekrarlanabilir bir dijital kopya oluşturmak

için fiziksel varlıkların çeşitli niteliklerini dijital dünyaya eşler (Boschert ve Rosen, 2016; Tao ve ark., 2017). Dijital ikiz gerçek verileri ve model verilerini sentezlemekle kalmaz, aynı zamanda fiziksel varlıkları farklı boyutlardan inceleme fırsatı sunar. Dijital ikiz kavramı, Nesnelerin İnterneti (IoT) sayesinde farklı sektörlerde düşük maliyetlerle kullanılabilir hale gelmiştir ve akıllı şehir, hava araçları, enerji yönetimi, inşaat, üretim, sağlık, mühendislik, madencilik, arızacılık gibi birçok farklı sektörde kullanım alanı bulmuştur (Fuller ve ark., 2020). Savunma, sağlık, otomotiv, havacılık, enerji gibi imalat ve test aşaması maliyetleri yüksek olan sektörlerde fiziki ortamdan alınan veriler ile dijital ikiz oluşturulması, verilerin izlenmesi, üretim hatalarının öngörülmesi ve gerekli tedbirlerin alınması maliyet etkin ve güvenilir çıktılarını elde edilmesini sağlar. Son yıllarda yenilenebilir enerji sistemleri ve akıllı şebekeler dijital ikiz teknolojisinin etkin şekilde kullanıldığı sektörlerdir (Khaled ve ark., 2020; Bartie ve ark., 2021; Guarino ve ark., 2021). Dijital ikizin çalışmasını gösteren bir mikro akıllı şebekenin blok diyagramı Şekil 2’de gösterilmektedir.



Şekil 2. Dijital ikiz bileşenleri içeren bir mikro akıllı şebekeye ait blok şema

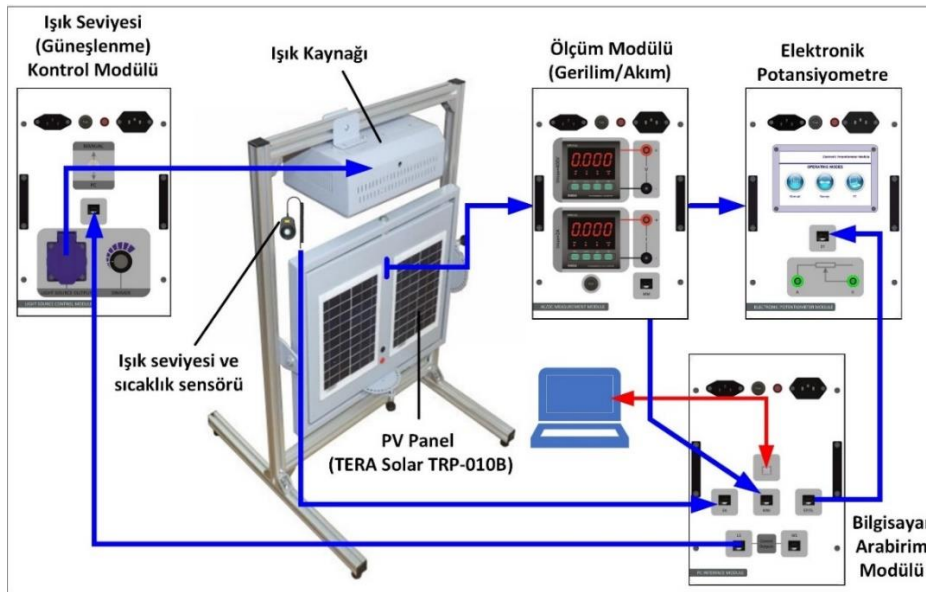
Dijital ikizde fiziki ve dijital hedefler için iki döngü vardır ve döngülerde sensörler ile aktüatörler bulunur. Sensörler, verileri fiziki hedeften toplar ve dijital hedefe aktarır. Dijital hedefte gerçekleştirilen işlemlerden elde edilen analitik sonuçlar, fiziki hedefin çalışmasını düzenlemek üzere aktüatörler aracılığıyla fiziki hedefe aktarılır. Dijital ikize ulaşmak için altı basamaktan oluşan bir işlemler dizisi takip edilir. Oluşturma safhasında; fiziki hedefe ait operasyonel (akım, gerilim, güç, frekans vb.) ve çevresel (sıcaklık, nem, güneşlenme, rüzgâr hızı vb.) ölçümler gerçekleştirilir. İletişim, fiziki hedef ile dijital hedef arasında iki yönlü haberleşmenin gerçekleştirildiği ve veri akışının sağlandığı safhadır. Veri toplama safhasında fiziki hedeften gelen veriler, dijital hedefte değerlendirilmek üzere bulut veya dahili bölgelere kaydedilir. Toplanan veriler, fiziki hedeften toplanan verileri analiz etmek ve görselleştirmek için kullanılır. Veri analistleri verileri analiz eder ve akıllı kararlar için fiziki hedefte iyileştirmeler yapar. Analiz edilen verilerin işlenmesiyle görselleştirme yapılabilir ve anomalilerin belirlenmesi için kullanıcı tarafından takip edilebilir. Fiziki hedefin daha fazla araştırılması, verilerin kavranmasıyla ve işselleştirilmesiyle mümkündür. Kavrama safhasında, fiziki hedef için gerçekleştirilecek akıllı eylemler tanımlanır. Dijital hedefte ele alınan veriler kontrol için aktüatörleri tetikler ve fiziki hedef kontrol edilir. Fiziki ve dijital hedefin kapalı döngü mimarisi, sistemin entegrasyonu ile gerçekleştirilir (Senthilnathan ve Annappoorani, 2019).

### Sistem Tasarımı

FV sistemlerin incelenmesi ve yenilenebilir enerji mühendisliği eğitimlerinde deneysel maksatlarla kullanılabilen bir FV panel emülatör prototipi geliştirmek üzere gerçekleştirilen bu çalışmada tasarım aşamaları aşağıda ele alınmıştır. FV panel emülatör prototipinin geliştirilmesi üç temel safhada gerçekleştirilmiştir. Birinci safhada ticari maksatla üretilen bir FV panele ait elektriksel parametreler tespit edilmiş, ikinci safhada FV panelin dijital ikizi oluşturulmuş, üçüncü safhada FV panel ile benzer elektriksel özelliklere sahip FV panel emülatörü tasarlanarak prototipi imal edilmiştir.

#### FV panelin elektriksel parametrelerinin tespiti

Çalışma kapsamında TERA Solar TRP-010B FV panel referans alınmış, FV panelin temel elektriksel parametrelerinin tespiti için Şekil 3'te verilen deney düzeneği kurulmuştur.



Şekil 3. FV panelin temel elektriksel parametrelerinin tespiti için kurulan deney düzeneği

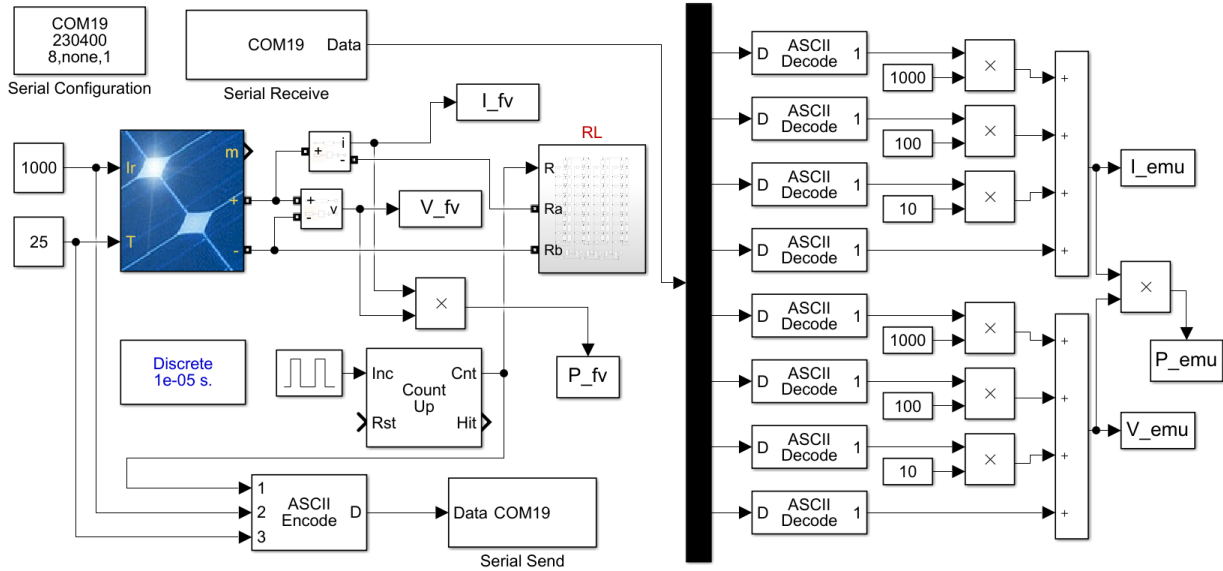
Çalışmanın bundan sonraki bölümlerinde TERA Solar TRP-010B FV panelden 'Referans Panel' olarak bahsedilmiştir. Şekil 3'te iki adet FV panel bulunmasına karşın bu panellerden yalnızca bir tanesi kullanılarak parametre tespiti gerçekleştirilmiştir. Deney düzeneği incelendiğinde, ışık seviyesi kontrol modülü ile bir halojen lamba grubunun kontrol edilerek FV panelin güneşlenme miktarının ayarlanabildiği görülmektedir. Güneşlenme miktarının kontrolü bilgisayar arabirim modülü tarafından gerçekleştirilmektedir. Belirlenen güneşlenme miktarı altında FV panelin gösterdiği elektriksel tepkinin ölçülmesi için bir ölçüm modülü kullanılmıştır. Ölçüm modülü ile FV panelden çekilen akım ve gerilim değerleri ölçülerek bilgisayar arabirim modülüne aktarılır. Elektronik potansiyometre ile FV panelin yüklenme miktarı ayarlanmaktadır. Elektronik potansiyometre, bilgisayar arabirim modülü tarafından kontrol edilebilir ve FV panel çıkışı 0-10 K $\Omega$  aralığında omik değerlerle yüklenebilir. Diğer taraftan FV panel güneşlenme miktarı ve sıcaklığının ölçümü için kullanılan sensör, bilgisayar arabirim modülü ile iletişim halindedir.

#### FV panel dijital ikizi

Dijital ikizin önemli bir kullanım alanı da test edilmesi veya doğrulanması için fazla donanım gereken sistemlerin daha ekonomik şekilde test edilmesini ve doğrulanmasını sağlamaktır. FV paneller de gerçek ortamlarında rahatlıkla test edilemeyen ve test için fazla donanım gerektiren yenilenebilir enerji bileşenleridir. Diğer taraftan FV panel emülatörleri, FV panellerin donanımsal bir modelidir. Özellikle teknik eğitimde FV paneller ile gerçekleştirilecek deneysel çalışmalarda FV panel yerine kullanılarak zamandan ve maliyetten tasarruf edilebilir. Ticari maksatla üretilen bir FV panelden yola



çıkarak oluşturulan dijital ikiz, FV panel ile yakın özelliklere sahip bir FV panel emülatörünün doğrulanması için kullanılabilir. Bu bilgidan hareketle, bu çalışmada elektriksel özellikleri belirlenen FV panel için bir dijital ikiz oluşturulmuş, sonraki bölümde tasarlanarak prototipi üretilen FV panel emülatörünün test edilmesi ve doğrulanması için kullanılmıştır. FV panel için tasarlanan dijital ikiz ve FV emülatörün doğrulanması için oluşturulan Simulink modeli Şekil 4'te verilmiştir.

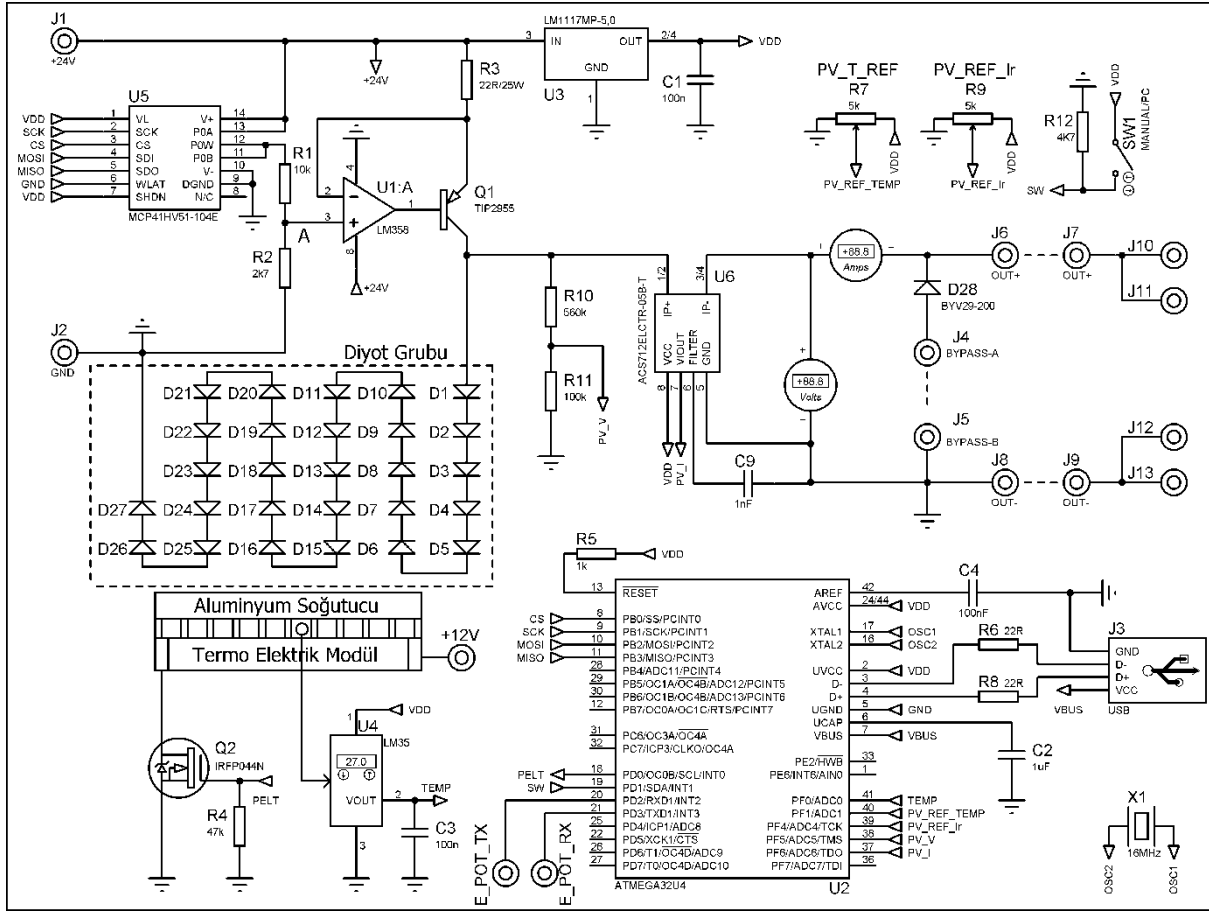


Şekil 4. FV panel için tasarlanan dijital ikiz ve FV emülatörün doğrulanması için oluşturulan Simulink modeli

### FV panel emülatörü

Çalışma kapsamında; referans panelin temel elektriksel verileri referans alınarak, Şekil 1'de eşdeğer devresi verilen FV hücrenin tek diyot modeline dayalı bir FV panel emülatör tasarımı ve prototip üretimi gerçekleştirilmiştir. Tasarlanan FV panel emülatörünün devre şeması ve prototip emülatörün dış görünümü sırasıyla Şekil 5 ve Şekil 6'da verilmiştir. Mikrodenetleyici tabanlı üretilen FV panel emülatöründe güneşlenme, panel sıcaklığı ve omik yük parametreleri bilgisayar destekli olarak ayarlanabilmektedir. Geliştirilen emülatör, bilgisayar ile kontrol edilebildiği gibi üzerinden manuel ayar yapılarak da işlemler gerçekleştirilebilmektedir. Emülatör ile bilgisayar arasındaki iletişim çalışma kapsamında geliştirilen bir protokolle yürütülmektedir. Bilgisayardan emülatöre doğru olan iletişimde; emülatör için gerekli olan güneşlenme, sıcaklık ve omik yük parametre değerleri bilgisayardan gönderilir ve bu değerlerin gereği olan işlemler emülatördeki mikrodenetleyici tarafından gerçekleştirilir. Emülatörden bilgisayara doğru olan iletişimde ise, emülatör çıkışından ölçülen akım ve gerilim verileri bilgisayara aktarılır. Emülatör üzerinde elektronik potansiyometre modülünün omik yük değerinin kontrol edilebilmesi için bir iletişim terminali bulunmaktadır.

Atmega328 mikrodenetleyici kullanılarak geliştirilen emülatörde, hedeflenen kısa devre akımı olan 0.56 A akım değerini sağlamak için bir akım kaynağı tasarlanmıştır. Şekil 5'te verilen devrede U1, U5, R1-R3 ve Q1 devre elemanları akım kaynağını oluşturmaktadır. U5 (MCP41HV51-104E), mikrodenetleyici tarafından kontrol edilen dijital bir potansiyometredir. Akım kaynağının sağlayabileceği maksimum akım 1 A'dır. R1, R2 ve U5 devre elemanları sayesinde akım kaynağının sağladığı akım 0.0275 A ile 0.57 A aralığında sürekli ayarlanabilir ve sınırlandırılabilir. Bu akım değerleri %5 ile %100 aralığına, diğer bir deyişle 50 W m<sup>-2</sup> ile 1000 W m<sup>-2</sup> aralığında güneşlenme miktarlarına karşılık gelmektedir. Güneşlenme referans değeri R7 ile ayarlanmaktadır. 0.57 A akım değeri emülatörden beklenen I<sub>SC</sub> değeridir.



Şekil 5. Tasarlanan FV panel emülatörün devre şeması

Açık devre gerilimini belirleyen devre elemanları D1-D27'dir. Çalışmada ileri yön gerilimi (forward voltage) yaklaşık 0.85 V olan diyotlar tercih edilmiştir. Bu durumda diyot grubunda yer alan 27 adet diyodun eşdeğer ileri yön gerilimi teorik olarak 22.95 V olur. Bu değer geliştirilen emülatörden beklenen  $V_{oc}$  değeridir.

Yük altında veya yüksüz çalışmada diyot grubundan geçen akım ısınmaya sebep olacaktır. Bu sıcaklık Eşitlik 2'deki  $T$  parametresinin değişmesine ve dolayısıyla emülatörün diğer parametrelerinin değişmesine sebep olacaktır. Bu nedenle bilinen sabit şartlar altında incelemeler yapabilmek için  $T$  değerinin kontrol altında tutulması gerekir. Bu maksatla diyot grubunun sıcaklık değerini sabit tutmak ve sabit sıcaklık altında FV panelin elektriksel davranışlarını incelemek için bir sıcaklık kontrol devresi tasarlanmıştır. Bunun için diyot grubu alüminyum soğutucuya ilişkilendirilmiş, alüminyum soğutucuya ise bir adet termo-elektrik modül (TEC1-12705) monte edilmiştir. Mikrodenetleyicide; U4 sıcaklık sensöründen elde edilen sıcaklık verisi ve R7 ile ayarlanan referans sıcaklık değeri karşılaştırılmakta, Q2 transistörü yardımıyla termo-elektrik modülün on-off kontrolü gerçekleştirilmektedir. Böylece diyot grubunun sıcaklığı 0 °C ile 80 °C aralığında istenen değerde sabit tutulabilmektedir.

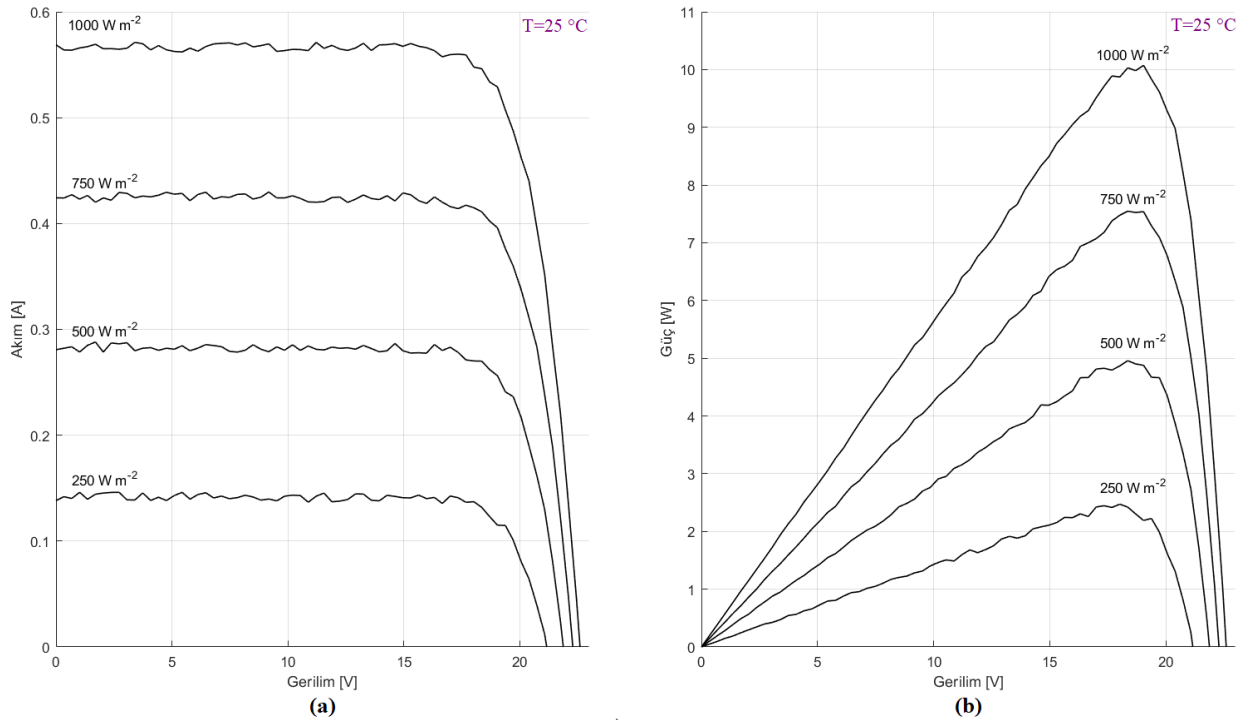


Şekil 6. Prototip FV panel emülatörün görünümü

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Referans Panele Ait Elektriksel Parametreler

Referans panele ait elektriksel parametrelerin elde edilmesi için Şekil 3'te verilen ölçme düzeneği kullanılmıştır. Kullanılan bu yapı sayesinde bilgisayar desteği ile FV panelin güneşlenme miktarı ayarlanmış, istenen yük koşullarında akım, gerilim, güneşlenme miktarı ve sıcaklık gibi parametreler elde edilebilmiştir. Referans panel için elde edilen temel elektriksel parametreler ve grafikler sırasıyla Çizelge 1 ve Şekil 7'de verilmiştir. Bu bölümde gerçekleştirilen çalışmalar 25 °C sıcaklık altında gerçekleştirilmiştir. Çizelge 1 ve Şekil 7 incelendiğinde elde edilen sonuçların, referans panel (Anonim, 2018) elektriksel verileri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlar, Şekil 3'te verilen ölçüm düzeneğinin işlevini yerine getirdiğini ve referans panelin temel elektriksel verilerinin doğru şekilde elde edildiğini göstermektedir.



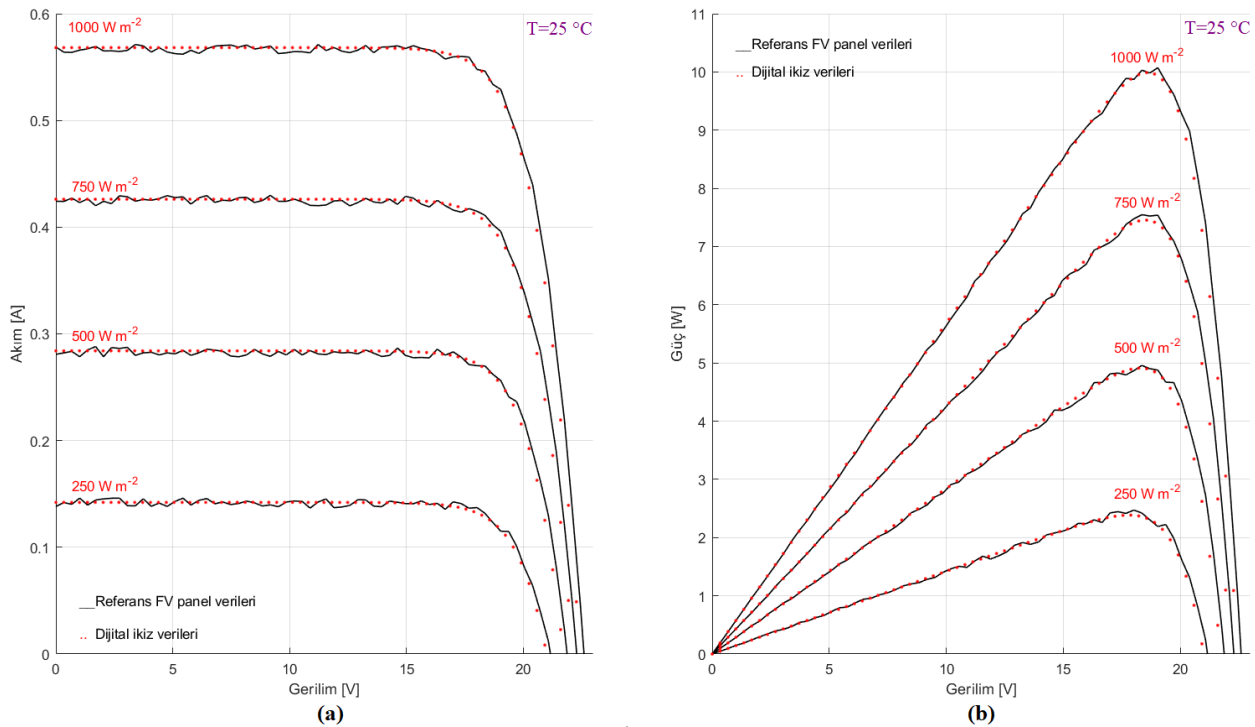
Şekil 7. Referans panel için elde edilen grafikler (a) I-V grafiği (b) P-V grafiği

Çizelge 1. Referans panel için elde edilen temel elektriksel parametreler

Parametre	Katalog Değeri	Elde Edilen Değer	Fark (%)
Maksimum Güç ( $P_{max}$ )	10.00 W	10.03 W	+0.30
Maksimum Güç Gerilimi ( $V_{mp}$ )	18.18 V	18.70 V	+2.86
Maksimum Güç Akımı ( $I_{mp}$ )	0.55 A	0.54 A	-1.81
Açık Devre Gerilimi ( $V_{OC}$ )	22.59 V	22.61 V	+0.08
Kısa Devre Akımı ( $I_{SC}$ )	0.57 A	0.56 A	-1.75

### Tasarlanan Dijital İkiz Performansının İncelenmesi

Çalışma kapsamında tasarlanan dijital ikiz ile istenen güneşlenme, sıcaklık ve yük koşullarında grafiksel inceleme yapılabilir, dijital ikiz için kullanılan parametreler eşzamanlı olarak FV panel emülatörüne iletilebilir ve FV panel emülatörünün bu parametrelere tepkisi incelenebilir. Böylelikle FV panel emülatörü verileri ile FV panel verileri karşılaştırılmış olur. Şekil 4'te Simulink modeli verilen dijital ikiz için elde edilen grafikler Şekil 8'de, temel elektriksel parametreler ise Çizelge 2'de verilmiştir. Şekil 8 ve Çizelge 2 incelendiğinde; tasarlanan dijital ikizin, referans panelin temel elektriksel özelliklerini büyük ölçüde sağladığı görülmektedir. Elde edilen sonuçlar, literatürde PV paneller için geliştirilen diğer dijital ikiz modeli sonuçları ile (Khaled ve ark., 2020) uyumludur.



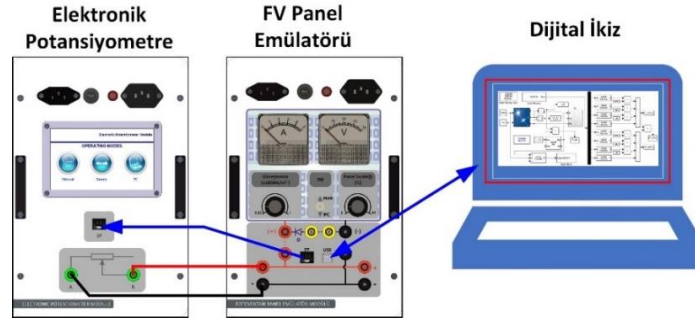
Şekil 8. FV panel dijital ikizi için elde edilen grafikler (a) I-V grafiği (b) P-V grafiği

Çizelge 2. FV panel dijital ikizi için elde edilen elektriksel parametreler

Parametre	Referans FV Panel Değeri	Dijital İkiz Değeri	Fark (%)
Maksimum Güç ( $P_{max}$ )	10.03 W	9.98 W	-0.50
Maksimum Güç Gerilimi ( $V_{mp}$ )	18.70 V	18.56 V	-0.75
Maksimum Güç Akımı ( $I_{mp}$ )	0.54 A	0.53 A	-1.85
Açık Devre Gerilimi ( $V_{OC}$ )	22.61 V	22.44 V	-0.75
Kısa Devre Akımı ( $I_{SC}$ )	0.56 A	0.56 A	0.00

### Tasarlanan FV Panel Emülatör Performansının İncelenmesi

Geliştirilen emülatörün doğrulanması için Şekil 9’da verilen deney düzeneği hazırlanmıştır. Bu düzenek ile emülatörün temel elektriksel parametreleri elde edilmiş, grafiksel incelemeler yapılmış, FV panel için geliştirilen dijital ikiz kullanılarak doğrulama işlemi gerçekleştirilmiştir. 25 °C referans sıcaklık değeri için gerçekleştirilen deneysel çalışma neticesinde FV panel emülatörü için elde edilen temel elektriksel veriler Çizelge 3’te, FV panel emülatörü ile dijital ikizin temel elektriksel verilerinin karşılaştırıldığı grafik Şekil 10’da verilmiştir. Elde edilen sonuçlar, literatürde FV panel emülatörleri için elde edilen sonuçlar ile (Can, 2013; Gürkan ve ark., 2020; İşen ve Koçhan, 2020) uyumludur.

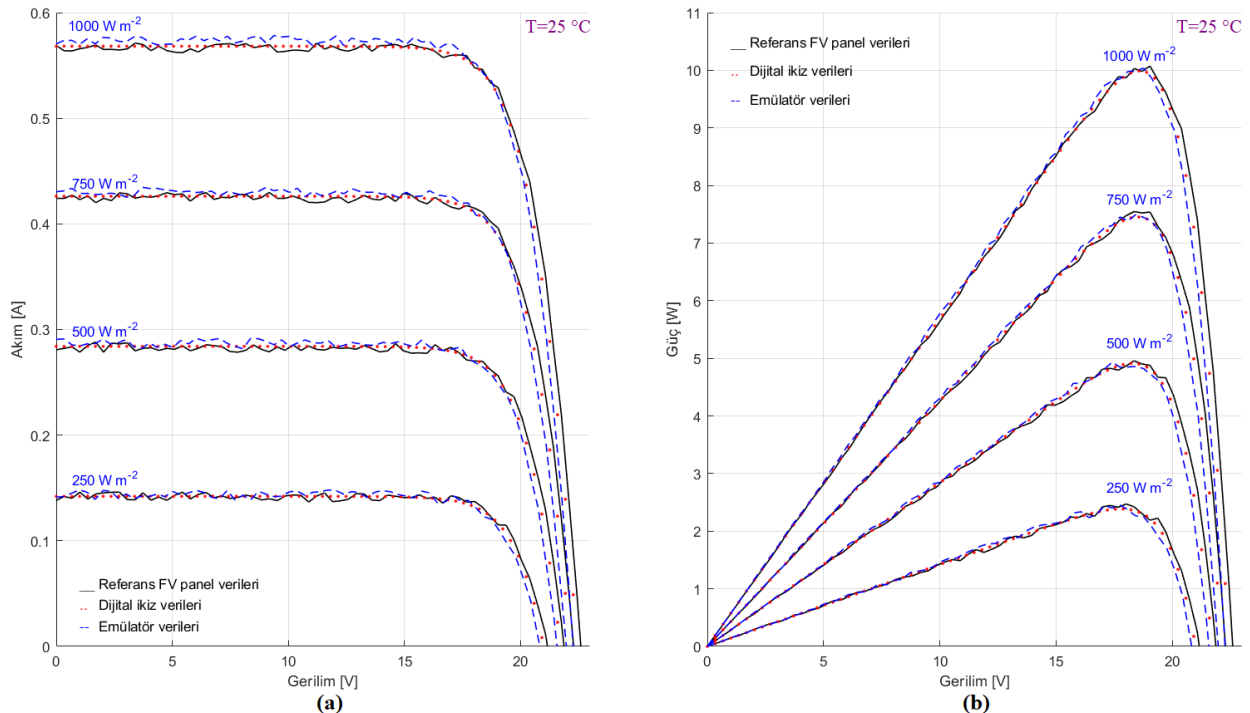


Şekil 9. FV panel emülatörünün doğrulanması için hazırlanan deney düzeneği

Çizelge 3. FV panel emülatörü için elde edilen temel elektriksel veriler

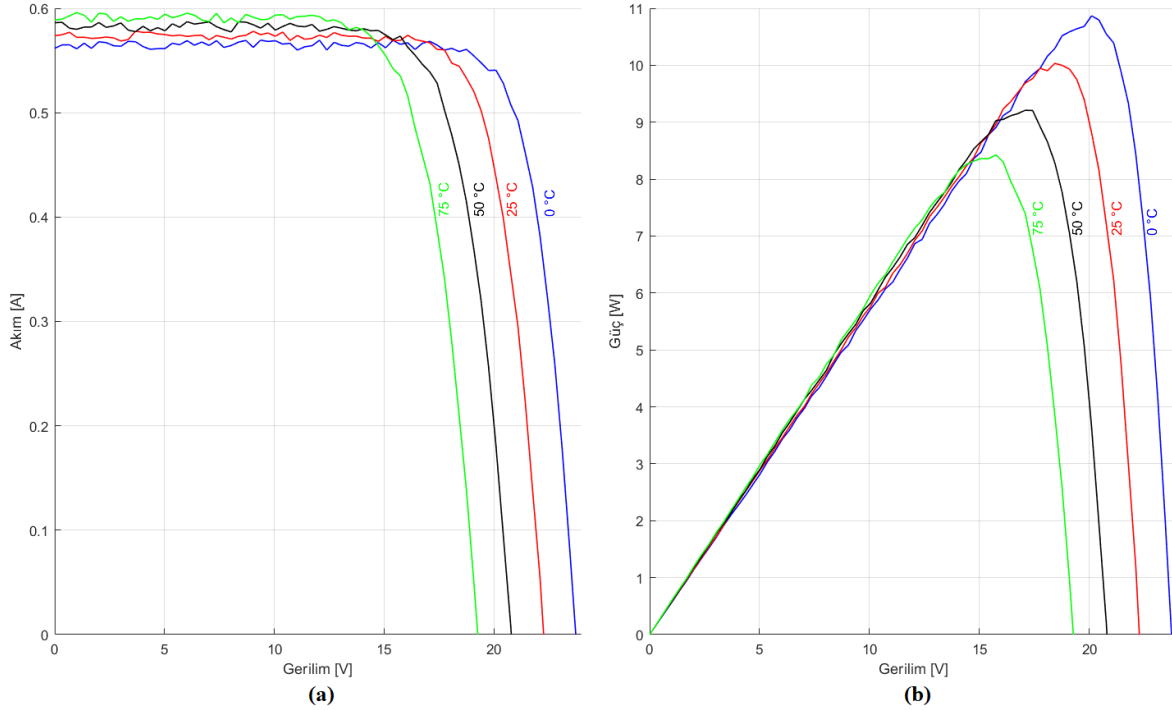
Parametre	Referans FV Panel Değeri	Dijital İkiz Değeri	Emülatör Değeri	Fark-1 (%)	Fark-2 (%)
Maksimum Güç ( $P_{max}$ )	10.03 W	9.98 W	10.01 W	-0,20	+0.30
Maksimum Güç Gerilimi ( $V_{mp}$ )	18.70 V	18.56 V	18.43 V	-1,47	-0.70
Maksimum Güç Akımı ( $I_{mp}$ )	0.54 A	0.53 A	0.54 A	0,00	+1.85
Açık Devre Gerilimi ( $V_{oc}$ )	22.61 V	22.44 V	22.27 V	-1,53	-0.76
Kısa Devre Akımı ( $I_{sc}$ )	0.56 A	0.56 A	0.57 A	1.75	1.79

Fark-1=Referans FV panel ile emülatör karşılaştırmasından elde edilen % fark, Fark-2=Dijital ikiz ile emülatör karşılaştırmasından elde edilen % fark.



Şekil 10. FV panel emülatörü için elde edilen grafikler (a) I-V grafiği (b) P-V grafiği

Geliştirilen FV panel emülatörünün farklı sıcaklıklardaki davranışlarını incelemek amacıyla, Şekil 9'da verilen deney düzeneği kullanılarak bir deneysel çalışma gerçekleştirilmiştir.  $1000 \text{ W m}^{-2}$  güneşlenme altında,  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  ve  $75 \text{ }^\circ\text{C}$  sıcaklıkları için elde edilen sonuçlar Şekil 11'de verilmiştir.



**Şekil 11.** FV panel emülatörü için farklı sıcaklıklar altında elde edilen grafikler (a) I-V grafiği (b) P-V grafiği

## SONUÇ

Bu çalışmada, TERA Solar TRP-010B FV panel referans alınarak bir FV panel emülatörü tasarlanmıştır. Tasarlanan donanımın test edilmesi ve doğrulanması için Matlab Simulink ortamında FV panele ait bir dijital ikiz oluşturulmuştur. Referans panel için deneysel çalışmalarla elde edilen temel elektriksel verilerin ve grafik sonuçların, panele ait veri sayfasındaki değerlerle uyumlu olduğu görülmüştür. FV panel için oluşturulan dijital ikiz ile gerçekleştirilen deneysel çalışmalar neticesinde elde edilen temel elektriksel verilerin ve grafiksel sonuçların da referans panel verileri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Dijital ikiz için elde edilen temel elektriksel verilerde en yüksek hata, %1.85 ile maksimum güç akımı parametresinde meydana gelmiştir. Geliştirilen FV panel emülatörü ile gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda, FV panel emülatörü temel elektriksel verileri ve grafik sonuçlarının dijital ikiz için elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu görülmüştür. FV panel emülatörü için elde edilen temel elektriksel verilerde en yüksek hata %1.85 ile kısa devre akımı parametresinde meydana gelmiştir. Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde FV panel, FV panel dijital ikizi ve FV panel emülatörüne ait sonuçların yüksek oranda uyumluluk gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu bilgiden hareketle; tasarlanarak prototip imalatı gerçekleştirilen FV panel emülatörünün, referans panel ile gerçekleştirilecek deneysel çalışmalarda kullanılabileceği kıymetlendirilmektedir.

Şekil 3 ve Şekil 9'da verilen deney düzenekleri karşılaştırıldığında; FV panellerin gerçek şartlarda test edilmesi veya deneysel çalışmalar gerçekleştirilmesi esnasında fazla miktarda donanım ihtiyacı duyulduğu, FV panel emülatörü kullanımı ile donanım ihtiyacının azaldığı ve zamandan tasarruf sağlandığı sonucuna ulaşılmaktadır. Referans panel ile gerçekleştirilen çalışmalarda farklı sıcaklıklar için deneysel çalışma gerçekleştirilmemiştir. Ancak dijital ikiz ve FV emülatör ile farklı sıcaklıklar için

gerçekleştirilen çalışmalarda elde edilen verilerin, referans panel katalog verileri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Böylelikle, dijital ikiz kavramı için geçerli olan fiziki hedef hakkında yeni ve güvenilir verilerin elde edilebilmesi teorisini destekleyen bir sonuç elde edilmiştir.

### Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

### Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

### KAYNAKLAR

- Anonim, 2018, TRP Serisi Polikristal Fotovoltaik Paneller, [http://www.tera-solar.com/upload/dosyalar/TERA\\_SOLAR\\_250W\\_300W\\_Fotovoltaik\\_Panel.pdf](http://www.tera-solar.com/upload/dosyalar/TERA_SOLAR_250W_300W_Fotovoltaik_Panel.pdf) (Erişim Tarihi: 01.10.2021).
- Anonim, 2019, Renewable Energy Trainer, [https://www.heliocentrisacademia.com/product/renewable\\_energy\\_trainer](https://www.heliocentrisacademia.com/product/renewable_energy_trainer) (Erişim Tarihi: 01.10.2021).
- Anonim, 2020, Statistical Review of World Energy, <https://www.bp.com/content/dam/bp/business-sites/en/global/corporate/pdfs/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2020-full-report.pdf> (Erişim Tarihi: 01.10.2021).
- Anonim, 2021, EPH 3 Professional Photovoltaics Trainer (PV), <https://www.lucas-nuelle.us/2768/apg/13261/EPH-3-Professional-Photovoltaics-Trainer-PV-.htm> (Erişim Tarihi: 01.10.2021).
- Alqahtani A, Alsaffar M, El-Sayed M, Behbehani H, 2018. A photovoltaic system experiment in a laboratory environment. *The International Journal of Electrical Engineering & Education*, 55(1):31–43.
- Aydın İ, 2014. Balıkesir’de Rüzgâr Enerjisi. *Doğu Coğrafya Dergisi*, 18:29–50.
- Bartie NJ, Cobos-Becerra YL, Fröhling M, Schlatmann R, Reuter MA, 2021. The resources, exergetic and environmental footprint of the silicon photovoltaic circular economy: Assessment and opportunities. *Resources, Conservation and Recycling*, 169:105516.
- Bayramoğlu T, 2018. Yenilenebilir Enerji Potansiyeli ve Etkileri: Bayburt Örneği. *İşletme Ekonomi ve Yönetim Araştırmaları Dergisi*, 1(1):1–16.
- Boschert S, Rosen R, 2016. Digital Twin---The Simulation Aspect. In: Hehenberger P, Bradley D, eds. *Mechatronic Futures: Challenges and Solutions for Mechatronic Systems and their Designers*, 59–74, Cham: Springer International Publishing;
- Can H, 2013. Model of a photovoltaic panel emulator in MATLAB-Simulink. *Turkish Journal of Electrical Engineering and Computer Science*, 21:300–308.
- Fuller A, Fan Z, Day C, Barlow C, 2020. Digital Twin: Enabling Technologies, Challenges and Open Research. *IEEE Access*, 8:108952–108971.
- Gençer Ç, Akkaya S, Gürkan S, 2009. Wind Energy Potential In Turkey And Case Study Of Three Projects. *5th International Advanced Technologies Symposium (IATS’09)*. 1–4, Karabük, Türkiye;
- Grieves M, 2006. *Product lifecycle management: driving the next generation of lean thinking* New York: McGraw-Hill Education.
- Grieves M, 2016. Origins of the Digital Twin Concept
- Guarino A, Monmasson É, Spagnuolo G, 2021. SoC-based embedded real-time simulation of mismatched photovoltaic strings. *Mathematics and Computers in Simulation*, 184:267–281.
- Gürkan S, Karapınar M, Sorgunlu H, Öztürk O, Doğan S, 2020. Development of a photovoltaic panel emulator and LabVIEW-based application platform. *Computer Applications in Engineering*

- Education, 28(5):1291–1310.
- İşen E, Koçhan Ö, 2020. Fotovoltaik Panelin Tek Diyotlu Modellenmesi. Mühendislik Bilimleri ve Araştırmaları Dergisi, 2(1):2–10.
- Kacan E, 2015. Renewable energy awareness in vocational and technical education. Renewable Energy, 76:126–134.
- Kavcıoğlu Ş, 2019. Yenilenebilir Enerji ve Türkiye. Finansal Araştırmalar ve Çalışmalar Dergisi, 11(21):209–227.
- Kaya K, Şenel MC, Koç E, 2018. Dünyada ve Türkiye’de Yenilenebilir Enerji Kaynaklarının Değerlendirilmesi. Technological Applied Sciences, 13:219–234.
- Khaled N, Pattel B, Siddiqui A, 2020. 6 - Digital twin model creation of solar panels. In: Khaled N, Pattel B, Siddiqui A, eds. Digital Twin Development and Deployment on the Cloud. 137–162, Academic Press;
- Kumaş E, Erol S, 2021. Endüstri 4.0’da Anahtar Teknoloji Olarak Dijital İkizler. Politeknik Dergisi, Erken Görünüm.
- Rosen R, von Wichert G, Lo G, Bettenhausen KD, 2015. About The Importance of Autonomy and Digital Twins for the Future of Manufacturing. IFAC-PapersOnLine, 48(3):567–572.
- Senthilnathan K, Annapoorani I, 2019. Cyber Twin Approach for Smart Grids. IEEE Smart Grid
- Shangguan D, Chen L, Ding J, 2020. A Digital Twin-Based Approach for the Fault Diagnosis and Health Monitoring of a Complex Satellite System. Symmetry, 12(8)
- Tagare DM, 2011. Electric Power Generation Wiley.
- Tao F, Cheng J, Qi Q, 2017. Digital twin-driven product design, manufacturing and service with big data. The International Journal of Advanced Manufacturing Technology, 94(2018):3563–3576.
- Yılmaz EA, Öziç HC, 2018. Türkiye’nin Yenilenebilir Enerji Potansiyeli ve Gelecek Hedefleri. Ordu Üniversitesi Sosyal Bilimler Araştırmaları Dergisi, 8(3):525–535.



**Atıf İçin:** Ayarcı Kuruoğlu N, 2022. MOCVD ile büyütülen GaN p-i-n yapısındaki sarı ışık merkezinin elektro-optik ölçümlerle incelenmesi. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 207-216.

**To Cite:** Ayarcı Kuruoğlu N, 2022. Investigation of the yellow light center in GaN p-i-n structure grown by MOCVD with electro-optical measurements. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 207-216.

## MOCVD ile büyütülen GaN p-i-n yapısındaki sarı ışık merkezinin elektro-optik ölçümlerle incelenmesi

Neslihan AYARCI KURUOĞLU<sup>1,\*</sup>

**ÖZET:** Bu çalışmada, metal organik buhar fazlı epitaksi ile üretilmiş GaN p-i-n yapı, elektrolüminesans (EL) ve sıcaklığa akım-gerilim ölçümleriyle incelenmiştir. GaN p-i-n yapının, düz besleme geriliminde uzay yükü sınırlamalı bölgeye karşılık gelen 50 mA enjeksiyon akımı altında, tepe noktası 2.2 eV enerjisinde olan sarı ışık yaydığı gözlenmiştir. Ayrıca, uzay yükü sınırlamalı bölgeden türetilen mobilitenin, elektrik alan bağıllığının Poole-Frenkel türünde olduğu saptanmış ve termal enerji aralığı 0.299 eV olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan bu enerji aralığı, EL ölçümünden elde edilen sonuçlarla desteklenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** GaN, p-i-n yapı, elektrolüminesans, akım-gerilim karakterizasyonu, mobilite.

### Investigation of the yellow light center in GaN p-i-n structure grown by MOCVD with electro-optical measurements

**ABSTRACT:** In this study, GaN p-i-n structure grown by metal-organic vapor phase epitaxy was investigated by temperature-dependent current-voltage and electroluminescence (EL) measurements. It has been observed that the GaN p-i-n structure emits yellow light with a peak energy of 2.2 eV under 50 mA injection current corresponding to the space charge limited region at forward voltage. In addition, the electric field dependence of the mobility derived from the space-charged region was determined to be Poole-Frenkel and the thermal energy gap was calculated as 0.299 eV. This calculated energy range was supported by the results obtained from the EL measurement.

**Keywords:** GaN, p-i-n structure, electroluminescence, current-voltage characterization, mobility.

<sup>1</sup>Neslihan AYARCI KURUOĞLU ([Orcid ID: 0000-0002-9659-7280](https://orcid.org/0000-0002-9659-7280)), Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, İstanbul, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Neslihan AYARCI KURUOĞLU, e-mail: nayarci@yildiz.edu.tr

## GİRİŞ

GaN geniş bant aralığının sağladığı optik özellikleri nedeniyle ışık yayan diyot (Amano 2016; Pimputkar ve ark. 2009), lazer diyot (Murayama ve ark. 2018; Nakamura 1998; Zhang ve ark. 2019), detektör gibi optoelektronik uygulamalar için kullanılmaktadır. Bu özelliklerinin yanında, radyasyon dayanıklılığı nedeniyle, radyoaktif beta kaynağından yayınlanan elektronların kinetik enerjisinin elektrik enerjisine dönüştürerek, beta kaynağının yarı ömrüne bağlı olarak uzun yıllar (örneğin Nikel-63 için 100.2 yıl) elektrik üretilmesini sağlayan betavoltaik pil uygulamaları (N. Kuruoğlu, Özdemir, and Bozkurt 2017; Munson ve ark. 2018; Yoon ve ark. 2020) için de ilgi çekici bir yarı iletkenidir.

GaN p-i-n yapılar, moleküler ışın epitaksi (MBE), Metal-Organik Kimyasal Buhar Biriktirme (MOCVD) ve hidrit buhar faz epitaksi (HVPE) (Tan 2020) gibi farklı büyütme yöntemlerle büyütülebilmektedir. GaN yapılar, yoğun kullanımına rağmen, altlık ile örgü parametresi uyumsuzluğu ve büyütme için pahalı olmayan, büyük alanlı bir bulk GaN altlık olmaması nedeniyle, hala teknik sorunlar içermektedir (Avrutin ve ark. 2010; Tan 2020). Safir altlık, yüksek termal ve kimyasal kararlılığı ve düşük maliyeti olması nedeniyle GaN tabanlı yapılarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Narayanan ve ark. 2002). Ancak, GaN ile safir arasındaki yüksek örgü uyumsuzluğu (%13.3) (Liu and Edgar 2002; Tan 2020), vida dislokasyonuna yol açan kusurların üretilmesine neden olmaktadır (Chichibu ve ark. 2020; Ning ve ark. 1996; O'Hanlon ve ark. 2021; Sheremet ve ark. 2018). GaN üretimindeki bir diğer problem de akseptör katkılama problemidir (Nakano and Jimbo 2002; Usami ve ark. 2017). MOCVD ile büyütülen filmlerde, p türü GaN oluşturmak için genellikle magnezyum (Mg) kullanılmaktadır (Usami ve ark. 2017; Y. Wang ve ark. 2020). Literatürdeki çalışmalarda, düşük Mg konsantrasyonu ile katkılanan GaN yapılarda, azot (N) ve galyum (Ga) boşluklarının oluşturduğu nokta kusurları nedeniyle 2.2 eV (560 nm) civarında sarı ışık (YL) gözlemlenmiştir (Arifin, Sugianto, ve ark. 2020; M. A. Reshchikov and Morkoç 2006; Soh ve ark. 2004; Sui and Yu 2011). Mg konsantrasyonu arttırıldığında, YL'nin baskılanmaya başladığı ve Mg konsantrasyonu daha da arttırıldığında, 2.8 eV (422 nm) enerjisinde (dalga boyunda) mavi ışık yayıldığı gözlemlenmiştir (Sui and Yu 2011). Gözlenen bu mavi ışık, valans bandının üzerindeki 0.5 eV enerjili derin kusura atfedilir (Maruska, Stevenson, and Pankove 1973; Maruska and Tietjen 1969; Oh, Park, and Park 1998; Smith ve ark.; Ves ve ark. 2000) ve derin bir vericiden sığ Mg alıcısına optik geçiş olarak yorumlanır (Kaufmann ve ark. 1998). GaN yapı içerisinde yer alan safsızlık ve boşluklar, ışımsız rekombinasyona neden olarak optoelektronik cihazlarda kuantum verimliliğini azaltmaktadır (Dreyer ve ark. 2016). Bununla birlikte, betavoltaik uygulamalarda, GaN'daki yerel kusurların, Ga boşluklarının neden olduğu akseptör benzeri tuzakların, pil verimini azalttığı gözlemlenmiştir (Yoon ve ark. 2020). Bu nedenlerden dolayı, yapı içerisindeki kusurların tanımlanması ve anlaşılması büyük önem arz etmektedir.

Yapı içerisindeki kusurları belirlemek ve karakterize etmek için pek çok teknik kullanılmaktadır. GaN p-i-n diyotun elektriksel ve optik analizi için, akım-gerilim (Cao ve ark. 2003; N. A. Kuruoğlu ve ark. 2017; Yang ve ark. 2014), admitans spektroskopisi (N. A. Kuruoğlu ve ark. 2017), derin seviye geçiş spektroskopisi (Lee ve ark. 2017), fotoiletkenlik, fotolüminesans ve elektrolüminesans (EL) ölçüm teknikleri kullanılmaktadır (Belahsene ve ark. 2015; Bozkurt ve ark. 2019; Shan ve ark. 2017; W. J. Wang ve ark. 2013). Akım-gerilim ölçümleriyle yük taşıyıcılarının mobilitesi belirlenmektedir (Berleb and Brütting 2002; Blom ve ark. 1998). Böylece aktivasyon enerjisi değeri hesaplanarak kusur seviyelerinin tanımlanması mümkündür (Ayarıcı ve ark. 2016). Bu konuda pek çok çalışma olmasına rağmen, GaN'taki kusurların araştırılması üzerine çalışmalar halen devam etmektedir (M. A. Reshchikov ve ark. 2018). Özellikle, MBE, MOCVD ve HVPE gibi farklı büyütme teknikleriyle

üretilen GaN yapılarında gözlenen YL uzun zamandır tartışılmaktadır (Michael A. Reshchikov and Morko 2005).

Bu makalede, betavoltaik pil için son teknoloji ürünlerinden olan GaN p-i-n (Munson ve ark. 2018) yapının yüzey morfolojisinin analizi, yapı içerisindeki elementlerin tayini ve elektronik, optoelektronik karakterizasyonu hakkındaki analizler yer almaktadır. Bu analizler ile, GaN p-i-n yapı içerisinde, betavoltaik pil verimini azaltan kusur seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla mevcut GaN p-i-n yapının sıcaklığa bağlı akım yoğunluğu (J)- gerilim (V) ölçümlerinden yararlanılarak sıfır alan mobilitesi hesaplanmış ve bu parametrenin sıcaklığa bağımlılığıyla termal enerji aralığı belirlenmiştir. Belirlenen bu kusur seviyesi, EL ölçümü ile desteklenmiştir.

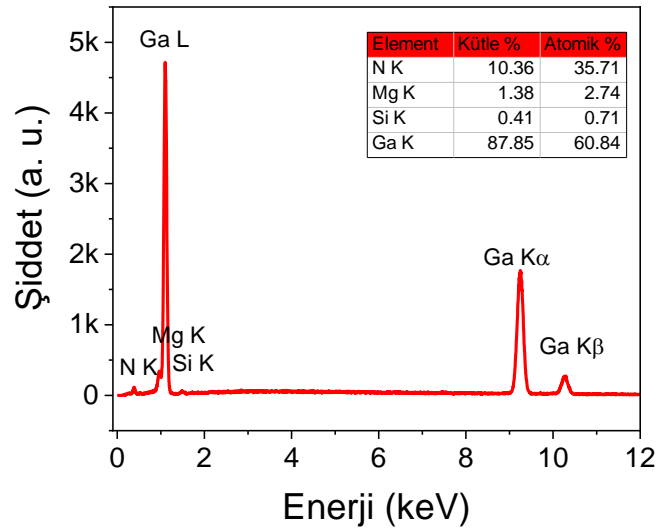
## MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada, MOCVD tekniği ile büyütülmüş GaN p-i-n eklem kullanılmıştır. Mevcut yapının, p-i-n katmanların kalınlıkları sırasıyla 0.27  $\mu\text{m}$ , 0.6  $\mu\text{m}$  ve 1  $\mu\text{m}$ 'dir. p katmanı  $1 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$  konsantrasyonuyla Mg ve n katmanı  $5 \times 10^{18} \text{ cm}^{-3}$  konsantrasyonunda silisyum (Si) katkılanmıştır. n tipi GaN'a 20/20 nm kalınlığında paladyum(Pd)/altın(Au) ve p tipi GaN'a 10 nm/30 nm/300 nm kalınlığında titanyum (Ti)/alüminyum (Al) /Au kaplanarak, 4\*4 mm<sup>2</sup> kontak alanına sahip numune elektriksel özellikleri incelemek için hazır hale getirilmiştir (N. A. Kuruoğlu ve ark. 2017; Munson ve ark. 2018). GaN p-i-n yapının yüzey morfolojisinin belirlenmesi için FEI Versa 3D ile SEM ve Park System XE-110 ile AFM görüntüleri alınmıştır. Ayrıca, GaN p-i-n yapının büyüme esnasında, kaplama oranlarının deneysel olarak belirlenmesi için taramalı elektron mikroskobu'na (SEM) eklenmiş EDAX, Octane Super SDD ile enerji dağılımlı X ışını spektroskopisi (EDS) ölçümü gerçekleştirilmiştir. GaN tabanlı p-i-n yapının elektriksel ve optoelektronik özelliklerini incelemek için, numune Janis Kreostat içerisinde yerleştirildi. Sonrasında numune ortam sıcaklığı oda sıcaklığından başlayarak 20 K aralıklarla Lake Shore 334 model sıcaklık kontrolcüsüyle 300-400 K aralığında değiştirildi. Böylece, sıcaklığa bağlı akım gerilim ölçümü, 0-10 V düz besleme geriliminde Keithley 2400 kaynak ölçer ile gerçekleştirildi. EL ölçümünde ise, Keithley 2400 kaynak ölçer ile örneğe gerilim/akım uygulanmış, yayılan spektrum fiber kablo bağlantılı Ocean Optics 2000+ spektrometre ile kaydedilmiştir

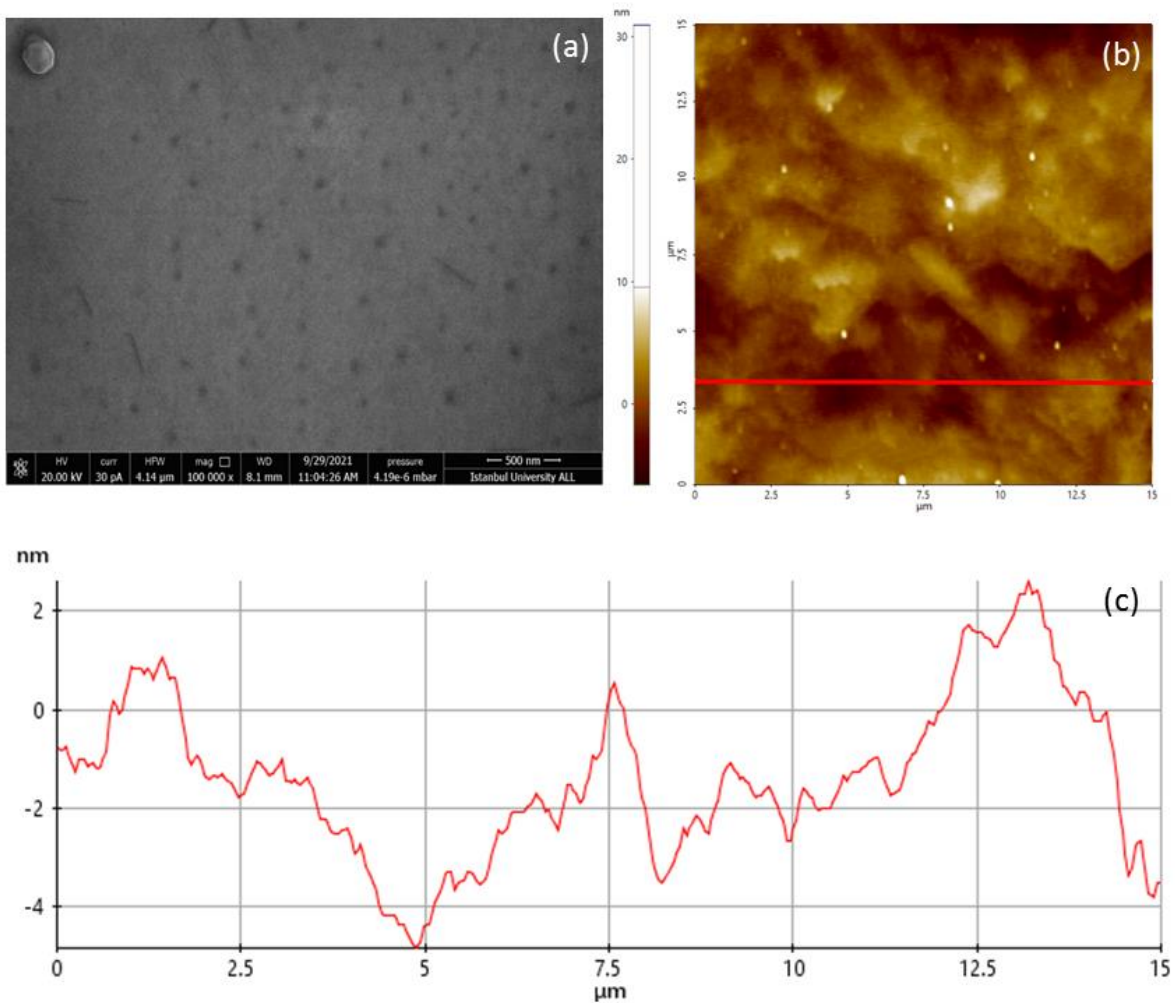
## BULGULAR VE TARTIŞMA

GaN p-i-n yapının p-GaN'ın üst yüzeyinden alınan EDS spektrumu Şekil 1'de gösterildiği gibidir. EDS spektrumu GaN p-i-n yapının Ga, N, Mg ve Si ana elementlerini içerdiğini göstermektedir. gözlenen elementlerin atomik ve kütle yüzdeleri Şekil 1 içerisinde gösterilmiştir. EDS spektrumunda, Ga:N oranı, %60:%36 olarak saptanmıştır. Ayrıca, GaN p-i-n yapının toplam hacmi içerisinde, p ve n katmanlarının sahip olduğu katkı atomlarının Ga ve N elementlerine göre daha az bulunması sebebiyle, EDS analizinde Şekil 1'de görüldüğü üzere, görece zayıf Si ve Mg pikleri gözlenmiştir.

GaN p-i-n yapının p-GaN tabakasının üst yüzeyinden alınmış SEM, AFM görüntüleri ve AFM görüntüsünden elde edilen yüzey kesit profili Şekil 2'de gösterildiği gibidir. AFM görüntüleri incelendiğinde,  $15 \times 15 \mu\text{m}^2$  tarama alanında oldukça düzgün süreklilik gösterdiği ve literatürle (Ke ve ark. 2012) uyumlu olarak, 1.2 nm Ra değerine sahip olduğu görülmüştür.

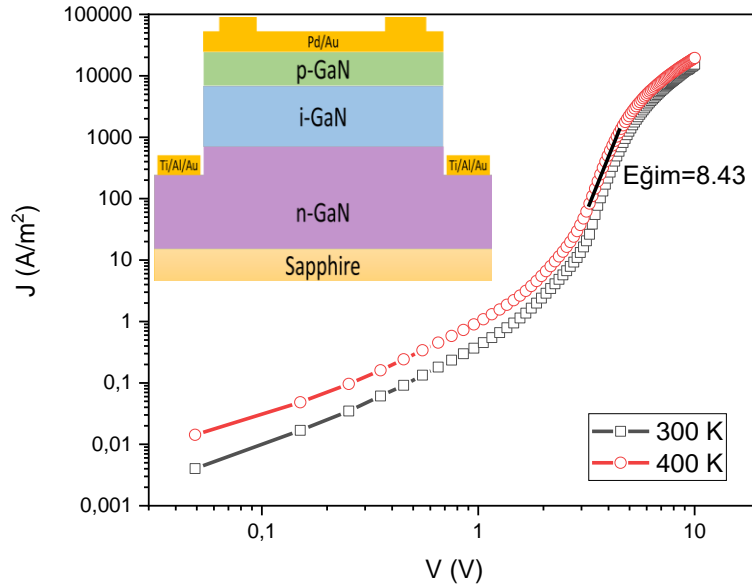


Şekil 1. GaN p-i-n yapının EDS spektrumu.



Şekil 2. MOCVD ile büyütülen GaN p-i-n yapının p-GaN üst yüzeyinden alınan (a) SEM görüntüsü (b) AFM görüntüsü ve (c) AFM görüntüsünden elde edilen yüzey kesit profili.

GaN p-i-n yapı için, oda sıcaklığında, karanlık ortam içerisinde akım yoğunluğunun, düz besleme gerilimi ile değişimi Şekil 3'te gösterilmiştir. Yüksek düz besleme gerilimlerinde ( $V > 5$  V), şekilde görüldüğü üzere, akım yoğunluğunun gerilimin kuvveti ile orantılı olarak arttığı gözlenmiştir. Akım yoğunluğunu ve gerilim arasında, şekilde gösterildiği üzere,  $J=KV^m$ ,  $m>2$  güç bağıntısının geçerli olması, bu bölgede uzay sınırlamalı akım iletim mekanizmasının baskın olduğunu göstermektedir (Gonzalez 2015; Lampert and Mark 1970).



Şekil 3. GaN p-i-n yapının akım yoğunluğunun düz besleme gerilimi ile değişimi.

Tek taşıyıcı için uzay yük sınırlamalı akım yoğunluğu,

$$J = \frac{9}{8} \mu \frac{E^2}{L} \quad (1)$$

ile verilir (Blom ve ark. 1998; Gill 1972; Martens, Brom, and Blom 1999; Novikov ve ark. 1998). Burada, J akım yoğunluğu, E elektrik alan, L malzeme kalınlığı,  $\mu$  mobilitedir. Mobilitenin Poole Frenkel türünde olması durumunda,  $\mu(E)$  ilişkisi

$$\mu = \mu_0 e^{\gamma \sqrt{E}} \quad (2)$$

şeklinde ifade edilir. Burada  $\gamma$  elektrik alan katsayısı,  $\mu_0$  ise sıfır alan katsayısıdır. Denklem (1)-(2) kullanılarak elde edilen  $J/E^2$ -  $E^{1/2}$  grafiği, sıcaklığa bağlı olarak, Şekil 4'de gösterilmiştir. J-V grafiğinde eğimin 8.3 olarak gösterildiği bölgeye karşılık gelen uzay yük sınırlamalı bölge,  $E^{1/2}$ - $J/E^2$  grafiğinde,  $E^{1/2}$ 'nin 2400-2800  $V^{1/2}m^{-1/2}$  aralığına karşılık gelmektedir.  $E^{1/2}$ - $J/E^2$  grafiğinde, uzay yükü sınırlamalı bölgedeki doğrunun eğiminden  $\mu_0$  sıfır alan katsayısı, eksenini kestiği noktadan ise  $\gamma$  elektrik alan katsayısı elde edilmiştir.  $\mu^*$  mobilite ön katsayısı,  $\Delta$  termal enerji aralığı,  $k_B$  Boltzmann sabiti, T sıcaklık, B ve  $T_0$  sabit elektrik alan katsayısı olmak üzere,  $\mu_0$  sıfır alan katsayısı

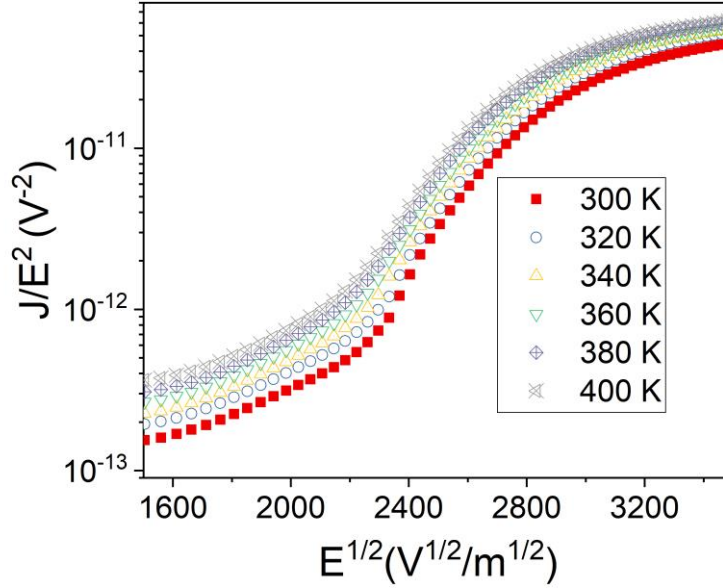
$$\mu_0 = \mu^* e^{-\frac{\Delta}{k_B T}} \quad (3)$$

ve  $\gamma$  elektrik alan katsayısı,

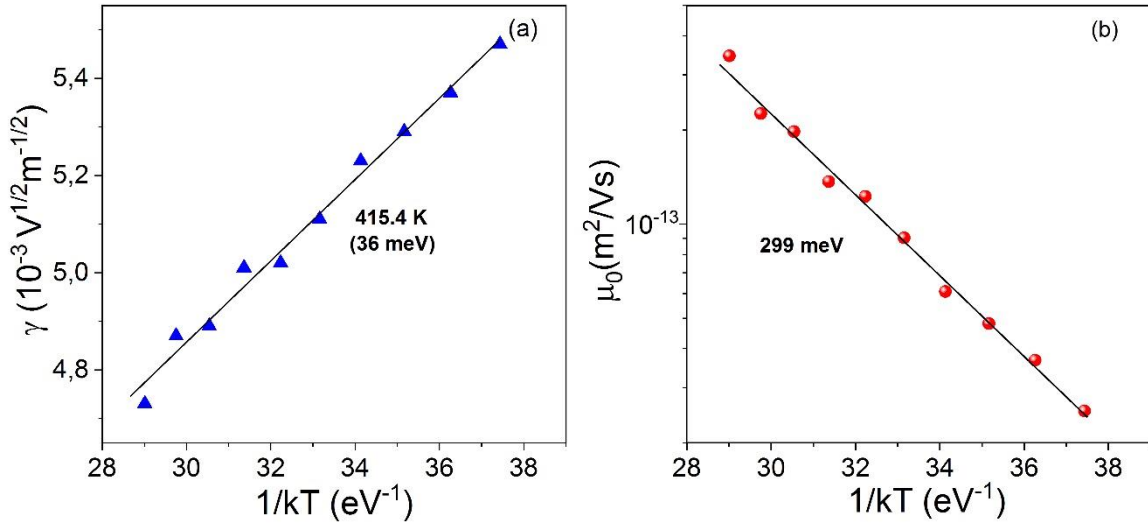
$$\gamma = B \left( \frac{1}{k_B T} - \frac{1}{k_B T_0} \right) \quad (4)$$

denklemleri ile ifade edilir (Blom ve ark. 1998; Gill 1972; Martens, Brom, and Blom 1999; Novikov ve ark. 1998).

$E^{1/2}$ - $J/E^2$  grafiğinde doğru eğiminin ve eksenini kestiği noktadan hesaplanan sıfır alan mobilitesinin sıcaklığa bağlı değişimi, sırasıyla, Şekil 5a ve Şekil 5b’de gösterilmiştir. Denklem (3)-(4) kullanılarak, doğru eğiminin sıcaklığa bağlılığından  $T_0$  sabiti 415 K (36 meV) ve sıfır alan mobilitesinin sıcaklığa bağlılığından  $\Delta$  termal enerji aralığı 0.299 eV olarak elde edilmiştir.

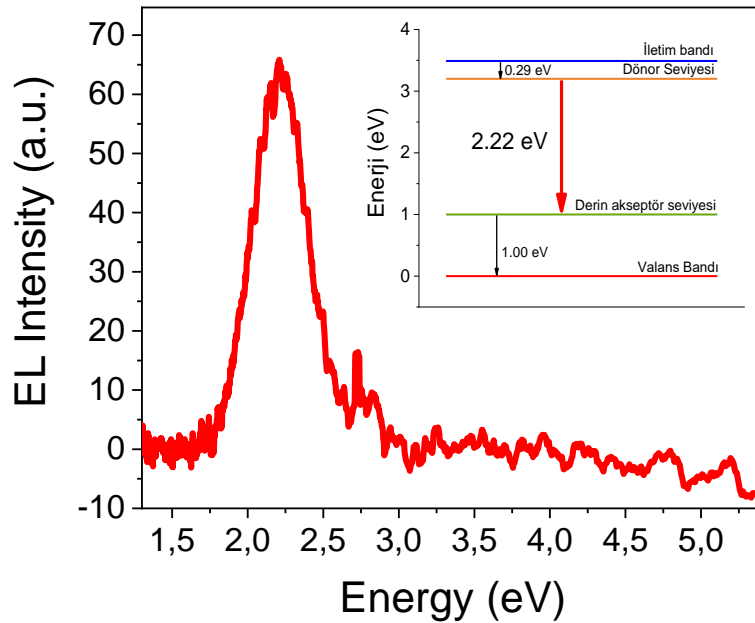


Şekil 4. GaN tabanlı p-i-n yapı için düz besleme gerilimi altında sıcaklığa bağlı  $E^{1/2}$ - $J/E^2$  grafiği.



Şekil 5. GaN tabanlı p-i-n yapıda düz besleme gerilimi altında (a)  $\gamma$  elektrik alan katsayısı ve (b)  $\mu_0$ 'ın sıcaklığa bağlı değişimi.

GaN p-i-n yapının oda sıcaklığında, 50 meV enjeksiyon akımı altında EL ölçümü alınmıştır. Şekil 6’da gösterildiği gibi, numuneden oda sıcaklığında keskin ve parlak YL çıkışı gözlenmiştir. EL spektrumunun tepe noktası 2.2 eV’a karşılık gelmektedir. 2.2 eV enerjili bu pik değeri, literatürde (Arifin, Subagio, ve ark. 2020), MOCVD ile büyütülmüş Mg katkılı GaN yapılar için önerilen alıcı verici ve rekombinasyon seviyelerinden, valans bandının 1 eV üzerindeki derin akseptör seviyesi ve iletim bandının 0.299 eV üzerindeki donör seviyesi arasındaki geçişe karşılık gelmektedir (Arifin, Subagio, ve ark. 2020) ve Şekil 6 içerisinde ek olarak bu geçiş gösterilmiştir.



**Şekil 6.** GaN tabanlı p-i-n yapının oda sıcaklığında 50 mA enjeksiyon akımı altında EL spektrumu.

## SONUÇ

GaN p-i-n yapı sabit sıcaklıklarda akım yoğunluğunu düz besleme voltajı bağılılığı ile incelenmiştir. Yüksek düz besleme bölgesinde, uzay yük sınırlamalı akım iletim mekanizması tanımlanmış ve taşıyıcılarının mobilitesi akım ölçümleriyle belirlenmiştir. Mobilitenin sıcaklığa bağılılığı ile aktivasyon enerjisi 0.299 eV olarak bulunmuştur. Elde edilen bu aktivasyon enerjisi EL ölçümünde gözlenen 2.2 eV pik değerindeki YL ışınmasında rol aldığı anlaşılmıştır. Belirlenen bu kusur varlığı, betavoltaik uygulamalar için kullanılan p-i-n yapının verim düşünü açıklar niteliktedir.

## TEŞEKKÜR

Örnek üretimi ve litografi işlemleri Fransa, Fransa Ulusal Bilimsel Araştırma Merkezi (CNRS) Fotonik ve Nanoyapılar Laboratuvarı (LPN)'de Prof. Dr. Abderrahim Ramdane ve grubu tarafından gerçekleştirilmiştir. SEM, AFM ve EDS ölçümleri için İstanbul üniversitesi Nano ve Optoelektronik araştırma laboratuvarı olanaklarını kullanmamı sağlayan Prof. Dr. Ayşe Erol'a ve ölçümleri gerçekleştiren Dr. Öğr. Üyesi Furkan Kuruoğlu'na çok teşekkürlerimi sunarım. Çalışma içerisindeki çok değerli yorumları ve desteği için Prof. Dr. Orhan Özdemir'e içtenlikle teşekkür ederim

## Çıkar Çatışması

Makalenin planlanması, yürütülmesi ve yazılması sırasında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederim.

## Yazar Katkısı

Makalenin planlanmasının, yürütülmesinin ve yazılmasının makalenin tek yazarı olarak tarafımdan yapıldığını beyan ederim.

**KAYNAKLAR**

- Amano H, 2016. Development of GaN-Based Blue LEDs, Metalorganic Vapor Phase Epitaxy of GaN, Related Materials. *Progress in Crystal Growth, Characterization of Materials*, 62 (2): 126-135.
- Arifin P, Sugianto, Subagio A, Sutanto H, Dwiputra D, Florena F F, Keintjem A C, Khaeroni R, 2020. Room-Temperature Photoluminescence of Mg-Doped GaN Thin Films Grown by Plasma-Assisted MOCVD. *AIP Advances*, 10: 045123.
- Avrutin V, Silversmith D J, Mori Y, Kawamura F, Kitaoka Y, Morkoc H, 2010. Growth of Bulk GaN, AlN: Progress, Challenges. In *Proceedings of the IEEE*, 98 (7): 1302–1315.
- Ayarcı N, Özdemir O, Bozkurt K, Ramdane A, Belahsene S, Martinez A, 2016. Discrimination of Carrier Conduction Mechanisms of InP/InGaAsP/InAs/InP Laser Structure Through J–V–T Measurements. *IEEE Transactions on Electron Devices*, 63 (5): 1866–1870.
- Ayarcı Kuruoğlu N, Özdemir O, Bozkurt K, Sundaram S, Salvestrini, J-P, Ougazzaden, A. Gaimard Q, Belahsene S. Merghem K, Ramdane A, 2017. Dc, Ac Electrical Response of MOCVD Grown GaN in P-i-n Structure, Assessed through I – V, Admittance Measurement. *Journal of Physics D: Applied Physics* 50 (50): 505109.
- Ayarcı Kuruoğlu N, Özdemir O, Bozkurt K, 2017. Betavoltaic Study of a GaN pin Structure Grown by Metal-Organic Vapour Phase Epitaxy with a Ni-63 Source. *Thin Solid Films*, 636: 746-750.
- Belahsene S, Al Saqri N.A, Jameel D, Mesli A, Martinez A, De Sanoit J, Ougazzaden A, Salvestrini J P, Ramdane A, Henini M, 2015. Analysis of Deep Level Defects in GaN P-i-n Diodes after Beta Particle Irradiation. *Electronics*, 4 (4): 1090–1100.
- Berleb S, Wolfgang B, 2002. Dispersive Electron Transport in tris(8-Hydroxyquinoline) Aluminum (Alq<sub>3</sub>) Probed by Impedance Spectroscopy. *Physical review letters*, 89 (28): 286601.
- Blom P W M, Vissenberg, M C J M, 1998. Dispersive Hole Transport in Poly (p -Phenylene Vinylene). *Physical review letters*, 80 (17): 3819–22.
- Bozkurt K, Özdemir Ö, Ayarcı Kuruoğlu N, Alshehri B, Dogheche K, Gaimard Q, Ramdane A, Dogheche E, 2019. Impact of Trap States on Inductive Phenomena in 30% InGaN/GaN MQW LED Devices. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 52 (10): 105102.
- Cao X A, Sandvik P M, LeBoeuf S F, Arthur S D, 2003. Defect Generation in InGaN/GaN Light-Emitting Diodes under Forward, Reverse Electrical Stresses. *Microelectronics Reliability*, 43 (12): 1987–91.
- Chichibu S F, Shima K, Kojima K, Ishibashi S, Uedono A, 2020. Origin, Dynamic Properties of Major Intrinsic Nonradiative Recombination Centers in Wide Bandgap Nitride. *Semiconductors*, 11280 (10): 112800B.
- Dreyer C E, Alkauskas A, Lyons J L, Speck J S, Van de Walle C G, 2016. Gallium Vacancy Complexes as a Cause of Shockley-Read-Hall Recombination in III-Nitride Light Emitters. *Applied Physics Letters*, 108: 141101.
- Gill W D, 1972. Drift Mobilities in Amorphous Charge-transfer Complexes of Trinitrofluorenone, Poly-n-vinylcarbazole. *Journal of Applied Physics*, 43(12): 5033.
- Gonzalez G, 2015. Quantum Theory of Space Charge Limited Current in Solids. *Journal of Applied Physics*, 117 (8): 22–25.
- Kaufmann U, Kunzer M, Maier M, Obloh H, Ramakrishnan A, Santic B, Schlotter P, 1998. Nature of the 2.8 eV Photoluminescence B, in Mg Doped GaN. *Applied Physics Letters*, 72: 1326-1328.
- Ke W-C, Jian S R, Chen I C, Jang J S-C, Chen W-K, Juang J-Y, 2012. Influence of Mg-containing precursor flow rate on the structural, electrical and mechanical properties of Mg-doped GaN thin films. *Materials Chemistry and Physics*, 136 (2-3): 796–801
- Lampert M A, Mark P, 1970. Current Injection in Solids Current Injection in Solids. *Semiconductors and Semimetals*, Elsevier, 6: 1-96.



- Lee I-H, Polyakov A Y, Smirnov N B, Zinovyev R A, Bae K-B, Chung T-H, Hwang S-M, Baek J-H, Pearton S-J, 2017. Changes in Electron , Hole Traps in GaN-Based Light Emitting Diodes from near-UV to Green Spectral Ranges. *Applied Physics Letters*, 110 (19): 192107.
- Liu L, Edgar J H, 2002. Substrates for Gallium Nitride Epitaxy. *Materials Science, Engineering: R: Reports*, 37 (3): 61–127.
- Martens H, Brom H, Blom P, 1999. Frequency-Dependent Electrical Response of Holes in Poly(p-Phenylene Vinylene). *Physical Review B*, 60 (12): R8489--R8492.
- Maruska H P, Stevenson D A, 1973. Violet Luminescence of Mg-Doped GaN. *Applied Physics Letters*, 22: 303.
- Maruska H P, Tietjen J J, 1969. The Preparation, Properties of Vapor-Deposited Single-Crystal-Line GaN. *Applied Physics Letters*, 15: 327.
- Munson C E, Gaimard Q, Merghem K, Sundaram S, Rogers D J, Sanoit J, Voss P L, Ramdane A, Salvestrini J P, Ougazzaden A, 2018. Modeling, Design, Fabrication, Experimentation of a GaN-Based, 63Ni Betavoltaic Battery. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 51: 035101.
- Murayama M, Nakayama Y, Yamazaki K, Hoshina Y, Watanabe H, Fuutagawa N, Kawanishi H, Uemura T, Narui H, 2018. Watt-Class Green (530 nm) , Blue (465 nm) Laser Diodes. *Physica Status Solidi (A) Applications, Materials Science* 215 (10): 1700513.
- Nakamura S, 1998. The Roles of Structural Imperfections in InGaN-Based Blue Light-Emitting Diodes, *Laser Diodes. Science*, 281 (5379): 956–61.
- Nakano Y, Takashi J, 2002. Electrical Characterization of Acceptor Levels in Mg-Doped GaN. *Journal of Applied Physics*, 92: 5590.
- Narayanan V, Lorenz K, Kim W, Mahajan S, 2002. Gallium Nitride Epitaxy on (0001) Sapphire. *Philosophical Magazine A*, 82 (5): 885–912.
- Ning X J, Chien, F R, Pirouz P, Yang J W, Khan M A, 1996. Growth Defects in GaN Films on Sapphire: The Probable Origin of Threading Dislocations. *Journal of Materials Research*, 11 (3): 580–92.
- Novikov S V, Dunlap D H, Kenkre V M, Parris P E, Vannikov A V, 1998. Essential Role of Correlations in Governing Charge Transport in Disordered Organic Materials. *Physical Review Letters*, 81 (20): 4472–75.
- O’Hanlon T J, Zhu T, Massabuau F C P, Oliver R A. 2021. Dislocations at Coalescence Boundaries in Heteroepitaxial GaN/Sapphire Studied after the Epitaxial Layer Has Completely Coalesced. *Ultramicroscopy*, 113258.
- Oh E, Park H, Park Y, 1998. Excitation Density Dependence of Photoluminescence in GaN:Mg. *Applied Physics Letters*, 72: 70.
- Pimputkar S, Speck J S, DenBaars S P, Nakamura S, 2009. Prospects for LED Lighting. *Nat Photonics*, 3 (4): 180–82.
- Reshchikov M A, Albarakati N M, Monavarian M, Avrutin V, Morkoç H, 2018. Thermal Quenching of the Yellow Luminescence in GaN. *Journal of Applied Physics*, 123: 161520
- Reshchikov M A, Morkoç H, 2006. Luminescence from Defects in GaN. In *Physica B: Condensed Matter*, 376-377: 428-431.
- Reshchikov M A, Morkoç H, 2005. Luminescence Properties of Defects in GaN. *Journal of Applied Physics*, 97: 061301
- Shan L-W, Liu Z-Y, Lin M-P, Yu C-J, Hsieh K-C, Wu M-C, 2017. Electrical Analyses of GaN PIN Diodes Grown on Patterned Sapphire Substrates. *Journal of Vacuum Science and Technology B*, 35: 052203.
- Sheremet V, Gheshlaghi N, Sözen M, Elçi M, Sheremet N, Aydınlı A, Altuntaş I, Ding K, Avrutin V, Özgür Ü, Morkoç H, 2018. InGaN Stress Compensation Layers in InGaN/GaN Blue LEDs with Step Graded Electron Injectors. *Superlattices and Microstructures*, 116: 253-261.

- Walker D, Saxler A, Kung P, Zhang X, Hamilton M, Diaz J, Razeghi M, 1998. Visible-Blind GaN PIN Photodiodes. *Applied Physics Letters*, 72 (25): 366–67.
- Soh C B, Chua S J, Lim H F, Chi D Z, Tripathy S, Liu W, 2004. Assignment of Deep Levels Causing Yellow Luminescence in GaN. *Journal of Applied Physics*, 96: 1341.
- Sui Y P, Guang H Y, 2011. Effect of Mg Doping on the Photoluminescence of GaN:Mg Films by Radio-Frequency Plasma-Assisted Molecular Beam Epitaxy. *Chinese Physics Letters*, 28 (6): 067807.
- Tan S, 2020. GaN-Based LEDs Using Homo-Epitaxial Technology, the Progress, Challenges of HVPE Method. *IOP Conference Series: Materials Science, Engineering*, 729: 012004.
- Usami S, Miyagoshi R, Tanaka A, Nagamatsu K, Kushimoto M, Deki M, Nitta S, Honda Y, Amano H, 2017. Effect of Dislocations on the Growth of P-Type GaN, on the Characteristics of p-n Diodes. *Physica Status Solidi (A)*, 214: 1600837
- Ves S, Venkateswaran U D, Loa I, Syassen K, 2000. Pressure Dependence of the Blue Luminescence in Mg-Doped GaN. *Applied Physics Letters*, 77: 2536.
- Wang W, Liao C, Chang Y, Lee Y, Ho C, Wu M, 2013. DLTS Analyses of GaN P-i-n Diodes Grown on Conventional, Patterned Sapphire Substrates. *IEEE Electron Device Letters*, 34 (11): 1376-1378.
- Wang Y, Huynh K, Liao ME, Yu H, Bai T, Tweedie J, Breckenridge M H, Collazo R, Sitar Z, Bockowski M, Liu Y, Goorsky M S, 2020. Strain Recovery, Defect Characterization in Mg-Implanted Homoepitaxial GaN on High-Quality GaN Substrates. *Physica Status Solidi (B) Basic Research*, 257 (4): 1900705.
- Yang W, Li D, He J, Wang C, Hu X, 2014. Temperature-dependent Ac Current-voltage-capacitance Characteristics of GaN-based Light-emitting Diodes under High Forward Bias. *Physica Status Solidi C*, 11 (3-4): 714–17.
- Yoon Y J, Lee J S, Kang I M, Lee J H, Kim D S, 2020. Design, Analysis of Gallium Nitride-Based p-i-n Diode Structure for Betavoltaic Cell with Enhanced Output Power Density. *Micromachines*, 11: 1100.
- Zhang H, Shih C-W, Martin D, Caut A, Carlin J-F, Butté R, Grandjean N, 2019. Short Cavity InGaN-Based Laser Diodes with Cavity Length below 300  $\mu\text{m}$ . *Semiconductor Science, Technology*, 34: 085005.

**Atf İçin:** Demircioğlu Z, Uzun S, 2022. 2-kloro-1-(6-floro-3,4-dihidro-2H-kromen-2yl)ethanon Yapısının Yoğunluk Fonksiyonel Kuramı İle Kimyasal Aktivite Hesaplamaları. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 217-226.

**To Cite:** Demircioğlu Z, Uzun S, 2022. Chemical Activity Calculations with Density Functional Theory of 2-chloro-1-(6-flouro-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl)ethanone. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 217-226.

## 2-kloro-1-(6-floro-3,4-dihidro-2H-kromen-2yl)ethanon Yapısının Yoğunluk Fonksiyonel Kuramı İle Kimyasal Aktivite Hesaplamaları

Zeynep DEMİRCİOĞLU<sup>1\*</sup>, Serap UZUN<sup>2</sup>

**ÖZET:** Bu çalışmada, sentezi yapılmış ve X-ışını kırınımı yöntemi ile yapısı aydınlatılmış 2-kloro-1-(6-floro-3,4-dihidro-2H-kromen-2yl) ethanon molekülünün kimyasal aktivitesi, ikinci dereceden lineer olmayan optik özellikleri ve DNA bazları ile etkileşimi üzerine kuramsal çalışmalar yapılmıştır. Kuramsal yöntem olarak, deneysel çalışmalara yakın ve anlamlı değerler vermesi ayrıca hesapsal maliyeti nedeniyle Yoğunluk Fonksiyonel Kuramı (YFK) seçildi. Çalışılan molekülün kararlı moleküler geometrisi optimizasyon yapılarak elde edildi. Tüm kuramsal hesaplamalarda YFK/B3LYP/6-311++G(d,p) baz seti kullanıldı. Optimize edilmiş molekülün geometrik parametre değerlerinin deneysel verilerle uyumlu olduğu görüldü. Frekans hesaplamaları sonucunda sanal frekans verisinin gözlenmemesi de yapının başarılı olarak optimize edildiğini destekledi. Böylece optimize yapı üzerinden elde edilen diğer özellikler hesaplanarak yorumlandı. Molekülün kimyasal aktivitesinin hesaplanmasında sınır moleküler orbital (HOMO, LUMO) enerjileri kullanılarak sertlik, yumuşaklık ve diğer kimyasal aktivite parametreleri elde edildi. Moleküler elektrostatik potansiyel (MEP), yük popülasyon ve Fukui fonksiyon analizleri ile yapının hangi bölgelerde kimyasal etkileşime yatkın olduğu belirlendi. Bunların yanı sıra Hirshfeld yüzey analizi ile moleküler etkileşimler, Hirshfeld yüzey haritaları, atomların birbirleriyle etkileşim yüzdeleri 2 boyutlu-parmak izi tayini ile incelendi.

**Anahtar Kelimeler:** YFK, kimyasal aktivite, Hirshfeld yüzey analizi, DNA bazları.

### Chemical Activity Calculations with Density Functional Theory of 2-chloro-1-(6-flouro-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl)ethanone

**ABSTRACT:** In this study, the 2-chloro-1-(6-flouro-3,4-dihydro-2H-chromen-2yl)ethanone molecule which was synthesized and whose structure was illuminated by X-ray diffraction method in previously study was determined by chemical activity, second order nonlinear optical properties and interactions with DNA bases were investigated. Density functional theory was chosen as the theoretical method because of it is significant values close to experimental and its computational cost. There is no imaginary frequencies was observed as a result of the frequency calculations also supported the optimized structure and thus other properties were obtained and interpreted from the optimized structure. The stable molecular geometry of the studied molecule was obtained by optimization. DFT/B3LYP/6-311++G(d,p) bases set was used in all theoretical calculations. It was seen that the geometric parameter values of the optimized molecule were compatible with the experimental data and thus other properties obtained through the optimized structure were calculated and interpreted. In the calculation of the chemical activity of the molecule, hardness, softness and other chemical activity parameters were obtained by frontier molecular orbital (HOMO, LUMO) energies. Molecular electrostatic potential (MEP), charge population and Fukui functional analysis was determined in which regions the structure is susceptible to chemical interactions. In addition to these, molecular interactions, Hirshfeld surface maps, interaction percentages of atoms with each other (2D-finger print) were examined by Hirshfeld surface analysis.

**Keywords:** DFT, chemical activity, Hirshfeld surface analysis, DNA bases.

<sup>1</sup>Zeynep DEMİRCİOĞLU ([Orcid ID:0000-0001-9538-9140](https://orcid.org/0000-0001-9538-9140)), Sinop Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, Sinop, Türkiye

<sup>2</sup>Serap UZUN ([Orcid ID:0000-0002-2982-8376](https://orcid.org/0000-0002-2982-8376)), Samsun Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü, Samsun, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Zeynep DEMİRCİOĞLU, e-mail: zdemircioglu@sinop.edu.tr

## GİRİŞ

İncelenen molekül grubu hipertansiyonun tedavisinde yararlı olan nebivololün hazırlanmasında oldukça büyük öneme sahip olan ara bir maddedir (Shen ve ark., 2014). Nebivololün hazırlanmasında tercih edilen bu molekül grubu ilaç endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır.

Kuantum mekaniksel yöntemlerden Yoğunluk fonksiyonel kuramı (YFK), moleküler sistemlerin enerjisini elektron yoğunluğunun bir fonksiyonu olarak hesaplamaktadır. Elektron korelasyonunu hesaba katması sebebiyle de moleküler hesaplamalarda oldukça iyi sonuçlar vermektedir (Lewars, 2003). Son yıllarda, kuramsal hesaplamalarda YFK sıklıkla kullanılmaktadır ve deneysel olarak elde edilemeyen moleküler özelliklerin belirlenmesinin yanı sıra sentezi gerçekleştirilmek istenen molekül grupları hakkında öngörü yapılmasında popüler bir yöntem olarak tercih edilmektedir. Biz de bu kapsamda Shen ve ark. tarafından sentezi gerçekleştirilmiş ve kristal yapısı X-ışını kırınımı yöntemiyle aydınlatılmış (Shen ve ark., 2014) olan 2-kloro-1-(6-floro-3,4-dihidro-2H-kromen-2yl) ethanon molekülünün kuramsal hesaplamaları YFK/B3LYP/6-311++G(d,p) baz setini kullanılarak gerçekleştirildi. Optimizasyon sonucunda elde edilen geometrik parametrelerin, X-ışını kırınımı yöntemi ile elde edilenlerle karşılaştırıldığında oldukça iyi bir uyum içerisinde olduğunu gözlemlendi. Böylece deneysel olarak elde edilemeyen kimyasal aktivite parametreleri, HOMO-LUMO şekillenimleri, MEP haritası, Fukui fonksiyonları, net yük değerleri ile optimize yapının elektron alma-verme yatkınlığını, kimyasal aktivite ve kinetik stabilitesi incelenerek moleküler özellikleri tartışıldı. Bunun yanı sıra bu çalışmada, incelenen molekül ve bazı DNA bazlarının (adenin, sitozin, guanin ve timin) arasındaki etkileşim ECT (elektrofilik merkezli yük transferi) yöntemi kullanılarak hesaplandı ve aralarındaki yük alış verişi incelendi. Böylece çalışılan molekül ve DNA bazlarının elektrofilik ve nükleofilik doğası belirlenmiş oldu. Bilindiği gibi ikinci dereceden lineer olayan optik özellikler molekül gruplarının optik bir materyal olma yatkınlığını belirlemektedir. 2-kloro-1-(6-floro-3,4-dihidro-2H-kromen-2yl)ethanon molekülünün optik bir materyal olma eğilimi, kutuplanabilirlik ve hiperkutuplanabilirlik parametreleri hesaplanarak üre ile karşılaştırılarak ve tartışılmıştır. Ayrıca Hirshfeld yüzey analizi ile moleküler etkileşimler ve çalışılan moleküle ait atomların birbirleri ile olan etkileşimleri 2boyutlu-parmak izi tayini ile incelendi.

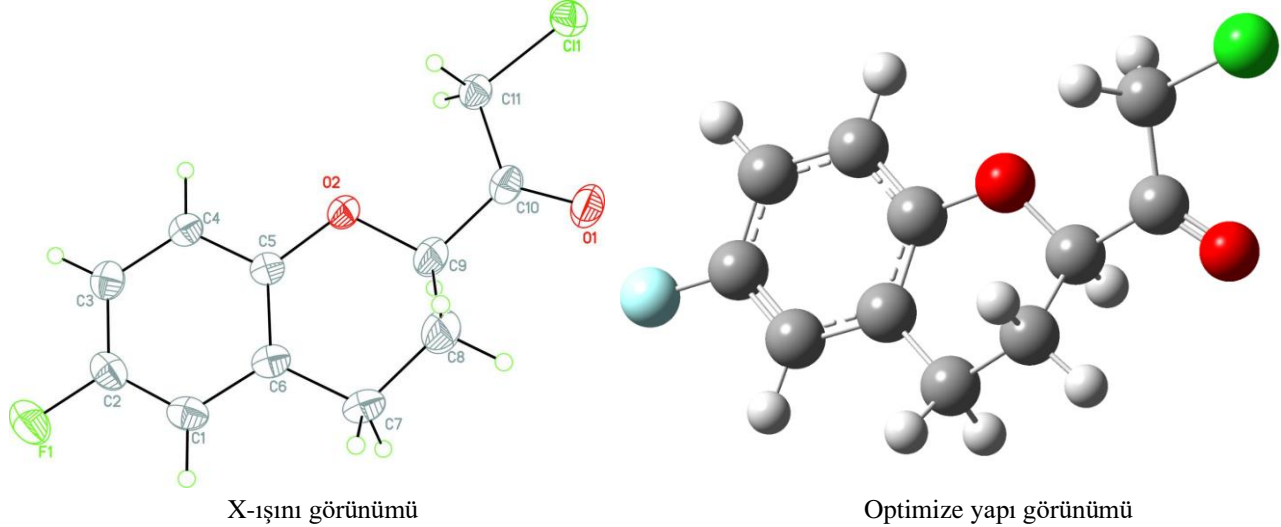
## MATERYAL VE METOT

Tüm kuramsal hesaplamalarda Gaussian 09 programı kullanıldı (Frisch et al., 2009). Kuramsal hesaplamalar YFT/B3LYP/6-311++G(d,p) baz seti kullanılarak yapıldı (Becke, 1988; Becke, 1993; Lee, 1988). İlk olarak çalışılan yapı gaz fazında optimize edildi. Optimizasyon sonucunda elde edilen geometrik parametreler, X-ışınları deneysel yöntem ile elde edilen geometrik parametre verileri ile karşılaştırıldı. X-ışını kırınımı verileri ile oldukça iyi bir uyum gösteren kuramsal geometrik parametre verileri ile seçilen baz setinin güvenilirliği ve doğruluğu öngörüldü. Optimizasyon işleminden sonra HOMO ve LUMO enerjileri, kimyasal aktivite parametreleri olan sertlik ve yumuşaklık değerleri, lineer olmayan optik özellikleri (polarizebilite ve hiperpolarizebilite), net yükler (Mulliken popülasyon yükleri), moleküler elektrostatik potansiyel (MEP) haritası, Fukui fonksiyonları ile elektrofilik ve nükleofilik bölgeleri belirlendi. Bunun yanı sıra Hirshfeld yüzey analizi ile elde edilen Hirshfeld yüzey haritaları, atomların yüzde etkileşimleri ile 2-boyutlu parmak izi tayini *Crystal Explorer* 3.1 (Wolff ve ark., 2012) programı kullanılarak elde edildi.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

## Optimize Yapı

2-kloro-1-(6-floro-3,4-dihidro-2H-kromen-2yl)ethanon kristalinin sentez ve X-ışını kırınımı kullanılarak yapı tayini Shen ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Shen ve ark., 2014).



Şekil 1. 2-kloro-1-(6-floro-3,4-dihidro-2H-kromen-2yl)ethanon molekülüne ait kristal yapı (Shen ve ark., 2014) ve optimize yapı görünümü

İncelenen kristal monoklinik kristal sisteminde P21/c uzay grubunda olup, birim hücrelerinde 4 moleküle vardır.  $C_{11}H_{10}Cl_1F_1O_2$  kristalinde benzen halkasına bağlı olan flor atomu, dihidropran halkasına bağlı oksijen atomu aynı düzlemde olup, r.m.s sapması 0.007 Å olarak hesaplanmıştır (Shen ve ark., 2014). Dihidropran halkası yarım-sandalye pozisyonuna sahip olduğu görülmüştür. Kristalin paket yapısı zayıf C-H... $\pi$  etkileşimleri ile meydana gelmiştir.

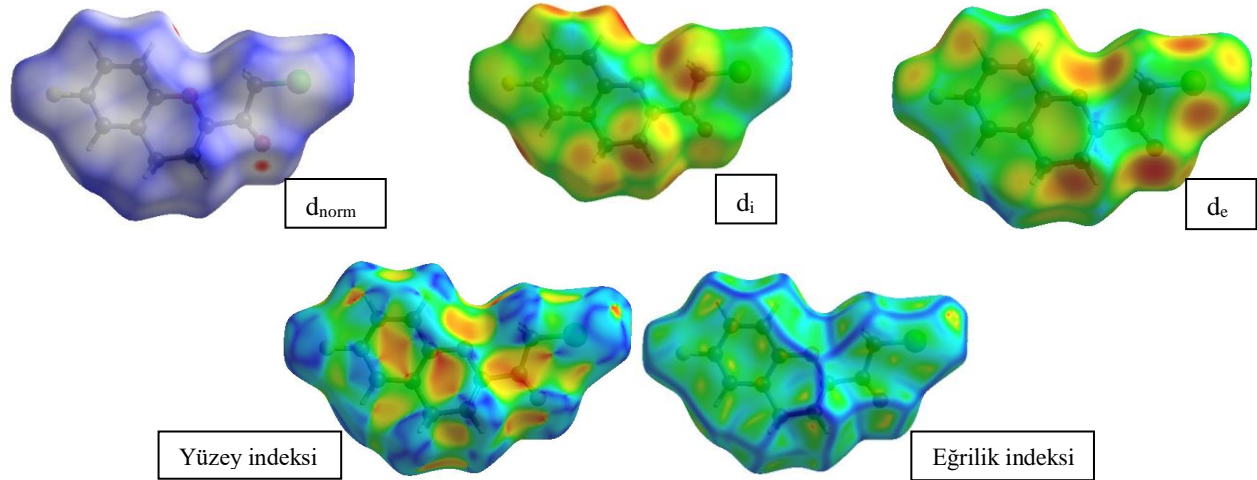
Moleküle ait X-ışını kırınımı ve YFK/B3LYP/6-311++G(d,p) baz setine ait geometrik parametreler Çizelge 1’de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. İncelenen molekülünün X-ışını kırınımına ait (Shen ve ark., 2014) ve optimize yapı görünümü Şekil 1’de verilmiştir. Kuramsal hesaplamalar sonucunda elde edilen geometrik parametrelerin ve X-ışını kırınımına ait verilerin iyi uyum içinde olduğu görüldü. YFT hesaplamaları moleküller arası etkileşimleri dikkate almaz ve gaz fazında tek bir molekül üzerinden çeşitli özellikleri hesaplar. Bu nedenle parametrelerde gözlenen ufak farklılıklar beklenen bir sonuçtur.

Çizelge 1. 2-kloro-1-(6-floro-3,4-dihidro-2H-kromen-2yl)ethanon molekülüne ait YFK/B3LYP/6-311++G(d,p) ve X-ışını kırınımı (Shen ve ark., 2014) yöntemine ait geometrik parametre verileri

Bağ Uzunluğu (Å), Bağ açısı (°)	X-ışını (Shen ve ark., 2014)	YFK/B3LYP/6-311++G(d,p)
F1-C2	1.354 (3)	1.358
C1-C2	1.364 (5)	1.3821
C5-O2	1.374 (3)	1.3793
C9-O2	1.416 (4)	1.4308
C8-C9	1.420 (5)	1.5305
C9-C10	1.506 (5)	1.5329
C10-C11	1.497 (4)	1.521
C10-O1	1.194 (4)	1.2041
C11-Cl1	1.761 (3)	1.79
C1-C2-C3	122.4 (3)	122.0973
F1-C2-C1	119.0 (3)	118.9296
O2-C9-C10	108.5 (3)	109.0181
O1-C10-C9	119.5 (3)	119.3586
Cl1-C11-C10	112.2 (2)	113.1053
O2-C9-C8	115.8 (3)	111.3013

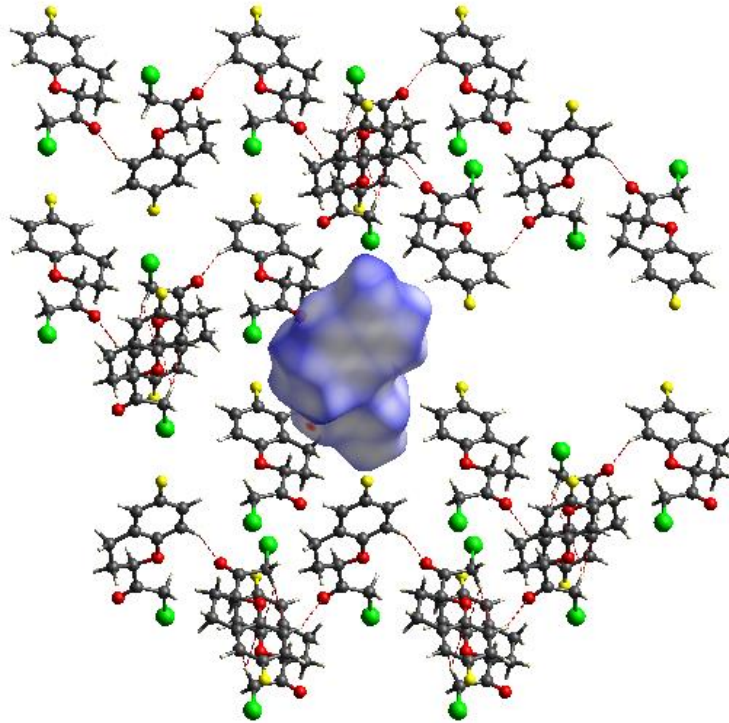
### Hirshfeld YüzeY Analizi

Hirshfeld yüzeY analizinde moleküller arası etkileşimin yüzeYe olan etkisi renk kodları yardımıyla yüzeY haritalarını ( $d_{norm}$ ,  $d_i$ ,  $d_e$ , yüzeY indeksi ve eğrilik indeksi) meydana getirir.



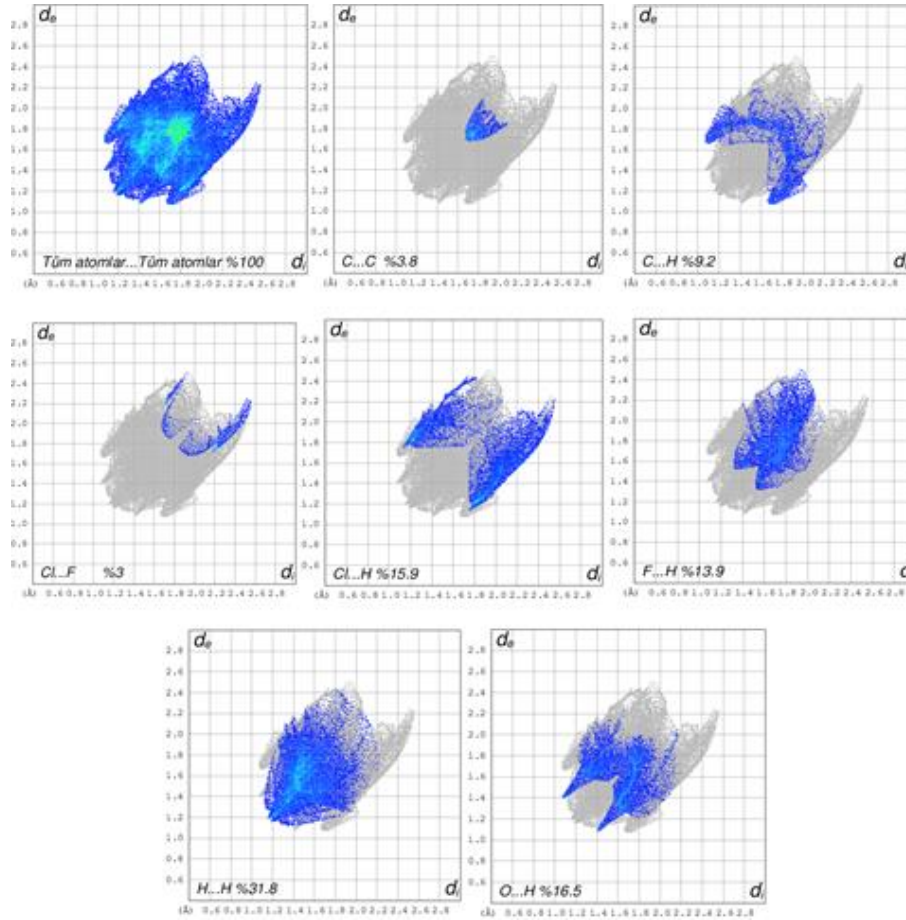
Şekil 2. İncelenen moleküle ait  $d_{norm}$ ,  $d_i$ ,  $d_e$ , yüzeY ve eğrilik indeksi Hirshfeld yüzeY haritaları görünümü

Hirshfeld yüzeY haritası  $d_{norm}$  tayini hidrojen bağlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu yüzeY, renk kodları ile oluşturulur. Hirshfeld yüzeY haritasında hidrojen bağları kırmızı renk kodu ile gösterilmektedir (Samanta ve ark., 2014). Çalışılan moleküle ait  $d_{norm}$ ,  $d_i$ ,  $d_e$ , yüzeY indeksi ve eğrilik indeksine ait haritalar Şekil 2’de verilmiştir.



Şekil 3. İncelenen molekülün  $d_{norm}$  Hirshfeld yüzeYine ait paket yapı görünümü

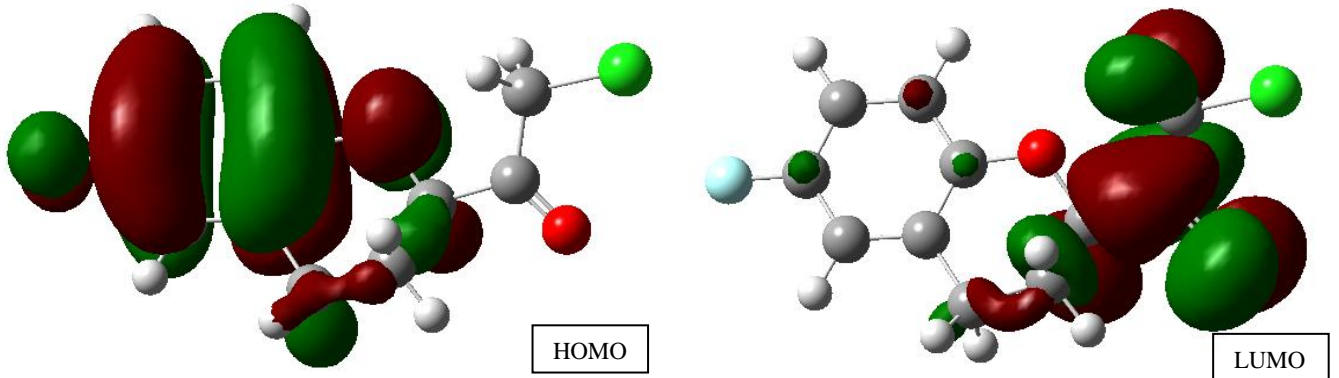
Şekil 3’de görüldüğü üzere incelenen moleküle ait paket yapı görünümü  $d_{norm}$  yüzeYi üzerinde moleküller arası bağlarla gösterildi. Bunlara ek olarak, atomların birbiriyle olan yüzde etkileşimleri 2-boyutlu parmak izi tayini ile belirlenir. İncelenen yapıya ait 2-boyutlu parmak izi bölgesi haritası Şekil 4’de görülmektedir. Toplam Hirshfeld yüzeYine ait en büyük katkılar O...H/H...O (%16.5), H...H/H...H (%31.8), C...H/H...C (%9.2), C...C/C...C (%3.8), Cl...H/H...Cl (%15.9), F...H/H...F (%13.9) ve Cl...F/F...Cl (%3) etkileşimlerine aittir.



Şekil 4. İncelenen molekülün atomlar arası etkileşimlerini gösteren 2-boyutlu parmak izi görünümü.

#### Sınır Orbitaleri ve Kimyasal Aktivite Parametreleri

Sınır orbitalleri HOMO ve LUMO olarak adlandırılır. HOMO en yüksek enerjili dolu orbital iken LUMO, en düşük enerjili boş orbital olarak bilinir. HOMO ve LUMO kimyasal tepkimelerde öncü moleküler orbitallerdir. HOMO iyonlaşma potansiyeli ile yakından ilişkili olup, molekülün elektron verme eğilimini, LUMO ise elektron ilgisi ile yakından ilişkili olup molekülün elektron alma eğilimini tanımlar. Molekülün enerji farkı olan  $\Delta E$ , HOMO ve LUMO orbital enerji farkıdır. Enerji aralığı  $\Delta E$ , kimyasal kararlılığın belirlenmesinde oldukça önemlidir.



Şekil 5. Başlık molekülüne ait HOMO ve LUMO orbital yüzey görüntüleri

Molekülün enerji aralığı küçük ise yumuşak, büyük ise sert bir molekül olduğu öngörülmektedir (Fukui, 1982). İncelenen molekülün yüzey orbitalleri Şekil 5’de verildi. Optimize yapıya ait tüm kimyasal aktivite parametreleri olan sertlik, yumuşaklık, Mulliken elektronegatifliği, elektrofilik

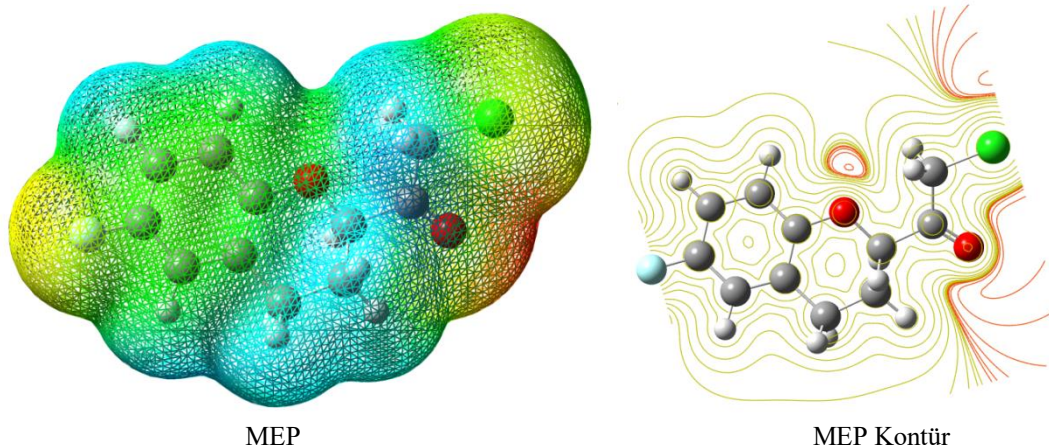
indeks, kimyasal potansiyel ve maksimum yük transfer parametresi formülleri ve değerleri ile birlikte Çizelge 2’de verildi. Optimize yapıya ait HOMO, LUMO enerjisi ve enerji aralığı sırasıyla -6.60 eV, -1.47 eV ve 5.13 eV olarak hesaplandı. Elde edilen veriler ile molekülün yüksek sertlik 2.565 eV ve düşük yumuşaklık  $0.194 \text{ (eV)}^{-1}$  verilerine sahip olması kimyasal aktivitesi düşük, kinetik kararlılığının yüksek olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 2.** Optimize 2-kloro-1-(6-floro-3,4-dihidro-2H-kromen-2yl)ethanon yapısına ait kimyasal aktivite parametreleri YFK/B3LYP/6-311++G(d,p) sertlik ve yumuşaklık parametreleri

parametreleri	
$E_{\text{HOMO}}$	-6.60 eV
$E_{\text{LUMO}}$	-1.47 eV
İyonizasyon enerjisi ( $I = -E_{\text{HOMO}}$ )	6.60 eV
Elektron ilgisi ( $A = -E_{\text{LUMO}}$ )	1.47 eV
Enerji aralığı ( $\Delta E$ )	5.13 eV
Elektronegatiflik ( $\chi = (I+A)/2$ )	4.035 eV
Kimyasal potansiyel ( $\mu = -(I+A)/2$ )	-4.035 eV
Kimyasal sertlik ( $\eta = (I-A)/2$ )	2.565 eV
Kimyasal yumuşaklık ( $S = 1/2\eta$ )	$0.194 \text{ (eV)}^{-1}$
Elektrofilik indeks ( $w = \mu^2/2\eta$ )	3.173 eV
Maksimum yük transferi ( $\Delta N_{\text{max}} = (I+A)/2(I-A)$ )	0.786

### Moleküler Elektrostatik Potansiyel

Moleküler elektrostatik potansiyel (MEP) birim pozitif yük ile sistemin moleküler yük dağılımı arasındaki etkileşim enerjisi olarak tanımlanmaktadır. Moleküle ait MEP fonksiyonu, hem çekirdek hem de elektronik dağılımdan gelen katkıların toplamından oluşmaktadır. Moleküler elektrostatik potansiyel elektrofilik ve nükleofilik doğanın belirlenmesinde kullanılan etkin bir yöntemdir (Haress ve ark., 2015). MEP yüzeyi farklı renklerin kullanılmasıyla tanımlanır ve yorumlanır. Potansiyel artışı kırmızı<turuncu< sarı<yeşil<mavi olarak tanımlanır.



**Şekil 6.** Başlık molekülüne ait MEP ve MEP kontör yüzey görüntüleri

En negatif bölgeler kırmızı ile kodlanmış olarak görülmektedir ve en çok oksijen atomları üzerinde yerleşmiştir. Bu bölgeler hidrojen bağlarının oluşumunda aktif olan ve elektrofilik yatkınlığı fazla olan bölgeleri temsil etmektedir. En pozitif nükleofilik doğanın baskın olduğu bölgeler ise hidrojen atomlarının yoğun olduğu bölgelerde yerleşmiş konumda bulunmaktadır. Moleküle ait MEP ve MEP kontör yüzeyi Şekil 6’da verilmiştir. MEP kontör haritaları elektrostatik potansiyeller gibi sabit yoğunluk veya parlaklık çizgilerini göstermek için kullanılır ve moleküler düzlemde çizilir. Elektron açısından zengin kırmızı çizgiler oksijen ve klor atomları etrafında, elektron eksikliği olan bölge ise yeşilimsi sarı çizgilerle gösterilmiştir.



### Mulliken Popülasyon Analizi

Mulliken popülasyon (MP) analizi atomik yük dağılımının belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu method atomik orbitallerin lineer kombinasyonu ile moleküler orbitallerin elde edilmesi ve dalga fonksiyonlarının atomlara dağılımında iki orbitalin çakıştığı durumlarda eşit dağılım ilkesine dayanmaktadır.

Ancak bu eşit dağılım bir atomun daha elektronegatif olduğu durumlarda tam doğru sonuç vermemektedir (Cramer, 2004). Bunu daha doğruya yakınsatmak için güçlü baz setleri kullanmak elverişli bir durumdur. Bu yöntem ile moleküldeki yük transferini gerçekleştiren verici ve alıcı çiftlerinin özellikleri belirlenir. İncelenen moleküle ait her bir atomun net yükleri Çizelge 3’de verildi. En pozitif yükler C1, C5, C6, C10, H1, H3, H4, H7A, H7B, H8A, H8B, H9, H11A, H11B atomları üzerinde, en negatif yükler ise C2, C4, C7, C8, C9, C11, F1, O1 ve O2 atomları üzerinde yerleşmişlerdir.

**Çizelge 3.** 2-kloro-1-(6-floro-3,4-dihidro-2H-kromen-2yl)ethanon moleküle ait Mulliken popülasyon net yük değerleri

Atomlar	MP Yükleri	Atomlar	MP Yükleri
C1	0.200941	O1	-0.169577
C2	-0.378862	O2	-0.079333
C3	0.194422	H1	0.149283
C4	-0.246293	H3	0.174216
C5	0.200941	H4	0.139536
C6	1.831418	H7A	0.174351
C7	-0.378761	H7B	0.165396
C8	-0.397455	H8A	0.167370
C9	-0.002711	H8B	0.200319
C10	0.011974	H9	0.217776
C11	-0.714059	H11A	0.221368
F1	-0.192282	H11B	0.198226
Cl1	-0.1400127		

### Fukui Fonksiyon Analizi

Fukui fonksiyon analizi ile nötral, anyonik ve katyonik duruma ait doğal popülasyon yüklerinden her bir atomun Fukui fonksiyon değerleri hesaplandı. Bu yöntem ile molekülün elektrofilik ve nükleofilik bölge yatkınlığı tespit edilmektedir. Fukui fonksiyon değerleri ( $f_k^+(r)$ ,  $f_k^-(r)$ ,  $f_k^0(r)$ ) fonksiyonları ile belirlenir.  $f_k^+(r)$  nükleofilik atağa,  $f_k^-(r)$  elektrofilik atağa ve  $f_k^0(r)$  serbest radikal atağa yatkınlığı belirleyen parametrelerdir. Aşağıdaki bu fonksiyonlara ait eşitlikler verilmiştir.

$$f_k^+(r) = q_k(r)(N + 1) - q_k(r)(N) \quad (1)$$

$$f_k^-(r) = q_k(r)(N) - q_k(r)(N - 1) \quad (2)$$

$$f_k^0(r) = \frac{1}{2} [q_k(r)(N + 1) - q_k(r)(N - 1)] \quad (3)$$

Yapıya ait atomların elektrofilik ve nükleofilik doğasını belirleyen parametre ise  $\Delta f_k(r)$ 'dir. Nükleofilik ve elektrofilik FF farkı  $\Delta f_k(r) = [f_k^+(r) - f_k^-(r)]$  ile belirlenir (Yang ve Parr, 1985; Morell ve ark., 2008). Eğer  $\Delta f_k(r) > 0$  ise nükleofilik yatkınlık,  $\Delta f_k(r) < 0$  ise elektrofilik yatkınlık baskındır. Çalışılan moleküle ait  $\Delta f_k(r) < 0$ , elektrofilik baskın bölgeler O1, O2, C11, F1, C2, C5, C7, C9 ve C10 atomları üzerinde,  $\Delta f_k(r) > 0$ , nükleofilik baskın bölgeler ise C1, C3, C4, C6, C8 ve C11 atomları üzerinde yoğunlaşmaktadır (Çizelge 4). Fukui fonksiyon analizi sonuçlarına göre incelenen molekülün elektrofilik doğasının baskın olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar diğer kimyasal aktivite parametrelerini destekler yönde elde edildi.

**Çizelge 4.** Optimize 2-kloro-1-(6-floro-3,4-dihidro-2H-kromen-2yl)ethanon molekülüne ait Fukui fonksiyon yük ve fonksiyon değerleri

Atomlar	$q^0_k$	$q_k^+$	$q_k^-$	$f_k^-$	$f_k^+$
C1	-0.24572	-0.22126	-0.17191	-0.07381	0.02446
C2	0.39846	0.53619	0.19898	0.19948	0.13773
C3	-0.25193	-0.20769	-0.19630	-0.05563	0.04424
C4	-0.21433	-0.16043	-0.14683	-0.0675	0.0539
C5	0.29756	0.40292	0.15723	0.14033	0.10536
C6	-0.07613	0.01183	-0.10061	0.02448	0.08796
C7	-0.39303	-0.41631	-0.21147	-0.18156	-0.02328
C8	-0.39738	-0.40381	-0.20797	-0.18941	-0.00643
C9	0.05848	0.03821	0.01744	0.04104	-0.02027
C10	0.55870	0.54708	0.11354	0.44516	-0.01162
C11	-0.45369	-0.46740	-0.21202	-0.24167	-0.01371
F1	-0.35599	0.40292	-1.11504	0.76905	0.75891
Cl1	-0.03478	0.03002	-0.11115	0.0764	0.0648
O1	-0.52401	-0.39034	-0.71165	0.18764	0.13367
O2	-0.57741	-0.41708	-0.76606	0.18865	0.16033

### İkinci Dereceden Linear Olmayan Optik Özellikler

Maddeye ait optik özellikler, uygulanan bir dış alanın etkisi ile maddenin dipol momentinin yeniden şekillenmesi sonucu ortaya çıkar. Birinci dereceden hiperkutuplanabilirlik ( $\beta$ ) değeri ile lineer olmayan optik özellikler tayin edilir. Molekülün  $\Delta E$  enerji farkı ne kadar küçük olursa elektron dağılımı o kadar kolay yönlendirilebilir ve kutuplanma büyük olur (Natorajan ve ark., 2008). Dolayısıyla HOMO-LUMO enerji aralığı küçük olan bir molekülde hiperkutuplanabilirlik büyük değerler alırken böyle bir molekül çizgisel olmayan optik özellik gösteren bir materyal olarak öngörülebilir. Son yıllarda, çizgisel olmayan optik özellik gösteren organik materyallerin iletişim alanında kullanımı ivme kazanmıştır.

Çalışılan optimize yapıya ait dipol moment, polarizebilite ( $\alpha$ ) ve hiperpolarizebilite ( $\beta$ ) değerleri sırasıyla 2.168 D, 21.348 Å<sup>3</sup> and 0.504x10<sup>-30</sup> esb olarak hesaplanmıştır. Literatürde en yüksek optik özellik sergileyen referans madde [ $\alpha=5.042$  Å<sup>3</sup>,  $\beta=0.78x10^{-30}$ cm<sup>5</sup>/esu; YFK/B3LYP/6-311++G(d,p)] ile karşılaştırıldığında 1.5 kat düşük hiperpolarizebilite değerine sahip olması yapının optik bir materyal olmaktan uzak olduğunu öngörmektedir (Toy ve Tanak, 2016). Bu değer, bize benzen halkasına bağlı flor atomu ve dihidropran halkasına bağlı guruplar arasındaki elektron hareketliliği sonucu molekülün daha polar bir hal almış olabileceğini düşündürülebilir. Hesaplanan  $\beta$  değeri molekülün, çizgisel olmayan optik özellik gösteren bir materyal olarak değerlendirilemeyeceğini öngörmektedir.

### Yük Transferi Yöntemi

ECT yöntemi incelenen molekül ve DNA bazlarının (adenin, guanin, sitozin ve timin) elektrofilik ve nükleofilik davranışları incelenmektedir (Ekici ve ark., 2020). Hesaplanan ECT değeri sıfırdan büyükse, yükler bazdan fonksiyonel gruba hareket eğilimindedir. ECT değeri sıfırdan büyük olduğunda yük geçişi bazlardan optimize yapıya; ECT sıfırdan küçük olduğunda ise yük geçişi optimize yapıdan bazlara olmaktadır.

Adenin, sitozin, guanin ve timin için hesaplanan ECT değerleri sırasıyla 0.472, 0.006, -0.017 ve 0.315 olarak bulundu (Çizelge 5). Bu sonuçlar, adenin, sitozin ve timin DNA bazlarından çalışılan yapıya yük geçişi olduğunu, guanin DNA bazına ise optimize yapıdan yük transferi olduğunu vurgulamaktadır. Optimize yapının en çok etkileşme gösterdiği ve yük transferine eğiliminin fazla olduğu DNA bazı ise adenindir. Optimize yapının sitozin ve guanin bazları ile olan etkileşiminin ise oldukça düşük olduğu Çizelge 5’de açık bir şekilde görülmektedir.

Çizelge 5. Optimize yapı (A) ve DNA bazlarına (B) ait hesaplanan DNA/ECT verileri

Optimize yapı ve DNA Bazları	IP (eV)	EA (eV)	$\mu$ (eV)	$\eta$ (eV)	$\Delta N_{max}$
Optimize yapı	0.136	-8.457	4.160	4.296	0.968
Adenin ECT=0.472	2.791	-8.304	2.756	5.547	0.496
Sitozin ECT=0.006	0.167	-8.741	4.287	4.454	0.962
Guanin ECT=-0.017	0.0584	-7.903	3.922	3.980	0.985
Timin ECT=0.315	2.068	-9.881	3.906	5.974	0.653

## SONUÇ

Kuramsal hesaplamalı yöntemler deneysel olarak elde edilemeyen özellikler hakkında bilgi sahibi olmamızı ve önceden kimyasal aktif bölge tayini yapmamızı sağlamaktadır. Bu sayede sentezi gerçekleştirilmek istenen molekül grupları hakkında öngörü yapabilmemize yardımcı olmaktadır. Bu çalışmada daha önceden sentezi yapılmış ve X-ışınları kırınımı analizi ile yapısı aydınlatılmış olan 2-kloro-1-(6-floro-3,4-dihidro-2H-kromen-2yl)ethanon molekülünün kimyasal aktivite hesaplamaları Yoğunluk Fonksiyonel Kuramı (YFK) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu kapsamda X-ışını kırınımına ait geometrik parametreler YFK/B3LYP/6-311++G(d,p) baz seti kullanılarak elde edilen geometrik parametreler ile karşılaştırıldı. Hesaplamalar sonucunda deneysel verilere yakın sonuçlar bulundu. Enerji aralığı 5.13 eV olarak hesaplanan optimize yapının, sertlik (2.565 eV) ve yumuşaklık (0.194 (eV)<sup>-1</sup>) değerleri molekülün düşük kimyasal aktivite ile oldukça kararlı olduğunu öngörmektedir. İncelenen yapının referans madde üre ile karşılaştırıldığında oldukça düşük hiperkutuplanabilirlik değerine ( $\beta = 0.78 \times 10^{-30} \text{cm}^5/\text{esu}$ ) sahip olduğu belirlendi. HOMO-LUMO enerji aralığı ile de yakın ilişkili olan hiperkutuplanabilirlik değerine bakıldığında, molekülün optik bir materyal olarak kullanılmayacağı öngörülebilir. Bunların yanı sıra MEP, net yük verileri ve Fukui fonksiyon analizleri yardımıyla optimize yapının elektrofilik ve nükleofilik bölgelerinin tayini gerçekleştirildi. ECT yöntemi sonucunda adenin, sitozin ve timin bazlarından incelenen optimize yapıya yük geçişi olurken, guanin bazına ise incelenen optimize yapıdan yük aktarımı olduğu öngörülmüştür. Hesaplanan sonuçlara göre optimize yapı en çok adenin bazı ile etkileşirken, özellikle sitozin ve guanin bazları ile olan etkileşiminin oldukça düşük olduğu belirlendi.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

**KAYNAKLAR**

- Becke AD, 1988. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys Rev A Gen Phys.*, 38 (6): 3098-3100.
- Becke AD, 1993. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J Chem Phys.*, 98: 372-377.
- Cramer, CJ, 2004. *Essentials of Computational Chemistry, Second Edition*, John Wiley&Sons, Ltd. England, S. 315.
- Ekici Ö, Demircioğlu Z, Ersanlı CC, Çukurovalı A, 2020. Experimental and theoretical approach: Chemical activity, charge transfer of DNA/ECT, thermodynamic, spectroscopic, structural and electronic properties of N-(4-(3-methyl-3-phenylcyclobutyl)thiazol-2-yl)acetamide molecule. *J. Mol. Struct.*, 1204: 127513.
- Fukui K, 1982. Role of frontier orbitals in chemical reactions. *Science*, 218 (4574): 747–754.
- Gaussian 09, Revision C.01, M. J. Frisch et al., Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- Haress NG, El-Emam A, Al-Deab OA, Panicker CY, Al-Saadi A, Van Alsenols C, Ahmad War J, 2015. Vibrational spectroscopic and molecular docking study of 2-benzylsulfanyl-4-[(4-methylphenyl)-sulfanyl]-6-pentylpyrimidine-5-carbonitrile, a potential chem. Other apeutic agent. *Spectrochim. Acta A*, 137:569-580.
- Lee C, Yang W, Parr RG, 1988. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys Rev.*, 37: 785-789.
- Lewars E, 2003. *Computational Chemistry*. Kluwer Academic Publishers, S. 471. Dordrecht.
- Morell C, Ayers P, Grand A, Gutierrez-Oliva S, Toro-Labbe A, 2008. Explaining reaction mechanisms using the dual descriptor: A complementary tool to the molecular electrostatic potential. *Phys. Chem.-Chem. Phys.*, 10: 7239-7246, 2008.
- Natorajan S, Shanmugam G, Martin SA, 2008. Growth and characterization of a new semi organic NLO material: L-tyrosine hydrochloride. *Cryst. Res. Technol.*, 43: 561-564.
- Samanta T, Dey L, Dinda J, Chattopadhyay SK, Seth SK, 2014. Structural characterization and Hirshfeld surface analysis of a Co<sup>II</sup> complex with imidazo[1,2-a]pyridine. *J. Mol. Struct.*, 1068: 58-70.
- Shen Z, Mao Q-X, Ge J-L, Tu Y-R, Wang Y, 2014. Crystal structure of 2-chloro-1-(6-fluoro-3,4-dihydro-2H-chromen-2yl)ethanone. *Acta Cryst.*, E70: o1087.
- Toy M, Tanak H, 2016. Molecular structure and vibrational and chemical shift assignments of 3'-chloro-4-dimethylamino azobenzene by DFT calculations. *Spectrochim. Acta A*, 152: 530-536.
- Wolff DJGSK, McKinnon JJ, Turner MJ, Jayatilaka D, Spackman MA, 2012. *Crystal Explorer*, Version 3.1.
- Yang W, Parr RG, 1985. Hardness, softness, and the fukui function in the electronic theory of metals and catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82: 6723-6726.

**Atf İçin:** Alp H, Unal K, Erdem N, 2022. Amaranth, Karabuğday ve Siyez Katkılı Tavuk Nuggetların Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 227-238.

**To Cite:** Alp H, Unal K, Erdem N, 2022. Determination of Some Characteristics of Chicken Nuggets Added Amaranth, Buckwheat and Einkorn. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 227-238.

## **Amarant, Karabuğday ve Siyez Katkılı Tavuk Nuggetların Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi**

Halime ALP<sup>1</sup>, Kubra UNAL<sup>2</sup>, Nuran ERDEM<sup>3\*</sup>

**ÖZET:** Tavuk nugget, rengi, gevrekliği, lezzeti ve kısa sürede hazırlanabilmesi gibi nedenlerle tercih edilen kaplanmış bir et ürünüdür. Nugget üretimi için belirli bir şekilde formüle edilmiş et hamurları un, baharatlar, bağlayıcı maddeler, su gibi bileşenlerden oluşan sıvı sos ile kaplanmaktadır. Sonra ise et hamurları kuru sos ile kaplanarak, derin yağda kızartılmaktadır. Nugget gibi ürünlerde, kaplama formülasyonlarında yapılan değişiklikler ile fonksiyonel, sağlıklı ve yeni ürünlerin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Buğday unu yerine farklı tahıl unları kullanılarak, gluten hassasiyeti olan çölyak hastalarının, diyabet ve sindirim bozukluğu olan bireylerin tüketebileceği ürünler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu çalışmada tavuk nugget üretiminde sıvı kaplama formülasyonlarında buğday unu yerine amaranth, karabuğday, siyez ve bu unların karışımının kullanımının fizikokimyasal, renk, tekstürel ve duyuşal özelliklere etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. En yüksek Ca, Fe ve Mg değerleri amaranth eklenmiş nuggetlarda belirlenmiş, karabuğday, siyez ve karışım içeren nuggetların Ca ve Mg değerleri arasındaki farklılık önemli bulunmamıştır. Tekstürel özellikler değerlendirildiğinde; nuggetların sertlik, gamsılık ve çiğnenebilirlik değerleri arasındaki farklılık istatistikî açıdan önemli ( $p<0.01$ ) bulunmuş ve en yüksek sertlik ve çiğnenebilirlik değerleri karabuğday eklenmiş nuggetlarda gözlenmiştir. Duyuşal özellikler açısından ise en yüksek renk, gevreklik ve genel kabul edilebilirlik değerleri amaranth eklenmiş nuggetlarda gözlenmiştir. Sonuç olarak, nugget üretiminde amaranth, siyez unları ve bunların karışımlarının tekstürel, duyuşal özellikler ve mineral madde içeriği açısından kullanılabilmesi belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Amaranth, karabuğday, siyez, nugget, çölyak, glutensiz et ürünleri

### **Determination of Some Characteristics of Chicken Nuggets Added Amaranth, Buckwheat and Einkorn**

**ABSTRACT:** Chicken nugget is a coated meat product preferred for reasons such as color, crispness, taste and preparation in a short time. The meat dough, which is formulated in a certain shape for the production of nugget, is covered with a liquid sauce consisting of components such as flour, spices, binders, water. Then the meat dough is covered with dry sauce and deep-fried. It is aimed to develop functional, healthy and new products with the changes made in coating formulations in these products. By using different grain flours instead of wheat flour, products are tried to be developed that can be consumed by celiac patients, individuals with diabetes and digestive disorders. This study aimed to investigate the effects of amaranth, buckwheat, einkorn and a mixture of these flours in liquid coating formulations on physicochemical, color, textural and sensory properties of nuggets. The highest Ca, Fe and Mg values were determined in nuggets with amaranth added. The difference between hardness, gumminess and chewiness values of nuggets was statistically significant ( $p<0.01$ ) and the highest hardness and chewiness values were observed in nuggets with buckwheat added. According to sensory properties, the highest color, tenderness and overall acceptability values were observed in nuggets with amaranth added. As a result, it has been determined that amaranth, einkorn flours and their mixtures can be used in nuggets production in terms of textural, sensory properties and mineral substance content.

**Keywords:** Amaranth, buckwheat, einkorn, nuggets, celiac, gluten-free meat products

<sup>1</sup> Halime ALP ([Orcid ID: 0000-0001-5833-9611](https://orcid.org/0000-0001-5833-9611)), Selçuk Üniversitesi, Karapınar Aydoğanlar Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Konya, Türkiye

<sup>2</sup> Kubra UNAL ([Orcid ID: 0000-0001-9005-6160](https://orcid.org/0000-0001-9005-6160)), Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Konya, Türkiye

<sup>3</sup> Nuran ERDEM ([Orcid ID: 0000-0002-7012-9251](https://orcid.org/0000-0002-7012-9251)), Aksaray Üniversitesi, Güzelyurt Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Aksaray, Türkiye

**\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Nuran ERDEM, e-mail: nuran.erdem42@gmail.com

## GİRİŞ

Günümüzde ev dışında çalışanların artması, değişen yaşam tarzlarına bağlı olarak beslenme alışkanlıklarının değişmesi, yoğun iş temposu, uzun çalışma saatleri ve yemek hazırlama için ayrılan zamanın azalması tüketicileri daha kolay ve kısa sürede hazırlanan ancak besin öğeleri kaybolmamış ve yüksek kaliteli gıdalara yönlendirmiştir. Bu eğilimler gıda endüstrisinde karşılığını bulmuş, yarı hazır ve hazır gıda üretimi üzerine araştırmalar yoğunlaşmıştır (Erdem, 2016). Gıda sektöründe çocuklar, hamileler, yaşlılar, sporcular ve çeşitli sağlık sorunları bulunan özel tüketici gruplarının karşılanabilmesi ve duysal olarak tatmin edilebilmesi için yeni nesil gıdaların üretimine ihtiyaç duyulmaktadır.

Son zamanlarda tüketiciler tarafından hazır gıdalara ilgi duyulsa da, sağlığa uygun, düşük kalorili, hazırlanması kolay olanları tercih edilmekte ve içerik bilgileri, üretim metotları, sağladıkları enerji dikkate alınmaktadır (Shokry, 2016; Kırpık ve Kılınççeker, 2018). Bu nedenlerle gıda sektörü; çölyak, diyabet ve sindirim bozukluğu gibi hastalıklara sahip bireyler için alternatif ürünler üzerinde çalışmaktadır. Bu tip gıdaların araştırılması, geliştirilmesi ve üretilmesi amacıyla et ürünleri sektörü ve et teknolojisi bilim adamları yoğun çaba harcamaktadırlar. İşlenmiş et ürünleri içerisinde, kaplamalı olanlara ilgi giderek artmaktadır. Özellikle kaplama rengi, gevrekliği, lezzeti ve kısa sürede sıcak servis edilebilmesi nedenleriyle kaplamalı et ürünleri her yaş tüketici tarafından tercih edilmektedir (Fizman ve Sanz 2010). Tavuk nugget, ileri işlenmiş kaplamalı ürünler içerisinde, tüketiciler tarafından en fazla tüketilen et ürünüdür. Tavuk nugget üretiminde; formüle edilmiş nugget şekli verilmiş et hamuru, un, nişasta, yumurta gibi ingrediyelemlerden oluşan sıvı sos ve üretim prosesine bağlı olarak kuru sos ile kaplanarak derin yağda kızartılmaktadır (Fizman ve Salvador, 2003; Altunakar ve ark. 2003; Albert ve ark., 2009).

Et ürünleri teknolojisinde yapılan araştırmalarda; çeşitli koruyucular, kıvam artırıcılar, renklendiriciler, protein gibi besin değerini düzenleyiciler veya bunların birçoğunu yapısında bulundurabilen farklı tahıl unları kullanılmaktadır (Weiss ve ark., 2010; Kurt ve Kılınççeker, 2012; Tabarestani ve Tehrani, 2014; Kılınççeker, 2015). Et ürünlerinde yaygın kullanılan bileşenlerden biri de buğday glutenidir. Ancak gluten alerjisi son yıllarda artış göstermiştir. Gluten, unlu mamul kalitesinde önemli yer tutan temel protein olmasına rağmen, dünya nüfusunun yaklaşık %1'inde gluten intoleransı veya çölyak hastalığı bulunmaktadır (Novotni ve ark., 2012). İlk defa Aretaeus'un bahsettiği ve bugünkü tanımını 1888'de İngiliz patolog Dr. Samuel Gee'nin yaptığı çölyak hastalığı; buğday (gliadin), çavdar (secalin), arpanın (hordein) bileşiminde bulunan ve "gluten" adı verilen depo proteinlerine (prolaminler) karşı inflamatuvar bir T hücre yanıtının neden olduğu kronik bir hastalıktır (Mearin, 2007; Ün ve Aydoğdu, 2003). Çölyak hastaları için gliadin fraksiyonunun, glutenin fraksiyonuna göre daha toksik olduğu belirtilmiştir (Olgun ve ark., 2013). Hastalığın nedenini oluşturan temel etken, gluten proteininin alt fraksiyonu olan gliadindir (Gallagher ve ark., 2004; Mendoza, 2005). Gluten içeren tahılların diyetten kaldırılması ve bunun bir ömür boyu sürdürülmesi ile tedavi edilmektedir. Bu şekilde ince bağırsaktaki hasarın tam iyileşmesi ve semptomların giderilmesi sağlanabilmektedir (Hill ve ark., 2002).

Ülkemizde tarımı yapılmayan karabuğday, birçok ülkede yetiştirilmektedir. Karabuğday, yüksek miktarda protein, diyet lifi, vitamin, mineral madde, temel çoklu doymamış yağ asitleri ve antioksidan içeren fonksiyonel bir gıda maddesi olup gluten içermemektedir (Bilgiçli, 2008; Acar ve ark., 2011). Bileşiminde %55-75 nişasta, %10-12 protein, %9.6-13.8 nem ve %7.0-10.7 lif bulunmaktadır (Dizlek ve ark., 2009). Karabuğday çölyak hastaları ve glutensiz beslenmeyi günlük diyetlerinde bulduran insanlar için üretilen gıdaların besin değerinin zenginleştirilmesinde önemli rol almaktadır (Mariotti ve ark., 2013). Amarant, yaklaşık 60-70 türü kapsayan *Amaranthus* cinsi bitkiler için kullanılmakta olup

sadece 10 tanesi sektörel olarak değerlendirilmektedir. Diğerleri yabancı ot veya yem bitkisidir (Ergun ve ark., 2014). Fonksiyonel özellikteki yüksek oranda protein içeriği, esansiyel yağ asitleri, antioksidan bileşikler, diyet lifi, elzem aminoasit olan lizin, kalsiyum ve demir içeriği nedeniyle et ürünleri üretiminde önemli faydalar sağlayabileceği düşünülmektedir. Gluten içermeyen amarant (Kalinova ve Dadakova, 2009; Venskutonis ve Kraujalis, 2013; Kılınççeker ve Büyük, 2019), son yıllarda çölyak hastalarına uygulanan diyetlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Paško ve ark., 2009). Protein, lif ve mineral madde içeriğinin oldukça yüksek, karbonhidrat içeriğinin düşük olması nedenleriyle; et ürünlerinin birçok özelliğinin iyileştirilmesinde kullanılabileceği öngörülmektedir (Kılınççeker ve Büyük, 2019). Siyez buğdayı (*Triticum monococcum*), bilinen en ilkel buğday türüdür. Yüksek kül içeriğine (2.3-2.8 g/100 g) sahip olup, mineral maddelerin önemli bir kısmını fosfor (415 mg/100 g) oluşturmaktadır (Løje ve ark., 2003; Hidalgo ve Brandolini, 2014; Abdel-Aal ve Hucl, 1995). Modern buğdaylara göre, karotenoid içeriğinin 2 kat, lutein içeriğinin 3-4 kat, riboflavin ve piridoksin içeriklerinin 4-5 kat yüksek olduğu, ekmeçlik buğdaya göre daha yüksek oranda Ca, Mn, S, Zn, Fe, Cu ve Se içerdiği, yüksek orandaki fitosterol içeriği sayesinde kanda kolesterol düzeyinin azalmasına yardımcı olduğu belirtilmiştir (Zaharieva ve ark., 2014). Protein içeriğinin diğer buğdaylara göre yüksek olduğu (Løje ve ark., 2003), ancak gluten fraksiyonunu oluşturan gliadin ve glutenin değerlerinin daha düşük olduğu belirtilmiştir (Stallknecht ve ark., 1996). Siyez buğdayının çölyak hastalığına sebep olan toksisiteye, çeşide bağlı olarak az neden olduğu veya neden olmadığı yönünde çalışmalar mevcuttur (De Vincenzi ve ark., 1996; Pizzuti ve ark., 2006).

Çölyak hastalarının sayısının artması ile glutensiz ürünlere ihtiyaç duyulmakta (Mahmoud ve ark., 2013) olup ürün çeşitliliğine olan talep de giderek artmaktadır. Günümüzde çölyak hastalarına yönelik tüketime hazır, çeşitli alternatif ürünler bulunmaktadır (Turabi ve ark. 2008). Ancak, glutensiz et ürünleri ile ilgili gıdaların ve araştırmaların yetersiz olduğu gözlenmiştir. Çalışma kapsamında; çölyak hastalığının insidensinin artması, tek tedavinin ömür boyu glutensiz diyet olması, gluten alerjisi olan tüketiciler için glutensiz kaplamalı tavuk ürünlerinin piyasada bulunmaması, sağlıklı beslenme arzusunda olan tüketicilerin glutensiz gıdaları diyetlerinde bulundurmaları istemeleri ve glutensiz nugget üretiminin hedef pazara ulaşılabilme potansiyelinin yüksek olması nedenleriyle kaplamalı tavuk eti ürünü olan tavuk nuggetların geliştirilmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Tavuk nuggetların üretiminde kullanılmak üzere bütün tavuk eti yerel bir marketten temin edilmiştir (Metro, Konya, Turkey). Bütün tavuk laboratuvarında kemiklerinden ayrılarak but, göğüs etleri ve deri elde edilmiş ve bu materyaller laboratuvar tipi kıyma makinesinden (Kitchen Aid, USA) geçirilerek kıyma haline getirilmiştir. Nuggetların üretiminde tuz, kimyon, karabiber, sarımsak tozu, mısır nişastası, sodyum bikarbonat ve ayçiçek yağı yerel marketlerden temin edilerek kullanılmıştır. Amarant unu, karabuğday unu ve siyez unu Ingro Gıda Bilişim Pazarlama (Karaman, Türkiye) firmasından sağlanmıştır. Karboksi metil selüloz (CMC) ise Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany) firmasından temin edilmiştir.

### Nuggetların Hazırlanması

Tavuk nuggetların üretimi Selçuk Üniversitesi Gıda Mühendisliği Et Bilimi ve Teknolojisi Araştırma Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir (Şekil 1).

**Çizelge 1.** Tavuk nugget et hamuru formülasyonu

Bileşen	Oran (%)
Tavuk göğüs eti	60.30
Tavuk but eti	31.80
Tavuk deri	6.30
Tuz	1.00
Baharat karışımı	0.60

Kıyma haline getirilmiş olan but, göğüs etleri ve deri Çizelge 1’de belirtilen oranlarda tuz ve baharat karışımı ile karıştırılarak et hamuru elde edilmiştir. Et hamuruna nugget şekilleri verilmiş ve buzdolabı sıcaklığında 1 saat dinlendirilmiştir.

**Şekil 1.** Tavuk nugget üretim akış şeması

Tavuk nuggetlar, katı-su oranı 1: 2 olmak üzere Çizelge 2’de belirtilen formülasyona (amarant unu; karabuğday unu; siyez unu veya amarant, karabuğday ve siyez unu karışımı, tuz, karboksi metil selüloz, kimyon, sarımsak tozu, mısır nişastası, sodyum bikarbonat ve su) uygun şekilde hazırlanan sıvı sos içerisinde 30 sn tutularak yüzeyi tamamen kaplanmış ve fazla sıvı sosun süzülmesi için 10 sn bekletilmiştir. Son olarak amarant unu, karabuğday unu, siyez unu veya amarant, karabuğday ve siyez unularının karışımı ile elde edilen kuru sos ile manuel olarak kaplanan nuggetlara ayçiçek yağı ile derin yağda kızartma işlemi uygulanmıştır. Kızartma işleminden sonra nuggetlar oda sıcaklığına soğutulmuştur.

**Çizelge 2.** Tavuk nugget üretimlerinde kullanılan sıvı sos formülasyonları

Bileşen (%)	Nugget Çeşidi			
	Amaranth	Karabuğday	Siyez	Karışım
Amarant unu	94	0	0	31.33
Karabuğday unu	0	94	0	31.33
Siyez unu	0	0	94	31.33
Tuz	1	1	1	1
Karboksi metil selüloz (CMC)	1	1	1	1
Kimyon	0.5	0.5	0.5	0.5
Sarımsak tozu	0.5	0.5	0.5	0.5
Mısır nişastası	2	2	2	2
Karbonat	1	1	1	1
Kuru bileşenler: su oranı	1:2	1:2	1:2	1:2



### **Protein, Yağ, Kül Tayini**

Nugget örneklerinde yağ, protein ve kül tayini AOAC (2000)'e göre yapılmıştır.

### **Renk Tayini**

Örneklerin renk yoğunlukları (CR-400 Minolta Co, Osaka, Japan) kromometre cihazı kullanılarak belirlenmiştir.  $L^*$ ,  $a^*$  ve  $b^*$  değerleri üç boyutlu renk ölçümünü esas alan Uluslararası Aydınlatma Komisyonu CIELab (Commission Internationale de l'Eclairage) tarafından verilen kriterlere göre uygulanmıştır (Hunt ve ark., 1991). Nuggetların ön ve arka tarafından toplam 3 kez ölçüm yapılmıştır.

### **Mineral Madde İçeriği**

Mineral madde kompozisyonu için hazırlanan örneklerden 1'er gram tartım yapılarak ön işlemler uygulanmıştır. Mineral madde içerikleri ICP-AES24 (inductively-coupled plasma spectrometer) cihazında (Vista Series, Varian International, AG, İsviçre) tayin edilmiştir (Skujins, 1998).

### **Tekstür Profil Analizi (TPA)**

Her bir nugget örneğinin tekstürel özellikleri (hardness-sertlik, springiness-elastikiyet, cohesiveness-dış yapışkanlık, gumminess-gamsılık, chewiness-çiğnenebilirlik ve resilience-geri dönüşüm), tekstür profil analiz cihazında (TA-HD Plus Texture Analyser, UK), cihaza ait yazılım programı kullanılarak belirlenmiştir. Testler oda sıcaklığında yapılmış olup, örnekler % 50 kompresyon ve test hızı 100 mm/dk uygulanmış, 36 mm çapında silindirik prob kullanılmıştır (Crehan ve ark., 2000; Bozkurt ve Bayram, 2006; Herrero ve ark., 2007).

### **Duyusal Analiz**

Duyusal analiz, Selçuk Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü gönüllü Öğretim Elemanı ve öğrencilerinden oluşan 13 panelist tarafından gerçekleştirilmiştir. Nugget örnekleri, pişirme işlemi sonrasında (15 dk sonra) panelistlere sunulmuştur. Panel öncesi (duyusal analiz öncesi) panelistlere, değerlendirme formu ile ilgili detaylı bilgi verilmiştir. Her bir grup kendi arasında rastgele 3 haneli rakamlar ile kodlanarak, oda sıcaklığında panelistlere sunulmuştur. Duyusal değerlendirme sırasında, ağızda oluşan tatları nötrlemek amacıyla su ve ekmek kullanılmıştır. Panelistlerden nugget örneklerinin çeşitli özelliklerini (renk, tat-lezzet-görünüş, gevreklik ve genel kabul edilebilirlik), kendilerine verilen ölçeğe (1 ile 9 arasında, 1: oldukça kötü, 9: mükemmel) göre değerlendirmeleri istenmiştir. Sonuçların değerlendirilmesinde, her grup için verilen puanların ortalamaları alınmıştır (Tseng ve ark. 2000; Jackson ve ark., 2006).

### **İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel analizler için elde edilen veriler Minitab Statistical Software, Release 16.0 programı kullanılarak Varyans analizine tabi tutulmuştur. Gruplar arasındaki farkların önemli olup olmadığını karşılaştırmak için ortalama değerler Tukey Karşılaştırma Testi kullanılarak analiz edilmiştir.

## **BULGULAR VE TARTIŞMA**

### **Fizikokimyasal Analizler**

Farklı unlarla hazırlanmış tavuk nuggetlara ait yağ, protein ve kül analizi sonuçları Çizelge.3'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre amarant, karabuğday, siyez ve karışım ilave edilerek hazırlanmış tavuk nuggetların yağ, protein ve kül değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz ( $P >0.05$ ) bulunmuştur. Pişmiş tavuk nuggetların yağ, protein ve kül değerlerinin sırasıyla %5.16-7.16, 12.51-13.29 ve 1.62-1.80 arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir.

**Çizelge 3.** Farklı unlar ilave edilerek hazırlanmış pişmiş nuggetların yağ, protein ve kül değerleri (%)

Nugget Çeşidi	Yağ (%)	Protein (%)	Kül (%)
Amarant	6.57±0.25 <sup>a</sup>	13.26±0.38 <sup>a</sup>	1.63±0.13 <sup>a</sup>
Karabuğday	5.16±0.59 <sup>a</sup>	13.29±0.24 <sup>a</sup>	1.62±0.01 <sup>a</sup>
Siyez	6.44±0.88 <sup>a</sup>	12.69±0.80 <sup>a</sup>	1.73±0.01 <sup>a</sup>
Karışım	7.16±0.05 <sup>a</sup>	12.51±0.36 <sup>a</sup>	1.80±0.05 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasında fark istatistik olarak önemlidir ( $P < 0.05$ ).

Çalışmamızda, karabuğday eklenmiş pişmiş nuggetların en düşük yağ ve kül, en yüksek protein içeriklerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Karışım eklenmiş nuggetların en yüksek yağ ve kül, en düşük protein içeriklerine sahip olduğu belirlenmiştir. Amarantın, diğer birçok kaynağa göre oldukça yüksek protein oranına sahip olduğu ve proteinin sindirilebilirliğinin %90 civarında olduğu vurgulanmıştır (Becker ve ark., 1981; Alvarez-Jubete ve ark., 2010). Bazı çalışmalarda, amarantın yaklaşık % 13-21 protein, % 5-11 yağ, % 2-5 kül ve % 3-5 lif içerdiği belirtilmiştir (Berghofer ve Schoenlechner, 2002; Arendt ve Zannini, 2013). Sharoba (2009), farklı miktarlarda amarant unu ilave ettiği sığır eti sosislerin kül içeriğinin arttığını, diğer bileşenlerin ise azaldığını ortaya koymuştur. Sığır eti sosislerin üretiminde amarant ununun kullanılabilirliğini belirtmiştir. Tamsen ve ark. (2018)'nin tavuk nugget üretiminde %0, %50 ve %100 oranlarında buğday unu ve amarant unu karışımları ilave ettikleri çalışmada, amarant ununun nuggetların yağ, protein ve kül değerlerini arttırdığını tespit etmişlerdir. Dizlek ve ark. (2009) tarafından karabuğdayın nişasta, protein, nem ve lif içeriklerinin sırasıyla %55-75, %10-12, %9.6-13.8 ve %7.0-10.7 arasında değiştiği belirtilmiştir. Tahıllarda, ana depo proteinleri prolaminler iken, karabuğdayda globülinler olduğu belirtilmiştir (Ikeda ve ark., 1991; Christa and Soral-Šmietana, 2008). Kilinceker ve Karahan (2020), karabuğday unu nişasta, protein ve nem içeriklerinin %68.15, %11.46 ve %7.42 olduğunu tespit etmişlerdir. Bilgiçli (2008)'nin, yapmış olduğu çalışmaya göre, gluten içermeyen erişte hazırlanmasında %20 oranında eklenen karabuğday ununun eriştenin kül içeriğini artırdığı gözlenmiştir.

### Renk Analizi Değerleri

Çiğ ve pişmiş tavuk nuggetların renk analizi sonuçları Çizelge 4'de verilmiştir. Çalışmamızda, pişmiş nuggetların  $b^*$  değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmazken ( $P > 0.05$ ), çiğ nuggetların  $L^*$ ,  $a^*$  ve  $b^*$  değerleri, pişmiş nuggetların  $L^*$  ve  $a^*$  değerleri arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli ( $P < 0.01$ ) bulunmuştur. Amarant eklenmiş çiğ örneklerin en düşük  $L^*$  (parlaklık), en yüksek  $a^*$  (kırmızılık) ve  $b^*$  (sarılık) değerlerine; karabuğday eklenmiş örneklerin ise en yüksek  $L^*$ , en düşük  $a^*$  ve  $b^*$  değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Karabuğday ilave edilmiş çiğ nuggetların en yüksek  $L^*$  değerine, amarant ilave edilmiş nuggetların ise en düşük parlaklık değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Amarant içeren nuggetların en yüksek  $a^*$  değerine sahip olduğu, bunu siyez içeren nuggetların takip ettiği, en düşük kırmızılık değerinin ise karabuğday içeren nuggetlarda olduğu belirlenmiştir. En yüksek  $b^*$  değerleri amarant eklenmiş nuggetlarda, en düşük ise karabuğday eklenmiş nuggetlarda gözlenmiştir. Farklı unlar ilave edilerek pişirilmiş nuggetların çiğ nuggetlara göre  $L^*$  değerlerinin daha düşük,  $a^*$  ve  $b^*$  değerlerinin ise daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çiğ nuggetlarda olduğu gibi pişmiş nuggetlarda da en yüksek  $L^*$  değerine, karabuğday ilave edilen örneklerin sahip olduğu belirlenmiştir. Siyez ilave edilmiş pişmiş nuggetların en düşük  $L^*$  ve en yüksek  $a^*$  değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Karışım ilave edilmiş pişmiş nuggetların en düşük  $b^*$  değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Amarant ilave edilmiş nuggetlar ile karabuğday ilave edilmiş nuggetların  $a^*$  değerleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır.

**Çizelge 4.** Farklı unlar ilave edilerek hazırlanmış çiğ ve pişmiş nuggetların renk değerleri

Nugget çeşidi	Çiğ			Pişmiş		
	<i>L*</i>	<i>a*</i>	<i>b*</i>	<i>L*</i>	<i>a*</i>	<i>b*</i>
Amarant	72.07±0.22 <sup>c</sup>	0.87±0.16 <sup>a</sup>	21.78±0.22 <sup>a</sup>	50.89±0.01 <sup>b</sup>	4.67±0.29 <sup>b</sup>	22.26±0.58 <sup>a</sup>
Karabuğday	81.73±0.07 <sup>a</sup>	0.41±0.02 <sup>c</sup>	12.77±0.16 <sup>d</sup>	53.02±0.22 <sup>a</sup>	4.67±0.33 <sup>b</sup>	21.56±0.04 <sup>a</sup>
Siyez	72.46±0.38 <sup>c</sup>	0.81±0.02 <sup>ab</sup>	19.46±0.43 <sup>b</sup>	49.46±0.34 <sup>c</sup>	6.91±0.29 <sup>a</sup>	22.19±0.51 <sup>a</sup>
Karışım	77.04±0.54 <sup>b</sup>	0.49±0.03 <sup>bc</sup>	16.92±0.43 <sup>c</sup>	49.88±0.54 <sup>bc</sup>	6.42±0.36 <sup>a</sup>	21.38±0.88 <sup>a</sup>

<sup>a-d</sup>: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasında fark istatistik olarak önemlidir ( $P < 0.05$ ).

Shekarchizadeh ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada, tavuk nuggetlara ilave edilen amarant miktarının artması ile açıklık, kırmızılık ve mavilik değerlerinin düştüğü tespit edilmiştir. Altınar ve ark. (2004), pirinç unu ve soya unu ilave ederek gerçekleştirdikleri kaplama çalışmalarında soya unu ilave ettikleri tavuk nuggetlarda rengin iyileştiğini tespit etmişlerdir. Kilinceker ve Karahan (2020)'ın yapmış oldukları çalışmaya göre; 3/1 oranında karabuğday unu ve buğday unu ilave ettikleri tavuk köftelerinin *L\**, *a\** ve *b\** değerleri sırasıyla 56.86, 12.07 ve 37.11 olarak tespit edilmiştir. Mezaize ve ark., (2009), Fransız ekmeğine benzer glutensiz ekmek üretimi için yaptıkları çalışmada, karabuğday ununun istenilen renk özelliğini verdiğini, %5 karabuğday unu kullanılmasının uygun olduğunu bildirmişlerdir. Barros ve ark. (2018)'nin yaptıkları çalışmada, tavuk nuggetların *L\** değerinin chia unu ilavesi ile azaldığı, bu durumun sebebinin ise chia ununun koyu renge sahip olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir.

### Mineral Madde Analizi Değerleri

Farklı unlar ilave edilerek kaplanmış tavuk nuggetların Ca, Fe ve Mg değerleri arasında istatistiksel fark ( $P < 0.01$ ) bulunmuş, K, Na ve P değerleri arasında ise ( $P > 0.05$ ) bulunmamıştır (Çizelge 5). En yüksek Ca, Fe ve Mg değerleri amarant ilave edilmiş nuggetlarda tespit edilmiş olup sırasıyla 283.50, 19.00 ve 453.00 mg/kg olduğu belirlenmiştir. Karabuğday, siyez ve karışım içeren nuggetların Ca ve Mg değerleri arasında farklılık ( $P > 0.05$ ) bulunmamıştır. Nuggetlarda en yüksek değerlerin Na, P ve K minerallerine ait olduğu belirlenmiştir.

**Çizelge 5.** Farklı unlar ilave edilerek hazırlanmış nuggetların mineral madde analizi sonuçları (mg/kg)

Nugget Çeşidi	Ca	Fe	K	Mg	Na	P
Amarant	283.50±12.02 <sup>a</sup>	19.00±1.41 <sup>a</sup>	2890.00±158.40 <sup>a</sup>	453.00±4.24 <sup>a</sup>	4136.0±462.40 <sup>a</sup>	3390.00±175.40 <sup>a</sup>
Karabuğday	175.50±26.16 <sup>b</sup>	10.50±0.70 <sup>b</sup>	2439.50±217.10 <sup>a</sup>	336.00±25.40 <sup>b</sup>	3285.0±683.10 <sup>a</sup>	2306.00±294.20 <sup>a</sup>
Siyez	165.50±12.02 <sup>b</sup>	14.50±2.12 <sup>ab</sup>	3235.00±111.70 <sup>a</sup>	314.00±7.07 <sup>b</sup>	5353.0±332.30 <sup>a</sup>	3410.50±191.60 <sup>a</sup>
Paçal	163.00±19.80 <sup>b</sup>	12.00±1.41 <sup>b</sup>	2386.50±389.60 <sup>a</sup>	276.50±44.55 <sup>b</sup>	4222.0±527.50 <sup>a</sup>	3294.00±408.70 <sup>a</sup>

<sup>a-b</sup>: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasında fark istatistik olarak önemlidir ( $P < 0.05$ ).

Tamsen ve arkadaşları (2018)'nin tavuk nuggetlara %0, %50 ve %100 oranında buğday unu ve amarant unu karışımlarını ilave ettikleri çalışmanın sonucuna göre amarant ununun nuggetlerdeki mineral içeriğini arttırdığı belirlenmiştir. Bilgiçli (2009) yaptığı çalışmada, ilave ettiği karabuğday unu miktarı arttıkça tarhananın içerdiği K, P ve Mg içeriklerinin arttığını tespit etmiştir. %20-40 düzeyinde amarant ilavesinin ekmeğin demir içeriğinde yaklaşık 1.6-2.3 kat artış oluşturabileceği belirtilmiştir (Venskutonis ve Kraujalis, 2013). Karabuğday zengin bir mineral içeriğine sahip olup diğer tahıllara göre Mg, Zn, K, P, Cu ve Mn seviyeleri oldukça yüksektir (Mazza, 1988).

### Tekstür Profil Analizi Değerleri

Farklı unlar eklenerek üretilen tavuk nuggetların tekstürel özellikleri Çizelge 6'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre nuggetların sertlik, gamsılık ve çiğnenebilirlik değerleri arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli ( $P < 0.01$ ), elastikiyet, dış yapışkanlık ve geri dönüşüm değerleri arasındaki farklılık ise önemsiz ( $P > 0.05$ ) düzeyde bulunmuştur. En yüksek sertlik ve çiğnenebilirlik değerleri karabuğday ilave

edilmiş tavuk nuggetlarda tespit edilmiştir. Amarant, siyez ve karışım eklenmiş nuggetların sertlik ve çiğnenebilirlik değerleri arasında farklılık gözlenmemiştir ( $P > 0.05$ ). Çalışmamızda farklı unlar ilave edilmiş tavuk nuggetların sertlik değerleri 106.41-166.38 N, gamsılık değerleri 59.27-94.05 N, çiğnenebilirlik değerleri 46.86-74.42 N.mm arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir.

**Çizelge 6.** Farklı unlar ilave edilerek hazırlanmış nuggetların Tekstür Profil Analizi sonuçları

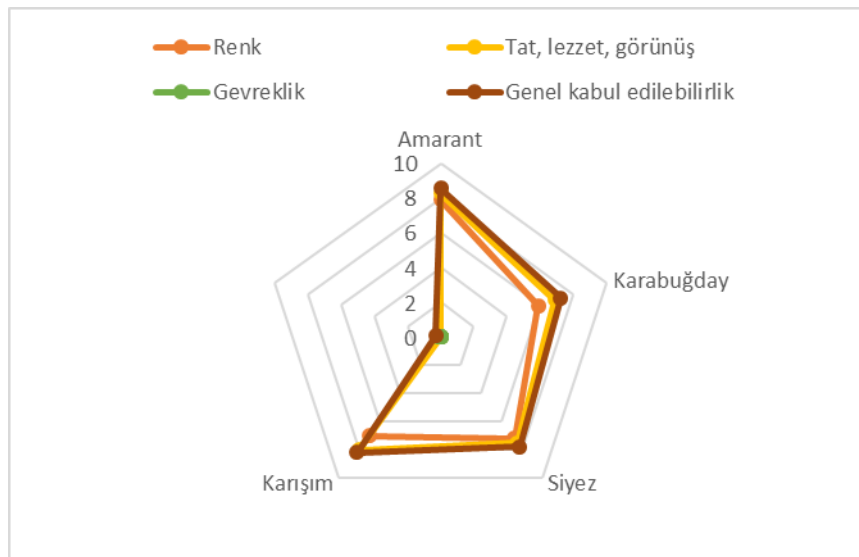
Nugget Çeşidi	Sertlik (N)	Elastikiyet (mm)	Dış Yapışkanlık	Gamsılık (N)	Çiğnenebilirlik (N.mm)	Geri Dönüşüm
Amarant	125.05±5.92 <sup>b</sup>	0.692±0.04 <sup>a</sup>	0.551±0.02 <sup>a</sup>	69.04±5.54 <sup>a</sup>	47.67±0.54 <sup>b</sup>	0.193±0.01 <sup>a</sup>
Karabuğday	166.38±13.28 <sup>a</sup>	0.791±0.01 <sup>a</sup>	0.566±0.01 <sup>a</sup>	94.05±5.83 <sup>b</sup>	74.42±3.94 <sup>a</sup>	0.214±0.01 <sup>a</sup>
Siyez	117.22±2.29 <sup>b</sup>	0.753±0.04 <sup>a</sup>	0.553±0.03 <sup>a</sup>	64.95±4.43 <sup>b</sup>	49.01±5.96 <sup>b</sup>	0.219±0.01 <sup>a</sup>
Paçal	106.41±1.32 <sup>b</sup>	0.793±0.01 <sup>a</sup>	0.560±0.06 <sup>a</sup>	59.27±5.66 <sup>b</sup>	46.86±3.62 <sup>b</sup>	0.215±0.03 <sup>a</sup>

<sup>a-b</sup>: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasında fark istatistik olarak önemlidir ( $P < 0.05$ ).

Altınar ve ark. (2004), gerçekleştirdikleri kaplama çalışmalarında pirinç ununa kıyasla soya unu ilave ettikleri tavuk nuggetların gevrekliğinin arttığını gözlemlemişlerdir. Gambus ve ark. (2009)'nın yaptıkları çalışmada mısır unu, karabuğday ve amarant unu ile ürettikleri bisküvilerin sertlik değerinin yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Devatkal ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada buğday ununa göre Sorghum unu ilave ettikleri tavuk nuggetların sertlik, yapışkanlık ve çiğnenebilirlik değerlerinin arttığını tespit etmişlerdir. Shekarchizadeh ve ark. (2018), amarant unu ilave ettikleri tavuk nuggetların buğday unu ilave ettikleri nuggetlara göre sertlik değerinin arttığını belirlemişlerdir. Bunun sebebinin ise arginin, glutamik asit ve andaspartik asitler gibi amarant yüklü amino asitlerin, et miyofibriler proteinlerindeki lizin, glutamik asit ve aspartik asit ile kovalent olmayan bağlar yoluyla bağlanabildiğini ve bunun da nuggetların sertliğinin, yapışkanlığının ve çiğnenebilirliğinin artmasına neden olacağını ifade etmişlerdir.

### Duyusal Analiz Değerleri

Amarant, karabuğday, siyez ve karışım ilave edilmiş tavuk nuggetların renk, tat-lezzet-görünüş, gevreklik ve genel kabul edilebilirlik değerleri arasında istatistiki fark ( $P < 0.01$ ) görülmemiştir. Duyusal analiz sonuçları Şekil 2'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, en yüksek renk, gevreklik ve genel kabul edilebilirlik değerlerinin amarant ilave edilmiş tavuk nuggetlarda olduğu belirlenmiştir. En yüksek tat-lezzet-görünüş değerleri ise amarant ve karışım ilave edilmiş nuggetlarda tespit edilmiştir. Elde edilen duyusal analiz sonuçlarına göre, diğer unların ilave edildiği nuggetlara kıyasla karabuğday ilave edilmiş nuggetların en düşük duyusal özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 2.** Farklı unlar ilave edilerek hazırlanmış nuggetların duyusal özellikleri

Tamsen ve ark. (2018)'nin yaptıkları çalışmaya göre, farklı miktarlarda Amarant unu ilave edilen tavuk nuggetların duyu analizi sonuçlarının kontrol örnekleriyle benzer olduğu belirlenmiştir. Belekhanlu ve ark. (2016), soya proteini tozu ve galeta ununa %50 oranında amarant unu ilave ederek hazırladıkları hamburgerlerin duyu özelliklerinin geliştiğini ve bunun yeni ürünlerde kullanılabilirliğini bildirmişlerdir. Bilgiçli (2009), yaptığı çalışmada, %40'ın üzerinde karabuğday unu ilave ettiği tarhananın duyu değerlerinin düştüğünü belirtmiştir. Kılınccıker ve Karahan (2020), buğday ve karabuğday unu ilave ederek hazırladıkları tavuk köftelerin duyu analizleri sonucunda, tekstür özelliklerinin karabuğday unundan etkilendiğini  $P < 0.05$  belirlemişlerdir. Makdoud ve Rosentrater (2017)'in yaptığı çalışmaya göre %40 kinoa unu, %10 amarant unu ve %50 pirinç unu ile üretilen makarnaları tüketen tüketicilerin %80'inin tekrar bu makarnayı tüketebilecekleri tespit edilmiştir. Bilgiçli (2008)'in yapmış olduğu çalışmaya göre gluten içermeyen erişte üretiminde %20 oranında ilave edilen karabuğday unu ile yapılan eriştelerin renk değeri haricindeki duyu özelliklerinin beğenildiği belirlenmiştir. Literatür bulgularına göre, karabuğday ilave edilen ürünlerin duyu özelliklerinin belirli bir miktara kadar tüketiciler tarafından beğenildiği, belirli bir miktarın üzerine çıktığında ise duyu özelliklerinin azaldığı anlaşılmaktadır.

## SONUÇ

Tavuk nugget üretiminde, gluten hassasiyeti olan bireyler için glutensiz kaplamaların geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Çalışmamızda buğday ununun yerine amarant, karabuğday, siyez ve karışım unlarının kullanılmasının nuggetların mineral madde içeriğine, tekstürel, renk ve duyu özelliklere etkide bulunduğu belirlenmiştir. Amarant eklenmiş nuggetların Ca, Fe ve Mg içeriğinin daha yüksek olduğu ve amarantın diğer unlara göre duyu özelliklere genel anlamda daha iyi etkide bulunduğu görülmüştür. Nuggetlara karabuğday eklenmesinin ise diğer unlara göre sertlik ve çignenebilirlik özelliklerini olumsuz etkilediği bulunmuştur. Karabuğday eklenmiş çığ ve pişirilmiş nuggetlarda en yüksek parlaklık değeri ( $L^*$ ) tespit edilmiştir. Amarant eklenmiş çığ nuggetların ise en yüksek kırmızılık ( $a^*$ ) ve sarılık ( $b^*$ ) değerlerine sahip olduğu bulunmuştur. Pişirilmiş nuggetların çığ nuggetlara göre  $L^*$  değerlerinin daha düşük,  $a^*$  ve  $b^*$  değerlerinin ise daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Nugget üretiminde amarant, siyez unları ve bunların karışımlarının kullanılmasının tekstürel, duyu, renk özellikleri ve mineral madde içeriği açısından düşünüldüğünde fonksiyonel ve kabul edilebilir olduğu düşünülmektedir.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Abdel-Aal ESM, Hucl P, Sosulski FW, 1995. Compositional And Nutritional Characteristics of Spring Einkorn And Spelt Wheats. Cereal Chemistry, 72: 621-624.
- Acar R, Güneş A, Gummadov N, Topal İ, 2011. Farklı Bitki Sıklıklarının Karabuğdayda Verim ve Bazı Verim Unsurlarına Etkisi. Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 25 (3): 47-51.
- Albert A, Perez Munuera L, Quiles A, Salvodor A, Fizman SM, Hernando L, 2009. Adhesion in Fried Battered Nuggets Performance of Different Hydrocolloids as Predusts Using Three Cooking Procedures. Food Hydrocolloids, 23: 1443-1448.
- Altunakar B, 2003. Functionally of Different Batters in Deep-Fat Fried Chicken Nuggets. Ortadoğu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış).

- Altunar B, Sahin S, Sumnu G, 2004. Functionally Of Batters Containing Different Starch Types For Deep-Fat Frying Of Chicken Nuggets. *European Food Research and Technology*, 218: 318-322.
- Alvarez-Jubetea, L., Arendt, E.K. and Gallagher, E. 2010. Nutritive value of pseudo cereals and their increasing use as functional gluten free ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 21: 106-113.
- AOAC, 2000. Official methods of analysis (17th ed.). Washington, D.C: Assn. of Official Analytical Chemists.
- Arendt EK, Zannini E, 2013. *Cereal Grains for The Food and Beverage Industries*. Woodhead Publishing Series in Food Sciences, Technology and Nutrition. No: 248, Philadelphia, USA.
- Barros JC, Munekata PES, Pires MA, Rodrigues I, Andaloussi OS, da Costa Rodrigues CE, Trindade MA, 2018. Omega-3-and fibre-enriched Chicken Nuggets by Replacement of Chicken Skin with Chia (*Salvia Hispanica L.*) Flour. *LWT*, 90: 283-289.
- Becker R, Wheeler EL, Lorenz K, Stafford AE, Grosjean OK, Betschart AA, Saunders RM, 1981. A Compositional Study of Amaranth Grain. *Journal of Food Science*, 46(4): 1175-1180.
- Belekhkanlu AS, Mirmoghtadayi L, Hosseini H, Hosseini M, Ferdosi R, Aliabadi SA, 2016. Effect of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seed Flour as a Soya Protein and Bread Crumbs on Physicochemical and Sensory Properties of a Typical Meat Hamburger. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*, 11 (3): 115-122.
- Berghofer E, Schoenlechner, R, 2002. Grain Amaranth. In Belton P, Taylor J: *Pseudocereals and Less Common Cereals: Grain Properties and Utilization Potential*. Springer-Verlag, pp. 219-260.
- Bilgiçli N, 2008. Utilization of Buckwheat Flour in Turkish Traditional Foods. *Bhosporus 2008 ICC International Conference*, İstanbul, 176: 24-26.
- Bilgiçli N, 2009. Effect of Buckwheat Flour on Chemical and Functional Properties of Tarhana. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 514-518.
- Bozkurt H, Bayram M, 2006. Colour and Textural Attributes of Sucuk during Ripening. *Meat Science*, 73 (2): 344-350.
- Christa K, Soral-Šmietana M, 2008. Buckwheat Grains and Buckwheat Products-Nutritional and Prophylactic Value of Their Components: A Review. *Czech J. Food Sci.*, 3: 153-162.
- Crehan C, Hughes E, Troy D, Buckley D, 2000. Effects of Fat Level and Maltodextrin on The Functional Properties of Frankfurters Formulated with 5, 12 and 30% fat. *Meat science*, 55(4): 463-469.
- De Vincenzi M, Luchetti R, Giovannini C, Pogna NE, Saponaro C, Galterio G, Gasbarrini G 1996. In Vitro Toxicity Testing of Alcohol-Soluble Proteins From Diploid Wheat Triticum Monococcum in Celiac Disease. *Journal of Biochemical Toxicology*, 11 (6): 313-318.
- Devatkal SK, Kadam, DM, Naik PK, Sahoo, J, 2011. Quality Characteristics of Gluten-Free Chicken Nuggets Extended with Sorghum Flour. *Journal of Food Quality*, 34: 88-92.
- Dizlek H, Özer MS, İnanç E, Gül H, 2009. Karabuğdayın Bileşimi ve Gıda Sanayiinde Kullanım Olanakları. *Gıda*, 34 (5): 317-324.
- Erdem N, 2016. *Gıda Katkı Maddeleri*. 1. Baskı, Büyük Anadolu Grup Medya Ltd. Şti., Ankara, Türkiye, s. 1-223. ISBN: 978-605-84171-0-6.
- Ergun M, Özbay N, Osmanoglu A, Çalkır A, 2014. Sebze ve Tahıl Olarak Amaranth (*Amaranthus spp.*) Bitkisi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 4 (3): 21-28.
- Fizman S, Sanz T, 2010. Battering and breading principles and system development. *Handbook of Poultry Science and Technology, Secondary Processing*, John Wiley 560 p.
- Fizman SM, Salvador A, 2003. Recent Developments in Coating Batters. *Trends in Food Science and Technology*, 14 (10): 399-407.
- Gallagher E, Gormley TR, Arendt EK, 2004. Recent Advances in the Formulation of Gluten-free Cereal-Based Products. *Trends in Food Science & Technology*, 15 (3-4): 143-152.
- Gambus H, Gambus F, Pastuszka D, Wrona P, Ziobro R, Sabat R, Mickowska B, Nowotna A, Sikora M, 2009. Quality of Gluten- Free Supplemented Cakes and Biscuits. *International Journal of Food Properties*, 60 (4): 31-50.

- Herrero AM, Ordóñez JA, Romero de Avila, Herranz B, de la Hoz L, Cambero MI, 2007. Breaking Strength of Dry Fermented Sausages and Their Correlation with Texture Profile Analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, 77: 331-338.
- Hidalgo A, Brandolini A, 2014. Nutritional Properties of Einkorn Wheat (*Triticum monococcum L.*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94:601-612.
- Hill I, Bhatnagar S, Cameron J, De Rosa S, Maki M, Russell G, Troncone R, 2002. Celiac Disease: Working Group Report of The First World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, And Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 35: 78-88.
- Hunt MC, Acton JC, Benedict RC, Calkins CR, Cornforth DP, Jeremiah LE, Olson DP, Salm CP, Savell JW, Shivas SD, 1991. Guidelines for Meat Color Evaluation. National Live Stock and Meat Board Chicago, III, 1-17.
- Ikeda K, Sakaguchi T, Kusano T, Yasumoto K, 1991. Endogenous Factors Affecting Protein Digestibility in Buckwheat. *Cereal Chemistry*, 68: 424-427.
- Jackson V, Schilling MW, Coggins PC, Martin JM, 2006. Utilization of Rice Starch in The Formulation of Low-fat, Wheatfree Chicken Nuggets. *Journal of Applied Poultry Research*, 15 (3): 417.
- Kalinova J, Dadakova E, 2009. Rutin and Total Quercetin Content in Amaranth (*Amaranthus spp.*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 64: 68-74.
- Kılınççeker O, 2015. Some Quality Characteristics of Fish Meatballs Manufactured with Different Vegetablebased Flours. *Gıda*, 4 (2): 61-67.
- Kılınççeker O, Büyük G, 2019. Amaranth (*Amaranthus spp.*)'ın Bazı Özellikleri ve Et Ürünlerinde Kullanımı. *Adyütayam*, 7 (2): 36-42.
- Kırpık M., Kılınççeker O, 2018. Use of Quinoa Flour in Chicken Meatball Production. I. International Gap Agriculture and Livestock Congress, 25-27 April, Şanlıurfa, Turkey.
- Kilinceker O, Karahan AM, 2020. The Effect Of Buckwheat Flour on Some Quality Properties of Chicken Meatballs as an Alternative to Wheat Flour. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*, 12(4): 155-164.
- Kurt Ş, Kılınççeker O, 2012. The Effects of Cereal and Legume Flours on The Quality Characteristics of Beef Patties. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18 (5): 725-730.
- Løje H, Møller B, Laustsen AM, Hansen A, 2003. Chemical Composition, Functional Properties and Sensory Profiling of Einkorn (*Triticum monococcum L.*). *Journal of Cereal Science*, 37: 231-240
- Mahmoud RM, Yousif EI, Cadallah MG, Alawneh AR, 2013. Formulations and Quality Characterization Of Gluten-Free Egyptian Balady Flat Bread. *Annals of Agricultural Sciences*, 58: 19-25.
- Makdoud S, Rosentrater KA, 2017. Development and Testing of Gluten-Free Pasta Based on Rice, Quinoa and Amaranth Flours. Iowa State University, Agricultural and Biosystems Engineering, Food Science and Human Nutrition, *Journal of Food Research* 6 (4): 1927-0887.
- Mariotti M, Pagani MA, Lucisano M, 2013. The Role of Buckwheat and HPMC on The Breadmaking Properties of Some Commercial Gluten-Free Bread Mixtures. *Food Hydrocolloids*, 30: 393-400.
- Mazza G, 1988. Lipid Content and Fatty Acid Composition of Buckwheat Seed. *Cereal Chemistry*, 65: 122-126.
- Mearin ML, 2007. Celiac Disease Among Children and Adolescents. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 37: 86-105.
- Mendoza N, 2005. Coeliac Disease: An Overview of The Diagnosis, Treatment and Management. *Nutrition Bulletin*, 30 (3): 231- 236.
- Mezaize S, Chevallier S, Bail A, Lamballerie MD, 2009. Optimization of Gluten-Free Formulations for French-Style Breads. *Journal of Food Science*, 74: 140-146.
- Novotni D, Cukelj N, Smerdel B, Bituh M, Dujmic F, Curic D, 2012. Glycemic Index and Firming Kinetics of Partially Baked Frozen Gluten Free Bread with Sourdough. *Journal of Cereal Science*, 55: 120-125.
- Olgun M, Başçiftçi ZB, Ayter NG, Kutlu İ, Akın A, Karaduman Y, 2013. Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum L.*) Çeşitlerinde Protein Oranının Üç Farklı Analiz Yöntemine Göre Karşılaştırılması Üzerine Bir Araştırma. *SDÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 8 (2): 80-87.

- Önay Derin D, Işık N, Erdem N, 2016. Konya İl Merkezinde Yaşayan Kadınların Yiyecek Hazırlama, Pişirme ve Saklama Uygulamaları Üzerine Bir Araştırma. Selçuk Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi, 35: 87-101.
- Paško P, Bartoń H, Zagrodzki P, Gorinstein S, Fołta M, Zachwieja Z, 2009. Anthocyanins, Total Polyphenols and Antioxidant Activity in Amaranth and Quinoa Seeds and Sprouts During Their Growth. Food Chemistry, 115: 994-998.
- Pizzuti D, Buda A, D'Odorico A, D'Inca R, Chiarelli S, Curioni A, Martines D, 2006. Lack of İntestinal Mucosal Toxicity of Triticum Monococcum in Celiac Disease Patients. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 41 (11): 1305-1311.
- Sharoba AM, 2009. Quality Attributes of Sausage Substituted by Different Levels of Whole Amaranth Meal. Annals of Agricultural Science, Moshtohor, 47 (2): 105-120.
- Shekarchizadeh H, Soltanzadeh N, Tamsen M, 2018. Evaluation of Wheat Flour Substitution With Amaranth Flour On Chicken Nugget Properties. LWT Food Science and Technology, 91: 580-587.
- Shokry AM, 2016. The Usage of Quinoa Flour As a Potential İngredient in Production of Meat Burger with Functional Properties. Middle East Journal of Applied Sciences, 6 (4): 1128-1137.
- Skujins S, 1998. Handbook for ICP-AES (Varian-Vista). A Short Guide to Vista Series ICP-AES operation. Varian Int. AG, Zug, Version, 1 (0).
- Stallknecht G, Gilbertson K, Ranney J, 1996. Alternative Wheat Cereals as Food Grains: Einkorn, Emmer, Spelt, Kamut, and Triticale. Progress in New Crops, 1996: 156-170.
- Tabarestani HS, Tehrani MM, 2014. Optimization of Physicochemical Properties of Low-Fat Hamburger Formulation Using Blend of Soy Flour, Split-Pea Flour and Wheat Starch As Part of Fat Replacer System. Journal of Food Processing and Preservation, 38 (1): 278-288.
- Tamsen M, Shekarchizadeh H, Soltanzadeh N, 2018. Evaluation of Wheat Flour Substitution with Amaranth Flour on Chicken Nugget Properties. LWT- Food Sciences and Technology, 91: 580-587.
- Tseng T-F, Liu D-C, Chen M-T, 2000. Evaluation of Transglutaminase on The Quality of Low-Salt Chicken Meat-Balls. Meat Science, 55 (4): 427-431.
- Turabi E, Sumnu G, Sahin S, 2008. Rheological Properties and Quality of Rices Cakes Formulated with Different Gums and an Emulsifier Blend. Food Hydrocolloids, 22: 305-312.
- Ün C, Aydoğdu S, 2003. Çölyak Hastalığının Moleküler Genetik Temelleri. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 46: 75-79.
- Venskutonis PR, Kraujalis P, 2013. Nutritional Components Of Amaranth Seeds And Vegetables: A Review on Composition, Properties, and Uses. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 12: 381-412.
- Weiss J, Gibis M, Schuh V, Salminer H, 2010. Advances in İngredient and Processing Systems for Meat and Meat Products. Meat Sciences, 86 (1): 196-213.
- Zaharieva M, Monneveux P, 2014. Cultivated Einkorn Wheat (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*): The Long Life Of A Founder Crop Of Agriculture. Genetic Resources and Crop Evolution, 61: 677-706.



**Atf İçin:** İnanç AL, 2022. Piyasada Satışa Sunulan Ayçiçeği Yağı, Mısır Yağı ve Riviera Zeytinyağlarının Safılık Kriterlerinin Belirlenmesi. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 239-251.

**To Cite:** İnanç, AL, 2022. Determination of Purity Criteria in Sunflower Oil, Corn Oil and Riviera Olive Oils in the Market. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 239-251.

## Piyasada Satışa Sunulan Ayçiçeği Yağı, Mısır Yağı ve Riviera Zeytinyağlarının Safılık Kriterlerinin Belirlenmesi

Ahmet Levent İNANÇ

**ÖZET:** Ayçiçek yağı, mısır yağı ve riviera zeytinyağı; Türkiye’de en çok tüketilen bitkisel yağlar arasında önde gelmektedir. Bu yağ çeşitleri, zaman zaman daha düşük değerli kolza, pamuk yağı vb. yağlarla karıştırılmaktadır. Bu karışımlar, tüketicileri ekonomik yönden zarara uğratmakta ve tüketici sağlığını da tehlikeye atmaktadır; üreticilere ise haksız kazanç sağlamaktadır. Yapılan bu taşışların belirlenmesi amacıyla, Piyasadan satın alınan 24 adet ayçiçek yağı, 24 adet mısır yağı ve 22 adet riviera zeytinyağı olmak üzere toplam 70 adet yağın safılık kriterleri incelenmiştir. Tüm yağların yağ asidi dağılımı ve sterol içerikleri gaz kromatografisi (GC) ile araştırılmıştır. Ayrıca zeytinyağı örneklerinde serbest asitlik, peroksit değeri, trans yağ asitleri, UV ışığında özgül soğurma, gerçek ve teorik ECN 42 trigliserid içeriği arasındaki maksimum fark parametreleri belirlenmiştir. Yağların saflıkları, en az bir kriterin Türk Gıda Kodeksi yönetmeliklerinde belirtilen sınırların dışında kalması referans alınarak belirlenmiştir. Buna göre; ayçiçek yağı örneklerin %75’i, mısır yağı örneklerin % 54.2’si ve riviera zeytinyağı örneklerin % 50’sinin saf olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Bitkisel yağ, gıda taşışi, sterol, yağ asidi, saflık kriteri

### Determination of Purity Criteria in Sunflower Oil, Corn Oil and Riviera Olive Oils in the Market

**ABSTRACT:** Sunflower oil, riviera olive oil and corn oil are the most consumed vegetable oils in Turkey. These kinds of oils are sometimes adulterated with some cheaper oils such as canola oil and cottonseed oil. These mixtures not only damage the consumers economically, but also obtain ill-gotten gains to the producers. Purity criteria of a total of 70 vegetable oils including 24 sunflower oils, 24 corn oils and 22 riviera olive oils purchased from the market were examined. Fatty acid composition and sterol contents of all oils were investigated by gas chromatography (GC). Additionally, free acidity, peroxide value, trans fatty acids content, specific absorption in UV light and ECN 42 numbers were determined in riviera olive oil samples. The purities of the oils were determined with reference to the fact that at least one criterion is outside the limits specified in the Turkish Food Codex regulations. Accordingly, it was determined that 75% of sunflower oil samples, 54.2% of corn oil samples and 50% of riviera olive oil samples were pure.

**Keywords:** Food adulteration, fatty acid, sterol, vegetable oil, purity criteria

Ahmet Levent İNANÇ ([Orcid ID: 0000-0002-7363-5096](https://orcid.org/0000-0002-7363-5096)), Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği, Kahramanmaraş, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Ahmet Levent İNANÇ, e-mail: linanc@ksu.edu.tr

## GİRİŞ

Dünya’da gıda olarak tüketilen yağların %76.2’si bitkisel kökenlidir (Gül ve ark., 2016). Bugün, endüstride yaygın olarak tohumlarından yağ elde edilen bitkiler; soya, ayçiçeği, çigit (pamuk), kolza, yerfıstığı, susam, aspir, hintyağı, haşhaş, keten, kenevir, jojoba, mısır (mısır özünden), zeytin, hurma ve Hindistan cevizidir (Onat ve ark., 2017). Türkiye’de ayçiçeği, zeytin ve mısır başta olmak üzere farklı bitkisel yağ üretimi ve tüketimi gerçekleşmektedir (Özer ve ark., 2021). Ayçiçek yağı, Türkiye’nin bitkisel yağ tüketiminde ortalama %70 ile ilk sıradadır (Taşkaya Top ve Uçum, 2012). Özer ve ark., (2021) Tekirdağ ilinde yaptıkları çalışma ile kişi başı aylık 1.079 L ile ilk sırada ayçiçek yağı, ikinci sırada 0.606 L ile zeytinyağı ve dördüncü sırada ise 0.319 L ile mısırozü yağının tüketildiğini tespit etmişlerdir. Benzer şekilde, Samsun ilinde ayçiçeği yağının diğer yağlardan daha fazla tüketildiği ve ailelerin %74’ünün ayçiçeği yağını kullandığı, ondan sonra zeytinyağını (%61) tercih ettikleri belirlenmiştir (Gündüz ve Esengün, 2010). Zeytinyağında tüketici tercihlerinde ise İzmir ilinde yapılan çalışmada, çoğunlukla natürel sızma (% 39) ve natürel birinci zeytinyağlarının (%36.6) tercih edildiği görülmüştür. Riviera zeytinyağını (%24.4) tüketen bazı tüketiciler, bu yağın kokusunun, kızartmaya uygun olduğundan veya daha uygun fiyata aldıkları için tercih ettiklerini söylemişlerdir (Ağır ve ark., 2018). Türkiye’de bitkisel yağ üretimi 2013 yılında 815 000 tondur. Ayçiçek yağı 560 000 ton ile en çok üretilen bitkisel ham yağlar içerisinde yer almaktadır. Mısır özü yağının üretimi ise 35 000 tondur. Bunun dışında yıllık 200 000 tonun üzerinde zeytinyağı üretilmektedir (Kolsarıcı ve ark., 2015).

Bitkisel yağ; sadece bitkisel kaynaklardan elde edilen, temel olarak yağ asitleri gliseridlerinden oluşan, doğal yapısı gereği az miktarda fosfatidler gibi diğer lipidleri, sabunlaşmayan bileşenleri ve serbest yağ asitlerini içerebilen yağ olarak tanımlanmaktadır (Anonim, 2012).

Yağı meydana getiren bileşenlerinden gliserin, bütün yağ bitkilerinde aynıdır, fakat yağı oluşturan diğer bileşen olan yağ asitleri her bir yağ bitkisinde farklı kompozisyonlarda bulunmaktadır. Yağ asitleri; hidrokarbon zincirindeki karbon sayısı, çift bağların varlığı, çift bağın pozisyonu ve sayısı gibi özelliklerinden dolayı birbirinden ayrılırlar (Baydar, 2000).

Ayçiçek yağı, yağ oranı %39-45 arasında değişen *Helianthus annuus* bitkisinin tohumlarından elde edilen bir yağdır. Ayçiçek yağında %15 doymuş, %85 doymamış yağ asidi bulunmakta; doymamış yağ asitlerinin %14-43’ünü oleik asit, %44-75’ini de linolenik asit oluşturmaktadır. Türkiye’de fiyatının düşüklüğü ve üretim fazlalığından dolayı en çok tercih edilen ayçiçek yağıdır, dünyada ise soya ve palm yağından sonra tercih edilmektedir (Tosun, 2003).

Mısır danesinin sadece embriyosundan rafine mısır yağı üretilmektedir. Bu nedenle soya ve pamuk gibi diğer bitkisel yağlardan her zaman daha pahalıdır. Amerika’da bitkisel yağın %12’si mısır yağı olarak üretilmektedir. Rafine mısır yağının %98’ini trigliserit oluşturmakta ve baskın yağ asitleri olarak; linoleik (%61.9), oleik (%24.1), palmitik (%11.1) ve stearik (%2.0) asit içermektedir (Yıldırım ve Öner, 2020).

Zeytinyağı, zeytin (*Olea europaea* L.) ağacının meyvelerinden elde edilen ve özellikle Akdeniz ülkelerinde üretilen, diyet/sağlık/ekonomik/kültürel faktörlerden dolayı önemli bir yeri olan ve bileşiminde yüksek oranda oleik asit bulunduran yemeklik bir yağdır. Zeytinyağının temel yağ asitlerini oleik (%55-83), linoleik (%3.5-21), palmitik (%7.5-20) ve stearik asitler (%0.5-5) oluşturmaktadır (Yorulmaz, 2009). Zeytinyağının özellikleri coğrafi bölgeye ve zeytin çeşidine göre farklılık göstermektedir. Türkiye’nin Doğu Akdeniz bölgesinde dört ilde hasat edilen zeytinlerden elde edilen zeytinyağlarının serbest asitlikleri %0.39-%2.23, peroksit değerleri 8.87-18.87 meq O<sub>2</sub>/kg, K<sub>232</sub> değerleri 1.4370-2.3970, K<sub>270</sub> değerleri 0.1270-0.1990 arasında değişmektedir. Baskın yağ asitleri ise; oleik (%58.72-%74.54) ve palmitik asit olmaktadır (%12.83-%18.50). Toplam sterol içerikleri; 720.41-

4519.17 mg kg<sup>-1</sup> olmakla birlikte,  $\beta$ -sitosterol içerikleri %76.12 ile %94.23 arasında değişmektedir (Demirağ ve Konuşkan, 2021).

Zeytinyağının doymamış yağ asitleri cis izomer yapısındadır. Bununla birlikte düşük miktarda trans izomerleri de bulunabilmektedir. Trans izomerlerin varlığı, zeytinyağının yüksek sıcaklık ve basınca maruz kaldığının bir göstergesidir. Trans yağ asitleri natürel zeytinyağlarında çok düşük seviyelerdedir. Eşdeğer karbon sayısı 42 olan (ECN42) trigliseritlerin oransal değerleri, zeytinyağlarının linoleik asidi yüksek tohum yağlarıyla taşışlarının belirlenmesinde önemli bir kriter olarak kullanılmaktadır. Diğer önemli kriter ise yağ asidi metil ve etil esterleridir (Kayahan ve Tekin, 2006; Civantos, 1999).

Bitki steroller (fitosteroller) triterpen familyasındadırlar. Steroller, sabunlaşmayan madde içerisinde yer alır ve bitkisel yağların karakteristik özelliklerini verirler. Her yağın sterol kompozisyonu farklıdır. Bu nedenle yağlarda fitosteroller karışık yağların değerlendirilmesinde ayırt edici bileşikler olarak kullanılır. Yağların botanik orijinlerinden dolayı bitkisel yağlar arasında karıştırma durumları belirlenebilir. Bazı bitkisel yağlarla diğer daha ucuz yağların karıştırılmasında sterollerin hemen hemen ayırt edici sonuç verdiği değişik çalışmalarla doğrulanmaktadır. (Ateş, 2005). Zeytinyağları için toplam sterol oranı en az 1000 mg kg<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. Sterollerin yaklaşık %90'ını  $\beta$ -sitosterol ve  $\Delta$ -5-avenasterolün toplamı oluşturmaktadır. Ayçiçek yağında başlıca sterol bileşenleri  $\beta$ -sitosterol (%50-70) ve  $\Delta$ -7-stigmasterol (%6.5-24) iken, mısır yağında  $\beta$ -sitosterol (%54.8-66.6), ve kampesterol (%16-24.1) diğer steroller arasında öne çıkmaktadır. Toplam sterol miktarı ayçiçek yağında 2400-5000 mg kg<sup>-1</sup>, mısır yağında ise 7000-22100 mg kg<sup>-1</sup> arasında değişmektedir. Her yağ kendine has yağ asidi ve sterol bileşimine sahip olduğundan, yağda bu bileşenlerin analizi örneğin saflığı hakkında bilgi vermektedir (Anonim, 2012).

Çalışmanın amacı; piyasada satışa sunulan ayçiçek yağı, zeytinyağı (riviera) ve mısır yağlarında yağ asidi ve sterol kompozisyonları ile zeytinyağında serbest asitlik, peroksit değeri, trans yağ asitleri, UV ışığında özgül soğurma, gerçek ve teorik ECN 42 trigliserid içeriği arasındaki maksimum fark verilerini tespit etmek ve saflıklarını belirlemektir.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Farklı markalarla satışa sunulan 24 adet ayçiçeği, 24 adet mısırözü ve 22 adet riviera tipi zeytinyağı numunesi rastgele market ve/veya pazardan satın alınmıştır. Örnekler rastgele 1'den 24'e kadar numaralandırılmıştır.

### Metot

#### Yağ asitleri kompozisyonu analizi (Ayçiçek ve mısır yağı)

Yağ asitleri metil esterleri karışımı analizi kapiler kolonlu gaz kromatografi cihazı ile yapılmıştır. Örnekteki yağ türevlendirilip yağ asitlerine dönüştürülmüş GC-FID dedektöründe oluşan kromatogram yüzde olarak hesaplanmıştır (Anonim, 2015).

#### Sterol kompozisyonu analizi (Ayçiçek ve mısır yağı)

Örnekteki yağ sabunlaştırılıp, sabunlaşmayan maddedeki steroller, sterol kolonu ile GC-FID dedektöründe oluşan kromatogram yüzde olarak belirlenmiştir (Anonim 2014).

#### Yağ asitleri kompozisyonu analizi (zeytinyağı)

Analiz, 2010/36 nolu Türk Gıda Kodeksi "Zeytinyağı ve Pirina Yağı Numune Alma ve Analiz Metotları Tebliği"ne göre yapılmıştır. Bu metot, sabunlaşma meydana gelmeden önce ara bir aşama

olarak metil esterlerin metanollü KOH ile trans-esterifikasyon oluşturularak uygulanmıştır (Anonim, 2010).

Yağ asidi metil esterlerinin analizi Shimadzu GC-2025 marka cihazda kapiler kolon (Restek Rt-2560) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kolonun uzunluğu 100 m ve iç çapı 0,25 mm'dir. Gaz kromatografisi çalışma koşulları; FID (alev iyonizasyon dedektör), enjeksiyon bloğu sıcaklığı 250°C, dedektör sıcaklığı 250°C, split oranı 1:50, kolon başlangıç sıcaklığı 165 °C ve dakikada 3 °C' lik artışla sıcaklık 240 °C'ye çıkarılmış ve 20 dakika bu sıcaklıkta tutulmuştur. Taşıyıcı gaz Helyum (1ml/dak.), enjekte edilen örnek miktarı 1 µl olarak ayarlanmıştır. 37 bileşenli bir FAME (fatty acid methyl ester) karışımı (C4-C24, Supelco, Bellefonte, PA, US) kullanılarak FID dedektörde oluşan pik alanlarının integrasyonu ile yüzde yağ asidi bileşimleri belirlenmiştir. Cihazın çalışma koşulları ayçiçek ve mısır yağları içinde geçerlidir.

### **Sterol kompozisyonu analizi (zeytinyağı)**

Analiz, 2010/36 nolu Türk Gıda Kodeksi "Zeytinyağı ve Pirina Yağı Numune Alma ve Analiz Metotları Tebliği"ne göre yapılmıştır. Örnekteki yağ sabunlaştırılıp, sabunlaşmayan maddedeki steroller, sterol kolonu ile GC-FID dedektöründe oluşan kromatogram yüzde olarak belirlenmiştir (Anonim, 2010).

Trimetilsilillenmiş örnekler kolon uzunluğu 30 m, iç çapı 0,32 mm ve film kalınlığı 0,25 µm olan HP-5 Fused Silica kapiler kolon özelliklerine sahip "Shimadzu GC-2025" gaz kromatografisi cihazına enjekte edilmiştir. Gaz kromatografisi çalışma koşulları; FID dedektör, enjektör sıcaklığı 280°C, dedektör sıcaklığı 290°C, split oranı 1:50, kolon sıcaklığı 260°C, taşıyıcı gaz Helyum (25 cm/s), enjekte edilen örnek miktarı 1µl olarak ayarlanmıştır. Cihazın çalışma koşulları ayçiçek ve mısır yağları içinde geçerlidir.

### **Serbest asitlik analizi (zeytinyağı)**

Örnek, nötrleştirilmiş etanol-dietil eter karışımında çözündürülmüş ve bundan sonra ortamda bulunan serbest yağ asitleri etanollü KOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Serbest yağ asitleri, hesaplanan serbest asitlik (% oleik asit cinsinden) ifade edilmiştir (Anonim, 2010).

### **Peroksit değeri analizi (zeytinyağı)**

Analiz, Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Pirina Yağı Numune Alma ve Analiz Metotları Tebliği'ne (Tebliğ No: 2010/36) göre yapılmıştır (Anonim, 2010). Asetik asit-izooktan çözeltisinde çözündürülen örneğe potasyum iyodür çözeltisi ilave edilmiş ve açığa çıkan serbest iyot, sodyum tiosülfat çözeltisi ile titre edilmiştir. Sonuç, meq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> yağ olarak ifade edilmiştir.

### **UV ışığında özgül soğurma analizi (zeytinyağı)**

Analiz, 2010/36 nolu Türk Gıda Kodeksi "Zeytinyağı ve Pirina Yağı Numune Alma ve Analiz Metotları Tebliği"ne göre yapılmıştır. (Anonim, 2010).

### **Gerçek ve teorik ECN 42 trigliserid içeriği arasındaki maksimum farkın tayini (zeytinyağı)**

Analiz, 2010/36 nolu Türk Gıda Kodeksi "Zeytinyağı ve Pirina Yağı Numune Alma ve Analiz Metotları Tebliği"ne göre yapılmıştır. Eşdeğer karbon sayısı (ECN) 42 olan trigliseridlerin teorik içeriğinin ve bunun HPLC'den elde edilen veriler ile arasındaki fark hesaplanmıştır. Kapiler gaz kromatografisi ile yağ asidi kompozisyonu analizi, HPLC ile belirlenen ECN 42 olan trigliseridlerin teorik miktarının hesaplanması analizi ve ECN 42 olan trigliseridlerin analizinin sonuçları değerlendirilerek belirlenmiştir (Anonim, 2010).

## Trans izomerlerin analizi

Karbon sayısı 10-24 arasındaki yağ asitlerinin trans-izomer miktarları belirli polaritedeki kapiler kolonlar kullanılarak tespit edilmiştir. Metil esterler hazırlanıp serbest yağ asitliği % 3'ün üzerinde olan örnekler nötralize edilmiştir (Anonim, 2010).

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Ayçiçek ve mısır yağlarının analiz sonuçları 2012/29 no'lu Türk Gıda Kodeksi "Bitki Adı ile Anılan Yağlar" Tebliği'nde belirtilen sınır değerleri (Anonim, 2012) göz önüne alınarak değerlendirilmiştir.

**Çizelge 1.** Ayçiçek yağlarının % yağ asit dağılımları

Yağ asidi		Örnek												Sınır*	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Kaproik	C <sub>6:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Kaprilik	C <sub>8:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Kaprik	C <sub>10:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Laurik	C <sub>12:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE-0.1
Miristik	C <sub>14:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	0.07	TE	TE	TE	TE-0.1
Palmitik	C <sub>16:0</sub>	5.77	10.07	5.90	6.02	6.05	6.01	6.05	9.89	10.46	11.18	4.45	5.90	4.0-7.6	
Palmitoleik	C <sub>16:1</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE-0.3
Heptadesenoik	C <sub>17:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE-0.1
Heptadesenoik	C <sub>17:1</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE-0.1
Stearik	C <sub>18:0</sub>	3.23	3.57	3.41	3.37	3.95	3.73	3.40	4.15	4.11	4.12	1.81	3.66	2.1-6.5	
Oleik	C <sub>18:1</sub>	31.26	25.84	32.87	27.21	26.15	28.20	33.02	25.10	22.28	23.39	64.66	23.96	14.0-71.8	
Linoleik	C <sub>18:2</sub>	58.27	53.19	56.24	61.63	62.37	60.57	55.95	53.65	54.23	58.95	24.37	64.98	18.7-74	
Linolenik	C <sub>18:3</sub>	TE	5.47	TE	0.28	TE	TE	TE	5.41	7.13	0.78	2.24	TE	TE-0.5	
Araşidik	C <sub>20:0</sub>	0.24	0.33	0.24	0.24	0.24	0.23	0.24	0.31	0.34	0.32	0.55	0.24	0.1-0.5	
Eikosenoik	C <sub>20:1</sub>	0.13	0.63	0.13	0.16	0.11	0.11	0.13	0.73	0.65	0.57	0.77	TE	TE-0.3	
Eikosadienoik	C <sub>20:2</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	
Behenik	C <sub>22:0</sub>	0.59	0.41	0.64	0.65	0.67	0.62	0.60	0.32	0.39	0.34	0.33	0.64	0.3-1.5	
Erusik	C <sub>22:1</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE-0.3	
Dokosedienoik	C <sub>22:2</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	
Lignoserik	C <sub>24:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE-0.5	
Nervonik	C <sub>24:1</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
	C <sub>6:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE		
	C <sub>8:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE		
	C <sub>10:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE		
	C <sub>12:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE		
	C <sub>14:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE		
	C <sub>16:0</sub>	5.77	6.32	5.91	5.76	5.74	5.96	5.18	6.12	6.18	5.68	6.12	5.93		
	C <sub>16:1</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE		
	C <sub>17:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE		
	C <sub>17:1</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE		
	C <sub>18:0</sub>	3.80	3.68	3.57	3.66	4.26	3.85	1.98	3.34	2.95	4.39	3.34	3.25		
	C <sub>18:1</sub>	28.64	24.64	24.45	24.45	26.44	29.66	59.07	25.55	35.6	26.17	29.41	27.79		
	C <sub>18:2</sub>	60.25	63.86	64.54	64.64	62.09	58.82	27.67	63.35	53.64	62.25	59.47	61.57		
	C <sub>18:3</sub>	TE	0.15	TE	TE	TE	TE	2.71	TE	TE	TE	TE	TE		
	C <sub>20:0</sub>	0.24	0.25	0.24	0.24	0.25	0.25	0.65	0.24	0.24	0.25	0.24	0.24		
	C <sub>20:1</sub>	0.12	TE	TE	0.12	0.11	0.14	1.15	0.14	0.15	0.11	0.14	0.12		
	C <sub>20:2</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE		
	C <sub>22:0</sub>	0.65	0.68	0.67	0.68	0.67	0.67	0.39	0.69	0.63	0.63	0.69	0.67		
	C <sub>22:1</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE		
	C <sub>22:2</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE		
	C <sub>24:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	0.25	TE	TE	TE		
	C <sub>24:1</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE		

\* TGK (Tebliğ No:2012/29) yönetmeliğine göre, TE: Tespit edilemeyen sınır ( $\leq 0.05$ )

Tebliğe uygun örnek

Tebliğe aykırı örnek veya sınır dışı değer

Ayçiçek yağı örneklerinin % yağ asit dağılımları Çizelge 1’de, sterol içerikleri ise Çizelge 2’de verilmiştir. Aynı veya farklı örneklerde bulunmakla birlikte, örneklerin dördünde palmitik, ikisinde stearik ve araşidik ve altısında linolenik ve eikosenoik asit değerlerinin alt veya üst sınırların dışında olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu asitler içerisinde palmitik, linolenik ve eikosenoik asit değerlerinin sınırların oldukça üstünde olduğu gözlenmiştir. Bütün örneklerin  $\beta$ -Sitosterol,  $\Delta$ -5-Avenesterol ve kolesterol içerikleri sınır değerlerin arasında bulunurken, diğer sterollerin sınır dışında kaldığı tespit edilmiştir. Buna göre;  $\Delta$ -7-Avenesterol ve Kampasterol değerleri sekiz örnekte; bunun ikisinde çok yüksek değer (11.76 ve 12.24) olmakla birlikte,  $\Delta$ -7-Sigmasterol beş örnekte (hepsi çok düşük değerde) ve Stigmasterol ile Brassikasterol altı örnekte sınır dışındadır. Yağ asit dağılımları ve sterol içerikleri birlikte değerlendirildikleri zaman örneklerin %75’nin saf olduğu anlaşılmaktadır.

Çizelge 3 ve 4’te Mısır yağı örneklerinin % yağ asit dağılımları ve sterol değerleri gösterilmiştir. Sınır dışı 10 adet yağ asidi bulunmuştur. Miristik, palmitik, palmitoleik, oleik, linolenik ve eikosadienoik asit dağılımlarının birer örnekte sınır dışı olduğu belirlenmiştir. Diğer sınır dışı olduğu tespit edilen kaprik asit 6 örnekte, eikosenoik ve dokosedienoik asit içerikleri 2 örnekte görülürken araşidik asit içeriği 3 örnekte görülmüştür. Örneklerin iki sterol (stigmasterol ve brassikasterol) hariç tamamı sınır içerisinde olduğu belirlenmiştir. Örnek 11 hem yağ asidi hem de sterol içeriği bakımında sınır dışı olan tek örnektir. Toplamda 24 örnekten 13’ü; yani %54.17’si saf mısır yağıdır.

**Çizelge 2.** Ayçiçek yağlarının sterol içerikleri

Örnek	$\beta$ -Sito sterol	$\Delta$ -5-Avene sterol	$\Delta$ -7-Avene sterol	$\Delta$ -7-Sigma stenol	Stigma sterol	Kampa sterol	Brassika sterol	Kolesterol
1	56.80	5.38	4.32	10.81	7.22	7.74	TE	TE
2	54.56	1.67	2.88	18.37	20.44	TE	2.04	TE
3	57.92	4.86	4.91	17.88	8.12	6.96	TE	TE
4	54.48	5.35	4.36	12.26	6.75	9.14	TE	TE
5	60.97	6.00	4.78	12.51	8.21	7.50	TE	TE
6	59.99	5.49	11.76	8.51	8.38	TE	5.84	TE
7	59.61	6.78	12.24	8.96	6.83	TE	5.55	TE
8	52.28	1.74	1.68	3.14	18.8	21.59	0.50	0.22
9	53.98	1.43	0.67	1.11	18.20	24.60	TE	TE
10	53.84	1.89	1.08	1.84	18.74	22.58	TE	TE
11	51.19	3.98	0.65	0.45	0.68	34.68	8.33	TE
12	60.83	6.69	4.82	11.81	9.04	6.78	TE	TE
13	61.75	5.15	4.01	12.75	8.73	7.57	TE	TE
14	57.27	6.21	6.77	11.99	10.68	7.06	TE	TE
15	52.41	4.54	7.38	21.97	7.09	6.59	TE	TE
16	60.37	6.83	6.51	12.04	7.36	6.86	TE	TE
17	61.73	5.34	4.14	12.76	8.55	7.45	TE	TE
18	60.35	4.95	4.17	13.33	8.65	8.52	TE	TE
19	52.14	2.69	0.56	0.62	0.51	33.4	10.04	TE
20	60.82	4.61	5.02	16.20	6.53	6.78	TE	TE
21	61.94	5.1	3.55	11.72	8.82	8.84	TE	TE
22	63.78	5.25	4.08	11.17	7.64	8.05	TE	TE
23	64.11	5.70	4.28	10.70	8.12	7.06	TE	TE
24	53.33	6.46	4.81	11.58	7.97	7.12	TE	TE
Sınır*	50-70	TE-6.9	3.0-7.5	6.5-24.0	6.0-13	6.5-13.0	TE-0.2	TE-0.7

\* TGK (Tebliğ No:2012/29) yönetmeliğine göre, TE: Tespit edilemedi

Tebliğe uygun örnek

Tebliğe aykırı örnek veya sınır dışı değer

Riviera zeytinyağlarının analiz sonuçları 2017/26 No’lu Türk Gıda Kodeksi “Zeytinyağı ve Pirina Yağı” Tebliği’ne (Anonim, 2017) göre incelenmiştir. Riviera zeytinyağı örneklerinin % yağ asit dağılımları Çizelge 5’te verilmiştir. Örneklerde en çok sınır dışı kalan yağ asidi linoleik asittir, toplam 22 örnek içerisinde 7 örnek bu yağ asidi bakımından saf değildir. İkinci sırada sınır dışı olan yağ asidi oleik asittir, 6 örnekte sınır dışı olduğu görülmektedir. Palmitik, linolenik ve eikosenoik asit değerleri 5 örnekte sınır dışıdır. Behenik, palmitoleik, miristik ve stearik asit içeriği sırasıyla 4, 3, 2 ve 1 adet örnekte

sınır dışıdır. Çizelge 6’da örneklerin sterol miktarları gösterilmiştir.  $\beta$ -Sitosterol ve kampasterol içerikleri sekizer örnekte sınır dışı kalmıştır. Brassikasterol 4 örnekte,  $\Delta$ -7-Sigmastenol 3 örnekte ve stigmasterol bir örnekte sınır dışı olduğu tespit edilmiştir. Zeytinyağların ECN 42 farkı, FFA, PV, trans yağ asitleri ve özgül soğurma değerleri Çizelge 7’de verilmiştir. Yedi örneğin ECN 42 farkları, bir örneğin FFA, iki örneğin  $C_{18:2r}+C_{18:3t}$  trans yağ asitleri, yedi örneğin özgül soğurma  $\lambda_{270}$  ve iki örneğin  $\Delta E$  değerleri olması gereken değerler aralığında olmadığı belirlenmiştir. Peroksit ve  $C_{18:1t}$  trans yağ asit değerleri incelendiğinde ise tebliğe aykırı bir örnek saptanmamıştır. Bütün saflık kriterleri göz önünde bulundurulduğunda 11 örneğin saf olduğu anlaşılmaktadır. Saf olmayan örnekler en az bir kriterinin sınır dışı değere sahiptir. Buna göre örneklerin %50’i saftır.

**Çizelge 3.** Mısır yağlarının % yağ asit dağılımları

Yağ asidi	Örnek												Sınır*	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Kaproik C <sub>6:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Kaprilik C <sub>8:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Kaprik C <sub>10:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	0.22	2.22	0.19	0.96	0.23	0.22	TE	TE
Laurik C <sub>12:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE-0.3
Miristik C <sub>14:0</sub>	TE	TE	TE	TE	0.72	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE-0.3
Palmitik C <sub>16:0</sub>	10.61	10.79	10.79	10.52	28.99	11.39	10.80	10.70	10.20	9.85	11.20	10.80	8.6-16.5	
Palmitoleik C <sub>16:1</sub>	TE	TE	TE	TE	11.00	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE-0.5	
Heptadenoik C <sub>17:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE-0.1	
Heptadenoik C <sub>17:1</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE-0.1	
Stearik C <sub>18:0</sub>	2.03	1.90	2.04	2.14	0.36	1.88	1.93	2.10	2.18	2.25	1.86	1.61	TE-3.3	
Oleik C <sub>18:1</sub>	31.06	31.22	27.73	30.93	TE	29.37	31.14	30.19	32.00	32.46	30.98	28.69	20-42.2	
Linoleik C <sub>18:2</sub>	54.32	54.32	57.04	54.48	54.48	55.51	54.04	54.90	53.58	52.60	53.87	57.02	34-65.6	
Linolenik C <sub>18:3</sub>	0.57	0.81	1.23	0.65	56.55	0.75	0.86	0.86	0.72	1.17	0.87	0.76	TE-2.0	
Araşidik C <sub>20:0</sub>	0.40	0.38	TE	TE	TE	0.37	0.40	0.40	0.39	0.38	0.43	0.35	0.3-1	
Eikosenoik C <sub>20:1</sub>	0.37	0.19	0.27	0.20	0.20	0.20	0.22	2.22	0.23	0.50	0.23	0.22	0.2-0.6	
Eikosadienoik C <sub>20:2</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	0.22	TE	TE	TE	TE	TE-0.1	
Behenik C <sub>22:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	0.25	0.27	TE	TE	TE-0.5	
Erusik C <sub>22:1</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE-0.3	
Dokosedienoik C <sub>22:2</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	0.21	0.73	TE	TE	TE	
Lignoserik C <sub>24:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE-0.5	
Nervonik C <sub>24:1</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	

	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C <sub>6:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
C <sub>8:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
C <sub>10:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
C <sub>12:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
C <sub>14:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
C <sub>16:0</sub>	10.80	10.60	10.40	10.90	10.50	10.10	10.90	10.40	11.00	11.40	11.50	10.70
C <sub>16:1</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
C <sub>17:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
C <sub>17:1</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
C <sub>18:0</sub>	1.92	TE	2.13	1.93	1.93	2.03	1.99	2.14	2.04	1.99	1.97	1.98
C <sub>18:1</sub>	30.91	31.62	31.32	31.75	32.34	33.85	30.77	35.30	30.28	30.14	30.07	31.78
C <sub>18:2</sub>	54.96	53.66	54.02	53.47	53.30	52.34	54.49	49.98	54.76	54.54	54.57	53.57
C <sub>18:3</sub>	TE	0.37	0.81	0.69	0.73	0.70	0.60	0.59	0.72	0.80	0.80	0.65
C <sub>20:0</sub>	0.39	0.40	0.41	0.41	0.39	0.40	0.40	0.45	0.39	0.37	0.37	0.40
C <sub>20:1</sub>	0.38	0.55	0.23	0.25	0.22	0.25	0.24	0.40	0.21	0.20	0.20	0.35
C <sub>20:2</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
C <sub>22:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
C <sub>22:1</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
C <sub>22:2</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
C <sub>24:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
C <sub>24:1</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE

\* TGK (Tebliğ No:2012/29) yönetmeliğine göre, TE: Tespit edilemeyen sınır ( $\leq 0.05$ )

Teblige uygun örnek

Teblige aykırı örnek veya sınır dışı değer

Yağların saflık kriterleri özellikle de serbest asitlik sayısı ve peroksit değerleri, uygun olmayan depolama süresi ve sıcaklığı ve uygun olmayan ambalaj gibi nedenlerle yüksek çıkabilmektedir (Riviera

zeytinyağı örneklerinden 9. örneğin FFA değeri gibi). Fakat yağların safsızlığı değerlendirilirken sınır dışı değerlere sahip yağların taşıdığı yönündedir. Taşış kelimesi kıymetli bir şeyi kıymetsiz bir şey ile karıştırma anlamına gelmektedir. Temel gıda maddelerinden birisi olan yağlar; taklit ve taşış açısından istismar edilebilecek gıdalar grubunda yer almaktadır. Gıda olarak kullanılan yağlar belirli özelliklere sahip olmalıdır.

Ambalajlı bitkisel yağların denetimleri Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'na yapılmaktadır. Bu denetimlere rağmen, son zamanlarda bu bitkisel yağlarda yapılan hile, taklit ve taşış faaliyetlerinin arttığı gözlenmektedir (Anonim, 2016). Geçmişte Roma İmparatorluğunda sızma zeytinyağı gibi pahalı yağların farklı yağlarla karıştırıldığı bilinmektedir (Jamwal ve ark., 2021).

**Çizelge 4.** Mısır yağlarının sterol içerikleri

Örnek	$\beta$ -Sito sterol	$\Delta$ -5-Avena sterol	$\Delta$ -7-Avena sterol	$\Delta$ -7-Stigma stenol	Stigma sterol	Kampa sterol	Brassika sterol	Kolesterol
1	66.22	3.82	1.82	0.72	7.21	20.18	TE	TE
2	66.22	4.33	2.54	0.3	7.53	19.05	TE	TE
3	66.18	3.11	2.66	0.35	6.81	20.86	TE	TE
4	66.41	3.74	1.69	0.82	7.54	19.78	TE	TE
5	62.73	4.83	0.98	2.78	7.18	21.46	TE	TE
6	65.29	3.20	0.49	1.47	7.00	22.52	TE	TE
7	65.09	3.46	2.01	2.09	7.82	19.5	TE	TE
8	66.25	4.48	0.98	1.52	6.78	19.96	TE	TE
9	66.16	5.44	1.85	1.17	6.98	18.37	TE	TE
10	65.51	5.02	2.00	1.27	7.20	18.96	TE	TE
11	63.67	3.81	0.30	4.20	TE	20.56	TE	TE
12	66.40	2.89	0.37	0.65	7.58	22.08	TE	TE
13	66.50	2.16	0.73	0.91	7.15	22.15	0.37	TE
14	65.34	2.22	1.28	2.48	7.99	20.42	TE	0.23
15	63.63	2.42	2.02	3.01	7.92	20.85	TE	0.11
16	66.40	2.78	1.12	0.89	7.94	20.50	0.11	0.18
17	66.21	4.18	1.99	1.71	7.49	18.23	TE	0.16
18	62.06	4.06	2.53	2.43	5.91	22.99	TE	TE
19	66.49	3.51	1.05	1.02	7.60	20.15	TE	0.15
20	66.42	3.31	2.10	0.86	7.45	19.83	TE	TE
21	66.32	3.02	2.36	0.41	7.12	20.74	TE	TE
22	66.40	2.25	0.72	0.70	7.83	21.85	TE	0.19
23	66.36	2.67	2.65	0.37	6.73	21.18	TE	TE
24	64.97	4.57	2.59	0.62	7.06	20.16	TE	TE
Sınır*	54.8-66.6	1.5-8.2	0.3-2.7	0.2-4.2	4.3-8.0	16-24.1	TE-0.2	TE-0.6

\* TGK (Tebliğ No:2012/29) yönetmeliğine göre, TE: Tespit edilemedi

Tebliğe uygun örnek

Tebliğe aykırı örnek veya sınır dışı değer

Günümüzde de birçok ülkede benzer bir durumun var olduğu rapor edilmiş ve yemeklik yağların büyük oranda serbest halde satıldığı gelişmekte olan ve az gelişmiş ülkelerde ciddi bir endişe haline geldiği bildirilmiştir (Muthukumar ve ark., 2021). Iqbal (2009), farklı ülkelerde fiyatı yüksek yağların taşış yapıldığını rapor etmektedir. Örneğin; Hindistan'da fiyatı yüksek olan rafine ayçiçek yağının ucuz yağlar ile taşış yapıldığı ifade edilmektedir. Pakistan'da kullanılan yemeklik yağlar (mısır, ayçiçek, kanola ve soya gibi) başka bir örnektir. Mısır ve Ayçiçek yağlarının fiyatları uluslararası pazardan daha pahalı olduğundan bu yağlara kanola, soya ve pamuk yağı katılmaktadır (Muthukumar ve ark., 2021). Yemeklik yağların dışında bitkisel kökenli özellikle de baharat bitkilerinden üretilen yağların saflıkları önemli bir sorun haline gelmiştir. Kimyasal, farmasötik, gıda endüstrilerinde ve diğer alanlarda uygulama potansiyeli yüksek olan kişniş yağının ve diğer yağlarda; Hint leylağı (Elzey ve ark., 2016), avokado (Rohman ve ark., 2016), sandal ağacı (Kuriakose, 2010), kabak çekirdeği (Van Hoed ve ark., 2017) ve kuşburnu (De Santana ve ark., 2016) gibi daha yüksek bir kâr marjı elde etmek için taşış edildiği bildirilmektedir (Kaufmann ve ark., 2022). Çin'in bir bölgesinde üretilen keten tohum yağları için de



yüksek oranda taşış yapıldığı Wang ve ark., (2021) tarafından rapor edilmektedir. Bitkisel yağ taşışlarının belirlenmesi yanında son zamanlarda taşış belirleme teknikleri üzerine birçok çalışma mevcuttur. Kamelya yağına kolza, Ayçiçek veya mısır yağlarının katılması (Du ve ark., 2021), kişniş yağında taşışın portatif NIR spektrofometre ile belirlenmesi (Kaufmann ve ark., 2022), Zeytinyağlarına karıştırılan bitkisel yağların içeriğini belirlemek için kemometrikle desteklenmiş 1H-NMR parmak izine dayalı analitik strateji geliştirilmesi (Alonso-Salces ve ark., 2022) ve yenilebilir yağlar için iki boyutlu korelasyon spektroskopisi ve evrişimli sinir ağları kullanılarak coğrafi ayırım ve taşış analizi (Liu ve ark., 2021) bu çalışmalara örnektir.

**Çizelge 5.** Riviera zeytinyağlarının % yağ asit dağılımları

Yağ asidi		Örnek											Sınır*
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Miristik	C <sub>14:0</sub>	0.01	0.02	0.02	0.02	0.10	0.58	0.58	0.06	0.11	TE	TE	≤0.3
Palmitik	C <sub>16:0</sub>	11.76	11.61	12.38	12.51	6.78	21.49	21.50	4.82	11.07	12.40	13.00	7.5-20
Palmitoleik	C <sub>16:1</sub>	1.04	0.64	0.76	0.78	0.21	0.48	0.48	0.21	0.50	0.80	0.70	0.3-3.5
Heptadekanoik	C <sub>17:0</sub>	0.08	0.09	0.14	0.13	0.05	0.08	0.08	0.05	0.05	0.10	TE	≤0.4
Heptadesenoik	C <sub>17:1</sub>	0.13	0.14	0.21	0.20	0.09	0.04	0.09	0.12	0.08	0.10	TE	≤0.6
Stearik	C <sub>18:0</sub>	3.29	2.78	3.27	3.16	2.57	2.74	2.76	1.83	2.72	3.00	3.00	0.5-5
Oleik	C <sub>18:1</sub>	73.92	74.10	72.81	73.01	45.46	15.97	16.03	60.67	53.70	73.00	73.00	55-83
Linoleik	C <sub>18:2</sub>	8.05	9.05	8.72	8.50	39.16	57.82	57.72	22.35	27.57	10.00	10.00	2.5-21
Linolenik	C <sub>18:3</sub>	0.75	0.66	0.64	0.65	3.75	0.26	0.27	7.60	2.70	0.60	0.60	≤1
Araşidik	C <sub>20:4n-6</sub>	0.46	0.47	0.52	0.51	0.42	0.25	0.25	0.58	0.47	0.40	0.50	≤0.6
Eikosenoik	C <sub>20:1</sub>	0.29	0.34	0.31	0.32	0.68	0.07	0.07	12.27	0.65	0.30	0.30	≤0.5
Behenik	C <sub>22:0</sub>	0.13	0.14	0.14	0.14	0.52	0.12	0.12	0.32	0.25	TE	TE	≤0.2
Lignoserik	C <sub>24:0</sub>	0.06	0.07	0.07	0.07	0.19	0.08	0.08	0.13	0.11	0.10	TE	≤0.2
		12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
	C <sub>14:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	0.02	0.02	0.02	0.02	0.25	0.23	
	C <sub>16:0</sub>	13.00	13.00	14.00	11.96	15.10	12.03	12.15	13.15	11.79	11.77	11.69	
	C <sub>16:1</sub>	0.80	1.00	1.00	0.45	TE	0.78	0.80	0.90	0.66	0.44	0.42	
	C <sub>17:0</sub>	TE	0.30	TE	TE	TE	0.11	0.12	0.13	0.12	0.07	0.07	
	C <sub>17:1</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	0.18	0.20	0.20	0.17	0.11	0.11	
	C <sub>18:0</sub>	3.00	3.00	3.00	2.58	0.30	3.09	2.96	3.15	3.12	2.29	2.34	
	C <sub>18:1</sub>	72.00	73.00	72.00	71.08	74.09	72.19	73.26	71.57	71.70	48.30	48.86	
	C <sub>18:2</sub>	10.00	8.40	10.00	11.23	7.75	9.94	8.86	9.25	10.46	31.36	31.07	
	C <sub>18:3</sub>	0.60	0.60	1.00	0.20	0.64	0.65	0.66	0.63	0.76	3.70	3.67	
	C <sub>20:4n-6</sub>	0.40	0.40	TE	TE	TE	0.48	0.46	0.49	0.52	0.44	0.45	
	C <sub>20:1</sub>	0.40	0.30	TE	TE	TE	0.31	0.31	0.30	0.35	0.67	0.68	
	C <sub>22:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	0.14	0.13	0.14	0.20	0.27	0.28	
	C <sub>24:0</sub>	TE	TE	TE	TE	TE	0.07	0.06	0.08	0.10	0.12	0.13	

\* TGK (Tebliğ No: 2017/26) yönetmeliğine göre, TE: Tespit edilemeyen sınır (≤0.05)

Teblığe uygun örnek

Teblığe aykırı örnek veya sınır dışı değer

Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, gıda ile ilgili yaptığı analizler ve kontroller sonucunda sahip olduğu bilgileri, 5996 Sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu'nun 31 inci maddesinin 6'ncı fıkrası uyarınca 15.09.2020 tarihinde kamuoyunun bilgisine sunmuştur. Taklit ve taşışlı ürünler arasında farklı firmalara ait 27 tane bitkisel yağ -bunların 4 tanesinin riviera zeytinyağı ve bir tanesinin Ayçiçek yağı- olduğunu ifşa etmiştir (Anonim, 2020). Yalım-Kaya ve Yayla (2020), Bakanlıkça kamuoyuna sunulan, 2016- 2020 yılları arasındaki taklit ve taşış gıda listesi verilerini betimsel analiz yöntemiyle incelemişlerdir. Bu yıllarda gıda ürünlerinden (2112 adet) en fazla taklit ve taşış bitkisel yağlarda (625 adet) yapıldığını belirlemişlerdir. Mısır, ayçiçek ve zeytinyağı gibi bitkisel yağların taşışının yanında kıymetli hayvansal yağlarda da taşış söz konusudur. Karagözlü ve Yılmaz (2020), İzmir piyasasında satışa sunulan tereyağların %20'sinde taşış yapıldığını tespit etmişlerdir.

Çizelge 6. Riviera zeytinyağlarının sterol içerikleri

Örnek	$\beta$ -sterol	$\Delta$ -7-Stigma stenol	Stigma sterol	Kampa sterol	Brassika sterol	Kolesterol	Eritroidol + Uvaol
1	95.97	0.32	1.25	2.46	TE	TE	TE
2	95.66	0.33	1.21	2.80	TE	TE	TE
3	95.58	0.41	1.48	2.53	TE	TE	TE
4	95.72	0.44	0.93	2.91	TE	TE	TE
5	62.04	0.48	2.40	28.50	6.58	TE	TE
6	90.19	0.46	1.63	7.72	TE	TE	TE
7	90.37	0.27	1.44	7.92	TE	TE	TE
8	58.11	0.34	31.95	9.60	TE	TE	TE
9	73.54	22.70	4.14	19.61	TE	TE	TE
10	88.00	1.00	2.00	6.30	0.80	TE	0.7
11	94.00	0.6	1.6	2.5	TE	TE	1
12	94.00	TE	1.80	3.60	TE	TE	TE
13	95.00	TE	1.90	2.50	TE	TE	TE
14	93.00	TE	1.80	3.40	TE	TE	2.1
15	94.32	0.12	0.88	2.66	TE	TE	2
16	93.14	0.47	1.33	2.66	TE	TE	2.37
17	95.46	0.50	1.36	2.69	TE	TE	TE
18	95.16	0.41	1.69	2.74	TE	TE	TE
19	95.78	TE	1.62	2.60	TE	TE	TE
20	95.69	0.28	1.19	2.60	0.09	0.14	TE
21	68.23	0.45	1.02	23.54	6.75	TE	TE
22	66.47	0.37	1.10	24.95	7.12	TE	TE
Sınır*	>93	$\leq 0.5$	<kampasterol	$\leq 4$	$\leq 0.1$	$\leq 0.5$	0-4.5

\* TGK (Tebliğ No: 2017/26) yönetmeliğine göre, TE: Tespit edilemedi

Tebliğe uygun örnek

Tebliğe aykırı örnek veya sınır dışı değer

Çizelge 7. Riviera zeytinyağlarının ECN 42 farkı, FFA, PV, Trans yağ asitleri ve özgül soğurma değerleri

Örnek	ECN 42 farkı	FFA	PV	Trans yağ asitleri		Özgül soğurma	
				$C_{18:1r}$	$C_{18:2r}+C_{18:3r}$	$\lambda_{270}$	$\Delta E$
1	0.11	0.58	4.89	TE	0.04	0.17	0.007
2	0.13	0.39	3.50	0.03	0.08	0.57	0.044
3	0.05	0.30	4.90	0.03	0.09	0.62	0.054
4	0.08	0.70	3.60	0.01	0.03	0.17	0.008
5	4.18	0.10	4.20	0.02	0.28	1.53	0.14
6	3.09	0.10	1.90	0.01	0.06	1.41	0.16
7	2.58	0.10	2.60	0.02	0.09	1.40	0.16
8	1.89	0.10	2.90	0.03	1.67	0.82	0.007
9	6.56	2.09	13.05	0.02	0.21	1.22	0.11
10	TE	0.90	9.35	TE	TE	0.85	TE
11	TE	0.90	9.65	TE	TE	0.90	TE
12	TE	0.90	9.35	TE	TE	0.80	TE
13	TE	0.80	9.45	TE	TE	0.20	TE
14	TE	0.8	9.45	TE	TE	0.80	TE
15	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
16	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
17	0.05	0.30	1.80	0.08	0.14	0.85	0.08
18	0.01	0.20	2.80	0.01	0.09	0.71	0.07
19	0.16	0.4	3.10	0.02	0.10	0.64	0.09
20	0.21	0.34	7.20	0.09	0.21	1.20	0.10
21	6.48	0.1	8.50	0.02	0.30	1.57	TE
22	5.84	0.30	3.30	0.03	0.38	1.53	0.12
Sınır*	$\leq 0.3$	$\leq 1$	$\leq 15$	$\leq 0.2$	$\leq 0.3$	$\leq 1.15$	$\leq 0.15$

\* TGK (Tebliğ No: 2017/26) yönetmeliğine göre, TE: Tespit edilemedi

Tebliğe uygun örnek

Tebliğe aykırı örnek veya sınır dışı değer

## SONUÇ

Bu çalışmada piyasaya sunulan üç farklı yemeklik bitkisel yağ (ayçiçek yağı, riviera zeytinyağı ve mısır yağı) çeşidinin gıda güvenirliliği açısından kalite ve sıfık kriterleri araştırılmıştır. Piyasadan rastgele seçilen örneklerin en az bir kalite ve/veya sıfık kriterlerinin Türk Gıda Kodeksine uygunluklarının tatmin edici düzeyde olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu üç yağ çeşidi içerisinde en yüksek sıfızlık %50 ile riviera zeytinyağlarında, ikinci sırada % 46.8 ile mısır yağlarında ve en düşük %25 sıfızlıkla ayçiçek yağlarında görülmüştür. Piyasa değeri düşük olan pamuk veya kolza gibi bitkisel yağların zeytinyağı gibi değerli yağlarla karıştırılması tüketiciyi aldatma işlemidir. Satışından daha fazla kazanç elde etmek için yaptığı bu tağışın tüketicinin görsel veya duyusal olarak algılaması -aşırı bir tağış olmadıkça- oldukça zordur. Roma İmparatorluğundan günümüze kadar geçen sürede gıdalara yapılan tağışın varlığı düşünülürse, sorunun büyüklüğü ortaya çıkmaktadır. Birçok ülkede benzer durumların olması; üreticilerin, pazarlama elemanlarının ve tüketicilerin daha fazla bilinçlendirilmesi, sürekli kontrollerin yapılması ve hijyenik koşulların korunmasında daha duyarlı olunmasına işaret etmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu projeye (Proje No: 2014/4-5 M) desteklerinden dolayı Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimine teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- Ağır M, Boran C, Özden F, Artukoğlu M, 2018. Zeytinyağında Tüketici Tercihleri Üzerine Bir Araştırma: İzmir İli Dikili İlçesi Örneği. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 55(4): 81-90.
- Alonso-Salces R M, Berrueta L Á, Quintanilla-Casas B, Vichi S, Tres A, Collado M I, Gallo B, 2022. Stepwise Strategy Based on 1H-NMR Fingerprinting in Combination with Chemometrics to Determine the Content of Vegetable Oils in Olive Oil Mixtures. Food Chemistry, 366, 130588.
- Anonim, 2010. Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Pirina Yağı Numune Alma ve Analiz Metotları Tebliği (Tebliğ No: 2010/36).
- Anonim, 2012. Türk Gıda Kodeksi Bitki Adı ile anılan Yağlar Tebliği. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 12.04.2012 tarih ve 28262 sayılı Resmî Gazete, Ankara.
- Anonim, 2014. Münferit ve toplam sterol muhteviyatının tayini-Gaz kromatografik yöntem-Bölüm 1: Hayvansal ve bitkisel katı ve sıvı yağlar. Türk Standartları Enstitüsü, TS EN ISO 12228-1.
- Anonim, 2015. Hayvansal ve bitkisel katı ve sıvı yağlar- Yağ asitleri metil esterlerinin gaz kromatografisi -Bölüm 4: Kapiler gaz kromatografisi ile tayin. Türk Standartları Enstitüsü, TS EN ISO 12966-4.
- Anonim, 2016. Bursa Sanayicileri ve İş Adamları Derneği, “Yağlarda Taklit ve Tağış” paneli, [https://www.busiad.org.tr/haber\\_/yaglarda-taklit-ve-tagis-paneli-sektor-paydaslarini-bir-araya-getirdi-494.html](https://www.busiad.org.tr/haber_/yaglarda-taklit-ve-tagis-paneli-sektor-paydaslarini-bir-araya-getirdi-494.html) (Erişim Tarihi: 15.10.2021).
- Anonim, 2017. Türk Gıda Kodeksi “Zeytinyağı ve Pirina Yağı” Tebliği (Tebliğ No: 2017/26)
- Anonim, 2020. Tarım Orman Bakanlığı, Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara [https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Lists/Duyuru/Attachments/411/Kamuoyu\\_Duyurusu.pdf](https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Lists/Duyuru/Attachments/411/Kamuoyu_Duyurusu.pdf). (Erişim Tarihi: 15.09.2020).
- Ateş J, Velioğlu S. 2005. Kolesterolle Karşı Yeni Silahımız: Bitki Sterolleri. Gıda Mühendisliği Dergisi, 9 (20): 55-58.
- Baydar H, 2000. Bitkilerde Yağ Sentezi, Kalitesi ve Kaliteyi Arttırmada Islahın Önemi. Ekin Dergisi, 11: 50-57.
- Civantos L, 1999. Obtención Del Aceite De Oliva Virgen 2nd Edición, Ed Agricola Española. Madrid. pp. 316-319.

- De Santana FB, Gontijo LC, Mitsutake H, Mazivila SJ, De Souza LM, Borges Neto W, 2016. Non-Destructive Fraud Detection in Rosehip Oil by MIR Spectroscopy and Chemometrics. *Food Chemistry*, 209: 228-233.
- Demirağ O, Konaşkan DB, 2021. Quality Properties, Fatty Acid and Sterol Compositions of East Mediterranean Region Olive Oils. *J Oleo Sci.*,70(1): 51-58.
- Du Q, Zhu M, Shi T, Luo X, Gan B, Tang L, Chen Y, 2021. Adulteration Detection of Corn Oil, Rapeseed Oil and Sunflower Oil in Camellia Oil by in Situ Diffuse Reflectance Near-Infrared Spectroscopy and Chemometrics. *Food Control*, 121, 107577.
- Elzey B, Pollard D, Fakayode SO, 2016. Determination of Adulterated Neem and Flaxseed Oil Compositions by FTIR Spectroscopy and Multivariate Regression Analysis. *Food Control*, 68: 303-309.
- Gül V, Öztürk E, Polat T, 2016. Günümüz Türkiye’inde Bitkisel Yağ Açığını Kapatmada Ayçiçeğinin Önemi. *Alinteri Journal of Agriculture Science*, 30(1): 70-76.
- Gündüz O, Esengün K, 2010. Ailelerin Bitkisel Yağ Tüketimleri Üzerine Bir Araştırma. *Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Sosyal ve Ekonomik Araştırmalar Dergisi*, 2: 67-72.
- Iqbal Z, 2009. Determination of Fatty Acid Compositional Fingerprints of Different Vegetable Oils and Their Effectiveness for Adulteration Detection in Commercial Oils. *Int. J. Biol. Biotech.*, 6(3): 157-161.
- Jamwal R, Kumari S, Sharma S, Kelly S, Cannavan A, Singh DK, 2021. Recent Trends in The Use of FTIR Spectroscopy Integrated with Chemometrics for The Detection of Edible Oil Adulteration. *Vibrational Spectroscopy*, 113, 103222.
- Karagözlü C, Yılmaz AÖ, 2020. İzmir Piyasasında Satışa Sunulan Tereyağı ve Peynir Örneklerinin  $\beta$ -Sitosterol İçeriklerinin Tespiti ile Tağşiş Belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 57(2): 257-266.
- Kaufmann KC, Sampaio KA, García-Martín JF, Barbin DF, 2022. Identification of Coriander Oil Adulteration Using A Portable NIR Spectrometer. *Food Control*, 132, 108536.
- Kayahan M, Tekin A, 2006. Zeytinyağı Üretim Teknolojisi. TMMOB Gıda Mühendisleri Odası, Kitaplar Serisi:11, Ankara-Türkiye.
- Kolsarıcı Ö, Kaya MD, Göksoy AT, Arıoğlu H, Kulan EG, Day S, 2015. Yağlı Tohumlu Bitkiler Üretiminde Yeni Arayışlar. Türkiye Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi (Bildiriler Kitabı-1), 12-16 Ocak 2015, Ankara, s. 401-425.
- Kuriakose S, Thankappan X, Joe H, Venkataraman V, 2010. Detection and Quantification of Adulteration in Sandalwood Oil Through Near Infrared Spectroscopy. *Analyst*, 135(10): 2676-2681.
- Liu Y, Yao L, Xia Z, Gao Y, Gong Z, 2021. Geographical Discrimination and Adulteration Analysis for Edible Oils Using Two-Dimensional Correlation Spectroscopy and Convolutional Neural Networks (CNNs). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 246, 118973.
- Muthukumar R, Kapoor A, Balasubramanian S, Vaishampayan V, Gabhane M, 2021. Detection Of Adulteration in Sunflower Oil Using Paper-Based Microfluidic Lab-On-A-Chip Devices. *Materials Today: Proceedings*, 34: 496-501.
- Onat B, Arıoğlu H, Güllüoğlu L, Kurt C, Bakal H, 2017. Dünya ve Türkiye’de Yağlı Tohum ve Ham Yağ Üretimine Bir Bakış. *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*, 20: 149-153.
- Özer D, Unakıtan G, Abdikoğlu Dİ, 2021. Tekirdağ İlinde Tüketicilerin Bitkisel Yağ Tercihlerinin Belirlenmesi. *Balkan ve Yakın Doğu Sosyal Bilimler Dergisi*, 7 (Special Issue): 71-77.

- Rohman A, Windarsih A, Riyanto S, Sudjadi Ahmad SAS, Rosman AS, Yusoff FM, 2016. Fourier Transform Infrared Spectroscopy Combined with Multivariate Calibrations for The Authentication of Avocado Oil. *Int. J. Food Properties*, 19(3): 680-687.
- Taşkaya Top, B., Uçum İ. 2012. "Türkiye'de Bitkisel Yağ Açığı", TEPGE BAKIŞ, Sayı:14, Nüsha: 2, Ankara.
- Tosun M, 2003. Bitkisel Sıvı Yağlar Sektör Araştırması. Türkiye Kalkınma Bankası A.Ş., Araştırma Müdürlüğü, Ankara.
- Van Hoed V, Sampaio KA, Felkner B, Bavec F, Scippo ML, Brose F, 2017. Tocopherols and Polyphenols in Pumpkin Seed Oil Are Moderately Affected by Industrially Relevant Roasting Conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(12): 1-9.
- Wang X, Han Y, Li Y, Wang S, Wang J, 2021. Detection of Qinghai-Tibet Plateau Flaxseed Oil Adulteration Based on Fatty Acid Profiles and Chemometrics. *Food Control*, 108332.
- Yalın Kaya S, Yayla F, 2020. Resmi Verilere Göre Türkiye'de Taklit ve Tağşiş Yapılan Yiyecek ve İçecekler. *J. Tourism and Gastronomy Studies*, 8(4): 3108-3128.
- Yıldırım GH, Öner F, 2020. Mısır Danesinin Fiziksel ve Besinsel Yapısı. *Harman Dergisi* 97: 2-7.
- Yorulmaz A, 2009. Türk Zeytinyağlarının Fenolik, Sterol ve Trigliserit Yapılarının Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi (Basılmış).

**Atıf İçin:** Olcay N, Demir MK, 2022. Yalancı Tahıllarda Çimlendirme Prosesinin Etkileri. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 252-265.

**To Cite:** Olcay N, Demir MK, 2022. Effects of Germination Process on Pseudocereals. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 252-265.

## Yalancı Tahıllarda Çimlendirme Prosesinin Etkileri

Nezahat OLCAY<sup>1\*</sup>, Mustafa Kürşat DEMİR<sup>1</sup>

**ÖZET:** Dünyada en çok görülen gıda alerjilerinden birisi olan çölyak, hasta bireylerde önerilen miktarlardan daha az B vitamini, demir, kalsiyum ve lif gibi besin öğelerinin emilimine, dolayısıyla besin eksikliğine bağlı komplikasyonların oluşmasına neden olmaktadır. Çölyak hastaları için yüksek besin değerine sahip yeni gıda formülasyonlarının oluşturulmasında, zenginleştirmenin yanı sıra, kinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), amarant (*Amaranthus* sp.) ve karabuğday (*Fagopyrum* sp.) gibi yalancı tahılların kullanımı da giderek artmaktadır. Çimlendirme, yenilebilir tohumların besleme kalitesini iyileştiren basit bir proses olarak görülmektedir. Dolayısıyla glutensiz gıdaların besin değerinin artırılmasındaki bir diğer yaklaşım ise formülasyonda kullanılacak yalancı tahıllara çimlendirme prosesi uygulamaktır. Bu çalışmada, yalancı tahıllardan kinoa, amarant ve karabuğdayın çimlendirilmesi ile besin içeriklerinde gerçekleşen değişimler hakkında yapılan çalışmalar derlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Çimlendirme, yalancı tahıllar, kinoa, karabuğday, amarant

## Effects of Germination Process on Pseudocereals

**ABSTRACT:** Celiac disease, is one of the most common food allergies in the world, causes malnutrition of vitamin B, iron, calcium and fiber below the recommended amounts in patients, thus causing complications due to nutrient deficiency. In addition to enrichment, the usage of pseudocereals such as quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), amaranth (*Amaranthus* sp.) and buckwheat (*Fagopyrum* sp.) has an increasing trend in the improvement of new food formulations with high nutritional value for celiac patients. Germination is seen as a simple process that improves the nutritional quality of edible seeds. Therefore, another approach to increase the nutritional value of gluten-free foods is to apply the germination process to pseudocereals that can be used in the formulation. In this study, studies researching the changes in nutrient content with the germination of quinoa, amaranth and buckwheat from pseudocereals were compiled.

**Keywords:** Germination, pseudocereals, quinoa, buckwheat, amaranth

<sup>1</sup>Nezahat OLCAY ([Orcid ID: 0000-0003-3302-8969](https://orcid.org/0000-0003-3302-8969)), Mustafa Kürşat DEMİR ([Orcid ID: 0000-0002-4706-4170](https://orcid.org/0000-0002-4706-4170)), Necmettin Erbakan Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Konya, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Nezahat OLCAY, e-mail: olcaynezahat@gmail.com

## GİRİŞ

Dünya genelinde yetişkinlerin %2'sinde, çocukların ise %5'inde gıda alerjisi bulunmaktadır. Bu yüzde, nüfus bazında değerlendirildiğinde yalnızca Avrupa ve Amerika'da 20 milyon insanın gıda alerjisine sahip olduğu görülmektedir. Alerjen özellik gösteren 70'ten fazla gıda olduğu bilinmektedir (Jedrychowski, 2010; Omary ve ark., 2012).

Çölyak hastalığı, dünyada en çok görülen gıda alerjilerinden birisidir. Çölyak, genetik olarak duyarlı bireylerde gluten içeren tahılların tüketilmesi ile tetiklenen bir otoimmün enteropatidir. Çölyak hastalarında gluten tüketimi, sürekli mukozal hasara neden olmakta ve ancak glutenin diyetten tamamen çıkarılması ile tam mukozal iyileşme gözlenmektedir (Fasano ve Catassi, 2001; Alvarez-Jubete ve ark., 2009). Çölyak hastalarında bağırsaktaki mukozal hasarın bir sonucu olarak, besinlerin kötü emilimi, sindirim bozukluğunun neden olduğu gastrointestinal semptomlar ve yetersiz beslenmeye bağlı hastalıklar yaygın olarak gözlenmektedir (See ve Murray, 2006; Alvarez-Jubete ve ark., 2009). Bunun yanı sıra, çölyak hastalığına bağlı olarak hasta bireylerde, anemi, bağırsak bozuklukları veya osteoporoz gibi birçok farklı semptom görülebilmektedir (McGough ve Cummings, 2005; Alvarez-Jubete ve ark., 2009). Glutensiz bir diyet ile çölyak hastalarında semptomatik ve histolojik iyileşmeler görülebilmektedir. Ayrıca glutensiz bir beslenmenin; besin eksikliği, kemik hastalığı ve lenfoma gibi komplikasyon risklerinde de azalmaya neden olacağı bildirilmiştir (See ve Murray, 2006; Alvarez-Jubete ve ark., 2009).

Hallert ve ark. (2002), glutensiz diyetle beslenen çölyak hastalarında, uygulanan diyetle ilgili olarak hastaların yarısının vitamin eksikliği belirtileri gösterdiğini gözlemlemiştir. Başka bir çalışma çölyak hastalarının sağlıklı bireylere kıyasla oldukça düşük kiloya ve vücut kitle indeksine sahip olduğu görülmüş, ileri yaştaki çölyak hastası kadınlarda kemik dokusunda mineral içeriğinin de daha düşük olduğu bildirilmiştir. Ayrıca çölyak hastalarının uyguladıkları diyetle enerji alımının çoğunun karbonhidratlar yerine yağlardan sağlandığı, bu nedenle glutensiz beslenmenin dengesiz olduğu bildirilmiştir (Ciacci ve ark., 2002). Thompson (2000), glutensiz ürünlerin beslenme kalitesini değerlendirdiği bir çalışmada, bu ürünlerin çoğunun buğday içeren ürünlere kıyasla daha düşük tiamin, riboflavin, niasin, folat ve demir içeriğine sahip olduğunu bildirmiştir. Mariani ve ark. (1998), glutensiz diyetle beslenen çocukların günlük diyetlerinde daha fazla protein ve yağ tükettiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Bardella ve ark. (2000), yetişkin çölyak hastalarının günlük enerji ihtiyacının çoğunluğunu yağ tabiatındaki gıdalardan karşıladığını buna karşın karbonhidrat bazlı beslenmenin oldukça düşük olduğunu bildirmişlerdir. Hopman ve ark. (2006), çölyak hastalarının lif ve demir alımının oldukça düşük, doymuş yağ alımının ise yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Dolayısıyla çölyak hastalarının diyetlerinde besin takviyesinin gerekli olduğuna dikkat çekilmiştir.

## Yalancı Tahıllar

Glutensiz diyetler gluten içermeyen amarant, karabuğday ve kinoa gibi yalancı tahıllar kullanılarak üretilen gıdalarla çeşitlendirilebilir (Dykes ve Rooney, 2007; Smeds ve ark., 2007; Gorinstein ve ark., 2008; Omary ve ark., 2012). Monokotiledon olan buğday, pirinç, arpa gibi çoğu tahılın aksine dikotiledon bitkiler olan amarant, kinoa ve karabuğday botanikte "yalancı tahıllar veya tahıl benzeri" olarak bilinmektedir. Bu tanelerin fonksiyonları ve bileşimleri gerçek tahıllara benzediği için yalancı tahıl olarak isimlendirilmektedirler. Yalancı tahıllar arasındaki en önemli türler kinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), amarant (*Amaranthus* sp.) ve karabuğdaydır (*Fagopyrum* sp.). Kinoa ve amarant, Güney Amerika'daki And bölgesine özgü Chenopodiaceae familyasına aittir. Orta ve Batı Çin'e özgü, Polygonaceae familyasına ait karabuğdayın ise *F. sculentum* (yaygın karabuğday), *F. tataricum* (tartar

karabuğday) ve *F. cymosum* (uzun karabuğday) olmak üzere 3 yaygın türü bulunmaktadır (Martínez-Villaluenga ve ark., 2020).

Amarant ve kinoa tanelerindeki dairesel şekilli embriyo veya ruşeym, nişastaca zengin perispermi çevrelemekte ve tohum kabuğu ile birlikte yağ ve protein açısından nispeten daha zengin olan kepek fraksiyonunu oluşturmaktadır (Taylor ve Parker, 2002; Bressani, 2003; Alvarez-Jubete ve ark., 2009). Amarant ve kinoa kepek fraksiyonunun (tohum kabuğu ve embriyo) oranı, mısır ve buğday gibi tahıllara kıyasla daha yüksek olduğundan, protein ve yağ içerikleri de daha fazladır (Bressani, 2003; Alvarez-Jubete ve ark., 2009). Karabuğday tohumlarında ise nişasta endospermde depolanmakta ve iki kotiledonlu embriyo, nişastalı endosperm boyunca uzanmaktadır (Mazza ve Oomah, 2003; Alvarez-Jubete ve ark., 2009). Yalancı tahılların ve buğdayın bazı besinsel içerikleri Çizelge 1'de karşılaştırılmıştır.

**Çizelge 1.** Yalancı tahıllar ve buğdayın kimyasal bileşimi (Alvarez-Jubete ve ark., 2009)

	Amarant	Kinoa	Karabuğday	Buğday
Protein (%)	16.5	14.5	12.5	12.0
Yağ (%)	5.7	5.2	2.1	2.5
Toplam nişasta (%)	61.4	64.2	58.9	63.0
Diyet lif (%)	20.6	14.2	29.5	17.4
Kül (%)	2.8	2.7	2.1	1.5
Kalsiyum (mg 100 g <sup>-1</sup> )	180.1	32.9	60.9	34.8
Magnezyum (mg 100 g <sup>-1</sup> )	279.2	206.8	203.4	96.4
Çinko (mg 100 g <sup>-1</sup> )	1.6	1.8	1.0	1.2
Demir (mg 100 g <sup>-1</sup> )	9.2	5.5	4.7	3.3

Glutensiz diyetler, ürünlere besin ögesi, mikrobesein ögesi, fitokimyasal madde ve lif içeriği yüksek gıdaların eklenmesiyle zenginleştirilebilmektedir. Zenginleştirmedeki bir diğer yaklaşım ise glutensiz diyetlerde çimlendirilmiş yalancı tahılların kullanımınıdır. Literatürde, çimlendirme ile tanede besin içeriğinin, toplam polifenolik madde içeriğinin ve antioksidan aktivitenin iyileştiği, antibesinsel faktörlerin ise azaldığı bildirilmiştir. Çimlendirmenin önemli bir avantajı ise yenilebilir tohumların beslenme kalitesini iyileştirmede kullanılacak, karmaşık ekipman gerektirmeyen basit bir proses olmasıdır (Omary ve ark., 2012).

Çimlendirme tahıllar ve baklagillerde olduğu gibi yalancı tahılların da besinsel, fonksiyonel ve duyuşal özelliklerini geliştirebilen bir prostestir. Çimlendirme ile örneklerde vitamin (folat), mineral ve lif içerikleri ile glukoz, maltoz, sakkaroz gibi şekerlerin miktarı artırılabilir. Ayrıca çimlendirme ile tahıl, baklagil ve yalancı tahıl unlarının enzim içerikleri artırılabilir. Çimlendirilmiş örneklerden elde edilecek ürünlerin sindirilebilirliği, dolayısıyla besinsel yararlılıkları da artırılabilir. Tüm bu faydalı etkileri ile çimlendirilen yalancı tahıl unları glutensiz fonksiyonel gıda üretiminde önemli potansiyele sahiptir (Bellaio ve ark., 2013).

## Çimlendirilmiş Yalancı Tahıllar

### Kinoa

Demir ve Bilgiçli (2020)'nin bir çalışmasına göre ham ve çimlendirilmiş kinoa ununa ait bazı özellikler Çizelge 2'de özetlenmiştir. Bu çalışmada çimlenme ile renk parametrelerinde,  $L^*$  ve  $a^*$  değerlerinin arttığı,  $b^*$  değerinin ise azaldığı, bu durumun çimlendirilmiş örneklerde toplam fenolik madde içeriğinin daha yüksek olmasından kaynaklanıyor olabileceği bildirilmiştir. Çimlendirme ile kinoa küllü, ham protein, toplam fenolik madde ve mineral içeriklerinin arttığı, ham yağ ve fitik asit içeriklerinin ise azaldığı tespit edilmiştir. Kül içeriğindeki artışın kuru madde kaybından kaynaklanıyor



olabileceği belirtilmiştir. Fitik asit miktarındaki önemli azalışın nedeninin ise çimlenme ile fitaz aktivitesinde gerçekleşen artış ve bu artışa bağlı olarak fitatların parçalanmasından kaynaklandığı bildirilmiştir. Toplam fenolik madde içeriğindeki artışın muhtemel sebebinin, hücre duvarının parçalanması sonucu serbest formdaki fenolik bileşiklerin miktarında artış olması veya çimlenme sırasında endojen esteraz enzimleri vasıtasıyla yeni fenolik bileşiklerin sentezi olduğu belirtilmiştir. Mineral madde içeriklerindeki artışın da kül içeriğine benzer şekilde kuru madde kaybından kaynaklanıyor olabileceği bildirilmiştir.

**Çizelge 2.** Ham ve çimlendirilmiş kinoa ununun bazı özellikleri (Demir ve Bilgiçli, 2020)

	Ham kinoa unu	Çimlendirilmiş kinoa unu
<i>L</i> *	85.60	86.76
<i>a</i> *	0.90	1.61
<i>b</i> *	13.47	12.77
Kül (%)	2.07	3.12
Ham yağ (%)	4.32	3.98
Ham protein (%)	18.69	25.68
Fitik asit (mg 100g <sup>-1</sup> )	970.97	221.05
Toplam fenolik madde (mg GAE g <sup>-1</sup> )	1.48	3.13
Antioksidan aktivite (%)	35.51	79.26
Ca (mg 100 g <sup>-1</sup> )	46.34	87.24
Fe (mg 100 g <sup>-1</sup> )	3.90	4.56
K (mg 100 g <sup>-1</sup> )	652.40	959.55
Mg (mg 100 g <sup>-1</sup> )	124.47	154.07
P (mg 100 g <sup>-1</sup> )	398.33	516.89
Zn (mg 100 g <sup>-1</sup> )	2.41	3.75

Bhinder ve ark. (2021), çimlendirme uygulanmış kinoa ununda, fenolik bileşik içeriğinin, antioksidan aktivitenin, protein içeriğinin ve indirgen şeker içeriğinin önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir. En yüksek artış çimlenmenin 48. ve 72. saatlerinde gözlenmiştir. 96 saat çimlenen örneklerde ise polifenol ve protein içeriklerinde kayıplar meydana geldiği görülmüştür.

Carciochi ve ark. (2014), 72 saatlik çimlendirme ile kinoa örneklerinin toplam fenolik madde miktarında %101.2'lik, toplam flavonoid miktarında ise %59.6'lık bir artış tespit etmişlerdir. 3 günlük çimlendirme ile toplam fenolik madde miktarının 8.57 kat arttığı, fenolik maddeler arasındaki ana bileşenlerin ise vanilik asit (%51.2) ve ferulik asit (%21.6) olduğu bildirilmiştir. Fenolik maddeler arasında en büyük artış, 21 kat artış gösteren p-kumarik asitte görülmüştür. Toplam flavonoid miktarı ise çimlenme ile 4.4 kat artış gösterirken, başlıca flavonoidin kuersetin (1.36 mg 100 g<sup>-1</sup>) olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen fenolik bileşikler ile DPPH antioksidan aktivite arasında pozitif bir korelasyon bulunmuş, buna paralel olarak 3 gün çimlendirme ile kinoa örneklerinin DPPH antioksidan aktivitesinin 2 kat arttığı tespit edilmiştir.

Suárez-Estrella ve ark. (2020), filizlendirmenin kinoa protein ve nişasta molekülleri üzerine etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, proteaz enzim aktivitesine bağlı olarak protein fraksiyonunda gözlenen değişikliklerin çimlenmenin 48. saatinden sonra başladığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada proteaz aktivitesiyle bakır ve çinko gibi elementlerin miktarında artış görülmüş, protein yapısındaki değişiklikler sonucu örneklerin köpük stabilitesi iyileşirken, köpük kapasitesi bu değişimlerden olumsuz etkilenmiştir. Filizlenme ile artan amilolitik enzim aktivitesine bağlı olarak ise ısıtma ile nişasta jelaletleşmesinin artış gösterdiği bildirilmiştir.

Darwish ve ark. (2020), bir çalışmalarında çimlendirmenin kinoaadaki etkisini ve kinoa filizlerinin antianemik potansiyelini araştırmışlardır. Çimlendirmeyle kinoa tanelerinde demir, kalsiyum, çinko, C vitamini ve karotenoid içeriklerinin sırasıyla %39, %49, %20, %32 ve %26 oranında artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla beraber antibesinsel faktör olan saponin, fitik asit ve tanen içerikleri sırasıyla %60, %50 ve %11 oranında azalmıştır. Biyolojik analizler sonunda, %10 oranında kinoa filizi içeren yemlerle beslenen demir eksikliği anemisine sahip deneklerin; vücut ve organ ağırlıklarının, serum profillerinin, kan hücresi sayımlarının ve kırmızı kan hücresi indekslerinin, 2 haftalık bir dönemden sonra kontrol grubuyla kıyaslanabilecek kadar iyileştirdiği bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonunda, antioksidan özellikleri, vitamin ve mineral içerikleri, besinsel bileşenlerinin biyoyararlılıkları geliştirilmiş, antibesinsel özellikleri ise azaltılmış kinoa filizlerinin antianemik sağlık potansiyellerine dikkat çekilmiştir.

Ali (2019) bir çalışmada, nikotin enjekte edilen fare deneklerinin lipid profili, karaciğer enzimleri ve böbrek fonksiyonları üzerinde çimlendirilmiş kinoanın koruyucu etkisini araştırmıştır. Bu çalışmada çimlendirilmiş kinoanın kimyasal bileşiminin, besinsel değerini artıran diyet lif, polifenoller ve diğer antioksidan bileşikler açısından iyi bir kaynak olarak kabul edilebileceği belirtilmiştir. %10 oranında çimlendirilmiş kinoa içeren diyetle beslenen deneklerde böbrek ve karaciğer fonksiyonlarının iyileştiği, diyetle kullanılan çimlendirilmiş kinoanın tüm oranlarının (%5, 10 ve 15) ise toplam kolesterol üzerinde azaltıcı bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada çimlendirilmiş kinoanın iç organları nikotinin neden olduğu hasarlardan korumadaki önemine vurgu yapılmıştır. Ayrıca çimlendirilmiş kinoanın fonksiyonel gıdalarda kullanımıyla, kalp hastalığı, hiperkolesterolemik (kolesterol yüksekliği) ve karaciğer hastalıklarına karşı sağlığa faydalı etkileri ortaya konmuştur. Bu çalışmanın sonucunda, çimlendirilmiş kinoanın, zenginleştirilmiş diyetlerde ve besin takviyelerinde kullanımı ile kronik hastalık risk faktörlerinin azaltılabileceği önerilmiştir.

de Oliveira Lopes ve ark. (2019) bir çalışmalarında, filizlenmiş ve fermente edilmiş gıdaların çözünür karbonhidrat konsantrasyonunun azalarak, diyet lif ve dirençli nişasta içeriklerinin artması fikrinden yola çıkarak, filizlenmiş ve fermente edilmiş kinoa örneklerinin fare deneklerinde hipoglisemik etkilerini araştırmışlardır. Uygulanan prosesler ile kinoa örneklerinin basit karbonhidrat içeriklerinin arttığı, buna bağlı olarak da örneklerin glisemik indeksi azaltma yeteneğinin arttığı bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, filizlenmiş ve fermente edilmiş kinoanın, diyabet, obezite ve dislipidemi gibi hastalıkların riskini azaltıcı etki gösterebilecek beslenme açısından önemli bir kaynak olabileceği bildirilmiştir.

### **Amarant**

Çimlendirilmiş amarant ununun bazı özellikleri Çizelge 3'te özetlenmektedir. Çimlendirme sonucu amarant tanelerinin protein içeriği %28.8 oranında artarken, yağ içeriği ise %28.5 oranında azalmıştır. Benzer şekilde çimlenmiş örneklerin esansiyel aminoasit içeriklerinde %6.7-%57.9 oranında artış görülmüştür. Ayrıca çimlendirmenin amarant ununda protein sindirilebilirliğini %11.7 oranında, protein verimliliğini ise %57 oranında artırdığı tespit edilmiştir. Çimlendirme ile örneklerin antioksidan aktivitesi ve fenolik madde içeriklerinde de artış gözlenmiş olup, tüm bu artışlara paralel şekilde örneklerin daha iyi antihipertansif (yüksek tansiyon önleyici) etki gösterdiği bildirilmiştir. Çalışma sonucunda çimlendirilmiş amarant ununun fonksiyonel gıda üretiminde kullanım potansiyelinin olduğu bildirilmiştir.

**Çizelge 3.** Ham ve çimlendirilmiş amarant ununun kimyasal bileşimi<sup>1</sup> (Argüelles-López ve ark., 2018)

	Özellik	Ham amarant unu	Çimlendirilmiş amarant unu
Kimyasal özellikler (%)	Protein	14.22	18.31
	Yağ	7.50	5.36
	Çözünür lif	4.69	3.55
	Çözünmeyen lif	9.74	20.31
	Toplam lif	14.43	23.86
Aminoasit bileşimi (g 100 g <sup>-1</sup> protein)	Histidin	1.96	2.62
	İzolösin	3.81	4.40
	Lösin	6.96	6.98
	Lizin	7.39	7.47
	Metiyonin+sistein	5.28	6.54
	Metiyonin+tirozin	9.94	9.03
	Treonin	4.55	4.91
	Triptofan	0.59	1.13
	Valin	5.49	5.95
Antioksidan aktivite (mikromol TE 100 g <sup>-1</sup> )	Serbest antioksidan içeriği	2.134	11.089
	Bağlı antioksidan içeriği	2.768	10.132
	Toplam	4.902	21.221
Fenolik madde içeriği (mg GAE 100 g <sup>-1</sup> )	Serbest fenolik madde içeriği	11.94	146.0
	Bağlı fenolik madde içeriği	16.11	101.6
	Toplam	28.05	247.6

<sup>1</sup>Sonuçlar kuru madde üzerinden verilmiştir

Guardianelli ve ark. (2019), çimlendirilmiş amarant tanelerinin %50.4 nişasta, %14.6 protein, %5.4 yağ, %10.4 lif, %2.76 kül ve %8.8 nem içeriğine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada çimlendirilmiş ve ham amarant unları %5, 15 ve 25 oranlarında buğday unu ile karıştırılmış ve bu karışımlardan elde edilen unların reolojik özellikleri incelenmiştir. Çimlendirilmiş amarant ununun %25 oranında buğday ununa karıştırılmasıyla elde edilen hamurun diğer örnekler göre nem içeriğinin daha yüksek olduğu, moleküler hareketliliğinin ise daha düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca %25 oranında amarant unu içeren hamur kontrol örneğine kıyasla daha iyi elastiklik ve daha viskoz bir yapı göstermiştir. Bu çalışmanın sonucunda ham ve çimlendirilmiş amarant ununun %25 oranına kadar buğday ununa karıştırılmasıyla, ekmek yapımına uygun reolojik özelliklere sahip bir bileşen elde edilebileceği bildirilmiştir.

Siwatch ve ark. (2019)'nın bir çalışmasına göre ham ve çimlendirilmiş amarantın bazı özellikleri Çizelge 4'te özetlenmiştir. Bu çalışmada çimlendirme ile amarant ununun şişme gücünün, jelatinizasyon entalpisinin ve viskozitesinin azaldığı, çözünabilirliğinin, kırılma viskozitesinin ve çirşlenme sıcaklığının ise arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda çimlenmiş amarant ununun sindirilebilirliğinde artış meydana gelebileceği bildirilmiştir.

Kanensi ve ark. (2013), suda bekletme ve çimlendirme koşullarındaki değişimlerin amarant örneğinin diastatik aktivitesi ve şeker içeriği üzerindeki etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, en yüksek aktivitenin 5 saat suda bekletme (631.4 mg maltoz 10 g<sup>-1</sup>) ve 72 saat çimlendirme (1658.9 mg maltoz 10 g<sup>-1</sup>) ile elde edildiğini bildirmişlerdir. 5 saat suda bekletmenin ardından 24 saat çimlendirme ile en yüksek indirgen şeker içeriği (%13.1) elde edilmiştir. İndirgen olmayan şeker içeriği ise maksimum değere 5 saat suda bekletme ve ardından 72 saat çimlendirme ile (%17.0) ulaşmıştır. Suda

bekletme ve çimlendirme süresindeki artışın amarant tanelerindeki nişasta içeriğini azaltıcı bir etki gösterdiği bildirilmiştir.

Vora ve ark. (2014) bir çalışmalarında, amarant tanelerinde çimlendirme ile protein, karbonhidrat, kalsiyum, demir ve C vitamini içeriğinde bir artış gözlemlendiğini ve çimlenmiş amarantın besinsel içeriğinin buğdaya kıyasla oldukça yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Hem çimlenmiş hem de çimlenmemiş amarant örneklerinin sulu ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliğinin ortaya konduğu bu çalışmada, *Salmonella typhi* gibi şiddetli gastro intestinal sistem patojenlerine karşı dahi efektif bir antimikrobiyal aktivite gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın sonunda, çimlendirmenin amarant tanelerindeki metabolik aktiviteyi artırdığı, besinsel ve duyuşsal özellikleri ise geliştirdiği bildirilmiştir.

**Çizelge 4.** Ham ve çimlendirilmiş amarant ununun bazı özellikleri (Siwath ve ark., 2019)

Özellik		Ham	Çimlendirilmiş
Nem		9.51	9.05
Kül		2.93	2.20
Yağ	(%)	7.33	6.51
Ham lif		2.04	2.19
Protein		15.27	16.19
Amiloz		7.05	5.99
Toplam fenolik içerik		3.96	5.02
Fitat içeriği	(mg g <sup>-1</sup> )	2.91	1.85
Tanen içeriği		0.80	0.51
Su absorpsiyon kapasitesi	(g g <sup>-1</sup> )	2.26	2.73
Yağ absorpsiyon kapasitesi		2.02	2.52
Yığın yoğunluğu	(g ml <sup>-1</sup> )	0.54	0.50

### Karabuğday

Ham ve çimlendirilmiş karabuğdayın bazı özellikleri Çizelge 5'te gösterilmektedir. Yapılan bir çalışmada, çimlendirilmiş tahıllar ve yalancı tahılların,  $\alpha$ -amilaz aktiviteleri sayesinde glukozidaz için iyi bir inhibitör olduğu bildirilmiştir (Donkor ve ark. 2012). Araştırmacılar, ham karabuğday tanelerinin antioksidan aktivitesinin yüksek olduğunu ve çimlendirmeyle bu aktivitenin %50 oranında arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca çimlendirme ile örneklerin arabinoksilan ve aminoasit içerikleri de artış göstermiştir.

Tanwar ve ark. (2019) çimlendirilmiş karabuğday ununun özelliklerini araştırdıkları çalışmalarından elde edilen verilere göre, ham ve çimlendirilmiş karabuğday ununun kimyasal kompozisyonu Çizelge 6'da özetlenmiştir. Bu çalışmada çimlendirme ile örneklerin yığın yoğunluğunda %15.66 oranında bir azalma görülmüştür. Çimlendirilmiş karabuğday ununun emülsiyon aktivitesi ve emülsiyon kapasitesinde sırasıyla %62.79 ve %24.52 oranında bir düşüş tespit edilmiştir. Örneklerin yağ absorpsiyon kapasitesinde, şişme gücünde (%48.07) ve su absorpsiyon kapasitesinde (%25.78) ise önemli bir artış görülmüştür. Ayrıca çimlendirme ile karabuğday ununun toplam fenolik madde içeriği (%26.12) ve antioksidan aktivitesinde önemli bir artış tespit edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda, çimlendirilmiş karabuğday ununun tahıl bazlı beslenmede görülen eksikliklerin giderilmesinde kullanılabilecek bir bileşen olduğu ve hem ekonomik hem de besinsel açıdan üstün özelliklere sahip ürünlerin üretiminde kullanılabileceği bildirilmiştir.

**Çizelge 5.** Ham ve çimlendirilmiş karabuğday ununa ait bazı özellikler (Donkor ve ark. 2012)

Özellik	Ham	Çimlendirilmiş
Kül	1.89	1.91
Protein	12.88	16.93
Yağ (g 100 g <sup>-1</sup> )	4.10	1.93
Nişasta	46.88	62.60
Gallik asit	0.73	nd
Epigallokateşin	14.04	1.41
Kateşin	26.80	13.53
Epikateşin	38.30	9.45
Epigallokateşingallat (µg ml <sup>-1</sup> )	4.03	3.08
p-kumarik asit	13.39	6.63
Ferulik asit	29.34	4.45
Luteolin	17.35	3.96
IP4 <sup>1</sup>	0.63	0.61
IP5 <sup>2</sup> (g 100 g <sup>-1</sup> )	nd	0.05
IP6 <sup>3</sup>	0.04	nd

<sup>1</sup> inositol tetraphosphate, <sup>2</sup> inositol pentaphosphate, <sup>3</sup> inositol hexaphosphate

**Çizelge 6.** Ham ve çimlendirilmiş karabuğdayunun kimyasal bileşimi (Tanwar ve ark., 2019)

	Ham	Çimlendirilmiş
Kül (%)	2.33	1.8
Karbonhidrat (%)	68.39	62.84
Yağ (%)	1.67	1.33
Lif (%)	8.23	7.87
Nem (%)	12.66	14.66
Protein (%)	11	11.5

Morita ve ark. (2013) çalışmalarında, karabuğdayın 5 farklı fraksiyonunun besinsel içeriğini ve çimlendirmenin karabuğdayın besinsel özellikleri üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada, karabuğday tanesinin iç fraksiyonlarından dış fraksiyonlarına doğru protein, yağ ve kül içeriklerinin arttığı ve nem içeriğinin ise azaldığı bildirilmiştir. İç fraksiyonların daha az kalsiyum içerdiği ve tüm fraksiyonların ise potasyum, magnezyum ve fosfor açısından oldukça zengin olduğu tespit edilmiştir. 24 saat çimlendirmenin karabuğdayın fitik asit içeriği üzerine önemli bir etkisi bulunmazken, aminoasit içeriğini önemli ölçüde artırdığı görülmüştür. 24 saat inkübasyon ile karabuğdayın γ-aminobütirik asit (GABA) içeriğinin 2.5 kat arttığı tespit edilmiştir. Karabuğdayın α-amilaz ve proteaz aktivitelerinin çimlenme sürecinde buğdaydan daha aktif olduğu görülmüştür. Karabuğdayın lizin ve triptofan aminoasitlerince oldukça zengin olduğu bilgisinden yola çıkılarak, alerjen protein içeriğinin düşürülmesi amacıyla karabuğdaya çimlendirme işlemi uygulanmıştır. Çimlendirme işleminin, düşük alerjen içeren ya da hiç alerjen içermeyen karabuğday ürünleri eldesinde efektif, uygun ve faydalı bir proses olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada elde edilen veriler doğrultusunda, çimlendirme işleminin, karabuğdayda GABA, mineral, aminoasit ve diğer besin bileşenlerinin içeriklerini artırdığı, karabuğdayın alerjenik özelliklerini azalttığı, gıda ürünlerinde daha iyi tat sağladığı ve böylece karabuğdaya besinsel açıdan değer katarak daha sağlıklı yeni bir gıda alternatifi oluşturduğu sonucuna varılmıştır.

Caterina ve Camelia (2012) bir çalışmalarında, karabuğday tanelerinin toplam fenolik madde içeriğinin 7 günlük çimlendirme sonucunda 50.26 mg 100 g<sup>-1</sup> değerinden 298.03 mg 100 g<sup>-1</sup> değerine yükseldiğini tespit etmişlerdir. Fenolik madde içeriğindeki artışın, hidrolitik enzim aktivitesindeki artışa

bağlı olarak, hücre duvarının parçalanması ve serbest formun açığa çıkmasından kaynaklandığı bildirilmiştir. Flavonoid içeriğindeki değişimin rutin ve kuersetin olarak ifade edildiği bu çalışmada, çimlendirme ile rutin içeriğinin 13.66 mg 100 g<sup>-1</sup>'dan 283.43 mg 100 g<sup>-1</sup>'a, kuersetin içeriğinin ise 4.77 mg 100 g<sup>-1</sup>'dan 223.76 mg 100 g<sup>-1</sup>'a yükseldiği tespit edilmiştir. Ayrıca suda çözünür askorbik asit içermeyen karabuğday tanelerinde, çimlendirme ile askorbik asit içeriğinin doğrusal bir şekilde arttığı ve çimlendirmenin 7. gününde örneklerin en yüksek (1.09 mg 100 g<sup>-1</sup>) askorbik asit içeriğine sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda çimlendirilmiş karabuğday ununun fonksiyonel gıda üretiminde kullanılabilecek bir bileşen olduğu bildirilmiştir.

Hung ve ark. (2020), farklı çimlendirme süresinin karabuğdayın kimyasal kompozisyonu, enzim aktivitesi ve biyoaktif bileşenleri üzerindeki etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, çimlendirme süresi uzadıkça örneklerdeki protein ve yağ içeriklerinin arttığını, kül ve karbonhidrat içeriklerinin ise azaldığını tespit etmişlerdir. En yüksek protein (%15.76) ve yağ (%4.19) içeriğine 48 saat çimlendirmenin ardından ulaşılmıştır. Örneklerin indirgen şeker içeriğinin çimlendirme prosesinin ilk 16 saatinde değişmediği, fakat 24-48 saat arasındaki çimlendirme ile indirgen şeker içeriğinin önemli derecede arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca çimlendirme ile esansiyel aminoasit içeriğinde de önemli bir artış gözlenmiş, tahıllarda sınırlayıcı aminoasitler olan lizin, histidin ve metiyonin içeriklerinin de esansiyel aminoasitlere benzer şekilde çimlendirme ile %11.72'den %15.64'e arttığı görülmüştür. Bunun yanı sıra ürünlerin acılığında sorumlu olan lösin ve arginin miktarının da çimlendirmeyle azaldığı gözlenmiştir. Çimlendirilmiş karabuğday örneklerindeki başlıca yağ asitlerinin palmitik, oleik ve linoleik asit olduğu, çimlendirmeyle doymamış yağ asitlerinin miktarı değişmezken, doymuş yağ asidi içeriğinin azaldığı bildirilmiştir. Çimlendirme ile diastatik ve  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitelerinde beklenildiği üzere artış görüldüğü, aktivite artışının çimlendirmenin 8. saatinde başladığı ve en fazla aktivitenin 48 saat çimlendirme ile elde edildiği bildirilmiştir. Proteaz aktivitesinin ise çimlendirmenin 16. saatinde artmaya başladığı ve 48. saatte maksimum değere ulaştığı bildirilmiştir. Serbest fenolik ekstraktlarındaki fenolik asit ve flavonoid miktarları bağlı ekstratlardan yüksek bulunurken, hem serbest hem bağlı fraksiyonların toplam fenolik ve flavonoid içeriklerinde çimlendirme ile artış görülmüştür. Karabuğday örneklerindeki ana fenolik bileşikler olarak tespit edilen rutin konsantrasyonunda artan, ve kuersetin konsantrasyonunda ise azalan bir eğilim gözlenmiştir. Tüm bu sonuçlar doğrultusunda, çimlendirilmiş karabuğdayın fonksiyonel gıda üretiminde kullanılabilecek sağlıklı bir gıda bileşeni olduğu bildirilmiştir.

Ispiryan ve ark. (2021) karabuğdayda çimlendirme ile FODMAP (fermente olabilir oligosakkaritler disakkaritler, monosakkaritler ve polioller) içeriğindeki değişimleri araştırdıkları çalışmanın sonuçları Çizelge 7'de özetlenmektedir. Bu çalışmanın sonucunda karabuğdaydaki çözünür, sindirilemeyen ve fermente olabilen karbonhidratların çimlendirme işlemi sırasında azaldığı, dolayısıyla karabuğday maltının düşük FODMAP içeriği ile sağlıklı bir gıda bileşeni olduğu bildirilmiştir.

**Çizelge 7.** Ham ve çimlendirilmiş karabuğdayın FODMAP içerikleri (Ispiryan ve ark., 2021)

	Ham karabuğday	Çimlenmiş karabuğday
Nem (%)	13.90	7.45
$\alpha$ -amilaz (cU g <sup>-1</sup> )	0.05	33.75
$\beta$ -amilaz (U g <sup>-1</sup> )	0.12	0.50 U/g
Glukoz (g 100 g <sup>-1</sup> )	0.09	1.84
Fruktoz (g 100 g <sup>-1</sup> )	0.04	0.08
Sorbitol (g 100 g <sup>-1</sup> )	0.03	0.08

### Çimlendirilmiş Yalancı Tahılların Bazı Özelliklerinin Karşılaştırılması

Ham ve çimlendirilmiş amarant ile kinoa unlarının bazı özellikleri Çizelge 8’de özetlenmiştir. Bu çalışmada hem amarant hem de kinoada çimlendirme işlemi ile un örneklerinin  $L^*$  değerlerinde düşüş görülmüştür.  $a^*$  değerleri üzerinde çimlendirme prosesinin önemli bir etkisi bulunmazken, çimlendirme ile amarant örneğinde  $b^*$  değeri artmış, kinoa örneğinde ise  $b^*$  değeri azalmıştır. Ayrıca çimlendirme yalancı tahıl unlarının viskozite değerlerinin düşmesine neden olmuştur.

**Çizelge 8.** Çimlendirilmiş amarant ve kinoaya ait bazı özellikler (Sindhu ve ark., 2019)

Özellik		Ham amarant	Çimlendirilmiş amarant	Ham kinoa	Çimlendirilmiş kinoa
Nem		7.60	5.46	7.93	5.20
Kül	%	3.33	2.33	3.46	2.60
Yağ	%	7.53	4.06	8.10	5.26
Protein		16.60	17.40	14.50	15.60
Çözünürlük	%	37.87	26.76	17.63	10.29
Su absorpsiyon kapasitesi	g g <sup>-1</sup>	1.53	2.77	1.25	2.14
Yağ absorpsiyon kapasitesi	ml g <sup>-1</sup>	1.53	2.73	1.73	2.53
Yığın yoğunluğu	g ml <sup>-1</sup>	0.82	0.56	0.63	0.36
Saponin içeriği	g 100 g <sup>-1</sup>	2.66	0.84	1.42	0.46
Tanen içeriği	mg 100 g <sup>-1</sup>	1.58	0.68	0.57	0.03
Demir		19.58	14.82	6.07	3.25
Magnezyum	mg 100 g <sup>-1</sup>	325.42	302.46	207.7	170.80
Çinko		4.92	4.25	4.58	3.60
Kalsiyum		201.88	196.27	69.18	60.97

Jimenez ve ark. (2019), çimlendirme prosesinin kinoa ve amarantın besinsel ve teknolojik özellikleri üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, çimlendirmenin örneklerin protein ve kül içeriğini önemli derecede artırdığını tespit etmişlerdir. Protein içeriği kinoa örneklerinde %12-22 arasında, amarant örneklerinde ise %7-11 arasında artış göstermiştir. Örneklerdeki proteinler, özellikle de yüksek moleküler ağırlığına sahip proteinler, çimlendirmeyle hidrolize uğramış, dolayısıyla sindirilebilirlik değerleri önemli ölçüde artış göstermiştir. Protein sindirilebilirliğinin kinoada %15-42, amarantta ise %19-20 oranlarında arttığı bildirilmiştir. Ayrıca örneklerin amiloz içeriğinde de önemli ölçüde bir artış görülmüştür. Amiloz artışı kinoada %13-65 arasında bulunurken, amarantta oldukça yüksek bir oranda (>%100) tespit edilmiştir. Örneklerin sindirilebilir nişasta içeriği çimlendirmeyle azalırken, dirençli nişasta içeriğinde önemli bir değişim görülmemiştir. Çimlendirme, örneklerin jelatinizasyon enerjisi ( $\Delta H$ ) ve retrogradasyon entalpisi ( $\Delta H_r$ ) üzerinde de azaltıcı bir etki göstermiştir. Çimlendirme ile retrogradasyonda (%R) gözlenen artışın, örneklerdeki yüksek amiloz/amilopektin oranından kaynaklandığı belirtilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, çimlendirmenin kinoa ve amarantta besinsel özellikleri geliştirdiği bildirilmiş, fakat retrogradasyondaki artışa bağlı olarak, çimlendirilmiş kinoa ve amarant unlarının kullanılacağı ürünlerde reolojik, tekstürel ve duyuşal özelliklerin olumsuz etkilenebileceğine dikkat çekilmiştir.

Egli ve ark. (2002), suda bekletme ve çimlendirmenin yalancı tahıllardaki fitaz aktivitesi ve fitik asit içeriği üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmanın sonuçları Çizelge 9’da özetlenmektedir. Bu çalışmanın sonunda, yalancı tahılların düşük fitaz aktivitesine sahip olduğu, fakat suda bekletme ve çimlendirme ile fitaz aktivitesinin artırılarak fitik asit içeriğinin düşürülebileceği bildirilmiştir.

**Çizelge 9.** Ham ve çimlendirilmiş amarant, karabuğday ve kinoanın fitaz aktivitesi ve fitik asit içeriği<sup>1</sup> (Egli ve ark., 2002)

Örnek		Ham	Suda bekletme	24 saat çimlendirme	48 saat çimlendirme	72 saat çimlendirme
Fitaz aktivitesi (PU g <sup>-1</sup> )	Amarant	1.27	1.01	1.21	1.57	nd
	Karabuğday	2.90	1.49	2.18	2.01	1.27
	Kinoa	0.62	0.40	0.74	0.54	nd
Fitik asit içeriği (g 100 g <sup>-1</sup> )	Amarant	1.39	1.43	1.44	1.30	nd
	Karabuğday	1.42	1.30	1.44	1.46	1.44
	Kinoa	0.97	1.03	0.93	0.85	nd

<sup>1</sup>Değerler kuru madde üzerinden verilmiştir

Motta ve ark. (2019), kinoa, amarant ve karabuğday tanelerinde çimlendirmenin etkisini araştırdıkları çalışmalarında, çimlendirme ile örneklerin nem içeriğinin düştüğünü tespit etmişlerdir. Örneklerin folat içeriklerinin amarant ve karabuğdayda çimlendirme ile arttığı, kinoada ise değişmediği görülmüştür. Örneklerin toplam folat içerikleri, folik asit (FA), 5-metiltetrahidrofolat (5-MTHF) ve 10-formiltetrahidrofolat (10-CHOTHF) içeriklerinin toplamı şeklinde ifade edilmiş (folik asit eşdeğeri), ham ve çimlendirilmiş kinoa, amarant ve karabuğdaydaki miktarları Çizelge 10'da özetlenmiştir. Çimlendirme ile örneklerin 5-MTHF ve toplam folat içeriklerinde önemli bir artış meydana geldiği görülmüş, çimlendirilmiş yalancı tahılların iyi bir folat kaynağı olduğu bildirilmiştir. EFSA (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi) önerilerine göre, çimlendirilmiş amarant ve kinoanın folat içeriği açısından diyet referans değerinin %25'inden fazlasına katkıda bulunabildiği, çimlendirilmiş karabuğdayın ise %19 oranında katkıda bulunabildiği bildirilmiştir.

**Çizelge 10.** Ham ve çimlendirilmiş kinoa, amarant ve karabuğdayın folat içerikleri (Motta ve ark., 2017)

Örnek		FA	5-MTHF	10-CHOTHF	Toplam Vitamin <sup>1</sup>
Amarant	Tane	4.88	211	21.2	228
	Çimlendirilmiş	4.87	268	14.6	276
Kinoa	Tane	9.35	259	53.4	309
	Çimlendirilmiş	6.41	233	57.8	285
Karabuğday	Tane	1.75	148	9.10	153
	Çimlendirilmiş	0.94	187	13.4	193

<sup>1</sup>Değerler folik asit eşdeğeri olarak verilmiştir.

## SONUÇ

Yalancı tahıllardan kinoa, amarant ve karabuğday glutensiz gıdaların üretiminde besin değerini artıran bileşenler olarak kullanılabilir. Bunun yanı sıra çimlendirme ile yalancı tahılların besinsel ve fitokimyasal özellikleri geliştirilebilmekte, bileşimlerdeki antibesinsel faktörler azaltılabilmekte ve çölyak hastaları için daha kaliteli besin ögesi içeriğine sahip gıdaların üretiminde kullanılabilir. Bu bağlamda, çimlendirilmiş yalancı tahılların glutensiz ürün formülasyonlarında kullanım olanakları ve glutensiz diyetlerde kullanımı ile çölyak hastaları üzerindeki etkilerinin araştırılması hakkında literatürde daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.



## TEŞEKKÜR

Yazar Nezahat Olcay, Yenilikçi Gıda İşleme Teknolojileri ve Gıda Biyoteknolojisi alanında Yüksek Öğretim Kurulu (YÖK) 100/2000 Doktora Bursiyeridir.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

## KAYNAKLAR

- Alvarez-Jubete L, Arendt EK, Gallagher E, 2009. Nutritive Value and Chemical Composition of Pseudocereals as Gluten-Free Ingredients. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60 (4): 240-257.
- Ali OIED, 2019. Nutritional Value of Germinated Quinoa Seeds and Their Protective Effects on Rats' Health Injected by Nicotine. *Egyptian Journal of Food Science*, 47 (2): 227-241.
- Argüelles-López OD, Reyes-Moreno C, Gutiérrez-Dorado RR, Sánchez-Osuna MF, López-Cervantes J, Cuevas-Rodríguez EO, Jorge Milán-Carrillo J, Perales-Sánchez JXK, 2018. Functional Beverages Elaborated from Amaranth and Chia Flours Processed by Germination and Extrusion. *Biotechnia*, 20 (3): 135-145.
- Bardella MT, Fredella C, Prampolini L, Molteni N, Giunta AM, Bianchi PA, 2000. Body Composition and Dietary Intakes in Adult Celiac Disease Patients Consuming a Strict Gluten-Free Diet. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72 (4): 937-939.
- Bellaio S, Kappeler S, Rosenfeld EZ, Jacobs M, 2013. Partially Germinated Ingredients for Naturally Healthy and Tasty Products. *Cereal Foods World*, 58 (2): 55.
- Bhinder S, Kumari S, Singh B, Kaur A, Singh N, 2021. Impact of Germination on Phenolic Composition, Antioxidant Properties, Antinutritional Factors, Mineral Content and Maillard Reaction Products of Malted Quinoa Flour. *Food Chemistry*, 346, 128915.
- Bressani R, 2003. Amaranth. In: B Caballero (Eds.). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Oxford: Academic Press, pp. 166-173.
- Carciochi RA, Manrique GD, Dimitrov K, 2014. Changes in Phenolic Composition and Antioxidant Activity During Germination of Quinoa Seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). *International Food Research Journal*, 21 (2): 767-773.
- Caterina B, Camelia V, 2012. Sprouted Buckwheat an Important Vegetable Source of Antioxidants. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI-Food Technology*, 36 (1): 53-60.
- Ciacchi C, Cirillo M, Cavallaro R, Mazzacca G, 2002. Long-Term Follow-up of Celiac Adults on Gluten-Free Diet Prevalence and Correlates of Intestinal Damage. *Digestion*, 66: 178-185.
- Darwish AM, Al Jumayi HA, Elhendy HA, 2020. Effect of Germination on the Nutritional Profile of Quinoa (*Cheopodium quinoa* Willd.) Seeds and Its Antianemic Potential in Sprague–Dawley Male Albino Rats. *Cereal Chemistry*, 98 (2): 315-327.
- de Oliveira Lopes C, Barcelos MDFP, de Goes Vieira CN, de Abreu WC, Ferreira EB, Pereira RC, de Angelis-Pereira MC, 2019. Effects of Sprouted and Fermented Quinoa (*Chenopodium quinoa*) on Glycemic Index of Diet and Biochemical Parameters of Blood of Wistar Rats Fed High Carbohydrate Diet. *Journal of Food Science and Technology*, 56 (1): 40-48.

- Demir B, Bilgiçli N, 2020. Changes in Chemical and Anti-nutritional Properties of Pasta Enriched with Raw and Germinated Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Flours. *Journal of Food Science and Technology*, 57 (10): 3884-3892.
- Donkor ON, Stojanovska L, Ginn P, Ashton J, Vasiljevic T, 2012. Germinated Grains–Sources of Bioactive Compounds. *Food Chemistry*, 135 (3): 950-959.
- Dykes L, Rooney LW, 2007. Phenolic Compounds in Cereal Grains and Their Health Benefits. *Cereal Foods World*, 52: 105-111.
- Egli I, Davidsson L, Juillerat MA, Barclay D, Hurrell RF, 2002. The Influence of Soaking and Germination on the Phytase Activity and Phytic Acid Content of Grains and Seeds Potentially Useful for Complementary Feeding. *Journal of Food Science*, 67 (9): 3484-3488.
- Fasano A, Catassi C, 2001. Current Approaches to Diagnosis and Treatment of Celiac Disease: An Evolving Spectrum. *Gastroenterology*, 120: 636-651.
- Gorinstein S, Lojek A, Číž M, Pawelzik E, Delgado-Licon E, Medina OJ, Moreno M, Salas IA, Goshev I, 2008. Comparison of Composition and Antioxidant Capacity of Some Cereals and Pseudocereals. *International Journal of Food Science & Technology*, 43: 629-637.
- Guardianelli LM, Salinas MV, Puppo MC, 2019. Hydration and Rheological Properties of Amaranth-Wheat Flour Dough: Influence of Germination of Amaranth Seeds. *Food Hydrocolloids*, 97: 105242.
- Hallert C, Grant C, Grehn S, Grännö C, Hultén S, Midhagen G, Ström M, Svensson H, Valdimarsson T, 2002. Evidence of Poor Vitamin Status in Celiac Patients on a Gluten-Free Diet for 10 Years. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 16: 1333-1339.
- Hopman EGD, Le Cessie S, Von Blomberg ME, Mearin ML, 2006. Nutritional Management of the Gluten-Free Diet in Young People with Celiac Disease in The Netherlands. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 43: 102-108.
- Hung PV, Trinh LND, Thuy NTX, Morita N, 2020. Changes in Nutritional Composition, Enzyme Activities and Bioactive Compounds of Germinated Buckwheat (*Fagopyrum esculantum* M.) Under Unchanged Air and Humidity Conditions. *International Journal of Food Science & Technology*, 56: 3209–3217.
- Ispiryan L, Kuktaite R, Zannini E, Arendt EK, 2021. Fundamental Study on Changes in the FODMAP Profile of Cereals, Pseudo-cereals, and Pulses During the Malting Process. *Food Chemistry*, 343: 128549.
- Jedrychowski L, 2010. General Characteristics of Food Allergens. In: L Jedrychowski, HJ Wichers (Eds.). *Chemical and Biological Properties of Food Allergens*. CRC Press: Boca Raton, pp. 185-192, FL.
- Jimenez MD, Lobo M, Sammán N, 2019. Influence of Germination of Quinoa (*Chenopodium quinoa*) and Amaranth (*Amaranthus*) Grains on Nutritional and Techno Functional Properties of Their Flours. *Journal of Food Composition and Analysis*, 84: 103290.
- Kanensi OJ, Ochola S, Gikonyo NK, Makokha A, 2013. Effect of Steeping and Germination on the Diastatic Activity and Sugar Content in Amaranth Grains and Viscosity of Porridge. *Journal of Agriculture and Food Technology*, 3 (1): 1-7.
- Mariani P, Viti MG, Montuori M, La Vecchia A, Cipolletta E, Calvani L, Bonamico M, 1998. The Gluten-Free Diet: A Nutritional Risk Factor for Adolescents with Celiac Disease?. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 27 (5): 519-523.

- Martínez-Villaluenga C, Peñas E, Hernández-Ledesma B, 2020. Pseudocereal Grains: Nutritional Value, Health Benefits and Current Applications for the Development of Gluten-Free Foods. *Food and Chemical Toxicology*, 137: 111178.
- Mazza G, Oomah BD, 2003. Buckwheat. In: B Caballero (Eds.). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Oxford: Academic Press, pp. 692-699.
- McGough N, Cummings JH, 2005. Coeliac Disease: A Diverse Clinical Syndrome Caused by Intolerance of Wheat, Barley and Rye. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64: 434- 450.
- Morita N, Miyake K, Maeda T, Van Hung P, 2013. Germinated Buckwheat for Functional Foods. In: *Advances in Cereal and Pseudocereal Research for Functional Foods*. pp. 75–90.
- Motta C, Castanheira I, Gonzales GB, Delgado I, Torres D, Santos M, Matos AS, 2019. Impact of Cooking Methods and Malting on Amino Acids Content in Amaranth, Buckwheat and Quinoa. *Journal of Food Composition and Analysis*, 76: 58-65.
- Omary MB, Fong C, Rothschild J, Finney P, 2012. Effects of Germination on the Nutritional Profile of Gluten-Free Cereals and Pseudocereals: A Review. *Cereal Chemistry*, 89 (1): 1-14.
- See J, Murray JA, 2006. Gluten-Free Diet: The Medical and Nutrition Management of Celiac Disease. *Nutrition in Clinical Practice*, 21: 1-15.
- Sindhu R, Beniwal SK, Devi A, 2019. Effect of Grain Processing on Nutritional and Physico-Chemical, Functional and Pasting Properties of Amaranth and Quinoa Flours. *Indian Journal of Traditional Knowledge (IJTK)*, 18 (3): 500-507.
- Siwatch M, Yadav RB, Yadav BS, 2019. Chemical, Physicochemical, Pasting and Microstructural Properties of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Flour as Affected by Different Processing Treatments. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 11 (1): 3-13.
- Smeds AI, Eklund PC, Sjöholm RE, Willför SM, Nishibe S, Deyama T, Holmbom BR, 2007. Quantification of a Broad Spectrum of Lignans in Cereals, Oilseeds, and Nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 1337-1346.
- Suárez-Estrella D, Bresciani A, Iametti S, Marengo M, Pagani MA, Marti A, 2020. Effect of Sprouting on Proteins and Starch in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Plant Foods for Human Nutrition*, 75 (4): 635-641.
- Tanwar B, Lamsal N, Goyal A, Kumar V, 2019. Functional and Physicochemical Characteristics of Raw, Roasted and Germinated Buckwheat Flour. *Asian Journal of Dairy & Food Research*, 38 (2).
- Taylor JRN, Parker ML, 2002. Quinoa. In: PS Belton, JRN Taylor (Eds.). *Pseudocereals and Less Common Cereals: Grain Properties and Utilization*. Berlin: Springer Verlag, pp. 93-122.
- Thompson T, 2000. Folate, Iron and Dietary Fiber Contents of the Glutenfree Diet. *Journal of the American Dietetic Association*, 100: 1389-1396.
- Vora JD, Rane AG, Jadhav P, 2014. Biochemical, Antimicrobial and Organoleptic Studies on the Germination Profile of Finger Millet (*Eleusine coracana*). *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 3 (4): 123.

**Atf İçin:** Hendek Ertop M, İncemehmetoğlu E, 2021. Çam (*Pinus* spp.) Türlerinin ve Fraksiyonlarının Gıda Takviyesi ve Tıbbi Bitki Olarak Kullanım Olanakları. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 266-278.

**To Cite:** Hendek Ertop M, İncemehmetoğlu E, 2021. The Potential Uses of Pine (*Pinus* spp.) Species and Their Fractions as Food Supplement and Medicinal Plant. Journal of the Institute of Science and Technology, 12 (1): 266-278.

### **Çam (*Pinus* spp.) Türlerinin ve Fraksiyonlarının Gıda Takviyesi ve Tıbbi Bitki Olarak Kullanım Olanakları**

Müge HENDEK ERTOP<sup>1\*</sup>, Emine İNCEMEHMETOĞLU<sup>2</sup>

**ÖZET:** Nutrasötik ve fonksiyonel özelliklere sahip yeni bileşenler belirlemek ve izole etmek için son zamanlarda çok sayıda bitki, meyve, sebze ve baharatlar üzerinde araştırmalar yapılmaktadır. Gıda olarak tüketilebilen kaynaklardan bu bileşiklerin ekstraksiyonu yerine endüstriyel yan veya atık ürünlerin bir biyoaktif molekül kaynağı olarak yeniden değerlendirilmesine yönelik çalışmalar ise doğal kaynakların etkin kullanımı amacıyla daha da önem kazanmıştır. Bu çalışmanın amacı, çam türleri ile kabuk, kozalak, sürgün, iğne gibi farklı fraksiyonlarının, antioksidan ve mikrobesebın kaynağı olarak gıda endüstrisinde ve biyomedikal amaçlarla kullanım potansiyelini vurgulamaktır. Çam fraksiyonları, polimerik flavanoller, tannik asit, flavonoidler ve kafeik veya protokatekuik asit gibi diğer fenolik asitler dahil olmak üzere geniş biyoaktif bileşen içeriğine sahiptir. Derlenen çalışmalar, çam türlerine ait özellikle kabuk ve kozalak gibi fraksiyonların halk arasında farklı yerel tedavi yöntemlerinde kullanıldığını, aynı zamanda meyve suyu, et, fırıncılık ürünleri teknolojisinde başarılı sonuçlar verdiğini göstermiştir. Farklı çam fraksiyonlarının kullanımı ile üretilmiş ticari ürünler sınırlı sayıda olmasına rağmen, ormancılık endüstrisi yan ürünlerinin, besin takviyesi olarak ikinci bir kullanım alanına girdi sağlayabileceği açıkça görülmektedir. Yapılan çalışmaların ağırlıklı olarak tedavi, alternatif ve geleneksel tıp alanında olduğu, gıda takviyesi olarak değerlendirme konusunda araştırmaların kısıtlı olduğu belirlenmiştir. Çok yönlü kullanıma sahip olmasına rağmen, sınırlı araştırma-geliştirme çalışmaları nedeniyle çam kozalağı, kabuğu gibi farklı fraksiyonlar yakacak olarak kullanılmakta, bu da büyük miktarda kaynak israfına neden olmaktadır. Ülkemizin bu alanda sahip olduğu büyük ekolojik sistem ve kaynaklar ile günümüz tüketicisinin gıda ve katkı maddelerinden fonksiyonellik ve doğallık beklentisi göz önüne alındığında, yapılacak araştırmaların gıda sektörüne büyük katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Çam kabuğu, Çam kozalağı, Fonksiyonel gıda, Gıda takviyesi, *Pinus* türleri

#### **The Potential Uses of Pine (*Pinus* spp.) Species and Their Fractions as Food Supplement and Medicinal Plant**

**ABSTRACT:** A great number of plants have been studied in order to identify and isolate new components with nutraceutical and functional properties. The aim of this study is to emphasize the potential of use of pine species and their fractions such as bark, cones, needles in the food industry and for biomedical purposes as sources of antioxidants and micronutrients. Pine fractions have a great content of bioactive molecules, including polymeric flavanols, tannic acid, flavonoids, and other phenolic acids. The compiled studies have shown that pine species have been used in different traditional medicinal treatments by the people, and at the same time, they gave successful results in fruit juice, meat, bakery products technology. Although commercialized goods produced with the use of different pine fractions in the global market are limited, it is clear that forestry industry by-products can provide input for a second use as a nutritional supplement. Despite they have versatile usage potential, due to limited research and development studies, different fractions such as pine cones and bark are used as a heating source, resulting in a large amount of resource waste and loss. Considering the great ecological system and resources that our country has in this field, and the functionality and naturalty expectation of today's consumers from foods and additives, it is thought that the researches will make a great contribution to the food sector.

**Keywords:** Pine bark, Pine cone, Functional food, Food supplement, *Pinus* spp.

<sup>1</sup>Müge HENDEK ERTOP ([Orcid ID: 0000-0003-4300-7790](https://orcid.org/0000-0003-4300-7790)), Kastamonu Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 37150,Kastamonu, Türkiye

<sup>2</sup>Emine İNCEMEHMETOĞLU ([Orcid ID: 0000-0001-9467-2681](https://orcid.org/0000-0001-9467-2681)), Kastamonu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kastamonu; Tarım ve Orman Bakanlığı Kastamonu İl Müdürlüğü, Kastamonu, Türkiye

**\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Müge HENDEK ERTOP, e-mail: mugeertop@kastamonu.edu.tr

## GİRİŞ

Günümüzde beslenme kavramı her geçen gün gelişmekte, gıda ürünleri sadece beslenme amacıyla tüketilmemekte, aynı zamanda farklı fonksiyonel bileşenler sayesinde sağlık üzerine olumlu etkiler de sağlamaktadır. Böylece, beslenme işlevinin ötesine geçen, iyileştiren ve/veya hastalığı önleyen fonksiyonel gıda kavramı ortaya çıkmaktadır. Fonksiyonel gıda, “doğal yapısı gereği fonksiyonel olabilen, ya da bir bileşen eklenen, bir bileşeni çıkarılmış, bir veya daha fazla bileşenin yapısı değiştirilmiş, bir veya daha fazla bileşenin biyoyararlanımı modifiye edilmiş veya bu olasılıkların herhangi bir kombinasyonunu taşıyan gıda” şeklinde tanımlanabilir (Roberfroid, 2002). Fonksiyonel gıda veya doğal gıda katkı maddeleri geliştirmek için çam kabuğu, iğnesi, kozalakları gibi orman atıklarının kullanımı ilgi çekici olduğu kadar, bir o kadar da sayı ve kapsamı sınırlı kalmış bir konudur. Özellikle belirli çam türleri (*Pinus maritima*, *Pinus brutia*, *Pinus nigra*, *Pinus sylvestris* vb.) hakkında yapılan sınırlı sayıdaki çalışma (Yesil-Celiktas ve ark., 2009; Yesil-Celiktas ve ark., 2010; Zhang ve ark., 2010; Suntar ve ark., 2012; Zou ve ark., 2013; Sadeghi ve ark., 2016; Yi ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2021) sonucu elde edilen bulgular, bu alandaki atık değerlendirmenin, dünya çapında iki milyardan fazla insanı etkileyen kronik mikro besin eksikliklerinin giderilmesi için katma değerli yeni gıdaların elde edilebileceğini göstermektedir (Burchi ve ark., 2011). Ticari gelişimi sınırlı olmasına rağmen, çam ağacı fraksiyonlarından elde edilen ekstraktların biyoaktif bileşik içeriği, fonksiyonel gıda geliştirmede kullanılabilir ilginç ve yeni bir bileşen olabileceğini düşündürmektedir. Bu fraksiyonların ekstrakt, toz, kapsül gibi farklı formlarının gıda katkısı veya takviyesi olarak kullanımına ilişkin az sayıda çalışma vardır (Esmaceli ve ark., 2021). *Pineaceae* familyasına ait bitkilerin yaprak, kozalak ve reçinelerinin halk arasında iyileştirici etkisi olduğuna inanılmaktadır bunlar mide rahatsızlıkları, astım, öksürük gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadırlar (Altaş, 2009). Doğu Asya ülkelerinde, çam iğneleri, kozalaklar, korteksler ve polen gibi çam ağaçlarının çeşitli kısımları, sağlığı desteklemek için gıda veya diyet takviyesi olarak yaygın şekilde tüketilmektedir (Kim ve ark., 2010).

### ***Pinus* Türlerinin Fonksiyonel Nitelikleri**

Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları biyolojik sistemlerde ve gıdalarda yaygın olarak görülmektedir. Bazı oksidasyon reaksiyonları gıdalar için faydalı olsa da çoğu, besin değeri kaybı ve gıdada istenmeyen ürünlerin ve/veya aroma bileşenlerinin gelişmesi anlamına geldiğinden dolayı zararlı etkilere neden olabilmektedir. Gıdalardaki oksidasyon reaksiyonlarının kontrolü, oksijeni uzaklaştıran işleme ve paketleme teknikleri kullanılarak veya sentetik veya doğal antioksidanlar dahil edilerek gerçekleştirilir. Son dönemlerde sentetik antioksidanların kullanımına, olası toksik ve karsinojenik etkileri nedeniyle oldukça mesafeli yaklaşılmaktadır (Kaur ve Kapoor, 2001). Güvenli bileşenler olarak kabul edildiğinden dolayı tüketicilerin doğal antioksidanlara olan talebi gittikçe artmaktadır. Doğal antioksidanlar genel olarak sentezlenmesi zor olan, toksikolojik açıdan doğal ürünlerden ekstrakte edilmesi daha ucuz ve daha güvenli olan karmaşık moleküllerdir. Antioksidanlar gıdalarda olduğu kadar, insan sağlığı açısından da önemli fonksiyonel bileşiklerdir. Günümüzde çok sayıda hastalık, aşırı serbest radikal üretimi ve oksidatif stres ile ilişkilendirilmektedir. Gıdalarda oksidasyonu önlemek için antioksidan özelliklere sahip yeni bileşenlerin bulunması ve ticarileştirilmesine yönelik artan bir ilgi vardır. Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerini ve diğer serbest radikalleri nötralize eden elektron donörleri olarak hareket ederek DNA hasarını önlerler (Willcox ve ark., 2004).

Bitkiler, antioksidatif etki, DNA'nın bakım ve onarımı, nitrozamin oluşumunun inhibisyonu, kanserojenlerin hücre farklılaşması veya deaktivasyonu sağlama gibi çok çeşitli biyoaktif özelliklere

sahip heterojen molekül grupları ile, aralarında fenolik bileşiklerin de bulunduğu nutrasötik potansiyele sahip birçok bileşik içerirler (Shahidi, 2004; Yesil Celiktas ve ark., 2010). Antioksidan özelliğe sahip yeni molekülleri sentezlemenin zorluğu ve yüksek ekonomik maliyeti göz önüne alındığında, bu tür bileşiklerin doğal kaynaklardan ekstraksiyonu en uygun seçenek olarak görülmektedir (Charles, 2013). Diğer taraftan bu antioksidanları sebze veya meyvelerden elde etmek maliyet ve gıda kaynaklarının verimli kullanımı açısından çok anlamlı olmayabilirken, doğada bulunabilen çam kabuğu, kozalağı gibi kullanılmayan bitkisel kaynaklardan elde etmek ekonomik açıdan etkili olma potansiyeline sahiptir (Marmol ve ark., 2019).

*P.pinaster* bileşenleri ve fonksiyonel nitelikleri açısından en çok araştırılan çam türüdür. Fradinho ve ark., (2002), sahil çam kabuğunun ve kabuğun alkali ekstraktlarının kimyasal bileşimini belirlemiştir. Çam kabuğu, lignin ve polifenollerden (%44), polisakkaritlerden (%39), kül (%1) ve diğer maddelerden (diklorometan, etanol ve su özütleri, %17) oluşmaktadır. Klason yöntemi ile belirlenen lignin içeriği %33.2 iken selüloz içeriği yaklaşık %24'tür. Jerez ve ark., (2006) ayrıca çam kabuğunun yoğunlaştırılmış tanenler açısından özellikle zengin olduğunu bulmuşlardır. Touriño ve ark. (2005), *P.pinaster* kabuğunun büyük miktarda prosiyanidin oligomerine sahip olduğunu bildirmiştir. Proantosiyanidinler, flavan-3-ollerin (kateşinler) oligomerlerinden oluşan ve bir flavonoid türü olan prosiyanidinleri ve prodelfinidinleri içerir. Proantosiyanidinler güçlü serbest radikal süpürücüdürler. Yeşil-Çeliktas ve ark. (2009), *P.brutia* ve *P.nigra*'nın fenolik kompozisyonunun *P.sylvestris* ve *P.pinea*'dan önemli düzeyde yüksek olduğunu ve *P.brutia*'nın diğerlerinden çok daha yüksek taksifolin içeriğine (%18.5) sahip olduğunu belirlemişlerdir. Nisca ve ark. (2021) ise *Pinus nigra* ve *Pinus sylvestris* türlerinden ultrases ve mikrodalga destekli ekstraksiyonla elde ettikleri kabuk ekstraktlarının kimyasal bileşimini ve biyolojik aktivitelerini değerlendirmişler, mikrodalga desteği ile daha fazla uçucu bileşik içeriğine ulaştığını, diğer taraftan ultrases destekli ekstraksiyon ile *Pinus sylvestris* kabuğundan daha yüksek antioksidan aktivite, toplam fenolik içerik ve toplam tanen içeriğine ulaştığını belirlemişlerdir. Iravani ve Zolfaghari (2014) ise İran'da yaygın olarak bulunan *Pinus* türlerinden, *P. eldarica*'nın temel bileşeninin kateşin olduğunu, *P. pinaster* ve *P. eldarica*'nın eşit düzeyde taksifolin içeriğine sahip olduğunu bulmuşlardır.

Özellikle çam kabuğu ve kozalağının kompozisyonel içeriğine dair yapılan çalışmaların yanı sıra bu bileşenlerin neticesinde ortaya çıkan antioksidatif etkinin gıdalarda fonksiyonel olarak sonuçlarını ortaya çıkaran çalışmalar da yapılmıştır. Vuorela ve ark., (2005) yaptıkları çalışmada, fenolik bileşikler açısından zengin olan kolza tohumu yağı ve çam kabuğu ekstraktının et lipitlerinin ve proteinlerinin oksidasyonu üzerindeki etkisini incelemiş, her iki ekstraktın da protein oksidasyonunu %42 ile %64 arasında önlediği kanıtlanmış, bu nedenle et endüstrisinde mükemmel bir antioksidan olarak kabul edilebileceği belirtilmiştir. Iglesias ve ark., (2010), *P.pinaster* kabuğundan elde edilen polifenolik ekstraktlarının balık yağı ile zenginleştirilmiş yiyeceklerdeki oksidasyonu inhibe etme üzerinde, Ahn ve ark., (2002) ise pişirilmiş etin oksidatif stabilitesinde önemli bir iyileşme sağlandığını bildirmişlerdir. Öte yandan, çam ekstraktları, meyve suyu endüstrisinde katkı maddeleri olarak önerilmiştir. Yeşil Çeliktas ve ark., (2010) portakal suyuna *P.brutia* ve *P. pinea* kabuğu ekstraktlarının ilavesini değerlendirdikleri çalışmada, çam kabuğu ekstraktı ile meyve suyu takviyesinin mevcut vitamin ve mineral takviyesi yerine meyve suyu teknolojisinde gelecek vaat eden bir yaklaşım olduğunu belirtmişlerdir. Frontela-Saseta ve ark. (2011), çam ekstraktı (piknogenol) ile zenginleştirilmiş meyve sularının *invitro* sindirim simülasyonu öncesi ve sonrası içeriklerini inceledikleri çalışmada, fenolik bileşik düzeyinin, ananas meyve suyunda 94.6 mg/100 mL'den 155.6 mg/100 mL'ye, kırmızı meyve sularında ise 406.9 mg/100 mL'den 478.5 mg/100 mL'ye yükseldiğini

belirlemişlerdir. Bu nedenle, meyve sularını piknogenol ile zenginleştirme, *invitro* gastrointestinal koşullarda yüksek stabiliteye sahip bir fenolik bileşik kaynağı olarak bildirilmiştir.

### Fonksiyonel Olarak Kullanılan Çam Türleri

*Pinus* cinsine ait türler sistematikte *Gymnospermae*'lerin *Conifera* sınıfı, *Pinaceae* familyasına dâhildir. *Pinus* türleri çoğunlukla Kuzey Yarımküre'ye dağılmış geniş bir kozalaklı ağaç grubudur (Mármol ve ark., 2019). *Pinaceae* familyasına ait *Pinus* L. cinsi, doğal olarak Kuzey ve Güney Yarımküre'de, Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika, Guatemala, Batı Hindistan, Kuzey Afrika ve Endonezya'da yetişmektedir. Bilinen yaklaşık 126 çam türü bulunmakta, Türkiye florası ise *Pinus silvestris* L., *P.nigra* Arnold, *P.brutia* Ten., *P.pinea* L. ve *P.halepensis* adlı beş çam türünden oluşmaktadır (Kozan ve ark., 2019). Dünya çapında geleneksel halk ilaçlarında yaygın olarak kullanılan çam ailesinin yüzden fazla türü arasında, *Pinus pinaster*, *P. sylvestris*, *P. brutia*, *P. pinea*, *P. koraiensis*, *P. maritima*, *P. eldarica* ve *P.nigra* gibi beslenme ve tıbbi amaçlar için kullanılan başlıca türler vardır. *P. pinaster* en çok araştırılan çam türüdür. Ancak *Pinus* spp.'nin diğer türlerinin biyolojik özellikleri hem ilaç hem de gıda endüstrisinde büyük potansiyel gösterdiğinden, bu araştırmalar yalnızca *P. pinaster* ile sınırlı kalmamıştır (Çizelge 1).

**Çizelge 1.** Çam (*Pinus* spp.) türlerinin gıda endüstrisinde ve tıbbi bitki olarak potansiyel kullanımları

Çam türü	Kullanım nedeni	Kaynak
<i>P. koraiensis</i>	Gıda antioksidanı	Zhang ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2021
<i>P. koraiensis</i> (fıstığı)	Gıda antioksidanı	Liang ve ark., 2018
<i>P. pinaster</i>	Gıda antioksidanı	Ahn, ve ark., 2002; Iglesias ve ark., 2010; Frontela-Saseta ve ark., 2011
<i>P. sylvestris</i>	Gıda antioksidanı	Vuorela ve ark., 2005
<i>P.brutia</i> , <i>P.pinea</i> , <i>P.pinaster</i>	Gıda antioksidanı	Yesil Celiktas ve ark., 2010
<i>P. pinaster</i>	Gıda antioksidanı, antiproliferatif etki	Touriño,ve ark., 2005
<i>P. pinea</i>	Gıdada antimikrobiyal etki	Kocabaş ve ark., 2008
<i>Pinus</i> spp.	Diyet lif kaynağı	Kartal ve Öztürk, 2016
<i>P. densiflora</i>	Biyo-bozunur antioksidan film	Han ve ark., 2018
<i>P. koraiensis</i>	Antikanser, antioksidan, immün düzenleyici	Yi,ve ark., 2017
<i>P. koraiensis</i> (fıstığı)	Hepatoprotektif (karaciğer koruyucu) etki, Yorgunluk, yaşlanma (anti-fatigue ve anti-aging) önleyici	Qu ve ark., 2019
<i>P. morrisonicola</i>	LDL oksidasyonu engelleme, antiinflamatuvar	Su ve ark., 2009
<i>P. pinaster</i>	Diyabet önleme	Yen ve ark., 2008
<i>P. pinaster</i>	Sedef hastalığı tedavisi	Stuard ve ark., 2010; Belcaro ve ark., 2013; Muchova ve ark., 2014
<i>P. pinaster</i>	Antiinflamatuvar ve immünomodülatör etki	Belcaro ve ark., 2014
<i>P. pinaster</i>	Kardiyovasküler hastalık risk faktörlerini azaltma	Belcaro ve ark., 2016; Ross, 2016; Jessberger ve ark., 2017
<i>P. radiata</i>	Nöroprotektif etki	Valls ve ark., 2016
		Pipingas ve ark., 2008; Chayasirisobhon, 2013; Theadom ve ark., 2013

Yapılan çalışmalar, çam türleri arasında en fazla *P.pinaster*'in araştırmalarda materyal olarak kullanıldığını ve özellikle tıbbi bitki olarak ele alındığını göstermektedir (Çizelge1). *P.pinaster*'in özellikle kabuklarından elde edilen ekstraktların kullanıldığı ve günümüzde ticarileştirilen ürünlerden biri olduğu bilinmektedir. Diğer taraftan, farklı çam türlerinin gıdalarda kullanımına dair yapılan çalışmaların özellikle bu bitkinin antioksidan aktivitesi ve oksidasyonuna bağlı gıda bozulmaları ile raf ömrü çalışmaları üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Tüm dünyada olduğu gibi, ülkemizde de tıbbi açıdan önemli olan bitkiler, yüzyıllardan beri halk arasında hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılmaktadır. Sınırlı sayıda çalışma olsa da, bu bilgiler yapılan bazı etnobotanik çalışmaların da

yardımıyla günümüze kadar gelmiştir. Özellikle çam ormanlarının yoğun olduğu Karadeniz bölgesinde farklı çam türleri ve fraksiyonlarından bu amaçla faydalandığı bilinmektedir. Artvin ili merkez ilçesine bağlı mahalle ve köylerinde yapılan bir çalışma sonucunda yerli halkın *Pinaceae* familyasına ait Sarıçam ve Köknar bitkilerinin sakız, reçine, odun ve kozalaklarından faydalanma şekilleri belirlenmiştir (Bak, 2020). Benzer şekilde, Orman Genel Müdürlüğü'nün Çankırı'nın orman köylerinde yapmış oldukları etnobotanik çalışma sonucunda çam ağacından yöre halkının farklı şekillerde faydalandıkları görülmüştür (Özer ve ark., 2015). Halk arasında uygulanan bu tür geleneksel yöntemler bilimsel yaklaşımdan uzak uygulamalar olmakla birlikte geleneksel halk tıbbi niteliğindedir. Her iki çalışmada elde edilen sonuçlar Çizelge 2'de verilmiştir.

**Çizelge 2.** Köknar, Sarıçam ve Karaçam'dan halk arasında geleneksel faydalanma yöntemleri

Bitki	Kullanılan kısmı	Kullanım şekli	Kullanılış amacı	Kaynak	
Köknar ( <i>Abies</i> ssp.)	Sakızı	Çiğnenir ve yutulur	Mide rahatsızlıkları	Bak, 2020	
	Reçinesi	Sürülür	İltihaplı yaralar		
	Reçinesi	Kaynatılıp soğutularak yapılan haplar yutulur.	Mide ülseri		
Sarıçam ( <i>Pinus sylvestris</i> )	Reçinesi	Zeytinyağı ve balmumu ile karıştırılıp sürülür.	Yara		
	Yeşil kozalağı	İnfüzyon veya dekoksasyon	Öksürük		
	Odunu	Isıtılarak, üzerine oturulur	İshal, karın ağrısı		
Karaçam ( <i>Pinus nigra</i> )	Çam kozası-kozalağı (Açmamış)	2-3 kozalak suda kaynatılarak, balla karıştırılır	Astım		Özer ve ark., 2015
	Reçinesi	Direkt sürülür Kolafan kısmı direkt sürülür	Siğillerin düşürülmesi Kesiklerin kapanması		
	Sakızı (Yağrı, yağırı)	Yarının üzerine sürülerek Demlenip içilerek	Yara tedavisinde, yaranın kuruyup çatlamasını engellemek İltihaplı yarayı patlatmak İshali kesmek		
	Çam tozu (poleni)	Kaynatılıp içilir	Bronşit		
	Odundan elde edilen katran	Leblebi tozu ile karıştırılıp leblebi büyüklüğünde yuvarlanarak yutulur	Kısırlık		

### Çam Fraksiyonlarının Fonksiyonel Nitelikleri

Çam kabuğu, iğneleri veya uçucu yağ dahil olmak üzere çamın farklı fraksiyonları, biyoaktif moleküllerindeki içeriklerinden dolayı farklı araştırmalarda yer bulmuştur (Cheng ve ark., 2015; Sharma ve ark., 2016; Basholli-Salihu ve ark., 2017). Ülkemizde de geleneksel olarak kullanılan halk ilaçlarının çeşitliliği oldukça fazladır. Çam (*Pinus*) tomurcuğu, palamutu, kozalağı, filizleri ve çırası da ilaç yapımında kullanılan fraksiyonlar arasında yer almaktadır. Çamın farklı bölümlerinin kullanımı ile yapılan bazı çalışmalarda ise benzer nitelikte sonuçlar bulunmuştur. Örneğin, Sadeghi ve ark., (2016), *P. eldarica*'dan hem uçucu yağın hem de kabuğun antibakteriyel etki gösterdiğini tespit etmiştir. Bu nedenle çam bütün olarak potansiyel yeni bileşiklerin kaynağı olarak düşünülebilir.



### **Kozalak**

Kore çamı olarak bilinen *Pinus koraiensis* yöresel gıdalar, tıbbi tedaviler ve çam kozalaklarından elde edilen fonksiyonel maddeleri temel alan uygulamalarda kullanılan çam ağacı türlerinden biridir (Guan ve ark., 2012). *Pinaceae* familyasından biri olan *P.koraiensis*, Çin'in kuzeydoğusunda, özellikle Xiaoxing'anling bölgesinden Changbai Dağları'na kadar uzanan bölgede bol miktarda bulunur. Ming Hanedanlığı döneminde (1368 ~ 1644) Li Shizhen tarafından tedavi için kullanılan maddelerin (yöresel ilaçların) terapötik özellikleriyle ilgili bilgilerini derlediği, "Compendium of Materia Medica" adlı Çin herboloji kitabında, *P.koraiensis* başta olmak üzere diğer çam türlerinin kozalaklarına da yer verilmiştir (Zhang ve ark., 2021). Tıpta çam kozalakları toksik olarak değerlendirilmemektedir. Akciğerleri nemlendirmek, öksürüğü gidermek ve ateşi düşürmek için kullanılmıştır (Zhang ve ark., 2010). Bununla birlikte, kapsamlı araştırmalar, *P.koraiensis*'ten elde edilen çam kozalağının, antitümör, antiinflamatuvar, antibakteriyel ve antioksidan aktivitelere sahip flavonoidler, polisakkaritler ve fenolik bileşikler gibi çeşitli biyoaktif maddelere sahip olduğunu göstermiştir (Wang ve Hong, 2016; Yive ark., 2017).

*Pinus* ekstresi terpenoidler, steroidler, prosiyanidinleri ve flavonoidleri içermektedir (Lantto ve ark., 2009). Bu bileşikler üzerinde antibakteriyel, antifungal ve yara iyileştirme aktivitelerini ortaya çıkaran çeşitli biyolojik aktivite çalışmaları yapılmıştır (Smith ve ark., 2005; Suntar ve ark., 2012). Çam kozalaklarından elde edilen ekstraktların, reaktif oksijeni süpürücü etkisinin olduğu ve serum lipidlerini düşürdüğü bildirilmiştir (Kwak ve ark., 2006; Kartal ve Öztürk, 2016). Oksidatif stresten kaynaklanan süperoksit anyon, hidroksil ve ABTS+ radikalleri dahil olmak üzere reaktif oksijen türleri hücreler, dokular ve organlardaki biyolojik makromoleküllere saldırabilir. Hücrelerdeki yüksek reaktif oksijen konsantrasyonları, diyabet, ateroskleroz, kanser, nörodejenerasyon ve yaşlanma gibi hastalıkların olasılığını artırır (Xu ve ark., 2016). Bu nedenle, aşırı reaktif oksijenin *invivo* olarak temizlenmesi, canlı organizmalara önemli bir koruma sağlar (Fanve ark., 2012). Genellikle polisakkaritler, yapı ile ilişkili antioksidan aktiviteye sahiptirler. Üç boyutlu konformasyonları kadar, moleküler ağırlık, monosakkarit bileşimi, glikosidik bağların tipi ve dallanma derecesi gibi yapısal özellikler, polisakkaritlerin biyolojik aktivitesi ile ilgilidir (Jia ve ark., 2015; Miao ve ark., 2020). Zhang ve ark., (2017), *P.koraiensis*'in farklı fraksiyonlarından polisakkaritleri izole ederek karakterize etmişlerdir. Çam kozalaklarından ekstrakte edilen polisakkaritlerin, kabuk ve iğnelere elde edilenlere kıyasla daha iyi antioksidan aktiviteye sahip olduğunu, *P.koraiensis*'ten elde edilen polisakkaritlerin *invitro* antioksidan özelliklerinin, fizikokimyasal özellikleriyle ilişkili olduğu bulmuşlardır. Daha önce de Meng (2010), *P.koraiensis*'in çam kozalaklarından ekstrakte edilen ham polisakaritlerin antioksidan aktivitesini incelemiş ve polisakkaritlerin önemli ölçüde serbest radikal temizleme kabiliyetine sahip olduğunu ve ABTS+ radikaliyle IC<sub>50</sub> değerinin 28.0 mg/mL olduğunu belirtmiştir. Başka bir çalışmada dakademeli etanol çöktmesi kullanılarak izole edilen beş polisakkarit fraksiyonunun, *invitro* olarak güçlü radikal temizleme yeteneği ve antiproliferasyon etki gösterdikleri belirtilmiştir (Zou ve ark., 2013).

Yapılan çalışmalarda ülkemizde yetişen bazı çam türlerinin kök, gövde, kozalak, dal, sürgünlerinden elde edilen ekstraktların da antimikrobiyal (Kızıl ve ark., 2002, Eryılmaz ve ark., 2016), yara iyileştirici ve antiinflamatuvar aktivite (Tümen, 2010) ile antikarsinogenik etki (Aydın, 2013) gösterdikleri belirlenmiştir.

### **Kabuk**

Kabuk fraksiyonunun, biyoaktif bileşikler açısından genellikle yüksek içerik gösterdiği bilinmektedir. Bileşenleri arasında, patojen istilasını geciktirme veya önleme gibi farklı fonksiyonlara

sahip maddeler, depo rezerv maddeleri ve bitkisel hormonlar bulunabilir. Farklı bitkilerden elde edilen ağaç kabuklarının, hastalıkları önleme ve tedavi için tıbbi değerli ürünler elde etmede kullanıldığı bilinmektedir. Örneğin, asetillenmiş formu aspirin olan salisilik asit, *Salix alba* kabuğundan elde edilir. Birkaç yıl öncesine kadar orman endüstrisi atığı olarak görülmesine rağmen, çam ağacı kabuğu da bu bağlamda, yeni biyomedikal bileşikler için ilginç bir kaynak olarak görülmektedir. Çam ağaçlarının kabuk kısmının, terebentin reçinesi ve tanen kaynağı olduğu (Zhang ve ark., 2021), eski dönemlerden bu yana öksürük şurubu olarak, inflamatuvar hastalıklarda, kanamaların önlenmesinde, yaraların ve diş ağrılarının tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir.

Çam ailesinin 100'den fazla türü arasında, sahil çamı olarak da bilinen *Pinus pinaster* beslenme ve tıbbi amaçlar için en çok kullanılan türdür. *P. pinaster* Güney Fransa, İspanya, İtalya, Portekiz ve Fas'ta yaygın olarak bulunurken, Cezayir, Malta ve İran'ın kuzeyinde küçük popülasyonlar halinde bulunabilmektedir. Amerika'da "United States Pharmacopeia (USP)" da diyet takviyesi olarak kabul gören, sahil çam (*P. pinaster*) kabuğu ekstresi, karanlıkta ve kuru bir yerde muhafaza edildiğinde stabil kahverengi bir tozdur (Maimoona ve ark., 2011). Günümüzde *P. pinaster*'den ticari olarak da temin edilebilen, tescilli markaya sahip ve pek çok ülkede regülasyonlarca kabul görmüş Pycnogenol® ve Flavangenol® olmak üzere iki farklı ekstrakt bulunmaktadır. Fransa'nın güneybatı sahillerinde yetişen *P. pinaster* (*Pinus maritima*)'in kabuklarından elde edilen, prosiyanidinler ve fenolik asitler başta olmak üzere flavonoid/polifenol yapısında bir bitki ekstresi olan Pknogenol'un, gıda takviyesi olarak dünya çapında oral tüketimi bulunmaktadır. Bu ekstraktın toplam kompozisyonunun yaklaşık %65-75'i, insan sağlığı için faydalı olarak kabul edilen çeşitli zincir uzunluğuna sahip prosiyanidin-kateşin ve epikateşin parçalarıdır (Rohdewald, 2002). Minor olarak bulunan diğer bileşenleri, polifenolik monomerler, fenolik veya hidrokisisinamik asitler ve bunların glikozitleridir (Kurlbaum ve Hogger, 2011). Pknogenol, kabuğun su ve alkolle ekstrakte edilmesiyle elde edilmekte ve tüm dünyada besin takviyesi ve çeşitli hastalıklar için fitokimyasal olarak kullanılmaktadır. Bu ekstrakt, uzun süredir açık yaraları ve cilt hasarını iyileştirmek ve skorbüt hastalığını önlemek için de kullanılmaktadır (Ohkita ve ark., 2011). Kılcal geçirgenliği arttırdığı, askorbil radikalini yenileyebildiği ve endojen E vitamini ve glutasyonu oksidatif strese karşı koruyabildiği için dolaşım problemlerinin tedavisinde ve kardiyovasküler faydaları için de kullanılmaktadır (Marmol ve ark., 2019). Sahil çam kabuğu ekstresi hakkında yapılan *invitro* ve *invivo* çalışmalar terapötik etkinliğini desteklerken, yüksek antioksidan ve antiinflamatuvar etkisini ortaya çıkarmış, kardiyovasküler ve solunum yolu hastalıklarında, diyabette glisemik indeks kontrolü, alerji, kramp ve kas ağrıları gibi çeşitli fizyolojik rahatsızlıklarda koruyucu veya destekleyici tedavide yer bulabileceği belirtilmektedir (Becit ve ark., 2017).

Öte yandan, Flavangenol® ise, kabuğun sıcak suyla ekstrakte edilmesiyle elde edilmekte ve oligomerik proantosiyandinleri içermektedir (Shimada ve ark., 2012). Flavangenol®'ün UV'nin neden olduğu cilt kanseri üzerinde önleyici ve antihipertansif etkiye sahip olduğu, böbrek bozukluğu ve arteriyoskleroz bastırıcı, düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu önleyici etkileri olduğu bilinmektedir. Pycnogenol® ve Flavangenol® gibi ticarileşmiş ürünler, bir ormancılık endüstrisi yan ürününün, farklı türden ekstraksiyon yöntemleriyle besin takviyesi olarak ikinci bir şansa sahip olabileceğinin iyi bir göstergesidir.

Diğer çam türleri de hem farmasötik hem de gıda endüstrisinde büyük potansiyel gösterdiği için, *Pinus spp.*'nin biyolojik özellikleri yalnızca *P. pinaster* türü ile sınırlı değildir. Yeşil-Çelikleş ve ark., (2009), *P. nigra*, *P. pinea*, *P. brutia* ve *P. sylvestris*'ten elde edilen ağaç kabuğu özlerinin fenolik ve biyolojik aktivitelerini analiz etmişler, *P. brutia* ve *P. nigra*'da, *P. sylvestris* ve *P. pinea*'dan daha yüksek içerik fenolik içerik ve bileşimde önemli farklılıklar bulmuşlardır. Radikal süpürme aktivitesi; *P. pinea*'da en yüksek seviyede (%88.6) iken, onu *P. nigra* (%87.2) ve *P. brutia* (%86.4) izlemiştir.

Geleneksel Türk tıbbında ise *P. nigra* subsp.*pallasiana* ve *P.sylvestris*, yara tedavisinde harici olarak kullanılmakta, ayrıca sığırlarda solucan tedavisinde ve kaynatılmış ekstraktı hemoroit, diyabet, karaciğer hastalıkları, soğuk algınlığı, bronşit, karın ağrısı ve ciltteki mantar enfeksiyonlarının tedavisinde de kullanılmaktadır (Ari ve ark., 2017). Ayrıca bitkinin katranı deri hastalıkları, egzama, osteomyelit ve viral enfeksiyonları tedavi etmek ve aynı zamanda keçileri parazitlerden korumak için de kullanılmaktadır (Ari ve ark., 2014; Ari ve ark., 2015; Ari ve ark., 2018).

### ***Diğer çam fraksiyonları***

Çam türlerinin yalnızca kabuk ve kozalakları değil, iğne, fıstık, sürgün, polen gibi farklı fraksiyonları da değişik amaçlarla kullanılmakta, çam terementisi, katran, sakız, tomurcuk gibi çok değişik ürünler de elde edilmektedir. Çam katranında fenol türevleri ve reçine asidi, çam sakızında kolofan ve reçine asidi, çam tomurcuğunda uçucu yağ ve reçineli maddeler, çam fıstığında sabit yağ, protein ve selüloz bulunur. *Pinus koraiensis*'in tohumu olan çam fıstığı, tüm dünyada yemeklerde, tatlılarda ve çerezlerde yaygın olarak kullanılmaktadır ve aynı zamanda iyi bilinen tıbbi bitkisel bir kaynaktır (Qu ve ark., 2019). Modern farmakolojik çalışmalar, çam fıstığının hiperlipidemi ve hipertansiyonu tedavi etmek için (Asset ve ark., 1997), yorgunluk ve iltihap önleyici, yaşlanma karşıtı (Su ve ark., 2009) ve antioksidan (Liang ve ark., 2018) olarak tüketilebileceğini göstermiştir. Bildirilen bu biyoaktiviteler, çoğunlukla çam fıstığında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerine ve peptitlere bağlanmaktadır. Çam fıstığı yağı, doymamış yağ asidi, pinolenik asit- (cis-5-cis-9-cis-12 oktadekatrienoik asit) içerir. Çam tozu olarak da bilinen çam poleni ise, geleneksel olarak balgam söktürücü ve dişeti kanamalarının önlenmesinde etkili olan değerli bir besin maddesi olarak kabul edilir. Ayrıca parçalanmış çam iğneleri kümes hayvanları yemi olarak kullanılmaktadır (Zhang ve ark., 2021). Yağrı veya yağırı olarak bilinen çam sakızı ise özellikle yaraların tedavisinde yara yüzeyinin kuruyarak çatlamasını önlemek ve yaranın yumuşak kalmasını sağlamak için yöresel olarak kullanılır. Karaçam reçinesinin halk arasında siğillere sürülerek düşmesini sağladığı bilinmektedir. Çam yağları, kozmetikte koku olarak, yiyecekler için tatlandırıcı katkı maddeleri olarak ve içecekler ile çeşitli ev ürünlerinde koku verici maddeler olarak kullanılmaktadır (Sezik ve ark., 2010; Üstün ve ark., 2016). Farklı çam türlerinin sürgünlerinden ise Anadolu'nun farklı yörelerinde çam reçeli ve çam pekmezi adı verilen ürünler üretilmekte, fonksiyonel nitelikleri nedeniyle tüketilmektedir. Çam fraksiyonlarının veya ekstraktlarının kullanımı dışında fonksiyonel özellikleri nedeniyle, gıdalarda kullanımına dair yapılmış farklı çalışmalar da vardır. Kartal ve Öztürk (2016) tarafından yapılan çalışmada çam kozalağı toz forma getirilerek alternatif bir lif kaynağı olarak kek ve bisküvi formülasyonlarında kullanılmış, %20 oranında kullanımının duyuşal olarak kabul edilebilir olduğu ve fırıncılık ürünlerinde besinsel lif olarak kullanım potansiyelinin bulunduğu belirtilmiştir. Fraksiyonlara dair yapılan çalışmaların yanı sıra, fraksiyonların bir arada kullanımına dair yapılan çalışmalarda vardır. Hajhashemi ve ark.(2021), *Pinus elderica*'nın kabuğunun hidroalkolik ekstraktı ile yaprak uçucu yağı karışımını hayvan modelinde denedikleri *invivo* çalışmada, karışımın antinosiseptif ve antiinflamatuvar etki gösterdiğini, ödemi giderdiğini, kronik ağrıyı gidermesinin yanında karışımın iltihabı da önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir.

### **SONUÇ**

Yapılan çalışmalarda farklı çam türlerinden elde edilen ekstraktların bileşim ve antioksidan aktivite bakımından çok farklı profillere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle gıda endüstrisindeki uygulamalar için farklı çam türlerinden hatta kabuk, kozalak gibi farklı fraksiyonlardan elde edilecek doğal antioksidan karışımların tasarımının faydalı olacağı düşünülmektedir. Çok yönlü kullanıma sahip olmasına rağmen, sınırlı araştırma geliştirme çalışmaları nedeniyle birçok çam kozalağı, kabuğu

gibi farklı fraksiyonlar yakacak olarak atılmakta ve bu da büyük miktarda kaynak israfına ve kayba neden olmaktadır. Farklı çam fraksiyonlarının kullanımı ile üretilmiş global pazardaki ticarileşmiş ürünler, ormancılık endüstrisi yan ürünlerinin, farklı türden ekstraksiyon yöntemleriyle besin takviyesi olarak ikinci bir yaşama sahip olabileceğinin en iyi kanıtıdır. Ülkemizin bu alanda sahip olduğu büyük ekolojik sistem ve kaynaklar ile günümüz tüketicisinin gıda ve katkı maddelerinden fonksiyonellik ve doğallık beklentisi göz önüne alındığında, yapılacak araştırmaların gıda sektörüne büyük katkı sağlayacağı açıktır. Diğer taraftan, gıda takviyesi olarak diyeteye veya katkı olarak gıdalara eklenebilecek çam ekstraktlarını elde etmek için kullanılan yöntemlerin, çözenlerin ve toksikolojik etkilerin de göz önünde bulundurulması gerektiği düşünülmektedir.

### Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

### Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

### KAYNAKLAR

- Ahn J, Grün IU, Fernando LN, 2002. Antioxidant properties of natural plant extracts containing polyphenolic compounds in cooked ground beef. *Journal of Food Science*, 67(4): 1364–1369.
- Altaş S, 2009. *Cedrus libani* (sedir) ve *Abies cilicia* (köknar) reçine özütlerinin antimikrobiyal ve antioksidant aktivitelerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Diyarbakır Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 1-146.
- Ari S, Kargiöglu M, Temel, M Konuk M, 2014. Traditional tar production from the Anatolian Black Pine [*Pinus nigra* Arn. subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe var. *pallasiana*] and its usages in Afyonkarahisar, Central Western Turkey. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10: 29
- Ari S, Kargiöglu M, Yildirim HI, Konuk M, 2018. An ethnobotanical approach to animal diseases and biological control in Antalya: Southern Turkey. *Indian Journal of Traditional Knowledge (IJTK)*. 17, 59–70.
- Ari S, Temel M, Kargiöglu M, Konuk M, 2015. Ethnobotanical survey of plants used in Afyonkarahisar-Turkey. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 11:84.
- Ari S, Temel M, Konuk M. 2017. An ethnobotanical approach to MRSA (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) in Western Anatolia: a case of Afyonkarahisar. *Indian Journal of Traditional Knowledge (IJTK)*. 16: 35–43.
- Asset G, Wolff R L, Bauge E, Fruchart JC, Dallongeville J, 1997. 91Δ5 olefinic acids extracted from pine tree seeds decrease serum triglyceride levels in rats. *Atherosclerosis*, 130:24.
- Aydin E, Türkez H, Geyikoğlu F, 2013. Antioxidative, anticancer and genotoxic properties of α-pinene on N2a neuroblastoma cells. *Biologia*, 68: 1004–1009.
- Basholli-Salih M, Schuster R, Hajdari A, Mulla D, Viernstei H, Mustafa B, et al, 2017. Phytochemical composition, anti-inflammatory activity and cytotoxic effects of essential oils from three *Pinus* spp. *Pharmacien Biologiste*, 55(1): 1553–1560. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1309555>
- Bak F, Çifci K, 2020. Artvin'in merkez köylerinde bazı tıbbi bitkilerin yöresel kullanımları. *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi* 318-329.
- Becit M, Aydın S, Başaran N, 2017. İnsan Sağlığında Pknogenol: Bir Genel Derleme, *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(2):125-138.
- Belcaro G, Cornelli U, Luzzi R, Cesarone, MR, Dugall, M. Feragalli B, et al. 2013. Pycnogenol® supplementation improves health risk factors in subjects with metabolic syndrome. *Phytotherapy Research*, 27(10): 1572–1578. <https://doi.org/10.1002/ptr.4883>.
- Belcaro, G, Feragalli, B, Hosoi M, Dugall M, Cornelli, U 2016. Pycnogenol® reduces the wheal and flare response to histamine in normal subjects. *Minerva Biotechnologica*, 28(2): 114–119.

- Belcaro, G., Luzzi, R., Hu, S., Cesarone, M. R., Dugall, M., Ippolito, E., ... Caporale, S. 2014. Improvement in signs and symptoms in psoriasis patients with Pycnogenol® supplementation. *Panminerva Medica*, 56(1): 41–48
- Burchi, F., Fanzo, J. and Frison, E. 2011. The role of food and nutrition system approaches in tackling hidden hunger. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8, 358–373.
- Charles, D. J. (Ed.). 2013. *Antioxidant properties of spices, herbs and other sources*. New York: Springer.
- Chayasirisobhon, S. 2013. Efficacy of *Pinus radiata* bark extract and vitamin C combination product as a prophylactic therapy for recalcitrant migraine and long-term results. *Acta Neurol Taiwan*, 22(1), 13–21 doi:10196099/221013
- Cheng MC, Chang WH, Chen CW, Li WW, Tseng CY, SongTY,2015. Antioxidant properties of essential oil extracted from *Pinus morrisonicola* hay needles by supercritical fluid and identification of possible active compounds by GC/MS. *Molecules*, 20(10), 19051–19065. <https://doi.org/10.3390/molecules201019051>
- Eryilmaz M., Tosun A. and Tümen İ. 2016. Antimicrobial activity of some species from *Pinaceae* and *Cupressaceae*. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 35-40.
- Esmaeili S, Dayani L, Taheri A, Zolfaghari B,2021. Phytochemical standardization, formulation and evaluation of oral hard gelatin capsules from *Pinus eldarica* bark extract. *Avicenna journal of phytomedicine*. 11(2):168-179.
- Fan, L. P., Li, J. W., Deng, K. Q., and Ai, L. Z. 2012. Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1849–1854.
- Fradinho, D. M., Pascoal-Neto, C., Evtuguin, D., Jorge, F. C., Irle, M. A., Gil, M. H., et al. 2002. Chemical characterisation of bark and of alkaline bark extracts from maritime pine grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*, 16: 23–32.
- Frontela-Saseta, C, Lopez-Nicolas R, Gonzalez-Bermudez CA, Peso-Echarri P, Ros-Berruezo G, Martinez-Gracia C, ...Virgili F,2011. Evaluation of antioxidant activity and antiproliferative effect of fruit juices enriched with Pycnogenol® in colon carcinoma cells. The effect of in vitro gastrointestinal digestion. *Phytotherapy Research*, 25(12): 1870–1875. <https://doi.org/10.1002/ptr.3625>.
- Guan Y, Zhang DW, Liu W, Hao LL, Liu SC, 2012. Research advance of natural polysaccharide in *Pinus*. *Journal Anhui Agricultural Sciences*, 40(25): 12357–12359.
- HanY, Yu M, Wang L, 2018. Bio-based films prepared with soybean by-products and pine (*Pinus densiflora*) bark extract, *Journal of Cleaner Production*, 187, 1-8
- Hajhashemi V, Zolfaghari B, Amin P, 2021. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and essential oil of *Pinus eldarica* in animal models. *Avicenna journal of phytomedicine*. 11(5):494-504. doi:10.22038/AJP.2021.18038
- Iglesias J, Pazos M, Lois S, Medina I,2010. Contribution of galloylation and polymerization to the antioxidant activity of polyphenols in fish lipid systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12): 7423–7431. <https://doi.org/10.1021/jf100832z>.
- Iravani S, Zolfaghari B,2014. Phytochemical analysis of *Pinus eldarica* bark. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 9(4): 243–250.
- Jerez M, Pinelo M, Sineiro J, Nuñez MJ,2006. Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark: Assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis. *Food Chemistry*, 94: 406–414.
- Jessberger S, Hogger P, Genest F, Salter DM, Seefried L,2017. Cellular pharmacodynamic effects of Pycnogenol® in patients with severe osteoarthritis: A randomized controlled pilot study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1): 537. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-2044-1>
- Jia XJ, Zhang C, Qiu, JF, Wang LL, Bao JL, Wang K, et al. 2015. Purification, structural characterization and anticancer activity of the novel polysaccharides from *Rhynchosia minima* root. *Carbohydrate Polymers*, 132: 67–71.
- Kartal E, Öztürk S,2016. Pine cone as an alternative dietary fiber source and its effect on cake and cookie quality, *Gıda*, 41 (5): 291-297

- Kaur C, Kapoor HC, 2001. Antioxidants in fruits and vegetables - the millenium's healt. International Journal of Food Science and Technology, 36:703–725.
- Kızıl M, Kızıl G, Yavuz M, Aytekin Ç, 2002. Antimicrobial activity of resins obtained from the roots and stems of *Cedrus libani* and *Abies cilicia*, Applied Biochemistry and Microbiology, 38: 144-146.
- Kim NY, Jang MK, Lee DG, Yu KH, Jang H, Kim M, Kim SG, Yoo BH, Lee SH. 2010. Comparison of methods for proanthocyanidin extraction from pine (*Pinus densiflora*) needles and biological activities of the extracts, 4(1): 16-22. <https://doi.org/10.4162/nrp.2010.4.1.16>
- Kocabas EEH, Yesil O, Isleten M, Sukan FV, 2008, Antimicrobial activity of pine bark extract and assessment of potential application in cooked red meat, Gıda, 33 (3): 123-127.
- Kozan E, Ilhan M, Tümen I, Küpeli Akkol E, 2019. The scolicidal activity of the essential oil obtained from the needles of *Pinus nigra* Arn. subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe on hydatid cyst, Journal of Ethnopharmacology, 235: 243–247. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.02.018>
- Kurlbaum M, Hogger P, 2011. Plasma protein binding of polyphenols from maritime pine bark extract (USP). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 54(1): 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.07.038>
- Kwak CS, Moon SC, Lee MS, 2006. Antioxidant, antimutagenic, and antitumor effects of pine needles (*Pinus densiflora*). Nutrition and Cancer, 56: 162-171.
- Lantto TA, Dorman HJD, Shikov AN, Pozharitskaya ON, Makarov VG, Tikhonov VP, Hiltunen RAR, 2009. Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of a Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) extract. Food Chemistry. 112: 936–943.
- Liang R, Cheng S, Wang X, 2018. Secondary structure changes induced by pulsed electric field affect antioxidant activity of pentapeptides from pine nut (*Pinus koraiensis*) protein. Food Chemistry, 254: 170–184
- Maimoona, A., Naeem, I., Saddiqe, Z. and Jameel, K. 2011. A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. Journal of Ethnopharmacology, 133(2): 261–277. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.041>
- Mármol I, Quero J, Jiménez-Moreno N, Rodríguez-Yoldi MJ, Ancín-Azpilicueta C, 2019. A systematic review of the potential uses of pine bark in food industry and health care, Trends in Food Science & Technology 88: 558–566.
- Meng Q, 2010. Separation, purification and bioactivity of polysaccharide from pine cone of *Pinus koraiensis*. Master Thesis. Harbin, Heilongjiang, China: Harbin Institute of Technology.
- Miao JN, Regenstein JM, Qiu, JQ, Zhang JQ, Zhang XP, Li HX, et al, 2020. Isolation, structural characterization and bioactivities of polysaccharides and its derivatives from *Auricularia*-A review. International Journal of Biological Macromolecules, 150: 102–113.
- Muchova J, Orszaghova Z, Zitnanova I, Trebaticky B, Breza J, Durackova Z, 2014. The effect of natural polyphenols on the oxidative stress markers in patients with diabetic nephropathy. Free Radical Biology and Medicine, 75(1): S42. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.795>
- Nisca A, Ștefănescu R, Stegăruș DI, Mare AD, Farczadi L, Tanase C, 2021. Comparative study regarding the chemical composition and biological activity of pine (*Pinus nigra* and *P. sylvestris*) bark extracts. Antioxidants. 10(2):327. <https://doi.org/10.3390/antiox10020327>
- Ohkita M, Kiso Y, Matsumura, Y, 2011. Pharmacology in health foods: Improvement of vascular endothelial function by French maritime pine bark extract (Flavangenol). Journal of Pharmacological Sciences, 115(4): 461–465
- Özer A, Akdemir R, Yılmaz S, Yılmaz Ö, Arslan, N, 2015. Çankırı'nın Orman Köylerinde Odun Dışı Orman Ürünlerinin (ODOÜ) Geleneksel (Etnobotanik) Kullanımının Belirlenmesi ve Değerlendirilmesi. İç Anadolu Ormancılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü.
- Qu H, Gao X, Zhao HT, Wang ZY, Yi JJ, 2019. Structural characterization and in vitro hepatoprotective activity of polysaccharide from pine nut (*Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc.), Carbohydrate Polymers, 223: 115056. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115056>

- Pipingas A, Silberstein RB, Vitetta L, Rooy CV, Harris EV, Young JM, ... Nastasi J,2008. Improved cognitive performance after dietary supplementation with a *Pinus radiata* bark extract formulation. *Phytotherapy Research*, 22(9): 1168–1174. <https://doi.org/10.1002/ptr.2388>.
- Roberfroid M,2002. Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease*, 34(2): 105–110.
- Rohdewald P, 2002. A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *International Journal of Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 40(4): 158–168.
- Ross SM,2016. Allergic rhinitis: A proprietary extract of *Pinus pinaster* Aiton (Pycnogenol) is found to improve the symptoms associated with allergic rhinitis. *Holistic Nursing Practice*, 30(5): 301–304. <https://doi.org/10.1097/HNP>.
- Sadeghi M, Zolfaghari B, Jahanian-Najafabadi A, Abtahi SR,2016. Anti-pseudomonas activity of essential oil, total extract, and proanthocyanidins of *Pinus eldarica* Medw. bark. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 11(1): 58–64.
- Sezik A, Ustun O, Demirci B, Başer KHC,2010 Composition of the essential oils of *Pinus nigra* Arnold from Turkey. *Turkish Journal of Chemistry*, 34: 313–325.
- Shahidi F,2004. Functional foods: Their role in health promotion and disease prevention. *Journal of Food Science*, 69(5): 146–149.
- Sharma A, Goyal R, Sharma L,2016. Potential biological efficacy of *Pinus* plant species against oxidative, inflammatory and microbial disorders. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16:35. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1011-6> 10.
- Shimada T, Tokuhara, D, Tsubata M, Kamiya T, Kamiya-Sameshima M, Nagamine R, ... Aburada M,2012. Flavangenol (Pine bark extract) and its major component procyanidin B1 enhance fatty acid oxidation in fat-loaded models. *European Journal of Pharmacology*, 677(1–3): 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.12.034>
- Smith E, Williamson E, Zloh M, Gibbons S,2005. Isopimaric acid from *Pinus nigra* shows activity against multidrug-resistant and EMRSA strains of *Staphylococcus aureus*. *Phytotherapy Research*. 19, 538–542.
- Stuard S, Belcaro G, Cesarone MR, Ricci A, Dugall M, Cornelli U, ... Rohdewald PJ,2010. Kidney function in metabolic syndrome may be improved with Pycnogenol®. *Panminerva Medica*, 52(2 Suppl. 1): 27–32 R41102518
- Su, X.-Y., Wang, Z.-Y. and Liu, J.-R. 2009. In vitro and in vivo antioxidant activity of *Pinus koraiensis* seed extract containing phenolic compounds. *Food Chemistry*,117(4): 681–686
- Suntar I, Tumen I, Ustun O, Keles H, Akkol EK,2012. Appraisal on the wound healing and anti-inflammatory activities of the essential oils obtained from the cones and needles of *Pinus* species by in vivo and in vitro experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*. 139: 533–540.
- Theadom A, Mahon, S., Barker-Collo, S., McPherson, K., Rush, E., Vandal, A. C., et al. 2013. Enzogenol for cognitive functioning in traumatic brain injury: A pilot placebo- controlled RCT. *European Journal of Neurology*, 20(8): 1135–1144. <https://doi.org/10.1111/ene.12099>.
- Touriño S, Selga A, Jimenez A, Julia L, Lozano C, LizarragaD, ... Torres JL,2005. Procyanidin fractions from pine (*Pinus pinaster*) bark: Radical scavenging power in solution, antioxidant activity in emulsion, and antiproliferative effect in melanoma cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12): 4728–4735. <https://doi.org/10.1021/jf050262q>
- Tumen I, Hafizoglu H, Kilic A, Dönmez IE, Sivrikaya H, Reunanen M,2010. Yields and Constituents of Essential Oil from Cones of Pinaceae spp. Natively Grown in Turkey. *Molecules*, 15: 5797-5806
- Ustun O, Sezik E., Kurkcuoglu M. and Baser K. H. C. 2006. Study Of The Essential Oil Composition Of *Pinus sylvestris* From Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 42, No. 1
- Valls RM, Llauro E, Fernandez-Castillejo S, Puiggros F, Sola R, Arola L, et al, 2016. Effects of low molecular weight procyanidin rich extract from French maritime pine bark on cardiovascular disease risk

- factors in stage-1 hypertensive subjects: Randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention trial. *Phytomedicine*, 23(12): 1451–1461. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.08.007>
- Vuorela S, Salminen H, Makela M, Kivikari R, Karonen M, Heinonen M, 2005. Effect of plant phenolics on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22): 8492–8497. <https://doi.org/10.1021/jf050995a>.
- Wang T, Hong M, 2016. Solid-state NMR investigations of cellulose structure and interactions with matrix polysaccharides in plant primary cell walls. *Journal of Experimental Botany*, 67(2): 503–514.
- Willcox JK, Ash, S. L. and Catignani, G. L. 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 275–295. <https://doi.org/10.1080/10408690490468489>
- Xu Z, Wang HD, Wang BL, Fu L, Yuan M, Liu J, et al, (2016). Characterization and antioxidant activities of polysaccharides from the leaves of *Lilium lancifolium* Thunb. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92: 148–155.
- Yen GC, Duh PD, Huang DW, Hsu CL, Fu TY, 2008. Protective effect of pine (*Pinus morrisonicola* Hay.) needle on LDL oxidation and its anti-inflammatory action by modulation of iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1): 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.07.012>
- Yesil Celiktas O, Isleten M, Vadar-Sukan F, Oyku C, 2010. In vitro release kinetics of pine bark extract enriched orange juice and the shelf stability. *British Food Journal*, 112: 1063–1076
- Yesil-Celiktas O, Ganzera M, Akgun I, Sevimli C, Korkmaz KS, Bedir E, 2009. Determination of polyphenolic constituents and biological activities of bark extracts from different *Pinus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(8): 1339–1345.
- Yi J, Qu H, Wu YZ, Wang ZY, Wang L, 2017. Study on antitumor, antioxidant and immunoregulatory activities of the purified polyphenols from pinecone of *Pinus koraiensis* on tumor-bearing S180 mice in vivo. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94 (PartA): 735–744. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.071>
- Zhang H., Zou, P., Zhao, H., Qiu, J., Mac Regenstein, J. and Yang, X. 2021. Isolation, purification, structure and antioxidant activity of polysaccharide from pinecones of *Pinus koraiensis*, *Carbohydrate Polymers*, 251: 117078. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117078>
- Zhang H, Zhao HT, Yao L, Yang X, Shen SY, et al, 2017. Isolation, physicochemical properties, and in vitro antioxidant activity of polysaccharides extracted from different parts of *Pinus koraiensis*. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 37(1–3): 225–240, <https://doi.org/10.1080/02773813.2016.1272125>
- Zhang Z, Xiao, H., Jiao, C. X. and Liu, G. M. 2010. Studies on chemical constituents from *Pinus armandi* Franch. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 38(24): 13258–13259,
- Zou P, Yang X, Huang WW, Zhao HT, Wang J, Xu RB, et al, 2013. Characterization and bioactivity of polysaccharides obtained from pine cones of *Pinus koraiensis* by graded ethanol precipitation. *Molecules*, 18(8): 9933–9948. <https://doi.org/10.3390/molecules18089933>.



**Atf İçin:** Tozlu İ, Taşdemir V, Çelik A.G, Genç H, 2022. Sübstitüe Pirazol Karboksilik Asit Sentezi, Siklizasyonu ve Nükleofilik Yer Değiştirme Reaksiyonları İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 279-286.

**To Cite:** Tozlu I, Taşdemir V, Çelik A.G, Genç H, 2022. Synthesis, Cyclization and Nucleophilic Substitution Reactions of Substituted Pyrazole Carboxylic Acid. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 279-286.

### Sübstitüe Pirazol Karboksilik Asit Sentezi, Siklizasyonu ve Nükleofilik Yer Değiştirme Reaksiyonları

İsrafil TOZLU<sup>1</sup>, Volkan TAŞDEMİR<sup>2</sup>, Aycan GÜNER ÇELİK<sup>1</sup>, Hasan GENÇ<sup>1\*</sup>

**ÖZET:** Sübstitüe pirazol karboksilik asit 2a-b türevleri 2,3-furandion 1 ve benzaldehit hidrazon 11a-b elde edildi. Pirazol karboksilik asit türevleri asit klorürlerine 3a-b dönüştürüldü. Pirazol karboksilik asitin asit klorürü çeşitli alkoller, üre ve aminlerle reaksiyonundan karşılık gelen ester 6a-b, üre 7a-b ve amid 4a-b, 8a-b türevleri elde edildi. Ek olarak, amid türevlerinden (SOCl<sub>2</sub>/DMF) ile su çekilerek karşılık gelen nitril türevleri 5 elde edildi. Ayrıca pirazol karboksilik asit türevlerinin hidrazin ile siklizasyon reaksiyonlarından 9 ve dekarboksilasyonu sonucu 10 türevlerinin eldesi reaksiyonları araştırılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Siklizasyon, Dekarboksilasyon, Pirazol karboksilik asit, Pirazol.

#### Synthesis, Cyclization and Nucleophilic Substitution Reactions of Substituted Pyrazole Carboxylic Acid

**ABSTRACT:** Substituted pyrazole carboxylic acid 2a-b derivatives, obtained from 2,3-furandione 1 and benzaldehyde hydrazone 11a-b was converted via reactions of its acid chloride 3a-b. The corresponding ester 6a-b, urea 7a-b, and amide derivatives 4a-b, 8a-b were obtained from the reaction of the acyl chloride of the pyrazole carboxylic acid with various alcohols, urea, and amines. Additionally, the corresponding nitrile derivatives 5 were obtained by extracting water from the amide derivatives (SOCl<sub>2</sub> / DMF). Furthermore, cyclization reactions of substituted pyrazole carboxylic acid derivatives using hydrazine were investigated 9 and reaction of 2b decarboxylation product 10.

**Keywords:** cyclization, decarboxylation, pyrazole carboxylic acid, pyrazole.

<sup>1</sup>İsrafil TOZLU ([Orcid ID: 0000-0002-9402-2539](https://orcid.org/0000-0002-9402-2539)), Aycan GÜNER ÇELİK ([Orcid ID: 0000-0002-6333-4353](https://orcid.org/0000-0002-6333-4353)), Hasan GENÇ ([Orcid ID: 0000-0003-1454-3279](https://orcid.org/0000-0003-1454-3279)) Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Education, Department of Sciences, Van, Türkiye

<sup>2</sup> Volkan Taşdemir ([Orcid ID: 0000-0001-5836-784X](https://orcid.org/0000-0001-5836-784X)), Van Yüzüncü Yıl University, Muradiye Vocational School, Van, Türkiye

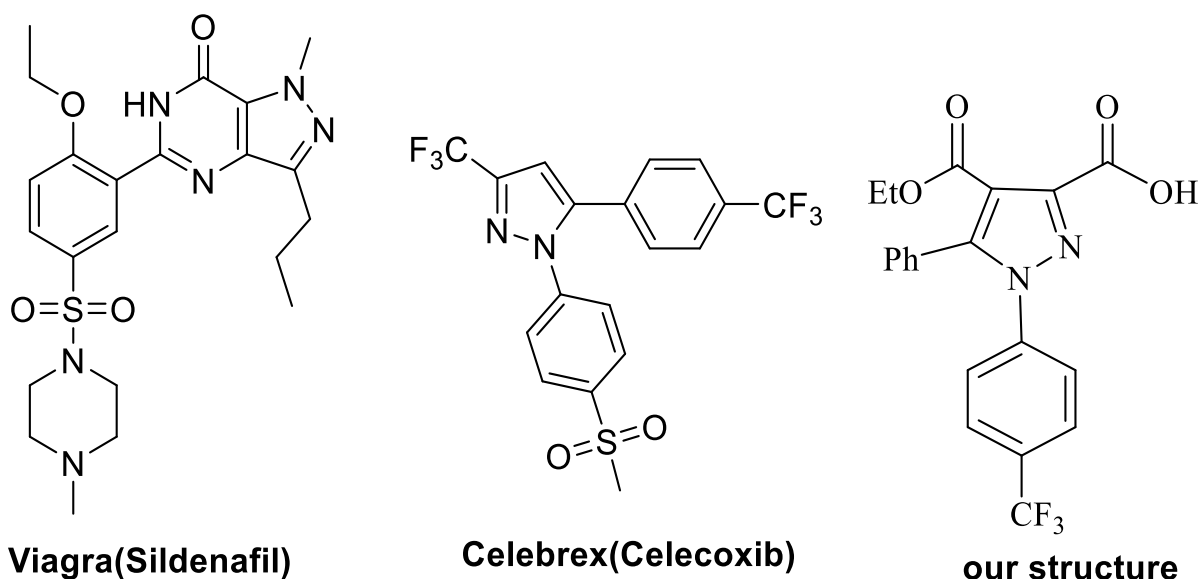
\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Hasan GENÇ, e-mail: h\_genc2000@yahoo.com

Bu çalışma 10 - 13 Eylül 2017 tarihlerinde Bakü'de "3rd INTERNATIONAL TURKIC WORLD CONFERENCE ON CHEMICAL SCIENCES AND TECHNOLOGIES" sözlü olarak sunulmuştur.

## INTRODUCTION

The reaction of 2,3-furandiones in apolar solvents with various hydrazines and hydrazones at 70–80 °C directly produces pyrazole-3-carboxylic acids (Şener et al., 2007). Through the investigation of advanced reactions, various derivatives of pyrazole skeletons, such as ester, amide, ureide, nitrile, pyrazolopyridazine, and their new derivatives, have been synthesized (Şener et al., 2002; Yıldırım et al., 2005; Şener et al., 2008; Korkusuz and Yıldırım, 2011). Today, pyrazole carboxylic acids and their derivatives have various bioactive properties such as antidiabetic, antiviral, antiobesity, anticancer, and antibacterial (Kamal et al., 2015), and their pyridazinone-containing compounds have cardiovascular, anti-inflammatory, and antiseptic properties (Frizzo et al., 2013), which have various applications in the agricultural and pharmaceuticals areas (Joule and Mills, 2010; Matyus, 1998; Tewari and Mishra, 2001).

Carbon-fluorine bonds are necessary pharmacophore units in medicine and are found in naturally occurring organic molecules (Harper et al., 2003) (Figure 1). Furthermore, most pharmaceutical and chemical products that possess fluorine atoms show biological activities and can be used in agriculture (Hagmann, 2008; Banks et al., 1994). In this work, we aimed to prove the reproducibility of the reaction of substituted pyrazole-3-carboxylic acid 2 a-b to produce some known and unknown pyrazole derivatives (Şener et al., 2004; Bildirici et al., 2009). This work is concerned with the synthesis and various reactions of heterocyclic compounds containing a new pyrazole ring (Akçamur et al., 1986; Shawali, 1977).



**Figure 1.** Essential medicines which include pyrazole and CF<sub>3</sub> groups and our structure

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

All chemicals and solvents were commercially obtained from Sigma-Aldrich with analytical grade. The solutions were distilled and dried with suitable agents. The Electrothermal Gallenkamp apparatus is used to determine the melting points. FT-IR (Thermo Nicolet iS10) spectra were determined in ATR mode. Elemental compositions of samples were obtained using a Thermo Scientific Flash 2000 machine. <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR spectra were recorded using a 400 MHz Agilent using TMS (tetramethylsilane) as the internal standard. All experiments were followed by TLC (thin layer chromatography) using DC Alufolien Kieselgel 60 F254 and a Camag TLC lamp (254/366 nm).

## Experimental procedure

### General procedure for 4-(ethoxycarbonyl)-aryl-5-phenyl-1H-pyrazole-3-carboxylic acid 2a-b

**I.** It was refluxed in 10 mL of dry benzene by adding **1** (4 ethoxycarbonyl-5-phenyl-2,3-furandione) and **11a-b** (benzaldehyde-phenyl hydrazone) in a stoichiometric ratio 1:1 ratio into a 50mL flask for 6 hours. TLC control defined the starting compounds finished and the product formed. Dry benzene was removed and treated with diethyl ether. The crude product was crystallized from toluene by filtration 0.218 g (60%) of **2**. M.p.: 165 °C.

**II.** In a 25 mL beaker, **1** and **11a-b** were mixed in a stoichiometric ratio with the help of a spatula in an oil bath at 110 °C for 40 minutes. The crude product was brought to room temperature and treated with diethyl ether. Then, the crude product was crystallized using toluene.

### General procedure for 3a-b

**I.** Compound **2a** (1 mmol) was soluted in excess of SOCl<sub>2</sub> (2 mL). The reaction flask was stirred at room temperature for 2 days. The resulting product was crystallized using toluene to get compound **3a**.

**II.** PCl<sub>5</sub> was added to the solution of compound **2b** (1mmol) in CCl<sub>4</sub> (10 ml). The mixture in the reaction chamber was heated to 80°C and stirred. It was observed that the starting material was finished after 4 hours by TLC. After removing the solvent, the crude product was crystallized with cyclohexane to form compound **3b**

### Ethyl 3-carbamoyl-aryl-5-phenyl-1H-pyrazole-4-carboxylate 4a-b

#### General Procedure

Aqueous ammonia (8 ml, 2 mmol) was added to a cold solution of acid chloride **3a-b** (1 mmol) in toluene at 0–5 °C, and the reaction flask was stirred for 24 h. The white precipitate was isolated by filtration and recrystallized using methanol.

### Ethyl 3-cyano-1-(3,4-dimethylphenyl)-5-phenyl-1H-pyrazole-4-carboxylate 5

To a mixture of DMF (1.4 ml) and SOCl<sub>2</sub> (0.30 ml) was added a cold solution of acid amide **4a** (1 mmol) at 0–5 °C for 24 h. After determining by TLC that the starting material was finished in the reaction mixture, the mixture was poured into ice in a 100 mL beaker. The solid product formed was crystallized in toluene by filtration 0.165 g (75%) of **5**.

### 4-Ethyl 3-methyl-aryl-5-phenyl-1H-pyrazole-3,4-dicarboxylate 6a-b

#### General Procedure

A cold solution of pyrazole acid **2a-b** (0.364 g, 1 mmol) in 3 drops sulfuric acid was added 10 mL in methanol with stirring. The reaction mixture was refluxed for 3 hours. When the starting material was finished, the mixture was filtered after cooling to 5 °C. The crude product obtained was crystallized from the same alcohol.

### Ethyl 1-(3,4-dimethylphenyl)-3-((methylcarbamoyl)carbamoyl)-5-phenyl-1H-pyrazole-4-carboxylate 7 a-b

#### General Procedure

Acid chloride **3a-b** and methyl urea were refluxed at a stereometric ratio of 1:2 in 10 mL xylene for 6 hours. When the starting material was finished, the reaction mixture was evaporated. The oily product obtained was treated with diethyl ether. It was crystallized in a mixture of methanol and ethanol(1:1).

### Ethyl 3-(benzylcarbamoyl)-1-(3,4-dimethylphenyl)-5-phenyl-1H-pyrazole-4-carboxylate 8 a-b

Acid chloride **3a** (0,150 g, 1 mmol) and benzyl amine (0.22 g, 2 mmol) were refluxed in toluene for about 5 h. After evaporation, the oily residue was treated with dry diethylether and the crude product was crystallized using by toluene to furnish compound **8**

### 2-(3,4-dimethylphenyl)-4-ethoxy-6-(2-nitrophenyl)-3-phenyl-2,6-dihydro-7H-pyrazolo[3,4-d]pyridazin-7-one **9a**

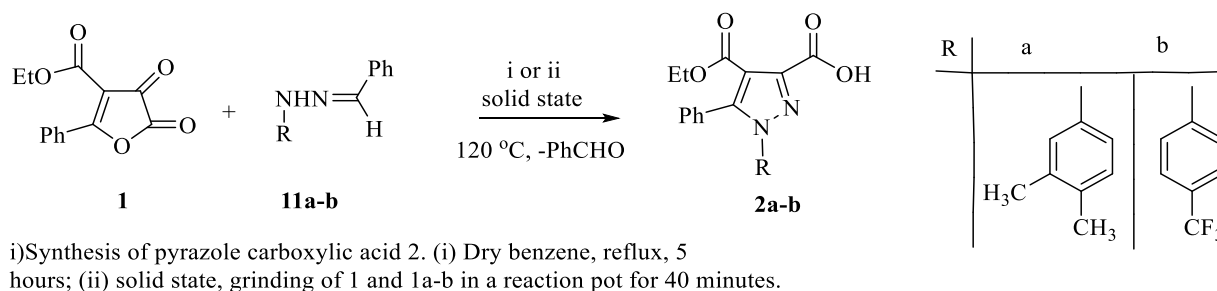
Compound **2a** (0.103 g, 1 mmol) and 2-nitrophenyl hydrazine (0.043 g, 1 mmol) were refluxed in 10 mL xylene for 5 h. Then, the white precipitated solid was filtered off and crystallized using xylene to form 0.108 g (80%) of compound **9**

### 5-phenyl-1-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-pyrazole **10**

The **2b** (0.404 g, 1 mmol) molecule was taken into a 25 mL beaker mixed with a spatula in the oil bath and heated for 45 minutes to 240 °C. The reaction was brought to room temperature and treated with cyclohexane.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Adsorption** In this investigation, 4-ethoxycarbonyl-5-phenyl-2,3-furandione **1** (Yıldırım et al., 1995; Kappe et al., 1995) and (E)-1-benzylidene-2-(3,4-dimethylphenyl) hydrazone **1a** were refluxed in dry benzene for 6 hours to produce **2** (Akçamur et al., 1997; Tewari and Mishra, 2001; Mahajan al., 1991). When the reaction was carried out at 110 °C for 50 minutes in an oil bath in the absence of any solvent, the same substance was obtained more quickly and in greater yield (70%; Figure 2).



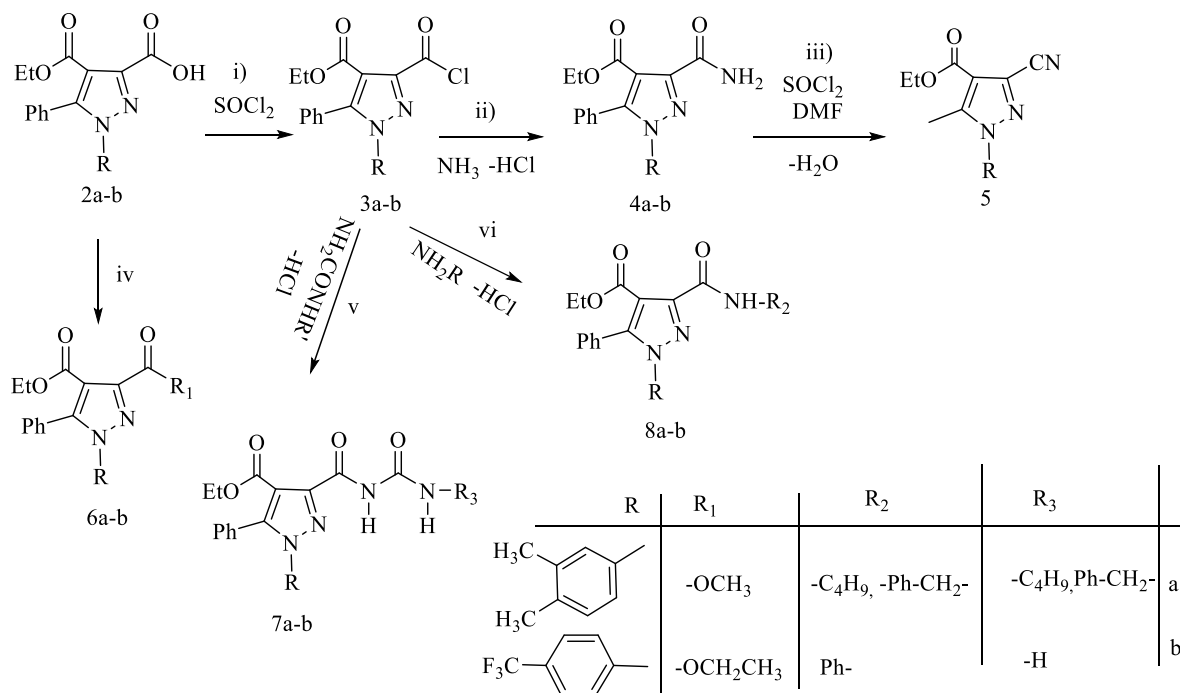
i) Synthesis of pyrazole carboxylic acid **2**. (i) Dry benzene, reflux, 5 hours; (ii) solid state, grinding of **1** and **1a-b** in a reaction pot for 40 minutes.

**Figure 2.** Proposed reaction mechanism for compound **2**

The reaction between compound **2** and ethyl alcohol using the Fischer esterification method gave compound **4** (Figure 3). Compound **2a** in excess thionyl chloride was stirred at room temperature for 3 days to produce acyl chloride **3a** (Şener et al., 2007; Genç et al., 2010). The acyl chloride was then reacted with different nucleophiles, such as benzylamine (for **7b**), n-butyl amine (for **7a**), methyl urea (for **8**), and ammonia (for **5**). Compound **5**, which contains an amide group, was reacted with a mixture of DMF and SOCl<sub>2</sub>, a water-removing reagent, resulting in compound **6**, which contains a nitrile unit.

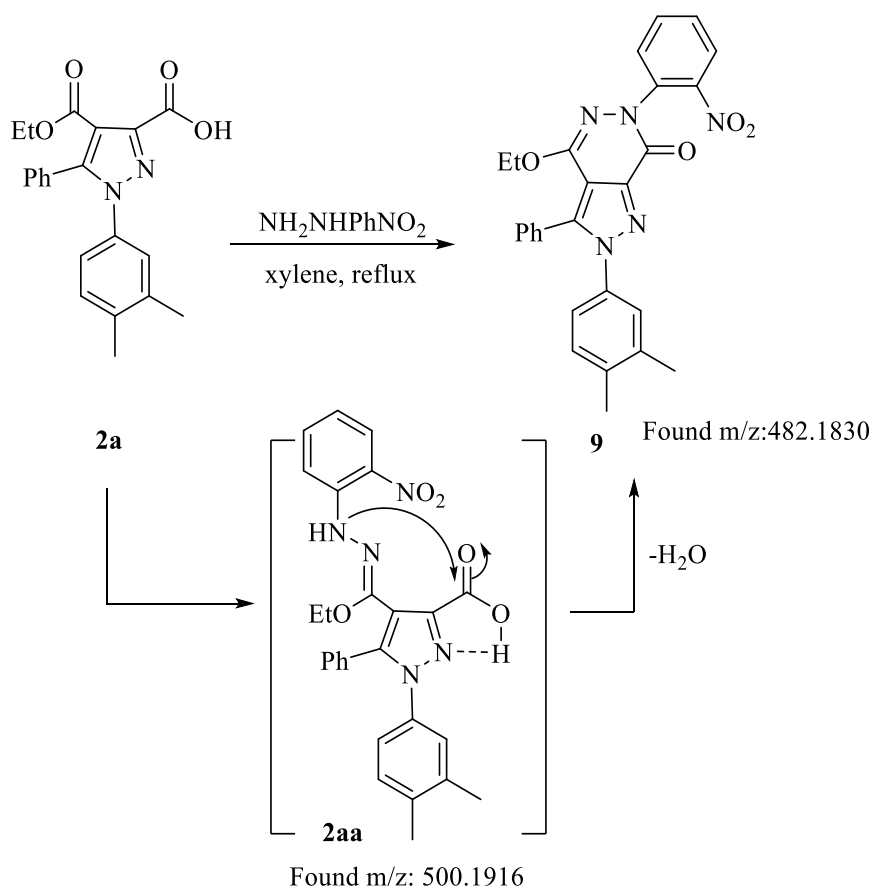
The ring closure reaction between compound **2a** and 2-nitro phenylhydrazine in xylene gave compound **9** (Şener et al., 2008; Tozlu et al., 2019) (Figure 4). Unexpectedly, the final product of the reaction was found to carry an EtO group on the pyridazinone ring. The final product, **9**, was confirmed by NMR data. To understand the forming of compound **9**, we have progressed the same reaction under 50 °C for 50 min. The experiment gave an intermediate which was confirmed by LC-MS/MS data. After increasing the temperature of reaction media to the reflux temperature of xylene, compound **9** was yielded, which was also confirmed by NMR and LC-MS/MS data (Figure 4).

Decarboxylation of **2b**, which possess ester and carboxylic acid, gave unexpected product resulting in C-3 and C-4 unsubstituted pyrazole ring (Figure 5). Previous decarboxylation reactions of the similar skeleton by us (Genç et al., 2019) and (Taslimi et al., 2019) did not give the same result as we have observed.

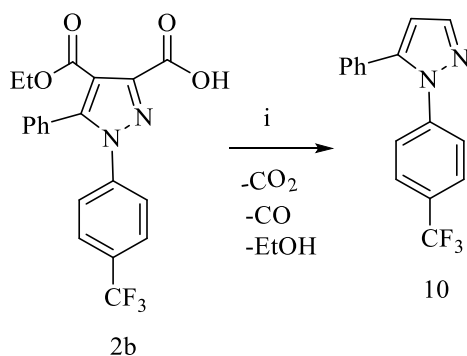


i) a) SOCl<sub>2</sub> (extreme) stirred for 3 days. b) PCl<sub>5</sub> in CCl<sub>4</sub> refluxed for 4 h, ii) add NH<sub>3</sub> at 0-5°C for 24h, iii) DMF+SOCl<sub>2</sub> stirred at 0-5°C for 24h, iv) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Alcohol, ref. 3h, v) urea refluxed in xylene for 5 vi) amine refluxed in toluene for 4h.

**Figure 3.** Further reactions of compound 2a-b



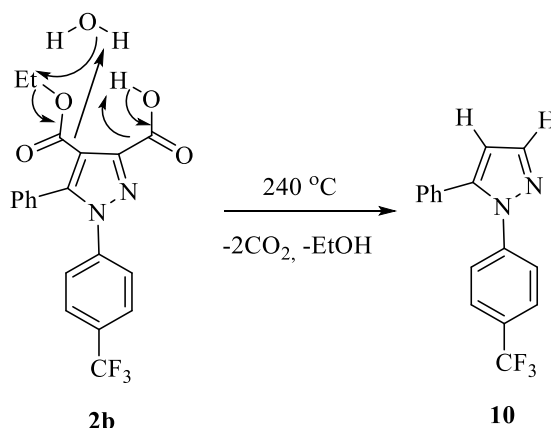
**Figure 4.** Synthesis of pyrazolopyridazine 9



i) stirred at 240°C for 40 min

**Figure 5.** Decarboxylation of 2b

In the literature, decarboxylation of malonic acid monoester gives ethyl acetate. The resonance structure of dicarbonyl molecules is the driving force for decarboxylation. However, in our decarboxylated product, either ester or carboxylic acid was removed from the ring. It might be due to the inductive effect of  $\text{CF}_3$  group (Figure 6). We have proposed that under high temperature, decarboxylation of carboxylic acid and ethoxy groups occurs simultaneously. We have progressed the reaction under open-air, and  $\text{H}_2\text{O}$  molecules assist it. We have assumed that after removing carbon dioxide from the ethoxy unit, water molecules attach to the Et group and protonated ethanol gives a proton to the C-4 position of pyrazole ring, which emerged the compound **10** (Baird, 2003). The driving force of this reaction might be a negative inductive effect of  $\text{CF}_3$ .



**Figure 6.** Proposed mechanism for decarboxylation of compound 2

## CONCLUSION

In this work, the reaction between 4-ethoxycarbonyl-5-phenyl-2,3-furandione **1** and two different hydrazone derivatives, one of them has  $\text{CF}_3$  group, in both solvent and solid-phase were investigated. Synthesis of novel derivatives with various functional groups from the obtained compound was achieved. Because the reaction of acid chloride can easily convert new functional groups with nucleophiles, the carboxylic acid was converted into acyl chloride. Spectroscopic studies carried out structural analysis of the synthesized pyrazole carboxylic acid derivatives. Besides the nucleophilic substitutions of the pyrazole carboxylic acid, pyrazolopyridazine derivatives bearing the nitrophenyl unit were formed. It is known that nitro phenylhydrazine derivatives exhibit biological activity with pyrazole carboxylic acid ring-forming derivatives.

## ACKNOWLEDGEMENTS

### Conflict of Interest

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

### Author's Contributions

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

## REFERENCES

- Akçamur Y, Penn G, Ziegler E, Sterk H, Kollenz G, Peters K, Peters E.M, 1986. Reactions of Cyclic Oxalyl Compounds. Reaction of 4-benzoyl-5-phenyl-furan-2,3-dione with Phenylhydrazones and Phenylhydrazine. *Monatsh Chemistry*, 117, 231-245.
- Akçamur Y, Şener A, Ipekoglu A.M, Kollenz G, 1997. Functionalization and Cyclization Reactions of 4-Benzoyl-1,5-diphenyl-1H-pyrazole-3-carboxylic Acid. *Journal Heterocyclic Chemistry*, 34, 221-224.
- Baird M.S, 2003. Thermally Induced Cyclopropene–Carbene Rearrangements: An Overview. *Chemical Reviews*, 103(4):1271-1294.
- Banks R.E, Smart S.E, Tatlow J.C, 1994. *Organofluorine Chemistry. Principles and Commercial Applications*: New York, Plenum: 52-200.
- Bildirici İ, Şener A, Atalan E, Battal A, Genç H, 2009. Synthesis and Antibacterial Activity of 4-benzoyl-1-(4-carboxy-phenyl)-5-phenyl-1H-pyrazole-3-carboxylic Acid and Derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, 18(5):327-340.
- Frizzo C. P, Villetti M.A, Tier A.Z, Gindri I.M, Buriol L, Rosa F.A, Claramunt R.M, Sanz D, Martins M.A.P, 2013. Structural and thermodynamic properties of new pyrazolo[3,4-d]pyridazinones. *Thermochimica Acta*. 574, 63-72.
- Genç H, 2009. Reaction of 4-Ethoxycarbonyl-5-phenyl-2,3-dihydro-2,3-furandione with Some Hydrazine Nucleophiles. *Asian Journal of Chemistry*, 21(1):299-303.
- Genç H, Tan M, Gümüş S, Mengeş N, Bildirici İ, Şener A, 2010. Studies on the different reaction pathways between 3-Acetyl-5-benzoyl-6-methyl-2-phenyl-4H-pyran-4-one and alkylamines. *Bulletin of Korean Chemical Society*, 31(9):2633-2636.
- Genç H, Taşdemir V, Tozlu İ, Ögün E, 2019. Synthesis of Novel Tetra-Substituted Pyrazole Derivatives from 2,3-Furandione. *Letters in Organic Chemistry*, 16(11):891-897.
- Hagmann W. K, 2008. The Many Roles for Fluorine in Medicinal Chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(15):4359-4369.
- Harper D. B, O'Hagan D, Murphy C. B, 2003. Fluorinated Natural Products: Occurrence and Biosynthesis. *Natural Production of Organohalogen Compounds; Handbook of Environmental Chemistry*: Berlin, Heidelberg, Springer, 141.
- Joule J. A, Mills K, 2010. *Heterocyclic Chemistry*, Blackwell. Oxford. 1-150.
- Kamal A, Visweswarasastry K. N, Chandrasekhar D, Mani G.S, Adiyala P.R, Nanubolu J.B, Singarapu K.K, Andmaurya R.A, 2015. One-Pot, Three-Component Approach to the Synthesis of 3,4,5-Trisubstituted Pyrazoles. *The Journal of Organic Chemistry*, 80(9):4325-4335.
- Kappe C. O, Terpetschnig E, Penn G, Kollenz G, Peters K, Peter E. M, 1995. Substituent effect on the site of nucleophilic attack at 1H-pyrrole-2,3-diones. *Liebigs Annalen der Chemie*, 3, 537-543.
- Korkusuz E, Yıldırım İ, 2011. On the Reactions of Furan-2,3-diones with Oxindole (=1,3-Dihydro-2H-indol-2-one) and Lawesson Reagent. Synthesis of New 1,3-Dihydro-2H-indol-2-ones, Bis-furanones, and Bis-pyrrolones. *Helvetica*, 94(5):801-810.
- Mahajan R.N, Havaladar F.H, Fernandes P.S, 1991. Syntheses and biological activity of heterocycles derived from 3-methoxy-1-phenyl-1H-pyrazole-5-carboxylate. *Indian Chemical Society*, 68, 245-246.

- Matyus P, 1998. 3(2H)-Pyridazinones-Some Recent Aspects Of Synthetic And Medicinal Chemistry. *J. Heterocyclic Chemistry*, 35,1075.
- Shawali A.S, 1977. Synthesis and tautomeric structure of some 2H-pyrazolo[3,4-d]pyridazines. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 14, 375-381.
- Şener A, Kasımoğulları R, Şener M. K, Bildirici İ, Akçamur Y, 2002. Studies on the reactions of cyclic oxalyl compounds with hydrazines or hydrazones II [1]:Synthesis and reactions of 4-benzoyl-1-(3-nitrophenyl)-5- phenyl-1H-pyrazole-3-carboxylic acid. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 39(1):869-875.
- Şener A, Genc H, Tozlu I, Sener M. K, 2004. Studies on the Reactions of 4-Ethoxycarbonyl-5-phenyl-2,3-dihydro-2,3- furandione with Some NH Nucleophiles. *Turkis Journal of Chemistry*, 28(5):659-665.
- Şener A, Kasimogullari R, Sener M.K, Genç H, 2004. Studies on reactions of cyclic oxalyl compounds with hydrazines or hydrazones. 2. Synthesis and reactions of 4-benzoyl-1-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-1H-pyrazole-3-carboxylic acid. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 40(8):1039-1046.
- Şener A, Tozlu İ, Genç H, Bildirici İ, Arısoy K, 2007. Synthesis and some reactions of 4-(ethoxycarbonyl)-1,5-diphenyl-1H-pyrazole-3-carboxylic acid. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 44(5):1077-1081.
- Şener A, Eskinoba S, Bildirici İ, Genç H, Kasımoğulları R, 2007. A study on chemical behaviors of some 4-pyrones synthesized by one-step reactions towards various amines. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 44, 337-341.
- Şener A, Mengeş N, Akkurt M, Karaca S, Büyükgüngör, O, 2008. Efficient synthesis of some oxalacetic acid and pyruvic acid derivatives from the reactions of 2, 3-furandiones with 2-phenylindole. *Tetrahedron Letters*, 49(17):2828-2831.
- Şener A, Bildirici İ, Genç H, Mengeş N, Eskinoba S, 2008. One Step Synthesis of Some 2,5,6-Trisubstituted-1,3-Dioxin-4-ones. *Turkish Journal of Chemistry*, 32(1):19-24.
- Yılıırım I, Saripinar E, Güzel Y, Patat S, Akçamur Y, 1995. Theoretical investigations on the mechanism of interaction of 4-formyl furan-2,3-dion and urea. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 334(2):165-171.
- Yıldırım İ, Kandemirli F, Korkusuz E, 2005. Experimental And Theoretical Studies On The Functionalization Reaction Of 4- Benzoyl -1,5- Diphenyl-1h-Pyrazole-3- Carboxylic Acid And Chloride With 2,3- Diaminopyridine. *Molecules*. 10(3):559-571.
- Taslimi P, Türkan F, Cetin A, Burhan H, Karaman M, Bildirici I, Gulçin İ, Şen F, 2019. Pyrazole[3,4-d]pyridazine derivatives: Molecular docking and explore of acetylcholinesterase and carbonic anhydrase enzymes inhibitors as anticholinergics potentials. *Biyoorganic Chemistry*, 92,103213.
- Tewari A. K, Mishra A, 2001. Synthesis and anti-inflammatory activities of N4, N5-disubstituted-3-methyl-1H-pyrazolo[3,4-c]Pyridazines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 9(3):715-718.
- Tozlu I, Hacialioğlu E, Taşdemir V, Genç H, 2019. Synthesis and Some Reactions of Pyrazole-3-carboxylic acid Having Trifluoromethyl Unit. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(4):645-654.



**To Cite:** Karakus A, Ceylan H, Erdogan O, 2022. Cloning and Expression of Rat Brain Acetylcholinesterase Enzyme in *Escherichia coli*. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 287-296.

### Cloning and Expression of Rat Brain Acetylcholinesterase Enzyme in *Escherichia coli*

Ahmet KARAKUS<sup>1</sup>, Hamid CEYLAN<sup>2</sup>, Orhan ERDOĞAN<sup>2\*</sup>

**ÖZET:** In this study, the gene region of rat (*Rattus norvegicus*) brain acetylcholinesterase enzyme was amplified in PCR with designed forward and reverse primers and it was ligated into a pET-SUMO vector under suitable conditions. This recombinant vector was transformed to competent *Escherichia coli* cells and it was grown in liquid LB medium including kanamycin. Colony PCR was performed from growing colony and PCR products were checked with agarose gel electrophoresis. The correct colonies were grown in a liquid medium for plasmid isolation. After plasmid isolation, these recombinant constructs were used for whether the gene inserts properly with cross-PCR. After determining the accuracy of the plasmid, recombinant vectors were transferred into the *E. coli* BL21 (DE3) cells to perform protein production. Cells were grown in IPTG induced larger media for hours. Enzyme activity and SDS-PAGE analysis were performed from homogenate for each treatment samples.

**Keywords:** *Rattus norvegicus*, Acetylcholinesterase, Cloning, pET-SUMO vector, *E. Coli*

<sup>1</sup> Ahmet KARAKUS ([Orcid ID: 0000-0003-1458-808X](https://orcid.org/0000-0003-1458-808X)), Bartın University, Science Faculty, Department of Biotechnology, Bartın, Türkiye

<sup>2</sup>Hamid CEYLAN ([Orcid ID: 0000-0003-3781-4406](https://orcid.org/0000-0003-3781-4406)), Orhan ERDOĞAN ([Orcid ID: 0000-0001-8908-7293](https://orcid.org/0000-0001-8908-7293)), Ataturk University, Science Faculty, Department of Molecular Biology and Genetics, Erzurum, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Orhan ERDOĞAN, e-mail: oerdogan@atauni.edu.tr

This study was produced from Ahmet KARAKUS's Master's thesis. The article was presented as a poster at the "International Eurasia Pharmacy Congress" in Erzincan on 3-7 September 2015.

## INTRODUCTION

Acetylcholine is an ester with important biological effects. The strong pharmacological effect of acetylcholine was determined in 1906 (Nachmansohn 1952). Acetylcholine, whose effects on heart tissue were revealed for the first time by Henry Hallett Dale in 1914, is a neuromodulator that plays a role in the central and peripheral nervous system. Choline is synthesized from acetyl CoA and choline by the enzyme acetyltransferase. The enzyme acetylcholinesterase (AChE), which is abundant in the synaptic space, breaks down free acetylcholine into choline and acetate metabolites (Nirogi et al. 2010).

Acetylcholinesterase hydrolyzes acetylcholine, a neurotransmitter in cholinergic synapses. Acetylcholine released into the synaptic space binds to its receptors in the postsynaptic membrane (Lester 1977). AChE in the same region terminates signal transmission by hydrolyzing acetylcholine (Whittaker 1990). AChE with very high catalytic activity breaks down 25,000 acetylcholine molecules per second (Quinn 1987). The released choline is taken up again by the presynaptic nerve. Choline combines with acetyl CoA catalyzed by cholineacetyltransferase to form acetylcholine again (Kim et al. 2006).

Hydrolysis of acetylcholine is regulated by cholinesterase inhibitors. There are two types of cholinesterase enzymes. These include acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. Substances that inhibit the enzyme acetylcholinesterase are defined as cholinesterase inhibitors or anticholinesterases (Colovic et al. 2013). Cholinesterase inhibitors that inhibit hydrolysis of acetylcholinesterase enzyme contribute to central and peripheral cholinergic function and strengthen this function (Alaşehirli 2005).

Since pathogenesis and pathophysiology of Alzheimer's disease can not be fully clarified, there is no adequate and complete preventive treatment for today (Golde 2003). Acetylcholinesterase inhibitors (AChEI) are the most effective treatment agents proven (McGleenon et al. 1999). AChEIs prevent the destruction of acetylcholine by cholinesterase and increase the amount of acetylcholine in neuronal synapse and prolong the biochemical and functional effect of acetylcholine in the brain (Snowdon et al. 1997).

In this study; In this study, rat AChE gene was cloned into pET-SUMO vector and acetylcholinesterase enzyme, a product of this gene, was produced recombinantly in *E. coli* cells and the activity and molecular weight of the produced enzyme were determined.. In the following stages, it is thought that AChE enzyme purification and characterization can be carried out to prevent drug studies.

## MATERIALS AND METHODS

### Total RNA Isolation and cDNA Production

Total RNA was isolated rat brain by using Méndez's method (Méndez et al. 2011). The obtained products were checked by agarose gel electrophoresis and NanoDrop. cDNA library was performed according to the reverse transcriptase method. For this process, First-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, USA) and Oligodt primers were used.

### Plasmid construction and cloning of AChE

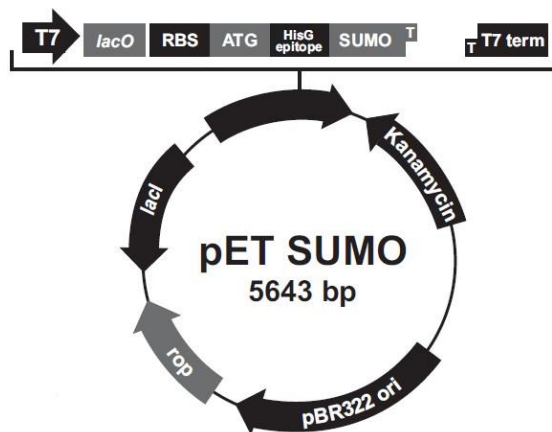
For recombinant production of AChE protein, the coding sequence of rat AChE (NM\_172009) was cloned into the vector (pET-SUMO). The rat AChE gene sequence (NM\_172009) was amplified with designed forward and reverse primer with PCR, sequence information of the primers is given in Table 1. Afterwards, AChE gene was amplified by applying the PCR parameters given in Table 2. PCR products were checked by agarose gel electrophoresis and PCR product was purified from agarose gel. This sequence was cloned into the pET-SUMO vector (Figure 1).

**Table 1.** Primer sequences used in amplification of the rat AChE gene sequence.

Primer	5'-3'
Forward	ATGAGGCCTCCCTGGTATCC
Reverse	TCACAGGTCTGAGCAGCGT

**Table 2.** PCR parameters applied in amplification of AChE gene

Steps	Temperature (°C) / Time / Cycle
Pre-denaturation	94 / 4 min / 1
Denaturation	94 / 90 s / 30
Annealing	60 / 40 s / 30
Extension	72 / 100 s / 30
Final extension	72 / 10 min / 1
End of the reaction	4 / - / -

**Figure 1.** pET-SUMO vector map

### Recombinant protein expression

Obtained recombinant vector was transformed to component *E. coli* One Shot Mach-T1<sup>R</sup> cells and it was incubated for 1 night at 37°C in LB medium (1% tryptone, 0.5% NaCl, 2% agar and 0.5% yeast) containing 50 µg/mL kanamycin. Colony PCR was performed to determine the colonies carrying the recombinant vector. Four combinations of vector-specific and gene-specific primers (gene-gene, vector-vector, gene forward-vector reverse, and gene reverse-vector forward) were used to determine whether the vector was an insert. Plasmid isolation was performed.

Isolated plasmids were transferred to *E. coli* BL21(DE3) cells and grown in LB plates to perform protein production. Transfer procedure was performed by classical heat shock method. A single colony was taken from the agar plate and inoculated in 10 mL of LB medium and left in an incubator at 37°C and 200 rpm for 1 night to prepare the preculture.

To obtain the recombinant protein, 1 mL of preculture was added to 200 mL of 50 µg/mL antibiotic and 1% glucose including LB medium. When OD<sub>600</sub>=0.6 measured in the spectrophotometer, IPTG was added to the medium and incubated at 200 rpm and 37°C.

### Protein purification and pilot expression of AChE

After IPTG induction, cells were centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes to determine whether protein was produced. Cell pellets were resuspended in 1 mL of lysis buffer. Next, the cells was sonicated and lysed by a freeze-thaw cycle (3 times) with liquid nitrogen (-196°C) and a 42°C water bath. Then

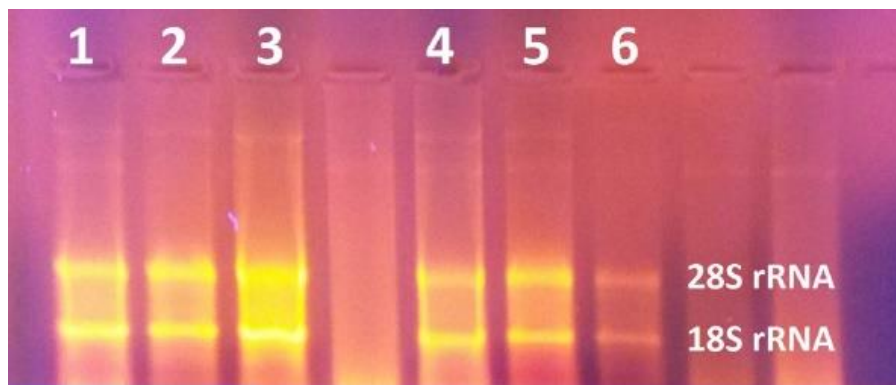
the cell lysate was centrifuged at 10.000 rpm for 1 min. The supernatant was taken into a new tube and stored at -20°C.

Produced Rat AChE protein concentration was detected by the Bradford method (Bradford 1976) using Bovine Serum Albumin (BSA). The absorbance was measured in the spectrophotometer at 595 nm. AChE enzyme activity was determined by Ellman's method (Ellman et al., 1961). Time dependent expression level (0-7 s) and molecular weight of the produced recombinant protein were analysed by SDS-PAGE (12%) method.

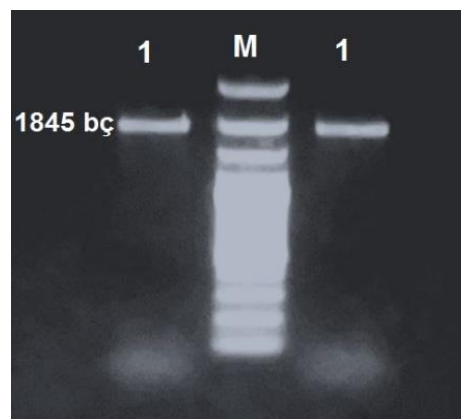
## RESULTS AND DISCUSSION

### Qualitative Determination of Isolated RNA by Agarose Gel Electrophoresis and cDNA Library

Total RNA isolation from rat brain tissue was performed according to the manufacturer's protocol and qualitatively determined by agarose gel electrophoresis (Figure 2) and rat cDNA library was performed (Figure 3).



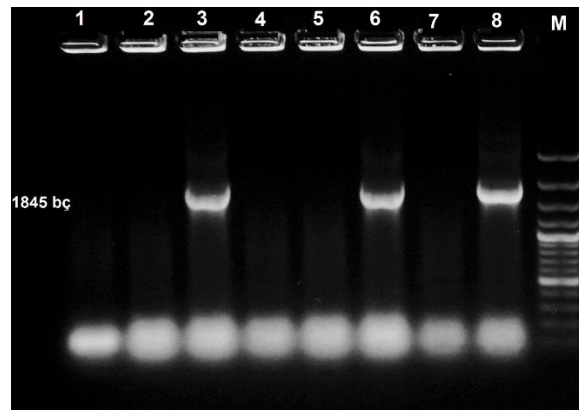
**Figure 2.** Gel image of total RNA from rat brain tissue (1, 2, 3, 4, 5, 6 gel RNA samples loaded with 18S and 28S rRNA bands)



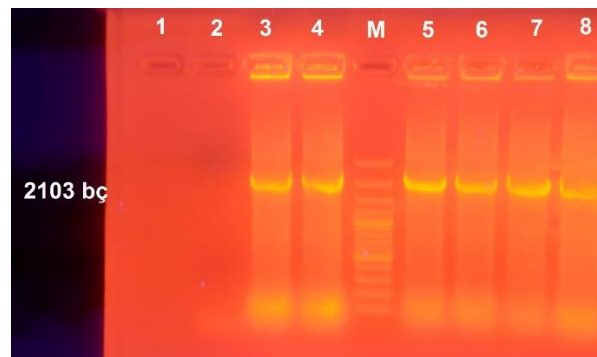
**Figure 3.** The gene region obtained by PCR from the cDNA library. (1: PCR sample loaded on gel, M: Marker)

### Cloning of ACHE into pET-SUMO vector

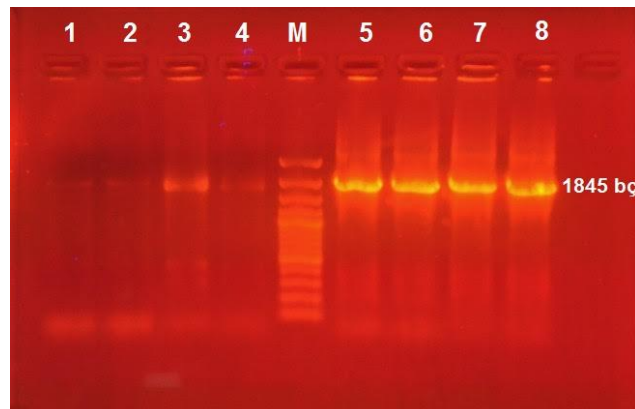
The rat AChE sequence was ligated and cloned into the pET-SUMO vector. Correct placement of the gene in the pET-SUMO vector was confirmed by colony and cross PCR (Figure 3, Figure 4 and Figure 5).



**Figure 3.** Gel image of bands obtained from colony PCR with primer of target gene. (M: Marker, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8: Colonies enumerated for PCR, 3rd, 6th and 8th colonies were evaluated as positive because they gave bands in the 1845 bp)



**Figure 4.** Gel image of bands obtained by colony PCR with vector primer. (M: Marker, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8: Numbered colonies for PCR, 3rd, 4th, 5th, 6th and 8th colonies were positive because they gave band in 2103 bp region. we evaluated)



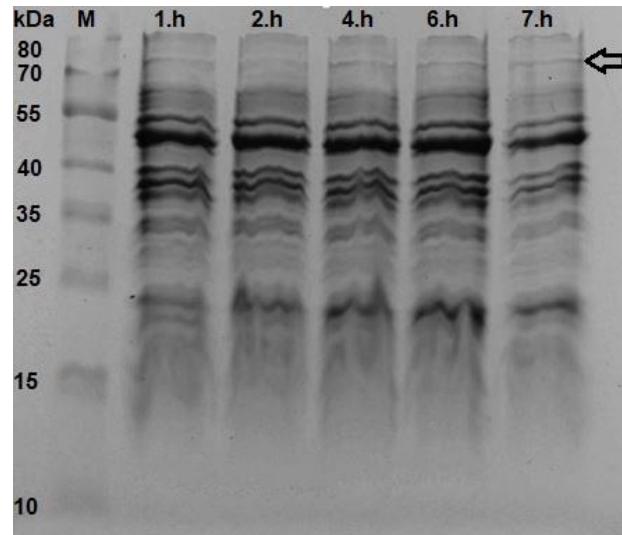
**Figure 5.** Gel image obtained by cross-PCR from plasmid

### Pilot expression of AChE

The protein quantity of the samples taken from the samples induced by IPTG at the 1st, 2nd, 4th, 6th and 7th hours are indicated in Table 3. Accordingly, samples induced with IPTG at 6 and 7 hours were determined to contain approximately 2.7 fold more protein than samples not induced by IPTG. Then cells were harvested and cell lysate was detected by SDS-PAGE. With SDS-PAGE analysis, the presence of approximately 80 kDa of product was detected in the gel. (Figure 6).

**Table 3.** Activity measurement results of acetylcholinesterase enzyme

Time of Samples (h)	IPTG + (unit)	IPTG – (unit)
0	16	12
2	27	16
4	44	22
6	72	26
7	68	24

**Figure 6.** SDS-PAGE analysis of cell homogenate obtained after lysis (M: Marker, kDa: Kilodalton, 1.h, 2.h, 4.h, 6.h, 7.h: When samples were taken)

In this study, it was aimed to clone acetylcholinesterase (AChE) enzyme from rat brain tissue and express it using a prokaryotic host. In this context, the region encoding the enzyme was isolated from the cDNA library of the relevant tissue using specific primers. The resulting gene region was transferred to a vector for cloning purposes. This recombinant vector was then transferred to a suitable expression host to produce the enzyme.

AChE plays a biological role in neurotransmission at synapses at the cholinergic junction by rapidly hydrolyzing its substrate acetylcholine to acetate and choline (Soreq and Seidman, 2001). In addition, non-cholinergic roles of cholinesterase such as cell adhesion, neurite outgrowth, and apoptosis have been reported in vertebrates and invertebrates (Park et al., 2004; Zhang and Greenberg, 2012; He et al., 2012; Lu et al., 2012).

Acetylcholinesterase enzyme was obtained recombinantly from different species such as human (Velan et al. 1991), rat (Legay et al. 1993; Coussen et al. 1995) and mouse (Vellom et al. 1993) for different purposes. The main objectives of the studies are structural analysis (Kronman et al. 1992), post-translational arrangements that occur during the maturation of the protein (Coussen et al. 1995), and the explanation of the substrate relationship of AChE, which is different from other cholinesterases (Vellom et al. 1993). It was on the clarification of tasks and their reasons. In these studies, the enzyme was successfully produced in many different hosts, from mammalian cell lines (Lazar et al. 1993) to plants (Yamamoto et al. 2009).

Recombinant therapeutics can be obtained using microbial systems, animal and plant hosts. Microbial systems are one step ahead at this point compared to other intermediaries, as they have the capacity to produce fast and high-yield products in addition to their low cost table. In addition, the

microbial systems do not have a contagious viral concern and are accepted by the authorities as the most suitable hosts recommended for this purpose (Picanco-Castro et al. 2013).

SUMO proteins, like ubiquitins, are synthesized in a precursor form before being conjugated to the target protein. The main difference between these two groups is that while ubiquitins are targeted to a protein for its degradation, cellular processes such as nuclear transport, transcriptional regulation and protein stability occur on the SUMO-targeted protein (Boggio et al. 2004). Producing efficient and soluble recombinant protein, especially in low-level hosts such as *E. coli*, is one of the most important problems encountered (Wang et al. 2010). To overcome this problem, approaches such as the use of fusion proteins, promoter alteration and chaperone co-expression are preferred (Thomas and Baneyx 1997; Zhang et al. 1998).

Fusion proteins not only ensure the expression and proper folding of the target protein, but also protect the related protein from degradation, facilitate purification and detection. For this reason, it has started to be preferred quite frequently in recombinant production techniques. The most commonly used fusion proteins are maltosebinding protein (MBP) (Pryor and Leiting 1997), NUS A (De Marco et al. 2004), glutathione S-transferase (GST), ubiquitin (Ub), thioredoxin (TRX) (LaVallie et al. . 1993) and SUMO (Catanzariti et al. 2004).

Some recent studies have shown that acetylcholinesterase may be a marker and regulator for apoptosis (Park et al. 2004; Ye et al. 2015). Therefore, conclusions can be drawn that AChE may be a promising tumor suppressor (Lu et al. 2013).

Neurodegenerative diseases are a type of neurological diseases, and they generally manifest themselves with the loss of function of neurons over time and ultimately the death of the cell. Today, the causes and pathological mechanisms of the formation of these diseases have not yet been fully explained (Lu et al. 2013). Many neurodegenerative diseases are characterized by disturbances in the cholinergic system. For this reason, inhibition of cholinergic system components or keeping the amount of molecules targeted by these components at an optimum level is seen as the most common and most likely approach for the treatment of related diseases (Holzgrabe et al. 2007). However, since these types of diseases are generally progressive, current treatment strategies can only slow down the progression seen in the pathogenesis of the disease (Dorransoro et al. 2003).

The acetylcholinesterase enzyme is a very sensitive enzyme that can lose its activity quickly. With the help of manipulative techniques such as directed mutation generation methods, it is possible to produce more useful products both in the industrial and therapeutic fields, which can maintain the initial activity for a longer time by increasing the stability of the enzyme with the changes made on the active site.

It has been proven in the literature that bacterial production systems are very suitable models for the production of recombinant products. However, the biggest disadvantage of these systems is that they cannot produce after a certain point because the growth medium is not sufficient after a certain level. Today, specialized systems called bioreactor/fermentor are used, especially for microbial models. With the mentioned systems, the production of microbial biomass, enzymes, metabolites and recombinant products can be done on larger scales. Considering that the amount of product and productivity are obtained from a very small volume in our study, it is thought that better results can be obtained when the production is done by using this type of intermediaries.

## CONCLUSION

In summary, *Rattus norvegicus* AChE gene cloning and expression have been performed, which is of extremely importance to enable further studies on the characterization of AChE enzyme. Today, developing technology allows the design and construction of novel proteins by modification of the amino acid sequence *in vitro* using recombinant DNA technology. In this way, it is thought that research can be done about how mutations can be made *in vitro* in the active part of AChE enzyme and how enzyme activity can change. Whereby about the molecular structure of AChE enzyme shown as targets for drug design and function can be made more extensive information. We believe that obtaining this data may allow the design of selective inhibitors against this enzyme, which has an important place in the cholinergic junction.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Ataturk University Scientific Research Projects Coordination Office (Project ID: 2012/172).

## Conflict of Interest

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

## Author's Contributions

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

## REFERENCES

- Alaşehirli B, 2005, The Inhibitors Of Cholinesterase (Anticholinesterases). *Journal of Internal Medical Sciences Pharmacology*, 1 (18): 47.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Boggio R, Colombo R, Hay RT, Draetta GF, Chiocca S, 2004. A mechanism for inhibiting the SUMO pathway. *Molecular Cell*, 16 (4): 549-561.
- Catanzariti AM, Soboleva TA, Jans DA, Board PG, Baker RT, 2004. An efficient system for high-level expression and easy purification of authentic recombinant proteins. *Protein Science*, 13 (5): 1331-1339.
- Colovic MB, Krstic DZ, Lazarevic-Pasti TD, Bondzic AM, Vasic VM, 2013. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11 (3): 315-335.
- Coussen F, Bonnerot C, Massoulie J, 1995. Stable expression of acetylcholinesterase and associated collagenic subunits in transfected RBL cell lines: production of GPI-anchored dimers and collagen-tailed forms. *European Journal of Cell Biology*, 67 (3): 254-260.
- De Marco V, Stier G, Blandin S, De Marco A, 2004. The solubility and stability of recombinant proteins are increased by their fusion to NusA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322 (3): 766-771.
- Dorransoro I, Castro A, Martinez, A, 2003. Peripheral and dual binding site inhibitors of acetylcholinesterase as neurodegenerative disease modifying agents. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 13 (11): 1725-1732.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Featherstone RM, 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7 (2): 88-95.
- Golde TE, 2003. Alzheimer disease therapy: can the amyloid cascade be halted? *The Journal of Clinical Investigation*, 111 (1): 11-18.
- Greig NH, Lahiri DK, Sambamurti K, 2002. Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy. *International Psychogeriatrics*, 14 (1): 77-91.
- He G, Sun Y, Li F, 2012. RNA interference of two acetylcholinesterase genes in *Plutella xylostella* reveals their different functions. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 79 (2): 75-86.



- Holzgrabe U, Kapkova P, Alptuzun, V, Scheiber J, Kugelmann E, 2007. Targeting acetylcholinesterase to treat neurodegeneration. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 11 (2): 161-179.
- Kim AR, Rylett RJ, Shilton BH. Substrate binding and catalytic mechanism of human choline acetyltransferase. *Biochemistry*. 2006 Dec 12;45(49):14621-31. Kronman C, Velan B, Gozes Y, Leitner M, Flashner Y, Lazar A, Marcus D, Sery T, Papier Y, Grosfeld H, 1992. Production and secretion of high levels of recombinant human acetylcholinesterase in cultured cell lines: microheterogeneity of the catalytic subunit. *Gene*, 121 (2): 295-304.
- LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, Grant KL, Schendel PF, McCoy JM, 1993. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology*, 11: 187-193.
- Lazar A, Reuveny S, Kronman C, Velan B, Shafferman A, 1993. Evaluation of anchorage-dependent cell propagation systems for production of human acetylcholinesterase by recombinant 293 cells. *Cytotechnology*, 13 (2): 115-123.
- Legay C, Bon S, Vernier P, Coussen F, Massoulie J, 1993. Cloning and expression of a rat acetylcholinesterase subunit: generation of multiple molecular forms and complementarity with a Torpedo collagenic subunit. *Journal of Neurochemistry*, 60 (1): 337-346.
- Lester HA, 1977. The response to acetylcholine. *Scientific American*, 236 (2): 106-120.
- Lu W, Jiang J, Yang G, Lai J, Lu K, 2012. Endovascular treatment for the spontaneous rupture of a non-aneurysmal subdiaphragmatic aorta. *Vasa*, 41 (4): 288-291.
- Lu H, Liu X, Deng Y, Qing H, 2013. DNA methylation, a hand behind neurodegenerative diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5: 85.
- Massoulie J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette FM, 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*, 41 (1): 31-91.
- McGleenon B, Dynan K, Passmore A, 1999. Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 48 (4): 471.
- Méndez V, Avelar E, Morales A, Cervantes M, Araiza A, González D, 2011. A rapid protocol for purification of total RNA for tissues collected from pigs at a slaughterhouse. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 10 (4): 3251-3255.
- Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen E, Lockridge O, 2002. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience*, 110 (4): 627-639.
- Nachmansohn, D., 1952. In *Modern Trends in Physiology, Biochemistry*. Academic Press, New York, 229.
- Nirogi R, Mudigonda K, Kandikere V, Ponnamaneni R, 2010. Quantification of acetylcholine, an essential neurotransmitter, in brain microdialysis samples by liquid chromatography mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 24 (1): 39-48.
- Park SE, Kim ND, Yoo YH, 2004. Acetylcholinesterase plays a pivotal role in apoptosome formation. *Cancer Research*, 64 (24): 9230.
- Picanco-Castro V, Biaggio RT, Cova DT, Swiech K, 2013. Production of recombinant therapeutic proteins in human cells: current achievements and future perspectives. *Protein & Peptide Letters*, 20 (12): 1373-1381.
- Quinn DM, 1987. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews*, 87 (5): 955-979.
- Snowdon DA, Greiner LH, Mortimer JA, Riley KP, Greiner PA, Markesbery WR, 1997. Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer disease. The Nun Study. *Jama*, 277 (10): 813-817.
- Soreq H, and Seidman S, 2001. Acetylcholinesterase new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, 2 (4): 294-302.
- Thomas JG, Baneyx F, 1997. Divergent Effects of Chaperone Overexpression and Ethanol Supplementation on Inclusion Body Formation in Recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 11 (3): 289-296.

- Velan B, Grosfeld H, Kronman C, Leitner M, Gozes Y, Lazar A, Flashner Y, Marcus D, Cohen S, Shafferman A, 1991. The effect of elimination of intersubunit disulfide bonds on the activity, assembly, and secretion of recombinant human acetylcholinesterase. Expression of acetylcholinesterase Cys-580-Ala mutant. *Journal of Biological Chemistry*, 266 (35): 23977-23984.
- Vellom DC, Radic Z, Li Y, Pickering NA, Camp S, Taylor, P, 1993. Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry*, 32 (1): 12-17.
- Wang Z, Li H, Guan W, Ling H, Wang Z, Mu T, Shuler FD, Fang X, 2010. Human SUMO fusion systems enhance protein expression and solubility. *Protein Expression and Purification*, 73 (2): 203-208.
- Whittaker VP, 1990. The contribution of drugs and toxins to understanding of cholinergic function. *Trends in Pharmacological Sciences*, 11 (1): 8-13.
- Yamamoto K, Oguri S, Chiba S, Momonoki YS, 2009. Molecular cloning of acetylcholinesterase gene from *Salicornia europaea L.* *Plant Signaling and Behavior*, 4 (5): 361-366.
- Ye X, Zhang C, Chen Y, Zhou T, 2015. Upregulation of Acetylcholinesterase Mediated by p53 Contributes to Cisplatin-Induced Apoptosis in Human Breast Cancer Cell. *Journal of Cancer*, 6 (1): 48-53.
- Zhang Y, Olsen DR, Nguyen KB, Olson PS, Rhodes ET, Mascarenhas D, 1998. Expression of eukaryotic proteins in soluble form in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 12 (2): 159-165.
- Zhang XJ, and Greenberg DS, 2012. Acetylcholinesterase involvement in apoptosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10 (5): 40.

**Atf İçin:** Söyüt H, Ulutaş Y, Köksal E, 2022. Bazı Kemoterapötik İlaçların İnsan Serum Paraoksonaz-1 (PON1) Üzerindeki İnhibisyon Etkisinin Araştırılması. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 297-305.

**To Cite:** Söyüt H, Ulutaş Y, Köksal E, 2022. Investigation of Inhibition Effect of Some Chemotherapeutic Drugs on Human Serum Paraoxonase-1 (PON1). Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 297-305.

### Bazı Kemoterapötik İlaçların İnsan Serum Paraoksonaz-1 (PON1) Üzerindeki İnhibisyon Etkisinin Araştırılması

Hakan SÖYÜT<sup>1\*</sup>, Yakup ULUTAŞ<sup>2</sup>, Ekrem KÖKSAL<sup>2</sup>

**ÖZET:** Kemoterapötik tedavide sıklıkla kullanılan iki ilacın (kladribin ve mitoksantron) insan serum paraoksanaz1 (PON1) enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini *in vitro* inceledik. Kemoterapötik kullanılan bu ilaçlar *in vitro* PON1 aktivitesini azalttı. Kladribin ve mitoksantron inhibisyon mekanizması yarışmasızdır. Kladribin ve mitoksantron için IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 0.077 mM, ve 0.099 mM, olarak hesaplandı ve K<sub>i</sub> sabitleri sırasıyla 0.057 ± 0.016 mM ve 0.067 ± 0.027 mM, olarak hesaplandı. IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri, kladribin'in daha güçlü inhibisyona sahip olduğunu gösterdi. Bulduğumuz sonuçlar kemoterapötik tedavide sıklıkla kullanılan bu ilaçların düşük dozlarda aynı inhibisyon mekanizmaları ile enzim aktivitesini inhibe ettiğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Paraoksonaz, inhibisyon, kladribin, mitoksantron.

#### Investigation of Inhibition Effect of Some Chemotherapeutic Drugs on Human Serum Paraoxonase-1 (PON1)

**ABSTRACT:** We examined the effects of two different drugs (cladribine and mitoxantrone), which are frequently used in chemotherapeutic treatment, on human serum paraoxanase1 (PON1) enzyme activity *in vitro*. Chemotherapeutic drugs decreased *in vitro* PON1 activity. Cladribine and mitoxantrone inhibition mechanism were not competitive inhibitors. IC<sub>50</sub> values for cladribine and mitoxantrone were calculated as 0.077 mM and 0.099 mM, respectively, and K<sub>i</sub> constants were calculated as 0.057 ± 0.016 mM and 0.067 ± 0.027 mM, respectively. IC<sub>50</sub> and K<sub>i</sub> values showed that cladribine has a stronger inhibition. The results we found showed that these drugs, which are frequently used in chemotherapeutic treatment, inhibit enzyme activity with the same inhibition mechanisms at low doses.

**Keywords:** Paraoxonase, inhibition, cladribine, mitoxantrone.

<sup>1</sup>Hakan SÖYÜT (Orcid ID: 0000-0002-0361-7458), Uludağ Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Temel Eğitim Bölümü, Bursa, Türkiye

<sup>2</sup>Yakup Ulutaş, (Orcid ID: 0000-0002-9839-9536), <sup>3</sup>Ekrem KÖKSAL, (Orcid ID: 0000-0002-1026-972X), Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Erzincan, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Hakan SÖYÜT, e-mail: hakansoyut@uludag.edu.tr

## INTRODUCTION

Paraoxonase (PON1) (arylesterase, [EC 3.1.8.1]) is a serum lactonase containing calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) in its structure.  $\text{Ca}^{2+}$  is necessary for both the enzyme activity and enzyme stability.  $\text{Ca}^{2+}$  shows its effect by directly participating in catalytic reactions and by providing the appropriate three dimensional structure of the enzyme active site (Harel et al., 2004). The enzyme, first discovered by Abraham Mazur in 1946, was purified from human serum in 1961. It is physically linked to high-density lipoprotein (HDL), which is synthesized in the liver and released into the human blood (Draganov et al., 2008). PON1 constitutes a very small part of HDL and shows activity dependent on Apo A1. The enzyme is named paraoxonase because it has a high affinity for paraoxon and the paraoxon substrate was first used to measure its activity. While the paraoxonase enzyme shows broad substrate specificity, its physiological substrate has not yet been determined (Marsillach et al., 2008). In addition, it was found to have arylesterase, organophosphatase, peroxidase and lactonase activities. The human serum paraoxonase enzyme is the esterase responsible for the hydrolysis of the O-P ester bond in paraoxon, which is the metabolic product of parathion and is a pesticide harmful to the organism. Paraoxonase enzyme hydrolyzes the paraoxon formed in metabolism by oxidative modification of parathion. It forms p-nitrophenol and diethyl phosphate compounds, which are relatively less harmful than paraoxon (Aviram et al., 1998). In the structural activity studies conducted in recent years, it has been reported that the natural activity of the PON1 enzyme is lactonase and the enzyme has been defined as  $\text{Ca}^{2+}$  dependent lipophilic lactonase. It has been reported that hydrolysis of oxidized lipids by PON1 results from the lactonase activities of this enzyme (Khersonsky and Tawfik, 2005). In other words, the fact that PON1 enzyme prevents the oxidation of LDL and HDL lipids and provides protection against atherosclerosis by metabolizing lipid peroxides is explained by its lactonase activity. The free cysteine amino acid at residue 284 is very important for the lactonase activity of the PON1 enzyme. Serum PON1 enzyme activity in newborn and premature infants is half of the adult level. The adult level is reached one year after birth. However, in most of the studies, it has been determined that PON1 activity decreases in advanced age. The level and activity of PON1 in serum vary among individuals (Teiber et al., 2003). The antioxidant role of PON1 is related to its peroxidase activity. This role of the enzyme leads to neutralization of fatty acids hydroperoxides, cholesteryl ester hydroperoxides and hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Ferretti et al., 2010).

Today, it has been found that the paraoxonase (PON) family consists of three genes. These are the genes encoding PON1, PON2 and PON3. Human PON is encoded by chromosome 7. In mammalian species, PON gene sequences are similar with a rate of 79-95% at the amino acid level and 81-95% at the nucleotide level (Furlong et al., 2016). PON1 is primarily expressed in the liver and is associated with high-density lipoprotein (HDL). Human PON2 is expressed in different tissues such as heart, liver, lung, testis, lung, placenta, stomach, small intestine, spleen, kidney, vascular endothelial cells, vascular smooth muscle cells and macrophages. PON2 is localized in the plasma membrane, endoplasmic reticulum, and inner mitochondrial membrane, which is essential for the correct functioning of the electron transport chain. In addition to the liver, PON3 expression has been detected in the kidney. Previous studies have reported that, similar to PON1, human PON3 is also localized on the HDL surface. The physiological effects of PON1 are very important. The physiological effects of the enzyme have been proven by many studies in the literature. Studies have shown that serum PON1 enzyme is important in protecting LDL phospholipids against oxidation in the first phase of the atherosclerosis process. It has been determined that the PON1 enzyme protects HDL as well as LDL from oxidation, increases cholesterol output from macrophages, and thus slows foam cell formation and the development of

atherosclerosis. It was observed that the development of atherosclerosis was accelerated and oxidative stress was increased in mice lacking PON1 enzyme. It was observed that oxidative stress decreased and the number of lesions decreased in mice into which a PON1 enzyme was injected (Rozenberg et al., 2005). In a study, it was observed that HDL decreased lipid peroxide accumulation on LDL by an enzymatic mechanism when kept under oxidizing conditions. Another study showed that the paraoxonase enzyme is one of the factors related to this feature of HDL. In addition, the PON1 enzyme limits the accumulation of oxidized LDL and HDL particles, prevents the conversion of LDL into proatherogenic particles, and reverses the biological effects of oxidized LDL particles; thus, it has been observed that it prevents the formation and progression of atherosclerosis lesions (Jaouad et al., 2003). In another study, oxidation of LDL by reactive oxygen species (ROS) or cellular enzymes is considered an atherogenic modification involved in the initial stage of atherogenesis. PON1-deficient mice showed a higher susceptibility to lipoprotein oxidation and inflammation. Mice overexpressing PON1 are more resistant to inflammation and atherosclerosis. A low PON1 activity in serum exposes subjects to a higher oxidative stress (Deakin et al., 2011). PON1 activity is significantly lower in the serum of patients affected by different types of cancer, such as lung cancer, gastrointestinal cancer, breast and gynecological cancer, prostate, bladder cancer, central nervous system tumors, non-hodgkin lymphoma and acute lymphoblastic lymphoma (ALL). Chemotherapeutic drugs used in the treatment of cancer types may further increase this risk. Because these drugs affect various enzymes after they are taken into the body. Some enzymes' being affected by drugs may prove to be fatal. One of these enzymes is PON1 enzyme. A decrease in the activity of this enzyme causes an increase in atherosclerosis and oxidative stress, as mentioned above. In this case, it may increase the risk of cardiovascular disease (Barrera, 2012). It is clear from the above statements that PON1 has important effects on living organisms. Therefore, more studies on the PON-drug interaction are needed. Enzyme-drug interactions have been done in previous studies. In vitro and in vivo inhibitory effects of ibuprofen, meloxicam, and methotrexate on PON1 activity were determined. They inhibited the enzyme at low concentrations ( Dilek and Polat, 2016).

Cladribine (2-chloro-2'-deoxyadenosine) is an immunosuppressive purine nucleoside analogue primarily used for the treatment of certain lymphoid malignancies and also used in recurrent Langerhans cell histiocytosis. It is used therapeutically for leukemia and multiple sclerosis. Cladribine has also been reported to induce cell death in blood monocytes and, to a lesser extent, B cells and dendritic cells (DC) (Kraus et al., 2014). Mitoxantrone is a symmetric drug consisting of a tricyclic planar chromophore and two main side chains. It is an important antineoplastic drug belonging to the anthracycline group. Mitoxantrone is used in the treatment of different types of cancer, such as myeloid leukemia, breast cancer, lung cancer and prostate cancer. Mitoxantrone is considered a chemotherapeutic drug of the anthracycline family of drugs with potent cytotoxicity and lower side effects against cardiotoxicity. Anthracycline drugs are known to cause cytotoxic effects through interaction with DNA, causing modification of DNA and thus inhibition of replication. Mitoxantrone is an inhibitor of topoisomerase II (Al-Otaibi et al., 2018). The aim of this study is to investigate the in vitro effects of cladribine and mitoxantrone on enzyme activity.

## MATERIALS AND METHODS

### Material

DEAE-Sephadex A50, Sepharose 4B, 1-naphthylamine, paraoxone, protein reagents and chemicals used for electrophoresis were obtained from Sigma Chemical Co. All other chemicals are

sourced from Sigma-Aldrich or Merck. Cladribine and mitoxantrone were obtained from Bursa Uludağ University Faculty of Medicine Oncology Department.

### Paraoxonase activity measurement

Human serum samples were obtained from Erzincan Mengücekgazi Research Hospital. PON1 activity was determined with paraoxone (diethyl p-nitrophenyl phosphate) (1 mM) in 50 mM glycine / NaOH (pH 10.5) containing 1 mM CaCl<sub>2</sub> at 25 °C. PON1 activity measurement was based on the estimation of p-nitrophenol at 412 nm. The molar extinction coefficient of p-nitrophenol ( $\epsilon = 18.290 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at pH 10.5) was used to calculate PON1 activity. An enzyme unit was defined as the amount of enzyme that catalyzes 1  $\mu\text{mol}$  of substrate hydrolysis at 25 °C. Activity measurement was performed using a spectrophotometer (CHEBIOS UV-VIS).

### *In vitro* studies for chemotherapeutic drugs

We examined the inhibitory effects of cladribine and mitoxantrone. Drugs were tested in triplicate for each concentration used. PON1 activities were measured in the presence of different drug concentrations. Control activity was assumed to be 100% in the absence of an inhibitor. For cladribine and mitoxantrone, % Activity-[Concentration] plots were plotted and IC<sub>50</sub> and K<sub>i</sub> values were calculated from the equation of the curve.

## RESULTS AND DISCUSSION

Paraoxonase (PON1) is a calcium-dependent mammalian hydrolase that hydrolyzes esters such as lactone. It is a glycoprotein with a molecular weight of 43-45 kDa. It is synthesized in the liver. PON1 enzyme has anti-atherogenic and antioxidant effects in living metabolism. As the enzyme is associated with HDL, it hydrolyzes lipid peroxides in oxidized lipoproteins. The anti-atherogenic property of PON1 determines the protection of HDL, LDL and macrophages against oxidative stress. This property is inversely related to oxidative stress in macrophages and serum (Golmanesh et al., 2008). Oxidative stress can be defined as a deterioration in the prooxidant-antioxidant balance in favor of the former and leads to potential tissue and cellular damage (Gulcin, 2012). When oxidative stress occurs, excessive amounts of free oxygen radicals are produced (Adam-Vizi and Chinopoulos 2006). They have a very important role in carcinogenesis and show high mutagenic activity. There are antioxidant defense mechanisms such as PON, glutathione peroxidases, catalases and superoxide dismutases to protect mammalian cells from reactive oxygen species. The human body works to maintain its biological functions and balance its antioxidant-oxidant systems (Hofseth et al., 2003). Numerous studies have revealed that PON1 makes a significant contribution to the antioxidant capacity of HDL. With this antioxidant feature, PON1 prevents the oxidation of both HDL and LDL (Cipollone et al., 2007).

It is well known that enzymes are very important biocatalysts in metabolism. Therefore, all substances taken into the body can interact with enzymes. PON1 is important for its pharmacokinetic role and is worthy of future research. Recently, researchers reported a number of studies on different properties of PON1. Few studies have been conducted on the relationship between certain chemicals or drugs and PON1 activity, for example the effect of chemotherapeutic agents on PON1 enzyme activity. These drugs showed strong inhibition effect on PON1 enzyme. The effect of chemotherapeutic drugs on PON1 has not been extensively studied. For example, a decreased PON1 activity was observed *in vitro* during incubations with chemotherapeutic agents (cetuximab, paclitaxel, etoposide, docetaxel and ifosfamide) (Alim and Beydemir 2016). Oxidative stress and inflammation are considered important factors that play a role in the development of cancer and in determining the prognosis of chemotherapy. A decrease in PON1 activity in cancer patients resulted in an increase in oxidative stress markers. If any

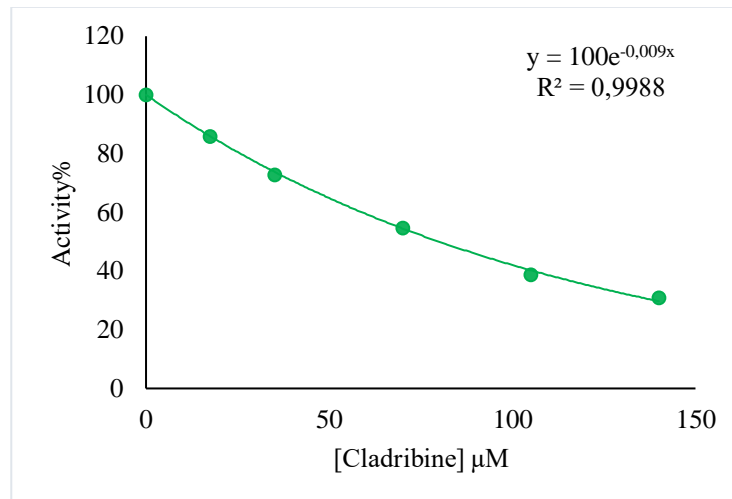
drug also causes a decrease in PON1 enzyme activity, many vascular diseases, including atherosclerosis, may occur due to increased oxidative stress (Ferretti et al., 2015). Statins generally appear beneficial for PON1. Pravastatin, simvastatin and atorvastatin have a positive effect on PON1 activity. (Malin et al., 2001; Kumar, 2010; Nagila et al., 2009). It was tested that aspirin may have beneficial effects on PON1 activity. Aspirin use significantly increased PON1 activity in patients with coronary artery disease (Bhattacharyya et al., 2008). Valsartan and barnidipine were found to have no effect on PON1 activity. (Saisho et al., 2006; Spirou et al., 2006). In another study, gentamicin sulfate and cefazolin sodium decreased PON1 activity. (Sinan et al., 2006). Işgör and Beydemir studied the effects of some cardiovascular drugs (digoxin, metoprolol tartrate, verapamil, diltiazem, amiodarone, dobutamine, and methylprednisolone) on human serum PON1 enzyme activity. The IC<sub>50</sub> values for these drugs were determined as 0.012 M, 0.621 M, 0.672 M, 1.462 M, 3.255 M, 4.495 M and 47.803 M, respectively (İşgör and Beydemir 2010). A similar study was carried out by Türkeş et al. They conducted some experiments on the *in vitro* effects of certain calcium channel blockers on PON1 purified from human serum. The IC<sub>50</sub> values for these drugs were determined as 0.121 mM, 0.130, 0.255 mM and 0.304 mM, respectively (Türkeş et al., 2014). In the study conducted by our study group, the *in vitro* effects of some anti-cancer drugs (1) palonosetron hydrochloride, (2) bevacizumab and (3) cyclophosphamide on PON1 were investigated. Compared with other anti-cancer drugs, palonosetron hydrochloride was found to inhibit enzyme activity significantly. The inhibition order of drugs was determined as 1 > 2 > 3 (Türkeş et al., 2016).

In this study, inhibition effects of cladribine and mitoxantrone, which are chemotherapeutic drugs, on paraoxonase activity were studied. IC<sub>50</sub> values for cladribine and mitoxantrone were determined as 0.077 mM and 0.099 mM with the aid of %Activity-[I] graph (Table 1 and Figure 1-2). In our study, Lineweaver-Burk graphs were used to determine the K<sub>i</sub> constants for cladribine and mitoxantrone, which have inhibitory effects on human serum PON1 enzyme. K<sub>i</sub> constants were determined as 0.057 ± 0.016 mM and 0.067 ± 0.027 mM, respectively (Table 1 and Figure 3-4). For drugs, the type of inhibition is competitive.

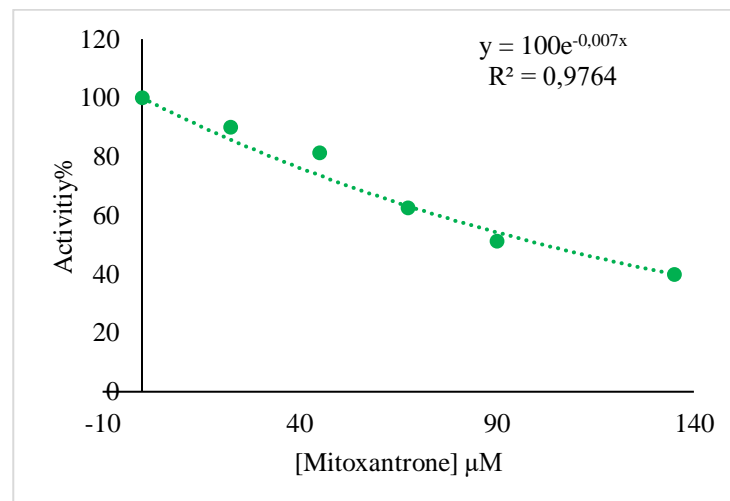
As a result of inhibition studies, it was observed that cladribine and mitoxantrone strongly inhibited the PON1 enzyme.

**Table 1.** IC<sub>50</sub> and K<sub>i</sub> values

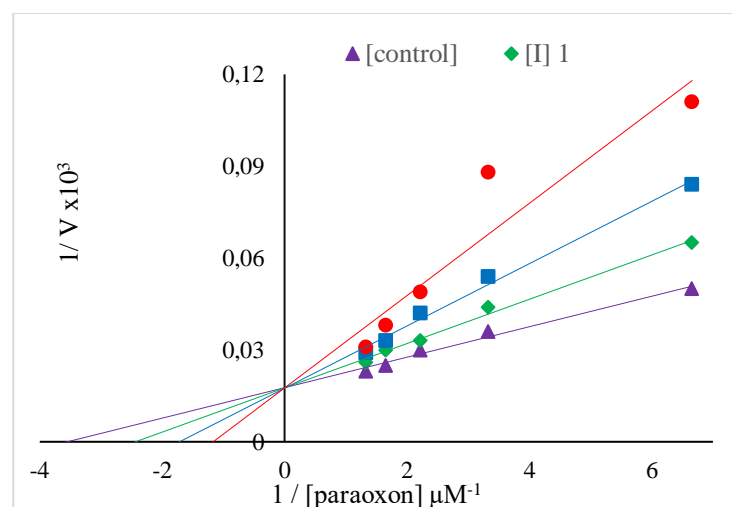
Inhibitor	IC <sub>50</sub> (mM)	K <sub>i</sub> (mM)	Type of inhibition
Cladribine	0.077	0.057 ± 0.016	Competitive
Mitoxantrone	0.099	0.067 ± 0.027	Competitive



**Figure 1.** % Activity-[Concentration] graph showing the inhibitory effect of cladribine on PON1 enzyme activity and used to determine the  $\text{IC}_{50}$  value

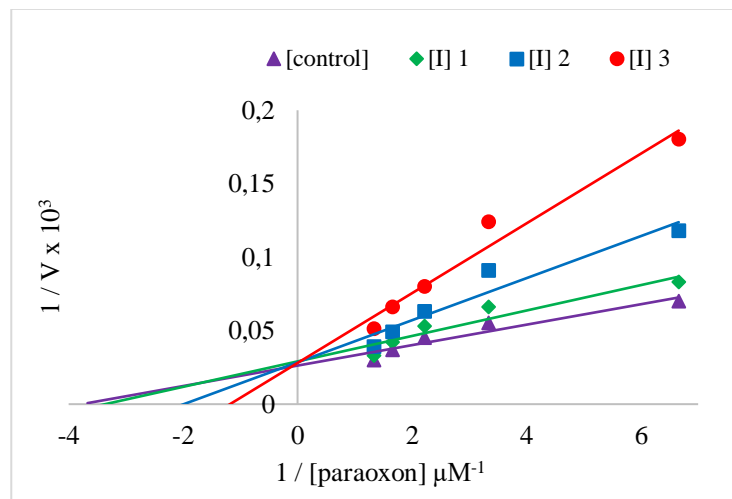


**Figure 2.** % Activity-[Concentration] graph showing the inhibitory effect of mitoxantrone on PON1 enzyme activity and used to determine the  $\text{IC}_{50}$  value



**Figure 3.** Lineweaver-Burk graph showing the effect of cladribine on human serum PON1 enzyme activity and used to determine the  $K_i$  constant





**Figure 4.** Lineweaver-Burk plot showing the effect of mitoxantrone on human serum PON1 enzyme activity and used to determine the  $K_i$  constant

## CONCLUSION

In conclusion, we investigated the *in vitro* effects of cladribine and mitoxantrone on PON1. We did not encounter any literature on the relationship between PON1 and cladribine and mitoxantrone. However, it is known that the expression and activity of the paraoxonase enzyme is critical for cancer diseases. Many studies have shown a decrease in PON1 activities in different cancer patients. PON1 is a multifunctional enzyme involved in the regulation of antioxidant defense and cell behavior. In addition, PON1 activity provides protection against cardiovascular diseases. Cladribine and mitoxantrone are used as chemotherapeutic drugs in the treatment of cancer. When applied in cancer therapy, they may cause some metabolic disorders, especially in patients with atherosclerotic lesions. However, our results should be confirmed by some *in vivo* studies.

## Conflict of Interest

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

## Author's Contributions

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

## REFERENCES

- Adam-Vizi V, Chinopoulos C, 2006. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27: 639–645.
- Alim Z, Beydemir S, 2016. Some anticancer agents act on human serum paraoxonase-1 to reduce its activity. *Chemical Biology & Drug Design*, 88: 188–196.
- Aviram M, Rosenblat M, 2008. Paraoxonases (PON1, PON2, PON3) analyses *in vitro* and *in vivo* in relation to cardiovascular diseases. *Methods in Molecular Biology*, 477: 259–276.
- Aviram M, Rosenblat M, Bisgair CL, 1998. Paraoxonase inhibits high density lipoprotein (HDL) oxidation and preserves its functions: a possible peroxidative role for paraoxonase. *Journal of Clinical Investigation*, 101: 2215-2257.
- Barrera G, 2012. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncology*, 2012: 137289.
- Bhattacharyya T, Nicholls SJ, Topol EJ, Zhang R, Yang X, Schmitt D, Fu X, 2008. Relationship of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk. *Journal of the American Medical Association*, 299: 1265–1276.

- Cipollone F, Fazia ML, Mezzetti A, 2007. Oxidative stress, inflammation and atherosclerotic plaque development. *International Congress Series*, 1303: 35–40.
- Deakin SP, Bioletto S, Bochaton-Piallat M., James RW, 2011. HDL-associated paraoxonase-1 can redistribute to cell membranes and influence sensitivity to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 50: 102–109.
- Draganov DI, La Du, BN, 2004. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 369: 78-88.
- Ferretti G, Bacchetti T, Masciangelo S, Bicchiega V, 2010. HDL-paraoxonase and membrane lipid peroxidation: a comparison between healthy and obese subjects. *Obesity*, 18: 1079–1084.
- Ferretti G, Bacchetti T, Sahebkar A, 2015. Effect of statin therapy on paraoxonase-1 status: a systematic review and meta-analysis of 25 clinical trials. *Progress in Lipid Research*, 60: 50–73.
- Furlong CE, Marsillach J, Jarvik GP, Costa LG, 2016. Paraoxonases-1, -2 and -3: what are their functions? *Chemico-Biological Interactions*, 259: 51–62.
- Golmanesh L, Mehrani H, Tabei M, 2008. Simple procedures for purification and stabilization of human serum paraoxonase-1. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70:1037-1042.
- Gülçin İ, 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86: 345-391.
- Harel M, Aharoni AI, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RB, McCarthy A, Toker L, Silman I, Sussman JL, Tawfik DS, 2004. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and antiatherosclerotic enzymes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11: 412-419.
- Hofseth LJ, Hussain SP, Wogan GN, Harris CC, 2003. Nitric oxide in cancer and chemoprevention. *Free Radical Biology and Medicine*, 34: 955–968.
- Isgor MM, Beydemir S, 2010. Some cardiovascular therapeutics inhibit paraoxonase 1 (PON1) from human serum. *European Journal of Pharmacology*, 645: 135-142.
- Jaouad L, Milochevitch C, Khalil A, 2003. PON1 paraoxonase activity is reduced during HDL oxidation and is an indicator of HDL antioxidant capacity. *Free Radical Research*, 37: 77–83.
- Khan I, Gothwal A, Sharma AK, Qayum A, Singh SK, Gupta U, 2016. Biodegradable nano-architectural PEGylated approach for the improved stability and anticancer efficacy of bendamustine. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92: 1242–1251.
- Khersonsky O, Tawfik DS, 2005. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry*, 44: 6371–6382.
- Kumar A, 2010. Effects of simvastatin on paraoxonase 1 (PON1) activity and oxidative stress. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3: 310-314.
- Malin R, Laaksonen R, Knuuti J, Janatuinen T, Vesalainen R, Nuutila P, Lehtimäki T, 2001. Paraoxonase genotype modifies the effect of pravastatin on high-density lipoprotein cholesterol. *Pharmacogenetics*, 11: 625-633.
- Marsillach J, Mackness B, Mackness M. 2008. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radical Biology and Medicine*, 45: 146–157.
- Nagila A, Permpongpaiboon T, Tantrarongroj S, Porapakkham P, Chinwattana K, Deakin S, Porntadavity S, 2009. Effect of atorvastatin on paraoxonase1 (PON1) and oxidative status. *Pharmacological Reports*, 61: 892-898.
- Rozenberg O, Shih SD, Aviram M, 2005. Paraoxonase 1 (PON1) attenuates macrophage oxidative status: studies in PON1 transfected cells and in PON1 transgenic mice. *Atherosclerosis*, 181: 1809–1818.

- Saisho Y, Komiya N, Hirose H, 2006. Effect of valsartan, an angiotensin II receptor blocker, on markers of oxidation and glycation in Japanese type 2 diabetic subjects: blood pressure-independent effect of valsartan. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 74: 201–203.
- Sinan S, Kockar F, Gencer N, Yildirim H, Arslan O, 2006. Effects of some antibiotics on paraoxonase from human serum *in vitro* and from mouse serum and liver *in vivo*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29: 1559–1563.
- Spirou A, Rizos E, Liberopoulos EN, 2006. Effect of barnidipine on blood pressure and serum metabolic parameters in patients with essential hypertension: a pilot study. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 11: 256–261.
- Teiber JF, Draganov DI, La Du BN, 2003. Lactonase and Lactonizing of Human Serum Paraoxonase (PON1) and Rabbit Serum PON3. *Biochemical Pharmacology*, 66: 887-896.
- Türkeş C, Söyüt H, Beydemir Ş, 2014. Effect of calcium channel blockers on paraoxonase-1 (PON1) activity and oxidative stress. *Pharmacological Reports*, 66: 74-78.
- Türkeş C, Söyüt H, Beydemir Ş, 2016. In vitro inhibitory effects of palonosetron hydrochloride, bevacizumab and cyclophosphamide on purified paraoxonase-I (hPON1) from human serum. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 42: 252–257.

**To Cite:** Dilek DA, Eren Belgin E, Ayçık GA, 2022. Prediction of I-131 Influence in the Aegean Region by Chernobyl Accident Using the Ratio of I-129/I-127 in the Lake Sediments. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 306-316.

## Prediction of I-131 Influence in the Aegean Region by Chernobyl Accident Using the Ratio of I-129/I-127 in the Lake Sediments

David Alper DİLEK<sup>1</sup>, Ezgi EREN BELGİN<sup>1\*</sup>, Gül Asiye AYÇIK<sup>1</sup>

**ABSTRACT:** After the Chernobyl accident, as in many countries, the short half-life I-131 radioactivity could not be measured in Turkey-Aegean Region. By using Cs-137 radioactivity, which is easy to monitor, I-131 radioactivity was tried to be predicted, but it was thought that the results obtained by these two radioisotopes because of their different chemical properties would not be correct. In this study I-129 was studied to predict the retrospective I-131 radioactivity. I-129, another iodine radioisotope, was thought to be more appropriate as a predictive agent because of the same chemical properties as I-131 and also its long half-life. I-129 was measured in the Bafa Lake sediments by using microwave digestion, extraction and AMS methods and retrospective I-131 activity was predicted. As a result, it was found that I-131 radioactivity values in Bafa Lake habitat is between  $9.78 \times 10^{-3}$  Bqkg<sup>-1</sup> and  $1.02 \times 10^{-2}$  Bqkg<sup>-1</sup> and the accuracy of the method used has been proved.

**Keywords:** Chernobyl accident, Bafa Lake, I-129, I-131, AMS, lake sediment

<sup>1</sup>David Alper DİLEK ([Orchid ID: 0000-0002-0603-6595](https://orcid.org/0000-0002-0603-6595)) Ezgi EREN BELGİN\* ([Orchid ID: 0000-0002-1089-3741](https://orcid.org/0000-0002-1089-3741)) Gül Asiye AYÇIK ([Orchid ID: 0000-0001-8978-4363](https://orcid.org/0000-0001-8978-4363)) Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Muğla, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Ezgi EREN BELGİN, e-mail: ebelgin@mu.edu.tr

Bu çalışma David Alper DİLEK'in Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir. Makale 26-28 Ekim 2017 tarihlerinde Tokat'ta düzenlenen "II Ulusal Yumuşak Çekirdekli Meyve Türleri Sempozyumu'nda" poster olarak sunulmuştur.

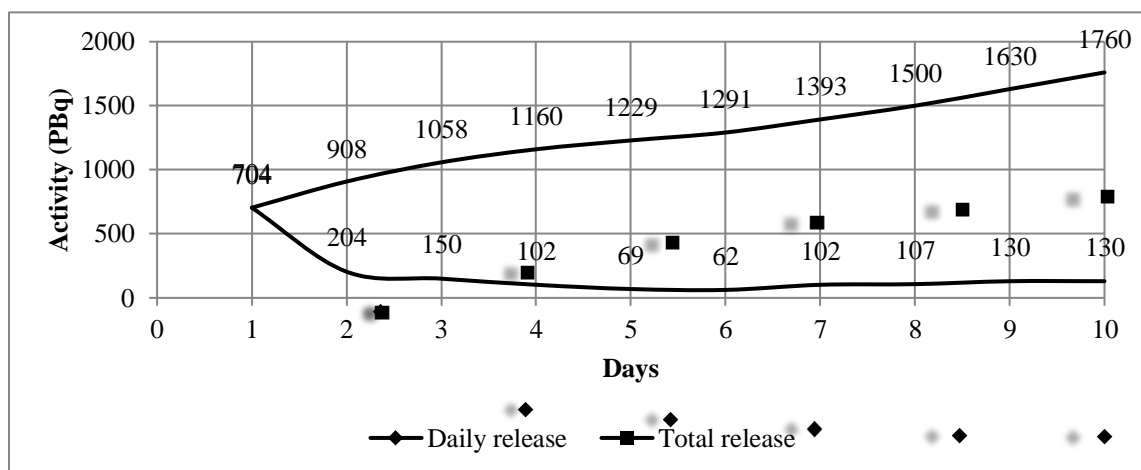
## INTRODUCTION

As it is known, a big explosion occurred in the 4th reactor of the Chernobyl Nuclear Power Plant in Ukraine-Chernobyl region on April 26, 1986 (TAEKa, 2007). The radioactive particles that started to leak into the atmosphere as a result of the explosion were first affected the countries of Ukraine, Belarus and the Russian Federation, and then Northern European countries such as Finland, Sweden and Norway. According to Turkey State Meteorology Affairs Directorate report of wind and regional precipitation for 1-9 May 1986, it is believed that Turkey also seriously affected by the radioactive contamination (TAEKb, 2007). However, as in many countries, I-131 radioactivity could not be measured in many parts of our country, especially in the Aegean Region due to its short (8.02 days) half-life (TAEKc, 2007).

After a nuclear accident, radioactive fallout is transported to the lake environment by dry/wet deposition, streams and erosion of contaminated soils. Lakes are suitable for retrospective isotope measurements due to the being a sealed system against radionuclides. Thus, in this study, the amount of I-129 was measured in the Bafa Lake in the Aegean Region in order to foresee the I-131 activity influenced to the Aegean Region in the accident. In this study it was also aimed to discuss the accuracy of the method and contribute to the literature.

I-131 is important for environmental contamination caused by radioactive waste due to its volatility, short half-life and abundance in fission products. In addition, I-131 is an important radioactive isotope for human health, as it can accumulate in thyroids and cause an increase in thyroid cancer.

The release of the I-131 radionuclide in Chernobyl took place over a period of 10 days at variable speeds as indicated in Figure 1 (TAEKa, 2007).



**Figure 1.** Released I-131 from Chernobyl Nuclear Power Plant in 10-days after the accident

Some amount of radionuclides released into the atmosphere in the Chernobyl accident are stated as 6 kg for I-129 (Aldahan et al., 2007) and 1200-1760 PBq for I-131 (TAEKa, 2007; UNSCEAR, 2008).

Then, I-131 activity was tried to be predicted by making use of Cs-137 radioactivity, which is easy to monitor due to its long half life (30.17 years). However, the accuracy of the obtained I-131 activity results by this method is controversial due to the different chemical behaviour of the two radioisotopes.

Soil, water and plant samples of different countries contaminated after the accident were studied and the I-131 amount was tried to be found by using the atom ratios of I-129/Cs-137, I-131/Cs-137 (Dubina et al., 1990; Mironov et al., 2002; Hou et al., 2003; Michel et al., 2005).

I-129 concentrations were examined in 42 soil profile samples in 1995 and 1997, respectively, in contaminated soils of Russia and Ukraine. It is found that I-129 activities varied in the range of 0.06-

24.5 mBqkg<sup>-1</sup> depending on the depth factor in soil profiles. In just two examples, a very high activity of I-129 such as 52 mBqkg<sup>-1</sup> in the Russia-Gomel region and 111 mBqkg<sup>-1</sup> at 800 meters from Chernobyl were detected. In similar studies, I-129/I-131 atom ratio was found to be 15.2±4.7 in 24 soil samples (Mironov et al., 2002) and I-129/I-131 atom ratio was found to be 2±10 in animal thyroids (Van Middlesworth et al., 1997). With the help of these data, the detection of the migration routes of iodine isotopes and the feasibility of calculating the historical dosimeter of I-131 has been proved (Fehn et al., 2002). Then, I-129 and I-131 measurements were made in soil, seawater and pelagic sediment, animal thyroid, lake water/sediment, air and plant samples by many different researchers in different parts of the world. In the studies, using the I-129/I-131, I-129/I-127 atom ratios, contamination of the regions caused by nuclear accidents and migration routes of iodine were investigated (Edwards vd 1962; Fabryka-Martin et al., 1985; Arntsing et al., 1991; BstMLU, 1998; Mironov et al., 2002; Ernst et al., 2003; Hou et al., 2003; Michel et al., 2005; Matsuzaki et al., 2007; Englund et al., 2008; Liu et al., 2008; Muramatsu et al., 2008; Otosaka et al., 2008; Hou et al., 2009; Englund et al., 2010; Hou et al., 2010; Zhang et al., 2011; METX, 2011; Daraoui et al., 2012; Miyake et al., 2012; Miyake et al., 2015; Muramatsu et al., 2015; Ezerinskis et al., 2016; Fan et al., 2016; Matsunaka et al., 2016; Yang et al., 2017; Zhang et al., 2018).

In their studies, Daraoui et.al. reported that Cs-137 and I-129 showed different distributions in sediment profile, while Michel et.al. reported that I-129 and Cs-137 mobility was different in the soil (Daraoui et.al. 2012; Michel et.al. 2015). Miyake et.al. reported that I-129 and I-131 will exhibit similar chemical behavior in the environment and that I-131 activity can be predicted by performing I-129 measurement (Miyake et al., 2015). In the study reported by Fujiwara (Fujiwara, 2016) the temporal variations of I-131 deposited on the ground and accumulated in cropland soil during the early stages of the Fukushima nuclear accident were monitored. I-129 concentrations in atmospheric deposits and soil were measured to examine the feasibility of retrospectively reconstructing I-131 levels from the levels of accident-derived I-129 levels and the I-131 concentrations measured in the topsoil were reported as very consistent with the I-131 concentrations reconstructed from the I-129 concentrations in the soil.

In this study, it is thought that the use of Cs-137 measurements to predict retrospective I-131 activity will not be correct, due to different chemical behaviors of cesium and iodine in soil, water and sediment environments. Instead, I-131 amounts were predicted by using I-129 measurements that has the same chemical properties and behaviors with I-131. Thus accuracy of the method was questioned and the I-129 and I-131 activities were studied for Turkey-Egean Region for the first time.

## MATERIALS AND METHODS

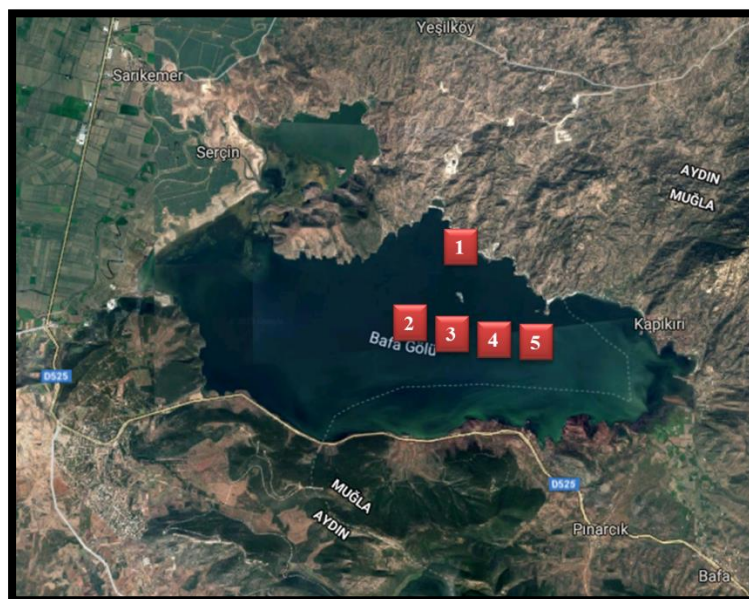
### Sampling Area

Bafa Lake is a natural embankment lake with a surface area of 65 km<sup>2</sup> located in the coordinates of 37 31' North, 27 27' East (Googlemaps, 2019; Balık and Ustaoglu, 1989). The depth of the lake reaches 21 m in some places and the percentage of sludge in its sediments varies between 6 and 97%. The sediments in the center of the lake are storage centers with sludge amounts exceeding 90% (Yilgör, 2012).

The Bafa Lake sedimentation rate varies between 0.089-7.587 cm and the sedimentation rate is on average 0.36 cm per year (Yilgör, 2012). In our study, sediment samples were taken on April 11, 2017 and 31 years have passed since the accident. In this case, approximately 11.408 cm sediment has accumulated in Lake Bafa after the accident.

### Sampling and Pretreatment

As shown in Figure 2, samples were taken from 5 different points at a depth of 5-10 m with a UWT Core sediment device as a 60 cm sediment profile sample. Sample coordinates are given in Table 1. The samples taken were kept at 4°C.



**Figure 2.** Lake Bafa sampling points

Sediment samples were divided into slices in 2 cm layers and dried at 103.5 °C for 24 hours. The weight of each sample was sensitively measured. Dry weights of the samples were found to be 16 g on average. Samples were then ground in a ball mill and sieved to a particle size of <77 microns.

**Table 1.** Lake Bafa sampling coordinates

	Sample Codes				
	N1	N2	N3	N4	N5
<b>Coordinates</b>	37°31'5.8" N	37°29'54.6" N	37°29'46.1" N	37°29'44.1" N	37°29'43.8" N
<b>(North/East)</b>	27°27'52.4" E	27°26'53.8" E	27°27'39.5" E	27°28'23.0" E	27°29'9.5" E

### Taking Iodine in Sediment into Solution Medium

Microwave digestion method was used to take iodine into solution medium. 0.5 g sediment sample was taken into the PTFE-TFM container and 2 mg iodine was added to facilitate the migration of the isotopes in the sample to the final step. As the solvent, 10 mL of 60% HNO<sub>3</sub> was added then waited until CO<sub>2</sub> output due to the interaction of organic matter and acid was end. The samples were then subjected to digestion in the microwave (Gomez-Guzman, 2011). The ramp time for digestion was determined as 10 min, waiting time as 20 min and target temperature as 200°C. After digestion, the samples were filtered, the solution volume was completed to 50 ml and extraction was started.

Extraction was done by repeating 3 times with 12 ml of chloroform. 0.1 M 20 ml of sodium bisulphite solution was added to the chloroform phase. Then 0.1 M 20 mL of bariumnitrate solution was added to precipitate sulfate and sulfite ions in solution medium. Centrifugation for 20 minutes at 4000 rpm allowed the sulfate and sulfite ions in the solution to settle as Ba(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. 0.1 M 600 µL silver nitrate solution was added to precipitate the iodine, which is oxidized in the separated solution. The color of the solution, which was colorless at this stage, turned cloudy yellow, indicating that the iodine precipitated as silver iodide. The solution was centrifuged at 4000 rpm for 20 minutes. The resulting precipitate was dried at 60°C for 24 hours. In the last step, as the excess silver nitrate added collapsed as silver oxide,

blackish gray color was observed in the precipitate. Then atomic mass spectrometry measurements of the dried precipitate were made.

### Atomic Mass Spectrometry (AMS) Measurements

AMS measurements were performed with 1MV HVEE AMS at the Romanian-Bucharest University Horia Hulubei National Institute of Physics and Nuclear Engineering. The properties of the used AMS system are given in Table 2.

**Table 2.** Properties of the AMS system used in the study

<b>Size</b>	4.2x6.2 m
<b>Ion source</b>	100 $\mu$ A max.–2 seperated injector 120 <sup>0</sup>
<b>Tension before acceleration</b>	35 kV
<b>Injector magnet</b>	3 kV, 100 Hz
<b>Terminal voltage and charging current</b>	1 MV, 2 mA
<b>Analysis magnet</b>	90 <sup>0</sup> , 63 MeV amu, max current 300 A
<b>Electric global analyzer</b>	(ESA) 120 <sup>0</sup> , $\pm$ 60 kV

## RESULTS AND DISCUSSION

### I-129 Activity Calculations

In the study, the data in terms of particles  $g^{-1}$  obtained with AMS were expressed in Bq for each layer sample, in order to make the results meaningful. For this purpose, I-129 activities were calculated by using Equation 1.

$$A = N \times \lambda \quad (1)$$

In Equation 1., A represents activity in Bq, N represents number of radioactive particles and  $\lambda$  represents decay constant in ( $s^{-1}$ ).  $\lambda$  value of I-129 was calculated by using Equation 2. where  $t_{1/2}$  is half life of I-129 that equals to  $1.57 \times 10^7$  years.

$$\lambda = 0,693/t_{1/2} \quad (2)$$

Sample codes, depths, AMS results (particles  $g^{-1}$ ) and calculated I-129 activities ( $Bqg^{-1}$ ,  $Bqkg^{-1}$ ) are given in Table 3.

**Table 3.** Sample codes, depths, AMS results and calculated I-129 activities (nd: undetectable through the used analysis method)

Sample code	Depth (cm)	Particle number (particles $g^{-1}$ )	Activity ( $Bqkg^{-1}$ )	Sample code	Depth (cm)	Particle number (particles $g^{-1}$ )	Activity ( $Bqkg^{-1}$ )
<b>N1</b>	(10-12)	$1.71 \times 10^8$	$2.39 \times 10^{-4}$	<b>N2</b>	(10-12)	Nd	Nd
	(12-14)	Nd	Nd		(12-14)	$2.03 \times 10^8$	$2.84 \times 10^{-4}$
	(14-16)	$9.67 \times 10^7$	$1.35 \times 10^{-4}$		(14-16)	Nd	Nd
	(16-18)	$5.76 \times 10^7$	$8.06 \times 10^{-5}$		(16-18)	Nd	Nd
	(18-20)	Nd	Nd		(18-20)	Nd	Nd
<b>N3</b>	(10-12)	$1.51 \times 10^8$	$2.11 \times 10^{-4}$	<b>N4</b>	(10-12)	$2.29 \times 10^8$	$3.21 \times 10^{-4}$
	(12-14)	Nd	Nd		(12-14)	Nd	Nd
	(14-16)	$9.18 \times 10^7$	$1.29 \times 10^{-4}$		(14-16)	Nd	Nd
	(16-18)	Nd	Nd		(16-18)	Nd	Nd
	(18-20)	Nd	Nd		(18-20)	Nd	Nd
<b>N5</b>	(10-12)	Nd	Nd				
	(12-14)	Nd	Nd				
	(14-16)	$5.00 \times 10^7$	$7.00 \times 10^{-5}$				
	(16-18)	Nd	Nd				
	(18-20)	Nd	Nd				

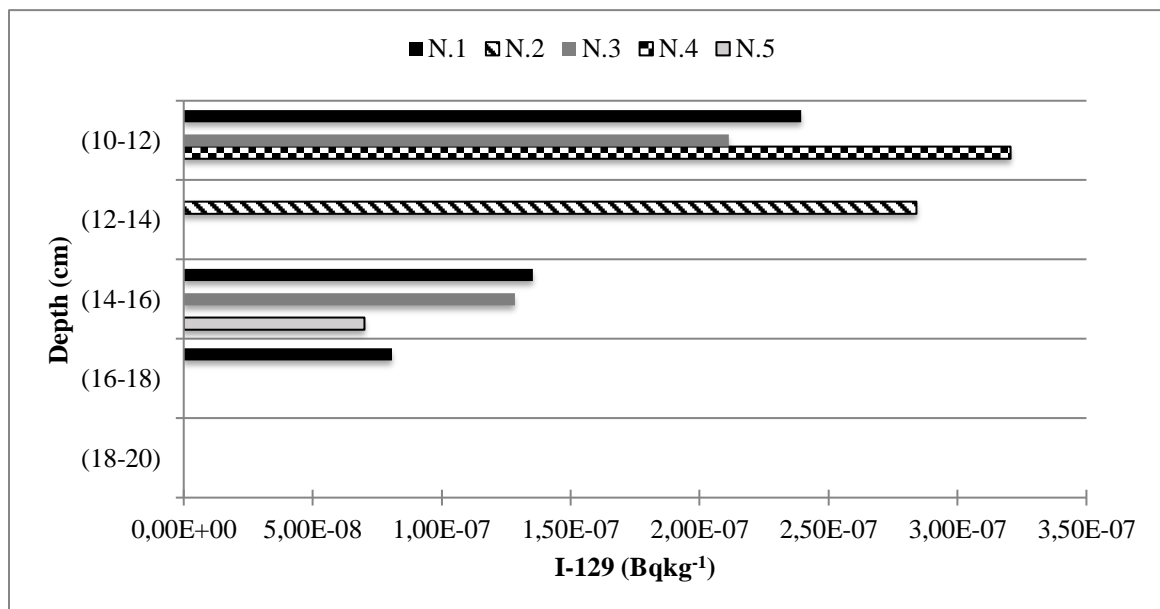


In order to evaluate the results more easily, the obtained data were grouped. Also, since the average sediment accumulation rate of Bafa Lake, which is the sample area in the study, is approximately  $0.387 \text{ cm year}^{-1}$  (Yılğör, 2012), the age determination of the sediment layers was made based on the layer depth. The results obtained are given in Table 4.

**Table 4.** Distribution of I-129 activity concentrations ( $\text{Bqg}^{-1}$ ) in depth profile

Sample Code	Depth:18-20 cm Age: 47-52 years Date: 1965-1970	Depth:16-18 cm Age: 41-47 years Date: 1970-1976	Depth:14-16 cm Age: 36-41 years Date:1976-1981	Depth:12-14 cm Age: 31-36 years Date:1981-1986	Depth:10-12 cm Age: 26-31 years Date:1986-1991
N.5	Nd	Nd	$7.00 \times 10^{-8}$	Nd	Nd
N.4	Nd	Nd	Nd	Nd	$3.21 \times 10^{-7}$
N.3	Nd	Nd	$1.29 \times 10^{-7}$	Nd	$2.11 \times 10^{-7}$
N.2	Nd	Nd	Nd	$2.84 \times 10^{-7}$	Nd
N.1	Nd	$8.06 \times 10^{-8}$	$1.35 \times 10^{-7}$	Nd	$2.39 \times 10^{-7}$

Figure 3 was also obtained by converting the data given in Table 4 into a graphic.



**Figure 3.** Distrubition of I-129 concentration in depth profiles

When Figure 3 is interpreted, it was estimated that 1986, when Chernobyl accident occurred, corresponded to approximately 15 cm sediment depth. It was seen that this result is in accordance with the sediment layer dating by Yılğör (Yılğör, 2012). The reason for the deviations that can be ignored is the variability of the sediment accumulation rate in the lake and the difference of the iodine-holding capacity of the sediment.

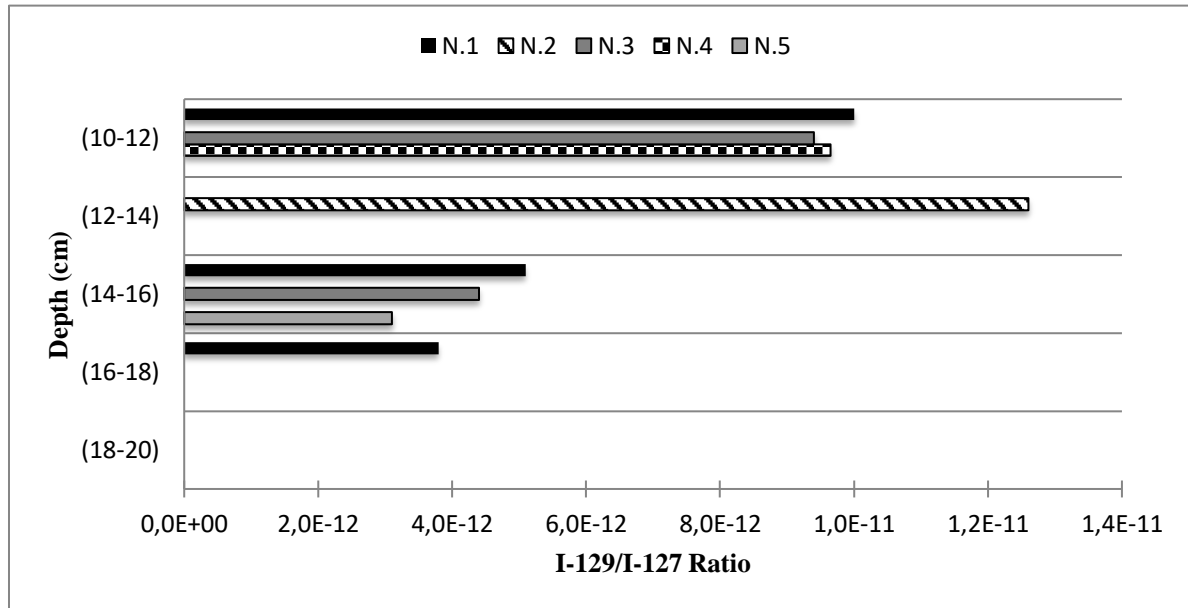
As can be seen in Figure 3, it was observed that the I-129 accumulation was started above 15 cm depth that is corresponding 1987 (one year after accident) and reached a maximum in 1988-1990 and then I-129 activity decreased gradually.

The distributions of I-129/I-127 atom ratios in depth profiles, obtained from the experimental study results, are given in Table 5 and Figure 4.

Using the data in Figure 4 and Table 5, it is thought that the increase in the accumulation of I-129 in the post-1986 period was due to the Chernobyl accident induced fallout. The low concentration of I-129 concentration in the pre-1986 period is estimated to be due to nuclear fuel reprocessing facilities and nuclear weapons trials.

**Table 5.** Distribution of I-129/I-127 atom ratios in depth profile

Sample Code	Depth:18-20 cm Age: 47-52 years Date: 1965-1970	Depth:16-18 cm Age: 41-47 years Date: 1970-1976	Depth:14-16 cm Age: 36-41 years Date:1976-1981	Depth:12-14 cm Age: 31-36 years Date:1981-1986	Depth:10-12 cm Age: 26-31 years Date:1986-1991
N.5	Nd	Nd	$3.10 \times 10^{-12}$	Nd	Nd
N.4	Nd	Nd	Nd	Nd	$9.65 \times 10^{-12}$
N.3	Nd	Nd	$4.40 \times 10^{-12}$	Nd	$9.40 \times 10^{-12}$
N.2	Nd	Nd	Nd	$1.26 \times 10^{-11}$	Nd
N.1	Nd	$3.80 \times 10^{-12}$	$5.10 \times 10^{-12}$	Nd	$1.00 \times 10^{-11}$

**Figure 4.** Distrubition of I-129/I-127 atom ratios in depth profile

The obtained results were compared with the literature values to question the accuracy of the method used in the study and the results are given in Table 6.

**Table 6.** Comparasion of results with literature values

Reference	Sampling region, Sample type	Method and equipment	I-129 activity (Bqkg <sup>-1</sup> )	
			Minimum	Maximum
<b>This study</b>	Lake Bafa, Sediment	Microwave digestion, AMS	$8.06 \times 10^{-5}$	$1.29 \times 10^{-4}$
<b>Michel et al., 2005</b>	Russia/Ukraine, Soil	RNAA, AMS	$6.00 \times 10^{-5}$	$2.45 \times 10^{-2}$
<b>Muramatsu et al., 2008</b>	Japan, Soil	Pyrohydrolysis, AMS	$1.40 \times 10^{-5}$	$4.50 \times 10^{-3}$
<b>Daraoui et al., 2012</b>	Germany, Soil	Standard method, AMS	$6.20 \times 10^{-4}$	$5.40 \times 10^{-3}$
<b>Daraoui et al., 2012</b>	Chile, Soil	Standard method, AMS	$1.50 \times 10^{-4}$	$1.62 \times 10^{-3}$
<b>Ezerinskis et al., 2016</b>	Lithuania, Forest soil	Pyrohydrolysis, AMS	$2.81 \times 10^{-4}$	$1.43 \times 10^{-3}$
<b>Ezerinskis et al., 2016</b>	Lithuania, Meadow soil	Pyrohydrolysis, AMS	$6.58 \times 10^{-4}$	$4.78 \times 10^{-3}$
<b>Zhang et al., 2018</b>	Philippines, Soil	Pyrohydrolysis, AMS	$7.00 \times 10^{-8}$	$3.00 \times 10^{-5}$

As can be seen from Table 6, the results obtained in this study are in agreement with the literature data.

### Prediction of I-131 Activity by Using I-129 Activity

It was suggested by Aldahan et al. (Aldahan et al., 2007) that 6 kg of I-129, whose activity was  $4.10 \times 10^{10}$  Bq (Equation 1.), was released into the atmosphere during the Chernobyl accident. It was reported by UNSCEAR that 1200-1760 PBq I-131 was released into the atmosphere during the accident (UNSCEAR, 2008). These values were used when predicting I-131 activity.

Table 7 contains the atom ratios of I-129/I-131 quantities of different studies given in the literature.

**Table 7.** Atom ratios of I-129/I-131 amounts in the literature

Reference	I-129/I-131 (g/g)
Mironov et.al. 2002	15.2
VanMiddlesworth et.al. 1997	27.0
Muramatsu et.al. 2015	19.5

The amounts of I-129 by gram were calculated from the I-129 particle values in Table 3. The amount of I-131 by gram were calculated by using I-129/I-131 atom ratios given in Table 7. In addition, the activity ( $\text{Bqkg}^{-1}$ ) values calculated using Equation 1. are also shown in Table 8.

**Table 8.** Calculated I-131 values by using the ratios given in Table 7

Samle Code	Depth	I-131 (g)			I-131 ( $\text{Bqkg}^{-1}$ )		
		Mironov et.al. 2002	VanMiddlesworth et.al. 1997	Muramatsu et.al. 2015	Mironov et.al. 2002	VanMiddlesworth et.al. 1997	Muramatsu et.al. 2015
N1	(10-12 cm)	$2.41 \times 10^{-15}$	$1.36 \times 10^{-15}$	$1.88 \times 10^{-15}$	$1.11 \times 10^{-2}$	$6.23 \times 10^{-3}$	$8.63 \times 10^{-3}$
	(12-14 cm)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	(14-16 cm)	$1.36 \times 10^{-15}$	$7.67 \times 10^{-16}$	$1.06 \times 10^{-15}$	$6.26 \times 10^{-3}$	$3.52 \times 10^{-3}$	$4.88 \times 10^{-3}$
	(16-18 cm)	$8.12 \times 10^{-16}$	$4.57 \times 10^{-16}$	$6.33 \times 10^{-16}$	$3.73 \times 10^{-3}$	$2.10 \times 10^{-3}$	$2.91 \times 10^{-3}$
	(18-20 cm)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
N2	(10-12 cm)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	(12-14 cm)	$2.86 \times 10^{-15}$	$1.61 \times 10^{-15}$	$2.23 \times 10^{-15}$	$1.31 \times 10^{-2}$	$7.40 \times 10^{-3}$	$1.02 \times 10^{-2}$
	(14-16 cm)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	(16-18 cm)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	(18-20 cm)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
N3	(10-12 cm)	$2.13 \times 10^{-15}$	$1.20 \times 10^{-15}$	$1.66 \times 10^{-15}$	$9.78 \times 10^{-3}$	$5.50 \times 10^{-3}$	$7.62 \times 10^{-3}$
	(12-14 cm)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	(14-16 cm)	$1.29 \times 10^{-15}$	$7.29 \times 10^{-16}$	$1.01 \times 10^{-15}$	$5.94 \times 10^{-3}$	$3.35 \times 10^{-3}$	$4.63 \times 10^{-3}$
	(16-18 cm)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	(18-20 cm)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
N4	(10-12 cm)	$3.23 \times 10^{-15}$	$1.82 \times 10^{-15}$	$2.52 \times 10^{-15}$	$1.48 \times 10^{-2}$	$8.35 \times 10^{-3}$	$1.16 \times 10^{-2}$
	(12-14 cm)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	(14-16 cm)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	(16-18 cm)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	(18-20 cm)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
N5	(10-12 cm)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	(12-14 cm)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	(14-16 cm)	$7.05 \times 10^{-16}$	$3.97 \times 10^{-16}$	$5.49 \times 10^{-16}$	$3.24 \times 10^{-3}$	$1.82 \times 10^{-3}$	$2.52 \times 10^{-3}$
	(16-18 cm)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	(18-20 cm)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

## CONCLUSION

As a result, at the end of the experimental studies, literature data and calculations, I-131 activity in the Bafa Lake sediments was found between  $9.78 \times 10^{-3}$  and  $1.02 \times 10^{-3} \text{ Bqkg}^{-1}$ . The average I-131 activity in the Bafa Lake sediments was found to be  $2.1 \times 10^{-3} \text{ Bqkg}^{-1}$ .

According to the measurements made in May 1986, the region with the highest concentration of I-131 radioactivity in Turkey was Edirne and its vicinity. In the first month after the accident, due to the limited data on I-131 radioactivity measurements in the Eastern Black Sea Region, a region-specific iodine assessment could not be made. Studies are being made to solve the deficiency of I-131 radioactivity measurements that are valid for many countries during the Chernobyl accident.

In this study, it was found that I-131 radioactivity can be predicted using the amount of I-129 radioisotope, a very long half-life fission product.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge the financial assistance of the Mugla Sitki Kocman University through the Grant 16/112 and Prof. Dr. Catalin Stan-sion, the Laboratory Head of the 'Horia

Hulubei National Institute of Physics and Nuclear Engineering R&D Institute' for his valuable contribution.

### Conflict of Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Author's Contributions

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

### REFERENCES

- Aldahan A, Alfimov V, Possnert G, 2007. 129-I Anthropogenic budget: Major sources and sinks. *Applied Geochemistry*, 22, 606–618.
- Arntsing R, Bjurman B, Geer DLE, Edvarson K, Finck R, Jakobsson S, Vintersved, I, 1991. Field gamma ray spectrometry and soil sample measurements in Sweden following the Chernobyl accident A data report. National Defence Research Establishment, 26 p.
- Balik S, Ustaoglu MR, 1989. Bioecological and economical investigation of Uluabat fish (*Acanthobrama mirabilis* Ladiges, 1960) in Lake Bafa, in Turkish. *Turkish Journal of Zoology*, 13:141-174.
- Bennett B, Bouville A, Hall P, Savkin M, Storm H, 2000. Chernobyl Accident: Exposures and Effects. Japan Health Physics Society, T-12-1, P-11-251.
- BstMLU, 1988. Radioaktive Kontamination der Boeden Bayerns, in German. Bayerische Staatsministerien fuer Landesentwicklung und Umweltfragen und fuer Ernaehrung, Landwirtschaft und Forsten, Munich.
- Daraoui A, Michel R, Gorny M, Jakob D, Sachse R, Synal HA, Alfimov V, 2012. Iodine-127 and Caesium-137 in the environment: soils from Germany and Chile. *Journal of Environmental Radioactivity*, 112:8-22.
- Dubina YV, Shchekin YK, Guskina LI, 1990. Systematisation and Verification of the Results of Spectrometric Measurements of Soil, Grass, Milk and Milk Production Samples with the Determined 131I Content. Institute of Nuclear Energy of the Belorussian Academy of Science.
- Edwards RR, 1962. Iodine-129: its occurrence in nature and its utility as a tracer, *Science*, 137:851-853
- Englund E, Aldahan A, Hou XL, Petersen R, Possnert G, 2010. Speciation of iodine, I-127 and 129I in lake sediments. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B268:1102-1105.
- Englund E, Aldahan A, Possnert, 2008. Tracing anthropogenic nuclear activity with 129I in lake sediment. *Journal of Environmental Radioactivity*, 99:219-229.
- Ensor DS, 2011. *Aerosol Science and Technology: History and Reviews*. RTI International is a trade name of Research Triangle Institute, ISBN: 978-1-934831-01-4.
- Ernst T, Szidat S, Handl J, Jakob D, Michel R, Benne J, Boess E, Gehrt E, Capelle A, Schneider J, Schafer W, Bottcher J, 2003. Migration of iodine-129 and iodine-127 in soils. *Kerntechnik*, 68:155-167.
- Ezerinskis Z, Hou XL, Druteikiene R, Puzas A, Sapolaite J, Gvozdait R, Gudellis A, Buivydas S, Remeikis V, 2016. Distribution and source of 129I, Pu-239, Pu-240, Cs-137 in the environment of Lithuania. *Journal of Environmental Radioactivity*, 151:166-173.
- Fabryka-Martin J, Bentley H, Elmore D, Airey PL, 1985. Natural iodine-129 as an environmental tracer. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 49:337-347.

- Fan Y, Hou X, Zhou W, Liu G, 2016. 129I record of nuclear activities in marine sediment core from Jiaozhou Bay in China. *Journal of Environmental Radioactivity*, 154:15-24.
- Fehn U, Snyder GT, Varekamp JC, 2002. Detection of recycled marine sediment components in crater lake fluids using 129I. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 115:451-460.
- Fujiwara H, 2016. Observation of radioactive iodine (131I, 129I) in cropland soil after the Fukushima nuclear accident. *Sci. Totan. Environ.* 566-567: 1432-1439
- Gomez-Guzman JM, Enamorado-Baez SM, Pinto-Gomez AR, Abril-Hernandez JM, 2011. Microwave-based digestion method for extraction of I-127 and 129I from solid material for measurements by AMS and ICP-MS. *International Journal of Mass Spectrometry*, 303:103-108.
- Hou X, Hansen V, Aldahan A, Possnert G, Lind OC, Lujanene G, 2009. A review on speciation of iodine-129 in the environmental and biological samples. *Anal Chim Acta*, 632:181-196.
- Hou XL, Fogh CL, Kucera J, Andersson KG, Dahlgard H, Nielsen SP, 2003. Iodine-129 and Caesium-137 in Chernobyl contaminated soil and their chemical fractionation. *The Science of the Total Environment*, 308:97-109.
- Hou XL, Fogh CL, Kucera J, Andersson KG, Dahlgard H, Nielsen SP, 2003. Iodine-129 and Caesium-137 in Chernobyl contaminated soil and their chemical fractionation. *The Science of the Total Environment*, 308:97-109.
- Hou XL, Zhou WJ, Chen N, Zhang LY, Liu Q, Luo MY, Fan YK, Liang WG, Fu YC, 2010. Determination of ultralow level 129I/I-127 in natural samples by separation of microgram carrier free iodine and accelerator mass spectrometry detection. *Anal Chem*, 82:7713-7721.
- Kaeri "Table of Nuclides" <http://atomkaerirekr/nuchart/?zlv=2> (Erişim: 6 şubat 2019).
- Liu G, Li D, Yi Y, Liu S, Bai J, Zhang J, 2008. Radionuclide distribution in sediments and sedimentary rates in the Jiaozhou Bay. *Acta Geosci Sin*, 29:769-777.
- Matsunaka T, Sasa K, Sueki K, Takahashi T, Satou Y, Matsumara M, Kinoshita N, Kitagawa J, Matsuzaki H, 2015. Pre-and post-accident 129I and Cs-137 levels, and 129I/Cs-137 ratios in soil near the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant. *Japan Journal of Environmental Radioactivity* 151:209-217.
- Matsuzaki H, Muramatsu Y, Kato K, Yasumoto M, Nakano C, 2007. Development of 129I-AMS system at MALT and measurements of 129I concentrations in several Japanese soils. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 259:721-726.
- MEXT, 2011. Preparation of Distribution Map of Radiation Doses, Map of Iodine 131 Concentration in Soil., Organized by MEXT September 21, 2011, in Japanese.
- Michel R, Handl J, Ernst T, Botsch W, Szidat S, Schmidt A, Jakob D, Beltz D, Romantschuk LD, Synal HA, Schnabela C, Lopez-Gutierrez JM, 2005. Iodine-129 in soils from Northern Ukraine and the retrospective dosimetry of the iodine-131 exposure after the Chernobyl accident. *Science of the Total Environment*, 340:35-55.
- Mironov V, Kudrjashov V, Yiou F, Raisbeck GM, 2002. Use of 129I and Cs-137 in soils for the estimation of 131I deposition in Belarus as a result of the Chernobyl accident. *Journal of Environmental Radioactivity*, 59:293-307.
- Miyake Y, Matsuzaki H, Fujiwara T, Saito T, Yamagata T, Honda M, Muramatsu Y, 2012. Isotopic ratio of radioactive iodine, 129I/131I released from Fukushima Daiichi NPP accident. *Geochemical Journal*, 46:327-333.

- Miyake Y, Matsuzaki H, Sasa K, Takahashi T, 2015. Measurement of long-lived radionuclides in surface soil around F1NPP accident site by Accelerator Mass Spectrometry. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B361:627-631.
- Muramatsu Y, Matsuzaki H, Toyama C, Ohno T, 2015. Analysis of <sup>129</sup>I in the soils of Fukushima Prefecture: preliminary reconstruction of <sup>131</sup>I deposition related to the accident at Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant, FDNPP. *Journal of Environmental Radioactivity*, 139:344-350.
- Muramatsu Y, Takada Y, Matsuzaki H, Yoshid S, 2008. AMS analysis of <sup>129</sup>I in Japanese soil samples collected from background areas far from nuclear facilities. *Quaternary Geochronology*, 3:291-297.
- Otosaka S, Satoh Y, Suzuki T, Kuwubara J, Nakanishi T, 2018. Distribution and fate of <sup>129</sup>I in the seabed sediment of Fukushima. *Journal of Environmental Radioactivity*, 192:208-218.
- Raisbeck GM, Yiou F, 1999. <sup>129</sup>I in the oceans: origins and applications. *The Science of the Total Environment* 237/238 31-41.
- TAEK\_a, Çernobil Nükleer Santralinin Özellikleri ve Kazanın Oluşumu, 2007. 2 Basım, 24 sayfa, Ankara-Türkiye.
- TAEK\_b, Çernobil Kazasının Ülkeler Üzerindeki Etkileri, 2007. 2 Basım, 60 sayfa, Ankara-Türkiye.
- TAEK\_c, Türkiyede Çernobil Sonrası Radyasyon ve Radyoaktivite Ölçümleri, 2007. 2 Basım, 107 sayfa, Ankara-Türkiye.
- UNSCEAR, 2008. Sources And Effects Of Ionizing Radiation, Report To The General Assembly With Scientific Annexes, VOLUME II Scientific Annexes C, D And E, ISBN-13: 978-92-1-142280-1.
- Vanmiddlesworth L, Handl J, 1997. <sup>129</sup>I, <sup>131</sup>I and I-127 in animal thyroids after the Chernobyl nuclear accident. *Health Phys*, 73:647-50
- Yang G, Tazoe H, Yamada M, 2017. Can <sup>129</sup>I track Cs-135, U-236, Pu-239, and Pu-240 apart from <sup>131</sup>I in soil samples from Fukushima Prefecture, Japan. *Scientific Reports*, 7:15369.
- Yılğör S, 2012. Bafa Gölü Sedimanlarında Ağır Metal Kirliliğinin Araştırılması. Dokuz Eylül Üniversitesi, Doktora Tezi, İzmir.
- Zhang L, Hou X, Li H, Xu X, 2018. A 60-year record of <sup>129</sup>I in Taal Lake sediments, Philippines: Influence of human nuclear activities at low latitude regions. *Chemosphere*, 193:1149-1156.
- Zhang LY, Zhou WJ, Hou XL, Chen N, Liu Q, He CH, Fan YK, Luo MY, Wang ZW, Fu YC, 2011. Level and source of <sup>129</sup>I of environmental samples in Xi'an region. *China Sci Total Environ*, 409:3780-3788.

**Atf İçin:** Arıkan Ölmez N, 2022. Asiklik imitlerin mikrodalga destekli sentezi. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 317-323.

**To Cite:** Arıkan Ölmez N, 2022. Microwave-assisted synthesis of acyclic imides. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 317-323.

## Microwave-Assisted Synthesis of Acyclic Imides

Nevin ARIKAN ÖLMEZ

**ABSTRACT:** Imides are an important class of compounds found in the structure of many biologically active and natural compounds. Imides are also important starting materials used in the synthesis of many heterocyclic compounds. Therefore, the synthesis of these compounds has attracted considerable attention and several innovative methods have been developed. Herein, the synthesis of acyclic imides has been reported from nitriles and carboxylic anhydrides in the presence of catalytic amounts of p-toluenesulfonic acid (PTSA) or H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> under microwave irradiation. The reaction has proceeded in better yields with PTSA. When sulfuric acid was used, the product was obtained in lower yields since the degradation was increased. This new microwave-assisted method is compared with conventional heating, and the other methods, reported in the literature. The main advantages of this procedure are shorter reaction times, easier work-up, and good yields.

**Keywords:** Acyclic imide, nitrile, carboxylic anhydride, microwave-assisted synthesis

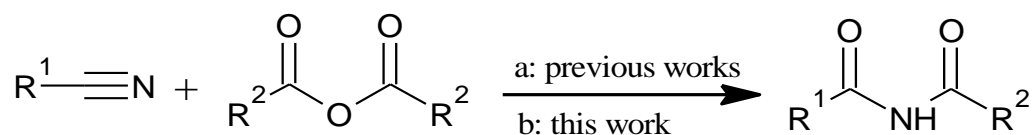
## INTRODUCTION

Imides are diacyl derivatives of ammonia or a primary amine, and these compounds are commonly found in many natural products and bioactive compounds (Maruyama et al., 1975; Ding et al., 2008). Many drugs containing the imide group exhibit so many different biological activities such as immunosuppressants (Koehn et al., 1992), cytotoxic anticancer agents (Pettit et al., 1989), antibiotics (Nakamura et al., 1974) and antifeedans (Nagle et al., 1996). Also, imides are important precursors in the synthesis of nitrogen-containing heterocyclic compounds (Flitsch et al., 1983, 1990; Lee et al., 2012).

Unlike cyclic imides, a few methods have been reported for the synthesis of acyclic imides. Generally, acyclic imides are synthesized by the reaction of amides with carboxylic acid and their derivatives as esters, anhydrides, and acyl chlorides (Wheeler et al., 1970; Challis et al., 1970; Davidson and Skovronek., 1958; Hurd and Prapas, 1959; Durrell et al., 1963). The other methods for the synthesis of acyclic imides are aminocarbonylation of aryl bromides (Schnyder and Indolese, 2002), reaction of azalactones with oxygen and palladium (Bates et al., 1984), oxidation of amides with ruthenium tetroxide (Tanaka et al., 1987), reaction of deprotonated amides with pentafluorophenyl esters (Merrit et al., 1998), reaction of amides with *N,N*-bis(trimethylsilyl)formamides (Kantlehner et al., 1978),  $\alpha,\alpha,\alpha$ -trichloromethylcarbonyl compounds (Atanasov et al., 1990), diketene (Yamamoto et al., 1981) or vinyl esters (Seiller et al., 1995). In recent years, acyclic imides have been synthesized from oxidation of secondary amides with hypervalent iodine reagent DMP (Dess-Martin periodinane) (Nicolaou and Mathison, 2005), oxidation of *N*-benzylamides with selectfluor and copper bromide (Jin et al., 2011) or by using copper catalyst TBHP/TEMPO system (Yu et al., 2015), reaction of amides with carboxylic anhydrides presence of sulphuric acid by microwave irradiation (Lee et al., 2012), direct coupling of *NH*-amides with methylarenes under iodine/aqueous TBHP conditions (Aruri et al., 2016), oxidative cleavage of C-C double bonds of enamides by the combination of hypervalent iodine (III) and TMSN<sub>3</sub> (Liu et al., 2017), oxidations of *N*-alkylamides by using oxone as the oxidant in the presence of a catalytic amount of KBr in H<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> under irradiation by an white LED (Mei et al., 2018).

Since the first reports in 1986 (Gedey et al., 1986; Giguere et al., 1986) the use of the microwave heating technique has become an essential tool in all areas of organic synthesis. The microwave mediated organic reactions are environmentally friendly, safe, rapid, and high yield compared to conventional methods.

The synthesis of acyclic imides from the reaction of nitriles with acyclic anhydrides, in the presence of, silica sulfuric acid (Habibiet et al., 2007), tungtophosphoric acid under microwave irradiation (Mohammadpoor-Baltork et al., 2011) or *p*-toluenesulfuric acid by ultrasound-assisted (Nasr-esfahani et al., 2012) have been reported previously. Herein we report a microwave-assisted method for the synthesis of acyclic imides from nitriles and carboxylic anhydrides by using PTSA or H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as a catalyst (Figure 1).



**a) A:** Silica sulfuric acid (Habibi et al., 2007), **B:** tungtophosphoric acid (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) under microwave irradiation (Mohammadpoor-Baltork et al., 2011), **C:** *p*-toluenesulfuric acid (PTSA) by ultrasound-assisted (Nasr-esfahani et al., 2012)

**b)** PTSA and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> under microwave irradiation

**Figure 1.** Methods for the preparation of imides from nitriles and carboxylic anhydrides



## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Melting points were determined in Electrothermal 9100 melting point apparatus and are uncorrected. Infrared spectra were recorded on Spectrum Two (Perkin Elmer, USA) FT-IR spectrometer in ATR and the wave numbers were given in  $\text{cm}^{-1}$ . NMR spectra were recorded using 400-MR NMR spectrometer (Agilent Technologies, USA). All of the microwave-assisted reactions was carried out with Discover System 908010 (Cem Corporation) All solvents and reagents were commercially available. Aluminum backed silica gel plates (Merck Kiesgel 60 F-254) were used for thin-layer chromatography (TLC).

### Experimental Procedure

A mixture of nitrile (1mmol), carboxylic anhydride (2 mmol) and PTSA (30 mol %, 0.3 mmol) (or concantrared (98%,  $d=1.84 \text{ g/mL}$ )  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 2 drops) was placed in a sealed tube and heated at  $110^\circ\text{C}$  in silicon bath or irradiated under microwave at  $100^\circ\text{C}$  ( $80^\circ\text{C}$  for  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). The reaction was monitored by TLC (ethyl acetate: hexan, 1:3). After the reaction was completed, the reaction mixture was cooled to room temperature. Chloroform was added to the reaction mixture and washed several times with water. The organic phase dried with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography using ethyl acetate : hexane (1:3 or 1:1) eluent system or crystallized from hexane.

All products were characterized by the comparison of their melting or boiling points, IR, and  $^1\text{H}$  NMR spectra with those of authentic samples.

**N-Acetylbenzamide(1):** White solid, mp.  $108\text{-}109^\circ\text{C}$  ( $109\text{-}110^\circ\text{C}$ ; Mohammadpoor-Baltork et al., 2011). FTIR (ATR)  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ; 3270, 1750, 1676.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.63 (s, 3H); 7.52-7.86 (m, 5H); 8.63 (brs, 1H).

**N-Acetyl-4-methylbenzamide (2):** White solid, mp.  $113\text{-}114^\circ\text{C}$  ( $111\text{-}113^\circ\text{C}$ ; Mohammadpoor-Baltork et al., 2011). FTIR (ATR)  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ; 3262, 1724, 1681.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.43 (s, 3H); 2.61 (s, 3H); 7.26-7.31 (m, 2H); 7.74-7.76 (m, 2H); 8.76 (brs, 1H).

**N-Acetyl-3-methoxybenzamide (3):** White solid, mp.  $78\text{-}79^\circ\text{C}$  ( $79\text{-}80^\circ\text{C}$ ; Lee et al., 2012). FTIR (ATR)  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ; 3367, 1670, 1650.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.62 (s, 3H); 3.96 (s, 3H); 7.49-7.50 (m, 2H); 7.58 (s, 1H); 7.74-7.76 (m, 2H); 9.23 (brs, 1H).

**N-Acetyl-3,4-dimethoxybenzamide (4):** White solid, mp.  $165\text{-}168^\circ\text{C}$ . FTIR (ATR)  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ; 3367, 1655, 1651.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.62 (s, 3H); 3.92 (s, 3H); 3.95 (s, 3H); 7.45-7.57 (m, 2H); 7.76 (s, 1H); 9.50 (brs, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 174.8, 170.7, 165.3, 153.2, 149.3, 124.4, 122.2, 110.2, 56.2, 55.9, 25.6.

**N-Acetyl-4-chlorobenzamide (5):** White solid, mp.  $141\text{-}143^\circ\text{C}$  ( $136\text{-}137^\circ\text{C}$ ; Mohammadpoor-Baltork et al., 2011). FTIR (ATR)  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ; 3255, 1683, 1660.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.61 (s, 3H); 7.47-7.49 (m, 2H); 7.82-7.85 (m, 2H); 8.99 (brs, 1H).

**N-Acetyl-4-florobenzamide (6):** White solid, mp.  $114\text{-}115^\circ\text{C}$  ( $111\text{-}112^\circ\text{C}$ ; Mohammadpoor-Baltork et al., 2011). FTIR (ATR)  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ; 3285, 1670, 1604.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.61 (s, 3H); 7.17-7.21 (m, 2H); 7.88-7.90 (m, 2H); 8.63 (brs, 1H).

**N-Acetyl-3-nitrobenzamide (7):** Yellow solid, mp.  $194\text{-}195^\circ\text{C}$  ( $195\text{-}196^\circ\text{C}$ ; Mohammadpoor-Baltork et al., 2011) FTIR (ATR)  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ; 3071, 1679, 1600.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.64 (s, 3H); 7.75-8.75 (m, 4H); 8.88 (brs, 1H).

**N-Acetylacetamide (8):** White solid, mp.  $76\text{-}77^\circ\text{C}$  ( $73^\circ\text{C}$ ; Mohammadpoor-Baltork et al., 2011). FTIR (ATR)  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ; 3168, 1660, 1598.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.31 (s, 6H); 8.63 (brs, 1H).

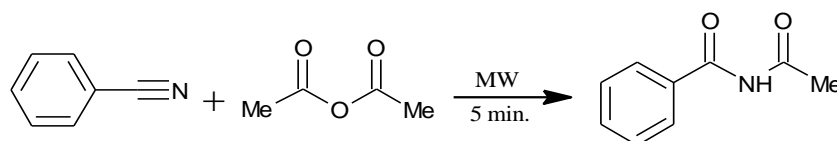
**N-Benzoylbenzamide (9):** White solid, mp. 148-149 °C (146-147 °C Voorstad et al., 1985). FTIR (ATR)  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ; 3071, 1678, 1601.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.47-7.51 (m, 4H); 7.61-7.64 (m, 2H); 8.13-8.15 (m, 4H); 9.11 (brs, 1H).

**N-Benzoyl-4-methylbenzamide (10):** White solid, mp. 125-130 °C (Yu et al., 2015, melting point not available) FTIR (ATR)  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ; 3270, 1693, 1670.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.43 (s, 3H); 7.29-7.86 (m, 9H); 8.98 (s, 1H).

## RESULTS AND DISCUSSION

Acyclic imides were prepared by the reaction of aromatic and aliphatic nitriles with carboxylic anhydride in the presence of *p*-toluenesulphonic acid (PTSA) or  $\text{H}_2\text{SO}_4$  under microwave irradiation in good to excellent yields. The reaction of benzonitrile and acetic anhydride was chosen as the model for optimization of the reaction condition. For this purpose, the reaction of benzonitrile (1 eqv.) and acetic anhydride (2 eqv.) was carried out with both  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and PTSA in different temperatures in solvent-free condition (Table 1). The reaction was monitored by TLC. The reaction was completed within 5 min. As shown in Table 1, both sulfuric acid and PTSA catalyzed reaction proceeds in good to excellent yields. However, when  $\text{H}_2\text{SO}_4$  was used, it was observed that the yield decreased due to increased degradation at high temperatures. Decomposition products have not been determined because the rate of degradation is very low. According to the results, the optimum temperature was determined as 80 °C for  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and 100 °C for PTSA.

**Table 1.** The preparation of imides under various reaction conditions<sup>a</sup> under microwave irradiation.



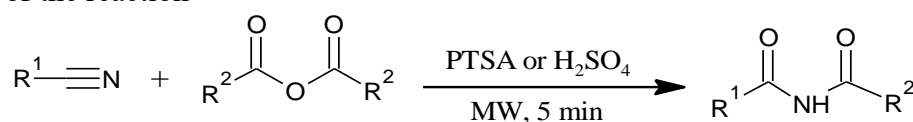
Entry	Temperature (°C)	Yield <sup>b</sup> (%)	
		$\text{H}_2\text{SO}_4$	PTSA
1	<b>80</b>	<b>90</b>	92
2	90	87	92
3	<b>100</b>	80	<b>95</b>
4	110	78	90
5	120	77	88

a) Used benzonitrile (1.0 mmol), acetic anhydride (2.0 mmol) and PTSA (30 mol %), or conc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (2 drops)

b) Isolated yield

In order to study the generality of this procedure, other aromatic and aliphatic nitriles were reacted with carboxylic anhydrides under optimized conditions (Table 2). Regarding aromatic nitriles, the substituents of benzonitriles did not affect the reactivity of the reaction electronically and sterically. In general, benzonitriles with both electron-donating and electron-withdrawing groups reacted well with acetic anhydride. When PTSA was used as the acid catalyst, imides have been obtained in much better yields in the same conditions. Compared to the method in the literature (Nasr-Esfahani et al., 2012), products were obtained in a shorter time than the ultrasonic-assisted reaction in similar yields.

The reaction was also carried out under conventional heating in the silicone bath, and the results were compared (Table 3). As shown in Table 3, the synthesis of imides under microwave irradiation is more effective than conventional heating. The transformations under conventional heating were completed within 1-2 hours in average yields, while under microwave irradiation were completed within 5 min in good yields.

Table 2. Scope of the reaction<sup>a</sup>

Entry	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Yield <sup>b</sup> (%)		MP (Exp. /Lit. <sup>c</sup> ) (°C)
			PTSA	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
1	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>	98	80	108-109/ 109-110
2	4-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub>	97	78	113-114/111-113
3	3-OMeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub>	90	72	78-79/79-80
4	3,4-(OMe) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	95	77	165-168
5	4-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub>	95	75	141-143/136-137
6	4-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub>	92	74	114-115/111-112
7	3-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub>	72	65	194-195/195-196
8	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	92	77	76-77/73
9	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	82	70	148-149/146-147
10	4-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	97	82	125-130/ not available

a) Used nitrile (1.0 mmol), carboxylic anhydride (2.0 mmol) and PTSA (30 mol %, 0.3 mmol) (at 100 °C) or conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 drops) (at 80 °C)

b) Isolated yield

c) References were given in the experimental section

Table 3. Effect of microwave irradiation for the reaction

Entry	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Conventional heating <sup>a</sup>		Microwave irradiation <sup>b</sup>	
			Time (min)	Yield <sup>c</sup> (%)	Time (min)	Yield <sup>c</sup> (%)
1	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>	45	70	5	98
2	4-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub>	55	82	5	97
3	4-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub>	50	75	5	95
4	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	90	60	5	92
5	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	90	50	5	82

a) Used nitrile (1.0 mmol), carboxylic anhydride (2.0 mmol) and PTSA (30 mol %) in silicon bath at 110 °C.

b) Used nitrile (1.0 mmol), carboxylic anhydride (2.0 mmol) and PTSA (30 mol %) under microwave irradiation at 100 °C.

c) Isolated yield

The synthesized products were purified by column chromatography or recrystallization and characterized by the comparison of melting points and FTIR and NMR data from the literature. In the FTIR spectra of imide compounds, the characteristic -NH vibration bands were observed in the range of 3070-3300 cm<sup>-1</sup>, and the vibration bands of the two C=O bonds were observed in approximately 1650 and 1750 cm<sup>-1</sup>. In the <sup>1</sup>H NMR spectra, the NH protons were observed as singlet in the range of 8.5-9.5 ppm as a broad signal. In the <sup>13</sup>C NMR spectra, the carbonyl carbons of imides were observed at about 170 and 175 ppm. Among the synthesized compounds, N-Acetyl-3,4-dimethoxybenzamide (4) is new, and <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra are given in Figure 1.

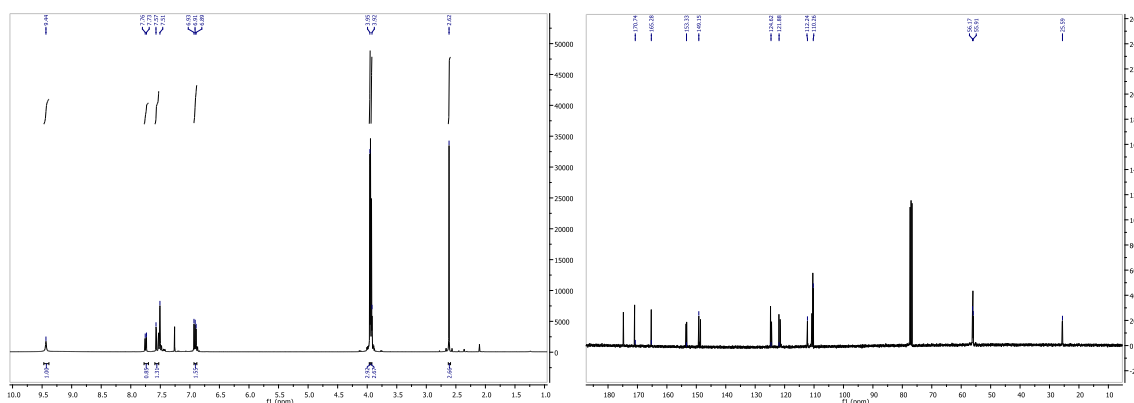


Figure 1. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of N-Acetyl-3,4-dimethoxybenzamide (4)

## CONCLUSION

As a result, an efficient and rapid synthesis of acyclic imides from the reaction of nitriles and carboxylic anhydrides presence of PTSA or H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as catalyst under microwave irradiation was reported. It was determined that PTSA is a more suitable catalyst than H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for this reaction. The products were obtained in a very short time in high yields compared with conventional heating and reported methods in the literature. This method will provide an easier way to synthesize of symmetrical or unsymmetrical acyclic imides from nitriles.

## Conflict of Interest

The authors confirm that this article content has no conflict of interest

## REFERENCES

- Aruri H, Singh U, Kumar S, Kushwaha M, Gupta AP, Vishwakarma RA, Singh PP, 2016. I<sub>2</sub>/Aqueous TBHP-catalyzed coupling of amides with methylarenes/ aldehydes/alcohols: Metal-Free synthesis of imides. *Organic Letters*, 18: 3638-3641.
- Atanassova IA, Petrov JS, Ognjanova VH, Mollov NM, 1990.  $\alpha,\alpha,\alpha$ -Trichloroketonylcarbonyl compounds as acylating reagents of amides. *Synthetic Communications*, 20: 2083-2090.
- Bates RB, Fletcher FA, Janda KD, Miller WA, 1984. A convenient synthesis of unsymmetrical acyclic imides. *The Journal of Organic Chemistry*, 49: 3038.
- Challis BC, Challis J, Zabicky J, (Ed.). 1970. *The chemistry of amides*. pp 759, J. Wiley and Sons, New York.
- Davidson D, Skovronek H, 1958. The acylation of amides. *Journal of the American Chemical Society*, 80(2): 376-379.
- Ding G, Jiang L, Guo L, Chen X, Zhang H, Che Y, 2008. Pestalazines and pestalamides, bioactive metabolites from the plant pathogenic fungus *pestalotiopsis theae*. *Journal of Natural Products*, 71: 1861-1865.
- Durrell WS, Young JA, Dresdner RD, 1963. Fluorocarbon nitrogen compounds. IX. The reaction of nitriles with carboxylic acids *The Journal of Organic Chemistry*, 28: 831-833.
- Flitsch W, Hohenhorst M, 1990. *N*-Protected 3-hydroxypyrroles. *Liebigs Annalen Chemie*, 397-399.
- Flitsch W, Pandl K, Ruskamp P, 1983. Zur Umsetzung offenkettiger Imide mit 1-ethoxycarbonylcyclopropyltriphenylphosphonium-tetrafluoroborat: Ein einfacher weg zu 1H-Pyrrol-3-carbonsäureestern. *Liebigs Annalen Chemie*, 529-534.
- Gedye R, Smith F, Westaway K, Ali H, Baldisera L, Laberge L, Rousell J, 1986. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Letters*, 27: 279-282.
- Giguère R, Bray T, Duncan S, Majetich G, 1986. Application of commercial microwave ovens to organic synthesis. *Tetrahedron Letters*, 27: 4945-4948.
- Habibi Z, Salehi P, Zolfigol MA, Yousefi M, 2007. A Novel one-pot synthesis of unsymmetrical acyclic imides. *Synlett*, 5: 812-814.
- Hurd CD, Prapas AG, 1959. Preparation of acyclic imides. *The Journal of Organic Chemistry*, 24: 388-392.
- Jin Z, Xu B, Hammond GB, 2011. Copper mediated oxidation of amides to imides by Selectfluor. *Tetrahedron Letters*, 52: 1956-1959.
- Kantlehner W, Fischer P, Kugel W, Möhring E, Bredereck H, 1978. *N,N*-Bis(trimethylsilyl)formamid und *N,O*-Bis(trimethylsilyl)imidsäureester; Struktur und chemische reaktivität. *Justus Liebigs Annalen Chemie*, 3: 512-527.

- Koehn FE, Longley RE, Reed JK, 1992. A Novel One-Pot Synthesis of unsymmetrical acyclic imides. *Journal of Natural Products*, 55: 613-619.
- Lee J, Hong M, Jung Y, Cho EJ, Rhee H, 2012. Synthesis of 1,3,5-trisubstituted-1,2,4-triazoles by microwave-assisted N-acylation of amide derivatives and the consecutive reaction with hydrazine hydrochlorides. *Tetrahedron*, 68: 2045-2051.
- Liu G, Li Y, Sheng J, Wang XS, 2017. Oxidative cleavage of enamides with hypervalent iodine(III)/TMSN<sub>3</sub> under an air atmosphere. *Synthesis*, 49: 3968-3974.
- Maruyama HB, Sahara Y, Suzuki-Watanabe J, Maeshima Y, Shimizu NJ, 1975. A new antibiotic, fumaramidmycin. I. Production, biological properties and characterization of producer strain. *The Journal of Antibiotics*, 28: 636-647.
- Mei C, Hu Y, Lu W, 2018. Visible-Light-Driven oxidation of *N*-alkylamides to imides using oxone/H<sub>2</sub>O and catalytic KBr. *Synthesis*, 50: 2999-3005.
- Merrit B, Andrus WL, Keyes RF, 1998. Synthesis of mixed acyclic imides using pentafluorophenyl esters. *Tetrahedron Letters*, 39: 5465-5468.
- Mohammadpoor-Baltork I, Tangestaninejad S, Moghadam M, Mirkhani V, Nasr-Esfahani M, 2011. Efficient synthesis of symmetrical and unsymmetrical acyclic imides catalyzed by reusable 12-Tungstophosphoric acid under thermal conditions and microwave irradiation. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 8 (2): 401-410.
- Nagle DG, Paul VJ, Roberts MA, 1996. Ypaoamide, a new broadly acting feeding deterrent from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Tetrahedron Letters*, 37: 6263-6266.
- Nakamura H, Iitaka Y, Sakakibara H, Umezawa H, 1974. The molecular and crystal structure determination of bisanhydroalthiomycin by the x-ray diffraction method. *The Journal of Antibiotics*, 27: 894-896.
- Nasr-esfahani M, Montazerzohori M, Filvan N, 2012. Ultrasound-assisted catalytic synthesis of acyclic imides in the presence of *p*-toluenesulfonic acid under solvent-free conditions. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 77 (4): 415-421.
- Nicolaou KC, Mathison CJN, 2005. Synthesis of imides, *N*-acyl vinyllogous carbamates and ureas, and nitriles by oxidation of amides and amines with Dess–Martin periodinane. *Angewandte Chemie International Edition*, 44: 5992-5997.
- Pettit GR, Kamano Y, Dufresne C, Cerny RL, Herald CL, Schmidt JM, 1989. Isolation and structure of the cytostatic linear depsipeptide dolastatin-15. *The Journal of Organic Chemistry*, 54: 6005-6006.
- Schnyder A, Indolese AF, 2002. Synthesis of unsymmetrical aroyl acyl imides by aminocarbonylation of aryl bromides. *The Journal of Organic Chemistry*, 67: 594-597.
- Seiller B, Heins D, Bruneau C, Dixneuf PH, 1995. Efficient preparations of acylamides, acylcarbamates and acylureas from alk-1-en-2-yl esters. *Tetrahedron*, 51: 10901-10912.
- Tanaka KI, Yoshifuji S, Nitta Y, 1987. Ruthenium tetroxide oxidation of *N*-acylated alkylamines: A new general synthesis of imides. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 35: 364-369.
- Voorstad PJ, Chapman JM, Cocolas GH, Wyrick SD, Hall IH, 1985. Comparison of the hypolipidemic activity of cyclic vs. acyclic imides. *Journal of Medicinal Chemistry*, 28: 9-12.
- Wheeler OII, Rosado O, Zabicky J (Ed.), 1970. *The chemistry of amides*. pp 335, J. Wiley and Sons, New York.
- Yamamoto Y, Onishi S, Azuma Y, 1981. A new method for preparation of *N*-acetoacetyl-carboxamides. *Synthesis*, 122.
- Yu H, Chen Y, Zhang Y, 2015. TBHP/TEMPO-mediated oxidative synthesis of imides from amides. *Chinese Journal of Chemistry*, 33: 531-534.

Araştırma Makalesi / Research Article

Geliş tarihi / Received: 27.08.2021

Kabul tarihi / Accepted: 21.11.2021

**Atf İçin:** Bilgiç A, 2022. Schiff Bazlı Fonksiyonelleştirilmiş Yeni Sporopollenin Mikrokapsülün Sentezi ve Karakterizasyonu ve Cu (II)'nin Etkili Adsorpsiyonu için Kullanımı. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 324-336.

**To Cite:** Bilgiç A, 2022. Synthesis and Characterization of the Schiff Base-on Functionalized Novel Sporopollenin Microcapsule and Its Use for Effective Adsorption of Cu (II). Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 324-336.

**Schiff Bazlı Fonksiyonelleştirilmiş Yeni Sporopollenin Mikrokapsülünün Sentezi ve Karakterizasyonu ve Cu(II)'nin Etkili Adsorpsiyonu için Kullanımı**

Ali BİLGİÇ<sup>1\*</sup>

**ÖZET:** Kanser ve karaciğer hasarı gibi ciddi hastalıklara neden olan Cu (II) iyonları özellikle su kirliliğinde önemli bir yere sahiptir. Bu ölümcül bakır (II) iyonlarını sulu çözeltilerden etkin bir şekilde uzaklaştırmak için, adsorban olarak kullanılacak yeni işlevselleştirilmiş sporopollenin mikrokapsüllerinin (Sp-CPTS-HNMAA) sentezi amaçlandı. Sporopollenin yüzeyini işlevselleştirmek için kullanılan Schiff bazı (HNMAA), 2-Hidroksi-1-naftaldehit ve glisinin reaksiyonu sonucu elde edilmiş ve <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR ile karakterize edilmiştir. Sentezlenen Sp-CPTS-HNMAA mikrokapsül adsorbanı, FTIR, XRD ve SEM teknikleri ile başarılı bir şekilde karakterize edildi. Adsorpsiyon deneylerinde başlangıç Cu (II) konsantrasyonu, sıcaklık, pH, anyon, temas süresi ve adsorban dozunun etkileri araştırıldı. Adsorpsiyon dengesi, 150 dakikalık bir temas süresi, 30 mg L<sup>-1</sup> başlangıç Cu (II) iyon konsantrasyonu, pH = 6 ve 0.03 g adsorban dozu ile maksimum Cu(II) giderimi ile % 92.73 olarak hesaplandı. Sp-CPTS-HNMAA mikrokapsül adsorbanının maksimum Cu (II) adsorpsiyon kapasitesi Langmuir izoterminden hesaplandı ve 32.57 mg g<sup>-1</sup> olarak bulundu. Adsorpsiyon izotermi ve kinetik çalışmaları, Langmuir adsorpsiyon izotermine ve yalancı ikinci dereceden kinetik modele uyduğunu göstermiştir. Termodinamik çalışmaların sonuçları, adsorpsiyon reaksiyonunun tersinir, kendiliğinden ve endotermik olduğunu ve ayrıca Cu (II) iyonlarının Sp-CPTS-HNMAA üzerinde adsorpsiyonunun kimyasal bir adsorpsiyon işlemi olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Sporopollenin, adsorpsiyon, termodinamik, Cu (II), mikrokapsül

**Synthesis and Characterization of the Schiff Base-on Functionalized Novel Sporopollenin Microcapsule and Its Use for Effective Adsorption of Cu (II)**

**ABSTRACT:** Cu (II) ions, which cause serious diseases such as cancer and liver damage, have an important place, especially in water pollution. To effectively remove these deadly copper (II) ions from aqueous solution, the synthesis of a new functionalized sporopollenin microcapsules (Sp-CPTS-HNMAA) to be used as an adsorbent was aimed. Schiff base (HNMAA), used to functionalize the surface of sporopollenin, was obtained as a result of the reaction of 2-Hydroxy-1-naphthaldehyde and glycine and was characterized by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR. The synthesized Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent was successfully characterized by FTIR, XRD, and SEM techniques. The effects of initial Cu (II) concentration, temperature, pH, anion, contact time, and adsorbent dose were researched in adsorption experiments. The adsorption equilibrium was calculated as 92.73%, with a contact time of 150 min, initial Cu (II) ion concentration of 30 mg L<sup>-1</sup>, pH = 6, and maximum Cu(II) removal with 0.03 g adsorbent dose. The maximum Cu (II) adsorption capacity of Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent was calculated from the Langmuir isotherm and found to be 32.57 mg g<sup>-1</sup>. Adsorption isotherm and kinetic studies indicated that it fits the Langmuir adsorption isotherm and pseudo-second-order kinetic model. The results of thermodynamic studies show that the adsorption reaction is reversible, spontaneous, and endothermic, and also showed that the adsorption of Cu (II) ions on Sp-CPTS-HNMAA is a chemical adsorption process.

**Keywords:** Sporopollenin, adsorption, thermodynamics, Cu (II), microcapsule

<sup>1</sup>Ali BİLGİÇ (Orcid ID: 0000-0002-7055-0847), Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Mülkiyet Koruma ve Güvenlik Bölümü, Karaman, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Ali BİLGİÇ, e-mail: alibilgic@kmu.edu.tr

## INTRODUCTION

Because of their toxicity, non-biodegradability, and bioaccumulation in living habitats, heavy metal pollution has become a global issue (Sutirman et al., 2020). Effluent discharges containing these heavy metal ions pose a severe danger to both the Earth's biological cycle and human health. One of these dangerous and widely distributed heavy metals is copper. Copper (Cu) is involved in many important industrial applications such as pulp production, fertilizer industries, sugar industry, jewelry making, alloys, kitchen appliances, war machines and weapons manufacturing, welding industry, and electrical wire construction, and it is also considered one of the elements that contribute to the activity of enzymes in the human body and engage in the metabolism and growth processes (Manzoor et al., 2019). Although the copper disclosed above is a very important element, its presence in high concentrations in water can cause deadly serious illnesses such as cancer and liver damage (Lavanya et al., 2017).

There are common conventional techniques used to remove copper or other heavy metals from water, such as reverse osmosis, chemical precipitation, ion exchange, solvent extraction, membrane filtration, etc., but these techniques are pricey and/or not fine for getting high removal efficiency (Gamal et al., 2021). Among these methods, the adsorption technique is widely utilized because of its high removal efficiency, wide application range, low cost, simplicity, and reusability (Yang et al., 2019; Tang et al., 2021a). Many natural adsorbents have been used to remove many different metal ions, including sporopollenin (Sp), from water. Sporopollenin (Sp) is a natural biopolymer that occurs in the outer membranes of fern and moss spores, as well as of most pollen grains (Chandrasekaram et al., 2021). The pollen and spore membranes of this biopolymer have been shown to have two layers; the outer part is known as exine containing a substance called sporopollenin, and the inner part is expressed as intine (Ünlü and Ersoz, 2007). It may survive millions of years in geological layers while retaining all of its morphological features, indicating that Sp is stable under severe circumstances (Gode and Pehlivan, 2007). The Sp's exact chemical structure is unknown. However, it has a stable cross-linked aromatic structure with hydrogen, oxygen, and carbon in a stoichiometry of  $C_{90}H_{144}O_{27}$  (Ibrahim et al., 2020). The main functional group of Sp has hydroxyl functional groups existing for large amounts of modification, and this group serves as anchor sites for metal ion complexation as well as adding the desired surface functional groups and other materials with high affinity for the metal ion (Gürten et al. 2006; Ibrahim et al., 2020). However, the literature search shows that studies with Sporopollenin microcapsule-based materials for the removal of metal ions are quite scarce. To the best of our knowledge, there exists no report on the use of sporopollenin microcapsule for the immobilization of HNMAA. The goal of this research was to investigate the Cu (II) adsorption performance of Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbents as a new adsorbent. For this purpose, the adsorption conditions of copper (II) ions were explored, and also the nature of the adsorption process in terms of isotherm, thermodynamic and kinetic aspects was evaluated.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals and Instrumentation

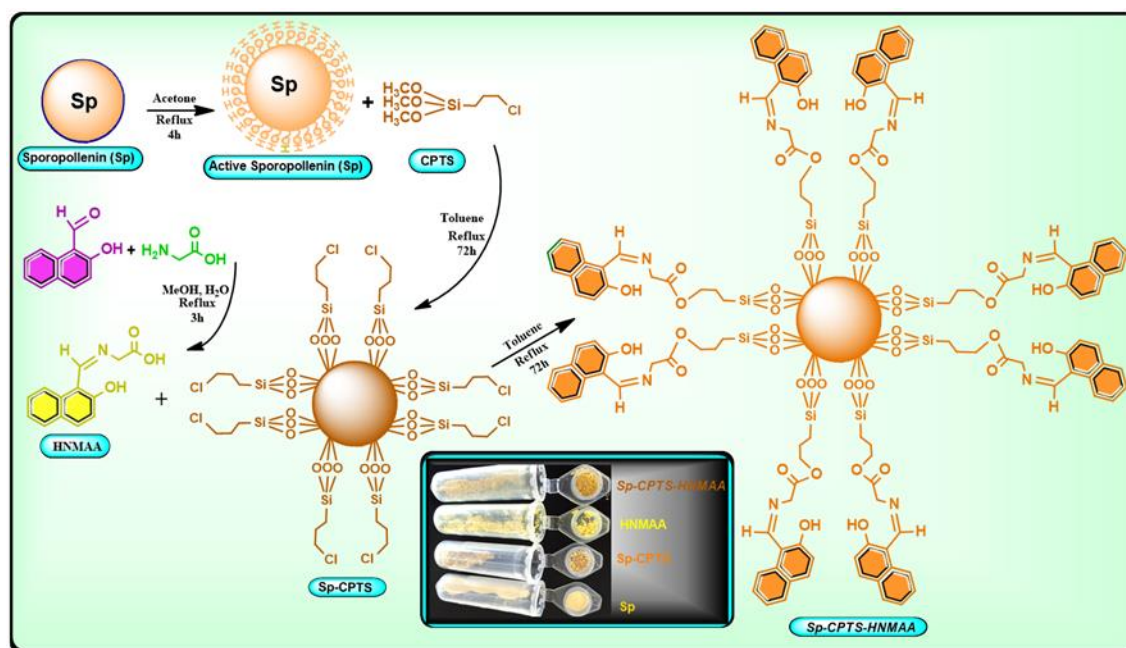
The microcapsule (particle size 20  $\mu\text{m}$ ) of the *L. clavatum* sporopollenin, the starting support material of the prepared adsorbent, was provided from Sigma-Aldrich. 2-Hydroxy-1-naphthaldehyde, glycine (99%), petroleum ether (90%), copper (II) nitrate trihydrate (puriss. p.a., 99-104%), and 3-Chloropropyltrimethoxy silane (CPTS), were obtained from Sigma-Aldrich. Sodium hydroxide ( $\geq 98\%$ ), ethanol (99%), methanol ( $\geq 99.9\%$ ), acetone (99.5%), toluene (99.8%), and hydrochloric acid (37%)

were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Unless otherwise noted, all compounds utilized in the investigation were utilized without additional purification.

The FTIR spectra of the microcapsules and microcapsule adsorbent prepared in each step were scanned using a Perkin Elmer 100 FTIR spectrometer. XRD patterns of prepared microcapsules and microcapsule adsorbent were determined using a Bruker brand device (D8 Advance with Davinci). The surface morphologies of the pure sporopollenin (Sp), modified Sp-CPTS, and the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent was determined with the SEM apparatus (HITACHI (SU5000)). An NMR spectrometer (Varian 400 MHz) was used to record  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra measurements of the HNMAA compound. Cr (VI) ion concentrations remaining in the solutions were determined using Analytical Jena, Contr AA 300 brand flame atomic absorption spectrometry (FAAS).

## Experimental Procedure

**The synthesis of (Z)-2-(((2-hydroxynaphthalen-1-yl)methylene)amino)acetic acid (HNMAA):** 0.172 g of 2-hydroxy-1-naphthaldehyde was added to a 150 mL reaction bottle containing 50 mL of methanol and dissolved by stirring for 10 min. Then 0.119 g of glycine dissolved in 30 ml of water was added to this solution. This mixture was refluxed for 3 h with constant stirring (Sevgi et al., 2018). After refluxing was complete, it was filtered. After 24 h, yellow crystals were obtained and recrystallized from methanol/petroleum ether. The synthesis of the HNMAA compound is shown in Figure 1.



**Figure 1.** Schematic illustration of Sp, Sp-CPTS, Sp-CPTS-HNMAA, and HNMAA compound

**The synthesis of Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent:** 100 mL of acetone and 5.0 g of sporopollenin were added to a 250 mL reaction vessel and the resulting suspension mixture was refluxed for 4 hours with continuous stirring (Gubbuk et al., 2012a). The suspension mixture was filtered, and the resulting active *L. clavatum* sporopollenin microcapsule was washed with pure water followed by methanol and then dried at 70 °C for 12 h. 5.0 g of active sporopollenin microcapsule was added into the reaction vessel containing 150 mL of anhydrous toluene, and the resultant mixture was stirred for 10 min at ambient temperature. Then (3-chloropropyl)triethoxysilane (CPTS) was added to this mixture and was refluxed for 72 h (Çimen et al., 2014; Gubbuk et al., 2021b). Sp-CPTS microcapsules were separated by filtration washed with  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , and  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , and dried at 70 °C. In a 250 mL one-neck round-bottom flask, 5.0 g Sp-CPTS microcapsules were suspended in 100 mL anhydrous



toluene. Then 0.1 g of HNMAA compound was added to this mixture and stirred under reflux conditions for 72 h. After mixing was complete, the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent in suspension was separated by filtration, washed with  $C_6H_5CH_3$ ,  $CH_3OH$ , and  $CH_3CH_2OH$ , and dried at  $70\text{ }^\circ\text{C}$ . The schematic route for the synthesis of the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent is given in Figure 1.

### Batch Adsorption Experiments For Cu (II)

Cu (II) adsorption onto Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent was carried out by batch adsorption process, and the influence of contact time, pH, temperature, adsorbent dose, anion, and initial copper concentration on adsorption was studied. The stock solution of copper (II) was prepared from  $100\text{ mg L}^{-1}$  of  $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$  salt then diluted to the desired concentrations. Adsorption equilibrium studies were carried out by shaking 0.03 g of Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent with 30 mL of copper (II) ion solutions of desired concentration at optimum conditions. Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent was filtered from the suspension mixtures through filters ( $0.02\text{ }\mu\text{m}$ ) at the end of the predetermined time interval. Then, the remaining copper ions in the solutions were measured by the FAAS. Each adsorption experiment was carried out with two replications to control calculations.

The following equation 1 and 2 were used to determine the amount of metal retained in the adsorbent phase ( $q_e$ ,  $\text{mg g}^{-1}$ ) and % Removal of metal ion, respectively, (Ali et al., 2016; Pavithra et al., 2021):

$$q_e = \frac{C_0 - C_e}{m} \times V \quad (1)$$

$$\% \text{ Removal} = \frac{C_0 - C_e}{C_0} \times 100 \quad (2)$$

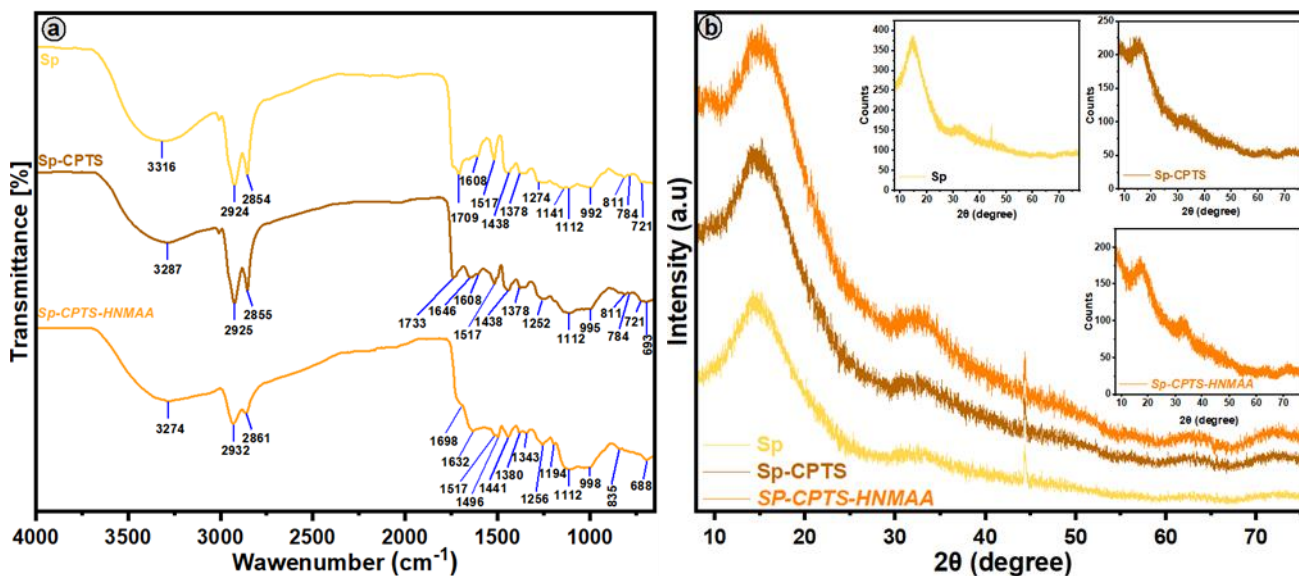
Here,  $q_e$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $V$  (L),  $C_e$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $m$  (g), and  $C_0$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) are the equilibrium adsorption capacity, the volume of copper solution, the initial copper concentration, the weight of the adsorbent and equilibrium copper concentration, respectively.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Characterization

#### FTIR and XRD analyses

The result of FTIR measurements for the natural sporopollenin (Sp), modified microcapsule (Sp-CPTS) and Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent is shown in Figure 2a. In the FTIR spectrum of the sporopollenin microcapsule (Sp), the adsorption peaks observed at  $3316\text{ cm}^{-1}$ ,  $2854\text{-}2925\text{ cm}^{-1}$  and  $1709\text{ cm}^{-1}$  represent the hydroxyl (OH) (Ahmad et al., 2017), aliphatic ( $-CH$ ,  $-CH_2$ ,  $-CH_3$ ) and carbonyl ( $C=O$ ) groups, respectively (Dyab and Sadek, 2018). In the FTIR spectrum of the Sp-CPTS microcapsule, the two new absorption peaks at  $1252\text{ cm}^{-1}$  and  $693\text{ cm}^{-1}$  represent Si-C and C-Cl groups in the Sp-CPTS microcapsule structure, respectively. The frequency of OH stretching vibration in Sp-CPTS is shifted to  $3287\text{ cm}^{-1}$  from  $3316\text{ cm}^{-1}$  (Sp). Other new peaks and shifts in the Sp-CPTS microcapsule's FTIR spectra show that the CPTS was modified to the sporopollenin's surface (Sp). In the FTIR spectrum of the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent, the absorption peaks at  $1698\text{ cm}^{-1}$ ,  $1632\text{ cm}^{-1}$ , and  $1496\text{ cm}^{-1}$  represent the  $-C=O$  stretching vibration of a carboxylic group,  $-C=N$  stretching vibrations, and the  $C=C$  stretching vibration of the aromatic rings, respectively. Also, the absorption peaks at  $1343\text{ cm}^{-1}$  and  $1194\text{ cm}^{-1}$  represent the stretching vibration of the C-O and the C-N bonds, respectively. In the FTIR spectrum of the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent, other new peaks and shifts show that the HNMAA compound was successfully immobilized to the Sp-CPTS surface.



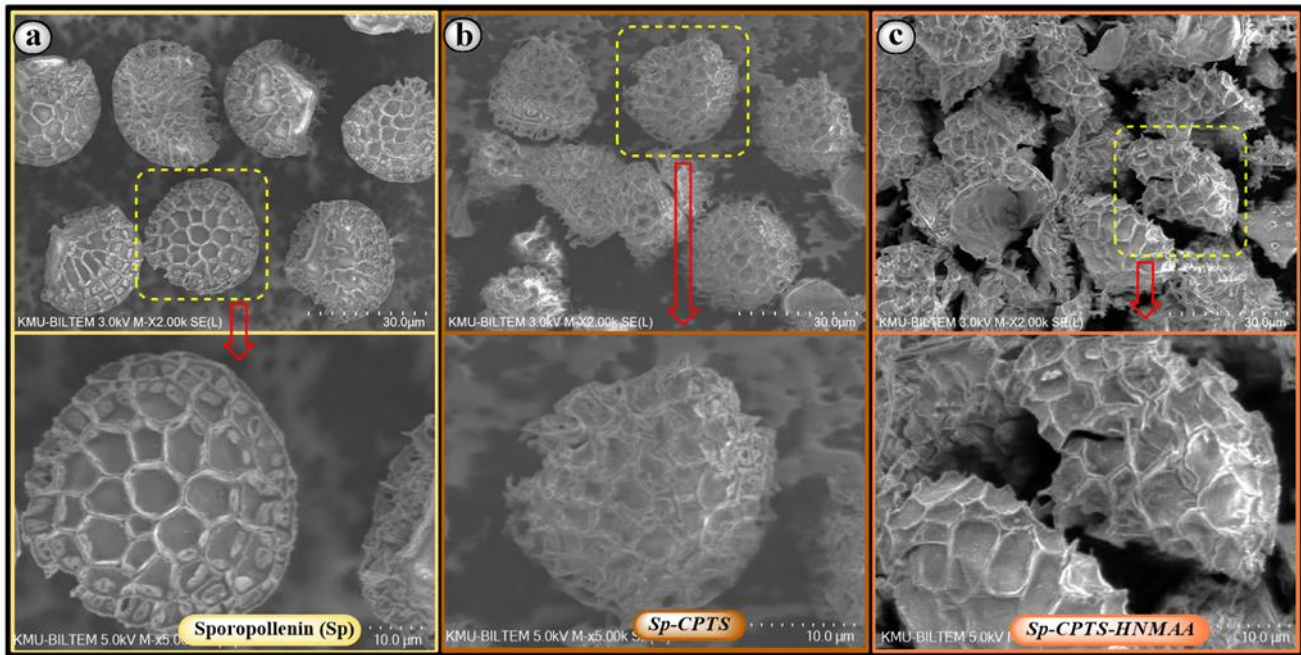
**Figure 2.** (a) FT-IR spectrum and (b) XRD patterns of the natural sporopollenin (Sp), Sp-CPTS, and the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent

The natural sporopollenin (Sp), modified microcapsule (Sp-CPTS), and the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent was investigated using XRD analysis, and the results are given in Figures 2b. The Natural *L. clavatum* sporopollenin microcapsules (Sp) (Figure 2b) showed a typical amorphous structure with a characteristic broad peak in the 25 - 8° range and about 15.24° (Sahin et al., 2012; Dyab and Sadek, 2018). In the XRD model of the Sp-CPTS (Figure 2b), the density of the characteristic sporopollenin peak was diminished. In the XRD model of the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent (Figure 2b), the intensity of the characteristic sporopollenin peak appears to be more reduced. These results approve that the characteristic structure of the sporopollenin is preserved, and the designed Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent has been successfully synthesized.

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of HNMAA compound; M.p.: 215 °C. <sup>1</sup>H-NMR [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>]: 13.71 (bs, OH) 13.07 (bs, COOH), 10.94 (s, HC=N), 8.2 (d, Ar-H), 7.88 (d, Ar-H), 7.74 (d, Ar-H), 7.45 (t, Ar-H), 7.22 (t, Ar-H), 6.71 (d, Ar-H), 4.41 (s, CH<sub>2</sub>) <sup>13</sup>CNMR [100 MHz, d<sup>6</sup>-DMSO]: δ (ppm) 52.2, 106.3, 118.8, 123.8, 126.2, 126.8, 128.8, 129.8, 135.7, 138.3, 160.3, 172.3, 177.4.

### SEM analysis

To detect the morphological differences of the surface of the sporopollenin, it was characterized by Scanning electron microscopy (SEM), and the SEM images obtained are given in Figure 3a-c. As seen in the SEM image of the native *L. clavatum* sporopollenin microcapsules in Figure 3a, the surfaces of the microcapsules are smooth, pore structure (round microcapsule shape) and consist of a uniform hexagonal shape connected (Ahmad et al., 2017). The SEM image of Sp-CPTS in Figure 3b shows that the pores of the sporopollenin microcapsules are disrupted, and the surface is rough. Moreover, the SEM image of Sp-CPTS (Figure 3b) compared to the SEM image of the precursor natural microcapsules (Figure 3a) preserved the natural morphology of consistent size (approximately 25 μm in diameter) of the microcapsules. As seen in the SEM image of Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent in Figure 3c, the pores of the microcapsules filled with HNMAA, and the pores became more rough and bumpy. The prepared Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent confirms that it has been successfully synthesized according to these results.



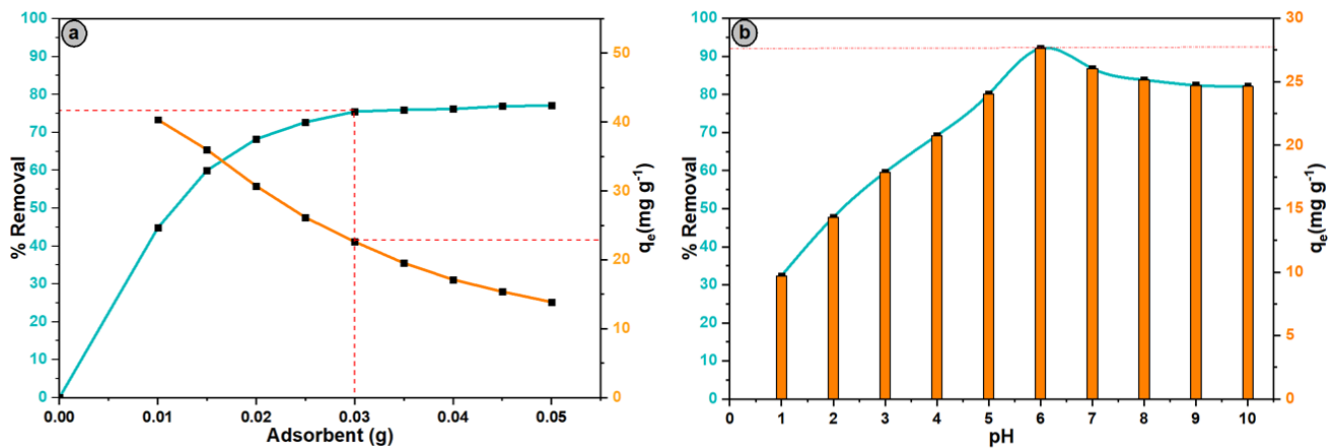
**Figure 3.** SEM microphotographs of (a) the natural sporopollenin (Sp), (b) Sp-CPTS, and (c) the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent

## Adsorption Studies

### Effect of microcapsule adsorbent dose and pH on adsorption

The influence of Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent dose (in the range of (0.01 - 0.05 g) on the copper (II) adsorption by the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent was investigated (Vol of Cu (II) solution = 30 mL; copper (II) concentration = 30 mg L<sup>-1</sup>; shaking speed = 250 rpm; temperature = 298 K, and contact time = 3 h.) and the results are given in Figure 4a. As shown in Figure 4a, in terms of general changes, Cu (II) removal efficiencies increased, and adsorption capacities of Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbents decreased with increasing Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent dose. The increments in Cu(II) removal percentages can be attributed to the larger quantity of adsorption sites (the increased adsorbent surface area, active sites, pores, and the number of unsaturated sites) provided by the increasing Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent dose (Nair et al., 2014; Tang et al., 2021b). However, the decrease in adsorption capacity ( $q_e$ ) value with increasing adsorbent dose may be due to overlapping or aggregation of adsorption sites, thus reducing the total surface area available for the metal ion (Kayalvizhi et al., 2021). The number of metal ions adsorbed to the adsorbent unit mass decreases, causing the  $q_e$  value to reduce as the adsorbent dose increases. Considering the removal efficiency and cost, the adsorbent dose of 0.03 g was selected and used in further studies.

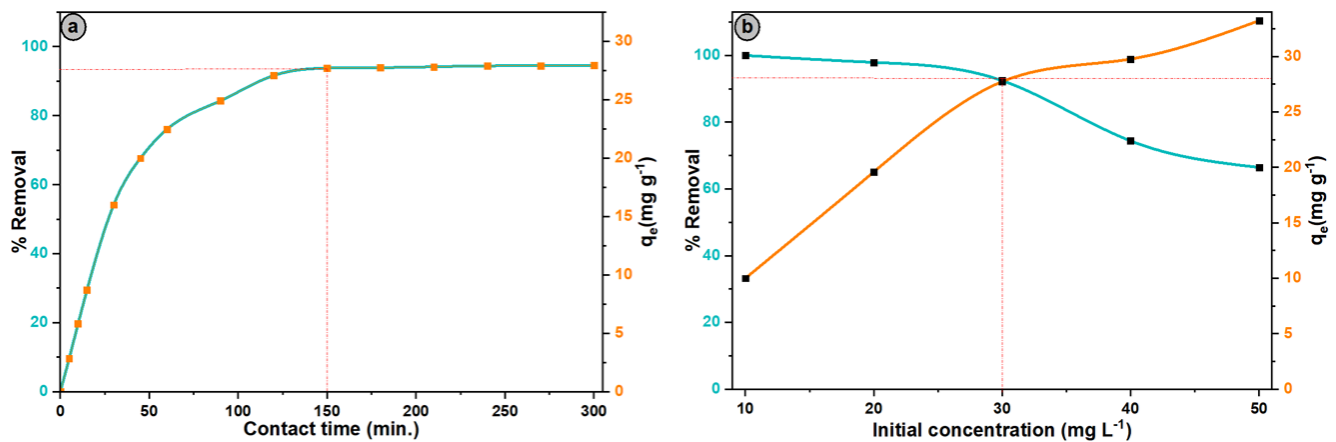
The pH of the solution is one of the most important factors impacting the adsorption process. In this study, the influence of initial pH (1.0 - 7.0) on the removal percentage and adsorption capacity of Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent against Cu (II) was investigated (Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent dose = 0.03 g; vol of Cu (II) solution = 30 mL; contact time = 3 h; Cu (II) concentration = 30 mg L<sup>-1</sup>; temperature = 298 K, and shaking speed = 250 rpm). Figure 4b depicts the results achieved. As seen in Figure 4b, the lowest adsorption efficiency (33%) and capacity (9.73 mg g<sup>-1</sup>) were detected at pH 1. However, as the pH improved from 1 to 6, the adsorption capacity and efficiency were improved. At pH 6, the maximum adsorption capacity (27.67 mg g<sup>-1</sup>) and efficiency (92.07%) were observed.



**Figure 4.** Influence of (a) Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent dose and (b) pH on the adsorption of Cu (II) ions by the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent

#### Influence of contact time and initial concentration on Cu (II) adsorption

The influence of contact time on copper (II) adsorption by the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent was explored in the range of 5 - 300 min (Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent dose = 0.03 g; vol of copper (II) solution = 30 mL; temperature = 298 K; pH = 6; Cu (II) concentration = 30 mg L<sup>-1</sup>; and shaking speed = 250 rpm) and the obtained results are given in Figure 5a. As shown in Figure 5a, it is viewed that the adsorption efficiency and capacity of copper (II) ions increment with increasing time between 0 - 150 minutes and remain constant after this min (150 min).

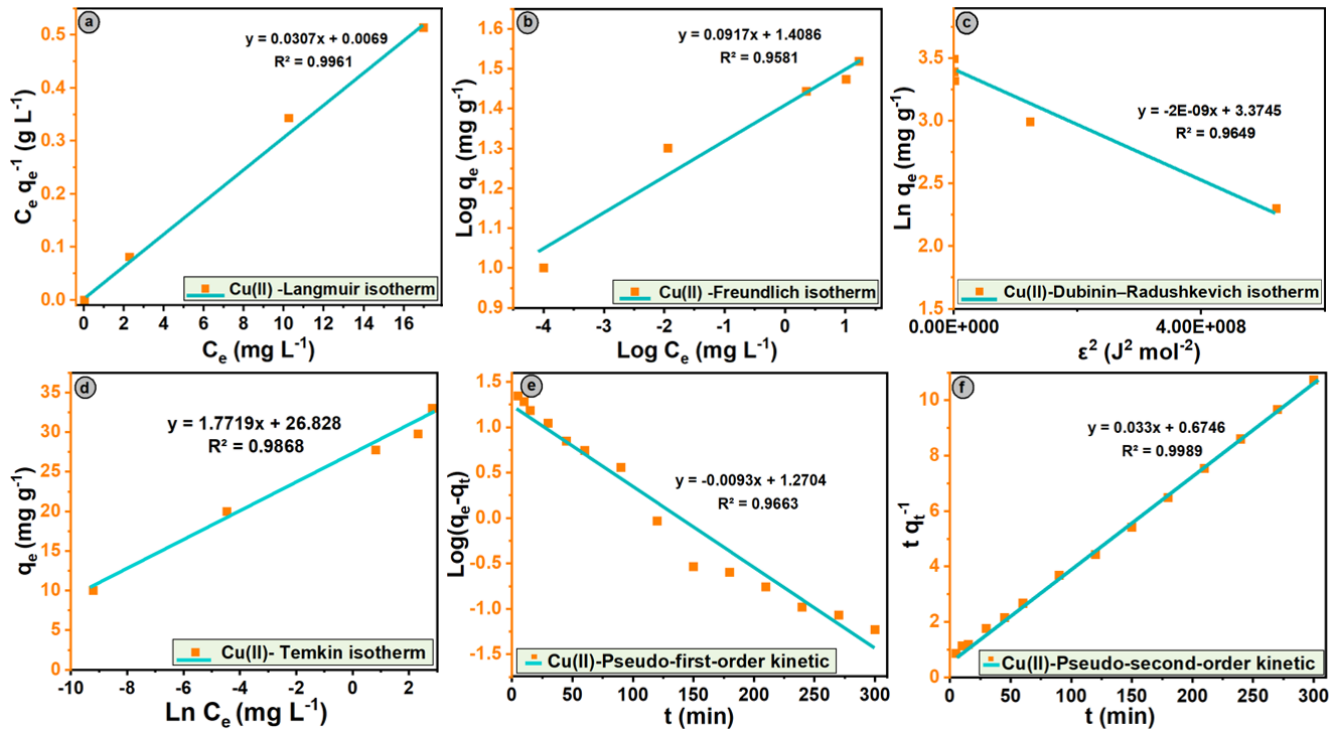


**Figure 5.** Effect of (a) contact time and (b) initial Cu (II) concentration on Cu (II) adsorption by the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent

The influence of initial Cu (II) concentration (10, 20, 30, 40 and 50 mg L<sup>-1</sup>) on Cu (II) adsorption by the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbents was investigated (Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent dose = 0.03 g; vol of copper (II) solution = 30 mL; temperature = 298 K pH = 6 and shaking speed = 250 rpm) and the results are given in Figure 5b. As seen in Figure 5b, the removal percentage of Cu (II) decreased when the initial copper concentration was increased from 10 mg L<sup>-1</sup> to 50 mg L<sup>-1</sup>. On the other hand, it is seen that the adsorption capacity against increasing initial copper (II) ion concentration increases (Figure 5b). The initial concentration of copper (II) ion with the highest adsorption efficiency and capacity by the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent is 30 mg L<sup>-1</sup>.

### Adsorption isotherms

The adsorption isotherm gives important information about the adsorption capacity of the adsorbent and is also important in the optimization and design of the adsorption process (Sutirman et al., 2020). For this purpose, Temkin (Yu, 2020), Freundlich (Barbosa et al., 2018), Langmuir (Chen et al., 2021), and Dubinin-Radushkevich (Agarwal et al., 2021) isotherm models were applied to define the experimental data. The equations for these isotherm models are listed in Table 1. The graphs obtained from these equations are given in Figure 6(a-d), and the obtained isotherm parameters are shown in Table 1.



**Figure 6.** The plots of (a) Langmuir, (b) Freundlich, (c) Dubinin–Radushkevich, (d) Temkin, (e) Pseudo-first-order kinetic, and (f) Pseudo-second-order kinetic models

**Table 1.** Equations, parameter constants, and values of isotherm models

Models	Equation	Parameter constants	Parameter values
Langmuir	$C_e/q_e = (C_e/q_m) + (1/(K_L q_m))$ $R_L = 1 / [1 + (K_L \cdot C_0)]$	$q_m$ (mg g <sup>-1</sup> )	32.57
		$b$ (L mg <sup>-1</sup> )	4.449
		$R^2$	0.9961
		$R_L$	0.002 - 0.004
Freundlich	$\text{Log} q_e = \text{log} K_F + (1/n) \text{log} C_e$	$n$	10.905
		$1/n$	0.0917
		$K_F$ (mg g <sup>-1</sup> ) $R^2$	4.090 0.9581
Dubinin - Radushkevich (D-R)	$\text{Ln} q_e = \text{Ln} q_{D-R} - K_{ad} \epsilon^2$ $\epsilon = RT \text{Ln}(1 + (1/C_e))$ $E = (2K_{ad})^{-1/2}$	$q_{D-R}$ (mg g <sup>-1</sup> )	29.297
		$K_{D-R}$ (mol <sup>2</sup> J <sup>-2</sup> )	$0.02 \times 10^{-7}$
		$R^2$	0.9649
		$E$ (KJ mol <sup>-1</sup> )	15.811
		$b_T$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	1.544
Temkin	$q_e = (RT/b_T) \text{ln} A_T + (RT/b_T) \text{ln} C_e$	$A_T$ (L g <sup>-1</sup> )	$3.7 \times 10^6$
		$R^2$	0.9868

As shown in Table 1, since the  $R^2$  value of the Langmuir model is higher than the other three models, we can say that the adsorption process fits the Langmuir isotherm. Its suitability for the Langmuir isotherm indicates the formation of monolayer coverage on surface of the Sp-CPTS-HNMAA

microcapsule adsorbent of Cu (II) ions. Also,  $R_L$  values (0.022 - 0.004) is in the range of 0 to 1, which means that the adsorption of copper (II) ions onto the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent is appropriate under the operating conditions used in this work. Since the  $E$  value ( $15.811 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) calculated from the D-R isotherm model is in the range of 8 -  $16 \text{ kJ mol}^{-1}$ , it was concluded that the adsorption of Cu (II) ions on Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent was realized by chemical ion exchange (Tural et al., 2018).

### Adsorption kinetics

Adsorption kinetics were studied to explain the adsorption mechanism of copper (II) ions on Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent and the associated rate-limiting steps. To examine the adsorption kinetics, widely used pseudo-second-order kinetic and pseudo-first-order models were analyzed (Ge et al., 2017). Equations ((3) and (4)) of these kinetic models are as follows, respectively.

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (3)$$

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{t \cdot k_1}{2.303} \quad (4)$$

The data obtained regarding the influence of contact time on adsorption of Cu (II) ions by the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent were fitted to these models, and the graphs and kinetic parameters of the results obtained are given in Figure 6 (e and f) and Table 2, respectively. As can be seen from the correlation coefficient ( $R^2$ ) values in Table 2, the adsorption kinetics fits better the pseudo-second-order model ( $R^2 = 0.9989$ ). Also, the value of  $q_e$  ( $27,782 \text{ mg g}^{-1}$ ) obtained in the experimental value is consistent with the value of  $q_e$  ( $30.303 \text{ mg g}^{-1}$ ) calculated from the pseudo-second-order model. These findings show that the adsorption process fits the pseudo-second model, and it can be concluded that the copper (II) adsorption by the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent is related to the chemical interaction (Ge et al., 2014).

**Table 2.** Calculated thermodynamic and adsorption kinetic parameters

Kinetic model	Parameter	Cu (II)	Thermodynamic parameters	Cu(II)	
Pseudo-first-order	$R^2$	0.9663	$\Delta H^\circ$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	36.712	
	$k_1$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0.0214	$\Delta S^\circ$ ( $\text{J K mol}^{-1}$ )	143.151	
	$q_e$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	18.638	$R^2$	0.9691	
Pseudo-second-order			298 (K)	-5.968	
	$k_2$ ( $\text{g mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )	0.001	308(K)	-7.399	
	$R^2$	0.9989	$\Delta G^\circ$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	318 (K)	-8.831
	$q_e$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	30.303		328 (K)	-10.263

### Effect of temperature and thermodynamic studies

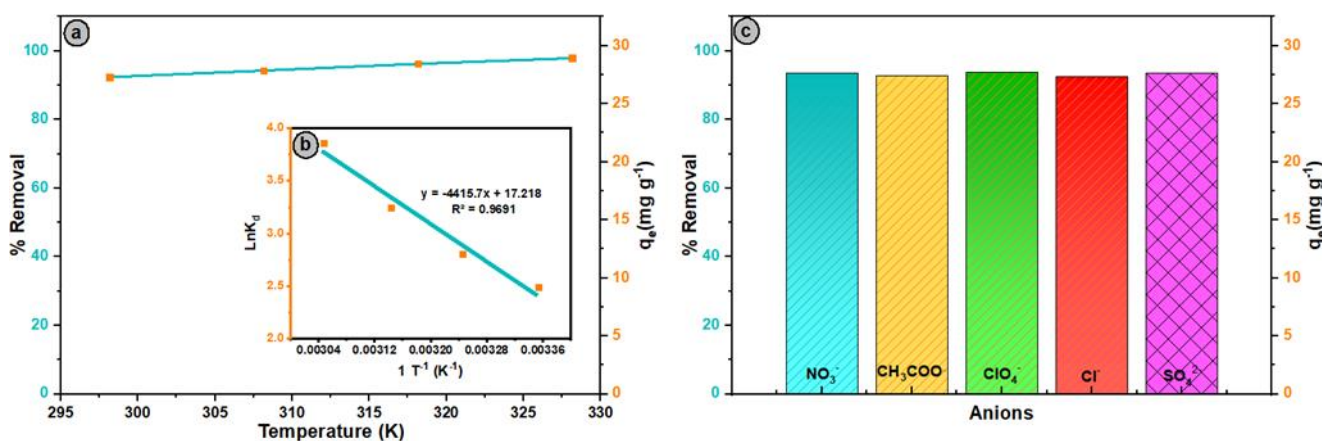
The influence of temperature on copper adsorption by the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent was investigated in the range of 298 K to 328 K (Sp-CPTS-HNMAA microcapsule dose = 0.03 g; pH = 6; vol of copper (II) solution = 30 mL; Cu (II) concentration =  $30 \text{ mg L}^{-1}$  and shaking speed = 250 rpm) and the results are given in Figure 7a. As seen in Figure 7a, it is seen that as the temperature of the suspension solution increases, the adsorption efficiency and capacity of Cu (II) ions slightly increase, indicating that the adsorption process of copper ions by the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent is endothermic in nature. To analyze the thermodynamic nature of Cu (II) adsorption on Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent, the data from the influence of temperature on adsorption were applied to the following equations ((5), (6) and (7)) (El-Massaoudi et al., 2021).

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_d \quad (5)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad (6)$$

$$\ln K_d = (\Delta S^\circ / R) - (\Delta H^\circ / RT) \quad (7)$$

Van't Hoff plot obtained from Equation 7 is given in Figure 7b, and the thermodynamic parameters obtained from these equations are listed in Table 2. As seen in Table 2, the positive enthalpy ( $\Delta H^\circ$ ) value ( $36.712 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) demonstrates that the adsorption process is endothermic. At the same time, the enthalpy ( $\Delta H^\circ$ ) value ( $36.712 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) was greater than  $20 \text{ kJ mol}^{-1}$ , which proved that the adsorption performed in this study is a chemical adsorption process (Bartell et al., 1951; Tang et al., 2021). The Gibbs free energy ( $\Delta G^\circ$ ) is negative values at different temperatures, indicating that Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent can spontaneously adsorb Cu (II) ions. In addition, the Gibbs free energy ( $\Delta G^\circ$ ) value reduces as the temperature increments, indicating that the adsorption on Sp-CPTS-HNMAA microcapsules of Cu (II) ions is easier under high-temperature conditions (Zhang et al., 2019). The positive value of entropy ( $\Delta S^\circ$ ) is a result of the increment in randomness at the solid-liquid interface. In addition, since the obtained entropy ( $\Delta S^\circ$ ) value ( $143.151 \text{ J K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ ) is greater than  $-10 \text{ J K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ , it shows that the copper adsorption involves a dissociative adsorption mechanism (Akpomie et al., 2015; Ahmad and Mirza, 2017).



**Fig. 7.** (a) Influence of temperature on Cu (II) adsorption by the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent, (b) Van't Hoff plot for the removal of Cu (II) ions by the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent, and (c) Effect of the anions ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{Cl}^-$  and  $\text{SO}_4^{2-}$ ) on the adsorption of Cu (II) ions by the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent

#### Effect of the anions ( $\text{NO}_3^-$ , $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , $\text{ClO}_4^-$ , $\text{Cl}^-$ and $\text{SO}_4^{2-}$ )

Based on the above adsorption experiments, the influence of different anions ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{Cl}^-$  and  $\text{SO}_4^{2-}$ ) on copper adsorption by the Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent under the same conditions (Sp-CPTS-HNMAA microcapsule dose = 0.03 g; temperature = 298 K; contact time = 150 min; vol of Cu (II) solution = 30 mL; pH = 6; Cu (II) concentration =  $30 \text{ mg L}^{-1}$ ; and shaking speed = 250 rpm) was investigated. The results obtained are demonstrated in Figure 7(c). As seen in Figure 7(c), the removal percentage and adsorption capacity of copper (II) ions were approximately the same in the asset of different anions. Different anions have no important effect on Cu (II) adsorption. Therefore, there is a strong bond between adsorbate (copper (II)) and adsorbent (Sp-CPTS-HNMAA) (Wang et al., 2018; Mu et al., 2020).

## CONCLUSION

In this study, environmentally friendly Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbents were prepared for the effective removal of Cu (II) ions from aqueous solutions. Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent was characterized by SEM, FTIR, and XRD analysis and confirmed that it was successfully synthesized. In adsorption studies, the equilibrium time is 150 min, and the maximum adsorption is at optimum pH = 6. Thermodynamic parameters were derived from the effect of

temperature, and positive  $\Delta H^\circ$  and  $\Delta S^\circ$  values demonstrated that the adsorption process was endothermic and reversible, while negative  $\Delta G^\circ$  values demonstrated that adsorption was spontaneous. The Dubinin - Radushkevich, Temkin, Freundlich, and Langmuir isotherm models were used in the adsorption isotherm calculations, and the Langmuir model was determined to have the best fit. The maximum adsorption capacity calculated according to the Langmuir model is  $32.57 \text{ mg g}^{-1}$ . The adsorption kinetics fit the pseudo-second-order model. All these results show that the synthesized Sp-CPTS-HNMAA microcapsule adsorbent has great potential; it can be concluded that it is low cost, environmentally friendly, can remove Cu (II) effectively, and is promising and efficient.

### Conflict of Interest

The author declares that this research article has no conflict of interest.

### Author's Contributions

I declare that the planning, execution, and writing of this research article were done by me as the sole author of the manuscript.

### REFERENCES

- Agarwal A, Kumar A, Gupta P, Tomar R, Singh NB, 2021. Cu (II) ions removal from water by charcoal obtained from marigold flower waste. *Materials Today: Proceedings*, 34:875-879.
- Ahmad NF, Kamboh MA, Nodeh HR, Abd Halim SNB, Mohamad S, 2017. Synthesis of piperazine functionalized magnetic sporopollenin: a new organic-inorganic hybrid material for the removal of lead (II) and arsenic (III) from aqueous solution. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(27):21846-21858.
- Ahmad R, Mirza A, 2017. Adsorption of Pb (II) and Cu (II) by Alginate-Au-Mica bionanocomposite: kinetic, isotherm, and thermodynamic studies. *Process Safety and Environmental Protection*, 109:1-10.
- Akpomie KG, Dawodu FA, Adebowale KO, 2015. Mechanism on the sorption of heavy metals from binary-solution by a low cost montmorillonite and its desorption potential. *Alexandria Engineering Journal*, 54(3):757-767.
- Ali RM, Hamad HA, Hussein MM, Malash GF, 2016. Potential of using green adsorbent of heavy metal removal from aqueous solutions: adsorption kinetics, isotherm, thermodynamic, mechanism and economic analysis. *Ecological Engineering*, 91:317-332.
- Barbosa TR, Foletto EL, Dotto GL, Jahn SL, 2018. Preparation of mesoporous geopolymer using metakaolin and rice husk ash as synthesis precursors and its use as potential adsorbent to remove organic dye from aqueous solutions. *Ceramics International*, 44(1):416-423.
- Bartell FE, Thomas TL, Fu Y, 1951. Thermodynamics of adsorption from solutions. IV. Temperature dependence of adsorption. *The Journal of Physical Chemistry*, 55(9):1456-1462.
- Chandrasekaram K, Alias Y, Fathullah SF, Lee VS, Haron N, Raoov M, Mohamad S, 2021. Sporopollenin supported ionic liquids biosorbent for enhanced selective adsorption of 2, 4-dinitrophenol from aqueous environment. *Materials Today Communications*, 28:102587.
- Chen Y, Cui J, Liang Y, Chen X, Li Y, 2021. Synthesis of magnetic carboxymethyl cellulose/graphene oxide nanocomposites for adsorption of copper from aqueous solution. *International Journal of Energy Research*, 45(3):3988-3998.
- Çimen A, Bilgiç A, Kursunlu AN, Gübbük, İH, Uçan Hİ, 2014. Adsorptive removal of Co(II), Ni(II), and Cu(II) ions from aqueous media using chemically modified sporopollenin of *Lycopodium clavatum* as novel biosorbent. *Desalination and Water Treatment*, 52(25-27):4837-4847.



- Dyab AK, Sadek KU, 2018. Microwave assisted one-pot green synthesis of cinnoline derivatives inside natural sporopollenin microcapsules. *RSC Advances*, 8(41):23241-23251.
- El-Massaoudi M, Radi S, Lamsayah M, Tighadouini S, Séraphin KK, Kouassi LK, Garcia Y, 2021. Ultra-fast and highly efficient hybrid material removes Cu (II) from wastewater: Kinetic study and mechanism. *Journal of Cleaner Production*, 284:124757.
- Gamal A, Ibrahim AG, Eliwa EM, El-Zomrawy AH, El-Bahy SM, 2021. Synthesis and characterization of a novel benzothiazole functionalized chitosan and its use for effective adsorption of Cu (II). *International Journal of Biological Macromolecules*, 183:1283-1292.
- Ge Y, Cui X, Liao C, Li Z, 2017. Facile fabrication of green geopolymer/alginate hybrid spheres for efficient removal of Cu (II) in water: Batch and column studies. *Chemical Engineering Journal*, 311:126-134.
- Ge Y, Xiao D, Li Z, Cui X, 2014. Dithiocarbamate functionalized lignin for efficient removal of metallic ions and the usage of the metal-loaded bio-sorbents as potential free radical scavengers. *Journal of Materials Chemistry A*, 2(7):2136-2145.
- Gode F, Pehlivan E, 2007. Sorption of Cr(III) onto chelating b-DAEG–sporopollenin and CEP–sporopollenin resins. *Bioresource Technology*, 98:904-911.
- Gubbuk IH, Gürfidan L, Erdemir S, Yilmaz M. 2012b. Surface modification of sporopollenin with calixarene derivative. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(5):2623-2632.
- Gubbuk IH, Ozmen M, Maltas E. 2012a. Immobilization and characterization of hemoglobin on modified sporopollenin surfaces. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(5): 1346-1352.
- Gürten AA, Uçan M, Abdullah MI, Ayar A, 2006. Effect of the temperature and mobile phase composition on the retention behavior of nitroanilines on ligand-exchange stationary phase. *Journal of hazardous materials*, 135(1-3):53-57.
- Ibrahim WAW, Hassan AAM, Sutirman ZA, Bakar MB, 2020. A mini review on sporopollenin-based materials for removal of heavy metal ions from aqueous solution. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 24(3):300-312.
- Kayalvizhi K, Alhaji NMI, Saravanakkumar D, Mohamed SB, Kaviyarasu K, Ayeshamariam A, Elshikh MS, 2021. Adsorption of copper and nickel by using sawdust chitosan nanocomposite beads–A kinetic and thermodynamic study. *Environmental Research*, 203:111814.
- Lavanya R, Gomathi T, Vijayalakshmi K, Saranya M, Sudha PN, Anil S, 2017. Adsorptive removal of copper (II) and lead (II) using chitosan-g-maleic anhydride-g-methacrylic acid copolymer. *International journal of biological macromolecules*, 104:1495-1508.
- Manzoor K, Ahmad M, Ahmad S, Ikram S, 2019. Synthesis, characterization, kinetics, and thermodynamics of EDTA-modified chitosan-carboxymethyl cellulose as Cu (II) ion adsorbent. *ACS omega*, 4(17):17425-17437.
- Mu, R, Liu, B, Chen, X, Wang, N, Yang, J, 2020. Adsorption of Cu (II) and Co (II) from aqueous solution using lignosulfonate/chitosan adsorbent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163:120-127.
- Nair V, Panigrahy A, Vinu R, 2014. Development of novel chitosan–lignin composites for adsorption of dyes and metal ions from wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 254:491-502.
- Pavithra S, Thandapani G, Sugashini S, Sudha PN, Alkhamis HH, Alrefaei AF, Almutairi MH, 2021. Batch adsorption studies on surface tailored chitosan/orange peel hydrogel composite for the removal of Cr (VI) and Cu (II) ions from synthetic wastewater. *Chemosphere*, 271:129415.

- Sahin M, Gubbuk IH, Kocak N, 2012. Synthesis and characterization of sporopollenin-supported schiff bases and ruthenium (III) sorption studies. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 22(6):1279-1286.
- Sevgi, F, Bagkesici U, Kursunlu AN, Guler E, 2018. Fe (III), Co (II), Ni (II), Cu (II) and Zn (II) complexes of schiff bases based-on glycine and phenylalanine: Synthesis, magnetic/thermal properties and antimicrobial activity. *Journal of Molecular Structure*, 1154:256-260.
- Sutirman ZA, Rahim EA, Sanagi MM, Abd Karim KJ, Ibrahim WAW, 2020. New efficient chitosan derivative for Cu (II) ions removal: characterization and adsorption performance. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153:513-522.
- Tang CJ, Chen X, Feng F, Liu ZG, Song YX, Wang YY, Tang X, 2021b. Roles of bacterial cell and extracellular polymeric substance on adsorption of Cu (II) in activated sludges: A comparative study. *Journal of Water Process Engineering*, 41:102094.
- Tang L, Gou S, He Y, Liu L, Fang S, Duan W, Liu T, 2021a. An efficient chitosan-based adsorption material containing phosphoric acid and amidoxime groups for the enrichment of Cu (II) and Ni (II) from water. *Journal of Molecular Liquids*, 331:115815.
- Tural S, Ece MŞ, Tural B, 2018. Synthesis of novel magnetic nano-sorbent functionalized with N-methyl-D-glucamine by click chemistry and removal of boron with magnetic separation method. *Ecotoxicology and environmental safety*, 162:245-252.
- Ünlü N, Ersoz M, 2007. Removal of heavy metal ions by using dithiocarbamated-sporopollenin. *Separation and Purification Technology*, 52(3):461-469.
- Wang, Y, Wang, X, Ding, Y, Zhou, Z, Hao, C, Zhou, S, 2018. Novel sodium lignosulphonate assisted synthesis of well dispersed Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> microspheres for efficient adsorption of copper (II). *Powder Technology*, 325:597-605.
- Yang H, Bai L, Wei D, Yang L, Wang W, Chen H, Xue Z, 2019. Ionic self-assembly of poly (ionic liquid)-polyoxometalate hybrids for selective adsorption of anionic dyes. *Chemical Engineering Journal*, 358, 850-859.
- Yu Z, Song W, Li J, Li Q, 2020. Improved simultaneous adsorption of Cu (II) and Cr (VI) of organic modified metakaolin-based geopolymer. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(3):4811-4823.
- Zhang H, Omer AM, Hu Z, Yang LY, Ji C, Ouyang XK, 2019. Fabrication of magnetic bentonite/carboxymethyl chitosan/sodium alginate hydrogel beads for Cu (II) adsorption. *International journal of biological macromolecules*, 135:490-500.

**Atıf İçin:** Reis C, Özdeş D, Duran C, 2022. Karaağaç (*Ulmus glabra*) ve Dut (*Morus alba*) Talaşı ile Sulu Çözeltilerden Adsorpsiyon Yöntemiyle Rodamin 6G Giderimi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 337-351.

**To Cite:** Reis C, Özdeş D, Duran C, 2022. Removal of Rhodamine 6G from Aqueous Solutions by Adsorption Method with Elm (*Ulmus glabra*) and Mulberry (*Morus alba*) Sawdust. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 337-351.

## Karaağaç (*Ulmus glabra*) ve Dut (*Morus alba*) Talaşı ile Sulu Çözeltilerden Adsorpsiyon Yöntemiyle Rodamin 6G Giderimi

Ceyhun REİS<sup>1</sup>, Duygu ÖZDEŞ<sup>2\*</sup>, Celal DURAN<sup>3</sup>

**ÖZET:** Bu çalışmada, canlı metabolizmasında toksik etki gösteren katyonik yapıda boyarmadde olan Rodamin 6G'nin (R6G) sulardan ve atık sulardan uzaklaştırılmasında doğal karaağaç (*Ulmus glabra*) (UGT) ve dut (*Morus alba*) (MAT) talaşlarının ucuz ve etkili adsorbanlar olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. R6G'nin gideriminde adsorban olarak literatürde ilk defa bu çalışmada kullanılan UGT ve MAT çeşitli yöntemlerle karakterize edilmiştir. Adsorpsiyon deneyleri kesikli sistemle yürütülmüş olup, R6G'nin adsorpsiyon verimi üzerine başlangıç sulu çözelti pH'ı, denge süresi ve başlangıç R6G konsantrasyonu gibi deneysel parametrelerin etkileri incelenmiştir. R6G'nin her iki adsorban üzerine adsorpsiyonu için optimum sulu çözelti pH'ının 7.0 ve denge süresinin 180 dakika olduğu görülmüştür. Adsorpsiyon mekanizmasının aydınlatılabilmesi için elde edilen deneysel verilere çeşitli kinetik (yalancı birinci ve ikinci mertebeden kinetik model ile parçacık içi difüzyon modeli) ve izoterm modelleri (Langmuir, Freundlich, Temkin ve Dubinin-Radushkevich) uygulanmıştır. Adsorpsiyon kinetiğinin, ikinci mertebeden kinetik modeli takip ettiği ve deneysel verilerin hem Langmuir hem de Freundlich izoterm modellerine iyi bir uyum gösterdiği tespit edilmiştir. UGT ve MAT'in maksimum adsorpsiyon kapasitesi Langmuir izoterm modeli kullanılarak sırasıyla 50.5 ve 31.8 mg g<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda karaağaç ve dut talaşının boyarmadde gideriminde kullanılacak etkili ve düşük maliyetli alternatifler olabileceği görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Adsorpsiyon, dut talaşı, izoterm, karaağaç talaşı, kinetik, Rodamin 6G

### Removal of Rhodamine 6G from Aqueous Solutions by Adsorption Method with Elm (*Ulmus glabra*) and Mulberry (*Morus alba*) Sawdust

**ABSTRACT:** In the present study, the utilization of natural elm (*Ulmus glabra*) (UGT) and mulberry sawdust (*Morus alba*) (MAT) as low cost and effective adsorbents in the removal of Rhodamine 6G (R6G), a cationic dye that has a toxic effect on living metabolism, from water and wastewater has been investigated. UGT and MAT, which were used for the first time in the literature as adsorbent in the removal of R6G, have been characterized by various methods. Adsorption experiments have been carried out by batch system and the effects of experimental parameters such as initial aqueous solution pH, equilibrium time, and initial R6G concentration on the adsorption efficiency of R6G have been evaluated. It was observed that the optimum aqueous solution pH was 7.0 and the equilibrium time was 180 minutes for the adsorption of R6G on both adsorbents. Several kinetics (pseudo first and second order kinetic models and intraparticle diffusion model) and isotherm models (Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin-Radushkevich) have been applied to the experimental data obtained in order to elucidate the adsorption mechanism. It was found that the adsorption kinetics followed the pseudo second order kinetic model and the experimental data showed good agreement with both Langmuir and Freundlich isotherm models. The maximum adsorption capacity of UGT and MAT has been calculated as 50.5 and 31.8 mg g<sup>-1</sup>, respectively, using the Langmuir isotherm model. As a result of the study, it has been seen that elm and mulberry sawdust can be an effective and low cost alternative to be used in dyestuff removal

**Keywords:** Adsorption, mulberry sawdust, isotherm, elm sawdust, kinetic, Rhodamine 6G

<sup>1</sup>Ceyhun REİS ([Orcid ID: 0000-0002-4185-194X](https://orcid.org/0000-0002-4185-194X)), Gümüşhane Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ormanlık ve Çevre Bilimleri Anabilim Dalı, Gümüşhane, Türkiye

<sup>2</sup>Duygu ÖZDEŞ ([Orcid ID: 0000-0002-8692-2676](https://orcid.org/0000-0002-8692-2676)), Gümüşhane Üniversitesi, Gümüşhane Meslek Yüksekokulu, Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümü, Gümüşhane Türkiye

<sup>3</sup>Celal DURAN ([Orcid ID: 0000-0002-1306-9061](https://orcid.org/0000-0002-1306-9061)), Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Trabzon, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Duygu ÖZDEŞ, e-mail: duyguozdes@hotmail.com

Bu çalışma Ceyhun REİS'in Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

## GİRİŞ

İnsan sağlığı ve ekosistem üzerinde ciddi tehdit oluşturan çevre kirliliği sorunu hızlı nüfus artışı ve teknolojik faaliyetlerin gelişim göstermesi ile birlikte son yıllarda önemli boyutlara ulaşmıştır. Canlıların yaşamı büyük oranda suya dayandığı için çevre sorunlarının en önemli kısmını su kirliliği oluşturmaktadır (Rafiq ve ark., 2021). Su tüketiminin fazla olduğu endüstriyel faaliyetler sonucunda oluşan atık sular, işletmenin türüne bağlı olarak çeşitli toksik organik ya da inorganik yapıda kirletici türleri içerebilir (Attademo ve ark., 2017). Organik kökenli kirleticiler arasında yer alan kompleks aromatik yapıya sahip boyarmaddeler çevreye tekstil, plastik, deri ve kâğıt endüstrilerinden bırakılmaktadır. Boyarmaddelerin çevrede bozunmadan uzun süre kalabilmeleri ısıya, ışığa ve yükseltgen maddelere karşı oldukça dayanıklı olmaları nedeniyledir. Boyarmaddeler sudaki çözünmüş oksijen derişiminin azalmasına neden olduğundan, bu kirleticilerin sulara bulaşması sonucunda en başta suda yaşayan canlılar zarar görmektedir. İnsanlarda ise; üst solunum yollarında, gözlerde ve ciltte tahriş, bronşit, nefes darlığı ve akciğer ödemi gibi rahatsızlıklara neden olmaktadır (Theamwong ve ark., 2021; Sangon ve ark., 2021). Bu nedenle özellikle endüstriyel atık sulardaki boyarmaddeler alıcı ortama verilmeden önce sulardan uzaklaştırılması gerekmektedir (Reis, 2019).

Bu amaçla koagülasyon (Januário ve ark., 2021), flokülasyon (Feng ve ark., 2021), membran filtrasyonu (Abid ve ark., 2012) ve adsorpsiyon (Wei ve Kamali, 2021) gibi çok değişik teknikler kullanılmaktadır. Adsorban olarak adlandırılan katı maddelerin sulu çözeltilerdeki kirleticileri çeşitli mekanizmalarla tutarak uzaklaştırması esasına dayan adsorpsiyon en etkili metotlarından biri olarak görülmektedir (Gad ve Nasef, 2021). Adsorpsiyon prosesi ile kirletici giderim verimi büyük ölçüde adsorbanın özelliğine bağlıdır. Bu amaçla; suda çözünmeyen, çevreye zarar vermeyen, düşük maliyetli, bol bulunan, geniş yüzey alanına ve kirletici türlerle etkileşime girecek fonksiyonel gruplara sahip maddeler adsorban olarak tercih edilmektedir (Duran ve ark., 2011a).

Organik ve inorganik karakterli birçok kirleticinin sulardan giderilmesinde kullanılan aktif karbon yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip bir adsorban olmasına rağmen oldukça pahalı oluşu adsorpsiyon işleminde aktif karbona alternatif olabilecek düşük maliyetli adsorbanların geliştirmesini önemli hale getirmektedir (Duran ve ark., 2011b). Bu amaçla son yıllarda araştırmacılar, orman endüstri atıkları olan lignoselülozik yapıdaki odun talaşlarını doğal olarak ya da çeşitli şekillerde modifiye ederek adsorban olarak değerlendirilmesi konusunda çalışmalarını yoğunlaştırmıştır. Çam talaşı (Şentürk ve Yıldız, 2020a), NaOH ile modifiye edilmiş portakal ağacı talaşı (Azzaz ve ark., 2017), kayın talaşı (El Hajam ve ark., 2019) ve kâfur ağacı (*Cinnamomum camphora*) talaşı (Wang ve ark., 2014) gibi ekonomik değeri bulunmayan orman endüstri ve tarımsal atıkların kullanılmasıyla çeşitli boyarmaddelerin sulu çözeltilerden uzaklaştırılma potansiyellerinin incelendiği çok sayıda çalışmaya literatürde rastlanmaktadır.

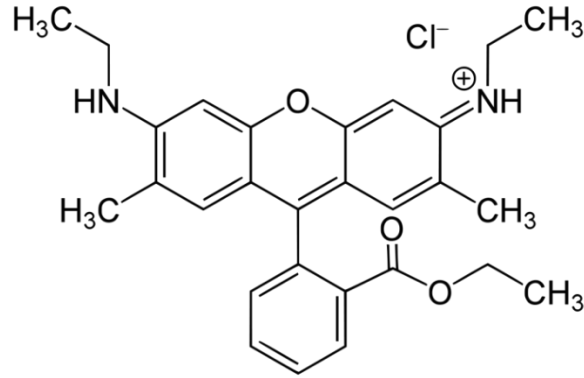
Bu çalışmada; sulu çözeltilerden R6G'nin adsorpsiyon yöntemiyle uzaklaştırılmasında adsorban olarak karaağaç (*Ulmus glabra*) (UGT) ve dut talaşı (*Morus alba*) (MAT)'nın doğal adsorban olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Yapılan literatür araştırmasına göre UGT ve MAT ilk defa bu çalışmada R6G'nin adsorpsiyonunda kullanılmıştır. Adsorpsiyon veriminin artırılması amacıyla çeşitli deneysel parametreler optimize edilmiş ve elde edilen veriler adsorpsiyon mekanizmasının aydınlatılması amacıyla çeşitli kinetik ve izoterm modellere uygulanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Kullanılan Cihazlar ve Çözeltiler

Çalışmada adsorbat olarak katyonik boyarmadde olan, pek çok endüstriyel faaliyette sıklıkla kullanılan ve sularda eser miktarda bulunması halinde bile hem suda yaşayan canlılara hem de besin

zincirine kadar ulaşmak suretiyle insan metabolizmasında zararlı etkilere neden olan Rodamin 6G (R6G) kullanılmıştır. Molekül yapısı Şekil 1'de verilen R6G'nin kimyasal formülü;  $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$ , mol kütlesi;  $479.02 \text{ g mol}^{-1}$  ve maksimum absorbans değeri;  $547 \text{ nm}$ 'dir. Çalışmada kullanılan kimyasalların tamamı analitik saflıkta olup, Fluka (Buch, Switzerland) veya Merck (Darmstadt, Germany) firmalarından temin edilmiştir. R6G'nin  $5000 \text{ mg L}^{-1}$  konsantrasyonunda stok çözeltisi hazırlanmış ve çalışma çözeltileri ile kalibrasyon çözeltileri stok çözeltilerden seyreltilerek hazırlanmıştır. Çalışmaların her aşamasında saf su kullanılmıştır. Sulu çözeltilerde kalan R6G derişimi Perkin Elmer Lambda 25 model UV-Vis spektrofotometre ile analiz edilerek belirlenmiştir. Adsorbanların karakterizasyonu için Perkin Elmer 1600 model Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre (FTIR) ve ZIESS Evo Ls 10 model Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) cihazı kullanılmıştır. Çözeltilerin pH değerlerini ayarlamak için Hanna pH-2221 model masaüstü pH metre, adsorbanların nem miktarlarının tayini için Santen SE 125 model etüv, adsorpsiyon deneyleri için BOECO PSU-15i model mekanik çalkalayıcı, adsorbanı çözeltilerden ayırmak için BOECO S-8 model santrifüj cihazı, tartımlar için Sartorius BP1106 model analitik terazi ve manyetik karıştırıcı olarak ta IKA RCT Basic model cihazlar kullanılmıştır.



Şekil 1. R6G'nin kimyasal yapısı

### Adsorbanların Hazırlanışı ve Karakterizasyonu

R6G'nin sulardan ve atık sulardan adsorpsiyonu için;  $150 \mu\text{m}$ 'den daha küçük boyuttaki doğal karaağaç (*Ulmus glabra*) (UGT) ve dut talaşı (*Morus alba*) (MAT) kullanılmıştır. Adsorbanların yapısında bulunan fonksiyonel grupları belirlemek ve yüzey morfolojileri hakkında fikir edinmek için FTIR ve SEM analizleri yapılmıştır. Ayrıca adsorbanların içerdikleri nem miktarları belirlenmiş olup, yüzey asidik gruplarının tayini için Boehm titrasyonu (Boehm, 1966) ve nötral yük noktasındaki pH değerlerini belirlemek için  $\text{pH}_{\text{pzc}}$  (Noh ve Schwarz, 1989) analizlerinden yararlanılmıştır.

### Adsorpsiyon Deneyleri

Adsorpsiyon deneyleri için çalkalama yönteminden (batch) yararlanılmıştır. Bu amaçla  $15 \text{ mL}$  hacimli polipropilen santrifüj tüplerine  $0.01\text{-}0.20 \text{ g}$  aralığındaki adsorbanlar ayrı ayrı tartıldıktan sonra üzerlerine pH değeri  $7.0$  olan  $50\text{-}1000 \text{ mg L}^{-1}$  başlangıç konsantrasyon aralığındaki R6G çözeltilerinden  $10$ 'ar  $\text{mL}$  ilave edilmiş ve elde edilen karışımlar  $400 \text{ rpm}$  hızda mekanik çalkalayıcı üzerinde  $1\text{-}240$  dakika zaman aralıklarında çalkalanmıştır. Belirlenen süreler sonunda adsorbat çözeltileri adsorbandan  $3500 \text{ rpm}$  hızda  $5$  dakika santrifüj edilerek ayrılmıştır. Çözeltilerde adsorplanmadan kalan R6G konsantrasyonu UV-Vis Spektrofotometre ile  $547 \text{ nm}$  dalga boyunda analiz edilerek belirlenmiştir.  $1 \text{ g}$  adsorbanın adsorpladığı R6G miktarları ( $q_e \text{ (mg g}^{-1}\text{)}$ ) Eşitlik 1 kullanılarak hesaplanmıştır.

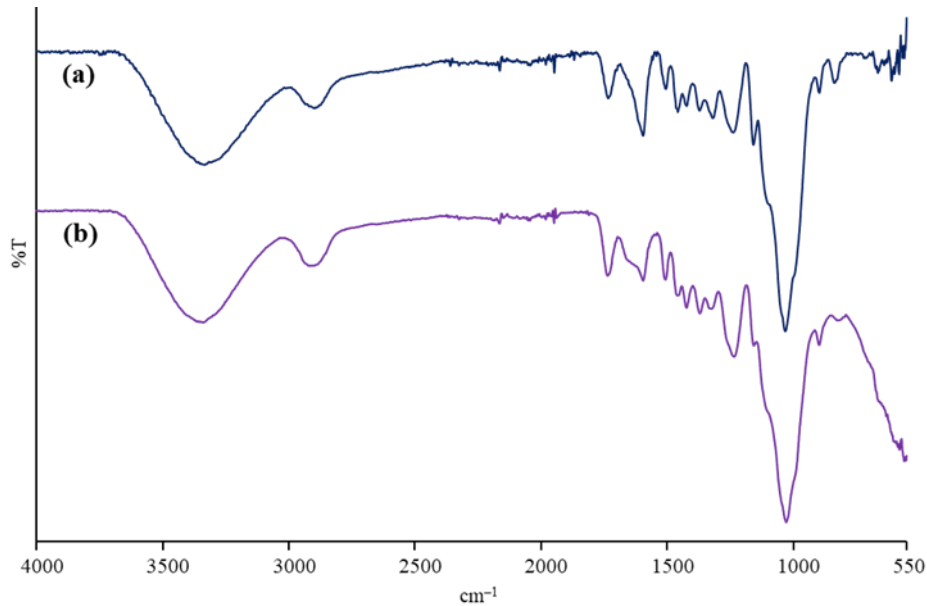
$$q_e = \frac{(C_o - C_e) \times V}{m} \quad (1)$$

Eşitlikte  $C_o$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ); başlangıç R6G konsantrasyonunu,  $C_e$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ); dengede sulu çözeltide adsorplanmadan kalan R6G miktarını,  $V$  (mL); çözelti hacmini ve  $m$  (g); adsorban miktarını ifade etmektedir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

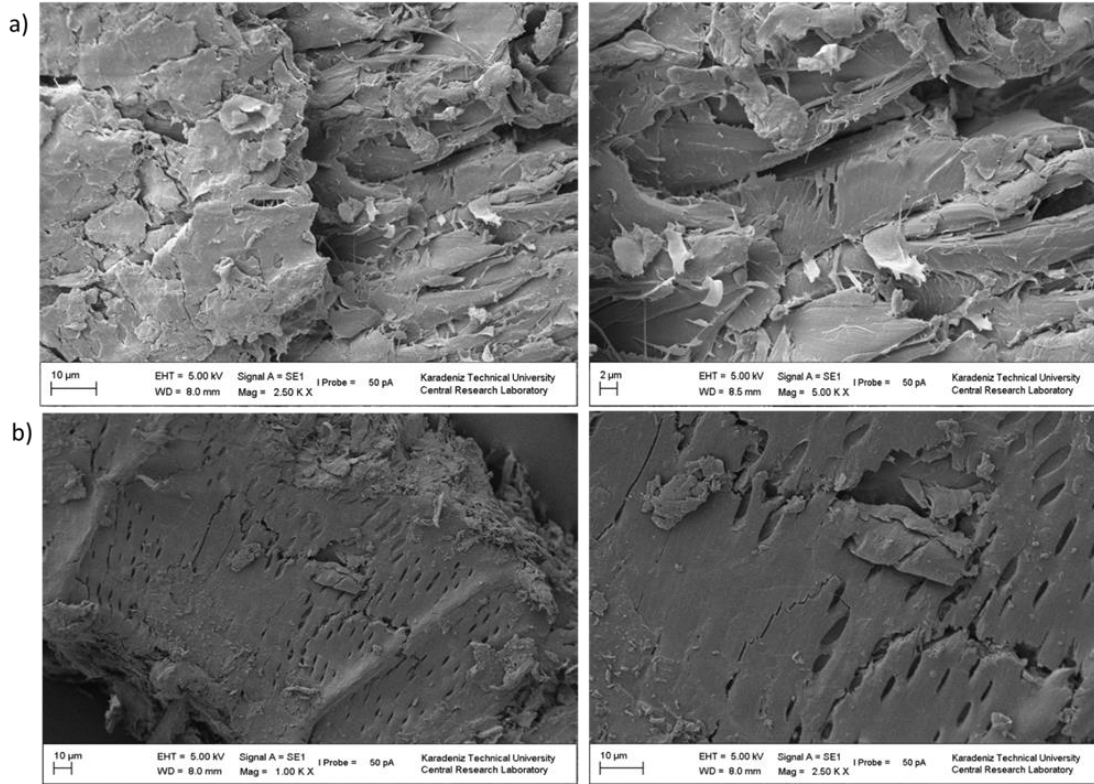
### Adsorbanların Karakterizasyonu

MAT ve UGT'nin yüzey fonksiyonel gruplarının belirlenmesi amacıyla elde edilen FTIR spektrumları sırasıyla Şekil 2(a) ve (b)'de gösterilmiştir. Spektrumlar incelendiğinde UGT ve MAT'ın yapısında benzer fonksiyonel gruplar bulunduğu görülmektedir. Her iki adsorbanın FTIR spektrumunda  $3340 \text{ cm}^{-1}$ 'de görülen geniş pik selülozun yapısında bulunan O-H gruplarından kaynaklanan O-H gerilme bandı ile ilgili olduğu düşünülmektedir.  $2899 \text{ cm}^{-1}$  dalga boyundaki pikin UGT ve MAT'ın yapısını oluşturan lignin, selüloz ve hemiselüloz gibi maddelerin fonksiyonel gruplarından kaynaklanan C-H gerilme bandı ile karakterize edilir. Bunların dışında spektrumda  $1730 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1590 \text{ cm}^{-1}$  ve  $1030 \text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen pikler; sırasıyla C=O, C=C ve C-O gruplarının varlığına işaret etmektedir (Şentürk ve Yıldız, 2020b; Chakraborty ve ark., 2021). MAT ve UGT'nin yüzey morfolojisini incelemek için elde edilen SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 3(a) ve (b)'de verilmiştir. Her iki adsorbanın da sulu çözeltiden R6G adsorplanmasına imkan sağlayacak gözenekli bir yapıya ve lifli bir dokuya sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 2. FTIR spektrumu (a) MAT (b) UGT

UGT ve MAT'ın  $\text{pH}_{\text{pzc}}$  değerleri, nem miktarları ve yüzey asidik gruplarının oranları Çizelge 1'de görülmektedir. UGT ve MAT'ın  $\text{pH}_{\text{pzc}}$  değerinin 7.0'dan düşük olması yapılarında bulunan asidik grupların bazik gruplara oranla daha baskın olmasıyla ilgilidir. Çözelti pH'ının adsorbanın  $\text{pH}_{\text{pzc}}$  değerinden daha küçük olması durumunda ( $\text{pH}_{\text{çözelti}} < \text{pH}_{\text{pzc, adsorban}}$ ) adsorbanın net yüzey yükü pozitif olur. Böyle bir ortamda anyonik yapıda bulunan boyarmaddeler daha iyi adsorplanır. Çözelti pH'ının adsorbanın  $\text{pH}_{\text{pzc}}$  değerinden daha büyük olması durumunda ( $\text{pH}_{\text{çözelti}} > \text{pH}_{\text{pzc, adsorban}}$ ) adsorbanın net yüzey yükü negatif olur ve bu şartlarda katyonik boyarmaddelerin giderim verimi daha yüksek olur (Li ve ark., 2013; Ratnamala ve ark., 2016). UGT ve MAT'ın toplam yüzey asidik grupları sırasıyla 5.70 ve 5.47  $\text{mmol g}^{-1}$  olarak ve nem miktarı da sırasıyla %6.8 ve %7.8 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3. SEM görüntüleri (a) MAT (b) UGT

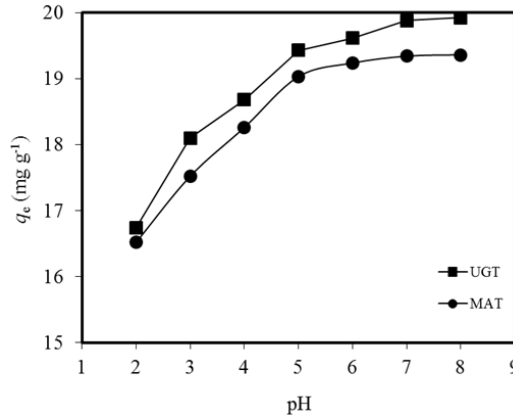
Çizelge 1. Adsorbanlara ait bazı karakterizasyon parametreleri

Parametre	Adsorbanlar	
	UGT	MAT
pH <sub>pzc</sub>	5.4	5.2
Nem Miktarı (%)	6.8	7.8
Yüzey asidik gruplar		
Laktonik gruplar (mmol/g)	2.28	3.04
Karboksilik gruplar (mmol/g)	0.76	0.76
Fenolik gruplar (mmol/g)	2.66	1.67
Toplam asidik gruplar (mmol/g)	5.70	5.47

### Adsorpsiyon Verimi Üzerine Başlangıç pH Etkisi

Sulu çözelti pH değeri adsorbanın yüzey yükünü ve adsorbatın kimyasal yapısını önemli ölçüde etkilediğinden adsorpsiyon çalışmalarında optimize edilmesi gereken en önemli parametrelerden biridir. Bu nedenle R6G'nin UGT ve MAT üzerine adsorpsiyon verimi, 2.0-8.0 başlangıç sulu çözelti pH aralığında, 100 mg L<sup>-1</sup> başlangıç R6G konsantrasyonunda ve 0.05 g adsorban kullanılarak test edilmiştir. Başlangıç sulu çözelti pH değeri 2.0'dan 8.0'a artırıldığında  $q_e$  değerleri UGT için 16.7'den 19.9 mg g<sup>-1</sup>'a ve MAT için 16.5'den 19.4 mg g<sup>-1</sup>'a yükseldiği görülmektedir (Şekil 4). Düşük pH değerlerinde adsorbanların çevresi H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> iyonlarıyla çevrelenmiş olup yüzey fonksiyonel grupları pozitif yüklüdür. Bu nedenle, katyonik yapıdaki R6G molekülleri ile pozitif yüklenmiş adsorban yüzeyleri arasında adsorpsiyon verimini azaltan elektrostatik itme meydana gelmektedir. Ayrıca H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> iyonlarının R6G molekülleri ile adsorbanın aktif yüzeylerine tutunmak için yarışmalı etkisi yine adsorpsiyon verimini azaltmaktadır. Bu durumun aksine başlangıç sulu çözelti pH değerinin yükselmesiyle, adsorbanlar yüzeyindeki negatif yük yoğunluğu artmaya başlar ve buna bağlı olarak R6G molekülleri ile UGT ve MAT yüzeyleri arasında elektrostatik etkileşim artmaktadır. Ayrıca H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> iyonlarının adsorpsiyon için yarışmalı etkisi de ihmal edilir seviyeye gelmektedir (Esmaili ve Foroutan, 2019). R6G'nin UGT ve MAT üzerine adsorpsiyon verimi üzerine pH etkisi, adsorbanların

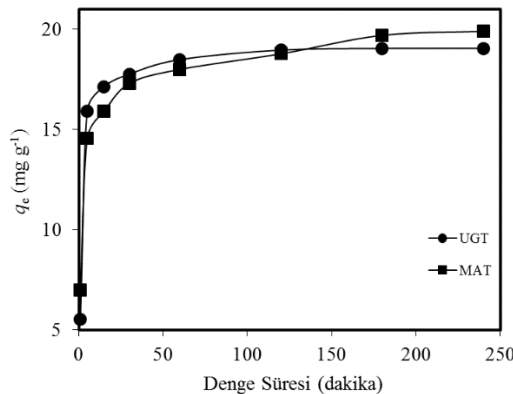
pH<sub>pzc</sub> değeri ile de açıklanabilir. UGT ve MAT'ın pH<sub>pzc</sub> değerleri sırasıyla 5.4 ve 5.2 olarak tespit edilmiş olup, sulu çözeltide katyonik yapıda olan R6G'nin bu değerlerden daha yüksek pH değerlerinde en yüksek verimle uzaklaştırılması beklenmektedir. Çünkü pH<sub>çözelti</sub>>pH<sub>pzc</sub>, adsorban olması durumunda adsorban yüzeyi negatif yükü yüklenir. Şekil 4'e bakıldığında, gerçekten de bu pH değerlerinden sonra adsorpsiyon veriminin daha da arttığı görülmektedir. Sonraki deneysel çalışmalarda R6G'nin UGT ve MAT üzerine adsorpsiyonu için optimum pH değeri 7.0 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. R6G adsorpsiyonu üzerine başlangıç sulu çözelti pH'ının etkisi

#### Adsorpsiyon Verimi Üzerine Denge Süresinin Etkisi

Geliştirilen adsorpsiyon prosesinin endüstriyel işlemlerde uygulanması sırasında işlem süresinin kısa oluşu maliyeti azaltmaktadır. Bu nedenle R6G'nin UGT ve MAT üzerine adsorpsiyonu için optimum denge süresinin belirlenmesi önemlidir. Bu amaçla 0.05 g (5.0 g L<sup>-1</sup>) UGT ve MAT ayrı ayrı tüplere tartılarak, başlangıç pH değeri 7.0'a ayarlanmış 100 mg L<sup>-1</sup> R6G çözeltisi ile 1-240 dakika zaman aralığında farklı sürelerde muamele edilmiştir. Belirlenen her bir süre sonunda adsorbat ve adsorban karışımları birbirinden santrifüjle ayrılarak ve çözeltide adsorplanmadan kalan R6G konsantrasyonları UV-Vis Spektrofotometre ile belirlendikten sonra 1 g UGT ve MAT'ın değişik zaman aralıklarında adsorpladığı R6G miktarları ( $q_t$ ) hesaplanmıştır. Adsorpsiyon işleminin ilk aşamalarında adsorbanların yüzeyindeki aktif adsorpsiyon bölgelerinin açık olmasından dolayı adsorpsiyon olayı hızlı bir şekilde gerçekleşmiştir. Zamanla adsorban gözeneklerinin dolmasıyla boyarmaddenin adsorplanma hızı azalmış ve 180 dakika temas süresinden sonra her iki adsorbanın da yüzeyinin tamamen doygunluğa ulaşması nedeniyle denge meydana gelmiştir (Ozdes ve ark., 2014). Denge durumu sonrasında ihmal edilebilir seviyede R6G adsorpsiyonu meydana gelmiştir. Sonuç olarak, R6G'nin her iki adsorban yüzeyine adsorpsiyonu için yeterli süre sonraki çalışmalarda 180 dakika olarak belirlenmiştir (Şekil 5).



Şekil 5. R6G'nin adsorpsiyonuna denge süresinin etkisi



### Adsorpsiyon Kinetiği

R6G'nin UGT ve MAT üzerine adsorpsiyon hızının belirlenmesi ve adsorpsiyon mekanizmasının açıklanabilmesi için elde edilen verilere yalancı birinci ve ikinci mertebeden kinetik model ile tanecik içi difüzyon modeli uygulanmıştır.

Adsorpsiyon işleminin ilk aşamaları için uygulanan birinci mertebeden kinetik model (Lagergren, 1898) ile adsorpsiyon mekanizmasının kimyasal sorpsiyon (kemisorpsiyon) olduğu varsayımına dayanan ikinci mertebeden kinetik modelin (Ho ve Mckay, 1999) doğrusal hız eşitlikleri sırasıyla Eşitlik 2 ve 3'te verilmiştir.

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (2)$$

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (3)$$

Eşitlikte  $q_e$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) ve  $q_t$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) dengede ve herhangi bir  $t$  anında adsorban üzerinde adsorplanan adsorbat miktarlarını gösterir.  $k_1$  ( $\text{min}^{-1}$ ) ve  $k_2$  ( $\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) ise sırasıyla yalancı birinci mertebeden ve ikinci mertebeden hız sabitidir. Birinci mertebeden kinetik modele göre  $\ln(q_e - q_t)$ 'ye karşı  $t$  grafiği çizilerek,  $k_1$  ve  $q_e$  değerleri sırasıyla bu grafiğin eğimden ve ordinatı kesim noktasından bulunabilir. İkinci mertebeden kinetik model dikkate alınarak,  $t/q_t - t$  arasında çizilen grafiğin eğiminden ve ordinatı kesim noktasından sırasıyla  $q_e$  ve  $k_2$  değerleri hesaplanır.

Birinci ve ikinci mertebeden kinetik modelin difüzyon mekanizmasını açıklama açısından yetersiz kaldığı durumlarda, doğrusal formu Eşitlik 4'te verilen tanecik içi difüzyon modeli kullanılmaktadır (Weber ve Morriss, 1963).

$$q_t = k_{id} t^{1/2} + C \quad (4)$$

$k_{id}$  ( $\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1/2}$ ) tanecik içi difüzyon hız sabiti,  $C$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) ise sınır tabaka kalınlığını ifade eden sabitlerdir.  $k_{id}$  ve  $C$ ,  $q_t$  ve  $t_{1/2}$  arasında çizilen grafiğin eğimi ve kesim noktasından tayin edilebilir.

Birinci mertebeden kinetik model için  $\ln(q_e - q_t)$ 'ye karşılık  $t$  grafikleri çizilmiş ve bu grafikten yararlanılarak  $k_1$  ve  $q_{e, \text{hes}}$  değerleri; ikinci mertebeden kinetik model için de  $t/q_t$ 'ye karşılık  $t$  grafikleri çizilerek  $k_2$  ve  $q_{e, \text{hes}}$  değerleri tespit edilmiştir. Elde edilen sabitler ilgili korelasyon katsayıları ( $R^2$ ) ile birlikte Çizelge 2'de verilmiştir.

UGT ve MAT için  $q_{e, \text{den}}$  değerleri sırasıyla 19.1 ve 19.9  $\text{mg g}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Birinci mertebeden kinetik modelin deneysel verilere uygulanması sonucu  $q_{e, \text{hes}}$  değerleri UGT ve MAT için sırasıyla 4.33 ve 6.79  $\text{mg g}^{-1}$  ve  $R^2$  değerleri 0.9061 ve 0.9124 olarak bulunmuştur. İkinci mertebeden kinetik uygulanmasıyla da  $q_{e, \text{hes}}$  değerleri UGT ve MAT için sırasıyla 19.3 ve 20.1  $\text{mg g}^{-1}$  ve  $R^2$  değerleri ise 0.9999'dan yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu veriler dikkate alındığında, hem deneysel olarak hesaplanan  $q_e$  değerlerinin, modelin uygulanmasıyla hesaplanan  $q_e$  değerlerine yakınlığı hem de  $R^2$  değerlerinin daha yüksek olması nedeniyle R6G'nin hem UGT hem de MAT üzerine adsorpsiyon mekanizmasında ikinci mertebeden kinetik modelin baskın olduğu düşünülmektedir. Bu durum da adsorpsiyon mekanizmasında kemisorpsiyon olayının etkili olduğunu düşündürmektedir. Adsorpsiyon mekanizmasının daha detaylı incelenmesi açısından deneysel verilere tanecik içi difüzyon modeli de uygulanmıştır.

**Çizelge 2.** R6G'nin UGT ve MAT üzerine adsorpsiyonunda kinetik parametreler

Adsorban	Birinci mertebeden kinetik model				İkinci mertebeden kinetik model		
	$q_{e, \text{den}}$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	$k_1$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$q_{e, \text{hes}}$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	$R^2$	$k_2$ ( $\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	$q_{e, \text{hes}}$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	$R^2$
UGT	19.1	0.0267	4.33	0.9061	0.0276	19.3	0.9999
MAT	19.9	0.0187	6.79	0.9124	0.0129	20.1	0.9996

Bu amaçla R6G'nin hem UGT hem de MAT üzerine adsorpsiyonu için  $t^{1/2}$ 'ye karşılık  $q_t$  grafikleri çizilmiştir (şekil verilmemiştir). R6G'nin her iki adsorban üzerine adsorpsiyonunun; film difüzyonu, tanecik içi difüzyon ve denge hali olmak üzere 3 aşamadan meydana geldiği göze çarpmaktadır. Film difüzyonunda R6G molekülleri adsorban yüzeyine tutunmakta, tanecik içi difüzyonda ise adsorbanın gözenek içlerine doğru adsorpsiyon gerçekleşmektedir. Son aşama olan denge durumunda ise adsorban yüzeyindeki aktif adsorpsiyon bölgelerinin doygunluğa ulaşmasından dolayı önemsenmeyecek seviyede R6G giderimi gözlenmektedir. Bu aşamalardan hangilerinin mekanizma üzerinde etkili olduğuna karar verebilmek için her aşama için hız sabiti hesaplanır. En küçük hız sabiti değerine sahip olan aşamanın mekanizma üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. R6G'nin hem UGT hem de MAT üzerine adsorpsiyonunda hangi aşamanın etkili olduğuna karar verebilmek için modelin uygulanmasıyla her aşama için hesaplanan hız sabiti ( $k_{id}$ ) değerleri ilgili  $R^2$  değerleri ile birlikte Çizelge 3'te verilmiştir. Denge hali olan son aşama çok hızlı gerçekleştiğinden hız sabiti büyük değerlere sahip olur. Bu nedenle bu aşamanın mekanizma üzerinde etkisi ihmal edilmektedir. Her iki adsorban için de tanecik içi difüzyon aşamasından elde edilen hız sabiti değerlerinin, film difüzyonu aşamasından hesaplanan hız sabiti değerlerinden daha düşük olduğu görülmektedir (Çizelge 3). Dolayısıyla R6G'nin hem UGT hem de MAT üzerine adsorpsiyon mekanizmasında tanecik içi difüzyonun etkili olduğu düşünülebilir. Ancak bu noktada dikkate alınması gereken bir başka parametre de  $C$  sabitidir.  $C$  sabitinin sıfır olması yani doğrunun orijinden geçmesi durumunda, sadece tanecik içi difüzyonun etkili olduğu söylenir.  $C$  sabiti sıfırdan farklı bir değerdeyse adsorpsiyon işleminde birden fazla mekanizma etkili olmaktadır (Chang vd., 2011). Hesaplanan  $C$  sabiti her iki adsorban için de sıfırdan farklıdır. Bu nedenle R6G'nin hem UGT hem de MAT üzerine adsorpsiyonunda film difüzyonu ve tanecik içi difüzyonun birlikte etkili olduğu söylenilebilir (Bensalah ve ark., 2017).

**Çizelge 3.** R6G'nin UGT ve MAT üzerine adsorpsiyonunda parçacık içi difüzyon model parametreleri

Adsorban	Parçacık içi difüzyon modeli				
	$k_{id,1}$ ( $\text{mg g}^{-1}\text{min}^{-1/2}$ )	$R^2$	$k_{id,2}$ ( $\text{mg g}^{-1}\text{min}^{-1/2}$ )	$R^2$	$C$
UGT	0.4516	0.9569	0.0303	0.9921	12.2
MAT	0.6353	0.9502	0.2507	0.9091	11.6

### Başlangıç Adsorbat Derişiminin Etkisi

R6G'nin UGT ve MAT üzerine adsorpsiyon verimine, başlangıç R6G konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla başlangıç konsantrasyonları 50-1000  $\text{mg L}^{-1}$  arasında olan, pH değerleri 7.0'a ayarlanmış bir seri R6G çözeltisi, 0.05 g UGT ve MAT ile 180 dakika boyunca muamele edilmiştir. Belirtilen süre sonunda adsorban ve adsorbat karışımı birbirinden ayrılmış ve çözeltide adsorplanmadan kalan R6G konsantrasyonları tayin edilmiştir. R6G konsantrasyonunun 50  $\text{mg L}^{-1}$ 'den 1000  $\text{mg L}^{-1}$ 'ye artırılmasıyla; sabit UGT miktarında adsorpsiyon miktarının 9.0  $\text{mg g}^{-1}$ 'den 48.0  $\text{mg g}^{-1}$ 'e arttığı, adsorpsiyon yüzdesinin %90.2'den %24.0'a azaldığı (Şekil 6(a)) ve sabit MAT miktarında adsorpsiyon miktarının 9.8  $\text{mg g}^{-1}$ 'den 32.0  $\text{mg g}^{-1}$ 'e arttığı, adsorpsiyon yüzdesinin ise %97.9'dan %16.0'a azaldığı (Şekil 6(b)) görülmektedir. Sabit adsorban miktarlarında R6G konsantrasyonunun artırılması, konsantrasyon gradiyentinin oluşmasına neden olur. Bu da adsorpsiyon için itici bir güç olduğundan, gram adsorban başına adsorplanan R6G miktarı ( $q_e$ ) artar. Öte yandan yüksek R6G konsantrasyonlarında adsorpsiyon yüzdesinin azalması ise UGT ve MAT yüzeyindeki aktif adsorpsiyon yüzeylerinin aşırı doygunluğa erişmesi ile ilişkilidir (Haroon ve ark., 2018).

### Adsorpsiyon İzotermi

R6G'nin UGT ve MAT üzerine adsorpsiyon mekanizmasının aydınlatılması amacıyla, başlangıç

R6G konsantrasyonunun adsorpsiyon verimi üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalardan elde edilen veriler Langmuir, Freundlich, Temkin ve Dubinin-Radushkevich (D-R) izoterm modellerine uygulanmıştır.

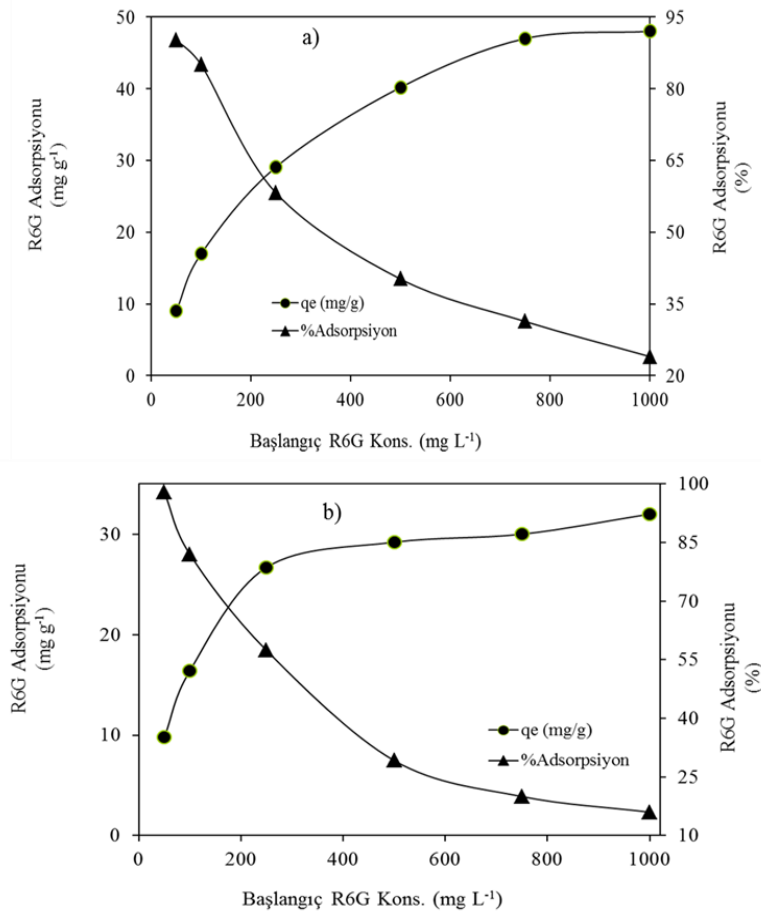
Langmuir izoterm modeli, adsorban yüzeyindeki aktif adsorpsiyon yüzeylerinin homojen ve eş enerjili bir yapıya sahip olduğu, adsorbat moleküllerinin adsorban yüzeyine tek tabakalı adsorplandığı fikrine dayanmaktadır (Langmuir, 1918). Langmuir izoterm modelinin doğrusal formu Eşitlik 5'te verilmiştir:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{C_e}{q_{\text{maks}}} + \frac{1}{bq_{\text{maks}}} \quad (5)$$

$C_e/q_e$ 'ye karşı  $C_e$  grafiği çizilerek bu grafiğin eğim ve kesim noktasından da sırasıyla  $q_{\text{maks}}$  ve  $b$  değerleri tayin edilebilir. Burada  $q_e$ ; gram adsorban başına adsorplanan adsorbat miktarı ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $q_{\text{maks}}$ ; tek tabaka adsorpsiyon kapasitesi ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $C_e$ ; dengede çözeltide adsorplanmadan kalan adsorbat miktarı ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $b$ ; serbest enerji ya da adsorpsiyon entalpisi ile ilgili sabittir ( $\text{L mg}^{-1}$ ). Adsorpsiyon işleminin uygunluğu hakkında fikir edinmek için  $b$  değeri kullanılarak  $R_L$  sabiti Eşitlik 6'ya hesaplanır (Hall ve ark., 1966);

$$R_L = \frac{1}{1 + bC_o} \quad (6)$$

$R_L$  değerlerinin 0 ile 1 aralığında hesaplanması çalışılan şartlarda adsorpsiyon işleminin uygunluğunu ifade eder.



Şekil 6. R6G'nin a) UGT b) MAT üzerine adsorpsiyonuna başlangıç R6G konsantrasyonunun etkisi

Freundlich izoterm modeli adsorban üzerindeki aktif adsorpsiyon bölgelerinin heterojen olduğunu ve adsorban yüzeyinde çok tabakalı adsorpsiyonun meydana geldiğini kabul eder

(Freundlich, 1906). Freundlich izoterm modelinin doğrusal şekli Eşitlik 7 ile ifade edilmektedir.

$$\ln q_e = \ln K_f + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (7)$$

Burada  $K_f$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ); adsorpsiyon kapasitesini gösteren sabit ve  $n$ ; adsorpsiyon yoğunluğunu gösteren birimsiz sabittir.  $K_f$  ve  $n$ 'in sayısal değerlerini elde etmek için  $\ln q_e$ 'nin  $\ln C_e$ 'ye karşı grafiği çizilir ve bu grafiğin eğiminden ve ordinatı kesim noktasından sırasıyla  $n$  ve  $K_f$  sabitleri bulunur.  $n$  sabitinin 1-10 aralığında olması, adsorpsiyon işleminin uygulanmasını ifade etmektedir.

Her iki izoterm modeline ait sabitler ilgili grafikler çizilerek hesaplanmış ve Çizelge 4'te verilmiştir. R6G'nin UGT ve MAT üzerine adsorpsiyonu için hem Langmuir hem de Freundlich izoterm modelinden elde edilen korelasyon katsayılarının 0.95'ten büyük olması her iki adsorban türünün yüzeyinde bulunan aktif adsorpsiyon bölgelerinin hem homojen hem de heterojen dağılım gösterdiğini işaret etmektedir. Langmuir izoterm modelinin uygulanmasıyla UGT ve MAT'ın maksimum R6G adsorplama kapasitesi sırasıyla 50.5 ve 31.8  $\text{mg g}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. UGT ve MAT'ın maksimum R6G adsorpsiyon kapasitesi, literatürde daha önce R6G uzaklaştırılmasında kullanılan adsorbanlarla karşılaştırılmıştır (Senturk ve ark., 2010; Ashrafi ve ark., 2017; Yang ve ark., 2017; Suwunwong ve ark., 2020; Abdullah ve ark., 2021; Salzano de Luna ve ark., 2021; Sharma ve ark., 2021; Suppaso ve ark., 2021). Çizelge 5'ten de görüldüğü gibi UGT ve MAT'ın maksimum R6G adsorpsiyon kapasitesi literatürde verilen pek çok adsorbandan daha iyidir. Langmuir izoterm sabiti olan  $b$  değerleri kullanılarak  $R_L$  değerleri hesaplanmıştır. Başlangıç R6G konsantrasyonunun 50  $\text{mg L}^{-1}$ 'den 1000  $\text{mg L}^{-1}$ 'ye artırılmasıyla UGT ve MAT için  $R_L$  değerleri sırasıyla 0.49-0.04 ve 0.27-0.02 aralığında değişim göstermiştir.  $R_L$  değerlerinin 0 ile 1 aralığında olması çalışılan şartlarda adsorpsiyon işleminin uygun olduğunu göstermektedir (Senturk ve ark., 2010). Ayrıca Freundlich izoterm modelinin uygulanmasıyla elde edilen  $n$  değerleri; R6G'nin UGT ve MAT üzerine adsorpsiyonu için sırasıyla 3.09 ve 5.53 olarak tespit edilmiştir.  $n$  değerlerinin 1-10 aralığında olması R6G'nin UGT ve MAT üzerine adsorpsiyonun uygulanması sonucunu desteklemektedir (Khasri ve Ahmad, 2018).

Temkin izoterm modeli, adsorbat molekülleri arasındaki etkileşimlerden dolayı tabakadaki bütün moleküllerin adsorpsiyon ısısının, yüzeyin kaplanmasıyla doğru orantılı olarak azalacağını ifade etmektedir (Temkin ve Pyzhev, 1940). Temkin izoterminin doğrusal şekli Eşitlik 8'de verilmiştir;

$$q_e = B (\ln A) + B (\ln C_e) \quad (8)$$

$$B = RT/b \quad (9)$$

Bu eşitlikte  $C_e$ ; dengede sulu çözeltide adsorplanmadan kalan adsorbat miktarı ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $B$ ; adsorpsiyon ısısı ile ilgili sabit ( $\text{J mol}^{-1}$ ),  $A$ ; denge bağlanma sabiti ( $\text{L g}^{-1}$ ),  $R$ ; gaz sabiti ( $\text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ ) ve  $T$ ; sıcaklığı (K) göstermektedir. Temkin izoterm modeli sabitleri,  $\ln C_e$ 'nin  $q_e$ 'ye karşı grafiğinden faydalanılarak hesaplanmış ve bu sabitler Çizelge 4'te verilmiştir.

Adsorpsiyonun fiziksel veya kimyasal özellikleri hakkında fikir edinmek için deneysel verilere D-R izoterm modeli uygulanmıştır. D-R izoterminin (Dubinin, 1989);

$$\ln q_e = \ln X_m - \beta \varepsilon^2 \quad (10)$$

eşitliği ile tanımlanır. Bu eşitlikte  $q_e$ ; adsorbanın birim ağırlığı başına tutulan adsorbat miktarı ( $\text{mol g}^{-1}$ ),  $X_m$ ; tek tabakalı adsorpsiyon kapasitesi ( $\text{mol g}^{-1}$ ),  $\beta$ ; adsorpsiyon enerjisi sabiti ( $\text{mol}^2 \text{kJ}^{-2}$ ),  $\varepsilon$ ; Polanyi potansiyeli olup değeri Eşitlik 11 yardımıyla hesaplanır.

$$\varepsilon = RT \ln(1 + 1/C_e) \quad (11)$$

Bu eşitlikte  $R$ ; gaz sabiti ( $8.314 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ ),  $C_e$ ; denge durumunda sulu çözeltide bulunan adsorbat konsantrasyonu ( $\text{mol L}^{-1}$ ),  $T$ ; sıcaklığı (K) ifade etmektedir.  $\ln q_e$ 'ye karşılık  $\varepsilon^2$  grafikleri çizilerek, D-R izoterm modeli sabitleri olan  $\beta$  ve  $q_m$  değerleri sırasıyla grafiğin eğiminden ve ordinatı kestiği noktadan hesaplanmıştır. Daha sonra  $\beta$  değerinden faydalanılarak, adsorpsiyonun kimyasal ya

da fiziksel olup olmadığına karar vermede faydalanılan, ortalama adsorpsiyon enerjisi olan  $E$  değerleri Eşitlik 12 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$E = 1/(-2\beta)^{1/2} \quad (12)$$

Adsorpsiyon mekanizmasını tahmin etmek için  $E$  değerinin büyüklüğünden faydalanılabilir.  $E$  değeri 8-16 kJ/mol arasında ise mekanizmada kimyasal iyon değişiminin baskın olduğu (Helfferich, 1962; Lin ve Juang, 2002), 8 kJ/mol'den daha küçük ise fiziksel adsorpsiyon olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca  $E$  değeri 21-38 kJ/mol değerleri arasında olduğunda adsorpsiyonun partikül difüzyonu kontrollü ve  $E$  değeri 50 kJ/mol'den daha büyük olduğunda ise kimyasal tepkime kontrollü olduğu düşünülmektedir (Boyd ve Saldano, 1953; Kıvanç, 2011). R6G'nin UGT ve MAT üzerine adsorpsiyonu için  $E$  değerleri sırasıyla 12.91 ve 18.26 kJ mol<sup>-1</sup> olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, R6G'nin UGT ve MAT üzerine adsorpsiyon mekanizmasında kimyasal iyon değişiminin etkili olabileceğini göstermektedir.

**Çizelge 4.** R6G'nin adsorpsiyon izoterm parametreleri

	UGT	MAT
<b>Langmuir izoterm modeli</b>		
$q_{\max}$ (mg g <sup>-1</sup> )	50.5	31.8
$b$ (L mg <sup>-1</sup> )	0.021	0.055
$R^2$	0.9940	0.9978
<b>Freundlich izoterm modeli</b>		
$K_f$ (mg g <sup>-1</sup> )	6.15	9.96
$n$	3.09	5.53
$R^2$	0.9778	0.9751
<b>D-R izoterm modeli</b>		
$q_m$ (mg g <sup>-1</sup> )	10.36	6.87
$\beta$ (mol <sup>2</sup> kJ <sup>-2</sup> )	-0.003	-0.0015
$E$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	12.91	18.26
$R^2$	0.9901	0.9842
<b>Temkin izoterm modeli</b>		
$A$ (L g <sup>-1</sup> )	0.56	13.06
$B$ (J mol <sup>-1</sup> )	7.91	3.43
$b$ (L mg <sup>-1</sup> )	313.2	722.3
$R^2$	0.9882	0.9743

**Çizelge 5.** Literatürdeki mevcut adsorbanların R6G adsorpsiyon kapasitelerinin karşılaştırılması

Adsorban	Ads. Kapasitesi (mg g <sup>-1</sup> )	Referans
Sığır serum albümini mikroküreleri	44.7	Sharma ve ark., 2021
Hindistan cevizi kabuğundan elde edilen nanomanyetik adsorban	32.02	Abdullah ve ark., 2021
Badem kabuğu ( <i>Prunus dulcis</i> )	32.6	Senturk ve ark., 2010
Kitosan/LTA Zeolit hibrit arojelleri	43	Salzano de Luna ve ark., 2021
Pirinç kabuğundan elde edilen Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ile kaplanmış biyokömür	9.42	Suwunwong ve ark., 2020
Manyetik ceviz kabuğu	78.53	Ashrafi ve ark., 2017
Grafen oksit (GO)/poliakrilamid (PAM) kompozit hidrojel	288	Yang ve ark., 2017
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /NiFe-LDH	97.0	Suppaso ve ark., 2021
Karaağaç talaşı	50.5	Bu çalışma
Dut talaşı	31.8	Bu çalışma

## SONUÇ

Bu çalışmada, endüstriyel atık sularda yaygın olarak bulunan, hem çevre hem de canlı sağlığı açısından toksik etkilere neden olan boyarmaddelerden R6G'nin sulardan ve atık sulardan adsorpsiyon yöntemiyle uzaklaştırılmasında adsorban olarak doğal karaağaç (UGT) ve dut (MAT) talaşının kullanılabilirliği araştırılmıştır. Adsorbanlar çeşitli yöntemler ile karakterize edildikten daha R6G'nin

giderim verimi üzerine başlangıç sulu çözelti pH'ı, denge süresi ve başlangıç R6G konsantrasyonu gibi deneysel faktörlerin etkileri incelenmiştir. Adsorpsiyon mekanizması çeşitli kinetik ve izoterm modeller uygulanarak yorumlanmıştır. UGT ve MAT üzerine adsorpsiyonunda optimum sulu çözelti pH'ı 7.0 ve denge süresi 180 dakika olarak belirlenmiştir. Adsorpsiyonun ikinci mertebeden kinetik model ile uyum sağladığı ve adsorpsiyon mekanizmasında hem film difüzyonu hem de tanecik içi difüzyonun etkili olduğu tespit edilmiştir. R6G'nin UGT ve MAT üzerine adsorpsiyonunun hem Langmuir hem de Freundlich izoterm modeline uyduğu ve dolayısıyla adsorban yüzeyindeki aktif bölgelerin hem homojen hem de heterojen dağılıma sahip olduğu görülmüştür. D-R izoterm modelinden elde edilen adsorpsiyon enerjisi ( $E$ ) değerleri dikkate alındığında, R6G'nin UGT ve MAT üzerine adsorpsiyon mekanizmasında kimyasal iyon değişiminin etkili olabileceği görülmüştür. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde doğal karaağaç ve dut talaşının R6G'nin sulardan ve atık sulardan gideriminde ucuz ve etkili adsorbanlar olarak kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır. Böylece hiçbir ekonomik değeri olmayan, atıl durumda olan ve hatta depolama sorunu oluşturan odun talaşları adsorban olarak değerlendirilmiş olup, kirleticilerin uzaklaştırılması amacıyla yüksek maliyetle hazırlanan ve bu esnada sayısız kimyasal madde kullanımı gerektiren diğer pek çok adsorbana yeni alternatifler sunulmaya çalışılmıştır.

#### Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

#### Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

#### KAYNAKLAR

- Abdullah PS, Wen LK, Awang H, Azmin SNHM, 2021. Rhodamine 6G removal from aqueous solution with coconut shell-derived nanomagnetic adsorbent composite (Cs-nmac): Isotherm and kinetic studies. *Pertanika Journal of Science and Technology*, 29(3): 1535-1556.
- Abid MF, Zablouk MA, Abid-Alameer AM, 2012. Experimental study of dye removal from industrial wastewater by membrane technologies of reverse osmosis and nanofiltration. *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 9(17).
- Ashrafi M, Chamjangali MA, Bagherian G, Goudarzi N, 2017. Application of linear and non-linear methods for modeling removal efficiency of textile dyes from aqueous solutions using magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> impregnated onto walnut shell. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 171: 268–279.
- Attademo L, Bernardini F, Garinella R, Compton MT, 2017. Environmental pollution and risk of psychotic disorders: A review of the science to date. *Schizophrenia Research*, 181: 55-59.
- Azzaz AA, Jellali S, Akrouf H, Assadi AA, Bousselmi L, 2017. Optimization of a cationic dye removal by a chemically modified agriculture by-product using response surface methodology: biomasses characterization and adsorption properties. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(11): 9831-9846.
- Bensalah H, Bekheet MF, Younssi SA, Ouammou M, Gurlo A, 2017. Removal of cationic and anionic textile dyes with Moroccan natural phosphate. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5: 2189–2199.
- Boehm HP, 1966. Chemical Identification of Surface Groups. *Advances in Catalysis*, 16: 179–274.
- Boyd GE, Soldano BA, 1953. Self-diffusion of cations in and through sulfonated polystyrene cation-exchange polymers. *Journal of American Chemical Society*, 75; 60-91.

- Chakraborty R, Verma R, Asthana A, Vidya SS, Singh AK, 2021. Adsorption of hazardous chromium (VI) ions from aqueous solutions using modified sawdust: kinetics, isotherm and thermodynamic modelling. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 101(7): 911-928.
- Chang Y.-P, Ren C.-L, Yang Q, Zhang Z.-Y, Dong L.-J, Chen X.-G, Xue D.-S, 2011. Preparation and characterization of hexadecyl functionalized magnetic silica nanoparticles and its application in Rhodamine 6G removal. *Applied Surface Science*, 257: 8610–8616.
- Dubin M, 1989. Fundamentals of theory of adsorption in micropores of carbon adsorbents: characteristics of their adsorption properties and microporous structures. *Pure and Applied Chemistry*, 61: 1841-1843.
- Duran C, Ozdes D, Gundogdu A, Imamoglu M, Senturk HB, 2011b. Tea-industry waste activated carbon, as a novel adsorbent, for separation, preconcentration and speciation of chromium. *Analytica Chimica Acta*, 688: 75–83.
- Duran C, Ozdes D, Gundogdu A, Senturk HB, 2011a. Kinetics and Isotherm Analysis of Basic Dyes Adsorption onto Almond Shell (*Prunus dulcis*) as a Low Cost Adsorbent. *Journal of Chemical Engineering Data*, 56: 2136-2147.
- El Hajam M, Idrissi Kandri N, Zerouale A, 2019. Batch adsorption of Brilliant Green dye on raw Beech sawdust: Equilibrium isotherms and kinetic studies. *Moroccan Journal of Chemistry*, 7(3): 431-435.
- Esmaceli H, Foroutan R, 2019. Adsorptive Behavior of Methylene Blue onto Sawdust of Sour Lemon, Date Palm, and Eucalyptus as Agricultural Wastes. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 40 (7): 990–999.
- Feng Q, Gao B, Yue Q, Guo K, 2021. Flocculation performance of papermaking sludge-based flocculants in different dye wastewater treatment: Comparison with commercial lignin and coagulants. *Chemosphere*, 262: 128416.
- Freundlich HMF, 1906. Über die adsorption in lösungen. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 57: 385-470.
- Gad YH, Nasef SM, 2021. Radiation synthesis of graphene oxide/composite hydrogels and their ability for potential dye adsorption from wastewater. *Journal of Applied Polymer Science*, 138(41): 51220.
- Hall KR, Eagleton LC, Acrivos A, Vermeulen T, 1966. Pore- and Solid-Diffusion Kinetics in Fixed-Bed Adsorption Under Constant-Pattern Conditions. *Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals*, 5: 212–223.
- Haroon M, Wang L, Yu H, Ullah RS, Abdin Z.-ul, Khan RU, Chen Q, Liu J, 2018. Synthesis of carboxymethyl starch-g polyvinylpyrrolidones and their properties for the adsorption of Rhodamine 6G and ammonia. *Carbohydrate Polymers*, 186: 150–158.
- Helferich F, 1962. *Ion-Exchange*, McGraw-Hill, New York, 260-262.
- Ho YS, McKay G, 1999. Pseudo-Second Order Model for Sorption Processes. *Process Biochemistry*, 34: 451-465.
- Januário EFD, Vidovix TB, Bergamasco R, Vieira AMS, 2021. Performance of a hybrid coagulation/flocculation process followed by modified microfiltration membranes for the removal of solophenyl blue dye. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 168: 108577.
- Khasri A, Ahmad MA, 2018. Adsorption of basic and reactive dyes from aqueous solution onto Intsia bijuga sawdust-based activated carbon: batch and column study. *Environmental Science and Pollution Research*, 25: 31508–31519.

- Kıvanç B, 2011. Adsorpsiyon ve İyon Değişimi Yöntemi İle Sulu Çözeltilerden Fosfat Gideriminin İncelenmesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış).
- Lagergren, S, 1898. About the theory of so-called adsorption of soluble substance. Kung Sven. Vetén. Hand., 24: 1-39.
- Langmuir I, 1918. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. Journal of the American Chemical Society, 40: 1361–1403.
- Li R, Liu L, Yang F, 2013. Preparation of polyaniline/reduced graphene oxide nanocomposite and its application in adsorption of aqueous Hg(II). Chemical Engineering Journal, 229: 460–468.
- Lin SH, Juang RS, 2002. Heavy metal removal from water by sorption using surfactant-modified montmorillonite. The Journal of Hazardous Materials, 92: 315–326.
- Noh JS, Schwarz JA, 1989. Estimation of the Point of Zero Charge of Simple Oxides by Mass Titration. Journal of Colloid Interface Science, 130: 157–64.
- Ozdes D, Duran C, Senturk HB, Avan H, Bicer B, 2014. Kinetics, Thermodynamics and Equilibrium Evaluation of Adsorptive Removal of Methylene Blue onto Natural Illitic Clay Mineral. Desalination and Water Treatment, 52: 208–218.
- Rafiq A, Ikram M, Ali S, Niaz F, Khan M, Khan Q, Maqbool M, 2021. Photocatalytic degradation of dyes using semiconductor photocatalysts to clean industrial water pollution. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 97: 111-128.
- Ratnamala GM, Deshannavar UB, Munyal S, Tashildar K, Patil S, Shinde A, 2016. Adsorption of Reactive Blue Dye from Aqueous Solutions Using Sawdust as Adsorbent: Optimization, Kinetic, and Equilibrium Studies. Arabian Journal for Science and Engineering, 41: 333–344.
- Reis C, 2019. Rodamin 6G Boyarmaddesinin Karaağaç (*Ulmus glabra*) ve Dut (*Morus alba*) Talaşı Üzerine Adsorpsiyonla Atık Sulardan Uzaklaştırılması, Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış).
- Salzano de Luna M, Greco F, Pastore R, Mensitieri G, Filippone G, Aprea P, Mallamace D, Mallamace F, Chen S.-H, 2021. Tailoring Chitosan/LTA Zeolite Hybrid Aerogels for Anionic and Cationic Dye Adsorption. International Journal of Molecular Sciences, 22: 5535.
- Sangon S, Hunt AJ, Ngernyen Y, Youngme S, Supanchaiyamat N, 2021. Rice straw-derived highly mesoporous carbon-zinc oxide nanocomposites as high performance photocatalytic adsorbents for toxic dyes. Journal of Cleaner Production, 318: 128583.
- Senturk HB, Ozdes D, Duran C, 2010. Biosorption of Rhodamine 6G from aqueous solutions onto almond Shell (*Prunus dulcis*) as a low cost biosorbent. Desalination, 252: 81–87.
- Sharma K, Sadhanala HK, Mastai Y, Porat Z, Gedanken A, 2021. Sonochemically Prepared BSA Microspheres as Adsorbents for the Removal of Organic Pollutants from Water. Langmuir, 37(32): 9927-9938.
- Suppaso C, Pongkan N, Intachai S, Ogawa M, Khaorapapong N, 2021. Magnetically recoverable  $\beta$ -Ni(OH)<sub>2</sub>/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/NiFe-LDH composites; isotherm, thermodynamic and kinetic studies of synthetic dye adsorption and photocatalytic activity. Applied Clay Science, 213: 106115.
- Suwunwong T, Patho P, Choto P, Phoungthong K, 2020. Enhancement the rhodamine 6G adsorption property on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-composited biochar derived from rice husk. Materials Research Express, 7(2): 025511.
- Şentürk İ, Yıldız MR, 2020a. Highly efficient removal from aqueous solution by adsorption of Maxilon Red GRL dye using activated pine sawdust. Korean Journal of Chemical Engineering, 37(6): 985-999.



- Şentürk İ, Yıldız MR, 2020b. Doğal ve Aktive Edilen Çam Talaşı ile Sucul Çözeltilerden Adsorpsiyonla Bazik Sarı 28 Giderimi. Niğde Ömer Halisdemir University Journal of Engineering Sciences, 9(2): 746-759.
- Temkin MJ, Pyzhev V, 1940. Recent modifications to Langmuir isotherms, Acta Physicochimica USSR, 12: 217-222.
- Theamwong N, Intarabumrung W, Sangon S, Aintharabunya S, Ngernyen Y, Hunt AJ, Supanchaiyamat N, 2021. Activated carbons from waste Cassia bakeriana seed pods as high-performance adsorbents for toxic anionic dye and ciprofloxacin antibiotic remediation. Bioresource Technology, 341: 125832.
- Wang H, Yuan X, Wu Z, Leng L, Zeng G, 2014. Removal of Basic Dye from Aqueous Solution using *Cinnamomum camphora* Sawdust: Kinetics, Isotherms, Thermodynamics, and Mass-Transfer Processes. Separation Science and Technology (Philadelphia), 49(17): 2689-2699.
- Weber Jr WJ, Morriss JC, 1963. Kinetics of adsorption on carbon from solution. Journal of the Sanitary Engineering Division, 89: 31–60.
- Wei S, Kamali AR, 2021. Waste plastic derived  $\text{Co}_3\text{Fe}_7/\text{CoFe}_2\text{O}_4$ @carbon magnetic nanostructures for efficient dye adsorption. Journal of Alloys and Compounds, 886: 161201.
- Yang M, Liu X, Qi Y, Sun W, Men Y, 2017. Preparation of  $\kappa$ -carrageenan/graphene oxide gel beads and their efficient adsorption for methylene blue. Journal of Colloid and Interface Science, 506: 669-677.

**Atf İçin:** Gönül İ, 2022. Sülfonat Grubu İçeren Schiff Bazı Ligandı ve Geçiş Metal Kompleksleri: Sentezi, Yapısal Karakterizasyonları ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(2): 352-364.

**To Cite:** Gönül I, 2022. Sulfonate Group Containing Schiff Base Ligand and Their Transition Metal Complexes: Synthesis, Structural Characterization and Antimicrobial Activity Studies. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(2): 352-364.

### Sülfonat Grubu İçeren Schiff Bazı Ligandı ve Geçiş Metal Kompleksleri: Sentezi, Yapısal Karakterizasyonları ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi

İlyas GÖNÜL<sup>1\*</sup>

**ÖZET:** Bu çalışmada, molekül yapısında primer diamin ve disülfonik asit grubu bulunduran 4,4'-Diamino-2,2'-stilbendisülfonik asit bileşiği ile 2,4-dihidroksi benzaldehit kullanılarak kararlı kompleksler oluşturabilen H<sub>4</sub>L Schiff bazı ligandı sentezlenmiştir. H<sub>4</sub>L ligandının Cu(II), Zn(II) ve Cd(II) kompleks bileşikleri sentezlenmiştir. Elde edilen bileşiklerin molekül yapıları analitik ve spektroskopik yöntemler kullanılarak karakterize edilmiştir. Tüm bileşiklerin gram pozitif (5), gram negatif (6) ve probiyotik bakterileri (2) kullanılarak antimikrobiyal aktiviteleri ve antifungal aktivite (MIC, MBC) çalışmaları yapılmıştır. Bileşiklerin 500, 250, 62.5, 31.2, 15.63 ve 7.81 µg/mL konsantrasyonlarda indikatör bakterileri üzerine MIC değerleri, H<sub>4</sub>L için 250 mg/mL, [Cu<sub>2</sub>H<sub>2</sub>L(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] için 31.5 mg/mL, [Cd<sub>2</sub>H<sub>2</sub>LC<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] için 62.5 mg/mL, [Zn<sub>2</sub>H<sub>2</sub>L(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] için 125 mg/mL olarak komplekslerin ligandtan daha etkili olduğu belirlenmiştir. MBC testinde 500-250 mg/mL konsantrasyonlarında bakterisid etki belirlenmiştir. Agar kuyu difüzyon testinde ise bileşikler sadece 500 mg/ml'de test edilmiş ve farklı inhibisyon çapları belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kompleks bileşikler, antimikrobiyal aktivite, gram pozitif

#### Sulfonate Group Containing Schiff Base Ligand and Their Transition Metal Complexes: Synthesis, Structural Characterization and Antimicrobial Activity Studies

**ABSTRACT:** In this study, H<sub>4</sub>L Schiff base ligand which can form stable complexes with 4,4'-Diamino-2,2'-stilbenedisulfonic acid compound having primary diamine and disulfonic acid group in its molecular structure was synthesized. Cu(II), Zn(II) and Cd(II) complex compounds of the H<sub>4</sub>L ligand were synthesized. Molecular structures of the compounds obtained were characterized using analytical and spectroscopic methods. Gram positive(5), gram negative(6), probiotic bacteria(2) antimicrobial and antifungal activities (MIC, MBC) of all compounds were studied. MIC values of the compounds on indicator bacteria at concentrations of 500, 250, 62.5, 31.2, 15.63 and 7.81 µg/mL, 250 mg/mL for H<sub>4</sub>L, 31.5 mg/mL for [Cu<sub>2</sub>H<sub>2</sub>L(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>], 62.5 mg/mL for [Cd<sub>2</sub>H<sub>2</sub>LC<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] and 125 mg/mL for [Zn<sub>2</sub>H<sub>2</sub>L(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>], the complexes were determined to be more effective than the ligand. Bactericidal effects were determined in the MBC test at concentrations of 500-250 mg/mL. In the agar well diffusion test, the compounds were tested only at 500 mg/ml and different inhibition diameters were determined.

**Keywords:** Complex compounds, antimicrobial activity, gram positive

<sup>1</sup>İlyas GÖNÜL (Orcid ID: 0000-0002-7697-3613) Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 01330, Adana, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: İlyas GÖNÜL, e-mail: ilyasgonul01@gmail.com

## GİRİŞ

4,4'-dinitro-2,2'-stilbendisülfonik asidin demir tozu ile indirgenmesi ile elde edilebilen 4,4'-diamino-2,2'-stilbendisülfonik asit, yapısal olarak, iki fenil halkasının her birinde amino ve sülfonik asit fonksiyonel grupları içeren bir trans- stilben türevi bir organik bileşiktir. Bu Stilben molekülleri genellikle azo boyaları, optik parlaticı, ağartıcılar, fosforlar ve bazı pH göstergelerinin ana maddelerini oluştururlar. Ayrıca birçok sıvı kristal malzemede rijit kısım (mezojen) olarak kullanılabilir (Salas ve ark., 2019).

Sülfonik asit ve tuzlarının organik boyalardaki kullanımını boyanın kumaşa daha sıkı bağlanma ve suda daha iyi çözünürlük gibi özellikler kazanmasına yolaçmaktadır. Sodyum hidroksit ve karbonatlar gibi bazik sülfonatlar, organik sentezde, bazı biyolojik olarak aktif bileşiklerde, sülfon ilaçlarında, katyon değişim reçinelerinde ve özellikle deterjan endüstrisinde yaygın olarak kullanılırlar (Wan ve ark., 2017).

Önemli organik bileşikler sınıfına mensup olan Schiff bazları, konvensiyonel yöntemlerle kolay bir şekilde sentezlene bilmektedir. Primer aminler ve aldehitlerin (ketonlar) kondenzasyon reaksiyonu sonucu ortamdaki su çıkışı ile oluşan yeni azometin bağına sahip organik bileşikler Schiff bazı bileşikleri olarak adlandırılmaktadır. Kolay sentezlenmesi ve yüksek verimle elde edilebilmelerinden dolayı bu bileşiklere ayrıcalıklı ligandlar denilmektedir. Yeni oluşturulan bileşiklerin yapılarında bulunan fonksiyonel grupların farklılaşması, Schiff bazlarının çok farklı uygulama alanlarında kullanılmasına imkan sağlamaktadır. Sülfonik asit ve karboksilik asit gibi grupların sodyumlanması sonucu oluşturulan sodyum sülfonat ve karboksilat grupları gibi tuz yapılarını bulduran schiff bazı bileşikleri yepyeni suda çözünebilen özellik kazanabilmektedir (Bharti ve ark., 2018). Azot, oksijen ve kükürt gibi elektron verici gruplar bulduran bileşikler metal iyonları ile koordine kovalent bağlar kurarak kararlı ve yeni kimyasal özelliklerde kompleks bileşikler oluşturarak antimikrobiyal, antioksidan ve antienflamatuvar denemelerinde kullanılabilirleri bilim insanlarının ilgisini çekmektedir (Li ve ark., 2018).

Antibiyotikler, bazı mikropların (bakteriler ve bazı parazitler) neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek amacıyla kullanılan bir grup ilaçtır. Bu ilaçlar 1800'lerin sonunda ilk olarak çalışılmaya başlanmış ve penisilin 1900'lerin başında uygulanması ile enfeksiyonu iyileştirebilme yetenekleri anlaşılmıştır. Ayrıca Bakteriler, maya ve küfler, önemli sayıda gıda ve gıda ürününün bozulmasından sorumlu olan yaygın mikroorganizma türleridir (Gonelimali ve ark., 2018).

Antimikrobiyal ajanlar olarak bilinen antibiyotikler, bulaşıcı hastalıkların küresel etkisinin azaltılmasında çok önemlidir. Bununla birlikte, patojenik bakterilerde çoklu ilaca dirençli suşun ortaya çıkması ve yayılması, mevcut antimikrobiyal ajanların patojenik bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı çok daha az etkili olduğu veya bazen hiç olmadığı için önemli bir halk sağlığı tehdidi haline gelmektedir.

Bu nedenle, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan bilinen antimikrobiyal ajanlara karşı patojenik bakterilerin hızlı ve yaygın olarak direnç gösterebildiğine dair net bulguların olması yeni antimikrobiyal ajanların bulunmasına olan ihtiyacı büyük ölçüde arttırmıştır (Rice ve ark., 2006).

Bu çalışmada kapsamında iminbağı içeren H<sub>4</sub>L Schiff Bazı ligandı ve metal komplekslerinin sentez yapılmış ve yapısal karakterizasyonları analitik ve spektroskopik teknikler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm bileşiklerin gram pozitif (5), Gram negatif (6), probiyotik bakterileri (2) antimikrobiyal aktiviteleri ve antifungal aktivite (MIC, MBC) çalışmaları yapılmıştır. Bileşiklerin 500 ve 250 62.5, 31.2, 15.63, 7.81 µg/mL konsantrasyonlarda indikatör bakterileri üzerine MIC değerleri ve MBC testinde 500-250 mg/mL konsantrasyonlarında bakterisid etki gösterdiği belirlenmiştir. Agar

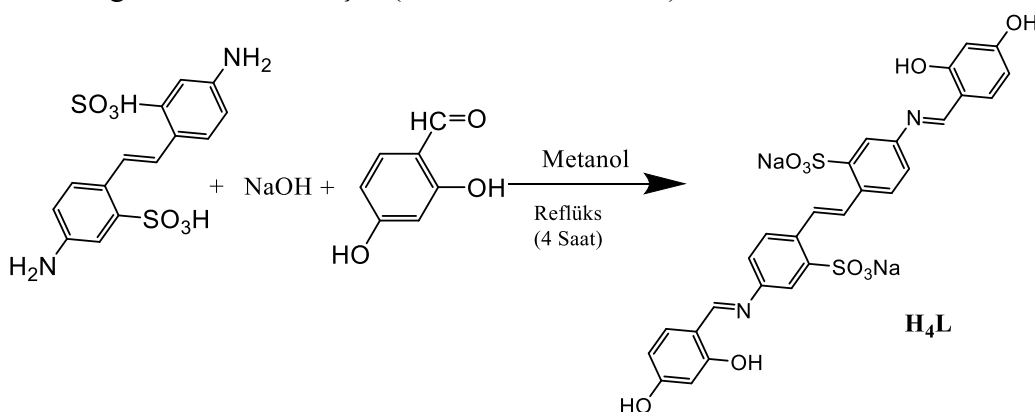
kuyu difüzyon testinde ise bileşikler sadece 500 mg/ml'de test edilmiş, *Salm. poona* ve *S. Paratyphi A* (10.55-20.90 ve 11.44-19.36 mm), *Aeromonas* üzerine ligand hariç (8.12-18-52 mm), *Pseudomonas* (7.14, 15.89 mm), *Campliobacter* (14.30 ile 20.89 mm), *Candida albicans* (7.12 mm), *Bacillus* üzerine ligand ve  $[Cu_2H_2L(CH_3COO)_2(H_2O)_2]$  kompleksi hariç 18.23, 12.09 mm, MRSA üzerine 7.34 ile 26.12 mm inhibisyon çapında kompleksler daha etkili olmuştur.

## MATERYAL VE METOT

Çözücülerin tamamı ticari olarak satın alınmıştır. İmin bağı içeren ligand ve kompleks bileşiklerin sentezinde kullanılan 4,4'-Diamino-2,2'-stilbendisülfonik asit, 2,4-hidroksi benzaldehit  $Cu(CH_3COO)_2$ ,  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  ve  $CdCl_2$  bileşikleri Sigma Aldrich firmasından tedarik edilmiştir. Bileşiklerin İnfredspektrumları, Perkin-Elmer RX-1 FT-IR spektrometre cihazı (KBr disk;  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ) kullanılarak kaydedilmiştir. Matris destekli lazer desorpsiyon / iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF-MS) ölçümleri bir Bruker Daltonics MicrOTOF kullanılarak kütle analizleri gerçekleştirilmiştir. DMSO- $d_6$  çözücüsü kullanılarak elde edilen  $^1H$ -,  $^{13}C$ -NMR analiz spektrumları Bruker 600 MHz cihazı ile kaydedilmiştir. ThermoScientific Flash 2000, CHNS Elementel Analiz cihazı ve Sherwood MK-1(Kalibrasyon sabiti (C)  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) Manyetik süseptibilite cihazı kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

### H<sub>4</sub>L Bileşiğinin Sentezi:

H<sub>4</sub>L Schiff bazı ligandının sentezlenmesi için Sodyum hidroksitten (0.08 g, 2 mmol) tartılarak 45 mL metanol çözücüsüne eklenmiştir. Bu karışım içerisine 4,4'-Diamino-2,2'-stilbendisülfonik asit (0.3704g, 1mmol)) tartılıp çözülmesi sodyum tuzu haline dönüşüp çözünmesi için ısıtılarak karıştırılmıştır. Ve çözünme tamamen sağlandıktan sonra çözelti üzerine 30 mL metanolde çözülmüş 2,4-dihidroksi benzaldehit'in (0.152 g, 1mmol) çözeltisinden damla damla eklenmiştir. Bu kondenzasyon reaksiyonu 4 saat reflüks ettirilerek devam ettirilmiştir. Reaksiyon başladıktan 1 saat sonra oluşan çökelti tamamlandıktan sonra süzümüştür. Safsızlıklardan arındırılmak için süzülen çökelti hegzan ve soğuk metanol ile yıkanmıştır. Su, DMSO ve THF'de çözünebilir koyu kırmızı renkte schiff bazı ligandı sentezlenmiştir (Atahan ve ark., 2015).



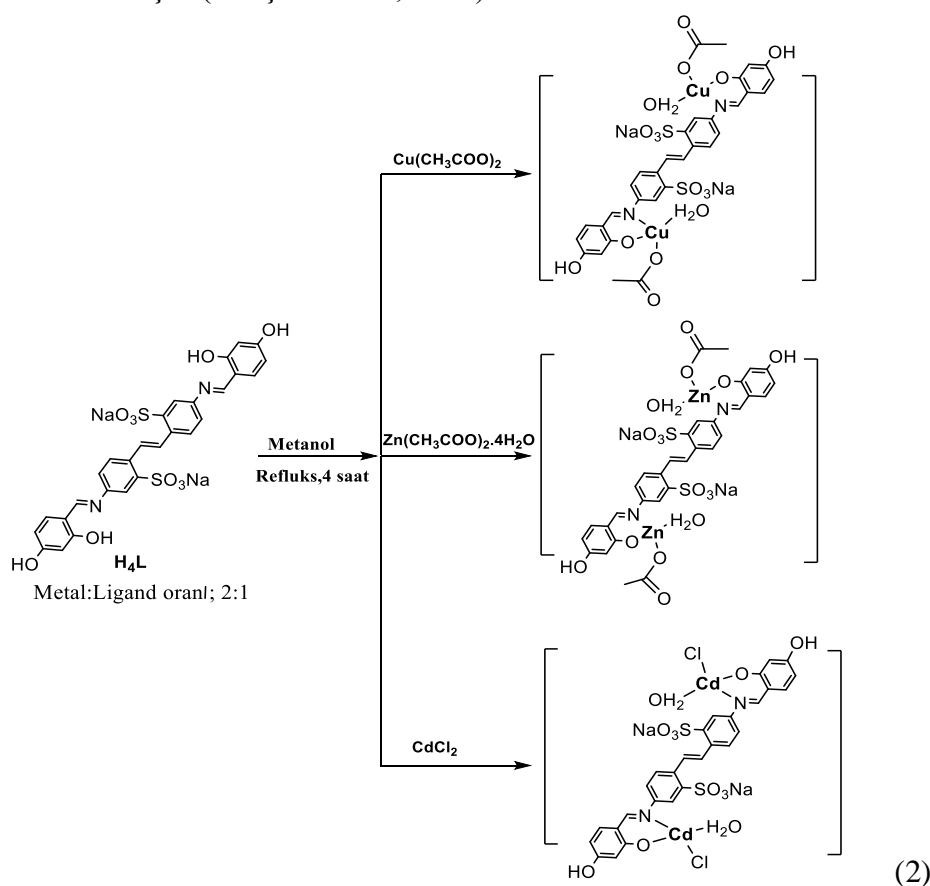
Şekil 1. H<sub>4</sub>L Schiff bazı ligandının oluşum reaksiyonu

**H<sub>4</sub>L:** Verim: %89, renk: koyu kırmızı, E.N.:>300 °C; M<sub>A</sub>:  $654,57\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; C<sub>28</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub> ligandının elementel ve ICP-OES analizlerinin teorik sonucu(%):C, 51.38; H, 3.08; N, 4.28; S, 9.80;Na, 7.02; Deneysel (%):C, 51.07; H, 2.87; N, 4.03; S, 9.53; Na, 6.84; FT-IR( $\text{cm}^{-1}$ ): 3362 (O-H), 1618 (C=N), 1251-1173(SO<sub>2</sub>).<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO<sub>4</sub>- $d_6$ )  $\sigma$  ppm: 13.65 (s, 1H) 10.34 (s, 1H); 8.89 (s, 1H); 8.20 (s, 1H); 7.804 (s, 1H); 7.76 (d,  $J=8.80$  Hz, 1H); 7.53 (d,  $J=8.40$  Hz, 1H); 7.45 (d,  $J=8.00$  Hz, 1H); 6.45 (d,  $J=8.80$  Hz, 1H); 6.36(s, 1H). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO<sub>4</sub>- $d_6$ )  $\sigma$  ppm:

163.20; 162.57; 161.77; 146.60; 145.93; 134.45; 133.11; 127.07; 126.64; 121.27; 119.85; 112.20; 107.99; 102.45.

### Kompleks Bileşiklerin Sentezi

H<sub>4</sub>L ligandı (0.655g, 1mmol) tartılarak balon içerisine aktarılmış ve 40 mL metanolde ısıtılarak çözülmüştür. Ligandın tamamı çözüldükten sonra [Cu<sub>2</sub>L(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] kompleksini sentezlemek için Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> (0.364 g, 2 mmol), [Zn<sub>2</sub>L(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] kompleksini sentezlemek için Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0.440 g, 2 mmol) ve [Cd<sub>2</sub>LCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] kompleksini sentezlemek için ise CdCl<sub>2</sub> (0.367 g, 2 mmol) metal tuzları tartılarak karıştırma devam ederken eklenmiştir. Elde edilen karışım geri soğutucu altında karıştırılarak 3 saat reflüks edilmiştir. Reaksiyon karışımı 3 saat sonunda oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Sentezlenen ürünü kalıntılardan temizlemek için soğuk metanol ve hegzan kullanılarak iyice yıkanmıştır. Analitik ve spektroskopik metodlar kullanılarak moleküler yapıları karakterize edilmiştir (Tunçel ve ark., 2003).



Şekil 2. H<sub>4</sub>L Schiff bazı Ligandının Metal Kompleks Sentez Reaksiyonu

[Cu<sub>2</sub>H<sub>2</sub>L(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]: Verim: %85, renk: yeşil, E.N.: >350 °C, Manyetik moment: 1.76 B.M.; M<sub>A</sub>: 933.93 g.mol<sup>-1</sup>; C<sub>32</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>Cu<sub>2</sub>O<sub>16</sub>S<sub>2</sub> molekülü'nün teorik elementel ve ICP-OES sonucu(%):C, 41.16; H, 3.02; N, 3.00; S, 6.87; Na, 4.92; Cu, 13.61; Deneysel (%):C, 40.94; H, 2.98; N, 3.14; S, 6.52; Na, 4.67; Cu, 13.26.

[Zn<sub>2</sub>H<sub>2</sub>L(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]: Verim: %78, renk: açık turuncu, E.N.: >350 °C, Manyetik moment: diamanyetik; M<sub>A</sub>: 937.43 g.mol<sup>-1</sup>; C<sub>32</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>O<sub>16</sub>S<sub>2</sub> molekülü'nün teorik elementel ve ICP-OES sonucu(%): C, 41.00; H, 3.01; N, 2.99; S, 6.84; Na, 4.90; Zn, 13.95; Deneysel (%):C, 39.88; H, 2.71; N, 2.75; S, 6.53; Na, 5.22; Zn, 13.69.

[Cd<sub>2</sub>H<sub>2</sub>LCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]: Verim: %91, renk: koyu turuncu, E.N.:>350 °C, Manyetik moment: diamanyetik; M<sub>A</sub>: 984.31 g.mol<sup>-1</sup>; C<sub>28</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>Cd<sub>2</sub>O<sub>12</sub>S<sub>2</sub> molekülü'nün teorik elementel ve ICP-OES sonucu(%): C, 34.17; H, 2.25; N, 2.85; S, 6.51; Na, 4.67; Cd, 22.84; Deneysel (%):C, 33.95; H, 2.08; N, 2.52; S, 6.23;Na, 4.35; Cd, 22.45.

### Ligand ve Komplekslerinin Antimikrobiyal Etkisinin Tespiti

Sentezlenen bileşiklerin 5 gram pozitif (*Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactia*, *S. aureus*, MRSA (Metisilin resist. *S. aureus Bacillus subtilis*), 6 (Gram negatif (*Aeromonas hidrofilia*, *Salmonella Paratyphi A*, *Campylobacter jejuni*, *E.coli*, *Salmonella poona*, *Acinetobacter boomanii*, *Klebsiella pneumoniae*) ve laktik asit bakterileri (*Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus plantarum* ve fungi olarak *Candida albicans* üzerine antimikrobiyal aktivite çalışmaları yapılmıştır. Testte, indikatör bakterilerin üzerine sentez bileşiklerin 500 ve 250 62.5, 31.2, 15.63, 7.81 µg/mL konsantrasyonları çalışılmıştır (Saranya ve ark., 2020).

### Kuyu Difüzyon Testi

H<sub>4</sub>L Schiff bazı ligandı ve metal komplekslerinin antimikrobiyal aktiviteleri, Muller Hinton agar ile kuyu difüzyon metodu kullanılarak analiz edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite için saf su içerisinde bileşiklerin maksimum çözünürlük miktarlarında çözülerek konsantrasyonları 1000 µg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Tetrasiklin referans antibakteriyel madde olarak kullanılmıştır. Aytar ve ark., 2019 optimizasyon çalışmaları modifiye edilerek her bir indikatör bakteri ile aşılansız Muller Hinton agarlı petri kaplara açılan kuyucuklara her bir kimyasal bileşik 100 µL aktarılmış ve 18 saat 37 °C'de bakterilerin optimum sıcaklıklarında inkübe edilmiştir (Aytar ve ark., 2019). İnkübasyon sonunda kuyucuk etrafında oluşan zon çapları dijital kumpas yardımıyla mm cinsinden ölçülmüştür (Al-Qadisy ve ark., 2020).

### 2.3.2. Mikro Broth Dilüsyon Testi (MIC ve MBC)

96 oyuklu bir plaka, 150 µL çift kuvvetli Mueller Hinton Broth (MHB) ve Çift kuvvetli ligand solüsyonu ile dilüsyonlarının her biri ile (1:1 v/v), 30 µL organizma süspansiyonu karıştırılır ve 35 °C'de 18-24 saat inkübe edilir. En düşük büyüme inhibisyonunu gösteren konsantrasyon, organizmanın MIC'si olarak kabul edilecektir. MIC, büyümeyi inhibe eden en yüksek seyreltme (tüpteki bulanıklık max düşük olduğu) olarak ifade edilir. Bu MIC dilüsyonlarından besiyerinde 99%> cansız hücre tespiti pozitif olanlar MBC olarak değerlendirilir (Lalitha ve ark., 2009).

96 kuyucuklu plate içerisinde MHB besi ortamında ve sentezlenen bileşikler eklenerek 600 nm dalga boyunda UV Spektrofotometresi yardımı ile 0., 3. ve 18. saat aralığında absorbans değişimleri kaydedilmiştir. İndikatör kültürler, bir gece aşılama sonucu elde edilen taze kültür yaklaşık 10<sup>6</sup> koloni/mL oluşturacak şekilde 0.5 McFarlanda standart steril fizyolojik su çözeltisi ile seyreltilmiştir. Gram negatif, gram pozitif, probiyotik bakteriler ve bir adet fungus (mantar) olmak üzere toplam 16 adet indikatör bakterilere karşı test edilmiştir. Bileşik çözeltileri, distile su içinde 1000 µg/mL konsantrasyonları hazırlanmıştır. Bileşiklerin, 96 kuyucuklu bir plate içerisinde 2 kat seyreltme işlemleri 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81 µg/mL konsantrasyon değerlerinde seyreltilerek hazırlanmıştır. Test sonuçları şeffaf kuyucuktaki konsantrasyon değerleri MIC olarak değerlendirilmiş ve agarlı plate de canlı hücre varlığı testi ile MBC tespiti yapılmıştır.

### BULGULAR VE TARTIŞMA

Schiff Bazı ligandı ve komplekslerinin karbon (C), hidrojen (H), kükürt (S), azot (N) yüzde bileşenlerini belirlemek için elementel analiz ve metal (Cu,Zn,Cd) bileşenlerinin deneysel değerlerini

belirleyebilmek için ICP-OES cihazları kullanılarak belirlenmiştir. Deneysel ve teorik tüm sonuçlar sentez bölümünde görülmektedir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde moleküllerin önerilen molekül yapılarının deneysel ve teorik bulgular ile uyum içerisinde olduğu belirlenmiştir.

H<sub>4</sub>L ligandının kompleks bileşiklerinin magnetik duyarlılık sonuçları molekülün yapısına ilişkin bilgiler verebilmektedir. Elde edilen bakır kompleksinin 1.76 BM olarak belirlenen  $\mu_{eff}$  değeri kompleksin paramagnetik olduğunu göstermiştir. Bu değer göz önüne alınarak hesaplandığında 1 tane eşleşmemiş elektronu olduğu belirlenmiştir. Belirlenen verilere göre hibrit yapısının  $sp^3$  ya da  $dsp^2$  (dörtüzlü veya kare düzlem) yapılarından her ikisinin de tercih edebileceği anlaşılmıştır. Çinko ve Kadmiyum komplekslerinin deneysel olarak manyetik duyarlılık analizi yapılmıştır. Bu komplekslerin diamagnetik olduğu ve teorik verilerle de uyum içinde olduğu görülmüştür. Tüm Komplekslerin diğer analiz verileri değerlendirildiğinde 4 koordinasyonlu kompleksler üretilmiştir. Ayrıca Cu(II) kompleksinin  $dsp^2$  hibriti yaparak kare düzlem olduğu ve diğer Zn(II), Cd(II) komplekslerinin  $sp^3$  hibriti yaparak düzgün dört yüzlü geometriye sahip olduğu düşünülmektedir (Hossain ve ark., 2018).

### Sentezlenen Bileşiklerin FT-IR Spektrum Bulgularının Değerlendirilmesi

H<sub>4</sub>L imin bağı içeren ligandın karakteristik FT-IR spektrumu incelendiğinde  $-C=N$  gerilme titreşimleri  $1618\text{ cm}^{-1}$ 'de kuvvetli bir pik olarak görülmektedir.  $3362\text{ cm}^{-1}$  ve  $1251-1173\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen pikler ise H<sub>4</sub>L ligandının yapısında bulunan Ar-OH ve  $-SO_2$  gruplarının varlığını göstermektedir.

Aynı periyod ve aynı grupta bulunan Cu(II), Zn(II) ve Cd(II) metal iyonları kullanılarak elde edilen komplekslerin FT-IR spektrumları incelendiğinde azometin bağında bulunan azot üzerinden metal iyonuna koordine olduğu  $-C=N-$  piklerinin yerlerinde gözlenen kaymalardan net bir şekilde anlaşılmaktadır. Sentezlenen komplekslerin  $3381-3250-3368\text{ cm}^{-1}$ 'deki pikler koordinasyon küresinin içerisindeki H<sub>2</sub>O molekülü ve ligantta koordine olmayan fenolik  $-OH$ 'dan kaynaklandığı düşünülmektedir. Cu(II) ve Zn(II) komplekslerinin FT-IR spektrumları incelendiğinde  $1737-1738\text{ cm}^{-1}$ 'de ortaya çıkan piklerin yapıda düşünülen asetat( $CH_3COO^-$ ) grubunun metallere koordine olduğunu ve önerilen yapılar ile uyum içerisinde olduğunu desteklemektedir. Kompleks bileşiklerin FT-IR spektrumlarında ortaya çıkan N-M bağının sahip olduğu pikler  $620-628\text{ cm}^{-1}$  aralığında ve M-O bağının sahip olduğu pikler ise  $453-535\text{ cm}^{-1}$  aralığında görülmektedir (Shaikha ve ark., 2016). Ligant ve kompleks bileşiklerinin FT-IR spektrumları Çizelge 1'de görülmektedir.

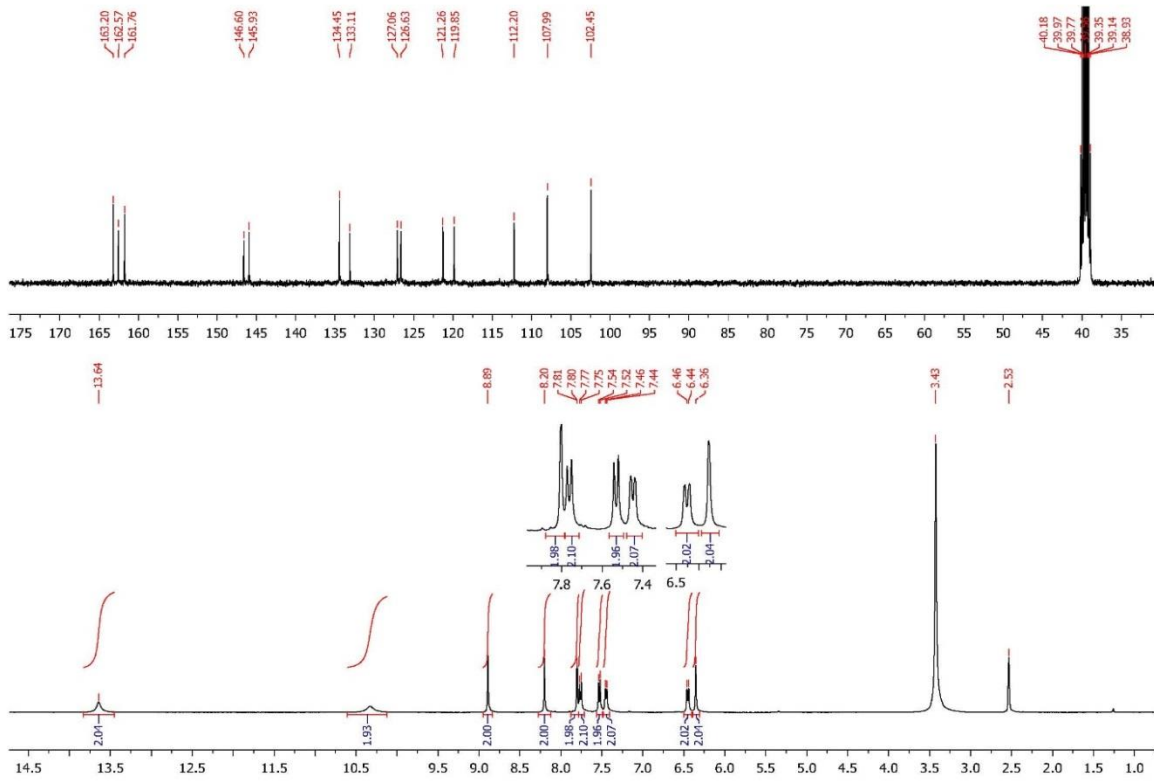
Çizelge 1. Schiff bazı ve metal komplekslerinin FT-IR Spektrumlarının Değerlendirilmesi

Bileşikler	(OH)	(>C=O)	(C=N)	(SO <sub>2</sub> )	(M-N)	(M-O)
H <sub>4</sub> L	3362	-	1618	1251-1173	-	-
[Cu <sub>2</sub> H <sub>2</sub> L(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	3381	1737	1611	1232-1184	620	568
[Zn <sub>2</sub> H <sub>2</sub> L(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	3250	1738	1613	1302-1172	626	566
[Cd <sub>2</sub> H <sub>2</sub> LCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	3368	-	1619	1301-1164	628	566

### H<sub>4</sub>L Ligandının <sup>1</sup>H- ve <sup>13</sup>C-NMR Bulgularının Değerlendirilmesi

H<sub>4</sub>L bileşiğinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu değerlendirildiğinde molekül yapısında bulunan Ar-OH grubu protonlarından kaynaklı  $13.65\text{ ppm}$ 'de 1H singlet (s,Ar-OH) ve  $10.34\text{ ppm}$ 'deki 1H singlet (s,Ar-OH) sinyalleri görülmektedir. Sentezlenen H<sub>4</sub>L bileşiğini oluşturan karakteristik imin bağına ait  $8.89\text{ ppm}$ 'de 1H singlet (s,CH=N) protonundan kaynaklı sinyal görülmektedir. Yapıda bulunan ( $-CH=CH-$ ) protonundan kaynaklı  $8.89\text{ ppm}$ 'de 1H singlet sinyali görülmektedir. Ayrıca aromatik (Ar-

H) protonlara ait görülen sinyaller ise 7.804-6.360 ppm aralığında olduğu belirlenmiştir. H<sub>4</sub>L schiff bazı ligandının <sup>1</sup>H- ve <sup>13</sup>C-NMR spektrumları Şekil 3’de görülmektedir.



Şekil 3. H<sub>4</sub>L Schiff bazı ligandının DMSO çözücüsünde <sup>1</sup>H- ve <sup>13</sup>C-NMR Spektrumları

### Sentezlenen Bileşiklerin Kütle Analiz Spektrum Bulgularının Değerlendirilmesi

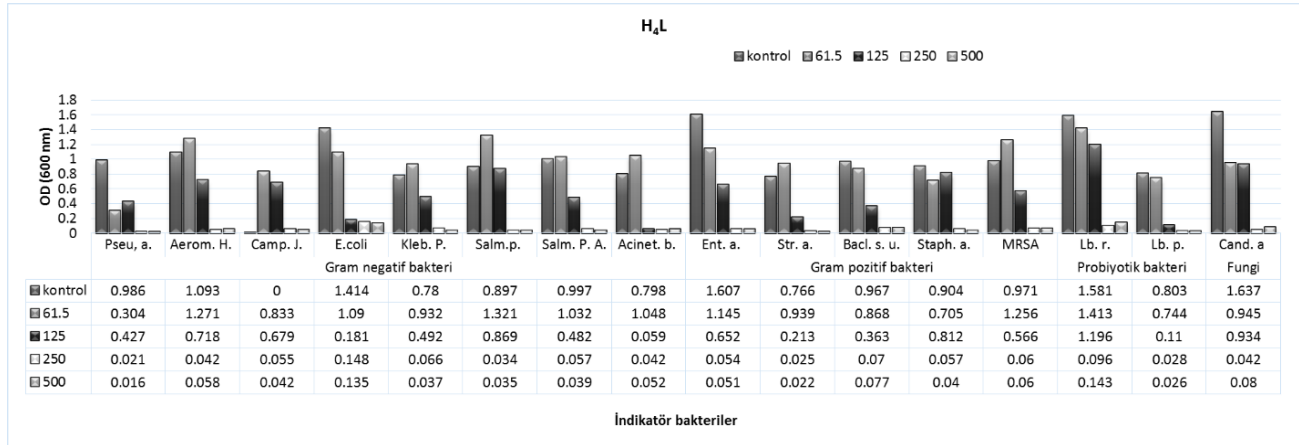
H<sub>4</sub>L ligandı ve tüm kompleks bileşiklerinin MALDI-TOF kütle analizleri alınarak elde edilen kütle spektrum verileri moleküllerin gerçek yapılarının teorik yapılar ile uyumlu olduğunun belirlenmeye çalışılmıştır. H<sub>4</sub>L ligandının kütle spektrumu incelendiğinde MALDI-TOF-MS m/z oranı 654.620 [M] olarak belirlenmiştir. Bakır metal kompleksi incelendiğinde MALDI-TOF-MS m/z oranı 933.787 [M] piki görülmüştür. Yine bakır kompleksinin fregmantları incelendiğinde m/z oranı 778.101 [M -2H<sub>2</sub>O -2CH<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> ve 692.212 [M -2CH<sub>3</sub>COO -ISO<sub>3</sub>Na -2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> olduğu belirlenmiştir. Çinko kompleksinin Kütle spektrumu incelendiğinde m/z oranı 938.496 [M]<sup>+</sup> piki görülmüş ve fregmantları incelendiğinde m/z oranı 773.663 [M -2CH<sub>3</sub>COO -ISO<sub>3</sub>Na]<sup>+</sup> ve m/z oranı 684.750 [M -2CH<sub>3</sub>COO -2H<sub>2</sub>O -1Zn -O]<sup>+</sup> parçalanma ürünleri olduğu düşünülmektedir. Kadmiyum kompleks bileşiğinin kütle spektrumunda belirlenen m/z oranı 985.337 [M]<sup>+</sup> piki ve kompleksin fregmantları incelendiğinde m/z oranı 906.272 [M -Cl -H<sub>2</sub>O -Na -2H]<sup>+</sup> ve 877.889 [M -2Cl -2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> parçalanma ürünlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Sentezlenen tüm bileşiklerin MALDI-TOF kütle spektrumları ve fregmantları değerlendirildiğinde teorik olarak molekülü oluşturan tüm grupların analiz sonuçları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (Kus ve ark., 2019).

### Minimum İnhibisyon Konsantrasyon Testi Sonucu Antimikrobiyal Bulgular

Bileşiklerin MIC test sonuçları grafikte, kuyu agar difüzyon testleri ise bileşiklere inhibisyon etki gösterdiği indikatörler üzerindeki zon çapları mm cinsinden Çizelge 2’de gösterilmiştir. Şekil 4’de ligandın kendisi indikatör gram negatif bakterileri üzerine, bakteriyostatik etkinin %90’lardan fazla olduğu 250 mg/mL konsantrasyonu olarak tespit edilmiş, hastane patojeni *Acinetobacter boomanii* (*Acinet. b.*) üzerine 125 mg/mL’da %90’dan yüksek aynı etkileri göstermiştir. İndikatör gram pozitif

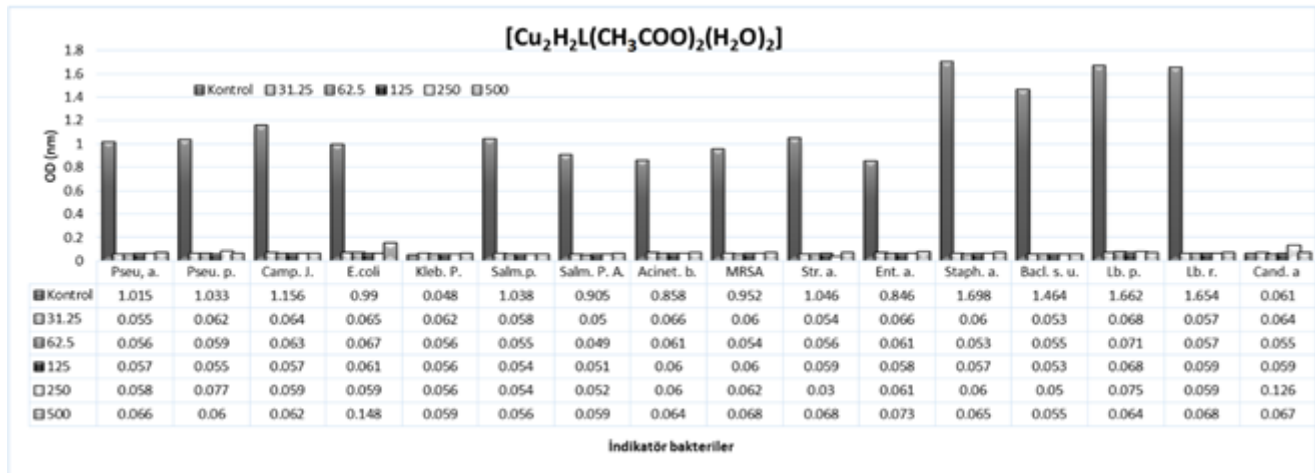


bakteriler üzerine 250-500 mg/mL konsantrasyonlarda yine %90'ın üzerinde bakteriyostatik etki göstermiş, ligand'ın probiyotik bakterilerden *Lb. plantarum* üzerine *Lb. reuteri*'den daha fazla etkili olduğu (250 ile 500 mg/mL) tespit edilmiştir. Aynı zamanda ligand'ın 61.5 ve 125 mg/mL konsantrasyonları *Lb. reuteri* üzerine %20-10'larda bakteriyostatik etki gösterirken, aynı konsantrasyonlar *L. plantarum* hücrelerinin gelişimini daha çok baskılamıştır. *Candida albicans* bakterileri üzerine 250-500 mg/mL konsantrasyonlarda uygulandığında bakteriyostatik etkili olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. H<sub>4</sub>L ligandının 600 nm UV-spektrofotometrede mikroplate kullanılarak 62.5, 125, 250 ve 500 mg/mL konsantrasyonlardaki MIC değerleri

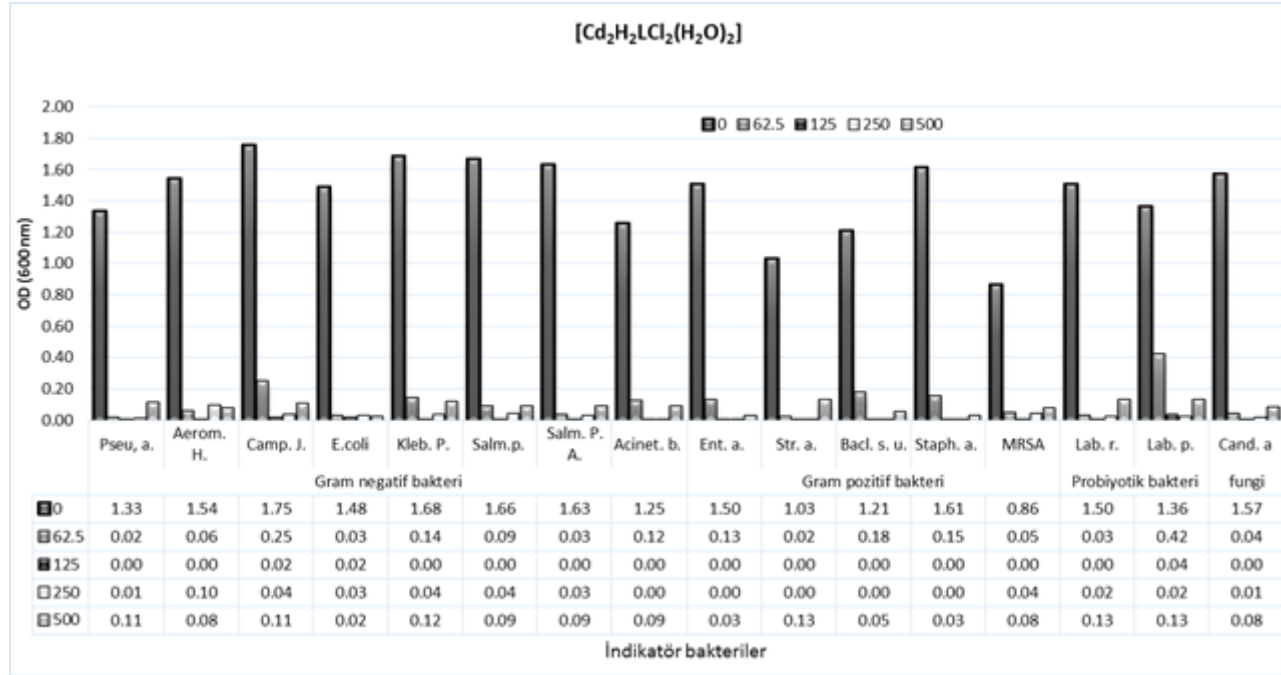
Şekil 5'de bakır kompleksinin ([Cu<sub>2</sub>H<sub>2</sub>L(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]) MIC sonuçları verilmiştir. Yaklaşık tüm indikatör bakterilerde aynı etkiye yol açmış 31.25 mg/mL en düşük konsantrasyonlarda %90 üzeri bakteriyostatik etkiye yol açmıştır. Gram negatif /pozitif probiyotik ve fungi üzerinde aynı etkiye sahip olmuştur.



Şekil 5. [Cu<sub>2</sub>H<sub>2</sub>L(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] kompleksinin 600 nm UV-spektrofotometrede mikroplate kullanılarak 31.25, 62.5, 125, 250 ve 500 mg/mL konsantrasyonlardaki MIC değerleri

Şekil 6'da [Cd<sub>2</sub>H<sub>2</sub>LCI<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] kompleksinin *Campliobacter*, *Klebsiella* ve *Acinetobacter* üzerine bakteriyostatik değeri en yüksek konsantrasyon 125 mg/mL olurken diğer gram negatif bakterilerde 62.5 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Gram pozitif bakterilerde *Staphylococcus*, *Enterococcus* ve *Bacillus* üzerine 125 mg/mL olurken diğer gram pozitif bakterilerde 62.5 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Probiyotiklerden *Lactobacillus reuteri* *Lactobacillus plantarum*dan daha hassas olarak 62.5 mg/mL'de %90-99'dan fazla bakteriyostatik olarak etkilenmiştir. Benzer olarak kadmiyum kompleksi 62.5 mg/mL'de %90 dan fazla *Candida* üzerinde bakteriyostatik etki göstermiştir. Birçok

antibakteriyel ajan, bakteri hücre duvarının temel bileşeni olan peptidoglikanın oluşumu için önemli olan adımları engeller. Kadmiyum tuzlarının kendileri zehirlidir, ancak komplekslerin stabilitesi test ortamında (Cd(II)) iyonlarının serbest kalmasını engeller. Ek olarak, kadmiyum tuzları da insanlar için zehirlidir, oysa ligandların metaller ile oluşturduğu kompleks bileşiklerin bu zararlı etkilerini oldukça azalttığı literatür çalışmalarında görülmektedir (Foni ve ark., 2014).

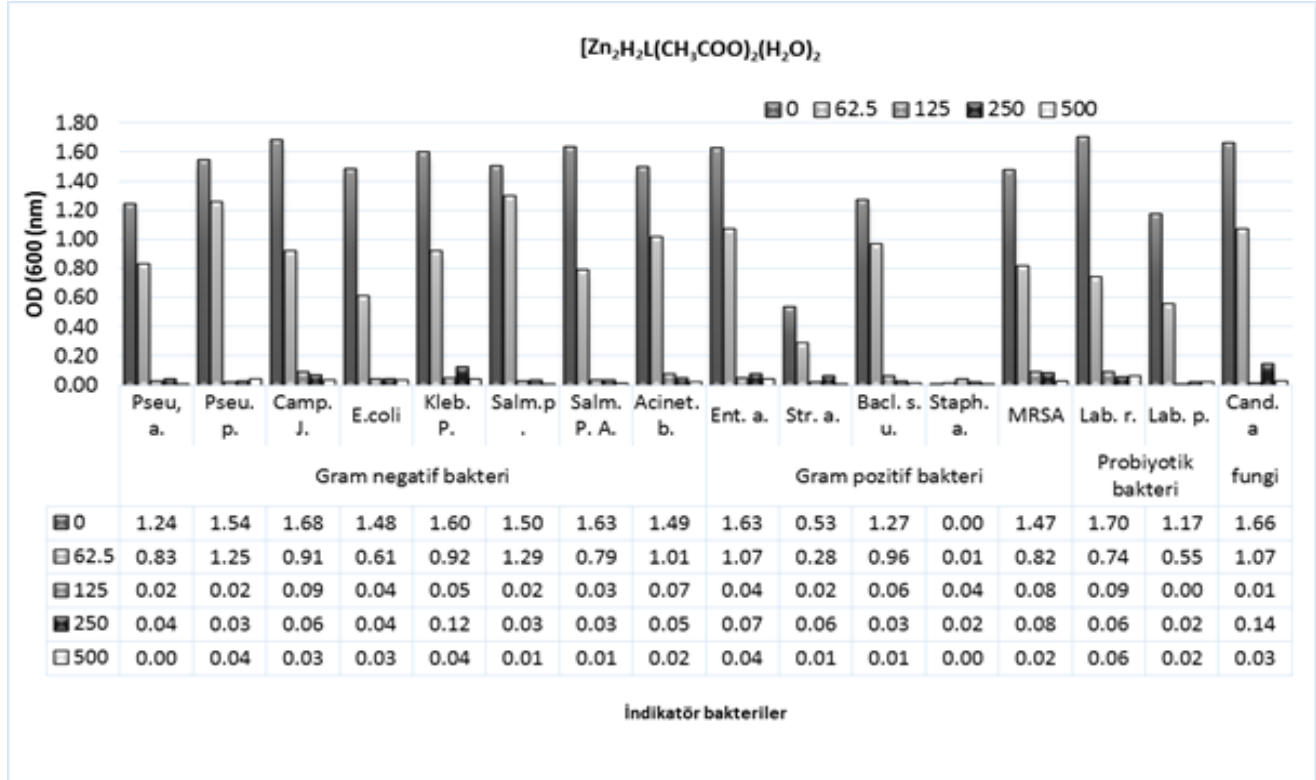


**Şekil 6.** [Cd<sub>2</sub>H<sub>2</sub>LCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] kompleksinin 600 nm UV-spektrofotometrede mikropate kullanılarak 62.5, 125, 250 ve 500 mg/mL konsantrasyonlardaki MIC değerleri

Birçok antibakteriyel ajan, bakteri hücre duvarı sentezinin önemli olan temel bileşen olan peptidoglikan oluşumu adımlarını engelleyerek antimikrobiyal etki gösterirler. Cd tuzlarının insan için zehirlidir ancak komplekslerin stabil olması test ortamında (Cd) iyonlarının serbest bırakılmasını önler (Foni ve ark., 2014). Cd ligandlarının kararlı olduğunu buna karşın cd-komplekslerinin kararlı olmamasıyla insanlar için toksik bulmuştur.

Şekil 7'de [Zn<sub>2</sub>H<sub>2</sub>L(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] kompleksinin MIC değerleri verilmiştir. Gram negatif bakterilerin tümü [Zn<sub>2</sub>H<sub>2</sub>L(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] kompleksinden aynı konsantrasyon olan 125 mg/mL'de bakteriyostatik (%90) olarak etkilenmiştir. Benzer olarak gram pozitif bakterileri ve fungi de aynı konsantrasyonda %90'dan fazla bakteriyostatik etkiye uğramışlardır. Candida albicans ise 500 mg/mL'de %90'dan fazla bakteriyostatik etkilenirken, kompleksin 125 mg/mL'si Candida üzerinde %90'da 250 mg/mL'den daha çok etkili olduğu belirlenmiştir.

Bakteriyostatik bileşikler, bakteriyel organizmaların üremesini durdurur ve bu ligand ve komplekslerde farklı konsantrasyonlarda çok farklı etki görülmesine neden olmaktadır. Bu durum ligand da 250 mg/mL'nin üzerindeki MIC'lerde gözlenmiştir. MIC sonuçları, bazı bileşiklerin ya bakterisidal ya da bakteriyostatik olduğunu göstermiştir. Bakterisidal bileşik konsantrasyonları MIC değerlerinden farklılık gösterebilmektedir.



Şekil 7.  $[Zn_2H_2L(CH_3COO)_2(H_2O)_2]$  kompleksinin 600 nm UV-spektrofotometrede mikropalte kullanılarak 62.5, 125, 250 ve 500 mg/mL konsantrasyonlardaki MIC değerleri

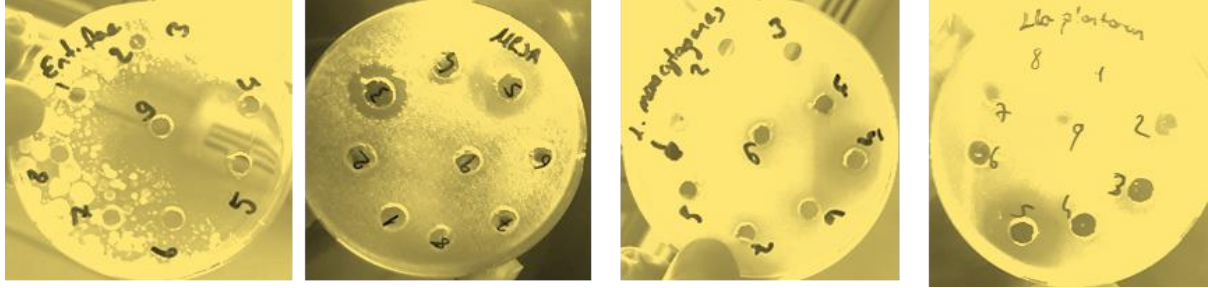
MIC ve MBC metodları kullanılarak yapılan analiz sonucunda elde edilen verilere göre H<sub>4</sub>L ligandı ile sentezlenen kompleksleri değerlendirildiğinde, komplekslerin ligand'dan daha yüksek aktivite gösterdiği görülmüştür. Diğer söylemde, MIC testi sonucunda ligandın komplekslerden daha düşük bakteriyostatik etki gösterdiği, daha yüksek konsantrasyon değeri ile anlaşılmaktadır. H<sub>4</sub>L ligandı ve kompleksleri için kuyu agar difüzyon testinde duyarlılık gösteren indikatör bakterileri üzerine denemeler yapılmış ve sentezlenen bileşiklerin farklı konsantrasyonlarında uygulanmış ve elde edilen MIC değerleri ile birlikte sonuçlar Çizelge 2'de verilmiştir.

### Agar Kuyu Difüzyon Metodu

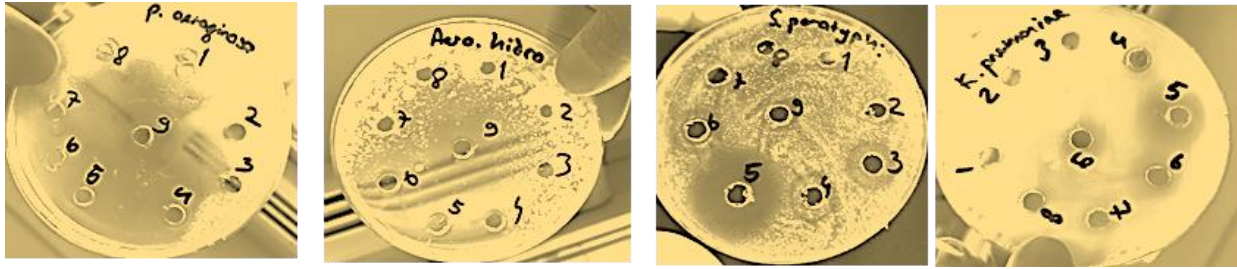
MIC testinde, komplekslerin ligand'dan daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği, bulunmuştur. Agar kuyu difüzyon testinde ise Gram negatif bakterilerden Salm. poona ve S. Paratyphi A üzerine sırasıyla 10.55-20.90 ve 11.44 -19.36 mm Aeromonas hidrofília üzerine ligand hariç 8.12-18.52 mm, Pseudomonas aeruginosa üzerine 7.14, 15.89 mm, Campiobacter üzerine 14.30 ile 20.89 mm, inhibisyon çapında etki gösterdiği bulunmuştur. Candida albicans üzerine (7.12 mm), Bacillus üzerine H<sub>4</sub>L ligand ve  $[Cu_2H_2L(CH_3COO)_2(H_2O)_2]$  kompleksi hariç 18.23, 12.09 mm, MRSA üzerine 7.34 ile 26.12 mm arasında ve diğer bakteriler üzerine kompleksler çoğunlukla, daha etkili olduğu görülmüştür. Bu da MIC sonuçları ile paralellik gösterdiğini açıklamaktadır.  $[Cd_2H_2LCl_2(H_2O)_2]$  kompleksinin diğerlerine göre daha etkili olduğu ve onu takiben  $[Zn_2H_2L(CH_3COO)_2(H_2O)_2]$  kompleks,  $[Cu_2H_2L(CH_3COO)_2(H_2O)_2]$  kompleks ve ligandın geldiği tespit edilmiştir (Bagul ve ark., 2016).

Çizelge 2. Tüm bileşiklerinin Agar difüzyon metodu kullanılarak antimikrobiyal sonuçları

İndikatör Bakteriler	Ligand ve Kompleksleri				Ref Antibiotic	
	H <sub>4</sub> L (250 mg/ml)	[Cu <sub>2</sub> H <sub>2</sub> L(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] (31.5 mg/ml)	[Cd <sub>2</sub> H <sub>2</sub> LCI <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] ( 62.5 mg/ml)	[Zn <sub>2</sub> H <sub>2</sub> L(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] (125 mg/ml)	TE 30	N 30
<b>Gram Pozitif bakteri</b>						
Bacillus subtilus			18.23	12.19	22	12
Enterococcus faecalis					9	20
Streptococcus agalactia						
MRSA(Metisilin resist. S. aureus)	7.34	8.03	26.12	9.67	14.17	
Staphylococcus aureus						
<b>Gram Negatif bakteri</b>						
Salmonella poona	11.40	10.55	24.87	20.90	20.45	
Pseudomonas aeroginasa	7.12	9.77	15.89	14.72	16.88	
Aeromonas hidrofilia		8.12	17.40	18.52	21.12	
Acinetobacter boomanii izolat					7.11	
Salmonella paratyphi A	15.22	14.44	19.36	15.14	21.44	
Klebsiella pneumonia					R	20
Campylobacter jejuni	14.30	16.33	20.89	20.23		
E.coli		7.64	11.70	8.70	12	22
<b>Probiyotik bakteri</b>						
Lactobacillus reuteri ATCC	8.45	8.33	25.32	7.22		
Lactobacillus plantarum (	13.45		21.88			
<b>Fungi</b>						
Candida albicans	R	R	11.43	7.12		
İndikatör Bakteriler	Ligand ve Kompleksleri				Ref Antibiotic	
	H <sub>4</sub> L (250 mg/ml)	[Cu <sub>2</sub> H <sub>2</sub> L(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] (31.5 mg/ml)	[Cd <sub>2</sub> H <sub>2</sub> LCI <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] ( 62.5 mg/ml)	[Zn <sub>2</sub> H <sub>2</sub> L(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] (125 mg/ml)	TE 30	N 30
<b>Gram Pozitif bakteri</b>						
Bacillus subtilus			18.23	12.19	22	12
Enterococcus faecalis					9	20
Streptococcus agalactia						
MRSA(Metisilin resist. S. aureus)	7.34	8.03	26.12	9.67	14.17	
Staphylococcus aureus						
<b>Gram Negatif bakteri</b>						
Salmonella poona	11.40	10.55	24.87	20.90	20.45	
Pseudomonas aeroginasa	7.12	9.77	15.89	14.72	16.88	
Aeromonas hidrofilia		8.12	17.40	18.52	21.12	
Acinetobacter boomanii izolat					7.11	
Salmonella paratyphi A	15.22	14.44	19.36	15.14	21.44	
Klebsiella pneumonia					R	20
Campylobacter jejuni	14.30	16.33	20.89	20.23		
E.coli		7.64	11.70	8.70	12	22
<b>Probiyotik bakteri</b>						
Lactobacillus reuteri ATCC	8.45	8.33	25.32	7.22		
Lactobacillus plantarum (	13.45		21.88			
<b>Fungi</b>						
Candida albicans	R	R	11.43	7.12		



Şekil 8. Schiff bazı bileşiklerinin numaralandırılması ile yapılan analize göre gram pozitif bakterilere karşı inhibisyon etkileri. ( $H_4L$ (3),  $[Cu_2H_2L(CH_3COO)_2(H_2O)_2]$ (4),  $[Cd_2H_2LCl_2(H_2O)_2]$ (5),  $[Zn_2H_2L(CH_3COO)_2(H_2O)_2]$ (6))



Şekil 9. Schiff bazı bileşiklerinin gram negatif bakterilere karşı inhibisyon etkileri



Şekil 10. Schiff bazı bileşiklerinin probiyotik bakterilere karşı inhibisyon etkileri

## SONUÇ

Bu çalışmada, suda çözünebilen tridentat Schiff Bazı ligandı ve Cu(II), Ni(II), Zn(II) ve Fe(III) metal kompleksleri sentezlenmiştir. Elde edilen bileşiklerin karakterizasyonları analitik ve spektroskopik teknikler kullanılarak yapılmıştır. Teorik olarak belirlenen yapılar elde edilen deneysel bulgular ve literatür değerleri ile karşılaştırıldığında uyum içerisinde olduğu görülmüştür.

Schiff Bazı ve metal komplekslerinin antimikrobiyal testinde, Gram negatif/pozitif, probiyotik ve bir adet fungi ye MIC olarak bakteriyostatik etkide;  $H_4L$  ligandı 250 mg/mL konsantrasyonda,  $[Cu_2H_2L(CH_3COO)_2(H_2O)_2]$  kompleksi 31,5 mg/mL konsantrasyonda,  $[Cd_2H_2LCl_2(H_2O)_2]$  kompleksi 62.5 mg/mL konsantrasyonda ve  $[Zn_2H_2L(CH_3COO)_2(H_2O)_2]$  komplekside 125 mg/mL konsantrasyonda bakteri gelişimlerini baskıladıkları anlaşılmıştır. Schiff Bazı ve metal komplekslerinin Bakterisid etkisi ise 500-250 mg/ml olarak bakterilerin çoğunluğunun gelişimi tamamen durdurmuştur. Bu da MIC sonuçları ile paralellik gösterdiğini açıklamaktadır.  $[Cd_2H_2LCl_2(H_2O)_2]$  kompleksinin diğerlerine göre daha etkili olduğu ve onu takiben  $[Zn_2H_2L(CH_3COO)_2(H_2O)_2]$  kompleks,  $[Cu_2L(CH_3COO)_2(H_2O)_2]$  kompleks ve ligandın geldiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak komplekslerin ligandan daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve gram pozitif /negatif ve probiyotik bakterilere ile fungiye karşı bakteriyostatik etki gösterdiği belirlenmiştir. Şekil 8-10'de agar difüzyon test sonucu oluşan inhibisyon zonları görülmektedir.

**Çıkar Çatışması**

Makalenin planlanması, yürütülmesi ve yazılması sırasında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederim.

**Yazar Katkısı**

Makalenin planlanmasının, yürütülmesinin ve yazılmasının makalenin tek yazarı olarak tarafımdan yapıldığını beyan ederim.

**KAYNAKLAR**

- Al-Qadisy I., Saeed WS., Al-Odayni A., Al-Faqeeh L.A.S., Alghamdi A.A., Farooqui M., 2020. Novel Metformin-Based Schiff Bases: Synthesis, Characterization, and Antibacterial Evaluation. *Materials* 13:514.
- Atahan, A., Durmus S., 2015. "1-Amino-2-hydroxy-4-naphthalenesulfonic acid based Schiff bases or naphtho[1,2-d]oxazoles: Selective synthesis and photophysical properties" *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 144:61–67.
- Aytar M., Oryaşın E., Başbülbul G., Bozdoğan B., 2019. Agar Well Difüzyon Yönteminde Standardizasyon Çalışması. *JONAS* 2 (2): 138-145.
- Bagul U.S., Sivakumar S.M., 2016. Antibiotic Susceptibility Testing: A Review On Current Practices. *Int J Pharm* 6(3): 11-17.
- Bharti, S., Choudhary, M., Mohan, B., Rawat, S.P., Sharma, S.R., Ahmad K., 2018. "Syntheses, spectroscopic characterization, SOD-like properties and antibacterial activities of dimer copper (II) and nickel (II) complexes based on imine ligands containing 2-aminothiophenol moiety: X-ray crystal structure determination of disulfide Schiff bases" *J. Mol. Struct.* 1164:137-154.
- Foni, B.B., Tapashi, G.R., Atiar, R., and Talha, B.E. (2014). An in vitro antibacterial and antifungal effects of cadmium(II) complexes of hexamethyltetraazacyclotetradecadiene and isomers of its saturated analogue. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 7(Suppl 1): S534-S539.
- Gonelimali FD., Lin J., Miao W., Xuan J., Charles F., Chen M., Hatab SR. 2018. Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms. *Frontiers in Microbiology* 9:1639.
- Hossain Md.M., Bashar Md.A., Khan Md.N., Roy PK., Ali Md.S., Farooque Md.A., 2018. Preparation, Physical Characterization and Antibacterial Activity of Ni (II), Cu (II), Co (II), Cd (II), Zn (II) and Cr (III) Schiff Base Complex Compounds. *Science Journal of Chemistry* 6(2): 17-23.
- Kus F., Tasaltın C., Albakour M. Gürek AG., Gürol İ., 2019. Macromolecular hexa-asymmetric zinc(II) phthalocyanines bearing triazole-modified triphenylene core: Synthesis, spectroscopy and analysis towards volatile organic compounds on Surface Acoustic Wave devices. *J. Porphyrins Phthalocyanines* 23: 477–488.
- Lalitha, M.K. (2009) *Manual on Antimicrobial Susceptibility Testing. (Under the Auspices of Indian Association of Medical Microbiologists). American Society for Microbiology, Washington DC.*
- Li, B., Webster, T.J., 2018. "Bacteria Antibiotic Resistance: New Challenges and Opportunities for Implant-Associated Orthopaedic Infections" *J. Orthop Res.* 36(1): 22–32.
- Rice, LB. 2006. "Unmet medical needs in antibacterial therapy" *Biochem Pharmacol* 71(7):991–5.
- Salas H., Gutiérrez-Bouzán C., López-Grimau V., Vilaseca M., 2019. Respirometric Study of Optical Brighteners in Textile Wastewater. *Materials* 12:785.
- Saranya J., Kirubavathy SJ., Chitra S., Zarrouk A., Kalpana K., Lavanya K., Ravikiran B., 2020. Tetradentate Schiff Base Complexes of Transition Metals for Antimicrobial Activity. *Arabian Journal for Science and Engineering* 45:4683–4695.
- Shaikha, A.B., Barachea, U.B., Anuseb, M.A., Gaikwada, S.H., 2016. "4-(4'-Nitrobenzylideneimino)-3-methyl-5-mercapto-1, 2, 4-triazole, A New Chromogenic Reagent for Extractive Spectrophotometric Determination of Copper (II) in Pharmaceutical and Alloy Samples" *S. Afr. J. Chem.*, 69, 157–165.
- Tunçel, M., Serin, S., 2003. "Synthesis and Characterization of Copper(II), Nickel(II), and Cobalt(II) Chelates with Tridentate Schiff Base Ligands Derived from 4-Amino-5-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic Acid" *Synth React Inorg M.* 33:985–998.
- Wan, M., Hua, L., Zeng Y., Jiao, P., Xie, D., Tong Z., Wu G., Zhou, Y., Tang Q., Mo, F., 2017. Synthesis and properties of novel stilbene-twelve alkyl quaternary ammonium salts as antibacterial optica whitening agents. *Cellulose* 24:3209–3218.

**Atf İçin:** Özbakiş Y, Erzincanlı F, Özsoy M, Uğur L, 2022. Merkezi Havalandırma Sistemi Mutfak Davlumbazı Verimliliğinin Artırılması Üzerine Bir Çalışma. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 365-377.

**To Cite:** Özbakiş Y, Erzincanlı F, Özsoy M, Uğur L, 2022. A Study on Increasing the Efficiency of Central Ventilation System Kitchen Hoods. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 365-377.

## Merkezi Havalandırma Sistemi Mutfak Davlumbazı Verimliliğinin Artırılması Üzerine Bir Çalışma

Yusuf ÖZBAKIŞ<sup>1\*</sup>, Fehmi ERZİNCANLI<sup>1</sup>, Murat ÖZSOY<sup>2</sup>, Levent UĞUR<sup>3</sup>

**ÖZET:** Bu çalışmada, merkezi havalandırma sistemi davlumbaz tasarımının yakalama performansı üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Davlumbaz tasarımını optimize etmek ve yakalama performansını tahmin etmek için ticari hesaplamalı akışkanlar dinamiği (HAD) yazılımı kullanılmıştır. HAD yazılımı sayesinde gerçek ölçülere sahip davlumbaz modellenmiş ve sayısal analizler gerçekleştirilmiştir. Sayısal analizlerde, davlumbaza eklenen hava yönlendirici kılavuz sayesinde davlumbaz kaputunda oluşan türbülanslı akış engellenmiştir. Bu sayede, davlumbaz yakalama hızında ve hava debisinde artış sağlanmıştır. Yapılan HAD analizleri sonucu elde edilen bilgiler ile davlumbaz prototipleri oluşturulmuş ve gerçek ortam deneyleri yapılmıştır. Farklı debi değerlerinde gerçekleştirilen sayısal analizler, deneysel analizler ile doğrulanmıştır. Sonuç olarak HAD analizleri, davlumbaza eklenen hava yönlendirici kılavuzun, hava akışında oluşan türbülansı engellediğini ve davlumbaz performansını artırdığını göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Merkezi havalandırma sistemi, davlumbaz, yakalama hızı, hava akış kontrol valfi, HAD, türbülans modelleme

### A Study on Increasing the Efficiency of Central Ventilation System Kitchen Hoods

**ABSTRACT:** In this study, it is aimed to investigate the effects of central ventilation system hood design on capture performance. Commercial computational fluid dynamic (CFD) software was used to optimize the hood design and predict capture performance. Thanks to the CFD software, the hood with real dimensions was modeled and numerical analyzes were carried out. In numerical analysis, the turbulent flow in the hood was prevented by the air guide attached to the hood. In this way, an increase was achieved in the hood capture velocity and airflow rate. With the information obtained as a result of CFD analysis, hood prototypes were created and real environment experiments were carried out. Numerical analysis performed at different flow rates were confirmed by experimental analyzes. As a result, CFD analysis showed that the air guide added to the hood prevents turbulence in the air flow and increases the hood performance.

**Keywords:** Center ventilation system, hood, capture velocity, air flow control valve, CFD, turbulence modeling

<sup>1</sup>Yusuf ÖZBAKIŞ ([Orcid ID: 0000-0002-8439-411X](https://orcid.org/0000-0002-8439-411X)), Fehmi ERZİNCANLI ([Orcid ID: 0000-0003-1454-8459](https://orcid.org/0000-0003-1454-8459)), Düzce Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Makine Mühendisliği Bölümü, Düzce, Türkiye

<sup>2</sup>Murat ÖZSOY ([Orcid ID: 0000-0003-2400-5212](https://orcid.org/0000-0003-2400-5212)), Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Makine Mühendisliği Bölümü, Sakarya, Türkiye

<sup>3</sup>Levent UĞUR ([Orcid ID: 0000-0003-3447-3191](https://orcid.org/0000-0003-3447-3191)), Amasya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Makine Mühendisliği Bölümü, Amasya, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Yusuf ÖZBAKIŞ, e-mail: yusufozbakis@hotmail.com

Bu çalışma Yusuf ÖZBAKIŞ'ın Doktora tezinden üretilmiştir.

## GİRİŞ

Dünya çapında yemek pişirmek, insan sağlığının temel dayanağı olmuştur (Adamu ve ark., 2017). Mutfaklarda, yemek pişirim esnasında ortama istenmeyen duman ve kokular yayılmaktadır. Ortama yayılan istenmeyen gazlar, bulunduğu ortamdan yakalanarak dış ortama atılmadığında, ortama nüfuz etmektedir. Bu gazlar konutlarda, diğer odalara yayılabilmektedir. Oluşan bu istenmeyen durum, kullanıcı konforunu olumsuz yönde etkilemektedir (Dominici ve ark., 2006; Anderson ve ark., 2012). Ayrıca literatürde, pişirme işleminden kaynaklanan dumanın, solunum yolu, göz tahrişi, baş ağrısı ve bel ağrısı gibi fiziksel rahatsızlıklara maruz bıraktığı belirtilmiştir (Dherani ve ark., 2008; Tielsch ve ark., 2009).

Son zamanlarda, mutfaklarda bulunan kirletici yakalama sistemlerini ayrıntılı olarak anlamak ve yakalama verimliliğini artırmak için sayısal ve deneysel çalışmalar yapılmıştır. Singer ve ark., (2012); deneysel olarak 15 farklı ev tipi mutfak davlumbazını tasarım ve performans açısından test etmişlerdir. Yazarlar çalışmada, kirletici yakalama performansının davlumbaz tasarımı, kurulum konfigürasyonu (yükseklik ve açı) ve debisi ile ilişkili olduğunu gözlemlemişlerdir. Oh ve ark., (2008); davlumbaza eklenen gaz kılavuz cihazının yakalama hızı üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Davlumbaz yakalama verimliliğinin davlumbaz geometrisi ve tasarımı ile ilgili olduğunu vurgulamışlardır. Başka bir çalışmada, mutfak davlumbazına eklenen ayırma plakasının oda içerisindeki sıcaklık dağılımında % 1.4-1.9 ve CO<sub>2</sub> yayılımında % 9.4–11.9 iyileşme olduğu belirtilmiştir (Lim ve Lee, 2008). Diğer bir çalışmada, davlumbaza eklenen hava bariyeri sayesinde, yakalama performansında % 16.8-30.8 artış sağlanmıştır (Özbakiş ve ark., 2020). Chen ve ark., (2018); lokal havalandırma sistemlerinde kullanılan valf tasarımının yakalama hızı ve türbülans yoğunluğu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Yapılan yeni valf tasarımı sayesinde yakalama hızında artış ve türbülans yoğunluğunda azalma sağlanmıştır. Pinelli ve Suman (2014); çalışmalarında, davlumbaz boyutunun yakalama hızı üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Huang ve ark., (2016); endüstriyel havalandırma sistemlerinde duman, toz, damlacık ve atık ısı kontrolü üzerine araştırma yapmışlardır. Yapılan çalışma sonucu yazarlar, davlumbaz hacminin yakalama oranında etkili olduğunu göstermişlerdir. Wu ve Liou (2019); ocaktan çıkan CO emisyonlarının, yakalanma verimliliğinin iyileştirilmesinde davlumbaz tasarımının etkisini vurgulamak için sayısal bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada mevcut davlumbaza ek olarak O, S ve V şekilli davlumbaz gövde tasarımları yapmışlardır. Mevcut davlumbaza göre akış hızlarında sırasıyla % 155.6 % 156.9 ve % 159.4 iyileşme sağlamışlardır. Keçel (2017); mutfak içerisinde duman ve sıcaklık dağılımını engellemek için sayısal bir çalışma yapmıştır. Mevcut davlumbaza ters akımlı hava perdeleri eklenerek mutfak içerisindeki buhar-hava karışımlarının dağılımını incelemiştir. Sonuç olarak davlumbaza eklenen ters hava akımı ile ocaktan yayılan buhar-hava karışımı davlumbaz hacmi içerisinde tutulmuştur. Le Hocine ve ark., (2020); davlumbaz debisinin ve fan dönüş hızının yakalama verimliliği, CO<sub>2</sub> dağılımı ve hız profilleri üzerindeki etkisini ayrıntılı olarak araştırmışlardır. 100 cfm akış oranında, ortama salınan CO<sub>2</sub> dağılımının sadece % 65'inin yakalandığını göstermişlerdir. Yi ve ark., (2016); davlumbaz debi miktarının, davlumbaz ısı ve gaz yakalama verimliliği üzerindeki etkisini araştırmak için sayısal ve deneysel çalışma yapmışlardır. Çalışmada 100 cfm ve 350 cfm arasında akış oranları ile deneyler gerçekleştirmişlerdir. Davlumbazın akış hızı arttıkça, hem ısı hem de gaz yakalama verimliliği artmıştır. Zhou ve ark., (2019); itmeli-çekmeli mutfak havalandırma sistemi üzerinde bir saha deneysel çalışması yapmışlardır. Sonuçta, bu havalandırma sisteminin davlumbazın yakalama verimliliği üzerinde etkili olduğunu göstermişlerdir.

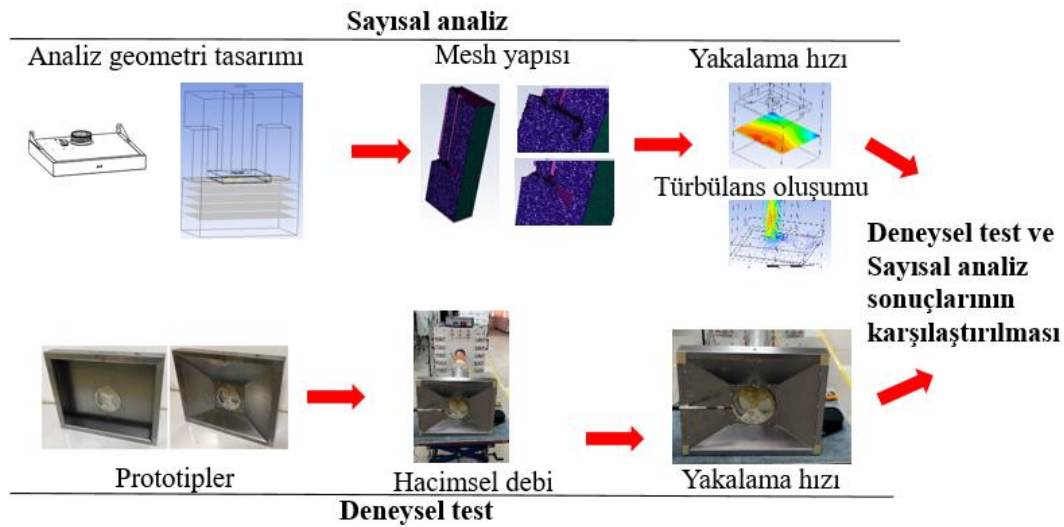


Havalandırma sistemi performansı ile ilgili literatürde birçok etkili çözümün var olduğu görülmektedir. Önemli olan, üretilecek olan davlumbazın insanların ihtiyaçlarını karşılayan daha iyi bir ürün olmasıdır.

Yapılan bu çalışmada, Hesaplamalı Akışkanlar Dinamiği (HAD) yazılımı sayesinde, merkezi havalandırma sistemi mutfak davlumbazı tasarım parametrelerinin, yakalama performansı üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, tam ölçekli bir merkezi havalandırma sistemi mutfak davlumbazı ve hava emiş alanı modellenmiştir. Oluşturulan geometri ile sayısal analizler gerçekleştirilmiştir. Analizler, mevcut ve hava yönlendirici kılavuz (HYK) eklenmiş geometriler ile 8 farklı debi koşulunda tekrarlanmıştır. Farklı debi değerlerinde gerçekleştirilen sayısal analizler, deneysel analizler ile karşılaştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Merkezi havalandırma sistemi davlumbazlarının kendi üzerinde fan motoru kullanılmamaktadır. Bu davlumbazlar, merkezi sistem fan motoru tarafından havalandırma sisteminde oluşturulan negatif basınç sayesinde (vakum yaparak) ortamda bulunan zararlı gazları yakalamaktadır. Bu çalışmada, merkezi havalandırma sistemi mutfak davlumbazı tasarımının, performans üzerindeki etkisinin gösterilmesi ve sayısal analizlerin ANSYS Fluent programı ile simüle edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, mevcut ve HYK'ya sahip 2 farklı merkezi havalandırma sistemi mutfak davlumbazı ile 8 farklı debi koşulunda sayısal ve deneysel performans testleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneysel sonuçlar ile sayısal analiz sonuçları karşılaştırılmıştır. Kullanılan materyal ve yöntemlerle birlikte deney düzeneğinin ayrıntılı şematik resmi Şekil 1'de görülmektedir.



Şekil 1. Deney kurulumunun detaylı şematik resmi

## Deneysel Detay

Çalışmalarda yazarlar, ürün tasarımını; tasarımcının deneyimine, yaratıcı düşüncesine ve bilgi birikimine dayalı problem çözme aktivitesi olarak tanımlamıştır (Goel ve Singh, 1998; Hsiao ve Chou, 2004). Bu çalışmada, merkezi sistemi mutfak davlumbazına eklenen HYK'nın, davlumbaz performansı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Performans ölçüm testleri, Avrupa Standardına (IEC 61591, 2019) uyumlu ve akredite test laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Test cihazına ait özellikler Çizelge 1'de verilmiştir. Hacimsel debi ve performans ölçüm cihazında davlumbaz debisi ve debi için gerekli olan sistem basınçları ölçülmüştür.

**Çizelge 1.** Hacimsel hava akış ve performans ölçüm cihazı özellikleri.

Marka / Tip	ILK Dresden / ILK-B-31
Basınç Ölçüm Aralığı / Hassasiyet	(-5 kPa) – (5 kPa) / 0.1 Pa
Debi Ölçüm Aralığı	18 m <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> - 2700 m <sup>3</sup> h <sup>-1</sup>
Maksimum Sapma	% 0.2
Şebeke (test odası modülü)	230 V / 50 Hz / 16 A
Menşei	Almanya

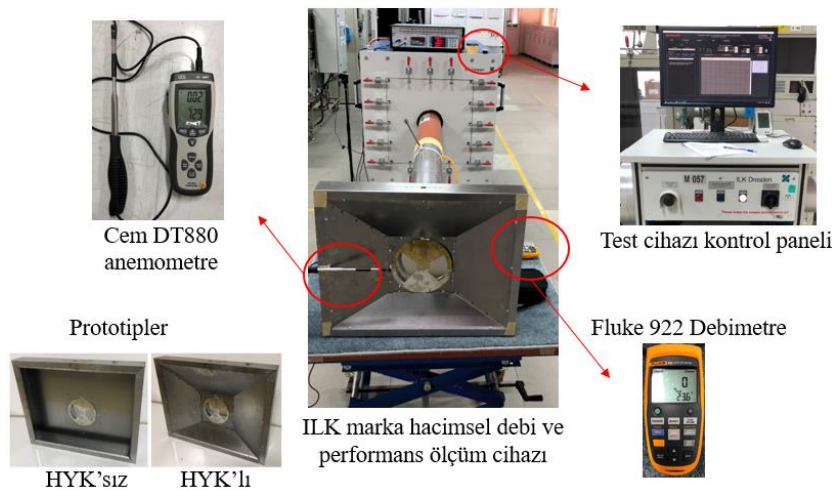
Davlumbazın emiş alanında oluşan yakalama hızları Cem DT880 marka sıcak tel anemometresi ile 2 noktadan ölçülmüştür. Deneysel testlerde kullanılan hız ve sıcaklık ölçüm cihazına ait özellikler Çizelge 2’de verilmiştir. Çıkış basıncının ölçümü için Fluke 922 marka debimetre kullanılmıştır. Deneysel esnasında tüm değerler stabil olana kadar beklenmiş ve daha sonra test sonuçları okunmuştur. Deneysel ölçümler 3 defa tekrarlanmış ve ortalama değerler hesaplanmıştır. Deneysel testlerde kullanılan HYK’lı ve HYK’sız modele ait prototip davlumbazlar Şekil 2’de verilmiştir. Oluşturulan deneysel test sistemi ise Şekil 3’te gösterilmiştir.

**Çizelge 2.** Hız ve sıcaklık ölçüm cihazı özellikleri

Marka	Cem DT880
Ölçüm birimleri	m s <sup>-1</sup> , km h <sup>-1</sup> , knots, °C
Hava hızı ölçüm hassasiyeti	0.01 m s <sup>-1</sup>
Hava sıcaklığı ölçüm aralığı	0 °C ile 501 °C
Hava sıcaklığı hassasiyeti	±1 °C
Ölçüm hassasiyeti	0.1 °C



Şekil 2. Deneysel test için hazırlanan prototipler, a) HYK’sız model, b) HYK’lı model



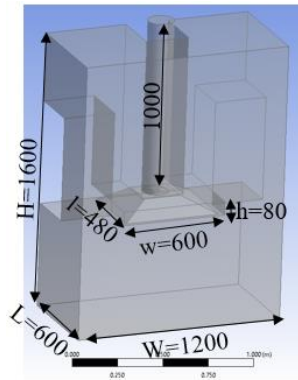
Şekil 3. Deneysel test sistemi

### Sayısal Model

Havalandırma sistemlerinde kullanılan cihazların tasarımı ve optimizasyonu için ANSYS'nin hesaplamalı akışkanlar dinamiği yazılımı kullanılmaktadır. Bu sayede hem zamandan hem de enerjiden tasarruf edilmektedir (Pinelli ve Suman, 2014). ANSYS yazılımı sayesinde, belirli bir alanda optimum hız, kararlılık ve hassasiyet kombinasyonunu hesaplamak için çeşitli formatlar ve değerler seçilebilir. Ayrıca yazılım, çeşitli alanlardaki karmaşık akışların hesaplanmasıyla ilgili sorunları etkin bir şekilde çözebilmektedir (Wu ve Liou, 2019). Bu makalede de gerçek ortam deneylerinin simüle edilebilmesi için ANSYS Fluent yazılımı kullanılmıştır. Yazılım sayesinde, davlumbaz tasarımının hava akışı üzerindeki etkileri incelenmiştir.

### Geometrik Model

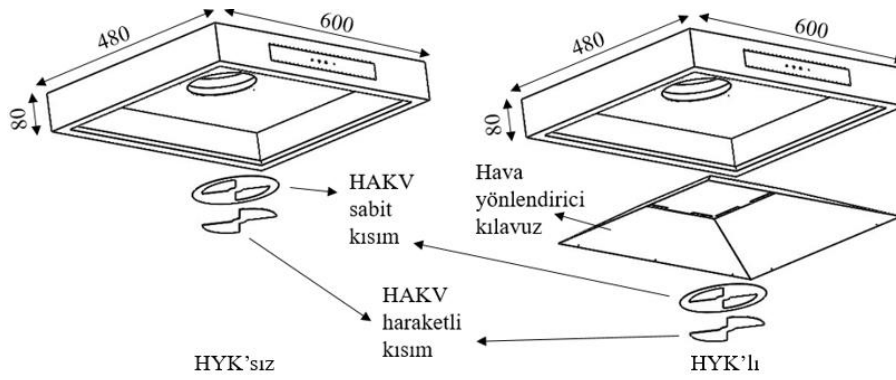
HAD analizleri için 3 boyutlu (3B) model tasarımları SolidWorks v20 software (Dassault Systemes SolidWorks Corp., Waltham, MA, USA) tasarım programı ile yapılmıştır. Analizlerden hızlı sonuç alınabilmesi için, oluşturulan geometri bölgesel olarak davlumbazı ve davlumbaz altında oluşacak hava akış alanını içerisine alacak şekilde; uzunluk:  $L=600$  mm, genişlik:  $W=1200$  mm ve yükseklik:  $H=1600$  mm ebatlarında tasarlanmıştır. Analiz için oluşturulan geometrik model Şekil 4'de gösterilmiştir.



Şekil 4. Analiz geometrisinin ana ölçüleri

Oluşturulan geometrik modelde davlumbazın boyutları ise; uzunluk:  $l=480$  mm, genişlik:  $w=600$  mm ve yükseklik:  $h=80$  mm dir. Davlumbaz merkezi havalandırma sistemi davlumbazı olduğu için fan motoru içermemektedir. Bunun yerine davlumbazda tam kapanabilir hava akış kontrol valfi (HAKV) kullanılmıştır. Davlumbaz 150 mm çapında ve 1000 mm uzunluğunda çıkış borusuna bağlanmıştır. Davlumbaz eksoz çapı 150 mm olduğu için HAKV çapı 140 mm olarak tasarlanmıştır. Çıkış basıncının tanımlanabilmesi ve hesaplamaların yakınsanabilmesi için davlumbazdan 900 mm uzaklığa basınç ölçüm noktası tanımlanmıştır.

Davlumbaz emme alanında oluşacak türbülanslı akış, debiyi olumsuz yönde etkileyecektir (Chen ve ark., 2018). Bu çalışmada da, davlumbaz kaput kenarlarında oluşan türbülansı engellemek için davlumbaz kaputuna HYK eklenmiştir. Davlumbaz emiş alanında oluşan türbülanslı akışın önüne geçilerek, debi artışı sağlanması amaçlanmıştır. Deneylerde kullanılan davlumbaz ve HAKV'ne ait 3B tasarımları Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5. Davlumbazların genişletilmiş görünümleri

### Sayısal Yöntem

Bu çalışma kapsamında yapılan sayısal analizlerde, 3B Reynolds-ortalama Navier-Stokes denklemlerini çözerek akışı tahmin etmek için sonlu hacim yöntemini kullanma imkânı tanıyan, ANSYS Fluent analiz programı kullanılmıştır. Davlumbazlar ile ilgili yapılan çalışmalarda bazı yazarlar  $k-\omega$  türbülans modelini (Liu ve ark., 2014; Le Hocine ve ark., 2020), kullanarak deneysel verilere kıyasla tatmin edici sonuçlar elde etmişlerdir. Bu çalışma kapsamında yapılan sayısal analizlerde de standart  $k-\omega$  türbülans modeli kullanılmıştır. Analizlerde kullanılan akışkan, mükemmel bir gaz olarak kabul edilen havadır.

Analizlerde, simülasyonlar sabit ve sıkıştırılmaz olarak kabul edilmiştir. Sayısal analizlerde kullanılan akışkanların hareketini tanımlayan, standart  $k-\omega$  model taşınım denklemleri ve enerji korunum denkleminde ait eşitlikler aşağıda verilmiştir (Wilcox, 2007).

Standart  $k-\omega$  modeli için taşıma denklemleri:

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho k) + \frac{\partial}{\partial x_i}(\rho k u_i) = \frac{\partial}{\partial x_j} \left( \Gamma_k \frac{\partial k}{\partial x_j} \right) + G_k - Y_k + S_k \quad (1)$$

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho \omega) + \frac{\partial}{\partial x_i}(\rho \omega u_i) = \frac{\partial}{\partial x_j} \left( \Gamma_\omega \frac{\partial \omega}{\partial x_j} \right) + G_\omega - Y_\omega + S_\omega \quad (2)$$

Eşitlik 1 ve Eşitlik 2'de,  $k$ ; türbülans kinetik enerjisi,  $\omega$ ; özgül dağılım oranını,  $\rho$ ; ortalama yoğunluğu,  $u_i$ ; ortalama hızı,  $t$  ve  $x_i$  zaman ve uzaysal koordinat vektörünü,  $G_k$ ; ortalama hız gradyanlarından dolayı türbülans kinetik enerjisinin üretimini temsil eder.  $G_\omega$ ;  $\omega$  üretimini temsil eder.  $\Gamma_k$  ve  $\Gamma_\omega$ ; sırasıyla  $k$  ve  $\omega$ 'nin etkin yayılımını temsil eder.  $Y_k$  ve  $Y_\omega$ ; türbülansın dolayı  $k$  ve  $\omega$  'nin dağılımını temsil eder.  $S_k$  ve  $S_\omega$  kullanıcı tanımlı kaynak terimlerdir.

Enerji korunumu denklemi:

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho h) + \nabla \cdot (\rho h \vec{v}) = -\nabla \cdot [(k + k_t) \nabla T] + S_h$$

(3Hata!  
Belgede  
belirtilen  
stilde metne  
rastlanmadı.)

Eşitlik 3'te  $h$ ; entalpi,  $k$ ; moleküler iletkenlik,  $k_t$ ; türbülanslı taşımadan kaynaklanan iletkenlik ( $k_t = Cp^\mu t / Pr_t$ ), ve  $S_h$ ; tanımlanmış hacimsel ısı kaynaklarını içerir.

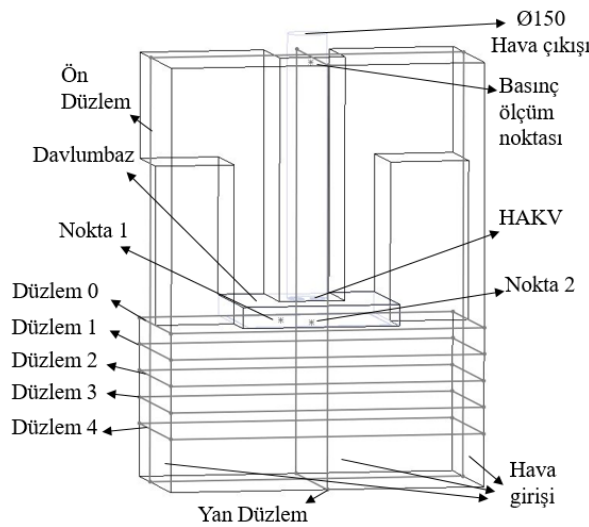
### Sınır Koşulları ve Mesh Model

Matematiksel modellemeye uygun sınır koşullarını belirlemek için, bu makaledeki fiziksel parametrelerde bazı varsayımlar yapılmıştır:

1) Analiz geometrisinde davlumbaz, duvara monte edilmiş olarak modellendiği için analiz geometrisinin üç yüzeyi hava girişi ve davlumbaz egzoz çıkışı tek hava akımı çıkışıdır;

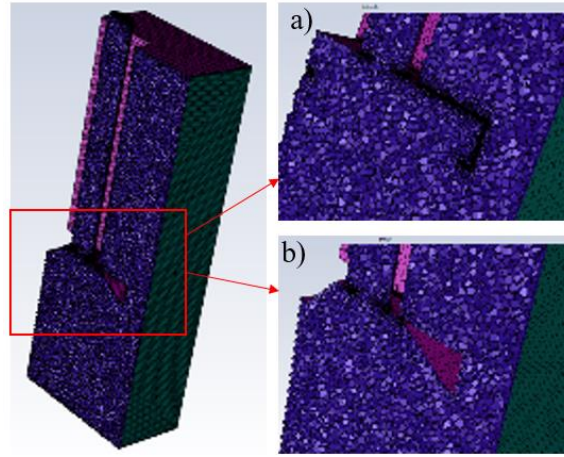
2) Hesaplama alanına ait sınır koşulu olarak ortam basıncı 1 atm (101325 Pa) ve ortam sıcaklığı 23 °C olarak kabul edilmiştir.

Hesaplama alanına ait sınır koşulları Şekil 6'da gösterilmiştir. Merkezi havalandırma davlumbazı maksimum açıklıkta tipik bir çalışma koşulunu temsil etmektedir. Davlumbaz çıkış alanına davlumbaz emme kapasitesini ( $50 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$  ile  $400 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$  arası) simüle eden çıkış basıncı tanımlanmıştır. Analiz sonucu karşılaştırma verilerini elde edebilmek için, tasarlanan geometride davlumbaz hava akış alanına 100 mm aralıklarla düzlem tanımlanmıştır. Ayrıca davlumbaz kaput bölgesinde oluşan hava akışının karşılaştırılması için davlumbaz merkezinden geçen, ön ve yan düzlemler tanımlanmıştır. Yakalama hızı ölçümleri için davlumbaz emiş alanına ölçüm noktaları tanımlanmıştır. Davlumbaz çıkış basıncı ölçümü için HAKV'nin 900 mm ilerisine basınç ölçüm noktası tanımlanmıştır.



Şekil 6. Hesaplama alanına ait 3B tasarım

Solidworks tasarım programı yardımı ile hazırlanan geometriler, analiz hacminin çıkarılması için ANSYS Spaceclaim modülüne aktarılmıştır. Sayısal ağ yapılandırması Fluent Meshing ile hazırlanmıştır. Sayısal ağ, sonlu elemanlar çözüm metodunun uygulanabilmesi için geometrinin küçük çözüm hücrelerine bölünmesi işlemidir. Mesh aşamasında çözüm sonuçlarının kalite beklentisi doğrultusunda eleman sayısı belirlenmektedir. Analiz için Fluent Meshing programının en etkili mesh yapısı olan, Polyhedral mesh yapısı kullanılmıştır. Bu mesh yapısı daha az eleman sayısı ile karmaşık geometrilerde, her mesh kalitesinde eleman oluşturabilme imkânı sağlamaktadır. Tüm modeldeki toplam mesh eleman sayısı yaklaşık 1.2 milyondur. Uygulanan mesh model ağının kalitesinin bir parametresi olan 'skewness' değeri 0 ile 1 arasında belirlenir ve 0.95 altındaki skewness değerleri kabul edilebilir görülmüştür. Yapılan mesh model sonucu maksimum skewness değeri 0.79 olmuştur. Optimum mesh eleman sayısı için yaklaşık 280 bin ile 3 milyon hücre arasında duyarlılık analizi gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucu hücre sayısının hacimsel debi ve yakalama hızı değeri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Yaklaşık 1.2 milyon eleman sayısı sonrası değerlerin duyarsızlaştığı görülmüştür. Yapılan duyarlılık analizi sonucu en iyi yakınsamayı sağlayan 1.2 milyon mesh eleman yapısı sayısal analizlerde kullanılmıştır. Oluşturulan mesh işlemi sonucu, mesh yapısı Şekil 7'de gösterilmiştir.

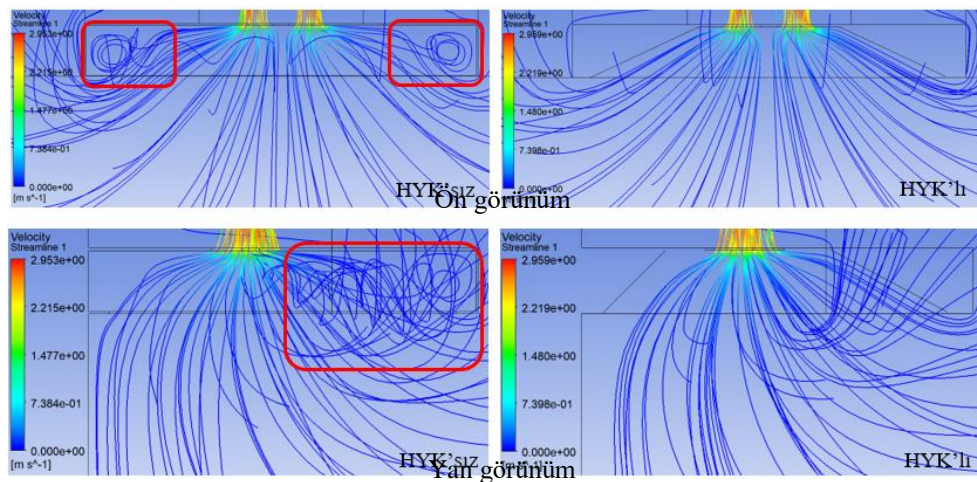


Şekil 7. Mesh dağılımı, a) HYK'sız model, b) HYK'lı model

## BULGULAR VE TARTIŞMA

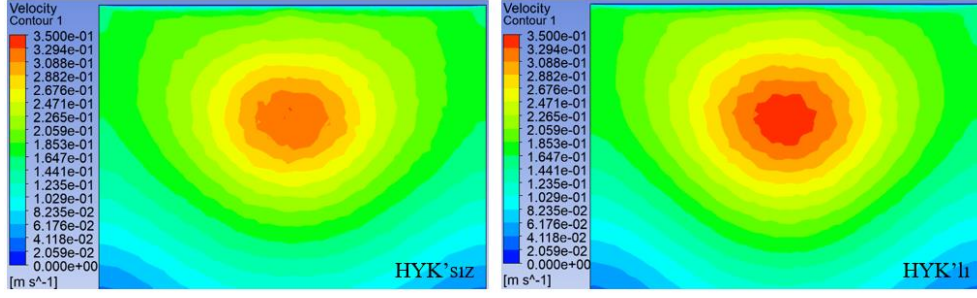
### Sayısal Analiz Sonuçları

Sayısal analizler, her 2 geometri ve 8 farklı hacimsel debi için tekrarlanmıştır. Analizlerde, davlumbaz emiş alanında oluşan hava akışı, yakalama hızı ve hacimsel debi için gerekli olan sistem basıncı açısından incelenmiştir. Analiz sonuçlarına bakıldığında HYK'sız davlumbaz giriş alanında düşük basınç bölgelerinin (vakum) oluştuğu ve bu bölgelerde türbülanslı akışların meydana geldiği görülmüştür. Davlumbaza eklenen HYK ile yapılan analiz sonuçları incelendiğinde, akışta istenmeyen türbülanslı akış bölgelerinin ortadan kalktığı görülmüştür. Yapılan analizlere ait hava akışı ve hava akışında oluşan türbülanslar, streamline yardımı ile Şekil 8'de gösterilmiştir. Şekil 8 incelendiğinde, türbülanslı akışların davlumbaz kaputu kenarlarında oluştuğu görülmektedir. Oluşan türbülanslı akışın, hava akışını bozduğu görülmektedir.

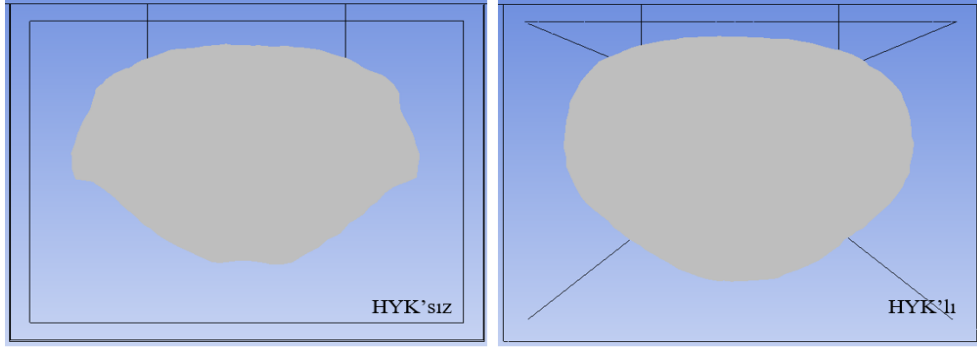


Şekil 8. Ön ve yan görünümde davlumbaz hava akışı

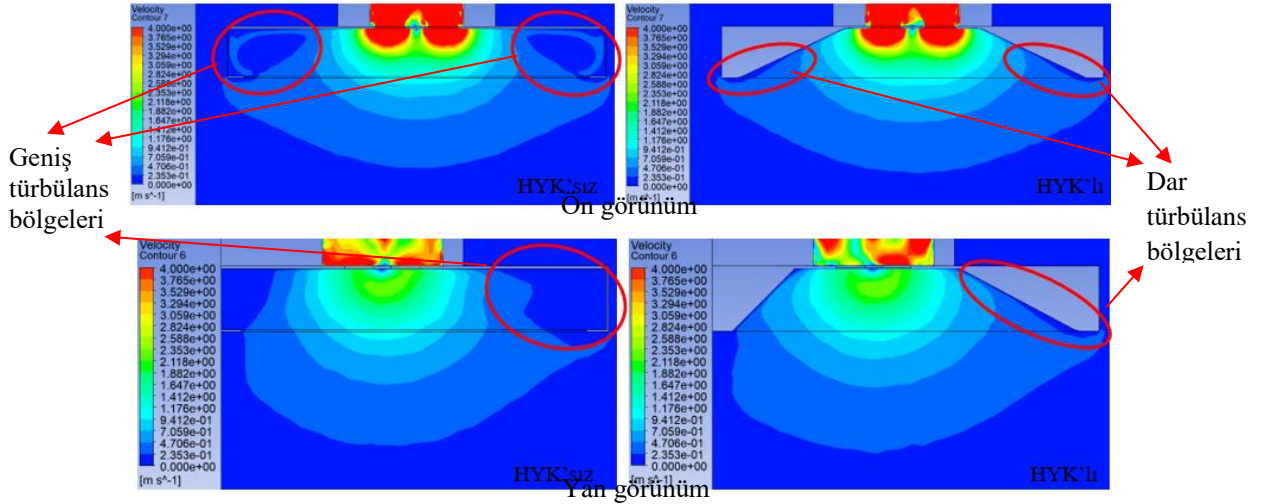
Şekil 9,  $250 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$  debide, Düzlem 1 üzerinde oluşan hava hızı dağılımını göstermektedir. Şekil 9 incelendiğinde, davlumbaza eklenen HYK sayesinde yakalama hızında oluşan artış görülmektedir. Şekil 10,  $250 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$  debide Düzlem 0'da oluşan  $0.35 \text{ m s}^{-1}$  ve üzeri hızların dağılımını göstermektedir. Bu hızların, HYK'sız modelde  $0.1022 \text{ m}^2$  ve HYK'lı modelde  $0.1213 \text{ m}^2$  alana yayıldığı görülmektedir. Şekil 10 incelendiğinde, HYK'lı modelde hava hızlarının daha homojen dağıldığı görülmektedir. Davlumbaza eklenen HYK sayesinde, davlumbaz emiş alanı ( $0.35 \text{ m s}^{-1}$  ve üzeri oluşan hızlarda) %16 arttırılmıştır.



Şekil 9. Düzlem 1'de oluşan hava hızı dağılımı

Şekil 10. Düzlem 0'da oluşan 0.35 m s<sup>-1</sup> ve üzeri hava hızı dağılım alanı

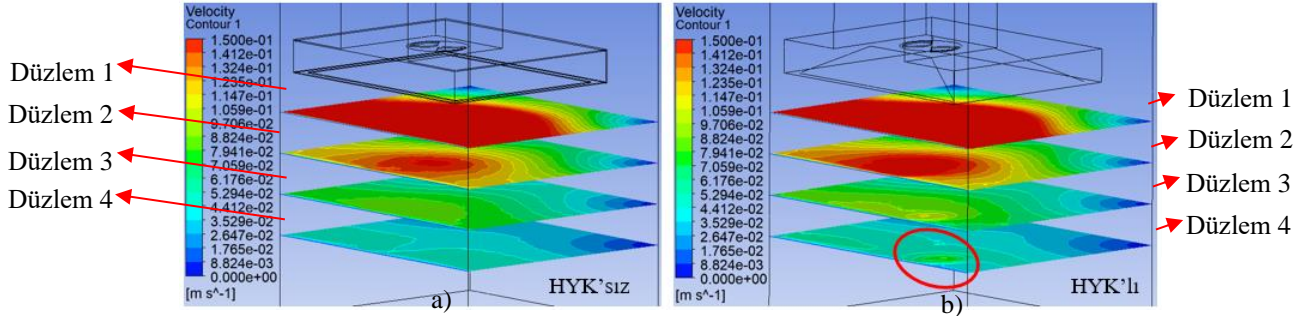
Analiz geometrisi ortasında oluşturulan, ön ve yan düzlemler üzerinde oluşan hava hızı dağılımları Şekil 11'de gösterilmiştir. HYK'sız modelde oluşan hava hızı dağılımı incelendiğinde, türbülanslı bölge net olarak görülmektedir. HYK'lı modelde oluşan hava hızı dağılımları incelendiğinde, daha homojen bir hava hızı dağılımı görülmektedir. Literatüre (Pinelli ve Suman, 2014; Logachev ve ark., 2018) benzer olarak, davlumbaza eklenen HYK kenarlarında dar türbülans bölgeleri oluşmuştur. Bu bölgede oluşan türbülans, HYK konumlandırma açısından kaynaklı sürtünme kuvveti sonucu oluşmuştur.



Şekil 11. Ön ve yan görünümünden davlumbaz hava hızı dağılımı

Yapılan analizler sonucu davlumbaz yakalama alanında oluşan hava akışını görebilmek için davlumbaz alt kısmına 4 adet düzlem tanımlanmıştır. Şekil 12.a ve b, düzlemlerde oluşan hava hızı dağılımını göstermektedir. Şekil 12.a incelendiğinde, davlumbazdan 400 mm aşağıda olan düzlemde (Düzlem 4) hava akışının ayrımı daha net görülmektedir. Analiz sonucu tüm düzlemlerde, HYK eklenmiş olan modelde (Şekil 12.b) hava hızlarının daha yüksek olduğu görülmektedir. Analizler sonucu, yakalama hızları incelendiğinde literatüre benzer olarak, davlumbaz merkezinden uzaklaştıkça

hava hızlarının azaldığı görülmüştür (Chen ve ark., 2018). Literatür araştırmaları sonucu, davlumbaz performansında emiş alanında oluşan partikül yakalama hızının etkili olduğu görülmüştür. Yapılan tasarım optimizasyonu sonucu, davlumbaza eklenen HYK sayesinde davlumbaz hava emiş alanında yakalama hızının arttığı görülmektedir.



Şekil 12. Davlumbaz yakalama alanında oluşan hava hızı dağılımı, a) HYK'sız model b) HYK'lı model

### Deneysel Sonuçlar

Davlumbaza eklenen HYK sayesinde, davlumbaz performansının arttığı sayısal analizlerde görülmüştür. Yapılan sayısal analizlerin doğrulanması için, 2 farklı davlumbaz modeli ile 8 farklı hacimsel debi değerinde, HAKV tam açık pozisyonda deneysel ölçümler (Çizelge 3) yapılmıştır. Deneyler için 2 farklı modele ait davlumbaz prototipleri (Şekil 2) hazırlanmıştır. Davlumbazlar sırası ile debi ve performans ölçüm test cihazına bağlanmıştır. Debi ve performans ölçümleri Şekil 3'te gösterildiği gibi, Avrupa Standardı'na (IEC 61591, 2019) uygun akredite bir laboratuvarda yapılmıştır. Deneylerde, sistem stabil olarak çalışana kadar beklenmiş ve daha sonra ölçümler yapılmıştır. Her bir deney 3'er defa tekrarlanmış ve ortalama değerler hesaplanmıştır.

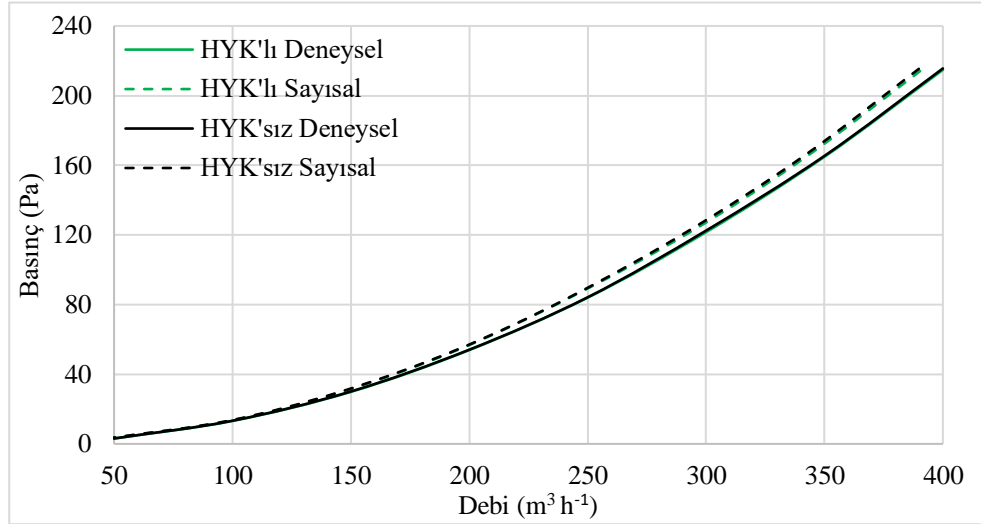
### Çizelge 3. Deneysel analiz sonuçları.

Deney numarası	Model	Valf pozisyonu	Debi ( $\text{m}^3 \text{h}^{-1}$ )	Basınç (Pa)	Yakalama hızı ( $\text{m s}^{-1}$ )
1	HYK'sız	Tam açık	50	3.1	0.13
2			100	13.3	0.28
3			150	30.1	0.41
4			200	54.1	0.54
5			250	84.2	0.70
6			300	122.5	0.83
7			350	165.4	0.93
8			400	215.6	1.09
9	HYK'lı	Tam açık	50	3.1	0.13
10			100	13.2	0.30
11			150	29.9	0.44
12			200	53.9	0.58
13			250	84.0	0.75
14			300	121.6	0.89
15			350	164.9	0.98
16			400	214.8	1.15

Deneyler sonucu, davlumbaza eklenen HYK sayesinde,  $50 \text{ m}^3 \text{h}^{-1}$  debi harici tüm debi koşullarında, davlumbaz yakalama hızında yaklaşık %6 artış sağlanmıştır. Deneylerde, yakalama hızı ile debi arasında güçlü bir korelasyon gözlemlenmiştir. Debinin arttırılması, yapılan diğer çalışmalara (Yi ve ark., 2016; Le Hocine ve ark., 2020) benzer olarak yakalama hızında doğrusal bir artışa yol açmıştır. Ayrıca HYK sayesinde, aynı debide, yakalama hızında artış sağlanırken gerekli olan sistem basıncında da tasarruf sağlanmıştır.

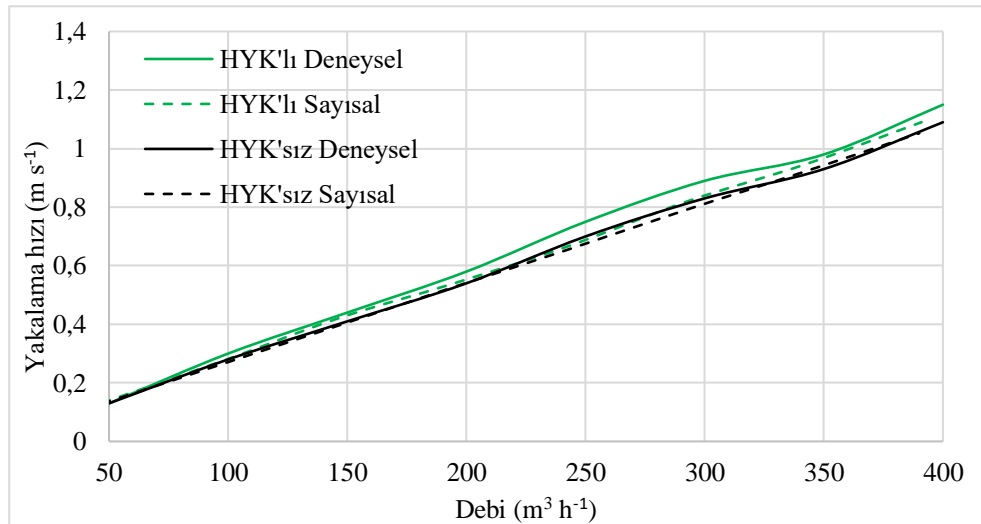


Şekil 13, deneyler sonucu her iki model için farklı debilerde gerekli olan sistem basınçlarını göstermektedir. Grafik incelendiğinde, aynı debi değeri için HYK'sız modelin daha fazla basınca ihtiyaç duyduğu görülmektedir. Bu gereksinim hem sayısal hem de deneysel sonuçlar ile doğrulanmıştır. Debi için gerekli olan sistem basıncı, deneysel ve sayısal analiz sonuçları (Şekil 13) karşılaştırıldığında, maksimum sapma %6 olmuştur.



Şekil 13. Deneysel ve sayısal analizler sonucu oluşan hacimsel debi-basınç değişimi

Şekil 14, deneyler sonucu her iki model için farklı debilerde hesaplanmış yakalama hızı sonuçlarını göstermektedir. Yapılan analizler sonucu davlumbaza eklenen HYK sayesinde, hava akış alanındaki istenmeyen ve akışı bozucu türbülans bölgelerinin oluşumu engellenerek davlumbaz yakalama performansında artış sağlanmıştır. Bu artış hem deneysel sonuçlarda hem de sayısal sonuçlarda rahatlıkla görülmektedir.



Şekil 14. Deneysel ve sayısal analizler sonucu oluşan hacimsel debi-yakalama hızı değişimi

## SONUÇ

Bu çalışmada, merkezi sistem mutfak davlumbazı 8 farklı debi koşulunda, gerekli sistem basıncı ve yakalama hızı sayısal analiz sonuçları incelenmiş ve deneysel sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. ANSYS Fluent yazılımı kullanılarak, davlumbaz debisinin ve tasarım parametrelerinin, davlumbaz hava akışı üzerindeki etkileri ayrıntılı olarak araştırılmıştır.

Sayısal analizlerin doğruluğunu kontrol etmek için, sayısal ve deneysel analiz sonuçları karşılaştırılmıştır. Yapılan doğrulama deneylerinde aynı ortam koşulunda debi sonuçlarında maksimum % 6 sapma olmuştur. Hem deneysel hem de sayısal analiz sonuçları uyumlu olduğundan oluşturulan sayısal yöntem güvenle kullanılabilir.

HYK'sız model davlumbaz emiş alanında türbülanslı akış oluşmuştur. Davlumbaza eklenen HYK sayesinde, hava akış alanındaki istenmeyen ve akışı bozucu türbülans bölgelerinin oluşumu engellenerek davlumbaz emiş alanında daha homojen bir hava hızı dağılımı olduğu görülmüştür.

250 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> debide Düzlem 0'da oluşan 0.35 m s<sup>-1</sup> ve üzeri hızların, HYK'sız modelde 0.1022 m<sup>2</sup> ve HYK'lı modelde 0.1213 m<sup>2</sup> alana yayıldığı görülmektedir. Davlumbaza eklenen HYK sayesinde, davlumbaz emiş alanı (0.35 m s<sup>-1</sup> ve üzeri oluşan hızlarda) %16 arttırılmıştır.

Deneyler sonucu, davlumbaza eklenen HYK sayesinde, 50 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> debi harici tüm debi koşullarında, davlumbaz yakalama hızında yaklaşık %6 artış sağlanmıştır. Deneylerde, yakalama hızı ile hacimsel debi arasında güçlü bir korelasyon gözlemlenmiştir. Ayrıca HYK sayesinde, aynı debide, yakalama hızında artış sağlanırken gerekli olan sistem basıncında da tasarruf sağlanmıştır.

İleriki çalışmalarda HAKV'nin tasarım parametrelerinin ve farklı açıklık konumlarında (1/2 açık 1/4 açık vb.) çalıştırılmasının performans üzerindeki etkilerinin araştırılması önerilmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmada hiçbir yardımı esirgemeyen Silverline Endüstri AŞ'ye ve çalışanlarına, ayrıca desteklerinden dolayı Ar-Ge analiz ve simülasyon süreç yöneticisi Halil KARTAL'a teşekkür ederiz.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Adamu BM, Yerima E, Bello MM, Umaru AN, 2017. Energy utilization in residential kitchens in bauchi, Nigeria. *Economic and Environmental Studies*, 17: 149-163.
- Anderson JO, Thundiyil JG, Stolbach A, 2012. Clearing the air: a review of the effects of particulate matter air pollution on human health. *Journal of Medical Toxicology*, 8: 166-175.
- Chen W, Liu J, Mak CM, Wang P, Zhao L, Wong HM, 2018. Near fields of annular slotted hoods measured via 2D-PIV. *Building and Environment*, 144: 1-8.
- Cooking Fume Extractors – Methods for Measuring Performance. In. 2019. IEC International: Standart.
- Dherani M, Pope D, Mascarenhas M, Smith KR, Weber M, Bruce N, 2008. Indoor air pollution from unprocessed solid fuel use and pneumonia risk in children aged under five years: a systematic review and meta-analysis. *Bulletin of the World Health Organization*, 86: 390-398C.
- Dominici F, Peng RD, Bell ML, Pham L, McDermott A, Zeger SL, Samet JM, 2006. Fine particulate air pollution and hospital admission for cardiovascular and respiratory diseases. *Jama*, 295: 1127-1134.
- Goel PS, Singh N, 1998. Creativity and innovation in durable product development. *Computers & industrial engineering*, 35:, 5-8.
- Hsiao SW, Chou JR, 2004. A creativity-based design process for innovative product design. *International journal of industrial ergonomics*, 34: 421-443.

- Huang Y, Wang Y, Ren X, Yang Y, Gao J, Zou Y, 2016. Ventilation guidelines for controlling smoke, dust, droplets and waste heat: Four representative case studies in Chinese industrial buildings. *Energy and buildings*, 128: 834-844.
- Kecel S, 2017. Preventing odor diffusion: an innovative hood design. *Gazi University Journal of Science*, 30: 1-13.
- Le Hocine AEB, Poncet S, Fellouah H, 2020. CFD modeling of the CO<sub>2</sub> capture by range hood in a full-scale kitchen. *Building and Environment*, 183: 107168.
- Lim K, Lee C, 2008. A numerical study on the characteristics of flow field, temperature and concentration distribution according to changing the shape of separation plate of kitchen hood system. *Energy and buildings*, 40: 175-184.
- Liu X, Wang X, Xi G, 2014. Orthogonal design on range hood with air curtain and its effects on kitchen environment. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 11: 186-199.
- Logachev K, Ziganshin A, Averkova O, Logachev A, 2018. A survey of separated airflow patterns at inlet of circular exhaust hoods. *Energy and buildings*, 173: 58-70.
- Oh YK, Kim YS, Yoon HS, 2008. A study on improvement capture velocity for increasing inhalation efficiency of hood in local ventilation system. Paper presented at the Advanced Materials Research, 47: 1039-1042.
- Özbaşı Y, Erzincanlı F, Nas E, Çeviksever T, 2020. The effect of the barrier mounted on the kitchen hood suitable for central ventilation systems on the odour extraction performance. *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7: 1015-1025.
- Pinelli M, Suman A. 2014. A numerical method for the efficient design of free opening hoods in industrial and domestic applications. *Energy*, 74: 484-493.
- Singer BC, Delp WW, Price P, Apte M, 2012. Performance of installed cooking exhaust devices. *Indoor Air*, 22: 224-234.
- Tielsch JM, Katz J, Thulasiraj RD, Coles CL, Sheeladevi S, Yanik EL, Rahmathullah L, 2009. Exposure to indoor biomass fuel and tobacco smoke and risk of adverse reproductive outcomes, mortality, respiratory morbidity and growth among newborn infants in south India. *International journal of epidemiology*, 38: 1351-1363.
- Wilcox D. C. "Formulation of the  $k-\omega$  turbulence model revisited". 45th AIAA Aerospace Sciences Meeting. Reno, NV, USA. AIAA Paper 2007-1408. 2007.
- Wu WC, Liou JY, 2019. Numerical simulation of harmful gas distribution in a range hood with an improved flow channel. *Microelectronics Reliability*, 99: 245-261.
- Yi KW, Kim YI, Bae GN, 2016. Effect of air flow rates on concurrent supply and exhaust kitchen ventilation system. *Indoor and Built Environment*, 25: 180-190.
- Zhou B, Wei P, Tan M, Xu Y, Ding L, Mao X, Kosonen R, 2019. Capture efficiency and thermal comfort in Chinese residential kitchen with push-pull ventilation system in winter-a field study. *Building and Environment*, 149: 182-195.

**Atf İçin:** Arslan F M, Taşlıca S, Karakurt Ç, Gürlek G, 2022. İnsan Canlı Dokusuna Yerleştirilen Termoelektrik Jeneratörden Elde Edilen Güce Farklı Parametrelerin Etkisi. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 378-388.

**To Cite:** Arslan F M, Taşlıca S, Karakurt Ç, Gürlek G, 2022. The Effect of Different Parameters on The Amount of Obtained Power The Thermoelectric Generator Placed in The Human Living Tissue. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 378-388.

### The Effect of Different Parameters on the Amount of Obtained Power the Thermoelectric Generator Placed in the Human Living Tissue

Feyzullah Mertkan ARSLAN<sup>1</sup>, Simge TAŞLICA<sup>1</sup>, Çağan KARAKURT<sup>1</sup>, Gökhan GÜRLEK<sup>1\*</sup>

**ABSTRACT:** Studies on thermoelectric generators (TEG) are becoming widespread day by day and the diversity of usage areas of generators is increasing. Individuals using TEG modules appear to be able to produce the required electricity for various uses from their own bodies. It is hoped that electricity will be generated from TEG modules that will be implanted in the human body because of this foresight. In order to obtain power from these TEG modules, which can be used for implantable devices, the temperature difference in different parts of the body is used. In the study, a thermal model of human living tissue was examined to investigate parameters affecting energy harvesting from human with TEG. A realistic TEG model was determined to accurately calculate the power generated by TEG. The thermal model was applied with using the finite volume method (FVM). Four important factors that affect generated power by TEG were chosen such as fat thickness ( $L_{fat}$ ), leg length of TEG ( $L_{leg}$ ), convection boundary condition on skin ( $h_{skin}$ ) and heat generation of muscle tissue ( $Q_{gen}$ ). The effects of these factors on temperature difference of TEG legs and power output were investigated using  $2^k$  factorial design method. As a result, maximum and minimum values were found as 0.26 °C and 1.13 °C respectively for the temperature difference between legs. According to these temperature difference values, the power outputs obtained from the TEG module are 3.86  $\mu$ W and 55.54  $\mu$ W, respectively. In addition,  $L_{leg}$ ,  $h_{skin}$  and  $Q_{gen}$  have a positive effect on TEG power output. As analysis of variance (ANOVA) result, the percentage contribution of factors A and B is high, so they have strong effects on both responses.

**Keywords:** Thermoelectric generator, energy harvesting from human body, thermal model of human tissues

Feyzullah Mertkan ARSLAN ([Orcid ID: 0000-0001-8359-7743](#)), Simge TAŞLICA ([Orcid ID: 0000-0002-5384-9812](#)), Çağan KARAKURT ([Orcid ID: 0000-0003-0907-7509](#)), Gökhan GÜRLEK ([Orcid ID: 0000-0001-5324-1818](#)), Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Makina Mühendisliği Bölümü, İzmir, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Gökhan Gürlek, e-mail: gokhan.gurlek@ege.edu.tr

Makale, 19-21 Kasım 2020 tarihlerinde Kayseri’de düzenlenen “International Conference on Energy, Environment and Storage of Energy, ICEESEN2020” kapsamında sözlü sunum olarak sunulmuştur.

## INTRODUCTION

There are several reasons for the growing interest in thermoelectric applications. The emergence of semiconductor materials, which are found to have much higher thermoelectric performance than pure metals, has accelerated the researches. On the other hand, the expectation of producing clean, quiet and low-cost energy has also spread the use of thermoelectric generators (Chakraborty et al., 2006). Looking at the basis of thermoelectric power generation technology, it is seen that a thermoelectric generator consisting of p-type and n-type semiconductors directly transforms the thermal energy created by the temperature difference caused by the hot and cold surfaces of it into electrical energy (Liu et al., 2016). In order to utilise these thermoelectric power generators, which generate electricity from temperature differences according to the Seebeck effect, in energy harvesting applications, research and efficiency-enhancing applications are continuing (Şener et al., 2021).

TEG modules have found very different usage areas especially in recent years. Perhaps the most important of these areas is medical practice. It is aimed to obtain electricity power by using a person's body temperature and to use this power in different areas. The studies conducted to obtain the power required to operate the auxiliary implanted devices in the body or to obtain power for the devices used as accessories come to the fore (Yang et al., 2007).

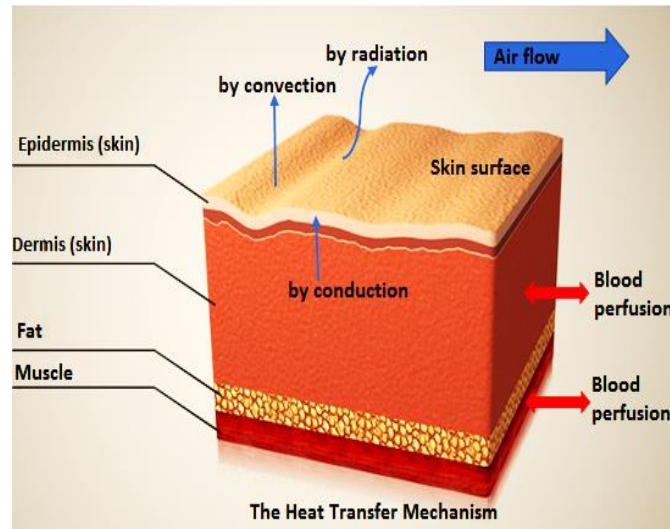
The most important problem for implantable devices is energy supply. Short-lasting batteries that do not match the life time of the patient are generally used. This means that the patient is going to undergo surgery to insert a new battery. Various studies have been conducted, such as the use of glucose as a fuel in the body to extend battery life. As the most recent studies, thermoelectric systems using body temperature have been found more applicable (Yang et al., 2007). Whether the power generated by thermoelectric generators corresponds to the power consumed by implantable medical devices is one of the biggest question marks. The power consumed by the implanted medical devices actually used is between a few microW and mW. The amount of required power of these devices to operate is given in the Table 1 (Schmidt and Skarstad, 2001).

**Table 1.** Power requirement for implanted devices to operate (Schmidt and Skarstad, 2001)

Implanted device	Application subject	Power requirement
Cardiac defibrillator	Ventricular tachycardia or fibrillation	30-100 $\mu$ W
Cardiac pacemaker	Conduction disorders	30-100 $\mu$ W
Neurological stimulator	Essential tremor	30 $\mu$ W to several mW
Drug pump	Spasticity	100 $\mu$ W to 2 mW
Cochlear implants	Help listening	Several $\mu$ W to 10 mW

A lot of research has been done on the development of suitable thermoelectric generators for the needs. Chen and Wright demonstrated the implantable left ventricular assist device (LVAD) and deep brain neurological stimulator as devices that can be operated with a thermoelectric generator (Chen and Wright, 2012). The tissue close to the skin surface can be modeled as three layers consisting of muscle, fat and epidermis (skin). Previous studies have shown that a 1-5 K temperature gradient is present in adipose tissue (Yang et al., 2007). Studies have shown that the maximum temperature gradients are in the upper back and abdomen during rest. This temperature change is between 1 and 2 K. A maximum temperature gradient of 4.75 K is observed in the abdominal region in case of exposure to high convective effects during running or in windy areas. As a result of the researches, it has been determined that the temperature differences in the abdominal region are higher in different physical exercises compared to other regions (Yang et al., 2007). In addition to this study, Yuan et al. analyzed the thermal model of human tissue with an implanted thermoelectric generator. They examined the effect of convection on the skin surface and the effects of film coefficient and ambient temperature (Yuan et al., 2018). Power was obtained with thermoelectric generators placed on four body areas, including forehead, wrist, palm and calf, and performances during different activities (resting, walking and running, etc.) were examined. It was observed that the highest power generation occurred during running

activity and in the forehead region and was 9.5 mW. In case the body temperature was above 35 °C, at least 5 mW of power was obtained with thermoelectric generators (Rosli and Mohamed, 2018).



**Figure 1.** The heat transfer mechanism in human living tissue.

When the studies on the subject are investigated, in this study, the parameters affecting the power to be obtained from the human body with the TEG module were examined and the thermal model of human living tissue was created. While creating the thermal model, the heat transfer mechanism in human living tissue shown in Figure 1 was used. In order for the thermal model to work correctly and to calculate the power obtained from the module exactly, a realistic TEG model is used. Four essential factors determining the power produced by TEG ( $L_{leg}$ ,  $L_{fat}$ ,  $h_{skin}$ , and  $Q_{gen}$ ) were chosen for this purpose. The effects of these factors on power output were analysed using a statistical method. Two levels in the appropriate range were determined for these 4 factors. Thus, contribution rates on response (power output of TEG) and interactions of factors can be analysed properly. Open source RStudio software was used for all statistical calculations.

The original side of the study is to perform the thermal analysis of the thermoelectric module implanted inside the human body and to determine how the four essential factors affect the results with the statistical analysis method.

## MATERIALS AND METHODS

### Numerical Model

#### Tissue model

In the study, 3D heat transfer model of living tissues is established. To model the heat transfer of human tissues, a rectangular prism shaped area was chosen (35mm width x 35mm depth). Geometric and thermophysical properties of muscle, fat and skin are shown in Table 2. In order to investigate the effect of fat tissue thickness on TEG power output, fat thicknesses of the model are selected 12 mm and 30 mm (Ishida et al., 1992; Hoffmann et al., 1994; C. D. Yuan et al., 2018).

**Table 2.** Geometric and thermophysical properties of tissues \*(Ishida et al., 1992) \*\*(Hoffmann et al,1994) \*\*\*(C. D. Yuan et al., 2018)

Properties	Fat	Muscle	Skin
Thickness (mm)	12 -30 *	15 *	1.57 **
Density (kg m <sup>-3</sup> ) ***	911	1090.4	1109
Heat capacity (j kg <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ) ***	2348.3	3421.2	3390.5
Thermal conductivity (W m <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ) ***	0.21	0.49	0.37

Significant change in temperature gradient is seen in the fat layer close to the skin. The temperature gradient in the fat layer is primarily a function of blood perfusion rate, near-skin convective heat transfer coefficient, and skin temperature. The heat transfer mechanism within the tissue near the skin surface can be calculated using a 1-dimensional tissue model based on the Pennes Bio-heat equation (Chen and Wright, 2012),

$$\rho_t c_t \frac{\partial T_t}{\partial t} = \nabla(k_t \nabla T_t) + q_{met}'' + \omega \rho_b c_b (T_a - T_v) \quad (1)$$

where,  $\rho_t$ ,  $c_t$ ,  $k_t$  and  $T_t$  represent density ( $\text{kg m}^{-3}$ ), heat capacity ( $\text{J kg}^{-1}\text{K}^{-1}$ ), thermal conductivity ( $\text{W m}^{-1}\text{K}^{-1}$ ) and temperature (K) of the tissue, respectively.  $\rho_b$  and  $c_b$  are density and heat capacity values of the blood.  $q_{met}$  is metabolic heat generation rate ( $\text{W m}^{-3}$ ).  $\omega$  is blood perfusion rate ( $\text{s}^{-1}$ ).  $T_a$  is the deep-body arterial temperature (K) and  $T_v$  is the venous (the skin temperature) temperature (K). In this paper,  $T_a$  was assumed as constant at 310 K (Chen and Wright, 2012). In addition, it is assumed that the rate of metabolic heat production is only in muscle tissue. Since the thermal conductivity of fat tissue is lower, the temperature gradient is higher under steady state condition. Therefore, in this study TEG module was implanted in fat tissue.

Convective heat flux on skin surface can be calculated by applying Newton's law of cooling (Wijethunge et al., 2018).

$$q_c'' = h_{skin} (T_{skin} - T_{air}) \quad (2)$$

where,  $T_{skin}$  and  $T_{air}$  are the upper skin temperature (K) and air temperature (K), respectively. The air temperature was chosen as 295 K.

**Table 3.** Convective heat transfer coefficient of skin (Chen and Wright, 2012)

Condition	Equation	Velocity ( $\text{m s}^{-1}$ )
Seated	$h_{skin} = 8.3 v^{0.6}$	$v = \text{air velocity}$
Waking or Running	$h_{skin} = 8.6 v^{0.56}$	$v = \text{moving velocity}$

The convection heat transfer coefficient used in the heat model is shown in Table 3 (Chen and Wright, 2012).  $h_{skin}$  ( $\text{W m}^{-2}\text{K}^{-1}$ ) is calculated differently while seated and in moving. The radiative heat flux on the skin is given as follows,

$$q_r'' = \varepsilon \sigma (T_{air}^4 - T_{skin}^4) \quad (3)$$

where,  $\sigma$  ( $\text{W m}^{-2}\text{K}^{-4}$ ) is Stephan Boltzmann constant and  $\varepsilon$  is skin emissivity and it is regarded as being 0.94 (Wijethunge et al., 2018). Heat loss by evaporation from skin is given by equations (4-7).  $q_e$  indicates the evaporating heat loss ( $\text{W m}^{-2}$ ) caused by sweat secretion. It consists of the sum of implicit sweat secretion  $q_{dif}$  ( $\text{W m}^{-2}$ ) and explicit sweat secretion  $q_{rsw}$  ( $\text{W m}^{-2}$ ).

$$q_e'' = q_{dif}'' + q_{rsw}'' \quad (4)$$

$$q_{dif}'' = 3.054(0.256T_{skin} - 3.37 - p_a) \quad (5)$$

$$q_{rsw}'' = 16.7h_{skin}W_{rsw}(0.256T_{skin} - 3.37 - p_a) \quad (6)$$

$$p_a = \phi_a p_a^* \quad (7)$$

where,  $W_{rsw}$  is skin humidity,  $p_a$  (kPa) is vapor pressure in ambient air,  $p_a^*$  (kPa) is saturated vapor pressure at surrounding air temperature and  $\phi_a$  is relative humidity of surrounding.

### Thermoelectric model

TEGs are devices that convert heat energy resulting from temperature difference into electrical energy (Siddique et al., 2017). These devices usually contain that thermoelement materials consisting of p and n semiconductors, the binding material that connects them and ceramic materials that hold the module together (Soleimani et al., 2020).  $\text{Bi}_2\text{Te}_3$  and  $\text{Sb}_2\text{Te}_3$  materials are generally used for

thermoelements which have high Seebeck coefficient and low electrical resistance. In this study, materials were chosen Bi<sub>2</sub>Te<sub>3</sub> and Sb<sub>2</sub>Te<sub>3</sub> for n-type and p-type semiconductors, copper as connecting and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> as substrate. These thermocouples are connected in series with each other and thermally in parallel by the top and bottom copper layers (Soleimani et al., 2020), (Nguyen Huu et al., 2018). Air is used as filling material. Properties of TEG materials are summarized in Table 4 (Soleimani et al., 2020), (Wang et al., 2013).

In this table,  $c_p$  is specific heat capacity (j kg<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup>),  $k$  is thermal conductivity (W m<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup>),  $\rho$  is density (kg m<sup>-3</sup>),  $\alpha$  is Seebeck Coefficient (V K<sup>-1</sup>),  $r_e$  is electrical resistivity ( $\Omega$ m),  $\sigma$  is electrical conductivity (S m<sup>-1</sup>),  $A$  is cross-sectional area and  $L_{leg}$  is thermocouple leg length (m). In this paper, 144 rectangular shaped p-type and n-type thermoelectric legs were used. Leg dimension is 1.6mm (and 3.2 mm) height, 1.4mm width and 1.4mm depth. The thicknesses of TEG electrodes and substrate are 0.1mm and 1 mm respectively, and the TEG size is 30mm × 30mm × 3.8mm (Nguyen Huu et al., 2018).

**Table 4.** Properties of TEG materials (Nguyen Huu et al., 2018). \*(Soleimani et al., 2020) \*\* (Wang et al., 2013)

	Bi <sub>2</sub> Te <sub>3</sub>	Sb <sub>2</sub> Te <sub>3</sub>	Cu	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
$c_p$	198	214	385 *	730 *
$k$	1.6	1.6	400 *	35 *
$\rho$	7670	6440	8960 *	3965 **
$\alpha$	-2.1 x 10 <sup>-4</sup> *	1.89 x 10 <sup>-4</sup> *	-	-
$r_e$	15 x 10 <sup>-6</sup>	25 x 10 <sup>-6</sup>	1.6 x 10 <sup>-8</sup> **	-
$\sigma$	1.08 x 10 <sup>6</sup> *	1.27 x 10 <sup>6</sup> *	5.99 x 10 <sup>7</sup> *	-
$A$	1.96 x 10 <sup>6</sup>	1.96 x 10 <sup>6</sup>	1.4 x 10 <sup>7</sup>	-
$L_{leg}$	1.6	1.6	-	-

The energy obtained from the temperature difference between the thermocouple legs is due to the Seebeck effect. For this reason the output voltage varies depending on the temperatures difference (C. Yuan et al., 2020). The following equations are used to calculate the output power (Jaziri et al., 2020). Formula of the output voltage (V) is given as,

$$V_{out} = N\alpha_{p-n}\Delta T \tag{8}$$

where,  $N$  is number of thermocouple pairs,  $\alpha_{p-n}$  (V K<sup>-1</sup>) is difference of Seebeck coefficients of  $p$  - $n$  semiconductors and the  $\Delta T$  (K) is temperature difference between the TEG legs.

Another parameter affecting the output power is the internal resistance ( $\Omega$ ) and its formula follows as,

$$R_{TEG} = N \left( \frac{r_{ep}L_p}{A_p} + \frac{r_{en}L_n}{A_n} + 2 \frac{r_{ec}L_c}{A_c} \right) \tag{9}$$

where  $r_e$ ,  $L$  and  $A$  are respectively thermoelements and contacts electrical resistivities ( $\Omega$ m), lengths (m) and cross-sectional areas (m<sup>2</sup>). Subscripts  $p$ ,  $n$  and  $c$  represent  $p$ -type semiconductor,  $n$ -type semiconductor and the copper. The power output of TEG calculated with Equation 10.

$$P = V_{out}^2 \frac{R_L}{(R_{TEG} + R_L)^2} \tag{10}$$

$R_L$  ( $\Omega$ ) is external load and when  $R_L$  has the same value with  $R_{TEG}$ , the maximum power (W) is calculated as Equation 11.

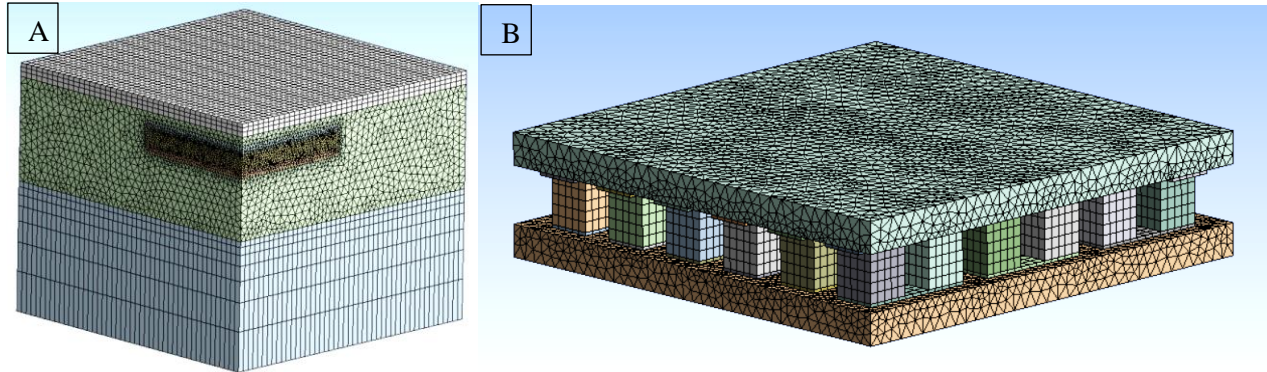
$$P_{max} = \frac{V_{out}^2}{4R_{TEG}} \tag{11}$$

**Boundary condition and mesh model**

All numerical model computations were performed using ANSYS software. In the numerical model, the symmetry boundary condition was used for two surfaces to save computation time. Convection boundary condition was applied on the skin surface. The temperature boundary condition ( $T_a = 310$  K) was given to the lower surface of the muscle tissue. In addition, a volumetric heat source was given to the muscle tissue (420 W m<sup>-3</sup> – 20.000 W m<sup>-3</sup>).



Energy equation was discretized by using the finite volume method (FVM). A range of 496.774 – 750.314 number of elements were used in the muscle, fat, skin and TEG domains. Hexahedral grid structure was used for muscle, skin and TEG legs, and tetrahedral grid structure was used for fat tissue and other TEG components. The mesh structure of the numerical model is shown in Figure 2.



**Figure 2.** A) Mesh structure of living tissues and TEG domains. B) Mesh structure TEG domains (except filling domain).

Figure 3 shows the mesh structure of the TEG domain, omitting the filling domain. The mesh structure on the legs is separated into five portions to see the temperature distribution properly.

## 2<sup>k</sup> Factorial Design

Generally, factorial designs are represented in the form of  $S^k$ ,  $S$  and  $k$  indicate that number of level and  $k$  number of factors, respectively (Ryan, 2007).

The  $2^k$  factorial design is particularly useful in the early stages of experimental study. It allows the investigation of many factors that affect the response of the experiment. Because in a complete factorial design,  $2^k$  design provides the least number of runs. Since there are two levels for each factor, the response is assumed to be approximately linear over the range of factor levels. Although the assumption of linearity in factor effects in  $2^k$  design is a potential concern, they linearity need not be perfect. If interaction terms are added to the first order regression model, the equation can be written as follow,

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon \quad (12)$$

where,  $y$  indicates response,  $\beta$  is regression model coefficients,  $x$  coded variable and  $\epsilon$  is random error (Montgomery, 2013).

Data transformations are an effective way of dealing with non-normal responses and related variance inequality problems. Box - Cox method can be used to choose the transformation form effectively. Log transformation is one of these transformations and is given as (Montgomery, 2013),

$$y^* = \ln(y) \quad (13)$$

## RESULT AND DISCUSSION

In the study, the effect of four important factors on temperature difference of TEG legs and on power output of TEG was investigated with using the unreplicated  $2^5$  design method. Factor and level data are shown in Table 5. Fat thickness,  $L_{fat}$ , was selected as 12 mm and 30 mm. Heat generation,  $Q_{gen}$ , has been considered to occur only in muscle tissue. In order to examine the change in TEG power generation of heat transfer through the skin, a convection boundary condition was applied to the skin surface ( $h_{skin}=10 \text{ W m}^{-2}\text{K}^{-1}$  -  $80 \text{ W m}^{-2}\text{K}^{-1}$ ). Only leg length,  $L_{leg}$ , was changed for the same TEG parameters.

The Effect of Different Parameters on the Amount of Obtained Power the Thermoelectric Generator Placed in the Human Living Tissue

Table 5. Skin and TEG factors

Factors	Parameters	Low (-1)	High (+1)
A	$L_{fat}$	12 mm	30 mm
B	$L_{leg}$	3.8 mm	7 mm
C	$h_{skin}$	10 W m <sup>-2</sup> K <sup>-1</sup>	80 W m <sup>-2</sup> K <sup>-1</sup>
D	$Q_{gen}$	420 W m <sup>-3</sup>	20000 W m <sup>-3</sup>

As an additional information, the place of TEG in fat tissue is not included as a factor. Because, it is assumed that there is no heat generation in the fat tissue and the thermal conductivity of tissues are not temperature dependent. Thus, the temperature gradient of fat tissue is constant. Steady state heat conduction equation in fat tissue is given as (Çengel and Ghajar, 2015),

$$\frac{d^2T}{dx^2} = 0 \tag{14}$$

In fat tissue, the temperature distribution will be linear. Therefore, the temperature difference between the p and n legs of TEG does not change in any part of the fat tissue.

The numerical computation pattern of the 2<sup>4</sup> factorial design is given in Table 6. This table includes 4 factors and their combinations. Besides, result of this combination, there are 2 response output (Table 6). The maximum and minimum value of the temperature difference (ΔT) between legs are 0.26 °C and 1.13 °C, respectively. The maximum value of temperature difference occurs with high factors B, C, D and low A factor. Maximum and minimum values for TEG power output ( $P_{max}$ ) are 3.86 μW and 55.54 μW, respectively. In addition, the temperature on the skin varies between 298.67 K and 305.57 K. It is obvious that the increase in fat thickness negatively affects to the ΔT and  $P_{max}$ . These results support the study in reference (Yang and Liu, 2010). However, whether there is an interaction between the factors and the effects of these factors on the responses are evaluated in detail with the analysis of variance (ANOVA) model.

Table 6. Numerical computation plan and corresponding results of 24 factorial design

Run	Factors				Responses	
	A	B	C	D	ΔT (°C)	$P_{max}$ (μW)
1	12	1.6	4.03	420	0.31	8.35
2	30	1.6	4.03	420	0.21	3.86
3	12	3.2	4.03	420	0.62	16.81
4	30	3.2	4.03	420	0.44	8.56
5	12	1.6	12.42	420	0.42	15.13
6	30	1.6	12.42	420	0.26	5.84
7	12	3.2	12.42	420	0.86	32.38
8	30	3.2	12.42	420	0.53	12.22
9	12	1.6	4.03	20000	0.39	13.22
10	30	1.6	4.03	20000	0.28	6.61
11	12	3.2	4.03	20000	0.83	29.85
12	30	3.2	4.03	20000	0.57	13.98
13	12	1.6	12.42	20000	0.55	24.85
14	30	1.6	12.42	20000	0.34	9.79
15	12	3.2	12.42	20000	1.13	55.44
16	30	3.2	12.42	20000	0.69	20.5

The temperature distribution over the tissue is shown in Figure 3 A. The temperature begins from 37 °C on the lower surface of the muscle tissue and dropped to 29.9 °C on the skin.

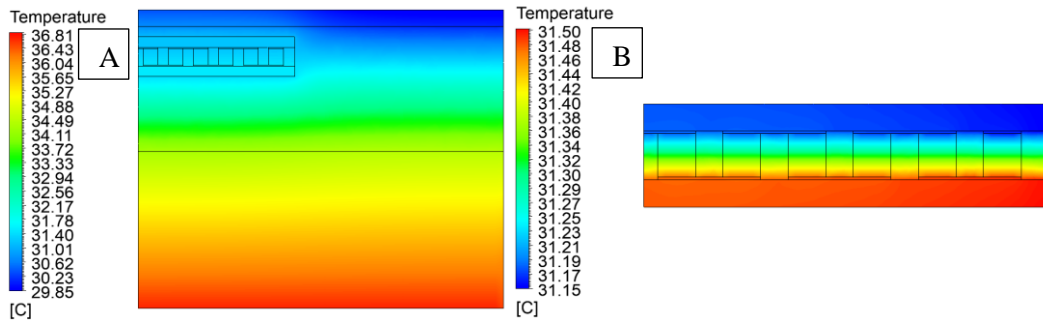


Figure 3. A) Main effects plots for mean response (symmetric model) B) Main effects plots for mean response (symmetric model).

Figure 3 B shows the temperature distribution over the TEG. While the average temperature on the lower leg surface is 31.17 °C, the average temperature on the upper surface is 31.48 °C.

### ANOVA Results and Regression Model

Analysis of variance (ANOVA) statistical models is used to examine the effects of factors on the responses in more detail. As responses, the temperature difference  $\Delta T$  between legs and TEG max power output are selected. ANOVA calculations were carried out using the codes of the open source RStudio software. According to the Box-Cox method suggestion, calculations were performed using natural log transformation. Table 7 shows the ANOVA model of main effects and two-way interactions for  $\Delta T$ .

Table 7. ANOVA model for  $\Delta T$

Term	DF	SS	MS	F	P-value
A	1	0.71	0.71	3301.7	< 0.0001*
B	1	2.09	2.09	9682.2	< 0.0001*
C	1	0.26	0.26	1184.8	< 0.0001*
D	1	0.26622	0.27	1234.2	< 0.0001*
AB	1	0.00005	0.00005	0.2107	0.665
AC	1	0.014	0.014	66.2	0.00046*
AD	1	0	0	0.0028	0.96
BC	1	0	0	0.022	0.89
BD	1	0.0002	0.0002	0.91	0.38
CD	1	0	0	0.0046	0.95
Residuals	5	0.00108	0.00022		

\* indicates significant

where, *DF* is Degree of freedom, *SS* is sum of square, *MS* is mean square, *F* is F ratio and *P-value* is probability. The *P-value* is used to determine whether the main effects and interaction effects are significant. If *P-value* less than 0.05, the model parameters considered as significant (Yurata et al., 2020). Table 8 shows the ANOVA model of main effects and interaction effects of the  $P_{max}$ .

Table 8. ANOVA model for  $P_{max}$

Term	Df	Sum Sq	Mean Sq	F	P-value
A	1	31079,00	30713,00	3301.7	< 0.0001*
B	1	12086,00	12086,00	2696.2	< 0.0001*
C	1	44228,00	44228,00	1184.8	< 0.0001*
D	1	44348,00	44348,00	1234.2	< 0.0001*
AB	1	0.00018	0.00018	0.2107	0.67
AC	1	0.057	0.057	661951,00	0.00046*
AD	1	0,00	0,00	0.0028	0.96
BC	1	0.00002	0.00002	0.022	0.89
BD	1	0.00079	0.00079	0.9142	0.38
CD	1	0,00	0,00	0.0046	0.95
Residuals	5	0.00431	0.00086		

\* indicates significant

As a result of ANOVA models, Main effects (A, B, C and D) and AC interaction effects are significant on  $\Delta T$  and  $P_{max}$  responses. The main effect plot shown in Figure 6 is an efficient method of visualizing the effect size. The difference in mean response between two levels of a factor is the main effect. While B, C and D main effects have a positive effect on  $\Delta T$ , A has a negative effect (Ghotbi Ravandi et al., 2016).

The contribution of each term on the response is determined by the percentage contribution. It measures percentage contribution of each model term to the total sum of squares. The percentage contribution provides an overview of the relative importance of each model term (Montgomery, 2013). Contribution percentage of each model term is given in Table 9.

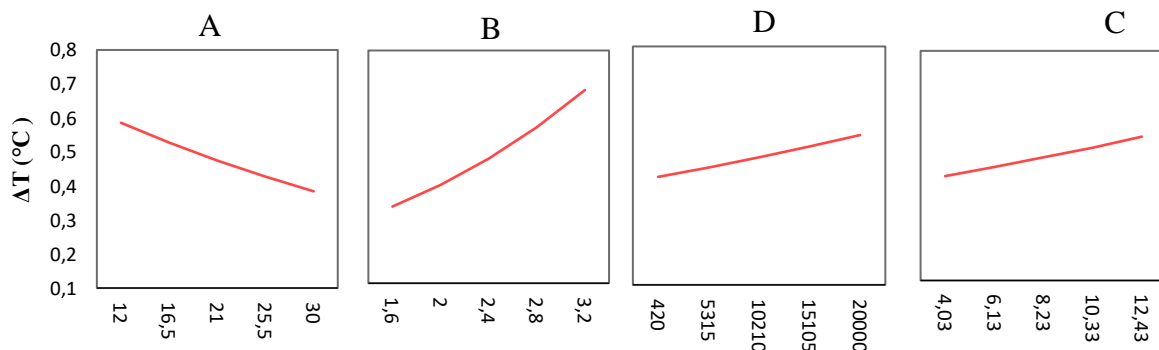


Figure 4. Main effects plots for mean response

Table 9. Percentage contribution of each term

Term	DF	SS	MS	F	P-value
A	1	0.71	0.71	3301.7	< 0.0001*
B	1	2.09	2.09	9682.2	< 0.0001*
C	1	0.26	0.26	1184.8	< 0.0001*
D	1	0.26622	0.27	1234.2	< 0.0001*
AB	1	0.00005	0.00005	0.2107	0.665
AC	1	0.014	0.014	66.2	0.00046*
AD	1	0	0	0.0028	0.96
BC	1	0	0	0.022	0.89
BD	1	0.0002	0.0002	0.91	0.38
CD	1	0	0	0.0046	0.95
Residuals	5	0.00108	0.00022		

Factors A and B have dominant effects on responses ( $\Delta T$  and  $P_{max}$ ) as their Contribution percentage are higher than other factors. While the percentage contribution of the factor B on  $\Delta T$  response is 62.59%, this value decreased to 31.79% on the  $P_{max}$ . The reason of this, as leg length of TEG increases, the internal resistance  $R_{TEG}$  also increases.

The two-way interaction AC has a small effect on both responses as contribution percentages are 0.43% and 0.78%.

The regression model for main factors and one significant interaction effects is expressed as,

$$\ln y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_4 D + \beta_5 AC \tag{14}$$

Table 10 shows the values of the constants ( $\beta$ ) of the regression model, y represent response and  $R^2$  is defined as the proportion of the variability in the data “explained” by the ANOVA.  $R^2$  ranges from 0 to 1 and it is desirable that the  $R^2$  value be close to the value 1 (Montgomery, 2013).

**Table 10.** The regression model constants

<i>Term</i>	<i><math>\Delta T</math></i>	<i>P<sub>max</sub></i>
$\beta_0$	-1.86E+00	1.42E+00
$\beta_1$	-1.69E-02	-3.39E-02
$\beta_2$	4.52E-01	4.77E-01
$\beta_3$	4.67E-02	9.35E-02
$\beta_4$	1.32E-05	2.64E-05
$\beta_5$	-7.91E-04	-1.58E-03
$R^2$	0.9994	0.9989

## CONCLUSION

In the study, a thermal model of human living tissue was investigated to determine parameters affecting temperature difference of TEG legs and power output (responses). In order to carry out a more realistic analysis, all components of the TEG have been added to the model. In addition, statistical models were used to better evaluate the output data. Four important factors were selected and their effects on responses were analysed statistically using  $2^k$  factorial design and ANOVA.

Maximum and minimum values are 0.26 °C and 1.13 °C respectively for the temperature difference,  $\Delta T$ , between legs. These values are 3.86  $\mu W$  and 55.54  $\mu W$  for TEG max power output ( $P_{max}$ ), respectively. As a result of ANOVA, main effects (A, B, C and D) and AC two-way interaction effects are statistically significant ( $P$ -value<0.05). The effects of B, C, D factors on  $\Delta T$  and  $P_{max}$  are positive. That is, the increase of these factors is provided to increase the  $\Delta T$  and  $P_{max}$  values. However, increasing the A factor has a negative effect on both responses.

Since, the percentage contribution of the A and B factors is high, they have strong effects on both responses. However, although the AC interaction effect is statistically significant, its effect on the response is very low (Table 9).

As a result, the amount of power generated by TEG implanted in human tissue is computed to be low (Table 6). However, these conclusions are based on numerical analysis under certain situations and not be exact. It will be beneficial to compare the acquired findings to the experimental data. TEG materials, on the other hand, are not yet biocompatible. However, in future investigations, the experimental procedure may be conducted on a portion of animal tissue that is closest to human tissue using standard TEG.

Designing TEGs are suitable for human tissue and increasing its efficiency by using more convenient materials will increase the TEG power output. Thus, it will be possible to meet the power requirements of biomedical devices implanted in the human body with implanted TEGs.

## Conflict of Interest

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

## Yazar Katkısı veya Author's Contributions

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

## REFERENCES

- Chakraborty A, Saha BB, Koyama S, Ng KC, 2006. Thermodynamic modelling of a solid state thermoelectric cooling device: Temperature–entropy analysis. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 49(19–20): 3547–3554.
- Chen A, Wright P, 2012. Chapter 26: Medical Applications of Thermoelectrics, Modules, Systems, and Applications in Thermoelectrics, pp. 1–22, CRC Press, Florida - United States.
- Çengel YA, Ghajar AJ, 2015. *Heat and mass transfer: Fundamentals & Applications (Fifth edition)*. McGraw Hill Education, United States.
- Ghotbi Ravandi E, Rahmangebadi R, Karimi-Nasab S, Sarrafi A, 2016. Sensitivity analysis of effective parameters on water curtain performance for crude oil storage in Iranian URC using the 2k factorial design and numerical modeling. *Tunnelling and Underground Space Technology*, 58: 247–256.
- Hoffmann K, Stucker M, Dirschka T, Goertz S, El-Gammal S, Dirting K, Hoffmann A, Altmeyer P, 1994. Twenty MHz B-scan sonography for visualization and skin thickness measurement of human skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 3(3): 302–313.
- Ishida Y, Carroll JF, Pollock ML, Graves JE, Leggett SH, 1992. Reliability of B-mode ultrasound for the measurement of body fat and muscle thickness. *American Journal of Human Biology*, 4(4): 511–520.
- Jaziri N, Boughamoura A, Müller J, Mezghani B, Tounsi F, Ismail M, 2020. A comprehensive review of Thermoelectric Generators: Technologies and common applications. *Energy Reports*, 6(7): 264–287.
- Liu KC, Chen YS, Chen MK, 2016. Test for Thermoelectric Self Cooling. *The International Conference on Computing and Precision Engineering (ICCPE 2015)*, August 02, 2016, 71: 05006.
- Montgomery DC, 2013. *Design and analysis of experiments (Eighth edition)*. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, United States.
- Nguyen Huu T, Nguyen Van T, Takahito O, 2018. Flexible thermoelectric power generator with Y-type structure using electrochemical deposition process. *Applied Energy*, 210: 467–476.
- Rosli N, Mohamed H, 2018. Experimental Study on the Use of Thermoelectric Generators in Harvesting Human Body Heat. *International Journal of Engineering & Technology*, 7(4.35): 264–269.
- Ryan TP, 2007. *Modern Experimental Design*. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, United States.
- Schmidt CL, Skarstad PM, 2001. The future of lithium and lithium-ion batteries in implantable medical devices, *Journal of Power Sources*, 97–98: 742–746,
- Şener M, Arslan FM, Gürses BO, Gürlek G, 2021. Experimental Investigation of Thermoelectric Self-Cooling System for the Cooling of Ultrasonic Transducer Drivers. *Journal of Polytechnic*, 1-1.
- Siddique ARM, Mahmud S, Heyst BV, 2017. A review of the state of the science on wearable thermoelectric power generators (TEGs) and their existing challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 73: 730–744.
- Soleimani Z, Zoras S, Cui Y, Ceranic B, Shahzad S, 2020. Design of heat sinks for wearable thermoelectric generators to power personal heating garments: A numerical study. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Sustainability in the built environment for climate change mitigation: SBE19 Thessaloniki, October 23-25, 2019, Thessaloniki, Greece*, 410: 012096.
- Wang W, Cionca V, Wang N, Hayes M, O’Flynn B, O’Mathuna C, 2013. Thermoelectric Energy Harvesting for Building Energy Management Wireless Sensor Networks. *International Journal of Distributed Sensor Networks*, 9(6):1-14.
- Wijethunge D, Kim D, Kim W, 2018. Simplified human thermoregulatory model for designing wearable thermoelectric devices. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 51(5): 055401.
- Yang Y, Liu J, 2010. Evaluation of the power-generation capacity of wearable thermoelectric power generator. *Frontiers of Energy and Power Engineering in China*, 4(3): 346–357.
- Yang Y, Wei XJ, Liu J, 2007. Suitability of a thermoelectric power generator for implantable medical electronic devices. *Journal of Physics D: Applied Physics - IOPscience*, 40(18): 5790–5800.
- Yuan CD, Jadhav OS, Rudnyi EB, Hohlfeld D, Bechtold T, 2018. Parametric model order reduction of a thermoelectric generator for electrically active implants. *19th International Conference on Thermal, Mechanical and Multi-Physics Simulation and Experiments in Microelectronics and Microsystems (EuroSimE), France, April 15-18, 2018*, pp:1–6.
- Yuan C, Kreß S, Sadashivaiah G, Rudnyi E B, Hohlfeld D, Bechtold T, 2020. Towards efficient design optimization of a miniaturized thermoelectric generator for electrically active implants via model order reduction and submodeling technique. *International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering*, 36(4):1-16.
- Yurata T, Piumsomboon P, Chalermssinsuwan B, 2020. Effect of contact force modeling parameters on the system hydrodynamics of spouted bed using CFD-DEM simulation and 2 factorial experimental design. *Chemical Engineering Research and Design*, 153: 401–418.

**To Cite:** Yazici MY, 2022. Thermal Management of Small-Scale Li-ion Battery Module Using Graphite Matrix Composite with Phase Change: Effect of Discharge Rate. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 389-402.

## Thermal Management of Small-Scale Li-ion Battery Module Using Graphite Matrix Composite with Phase Change: Effect of Discharge Rate

Mustafa Yusuf YAZICI<sup>1\*</sup>

**ABSTRACT:** An experimental study is performed to investigate the performance (thermally and electrically) of a small-scale li-ion module (3s2p) using passive thermal management strategy of phase change material (PCM)/graphite matrix. The PCM/graphite matrix was obtained by impregnating the graphite matrix (bulk density: 75 g L<sup>-1</sup>) with phase change material (paraffin/organic, RT-35). The performance tests of a li-ion module are conducted at 1C and 1.6C discharge rates for graphite matrix composite with phase change (phase change composite or PCM/graphite matrix) and also air cooling, comparatively. To illustrate the performance of the PCM/graphite matrix, transient temperature variations, thermal imaging, discharge capacity, and energy capacity are achieved comprehensively. The results illustrate that graphite matrix composite with phase change has a significant contribution to melting heat transfer, operating temperature, utilized capacity, and energy capacity compared to air cooling. Effective thermal conductivity of PCM/graphite matrix is increased 35 times by comparison with pure paraffin. Operating temperature and temperature gradient throughout the li-ion surface decrease by 22 % and 43 % compared to the air cooling, respectively, for high discharge rate. Operating time and energy capacity is increased 33 % and 28% compared to natural air cooling, respectively, for high discharge rate. It is also disclosed that dominant heat transfer mechanism is conduction depending on micro/nano-size porous structure of graphite matrix.

**Keywords:** Battery, cooling, graphite, li-ion, phase change material (PCM), thermal management

<sup>1</sup>Mustafa Yusuf YAZICI ([Orcid ID: 0000-0002-1076-9265](https://orcid.org/0000-0002-1076-9265)), Samsun Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Makine Mühendisliği Bölümü, Samsun, Türkiye

\*Corresponding Author: Mustafa Yusuf YAZICI, e-mail: myusuf.yazici@samsun.edu.tr

## INTRODUCTION

Li-ion batteries among battery technologies are the most promising power sources with no memory effect, lower self-discharge, lower mass density, higher energy density, and stable performance for EVs and also other applications such as electronics, robotics, aerospace, renewable energy sources, etc. One of the major hindrances regarding the li-ion is temperature-caused degradation. There are two main temperature concerns about li-ion batteries: unacceptable operating temperature, low-temperature uniformity. Adverse effects of temperature can be categorized as high temperature-performance degradation, thermal runaway, temperature maldistribution, and low-temperature behavior. The operating temperature of the li-ion battery needs to be kept within an acceptable narrow of 15°C - 35°C for optimum performance. Besides, temperature gradient among cells in the battery pack is desired to be less than 5 °C. Therefore, a well-designed battery thermal management system (BTMS) is required to ensure better battery performance and safety during charge/discharges (Liu et al., 2017; Landini et al., 2019; Zichen and Changqing, 2021).

BTMS through phase change material (PCM, solid/liquid) is an attractive way due to high energy storage capability and isothermally process. Besides, a PCM-based battery thermal management system ensures minimizing the complexity and providing weight, volume, power consumption, and noise. Nevertheless, thermal conductivity and leakage issues of PCM-based thermal management strategies for organic paraffin type are two main bottlenecks restricting usage of PCM-based technology. Lower thermal conductivity results in lower heat transfer rates and longtime solid/liquid phase transition process. Besides, form stable is not provided during the melting period. So, it requires encapsulation of PCM. This weakness of material depending on its nature can be improved using different methods investigating by researchers including increasing the heat transfer area (Aydin et al., 2018), geometric optimization (Yazici et al, 2014), dispersing particles (Arshad et al., 2020), metal matrix (Alhusseney et al., 2020), impregnated graphite foam/matrix (Py et al., 2001), encapsulation (Zhang et al., 2021).

Graphite matrix has an increasing research interest with its potential of high thermal conductivity thermal paths for heat dissipation and also encapsulation for preventing leakage issues. Graphite matrix achieves very low density, high porosity, high ratio heat transfer surface to volume, closest thermal conductivity to natural graphite, chemically non-reactive, and good mechanical properties. On the other side, the graphite matrix provides a porous medium for encapsulation. The liquid PCM is saturated/impregnated to the graphite matrix with the phenomena of surface tension and capillarity. To form shape-stabilized PCMs, impregnation encapsulation is shown to be a potential method by researchers (Zhang et al., 2021). This provides PCM to retain solid phase form without any leakage during melting.

Researches on thermal management of li-ion considering a PCM / graphite matrix-foam to ensure reliable operating temperatures are presented. Mills et al. (2006) first reported (within the authors' knowledge) an expanded graphite matrix for battery cooling. They revealed the potential of the PCM composite for passive thermal management systems. Kızılel et al. (2008) investigated the effect of the PCM/graphite matrix over conventional active cooling systems. The results showed that the surface temperature was lower when PCM was used. A numerical study was conducted to investigate the cooling performance of graphite matrix composite with phase change by Kizilel et al. (2009). Somasundaram et al. (2012) carried out a numerical study for cylindrical li-ion at different discharge currents. The results showed that lower temperature measurements were observed with a PCM/graphite. The thermal performance of composite PCM-based BTMS was performed by Greco et al. (2015). They observed that the relation between thermal conductivity and heat of fusion (latent heat) was significant. The authors also presented that the bulk density of the graphite matrix was a critical parameter for optimizing the



PCM/graphite matrix BTMS. Wilke et al. (2017) investigated the effect of the solid-liquid phase change composite (PCM/graphite matrix) on the thermal runaway for a single cell. Jiang et al. (2016) performed an experimental and numerical study on PCM-based battery thermal management. The expanded graphite-based phase change composite (EG/PCM slurry) was packed in aluminum tubes to improve the heat transfer via thermal conductivity. Wu et al. (2016) studied the effect of a copper mesh-enhanced paraffin/expanded graphite for thermal management of li-ion. Heat dissipation performance and temperature uniformity in better are provided in a better way by this method. A heat pipe-assisted PCM/EG-based BTMS was investigated by the same research group (Wu et al., 2017). Mallow et al. (2018) studied aluminum and graphite foam composites via saturation of PCM. He et al. (2019) developed composite PCM by introducing a thermal conductive skeleton of EG/copper foam for BTMS.

Because the li-ion battery is promising and updated technology in terms of an anode, cathode, electrolyte, etc., researches on thermal management are renewed by authors. From the cited literature, there are some studies on PCM/graphite matrix or foam for different li-ion chemistries or simulative batteries under various loading conditions. However, it is shown that the researches are needs to be expanded. Therefore, the goal of this study is to evaluate the effect of the phase transition phenomenon and porous media of PCM/graphite matrix on the heat dissipation process for battery thermal management, which is essential for better performance and safety requirements. Transient temperature recordings and thermal images are utilized under different discharge rates to illustrate the melting phase transition phenomenon and thermal energy storage behavior of graphite matrix composite with phase change. The electrical performance of the li-ion is presented by the way discharge and energy capacity variation. Free air cooling is also performed compared to the PCM/graphite matrix.

## MATERIALS AND METHODS

### Phase change material and phase change composite (PCM/graphite matrix)

As a heat storage material, organic-paraffin (RT35-Rubitherm) was used in this study. Paraffin has significant potential for heat absorption with its advantages including, high latent heat of fusion, stability in chemical/thermal, compatibility with materials, no phase segregation. The thermophysical properties of the paraffin and phase change composite (PCM/graphite matrix) are given in Table 1. Heat flow of materials was reported by DSC analysis (Hitachi-DSC 7020) in Figure1.

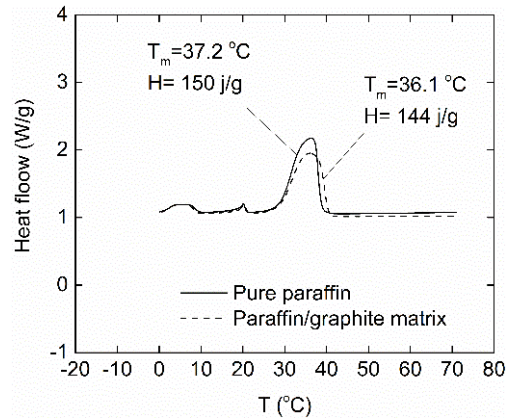
**Table 1.** Thermo-physical properties of the pure paraffin and phase change composite

Thermo-physical property	Pure paraffin	Phase change composite
Melting temperature (°C)	37.2	36.1
Latent heat (kJ kg <sup>-1</sup> )	150	144
Thermal conductivity (W m <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	0.2	7.2
Density (kg m <sup>-3</sup> ) (at 25 °C)	860	796

The graphite matrix was made by compacting expanded graphite (EG) to the desired bulk density. EG was achieved by rapid expansion and exfoliation of expandable graphite in a furnace over 900 °C for 60 seconds. A detailed description of the process of expanded graphite is presented in literature (Mills et al., 2006). For this investigation, expandable graphite (>%98 purity, 50 mesh, and 700 ml g<sup>-1</sup>) was supplied by Asbury Carbon, and EG was provided by heat treatment. Then, EG granules were compressed by a universal testing system (Instron 3382) to a bulk density of 75 g L<sup>-1</sup> graphite matrix.

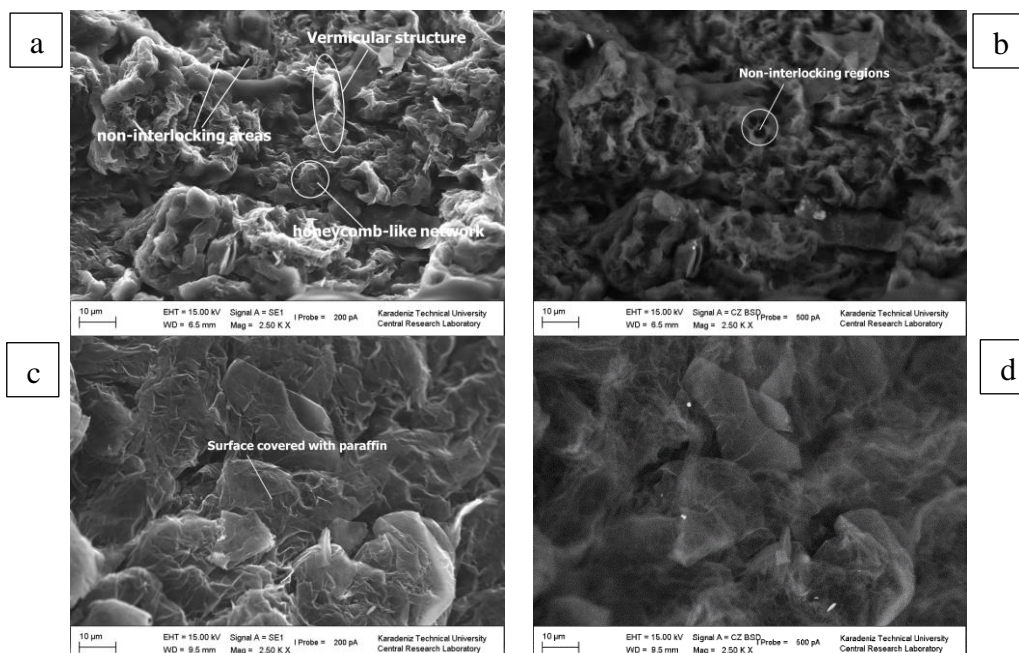
Graphite matrix with an overall dimension of 75mm x 52mm x 60mm (length x width x height) was manufactured for lower scale battery pack configuration (3s2p). The graphite matrix prepared for lower scale battery pack configuration was submerged in a melted paraffin bath (70°C) for about 4 hours

to complete saturation for producing PCM/graphite matrix composite. The graphite matrix was saturated with phase change material via capillary forces (Py et al., 2001; Mills et al., 2006). Here, it should be impressed that capillary forces prevent PCM leakage to the outside during phase transition. The total amount of PCM in the phase change composite of PCM/graphite matrix was 112.88 grams. The mass fraction of paraffin is about 92% in phase change composite. The porosity of the EG matrix was computed, approximately, 85% by using PCM volume in the matrix.



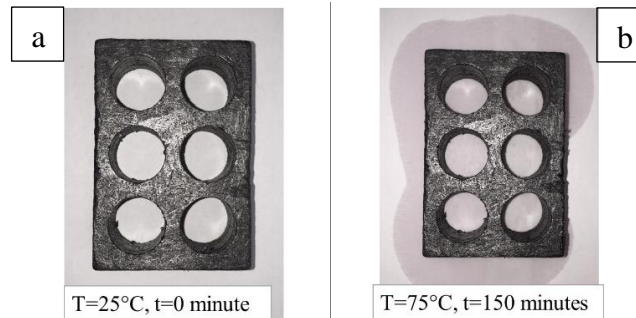
**Figure 1.** Heat flow-temperature variation for pure paraffin and paraffin/graphite

Scanning electron microscope (SEM) photographs of the graphite matrix and the phase change composite with different modes of SEM, the backscattered electrons (BSE), and the secondary electron (SE) are presented in Figure 2. SE modes (Figure 2a, c) are very useful for the inspection of the topography of the sample's surface. On the other side, BSEs (Figure 2b, d) are used to detect contrast between areas with different chemical compositions. It is shown that the compacted expanded graphite matrix exhibits vermicular particles (Figure 2a). There are some regions, which do not interlock each other in the EG matrix in Figure 2a. The honeycomb-like network is occurred due to the overlapping and intersecting of graphite flakes (Figure 2a) (Zou et al., 2020). The black areas seen in Figure 2b displays non-interlocking areas. Figure 2c presents the morphology of the EG matrix covered with paraffin (phase change composite). It can result in that paraffin of high amount is impregnated to pores of EG layers. Figure 2d clearly shows the different chemical phases between PCM and graphite.



**Figure 2.** SEM photographs: SE and BSD modes of the graphite (a,b) and phase change composite (c,d)

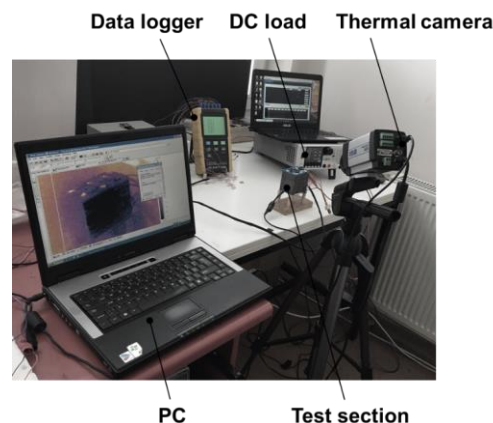
Optical images indicating leakage test results of phase change composite sample are illustrated in Figure 3. The graphite/PCM matrix composite sample was placed on paper and heated at 75 °C for 150 minutes PCM/graphite matrix keeps its form with a very low amount of leakage < 0.42 gram on paper. The leakage mass percentage of the composite is 0.37 %. These low amounts of leakage are explained by the melting of the surface solidified PCMs.



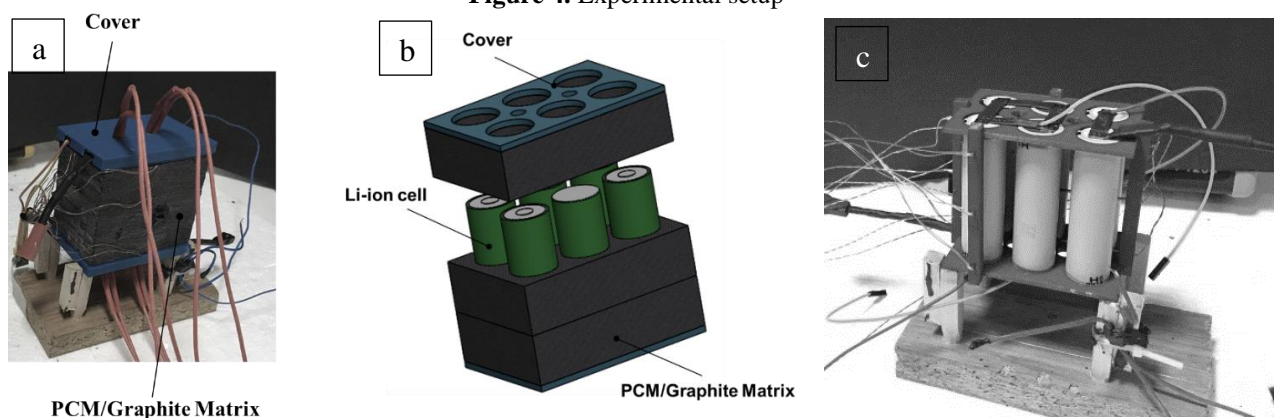
**Figure 3.** The leakage test result of phase change composite; T=25°C (a), T=75°C (b)

### Experimental procedure

The experimental facility built to evaluate the effect of graphite matrix composite with phase change (phase change composite or PCM/graphite matrix) on battery thermal management is illustrated in Figures 4 and 5. It consists of five main parts: test section (PCM/graphite matrix or air cooling), electronic dc load, data logger, thermal camera, and PC.



**Figure 4.** Experimental setup



**Figure 5.** Test section: phase change composite /photograph (a), phase change composite /schematic view (b), air cooling/photograph (c)

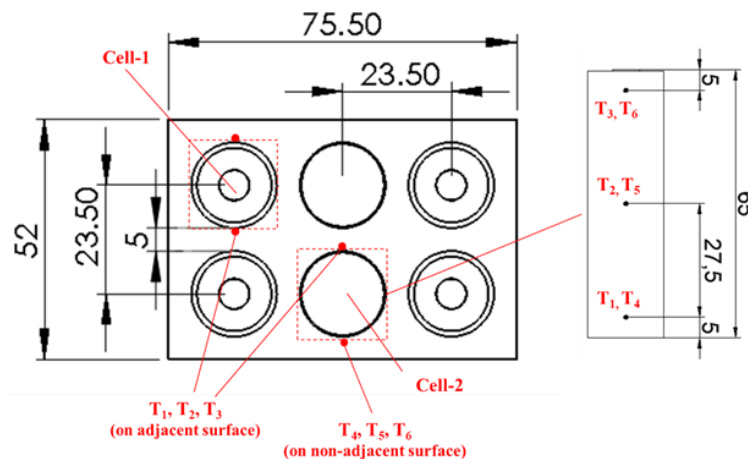
The construction details of the test section are shown in Figure 5. Test section comprises li-ion cell (3s2p), and PCM/graphite matrix/air cooling arrangements. A commercially available li-ion cell

(Panasonic-Sanyo NCR 18650B) was used in the test module. The specifications of the battery module are shown in Table 2.

**Table 2.** Li-ion cell/pack specification

Specification	cell	module
Form factor	1s	3s2p
Capacity nominal (mA h)	3350	6700
Voltage nominal (V)	3.7V	11.1
Specific energy (W h kg <sup>-1</sup> )	243	258

To monitor the temperature response along with the li-ion cell, six thermocouples of T-type supplied by OMEGA (T<sub>1-6</sub>) with an accuracy of  $\pm 1$  °C (or 0.75% whichever greater) were placed on the two li-ion cells (cell 1 and cell 2). The thermocouple locations on both cells are shown in Figure 6. A thermal camera (Flir/ thermovision series) was also used to visualize the thermal image of both air-cooling and phase change composite (PCM/graphite matrix) arrangements. Transient temperature measurements were recorded with the accuracy of  $\pm 0.5$  F.S. ( $\pm 2.1$  °C). via a data logger system (PCE-1200) by 5 seconds intervals. The li-ion module was discharged at 1.6C-rate (10 Amper) using a Chroma electronic dc load (CH-63004). For constant current mode of dc load, the measurement accuracy of current is  $\pm 0.1$  % F.S. ( $\pm 0.06$  amper)



**Figure 6.** The points of the temperature measurements on the Li-ion cell

All the experiments of air cooling and PCM/graphite matrix were carried out in a conditioned room, where the ambient temperature is 25°C. Experiments were terminated by reaching the limit operating temperature (55°C) or cut-off voltage (2.5 V) value whichever comes first. By following the approach of Kline & McClintock, the combined uncertainty of each measurement is found to be  $\pm 0.9\%$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

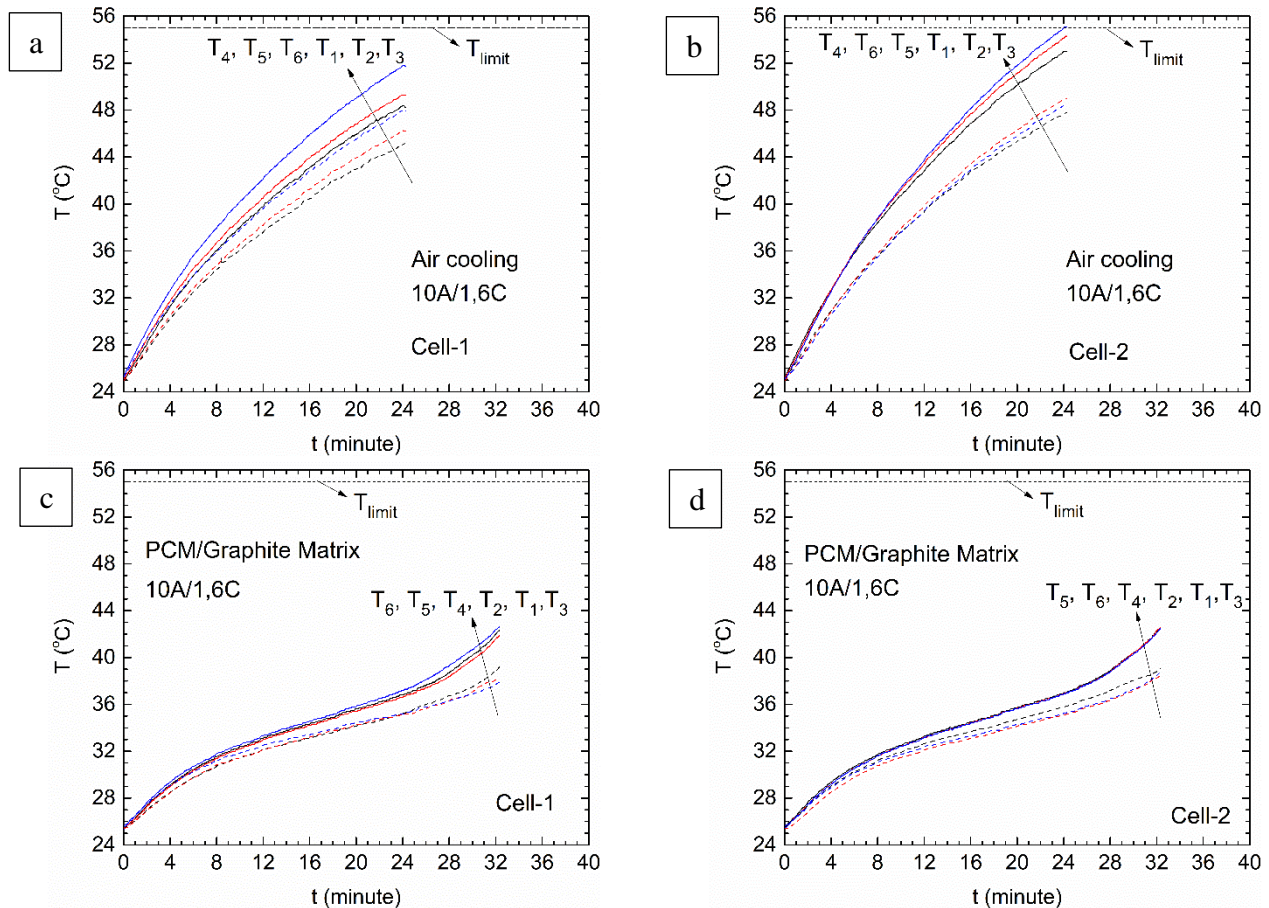
The effect of the PCM/graphite matrix on the thermal management of the li-ion module (3s2p) is tested experimentally compared to the reference case of natural air cooling. Experiments are carried out at room temperature for 1C and 1.6C rates. The time history of temperature (T °C) variations at six local temperature points for two cells (cell 1 and cell 2) and the thermal images are presented in Figure 7-8 and Figure 10-11 to evaluate the thermal performance of each battery pack arrangement for 1.6C rate and 1C rate, respectively. The voltage (V)-discharge capacity (A h) variation and energy capacity (Watt hour: W h) is also given in Figure 9 and Figure 12 to reveal the electrical performance of each battery pack for 1.6C-rate and 1C-rate, respectively.

Heat transfer through expanded graphite matrix, which is attractive material depending on its including properties including very low density, high porous structure, high heat transfer surface to volume ratio, is occurred with abundant thermal paths, which are highly conductive. This results in rapid heat dissipation on the EG matrix. These advantages of the expanded graphite matrix speed up the process of diffusing and storing heat in the PCM. Heat transportation mechanism in such porous medium results by conduction (Mills et al., 2006; Kang et al., 2019). The free convection heat transfer does not occur within pores smaller than 10 mm (Kang et al., 2019). SEM images confirm that pore sizes are in micro-scale for graphite matrix structure in Figure 2. Therefore, conduction heat transfer is the only mechanism for heat transport in the PCM/graphite matrix structure.

### Experimental results for 1.6C

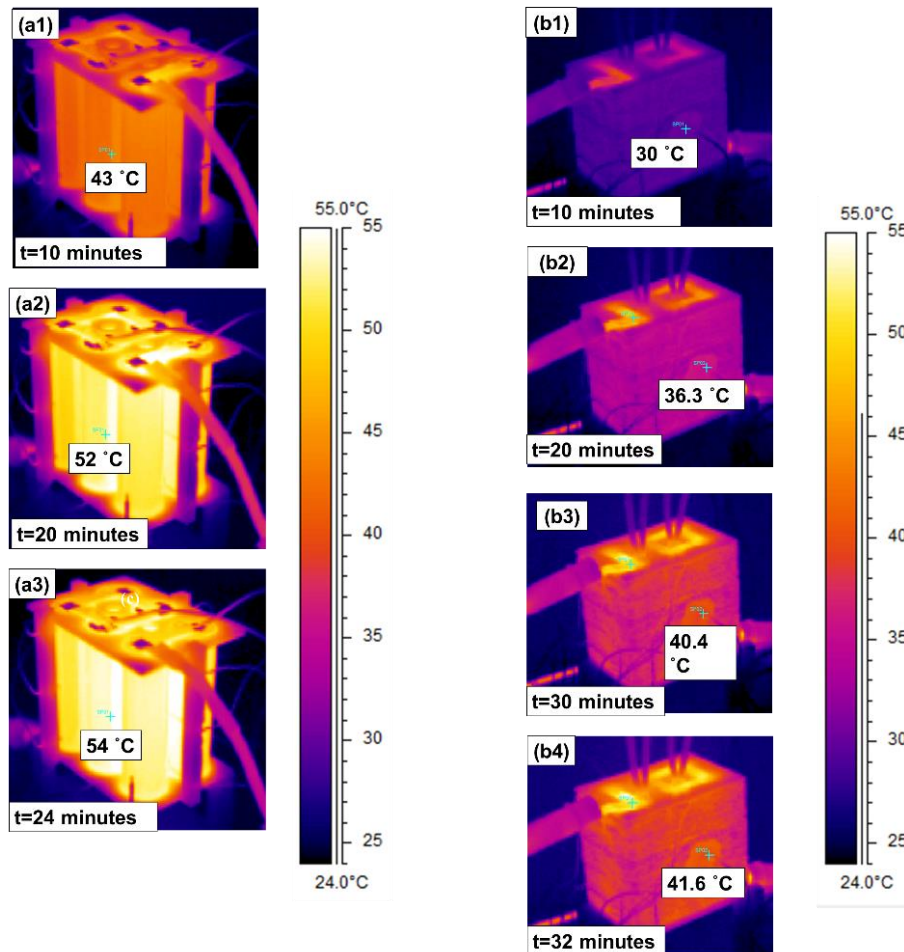
Temperature profiles of each battery pack configuration tested at the 1.6C rate are shown in Figure 7. For the natural air-cooling case, surface temperatures of the li-ion cell increase steeply with time in Figure 7a-b. For air cooling, the heat dissipated from the outer surface of the li-ion cell is not transferred effectively by air cooling due to the low thermal conductivity ( $0.025 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$  at  $25^\circ\text{C}$ ) and also low natural convection rates. This behavior causes reaching the limit operating temperature ( $55^\circ\text{C}$ ) in a shorter time of 24 minutes. It is shown from Figure 7a-b that the local temperature points of  $T_{1-3/\text{cell-1}}$  and  $T_{1-3/\text{cell-2}}$ , which are positioned on adjacent surfaces facing each other, have higher temperature measurements. In addition, cell-2 temperature history is higher ( $1-3^\circ\text{C}$ ) than cell-1. These are a result of the thermal effect caused by neighboring batteries surrounding the cell-2 battery. Hence, a non-uniform temperature profile along with the cell ( $T_{\text{maximum}} - T_{\text{minimum}} = T_{3/\text{cell-2}} - T_{4/\text{cell-1}} = 7^\circ\text{C}$ ) occurred more specifically. However, for the phase change composite (PCM/graphite matrix), the increment rate of the surface temperature is lower than the natural air cooling (Figure 7c-d). Also, a more uniform temperature gradient is observed by the PCM/graphite matrix. This is the result of the considerable increase of heat dissipation rates throughout the li-on cell surfaces to the medium and the thermal energy storage capacity of PCM. The higher heat dissipation rate due to abundant thermal paths provides a higher heat transfer rate. Dissipated heat in the phase change composite (PCM/graphite matrix) is absorbed by paraffin in the form of sensible (period of temperature increasing) and latent heat (period of phase transition). It is shown in Figure 7c-d that temperature measurements report a steep increase in the first period of discharging due to sensible heat storage (Figure 7c-d,  $t < 4$  minutes). In the next period, it is shown from Figure 3c-d that temperature values along the li-ion cells reach the melting area of RT-35 ( $T_{\text{melting}} = 29^\circ\text{C} - 36^\circ\text{C}$ ), and a positive decreasing variation during the solid-liquid phase transition occurs depending on latent heat of fusion, which has a high energy storage capacity (Figure 7b,  $4 \text{ minutes} < t < 25 \text{ minutes}$ ). In this period, latent heat storage is the dominant energy storage mechanism. In the following stage (Figure 7c-d,  $t > 25$  minutes), the rate of temperature increase again advances, because the phase change process is completed. For example, at  $t=24$  minutes, it is seen from Figure 7b and d that recorded maximum surface temperatures are  $55^\circ\text{C}$  ( $T_{3/\text{cell-2}}$ ) and  $43^\circ\text{C}$  ( $T_{3/\text{cell-2}}$ ) for natural air cooling and PCM/graphite matrix, respectively. On the other side, the maximum surface temperature difference decreased to the value of  $4^\circ\text{C}$  ( $T_{\text{maximum}} - T_{\text{minimum}} = T_{3/\text{cell-2}} - T_{5/\text{cell-1}}$ ) by PCM/graphite matrix. Temperature differences between both cell2-cell1 and on adjacent ( $T_{1,2,3}$ ), nonadjacent ( $T_{4,5,6}$ ) surfaces compensated depending on high thermal diffusivity medium compared to air cooling. These outputs reveal that for the PCM/graphite matrix, operating temperature and temperature difference on the li-ion surface are approximately 22 % and 43 % lower compared to natural air cooling, respectively. Therefore, the PCM/graphite matrix also provides a longer operating time in reliable operating temperatures. It is shown from Figure 7c-d that operating time in reliable temperature ranges increases up to 32 minutes

with an increase of 33 % compared to natural air cooling. It should be remembered that experiments are terminated with reaching the limit operating temperature (55 °C) or cut-off voltage (7.8 V) value whichever comes first. For natural air cooling and PCM/graphite matrix, operating temperature and cut-off voltage value were observed as a limit experimental condition, respectively.



**Figure 7.** The time history of temperature along the li-ion cell surface: natural convection case (a, b), the PCM/graphite matrix (c,d)

Temporal thermal camera images are presented every ten minutes in Figure 8. The last thermal images of both configurations are at the time of reaching the limit condition at which the experiment is completed. It is shown that the temperature increment rate is faster for natural air cooling compared to the PCM/graphite matrix. For the final period of the experiment, the increment rates of temperature (from  $T_{\text{initial}}$  to  $T_{\text{final}}$ ) are 116% and 66% for air cooling and PCM/graphite matrix, respectively. Besides, temperature increment rates are  $1.2 \text{ } ^\circ\text{C minutes}^{-1}$  and  $0.51 \text{ } ^\circ\text{C minutes}^{-1}$  for air cooling and PCM/graphite matrix under 1.6C rate, respectively. Here, it should be emphasized that thermal images in Figure 8b present temperature contours of PCM/graphite matrix outer surface. It is observed that outer (Figure 8b) and inner (Figure 7c/d) surface temperature measurements of the PCM/graphite matrix are close to each other. This behavior evaluates the higher thermal diffusivity and higher heat transfer rates radially and axially. The temperature field on the li-ion cell surface for natural air cooling and phase change composite (PCM/graphite matrix) supports Figure 7, which belongs to thermocouple measurements.



**Figure 8.** Transient thermal camera images: natural (free) convection, li-ion surface (a), PCM/graphite matrix (outer surface) (b)

Electrical performance findings of discharge capacity and energy capacity for each battery pack configuration are given in Figures 9 and 10. It is shown from the Figure 9 that utilized capacity (discharge capacity) values are 4 A h (Amper hour) and 5.5 A h (Amper hour) for natural air cooling and phase change composite (PCM/graphite matrix), respectively. It should be expressed that the utilized capacity of the battery module using the PCM/graphite matrix, which is higher 38% than natural air cooling, is achieved at a reliable operating temperature/voltage range. However, the voltage decrement rate is slightly lower for the air-cooling case. This can be explained by higher temperature measurements on the package, which provides higher ionic conductivity for air cooling. On the other side, reaching the limit of the surface temperature of 55 °C inhibits the longer-duration use and more capacity usage of a cell. Another electrical performance finding of energy capacity (Watt hour: W h) variation for both cases is presented in Figure 10. It is illustrated in Figure 10a that the battery module with PCM/graphite matrix delivers to 51 W h (Watt hour) with a linear increment, approximately, 28% more power compared to air cooling (40 W h) for an hour. This behavior evaluates that more amount of work performed is obtained by the case of PCM/graphite matrix cooling under reliable operating conditions. The reached total energy capacity is also presented comparatively in column chart format.

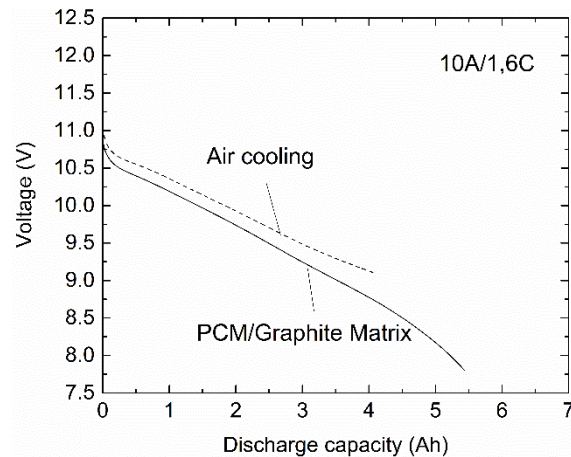


Figure 9. Capacity-voltage variation during discharge

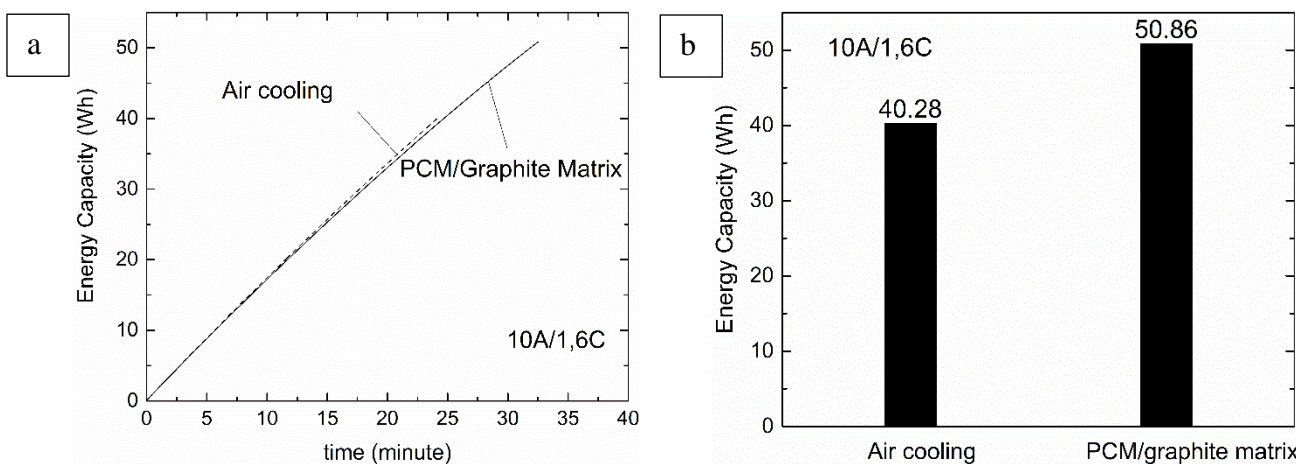


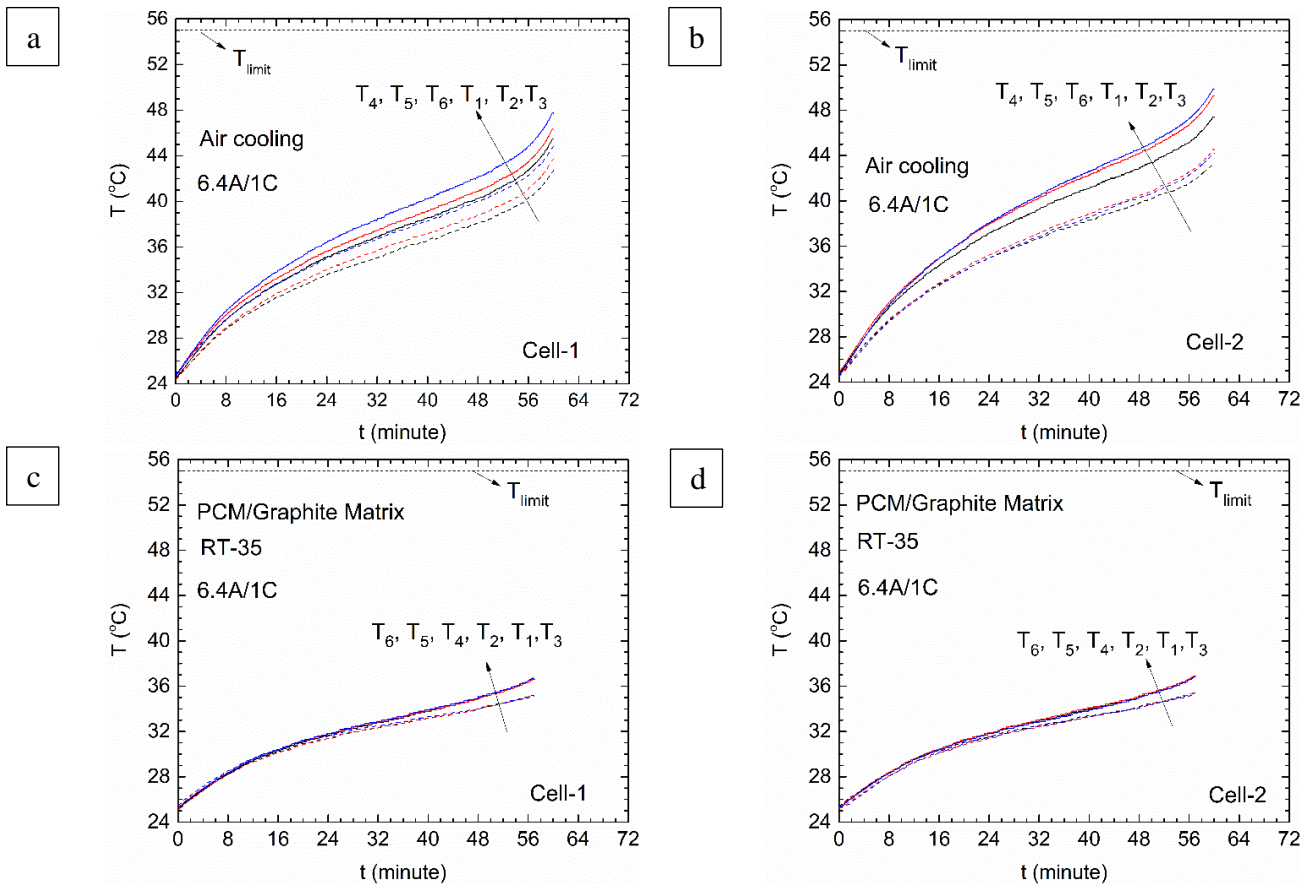
Figure 10. Energy capacity variation during discharge for different cooling strategies: time history of energy capacity (a), total energy capacity value (b)

### Experimental results for 1C

Temperature histories for a lower discharge rate of 1C are presented in Figure 11. It is shown that lower local temperature measurements are recorded with a similar variance trend with the 1.6C rate. For example, at  $t=24$  minutes, temperature measurements are  $38^{\circ}\text{C}$  ( $T_{\text{maximum}}=T_{3/\text{cell}-2}$ , air cooling),  $32^{\circ}\text{C}$  ( $T_{\text{maximum}}=T_{3/\text{cell}-2}$ , PCM/graphite matrix) for 1C rate;  $55^{\circ}\text{C}$  ( $T_{\text{maximum}}=T_{3/\text{cell}-2}$ , air cooling),  $37^{\circ}\text{C}$  ( $T_{\text{maximum}}=T_{3/\text{cell}-2}$ , PCM/graphite matrix) for 1.6C rate, respectively. These measurements result in the maximum temperature value of air cooling is 19% higher than PCM/graphite matrix under 1C rate. Besides, for the 1C rate (Figure 11c, d), temperature values of air cooling (Figure 11a, b) and PCM/graphite matrix is 31% and 14% lower, respectively, compared to the 1.6C rate. However, for the natural air-cooling case, after the period of rapid increase of temperature ( $t>8$  minutes), the rate of temperature rise is decreasing depending on the natural convection heat transfer mechanism. In the following period ( $t>56$  minutes), the rate of temperature rise is increasing again because of insufficient natural air cooling. On the other side, the battery pack with PCM/graphite matrix has lower temperature recording, but it is not observed rapid temperature increment for the second time after the completion of phase transition. This is a result of the reaching only upper limit of the phase transition temperature. In another word, the phase transition is just completed or is going on. Cut-off voltage value was observed as a limit experimental condition for both natural air cooling and PCM/graphite matrix for 1C rate. Reliable operating time is observed 60 minutes and 57 minutes for air cooling and PCM/graphite matrix,



respectively. This is the result of the higher operating temperatures, which provide higher ionic conductivities for air cooling configuration.



**Figure 11.** The time history of temperature along the li-ion cell surface: natural air convection case (a, b), the PCM/graphite matrix (c, d)

Transient thermal images of 1C rate are given every ten minutes for air cooling and PCM/graphite matrix in Figure 12. For the final period of the experiment, the increment rates of temperature (from  $T_{initial}$  to  $T_{final}$ ) are 118% and 35% for air cooling and PCM/graphite matrix, respectively. Besides, temperature increment rates are  $0.5 \text{ } ^\circ\text{C minutes}^{-1}$  and  $0.17 \text{ } ^\circ\text{C minutes}^{-1}$  for air cooling and PCM/graphite matrix under 1C rate, respectively. These values are nearly half of the values of the 1.6C-rate. It is observed that outer (Figure 12b) and inner (Figure 11c, d) surface temperature values of the PCM/graphite matrix are close to each other. The temperature field on the li-ion cell surface for natural air cooling and PCM/graphite matrix support Figure 11, which belongs to thermocouple recordings.

Discharge capacity-voltage and energy capacity histories are shown for each battery pack configuration Figure 13 and 14, respectively. It is shown that utilized capacity values are 6.4 A h (Amper hour) and 6.1 A h (Amper hour) for natural air cooling and PCM/graphite matrix, respectively. There is a slight difference of 5% in the value of utilized capacity. For air cooling configuration, utilized capacity is higher depending on higher temperature measurements on the package, which provides higher ionic conductivity for air cooling. Energy capacity variation is also presented in Figure 14. Time history of energy capacity variation shows similar curve characteristics with a high discharge rate. However, unlike the 1.6C-rate, the energy capacity value reaches slightly higher values for air cooling under 1C-rate. This slight difference of 6.6% supports the higher capacity usage depending on the operating temperature of the li-ion module with air cooling. The total energy capacities are nearly 64 W h (Watt hour) and 60 W h (Watt hour) for air cooling and PCM/graphite matrix configurations, respectively, in Figure 14b.

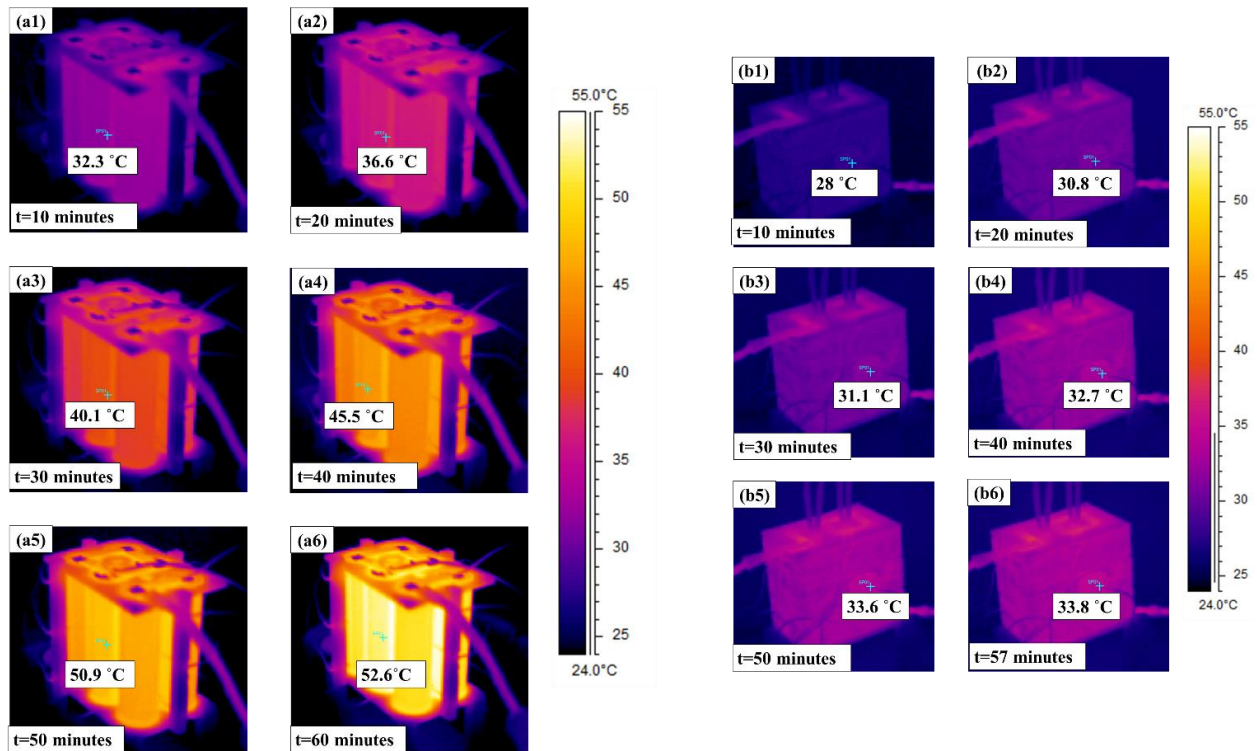


Figure 12. Transient thermal camera images at 1C rate: natural convection, li-ion surface (a), PCM/graphite matrix (outer surface) (b)

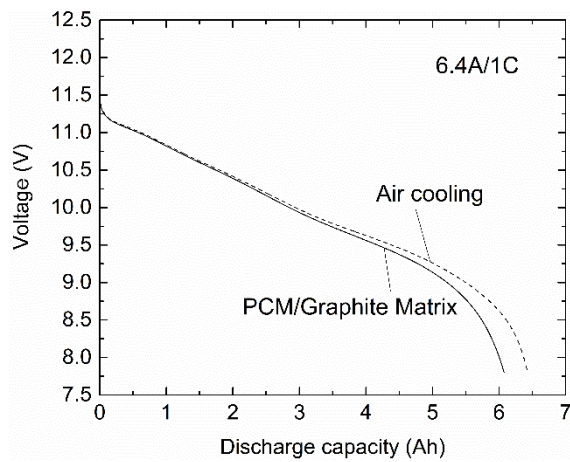


Figure 13. Capacity-voltage variation during discharge

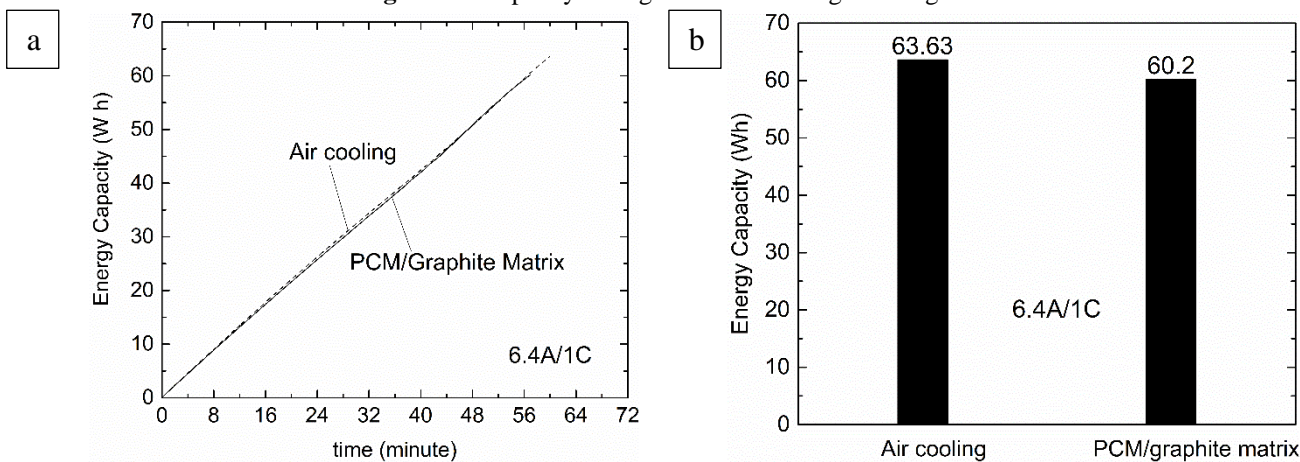


Figure 14. Energy capacity variation during discharge for different cooling strategies: time history of energy capacity (a), total energy capacity value (b)

## CONCLUSION

In this study, the effect of PCM/graphite matrix on li-ion battery thermal management is carried out experimentally. The results reveal that the PCM/graphite matrix has significant potential in battery thermal control systems, especially, for higher discharge rates. The temperature is successfully regulated and distributed uniformly in the li-ion module. The main conclusions may be summarized as follows:

- For the PCM/graphite matrix, operating temperature and temperature gradient on the li-ion module is decreased by 22 % and 43 %, respectively for the 1.6 °C-rate.
- For the PCM/graphite matrix, the operating time within safe temperature limits is increased 33 % compared to natural air cooling for the 1.6C-rate.
- For the PCM/graphite matrix, the utilized capacity, and energy capacity are increased by 38% and 28%, respectively, compared to natural air cooling for the 1.6C-rate.
- The PCM/graphite matrix configuration is more effective for higher discharge rates (1.6C).
- For lower discharge rates (1C), there is no significant difference in performance for air cooling and graphite matrix composite with phase change.
- The leakage issue was avoided by graphite matrix, which is the way of impregnated encapsulation via capillarity.
- For the graphite matrix composite with phase change, conduction is the main heat transportation mechanism.

## ACKNOWLEDGMENT

This study was financially supported by TUBITAK TEYDEB with project number 2180111.

## REFERENCES

- Alhusseny A, Al-Zurfi N, Nasser A, Al-Fatlawi A, Aljanabi M, 2020. Impact of using a PCM-metal foam composite on charging/discharging process of bundled-tube LHTES units. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 150: 119320.
- Arshad A, Jabbar M, Yan, Y, 2020. Thermophysical characteristics and application of metallic-oxide based mono and hybrid nanocomposite phase change materials for thermal management systems. *Applied Thermal Engineering*, 181: 115999.
- Aydin O, Avci M, Yazici MY, Akgun M, 2018. Enhancing storage performance in a tube-in shell storage unit by attaching a conducting fin to the bottom of the tube. *Isı Bilimi ve Teknigi Dergisi-Journal of Thermal Science And Technology*, 38(2): 1-13.
- Greco A, Jiang X, Cao D, 2015. An investigation of lithium-ion battery thermal management using paraffin/porous-graphite-matrix composite. *J. Power Sources*, 278: 50–68.
- He J, Yang X, Zhang G, 2019. A phase change material with enhanced thermal conductivity and secondary heat dissipation capability by introducing a binary thermal conductive skeleton for battery thermal management. *Applied Thermal Engineering*, 148: 984-991.
- Jiang GW, Huang JH, Fu YS, Cao M, Liu MC, 2016. Thermal optimization of composite phase change material/expanded graphite for li-Ion battery thermal management. *Thermal Engineering*, 108: 1119-1125.
- Kang S, Choi JY, Choi S, 2019. Mechanism of heat transfer through porous media of inorganic intumescent coating in cone calorimeter testing. *Polymers*, 11(2): 1-16.
- Kizilel R, Lateef A, Sabbah R, Farid MM, Selman JR, Al-Hallaj S, 2008. Passive control of temperature excursion and uniformity in high-energy Li-ion battery packs at high current and ambient temperature. *Journal of Power Sources*, 183(1): 370-375.
- Kizilel R, Sabbah R, Selman JR, Al-Hallaj S, 2009. An alternative cooling system to enhance the safety of Li-ion battery packs. *Journal of Power Sources*, 194(2): 1105-1112.

- Landini S, Leworthy J, O'Donovan TS, 2019. A review of phase change materials for the thermal management and isothermalisation of lithium-ion cells. *Journal of Energy Storage*, 25: 100887.
- Liu H, Wei Z, He W, Zhao J, 2017. Thermal issues about Li-ion batteries and recent progress in battery thermal management systems: A review. *Energy Conversion and Management*, 150: 304-330.
- Mallow A, Abdelaziz O, Graham S, 2018. Thermal charging performance of enhanced phase change material composites for thermal battery design. *Int. J. Thermal Science*, 127: 19-28.
- Mills A, Farid M, Selman JR, Al-Hallaj S, 2006. Thermal conductivity enhancement of phase change materials using a graphite matrix. *Thermal Engineering*, 26(14-15): 1652-1661.
- Py X, Olives R, Mauran S, 2001. Paraffin/porous-graphite-matrix composite as a high and constant power thermal storage material. *Int. J. Heat Mass Transfer*, 44(14): 2727-2737.
- Somasundaram K, Birgersson E, Mujumdar AS, 2012. Thermal-electrochemical model for passive thermal management of a spiral-wound lithium-ion battery. *Journal of Power Sources*, 203: 84-96.
- Wilke S, Schweitzer B, Khateeb S, Al-Hallaj S, 2017. Preventing thermal runaway propagation in lithium-ion battery packs using a phase change composite material: an experimental Study. *J. Power Sources*, 340: 51-59.
- Wu W, Yang X, Zhang G, Ke X, Wang Z, 2016. An experimental study of thermal management system using copper mesh-enhanced composite phase change materials for power battery pack. *Energy*, 113: 909-916.
- Wu W, Yang X, Zhang G, Chena K, Wang S, 2017. Experimental investigation on the thermal performance of heat pipe-assisted phase change material-based battery thermal management system. *Energy Conversion and Management*, 138: 486-492.
- Yazici MY, Avci M, Aydin O, 2014. Effect of eccentricity on melting behavior of paraffin in a horizontal tube-in-shell storage unit: An experimental study. *Solar Energy*, 101: 291-298.
- Zhang S, Feng D, Shi L, Wang L, Jin Y, 2021. A review of phase change heat transfer in shape-stabilized phase change materials (ss-PCMs) based on porous supports for thermal energy storage. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 135: 110127.
- Zichen W, Changqing D, 2021. A comprehensive review on thermal management systems for power lithium-ion batteries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 139: 110685.
- Zou T, Liang X, Wang S, Gao X, Zhang Z, Fang Y, 2020. Effect of expanded graphite size on performances of modified  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  phase change material for cold energy storage. *Microporous and Mesoporous Materials*, 305: 110403.

**Atıf İçin:** Korkut V, Yavuz H, 2022. Çam (*Pinus* spp.) Açık-Kaynaklı 3B Yazıcılarda Enerji ve Zaman Gereksinimini Azaltmada Etkili Parametrelerin İncelenmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 403-411.

**To Cite:** Korkut V, Yavuz H, 2022. Examining the Influential Parameters on Reducing both Energy and Time Requirements in Open-Source 3D Printers. Journal of the Institute of Science and Technology, 12 (1): 403-411.

### Açık-Kaynaklı 3B Yazıcılarda Enerji ve Zaman Gereksinimini Azaltmada Etkili Parametrelerin İncelenmesi

Volkan KORKUT<sup>1,\*</sup>, Hakan YAVUZ<sup>2</sup>

**ÖZET:** Katmanlı imalat ailesinde yaygın olarak tercih edilen cihazlar olan Fused Filament Fabrication (FFF) tipi 3D yazıcılara olan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır. Bu cihazların geliştirilmesi sayesinde kullanım alanlarının artmasına ek olarak, işlem kolaylığı ve maliyeti de azalmaktaya başlamıştır. Basılan parçaların mekanik dayanımını arttırmayı amaçlayan çok sayıda çalışma mevcuttur. Dolayısıyla, çevre dostu bir üretim süreci için yapılan çalışmalar da gittikçe daha nitelikli hale gelmektedir. Bu amaçla, dayanımı yüksek olduğu bilinen özellikte bir numune üzerinde, harcanan enerji ve üretim süresi üzerinde detaylı incelemeler yapılmıştır. Numune üretiminde ihtiyaç duyulan güç ve zaman tüketimi belirli bir deneysel sıraya göre ölçümlenmiştir. Deneyler, Taguchi tabanlı Deneysel Planlama yöntemi temel alınarak planlanmıştır. Deneysel sonuçların yorumlanmasında, mühendislikte yaygın olarak kullanılan, güçlü birer istatistiksel araç olan Sinyal-Gürültü Oranı ve ANOVA analizlerinden yararlanılmıştır. Analizler sayesinde büyükten-küçüğe sırayla, platform sıcaklığı, katman kalınlığı, baskı hızı ve nozzle sıcaklığı parametrelerinin, tüketilen güç ve harcanan zaman üzerinde etkili olduğu gözlemlenmiştir. Parametrelerin yüzde oranda etkileri de belirlenmiş olup, en verimli üretim işlemi sağlayabilecek optimum parametrik kombinasyon da elde edilmiştir. Yapılan doğrulama deneyleri sayesinde istatistiksel hipotezlerin doğruluğu da kanıtlanmıştır. Sonuç olarak, her baskı işlemi için geçerli olabilecek, sıradan bir parçanın üretimi için gereken enerji miktarını ve işlem süresini aynı anda ve önemli ölçüde azaltacak parametreler açığa çıkarılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** 3B yazıcı, enerji yönetimi, FFF işlemleri

### Examining the Influential Parameters on Reducing both Energy and Time Requirements in Open-Source 3D Printers

**ABSTRACT:** The need for Fused Filament Fabrication (FFF) type 3D printers in additive manufacturing family is increasing day by day. In parallel to the accelerating developments in these devices, the technical difficulties and the cost of operation have started to decrease in time. There are numerous studies available in the way to enhance the mechanical properties of parts printed with these devices. However, the energy and the time management in the printing processes have also become a new focus of today's research for more eco-friendly operations. In this study, the amount of energy and the time consumed during the printing period are examined in detail. The experiments are planned in accordance with the Taguchi method for Design of Experiments. Signal-to-Noise Ratio and ANOVA analysis, which are widely accepted and powerful statistical tools in the field of experimental engineering, are used to interpret the results. It is observed that the parameters of platform temperature, the layer thickness, the printing speed and the nozzle temperature are the most influential process parameters on the required power and time respectively. The percentage contributions of these parameters to the process performance is also presented. Furthermore, the optimal combination of parameters with suitable levels were obtained in order to minimize both the power and the time requirement for printing processes. The statistical hypothesis are verified by the confirmatory experiments. As a result, the parameters that significantly reduce the amount of energy and processing time for the production of a part applicable to most printing processes are revealed.

**Keywords:** 3d printing, energy management, FFF processes

<sup>1</sup>Volkan KORKUT\* ([Orcid ID: 0000-0002-9095-4056](https://orcid.org/0000-0002-9095-4056)), Adana Alparslan Türkeş Science and Technology University, Department of Mechanical Engineering, Balcalı, 01250 Sarıçam, Adana, Turkey

<sup>2</sup>Hakan YAVUZ ([Orcid ID: 0000-0002-6166-0921](https://orcid.org/0000-0002-6166-0921)), Çukurova University, Department of Mechanical Engineering, Balcalı, 01250, Sarıçam, Adana, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Volkan KORKUT, e-mail: [vkorkut@atu.edu.tr](mailto:vkorkut@atu.edu.tr)

## INTRODUCTION

Fused Filament Fabrication (FFF) type 3D printers are an attractive option for manufacturing industry due to their low running costs compared to other conventional options. For a product designer, an engineer or a manufacturer, the 3D printers stand as an effective solution. It allows both fast and inexpensive production of visual and/or functional prototypes for highly customized parts. The manufacturing methodology is based on depositing layers upon layers until the full shape of the real object is obtained. The contour limits of the layers are received from the CAD file which previously processed in the slicer software in form of G-Codes. Having an advantage of producing a physical object through the digital design made the FFF devices favorable choice in manufacturing industry. The fields such as rapid prototyping (Gibson et al., 2014. Rajpuhorit, 2018), household items production (Song et al., 2018), part replacement and tooling (Rajpuhorit, 2018) have already adopted this technology. Regarding the parts' quality, many studies have been conducted in order to strengthen the part, promoting the surface finish with various materials for wider functionality in part's use (Griffiths et al., 2016). From an engineering perspective, the time, the material and the energy consumption still must be considered besides the quality. That is, the printing operations need to be eco-friendly in the way to contribute the sustainable environment (Wohler assoc., 2018). Technically, many parameters are considered in a printing process those determine the quality, the durability of the part and the material/energy consumed during the production. Therefore the built parameters must be configured taking into account all of these output aspects.

In the study of (Suarez, 2020 and Gutierrez et al., 2019), the parameters of layer thickness, print head speed and the size of the design have been focused in the view of the energy efficiency. The operating temperatures for the system in order to make the solid material into a viscoelastic form is another field of the polymer science. By controlling the heating process efficiently, the study presented by Griffiths et al (2016) and McAlister (2014) proved that the need of energy can be decreased in certain circumstances. Moreover the cost estimation of the process depending the material-energy consumption also effected by the complexity of the shape. This is because the detailed geometries require the relatively slower printing speeds leading to longer printing operations (Watson and Taminger, 2018; Baumers et al., 2012). The axial motion of FFF machines relies on Computer Numerical Control (CNC) machines. So far, the energy consumption of material removal based CNC processes were investigated and understood in detail. However, in the study of Faludi et al (2015), the FFF devices were examined in the aspect of energy consumption by comparing them to the conventional CNC operations. It is stated that it is crucial to divide the FFF operations into the main steps of warm-up (preperation), actual operation, idle time and post-processing. This is because the use of FFF machines increase dramatically in the last decade which result in increased energy consumption. Parallel to this expression, the investment cost would expected to exceed 10 billion dollars by the 2022 as reported by (Forster, 2015).

At the present times, open-source and self-built devices are gaining popularity due to the high price/performance ratio (Tymrak, 2014). Numerous studies on mechanical, metallurgical and chemical properties, have been conducted on parts printed with open source devices (Liu, 2017; Kumar, 2010). As well as the final product characteristics which have been adequately researched, there is a need for more detailed investigation of the energy use during the manufacturing process. Because, their modifiable concept requires an additional effort in order to prevent the energy/time waste. Considering the printing devices are electro-mechanical systems, mechanical setup and the digital parameters need to be configured in a harmony. In this study, certain parameters are selected those have proven to be significant effect on time, material and energy consumption according to the past studies. The different

setting of these parameters are combined to be manufactured for the examining purposes. The experimental results are then evaluated using various statistical approaches in order to reveal the optimum conditions in terms of the energy management.

## MATERIALS AND METHODS

The 3D printing operation can be categorized according to operational steps from the electrical energy consumption aspect as shown in the Table 1.

**Table 1.** The operational steps of the 3d printing process

Preparation	Printing Period	Post-printing
Bed heating	Built parameters	Cooling
Nozzle heating	Motorised motion	Idling
Calibration	Extrusion	
Priming	Heating	
Idling	Idling	

Each print session requires some kind of preparation step. During these steps, the nozzle and the deposition bed must be sufficiently heated. Meanwhile, the appropriate distance between the bed and the nozzle tip should generally be calibrated before each print for proper extrusion and adhesion. Also a clean nozzle must be provided by evacuating the residual material left from previous prints (priming). When the printing is initiated, the motors should provide the smooth axial motion in order to extrude the semi-molten polymer into the appropriate coordinates on to the heated bed. After the job is accomplished, it is necessary to wait for the part to be cooled for a sufficient time avoiding the plastic defects. Additionally, an additional time should be accounted for the side components those drain energy such as controllers, sensors, lightening and LCD monitor during the whole process (the idle time).

The most important factor for determining the consumed energy in the process is the built parameters. That is, the time, the amount of material and the consumed energy strictly depend on the build parameters defined in the slicer software. In this investigation, the parameters of layer thickness (LT), nozzle temperature (NT), heated platform temperature (PT) and travel speed (TS) have been selected as a focus parameters since they are responsible from the energy management according to the literature (Song, 2018. Suarez, 2020. McAlister, 2014. Baumers, 2012.). The desing of experiments were planned based on Taguchi L<sub>9</sub> Orthogonal Array table. In Table 2, three different level settings for the selected parameters are presented.

**Table 2.** The selected parameters with their level settings

Parameters	Level 1	Level 2	Level 3
Layer Thickness (mm)	0.1	0.2	0.3
Nozzle Temperature (°C)	195	205	215
Platform Temperature (°C)	60	70	80
Travel Speed (mm/s)	50	65	80

The Orthogonal Array desing provides finding solid process parameters by minimizing the variance of input parameters over the output responses. By the design, the noise (uncontrollable disturbing factors) on the inputs are aimed to be reduced as much as possible. In this way, the deviation in the desired target is minimized. When the deviation is reduced, the effectiveness of the inputs over the output response become more distinct. The relation between the input and the output is measured by the Signal-to-Noise (S/N) Ratio which corresponds the quantitative measure of the process performance. In the Taguchi analyses, the S/N Ratio is desired to be high since it represents the improved quality of the job

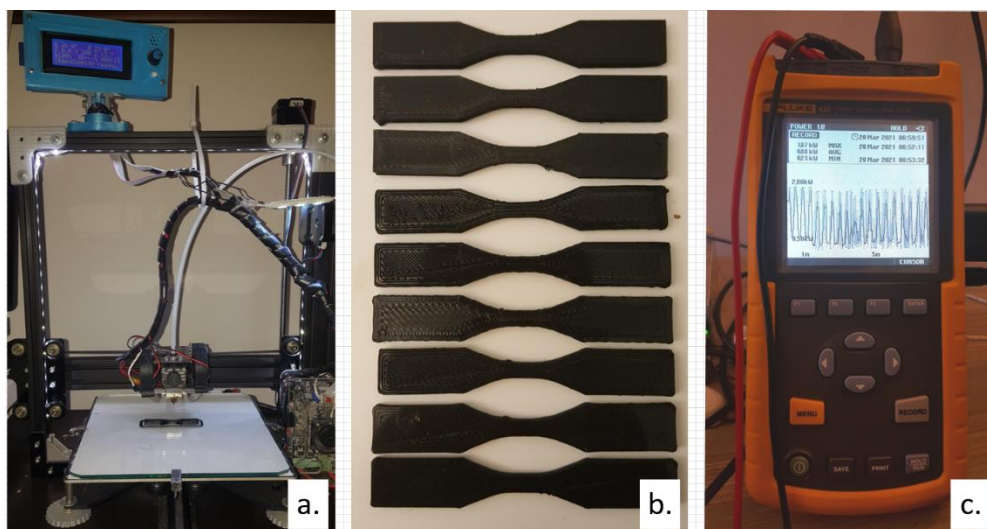
(Roy, 2010). From an engineering point of view, this method provides minimum but sufficient number of experiments while ensuring the validity of the obtained results to be generalised. Effort, test times, and product costs are the most important aspects of engineering. Therefore, this method was preferred also in this study. The experimental order has been presented with the relevant parameter combinations in Table 3.

**Table 3.** The parameter combinations according to L<sub>9</sub> Taguchi array

Experiment number	Parameters			
	LT (mm)	NT (°C)	PT (°C)	TS (mm/s)
1	0.1	195	60	50
2	0.1	205	70	65
3	0.1	215	80	80
4	0.2	195	70	80
5	0.2	205	80	50
6	0.2	215	60	65
7	0.3	195	80	65
8	0.3	205	60	80
9	0.3	215	70	50

In the testing procedure, the standart test specimen defined by the American Society for Testing and Materials was used (D638 Type 5, ASTM, 2012). In this way, it was possible to examine the parts, in terms of strength and energy consumption. The samples have been first prepared in the open-source Cura slicer then the printing process initiated. As a material, the Polylactic Acid (PLA) filament was used having a 1.75 mm in diameter (Shenzhen Esun Industrial Co., Ltd). The 9 different samples with three replication have been printed, one at a time (Figure 1.b).

The time duration and the power consumed for the printing processes have been recorded individually via the professional power analyser (Fluke 43B Power Quality Analyser, Figure 1.c) and mean results have been taken for each part.



**Figure 1.** a. Printer setup b. The batch one of three sample group c. Power analyser

As a manufacturing device, the cartesian type, self-assembled 3D printer have been used having the Marlin 2.0 open-source firmware installed on MKS Gen L v1.0 control board (Figure 1.a). The axial motion has been provided by individual Nema 17 stepper motors for each axis (x, y and z). The rest of the device specifications as well as the fixed parameters for the test samples are presented in the Table 4.



**Table 4.** Fixed parameters for printing

Fixed Parameters;	
Print size	20 x 20 x 20 cm
Platform surface	Smooth glass
Nozzle diameter	0.4 mm
Layer cooling	2 external fans
Line width	0.5 mm
Wall thickness	0.8 mm
Infill density	30%
Infill type	Grid

In the next section, the obtained results taken from the online monitoring has been presented.

## RESULTS AND DISCUSSION

In experimental session, the recorded data of the energy consumption and the processing times for each printing step have been summerized in the Table 5. The data represents the average of the three replications with their standard deviations for each sample.

**Table 5.** The energy and the time consumed for the samples

Exp. No	Energy consumed (Wh)						Processing time (s)					
	Bed heating	Nozzle heating	Print session	Idle time	TOTAL	%Std <sup>1</sup>	Bed heating	Nozzle heating	Print session	Idle time	TOTAL	%Std <sup>1</sup>
1	9.18	2.02	21.08	7.5	39.78	4.18	214	126	712	1413	2465	4.2
2	14.09	2.12	21.91	7.32	45.44	2.80	315	129	621	1576	2641	3.11
3	20.9	1.99	21.57	8.15	52.61	4.3	483	147	560	1733	2923	3.87
4	14.33	2.16	11.31	7.48	35.28	4.02	318	127	340	1567	2352	3.68
5	21.58	2.15	16.47	8.01	48.21	3.28	478	136	417	1710	2741	3.43
6	9.17	2.1	10.1	7.18	28.55	3.78	208	158	368	1431	2165	4.04
7	21.01	1.89	9.19	8.4	40.49	3.9	490	131	263	1720	2604	4.21
8	8.87	2.21	6.13	7.23	24.44	3.6	223	120	229	1400	1972	2.91
9	14.06	2.07	11.4	7.2	34.73	2.99	320	157	299	1539	2315	3.06
10	8.6	2.1	4.83	7.22	22.75	3.51	217	128	207	1350	1902	3.64

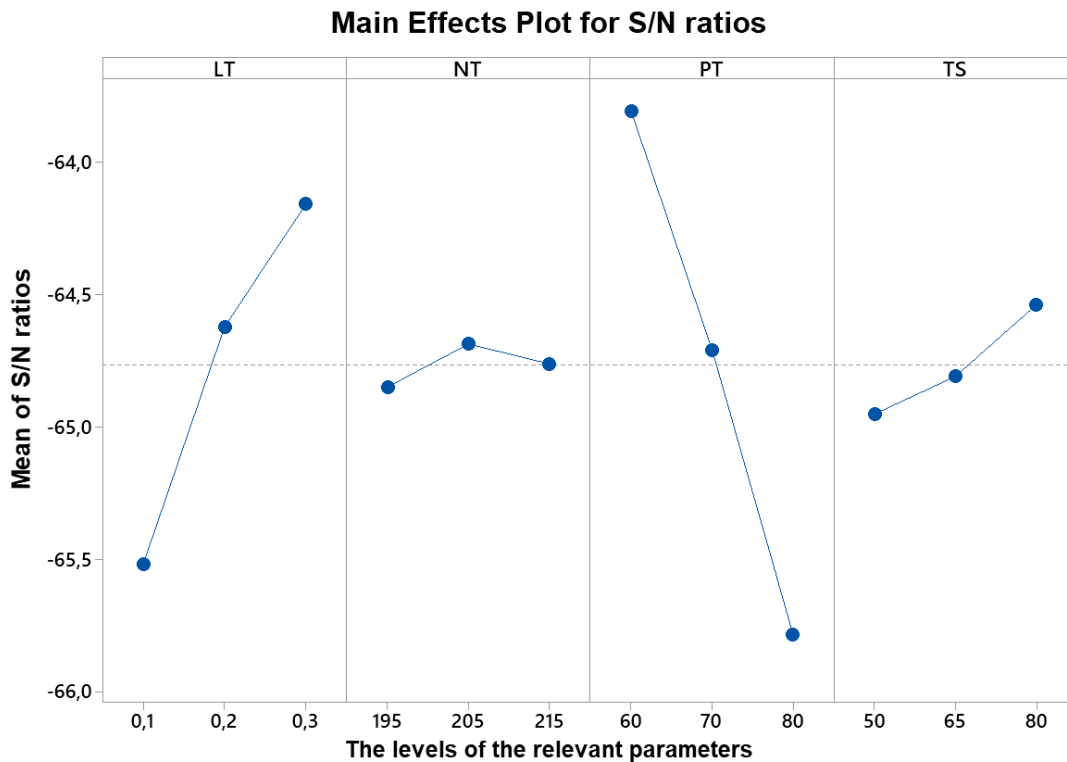
<sup>1</sup>Std: Standard deviation

The data have been examined with the S/N Ratio analysis in accordance with the Taguchi analyses. Since the S/N Ratio analysis is used for revealing the impact amount of the input parameters over the desired output; it becomes possible to sort the parameters over the energy consumption and the manufacturing times. In other words, the main effects of the parameter levels can be ranked according to their effects via the S/N Ratios. As mentioned previously, the higher S/N Ratio corresponds the higher impact over the output; That of the consumed energy during the process as it is subjected in this study. The ratios revealed have been schematized the graph given in the Figure 2.

Owing to the analysis, it was determined which parameter was effective on energy and time consumption. The numerical values belonging to the graph were also given in the Table 6.

**Table 6.** Response table for S/N Ratios

Level	LT	NT	PT	TS
1	-65.52	-64.85	-63.81	-64.95
2	-64.62	-64.69	-64.71	-64.81
3	-64.16	-64.76	-65.79	-64.54
Delta	1.36	0.16	1.98	0.41
Rank	2	4	1	3



**Figure 2.** Main effects of the parameter levels due to the S/N Ratios

Regarding the rankings (importances), the change in the platform temperature, layer thickness, travel speed and the nozzle temperature have a significant effect on both the consumed energy and the spent time respectively. Furthermore, the parameter combination of PT at 60 °C, LT at 0.3 mm, TS at 80 mm/s and NT at 205 °C is revealed to be the best candidate for minimizing both the power need and manufacturing time.

In the following, the effects of the parameters were investigated in more details by revealing their percentage contributions over the energy management.

The percentage contributions of the parameters can be determined by applying ANOVA (Analysis-of-Variance) analyses. In ANOVA analysis, the S/N ratios found in the Taguchi analyses are accounted for revealing the percentages of each parameter in accordance with their effectivenesses. In this way, the dominant parameters presenting the contribution of above %5 can be interpreted with their exact amount of the percentages (Roy, 2010). According to the S/N Ratios, the ANOVA tables have been generated using Minitab software.

**Table 7.** ANOVA tables for energy consumption and total processing time

Energy consumption					Processing time				
Parameter	DF	Adj SS	Adj MS	Contribution	Parameter	DF	Adj SS	Adj MS	Contribution
LT	2	252.815	126.408	37.88%	LT	2	224908	112454	31.92%
NT	2	1.267	0.634	0.19%	NT	2	802	401	0.11%
PT	2	393.250	196.625	58.92%	PT	2	466177	233088	66.17%
TS	2	20.052	10.026	3.00%	TS	2	12663	6331	1.80%
<b>Total</b>	<b>8</b>			<b>100.00%</b>	<b>Total</b>	<b>8</b>			<b>100.00%</b>

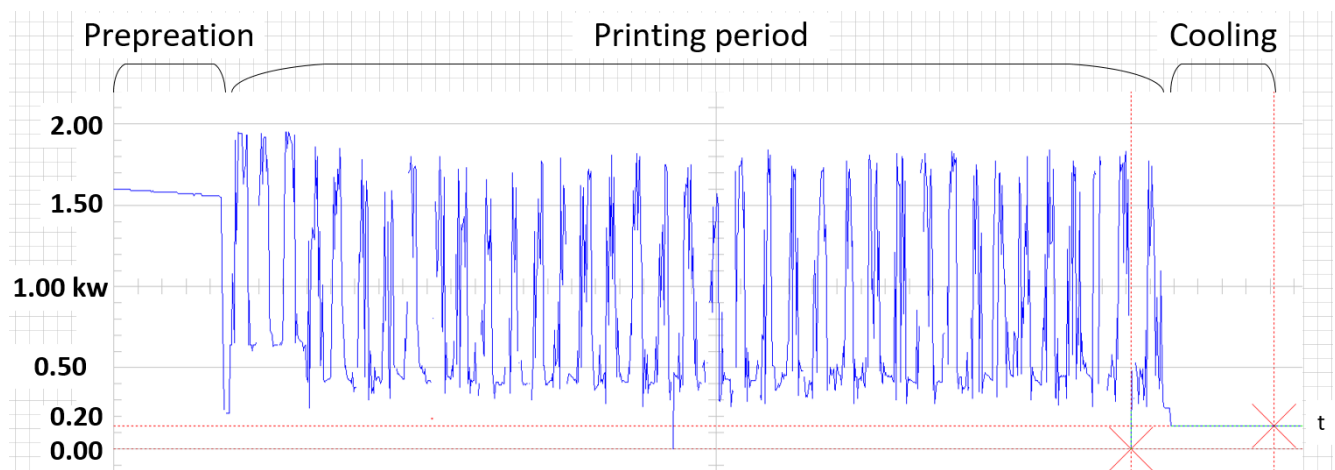
In the ANOVA tests for energy consumption, the contribution of PT and LT has been calculated as to be 58.92% and 37.88%. For processing time, the contribution of PT and LT has been calculated as to be 66.17% and 31.92% respectively. These parameters are then counted as dominant parameters

where the rest (TS and NT) are observed to have a minor effect with below 5% percent in contribution. It should be noted that the error adjustment has been made during the percentile calculations on the sum of squares (SS) and mean of squares (MS) as shown in the Table 7.

### Confirmation Tests

Until this point, the series of preliminary experiments have been conducted and the outputs were investigated using statistical approaches. As a result, the effects of the selected parameters have been revealed with their percentage contributions. Moreover, a new found combination have been obtained as; PT at 60 °C, LT at 0.3 mm, TS at 80 mm/s and NT at 205 °C.

In the light of the statistics, the prediction of the energy and the time spent can be minimized by using the parameters with revealed levels in a part manufacturing. To confirm this expression, a new specimen has been manufactured using this combination as a complementary testing. Tests were conducted using the same fixed parameters. The power consumption were monitored via the same online power analyser (Figure 3).



**Figure 3.** The representative capture of the online recording during the printing

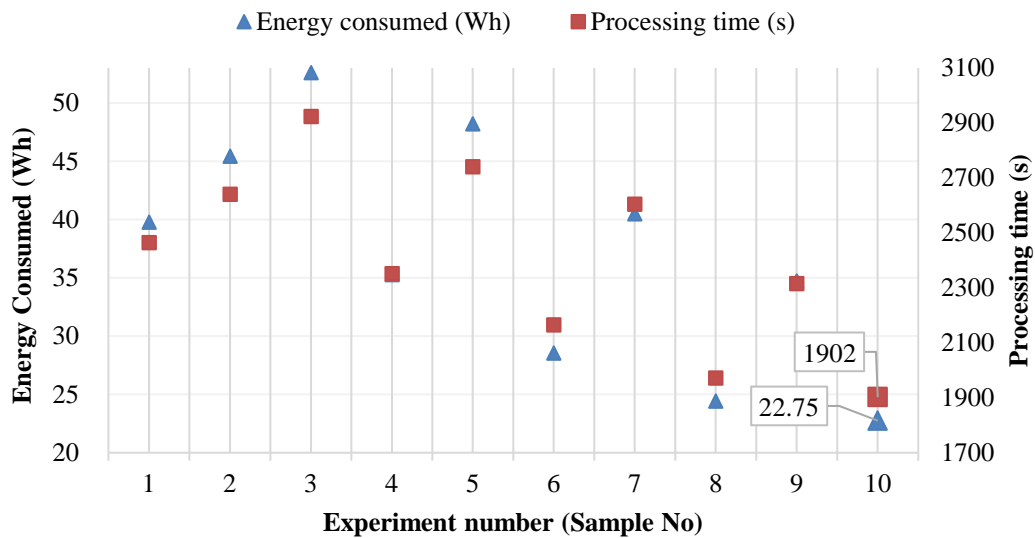
The confirmative tests were also repeated for three times. The mean results of the outputs have been give in the Table 8.

**Table 8.** Confirmation test results

Outputs	Bed heating	Nozzle heating	Print session	Idle time	TOTAL
Energy consumed (Wh)	8.6	2.1	4.83	7.22	22.75
Processing time (s)	217	128	207	1350	1902

The comparison between the results of the confirmative sample and the previously printed samples have been made as shown in the Figure 4.

Regarding the Figure 4, it was observed that the sample having the suggested combination consumed the minimum energy among the previous samples with the 22.75 Wh of energy consumption. In other words, the new found combination provided 6.91% energy efficiency within 10 samples. Moreover, the time required for the job has been reduced significantly.



**Figure 4.** The comparison graph between the samples

## CONCLUSION

The examinations over the actual printing processes are conducted via an open-source and modifiable device. The results are interpreted with the helpings of the powerful tools of engineering such as precise online monitoring, Taguchi and ANOVA analysis. The study is finalized by confirmative test procedure.

Owing to the experiments, it has been observed that the layer thickness and platform temperature parameters valid for each printing process have a significant effect on both power consumption and processing time. Because when these parameters are optimally adjusted according to the job, as also recorded in the tests, the energy consumption can be reduced within shorter printing times. The effects of these parameters on the need of energy-time have also been supported by revealing their percentage contributions. As a result, a reduction of 6.91% in energy consumption has been achieved. In addition, the printing time was also reduced significantly. According to the confirmation tests, the experiments have shown a good agreement with the statistical approaches. With this study, the parameters those should be taken into account while calculating the need of energy-time have been revealed with their effect amounts. In this way, it is provided to the users that which parameters those need to be focused specifically and it is contributed to more eco-friendly printing operations to be achieved.

**ACKNOWLEDGEMENTS:** This study was made possible with the generous supports from the mechanical engineering laboratories of both Adana Alparslan Türkeş Science and Technology University and Çukurova University.

**Conflict of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

**REFERENCES**

- ASTM F2792-12a, 2012. Standard terminology for additive manufacturing technologies, F42.19, Ed. West Conshohocken, PA: ASTM International.
- Baumers M, Tuck C, Wildman R, Ashcroft, I, Rosamond E, Hague R, 2012. Combined build-time, energy consumption and cost estimation for direct metal laser sintering. Proc of the Solid Freeform Fabrication Symposium, 278–288.
- Faludi J, Bayley C, Bhogal S, Iribarne M, 2015. Comparing environmental impacts of additive manufacturing vs traditional machining via life-cycle assessment, Rapid Prototyping J, 21(1):14-33.
- Forster A, 2015. Materials testing standards for additive manufacturing of polymer materials: State of the art and standards applicability, NIST Interagency/Internal report, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD.
- Gibson I, Rosen D, Stucker B, 2014. Additive manufacturing technologies: 3D printing, rapid prototyping, and direct digital manufacturing. Springer.
- Griffiths CA, Howarth J, De Almeida-Rowbotham G, Rees A, Kerton R, (2016). A design of experiments approach for the optimisation of energy and waste during the production of parts manufactured by 3D printing. J Clean Prod 139:74–85
- Gutierrez-Osorio A, Ruiz-Huerta L, Caballero-Ruiz A, Siller HR, Borja, V, 2019. Energy consumption analysis for additive manufacturing processes. International Journal of Advanced Manufacturing Technology, 105(1–4):1735–1743.
- Kumar Sood A, Ohdar RK, Mahapatra SS, 2010. Parametric appraisal of mechanical property of fused deposition modeling processed parts. Mater Des 31(1):287–295.
- Liu X, Zhang M, Li S, Si L, Peng J, Hu Y, 2017. Mechanical property parametric appraisal of fused deposition modeling parts based on the gray Taguchi method. Int J Adv Manuf Tech, 89(5–8):2387–2397.
- McAlister C, Wood J, 2014. The potential of 3D printing to reduce the environmental impacts of production, ECEEE Ind. Summer Study Energy Effic Retool a Compet Sustain Ind, 1:213– 221.
- Rajpurohit SR, Dave HK, 2018. Flexural strength of fused filament fabricated (FFF) PLA parts on an open-source 3D printer. Advances in Manufacturing, 6(4):430–441.
- Roy RK, 2010. A primer on the Taguchi method, 2nd edn. Society of manufacturing engineers.
- Song R, Clemon L, Telenko C, 2018. Uncertainty and variability of energy and material use by fused deposition modeling printers in makerspaces, J Indl Ecol Wiley/Blackwell, (10):1111.
- Suárez L, & Domínguez M, 2020. Sustainability and environmental impact of fused deposition modelling (FDM) technologies. International Journal of Advanced Manufacturing Technology, 106(3–4):1267–1279.
- Tymrak BM, Kreiger M, Pearce JM, 2014. Mechanical properties of components fabricated with open-source 3-D printers under realistic environmental conditions. Mater Des 58(6):242–246.
- Watson JK, Taminger KMB, 2018. A decision-support model for selecting additive manufacturing versus subtractive manufacturing based on energy consumption. J Clean Prod 176:1316–1322.
- Wohler Associates, 2018. 3D printing and additive manufacturing state of the industry: annual worldwide progress report.

**Atf İçin:** Soysal T, 2022. AZ-Mg Alaşımlarının Katılaşıma Çatlama Duyarlılığına Karşı Dolgu Metal ve Alaşım Elamanlarının Etkilerinin Tahmin Edilmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 412-422.

**To Cite:** Soysal T, 2022. Estimating the Effects of Filler Metal and Alloying Elements for Against Solidification Cracking Susceptibility of AZ-Mg Alloys. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 412-422.

## AZ-Mg Alaşımlarının Katılaşıma Çatlama Duyarlılığına Karşı Dolgu Metal ve Alaşım Elamanlarının Etkilerinin Tahmin Edilmesi

Tayfun SOYSAL<sup>1\*</sup>

**ÖZET:** Katılaşıma çatlak, magnezyum (Mg) alaşımlarının kaynağı için kaygı verici bir unsurdur. Maksimum  $|dT/d(f_s)^{1/2}|$ , bir indeks olarak Pandat termodinamik yazılımı ile alüminyum ve çinkonun başlıca alaşım elementlerinin olduğu AZ-Mg ark kaynaklarının katılaşıma çatlama duyarlılığını tahmin etmede kullanılmıştır. Bu indeksle AZ101 magnezyum kaynak telinin ticari olarak temin edilebilir AZ31, AZ61 ve AZ91 Mg alaşımlarının çatlak duyarlılığını azaltmaya etkisi araştırılmıştır. AZ101 Mg kaynak teli, üç alaşımın da katılaşıma çatlak duyarlılığının azaltılmasında etkili bulunmuştur. Alüminyum ve çinkonun AZ-Mg alaşımlarının katılaşıma çatlak duyarlılığına olan etkisi çatlak indeksi ve Pandat ile Scheil katılaşıma modeli esas alınarak tahmin edilmiştir. İndekse dayalı tahminler AZ-Mg alaşımlarının deneysel çatlak duyarlılığı verileri ile karşılaştırılmış ve hem tahminlerin hem de deneysel verilerin genel trendinin birbiriyle uyumlu olduğu görülmüştür. Tahminler, katılaşıma çatlak için önerilen kriter ışığında açıklanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** katılaşıma çatlak, kaynak edilebilirlik, magnezyum alaşımları, çatlak duyarlılığı tahminleri

### Estimating the Effects of Filler Metal and Alloying Elements for Against Solidification Cracking Susceptibility of AZ-Mg Alloys

**ABSTRACT:** Solidification cracking is a concern for welding magnesium (Mg) alloys. An index, the maximum  $|dT/d(f_s)^{1/2}|$ , was used with the thermodynamic software Pandat to make solidification cracking susceptibility predictions for AZ-Mg arc welds which have the main alloying elements of aluminum and zinc in the magnesium matrix. The effect of AZ101 magnesium filler on reducing crack susceptibility of commercially available AZ31, AZ61 and AZ91 Mg alloys was investigated with the crack susceptibility index. The filler metal AZ101 Mg alloy was found effective to reduce the susceptibility of all the three AZ-Mg alloys to solidification cracking. The influence of the amount of aluminum and zinc in the AZ-Mg alloys on the crack susceptibility was predicted using the cracking index and Pandat based on Scheil solidification model. The predictions based on the index were compared to the experimental crack susceptibility data of the AZ-Mg alloys, and it was seen that the general trend of both predictions and the reported data was consistent with each other. The predictions were explained in the light of the criterion proposed for solidification cracking.

**Keywords:** solidification cracking, weldability, magnesium alloys, crack susceptibility predictions

<sup>1</sup>Tayfun SOYSAL ([Orcid ID: 0000-0003-3861-2590](https://orcid.org/0000-0003-3861-2590)), İğdır Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Makine Mühendisliği Bölümü, İğdır, Türkiye

\*Corresponding Author: Tayfun SOYSAL, e-mail: tayfun.soysal@igdir.edu.tr

## INTRODUCTION

Magnesium (Mg) alloys have various applications such as automotive, aerospace and biomedical owing to their desired properties: light weight, castability, machinability and high strength (Friedrich, 2006). Although welding of Mg alloys is typically done to repair castings, the interest in the welding research for Mg alloys to increase the weldability of Mg alloys has increased (Liu, 2010). One of the challenges in welding of Mg alloys is cracking during solidification, called solidification cracking (Kou, 2020). The cracking phenomenon is also observed during casting, and named hot-tearing by casting community (Campbell, 2011). Solidification cracking susceptibility for Mg alloys have been reported by various studies (Adamiec, 2010; Huang et al., 2011; Kierzek and Adamiec, 2011; Liu and Kou, 2020; Liu and Dong, 2006; Sun et al., 2013; Yu et al., 2010; Demir and Durgutlu, 2014). Solid-state welding can be an alternative to have sound welds (Teker et al., 2018) but fusion welding with appropriate filler metals can save cost and be more versatile.

A number of tests and theories have been proposed to study susceptibility of materials to solidification cracking (Soysal and Kou, 2017). A criterion has been proposed to explain solidification cracking (Kou, 2015a). Formation of columnar dendritic grains during solidification was considered in the criterion. As these grains form and grow next to each other during solidification, they try to bond together. However, due to solidification shrinkage, e.g. 4.2 % for Mg (Flemings, 1974), and thermal contractions, these grains are separated from each other by tensile stresses. Furthermore, grain boundary liquid which flows through the channels between these grains help bonding of these grains filling the gaps caused by the stresses. Solidification cracking occurs if the tensile stresses can separate the grains by exceeding both the grain growth and the liquid flow between the grains. Therefore, if the grain growth rate or liquid flow rate is slow for an alloy during solidification, the alloy is susceptible or sensitive to solidification cracking. The growth of the grains has been related to a crack susceptibility index, the maximum  $\left| dT/d(f_s)^{1/2} \right|$ , in which  $T$  and  $f_s$  are respectively temperature and fraction solid (Kou S, 2015b). The susceptibility index has been coupled with solidification paths calculated by thermodynamic software and used to make crack susceptibility predictions of the materials. The susceptibility index was interpreted in the following way: if the maximum  $\left| dT/d(f_s)^{1/2} \right|$  of the material is small, the susceptibility or the tendency to cracking during solidification is low. This index was implemented to theoretically determine the crack susceptibility of aluminum alloys (Liu and Kou, 2015; Liu and Kou, 2016; Liu and Kou, 2017; Soysal, 2021a; Soysal and Kou, 2019a; Soysal and Kou, 2020), magnesium alloys (Liu and Kou, 2020), nickel-based alloys (Xia and Kou, 2020), and carbon steels (Soysal, 2021b; Xia and Kou, 2021). The predictions were verified by transverse motion weldability (TMW) test (Soysal and Kou, 2018; Soysal and Kou, 2019b) which was developed as an alternative to most widely used V-restraint test (Savage and Lundin, 1965). The crack susceptibility index was applied using the  $T$  vs  $f_s$  curves of the materials and assuming that an extensive bridging occurs between the dendritic grains of the materials at  $(f_s)^{1/2}=0.99$ , and beyond  $(f_s)^{1/2}=0.99$  crack susceptibility ends. This assumption comes from the RDG criterion proposed by Rappaz et al. (1999). It could be worth to note that Cylne and Davies (1981) assumed that the extensive bonding occurs between the grains when  $(f_s)^{1/2}$  exceeds 0.995. This assumption was also used for some aluminum alloys with the maximum  $\left| dT/d(f_s)^{1/2} \right|$  and worked well (Soysal and Kou, 2019a; Soysal, 2021a).

As mentioned earlier, the susceptibility index was used to predict the crack susceptibility of the arc welded magnesium welds made without filler metal, and the predictions were consistent with the TMW test results (Liu and Kou, 2020). In this study, the susceptibility index will be used to investigate the filler metal effect and alloying elements' effect on the crack susceptibility of the most commonly

used AZ-Mg alloys such as AZ31, AZ61 and AZ91 which have the main alloying elements of aluminum and zinc in the magnesium matrix. Commercially available filler metal AZ101 Mg alloy have been selected for welding and study the filler metal effect which has not been studied before. The calculated results are compared to the experimental data to verify the accuracy of the work.

## MATERIALS AND METHODS

Solidification cracking susceptibility of the AZ-Mg fusion welds were predicted using the maximum  $|dT/d(f_s)^{1/2}|$ , the susceptibility index for solidification cracking. Crack susceptibility predictions of AZ31, AZ61 and AZ91 Mg alloys were firstly calculated using the nominal chemical compositions of them given on Table 1. Then, these three alloys were presumed to be arc welded with the filler metal made out of AZ101 Mg alloy of which the nominal chemistry is included in Table 1. The welding conditions of arc welding with one pass can be considered for the imagined fusion welding process. The differences in the effect of the heating cycles of the welds on the crack susceptibility were ignored. The welds were considered to be composed of the workpiece and the filler metal with the ratio of 1:4 (20% workpiece and 80% filler metal). Table 2 shows the weld compositions which were calculated using the nominal chemical compositions on Table 1.  $T$  vs  $(f_s)^{1/2}$  curves of AZ31, AZ61, AZ91 and the welds were calculated using Pandat, commercial thermodynamic software, (Pandat 2020) and its databases regarding the chemical compositions on Tables 1 and 2. As the solidification model of the software, Scheil solidification, which assumes no solid diffusion and complete liquid diffusion (Kou S, 2020), was used for the calculations, as Liu and Kou (2020) used for arc welding of the Mg alloys. The maximum  $|dT/d(f_s)^{1/2}|$  on the  $T$  vs  $(f_s)^{1/2}$  curves were examined up to  $(f_s)^{1/2}=0.99$ . In addition, the influence of the alloying elements of aluminum and zinc on the crack susceptibility of the magnesium alloys was predicted. Contour map of the crack susceptibility was plotted using Pandat. For the contour map of AZ-Mg alloys, 121 alloys were considered. It covers the composition changes from 0.5 to 5wt% for both aluminum and zinc.

**Table 1.** Nominal chemical compositions of the materials (wt%)

	<i>Al</i>	<i>Zn</i>	<i>Mg</i>
<b>Workpiece</b>			
<b>AZ31</b>	3	1	bal.
<b>AZ61</b>	6	1	bal.
<b>AZ91</b>	9	1	bal.
<b>Filler metal</b>			
<b>AZ101</b>	10	1	bal.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Predicting Filler Metal Effect

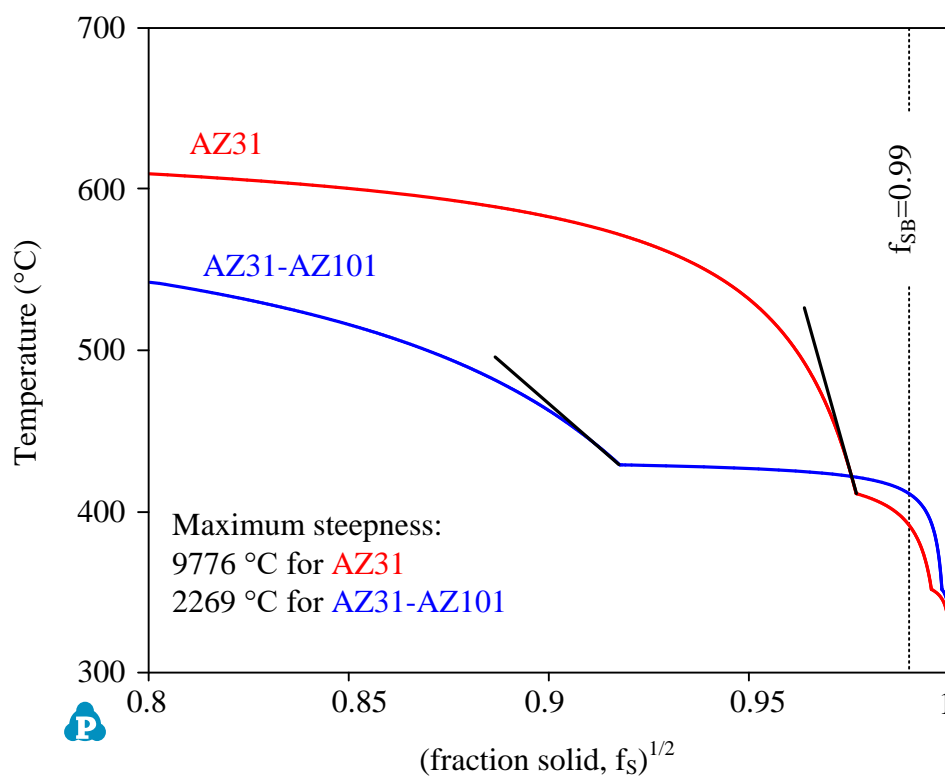
Although susceptibility of the AZ-Mg alloys was predicted and experimentally studied by Liu and Kou (2020), they were calculated in this study to illustrate the effect of the filler metal AZ101 Mg alloy on reducing the susceptibility to solidification cracking. Calculated  $T$  vs  $(f_s)^{1/2}$  curves by Pandat for AZ31 Mg alloy with and without the filler metal AZ101 Mg alloy are shown in Figure 1. The maximum  $|dT/d(f_s)^{1/2}|$ , in other words the maximum steepness, of the curves were determined and given on the lower right corner of the figure. The maximum steepness for AZ31 Mg alloy without filler metal was found as 9776 °C before  $(f_s)^{1/2}$  reaches 0.99 (indicated with black tangent line). When the filler metal AZ101 Mg alloy was considered to be used to weld AZ31 Mg alloy, the maximum steepness was found as 2269 °C. As Kou (2015b) pointed out, if the maximum  $|dT/d(f_s)^{1/2}|$  is small, the crack susceptibility



is low. Therefore, the filler metal AZ101 Mg alloy can be effective to reduce the susceptibility of AZ31 Mg alloy to solidification cracking lowering the maximum steepness from 9776 °C to 2269 °C. This drastic change in the maximum steepness is the result of changes in the chemical compositions, freezing temperature ranges, and the order of phase formations of the welds. The filler metal makes the important part of the solidification curve shallower. A detailed explanation on this is made at the end of this section.

**Table 2.** Chemical compositions of the welds (wt%) calculated based on 20% of the workpiece and 80% of the filler metal compositions.

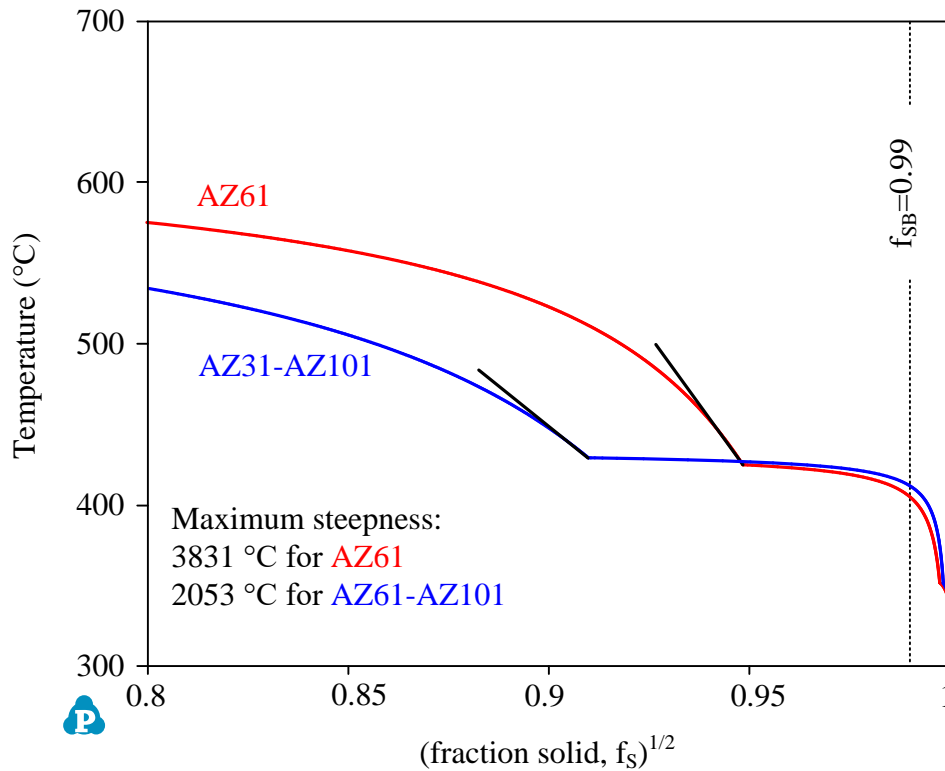
Welds	Al	Zn	Mg
AZ31-AZ101	8.6	1	bal.
AZ61-AZ101	9.2	1	bal.
AZ91-AZ101	9.8	1	bal.



**Figure 1.**  $T$  vs  $(f_s)^{1/2}$  curves of AZ31 Mg alloy with and without the filler metal AZ101 Mg alloy

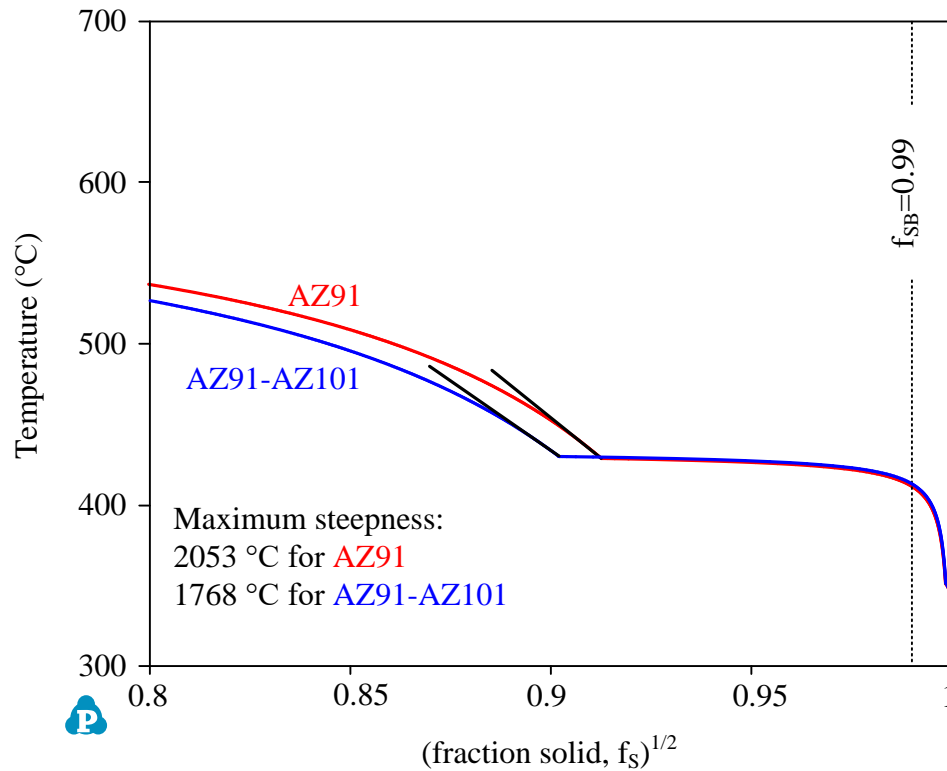
The  $T$  vs  $(f_s)^{1/2}$  curves of AZ61 Mg alloy with and without the filler metal AZ101 Mg alloy are shown in Figure 2. The maximum steepness of AZ61 Mg alloy was found as 3831 °C, and the maximum steepness of the weld metal made with AZ61 Mg alloy and the filler metal AZ101 Mg alloy was found as 2053 °C. The filler metal AZ101 Mg alloy can reduce the crack susceptibility of AZ61 Mg alloy lowering the maximum steepness from 3831 °C to 2053 °C.

Figure 3 shows the  $T$  vs  $(f_s)^{1/2}$  curves of AZ91 Mg alloy with and without the filler metal AZ101 Mg alloy. The maximum steepness of the welds made without and with the filler metal AZ101 Mg alloy were found as 2053 °C and 1768 °C, respectively. Since the maximum steepness of AZ91 Mg alloy decreases using the filler metal AZ101 Mg alloy, the filler metal can be effective to reduce its susceptibility to solidification cracking as well.



**Figure 2.**  $T$  vs  $(f_s)^{1/2}$  curves of AZ61 Mg alloy with and without the filler metal AZ101 Mg alloy

Solidification cracking susceptibility predictions of all the Mg welds given in Figures 1 to 3 were shown with the bar chart in Figure 4. The bar chart illustrates the maximum  $|dT/d(f_s)^{1/2}|$  and indicates that longer the bar, higher the susceptibility to solidification cracking is. The predictions show that the crack susceptibility order of workpiece is AZ31>AZ61>AZ91. Figure 5 shows TMW test results of these three Mg alloys reported by Liu and Kou (2020). The TMW test was conducted by doing a lap welding with gas tungsten arc welding and moving the lower-sheet normal to the welding direction to cause cracking. The magnitude of the moving speed indicates the crack resistance of the weld. As can be seen on the figure, the bar chart for the welds have three regions on the bars: no crack, full crack and transition range (located between no crack and full crack regions). As the moving speed was increased to cause full cracking during testing, some partial crack lengths were seen at some moving speeds. The moving speeds corresponding to these partial cracks are represented by the transition ranges on the figure. If the overall location of the transition range is located at a high moving speed, it means its crack resistance is high. The transition range of the AZ31 Mg alloy is located at a lower level than the other two alloys (the numbers increasing downward on the figure), therefore it has a higher crack susceptibility than AZ61 and AZ91 Mg alloys. The susceptibility order of the three alloys are consistent in both Figures 4 and 5. Since the index cannot be related to any physical property of the welds, the comparison between the predictions and the test results should be made qualitatively. As the predictions on Figure 4 shows, the filler metal AZ101 Mg alloy reduced the crack susceptibility of all the three AZ-Mg alloys. The use of AZ101 Mg alloy as the filler metal helped to reduce the crack susceptibility of both AZ31 and AZ61 Mg alloys significantly but it reduced the crack susceptibility of AZ91 Mg to some extent. Since the susceptibility of AZ91 Mg alloy was not bad compared to the other two alloys, the effectiveness of the filler metal AZ101 Mg alloy on reducing the crack susceptibility is expected to be small.

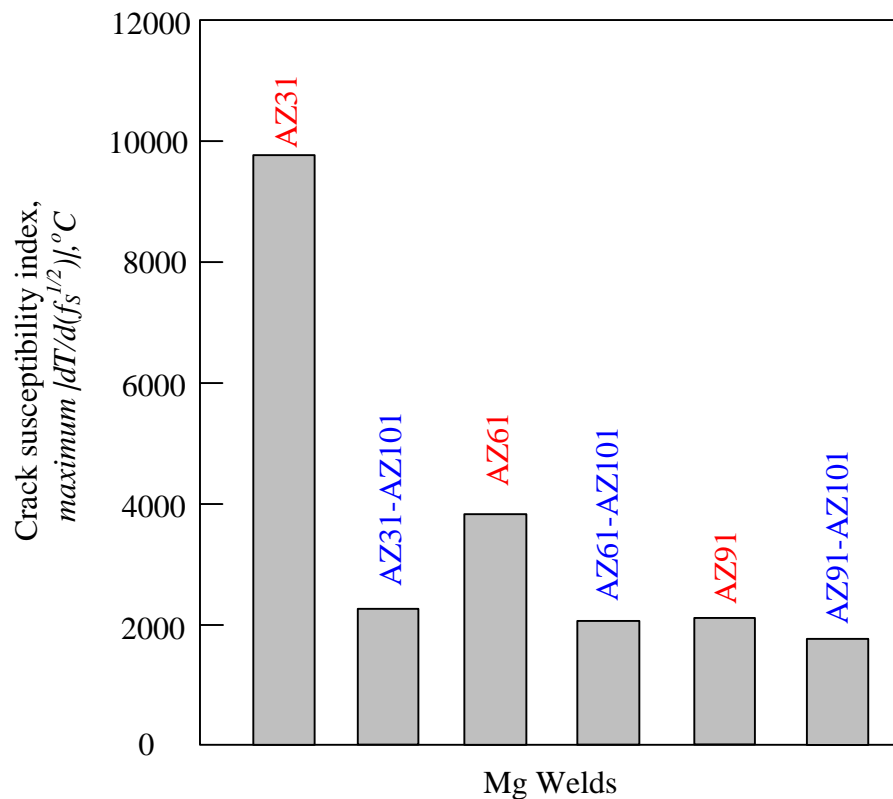


**Figure 3.**  $T$  vs  $(f_s)^{1/2}$  curves of AZ91 Mg alloy with and without the filler metal AZ101 Mg alloy

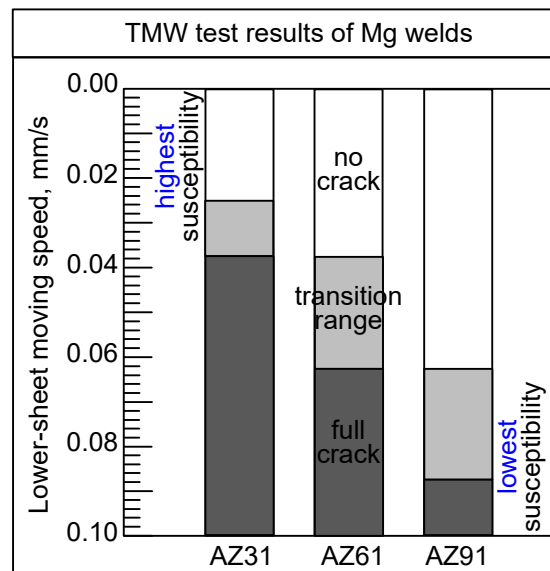
The crack susceptibility predictions have shown that the filler metal AZ101 Mg alloy can be used for the AZ-Mg alloys to help avoiding solidification cracking. AZ101 Mg alloy contains more aluminum than the other AZ-Mg alloys. Thus, keeping the aluminum content high in the weld metal can help for avoiding solidification cracking. The influence of the alloying elements in the AZ-Mg alloys will be subsequently discussed later. As can be seen from Figures 1 to 3, the filler metal AZ101 lowered the liquidus temperatures and shortened the freezing or solidification temperature ranges of AZ31, AZ61 and AZ91 Mg alloys. This resulted in a fast fraction solid increase as the temperature drops, and hence caused to have shallower  $T$  vs  $(f_s)^{1/2}$  curves. As the fraction solid increases, the growth rate of the grains considered by Kou (2015a) increases during solidification. If the total rate of the grain growth and the liquid flow between the grains exceeds the tensile strain rate during solidification, solidification cracking can be prevented. The filler metal AZ101 Mg alloy helps increasing the growth rate of the dendrites till very end of solidification (corresponding a  $(f_s)^{1/2}$  value higher than 0.99), therefore, it is effective to reduce solidification cracking susceptibility of AZ31, AZ61 and AZ91 Mg alloys.

The phases of the AZ-Mg alloys formed during cooling is as follows according to the calculated curves with Scheil solidification model:  $L \rightarrow L + \text{HCP} \rightarrow L + \text{HCP} + \text{AlMg}_\gamma \rightarrow L + \text{HCP} + \text{T\_AlMgZn} \rightarrow \text{HCP} + \text{T\_AlMgZn} + \text{MgZn}$ . The black tangent lines shown on the solidification curves in Figures 1-3 which were used to find maximum  $|dT/d(f_s)^{1/2}|$  were found at the border of the phase transformation of  $L + \text{HCP} \rightarrow L + \text{HCP} + \text{AlMg}_\gamma$ . When the filler metal AZ101 Mg alloy is used to weld the AZ-Mg alloys, this phase transformation happens faster and the solidification curve becomes shallower. For example, while the aforementioned phase transformation occurs at  $(f_s)^{1/2}$  of 0.977 and the temperature of 411°C for AZ31 Mg alloy, it occurs at  $(f_s)^{1/2}$  of 0.918 and the temperature of 429°C for AZ31-AZ101 Mg weld. The increased aluminum content of the AZ31-AZ101 Mg weld increases the rate of solidification and hence it results in a shorter freezing time range for cracking to occur. Since faster solidification rates in the welding processes can help for avoiding solidification

cracking (Soysal and Kou, 2017; Coniglio and Cross, 2020), the shortened freezing temperature ranges of the welds can be expected to more resistant to solidification cracking.



**Figure 4.** Solidification cracking susceptibility predictions of all the Mg welds in Figures 1 to 3 shown with bar chart: longer the bar chart, higher the susceptibility to solidification cracking is.



**Figure 5.** Solidification cracking susceptibility test results of AZ31, AZ61 and AZ91 Mg welds obtained by the TMW test (from Liu and Kou, 2020).

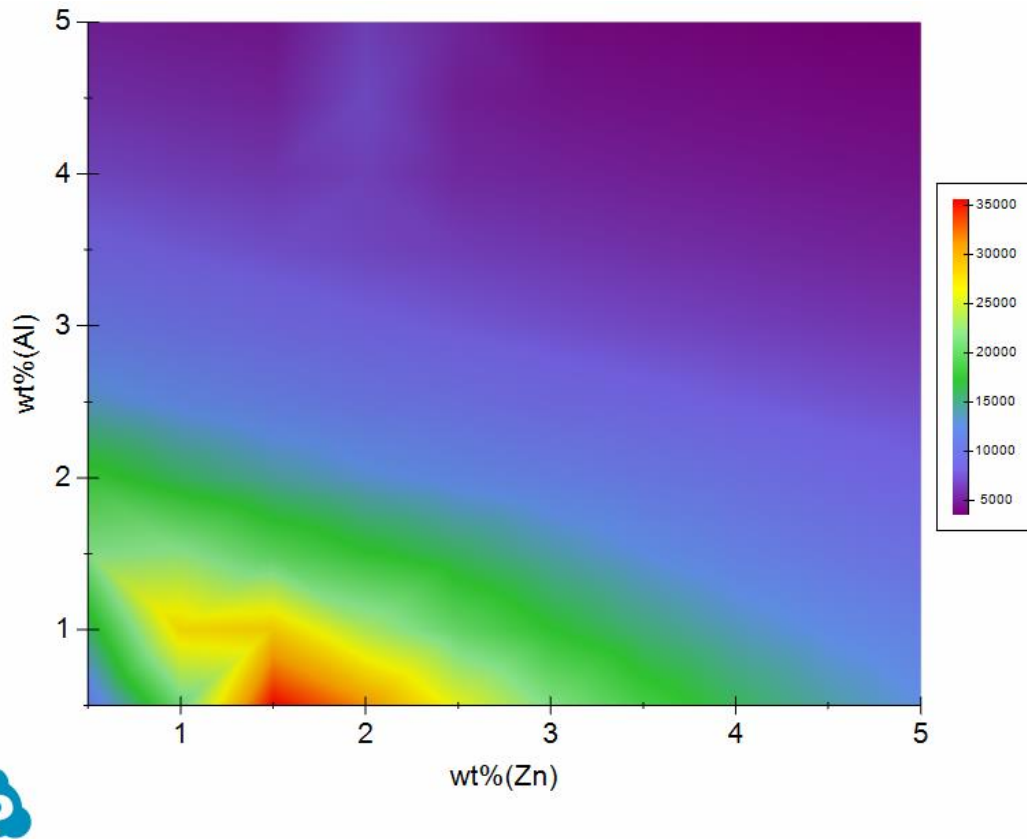
### Predicting Effect of Alloying Elements

The influence of both aluminum and zinc contents was also predicted using Pandat considering 121 alloys which cover the alloying element content ranges of 0.5-5wt% of both aluminum and zinc, and it is shown in Figure 6. According to the figure, the crack susceptibility is very high when the zinc

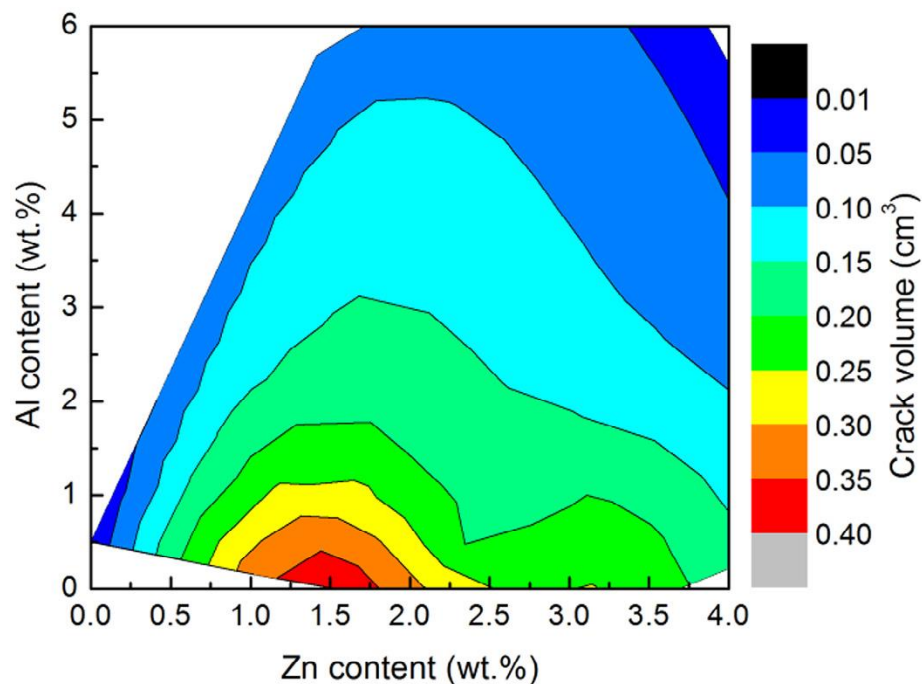
content is around 1.5 wt% with the absence of aluminum which was indicated with red colored region. By increasing the aluminum content in the AZ-Mg alloys the crack susceptibility decreases. It appears that decreasing or increasing the zinc content (going away from the zinc content of 1.5 wt%) also helps for avoiding solidification cracking but increasing aluminum content is more effective in the reduction of the crack susceptibility. If the zinc content is kept constant at 1 wt% just like in the case of the AZ-Mg alloys investigated in this study, the aluminum content of 4 wt% or higher can be helpful to avoid solidification cracking by moving to the purple colored region. As can be seen from the Table 2, the weld compositions have higher aluminum content than 7 wt% so they must fall into the darker purple colored regions, and the chemical compositions of them must be good for avoiding solidification cracking. Furthermore, AZ91 Mg alloy must also fall into the darker purple colored region which indicates low crack susceptibility. In fact, the TMW tests of the AZ-Mg alloys reported by Liu and Kou (2020) shown in Figure 5 has shown that AZ91 Mg alloy has good crack resistance. As mentioned earlier, the increase in the aluminum content of the welds consistently results in the earlier precipitation of AlMg<sub>2</sub> phase from liquid and hence the maximum steepness of the solidification curves decreases. On the other hand, increase in the zinc content of the weld (this was observed when the zinc content was increased from 1 wt% to 3 wt%) can result in the delay of the precipitation of AlMg<sub>2</sub> phase (phase formation occurs at lower temperatures), and therefore the focused part of the solidification paths can become more steeper. Since steeper solidification paths cause to have a high susceptibility index, the calculated crack susceptibility can increase as the zinc content increases.

Figure 7 shows experimental crack susceptibility data obtained by Zhou (2011) given in the review of Song et al. (2016). The data was obtained using hot tearing susceptibility test setup which was called constrained rod casting test. In this test setup, the geometry of the rods were designed to prevent free solidification shrinkage of the cast alloys to cause cracking during solidification. As can be seen from the figure, there is high crack susceptibility in the red colored region corresponding to the chemical composition of 1.5 wt% zinc content and no or little bit aluminum. It is possible to avoid this high crack susceptible region by adding more aluminum and zinc to the Mg alloys. It seems that increasing aluminum content of the AZ-Mg alloys is more effective in reducing crack susceptibility than increasing the zinc content which is consistent with the predictions demonstrated in Figure 6. The predictions calculated based on Scheil solidification model in Figure 6 were prepared considering arc welding conditions. In arc welding, the solidification time is shorter than that in casting. Longer solidification times promote the solid diffusion during solidification, thus the effect of solid diffusion in arc welding and casting can vary. The crack susceptibility can decrease, and the sensitive compositions can change when solid diffusion is significant in the process (Liu and Kou, 2015). In the predictions given in Figure 6, the effect of solid diffusion on the crack susceptibility is ignored using Scheil solidification model. Because of that, the crack susceptibility may shift in terms of chemical compositions while predicting solidification cracking susceptibility in arc welding compared to the crack susceptibility for casting. Although the high crack susceptible compositions (or crack susceptibility peak) of both Figures 6 and 7 are consistent with each other, there are some differences in how crack susceptibility decreases as the composition changes perhaps due to the differences between the metal processes and amount of solid diffusion in both processes. The predictions can also be made using solidification models which can account for solid diffusion in the selected metal process. However, Scheil solidification model used in the present study is fairly enough for fusion welding of magnesium alloys and can give an idea about the general trend of the crack susceptibility. Both Figures 6 and 7 indicate that increasing aluminum content in the composition of the AZ-Mg alloys can be effective to reduce the crack susceptibility. As

for the zinc content, avoiding the rough composition range of 1 to 3 wt% is better for solidification cracking.



**Figure 6.** Solidification cracking susceptibility predictions of AZ-Mg ternary alloys based on maximum  $|dT/d(f_s)^{1/2}|$  calculated by Pandat: crack susceptibility decreases from red colored region to purple colored region.



**Figure 7.** Experimental data for hot tearing susceptibility of aluminum-zinc-magnesium ternary alloys from Song et al. (2016).

## CONCLUSION

Crack susceptibility predictions of the AZ-Mg welds with and without filler metal AZ101 Mg were made using the susceptibility index, the maximum  $|dT/d(f_s)^{1/2}|$ , which was calculated with the help of commercial thermodynamic software. The filler metal AZ101 Mg alloy was found to be effective in reducing the crack susceptibility of all the three AZ-Mg alloys (AZ31, AZ61 and AZ91 Mg alloys) by lowering their maximum  $|dT/d(f_s)^{1/2}|$ . The influence of the amount of the alloying elements (aluminum and zinc) in the AZ-Mg alloys on the crack susceptibility was predicted. The predictions showed that increasing aluminum content of the weld helps for avoiding solidification cracking. The predictions based on the index were compared to literature and verified. The predictions were explained using a criterion proposed for solidification cracking.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. Demo version of Computherm LLC's thermodynamic software Pandat was used to do the calculations.

## Conflict of Interest

As an author, I declare that there is no conflict of interest in the planning, execution and writing of the article.

## Author's Contributions

As the author, the planning, execution and writing of the articles was carried out by me.

## REFERENCES

- Adamiec J, 2010. Evaluation of susceptibility of the ZRE1 alloy to hot cracking in conditions of forced strain. Archives of Foundry Engineering, 10: 345–350.
- Campbell J, 2011. Complete Casting Handbook: Metal Casting Processes, Techniques and Design, Butterworth-Heinemann, Waltham (MA), USA, pp. 465-495
- Clyne TW, Davies GJ, 1981. Influence of composition on solidification cracking susceptibility in binary alloy systems. Br. Foundryman, 74: 65–73.
- Coniglio N, Cross CE, 2020. Effect of weld travel speed on solidification cracking behavior, Part 1: Weld Metal Characteristics. The International Journal of Advanced Manufacturing Technology, 107:5011–5023
- Demir B, Durgutlu A, 2014. An Investigation of TIG Welding of AZ31 Magnesium Alloy Sheets. Materials Testing, 56: 847-851.
- Flemings MC, 1974. Solidification processing, McGraw-Hill, New York (NY), USA.
- Friedrich HE, Mordike BL, 2006. Magnesium Technology. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Huang CJ, Cheng CM, Chou CP, Chen FH, 2011. Hot Cracking in AZ31 and AZ61 Magnesium Alloy. Journal of Materials Science and Technology, 27: 633–640.
- Kierzek A, Adamiec J, 2011. Evaluation of susceptibility to hot cracking of magnesium alloy joints in variable stiffness condition. Archives of Metallurgy and Materials, 56: 759–767.
- Kou S, 2015a. A criterion for cracking during solidification. Acta Materialia, 88: 366-374.
- Kou S, 2015b. A simple index for predicting the susceptibility to solidification cracking. Welding Journal, 94 (2015): 374-388.
- Kou S, 2020. Welding Metallurgy, 2<sup>nd</sup> ed., Wiley, Hoboken (NJ), USA, pp. 263-299.
- Liu J, Kou S, 2015. Effect of diffusion on susceptibility to cracking during solidification. Acta Materialia, 100: 359-368.
- Liu J, Kou S, 2016. Crack Susceptibility of Binary Aluminum Alloys during Solidification. Acta Materialia, 110: 84-94.

- Liu J, Kou S, 2017. Susceptibility of ternary aluminum alloys to cracking during solidification. *Acta Materialia*, 125: 513-523.
- Liu K, Kou S, 2020. Susceptibility of magnesium alloys to solidification cracking. *Science and Technology of Welding and Joining*, 25: 251-257.
- Liu L, 2010. *Welding and Joining of Magnesium Alloys*. Woodhead Publishing, Cambridge, UK, pp. 23-93.
- Liu L, Dong C, 2006. Gas tungsten-arc filler welding of AZ31 magnesium alloy. *Materials Letters*, 60: 2194–2197.
- Pandat 2020– Phase Diagram Calculation software package for Multicomponent Systems, Computherm LLC, Madison, WI 53719.
- Rappaz M, Drezet JM, Gremaud M, 1999. A new hot-tearing criterion. *Metallurgical and Materials Transactions A*, 30: 449-455.
- Savage WF, Lundin CD, 1965. The Vareststraint test. *Welding Journal*, 44: 433s-442s.
- Song J, Pan F, Jiang B, Atrens A, Zhang MX, Lu Y, 2016. A review on hot tearing of magnesium alloys. *Journal of Magnesium and Alloys*, 4: 151-172.
- Soysal T, 2021a. A criterion to find crack-resistant aluminum alloys to avoid solidification cracking. *Science and Technology of Weld Joining*, 26: 99-105.
- Soysal T, 2021b. Effect of solidification models on predicting susceptibility of carbon steels to solidification cracking. *Weld World*, (1-12), <https://doi.org/10.1007/s40194-021-01132-0>
- Soysal T, Kou S, 2017. A simple test for solidification cracking susceptibility and filler metal effect. *Welding Journal*, 96: 389s-401s.
- Soysal T, Kou S, 2018. A simple test for assessing solidification cracking susceptibility and checking validity of susceptibility prediction. *Acta Materialia*. 143: 181-197.
- Soysal T, Kou S, 2019a. Predicting effect of filler metals on solidification cracking susceptibility of 2024 Al and 6061 Al. *Science and Technology of Welding and Joining*, 24: 559-565.
- Soysal T, Kou S, 2019b. Effect of filler metals on solidification cracking susceptibility of Al alloys 2024 and 6061. *Journal of Materials Processing Technology*, 266: 421-428.
- Soysal T, Kou S, 2020. Role of liquid backfilling in reducing solidification cracking in aluminum welds. *Science and Technology of Welding and Joining*. 25: 415-421.
- Sun DX, Cui DL, Shi JT, 2013. Hot Cracking and Microstructure of Welding Joint of Magnesium Alloy AZ91D. *Advanced Materials Research*, 753: 435–438.
- Teker T, Yilmaz SO, Karakurt EM, 2018. Effect of different rotational speeds on mechanical and metallurgical properties of friction welded dissimilar steels. *Materials Testing*, 60: 135-141.
- Xia C, Kou S, 2020. Evaluating susceptibility of Ni-base alloys to solidification cracking by transverse-motion weldability test. *Science and Technology of Welding and Joining*. 25: 690-697.
- Xia C, Kou S, 2021. Calculating the Susceptibility of Carbon Steels to Solidification Cracking During Welding. *Metallurgical and Materials Transactions B*, 52: 460-469.
- Yu ZH, Yan HG, Chen SJ, Chen JH, Zeng PL, 2010. Method for welding highly crack susceptible magnesium alloy ZK60. *Science and Technology of Welding and Joining*, 15: 354–360.
- Zhou L, 2011. School of materials science and engineering, Shenyang University of Technology, China, Doctoral Thesis (in Chinese).



**Atıf İçin:** Tokatlı, M., Saydam, F., Hal, M., Koşatepe, A., Çolak, M., Yüksel, Ç., 2022. Alüminyum alaşımlarının dökümünde yaygınca kullanılan sıvı metal temizleme yöntemlerinin incelenmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 423-434.

**To Cite:** Tokatlı, M., Saydam, F., Hal, M., Koşatepe, A., Çolak, M., Yüksel, Ç., 2022. Investigation of liquid metal cleaning methods commonly used in the casting of aluminum alloys. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 423-434.

### **Alüminyum Alaşımlarının Dökümünde Yaygınca Kullanılan Sıvı Metal Temizleme Yöntemlerinin İncelenmesi**

Mehmet TOKATLI<sup>1\*</sup> Ferhat SAYDAM<sup>2</sup> Murat HAL<sup>2</sup> Abdulhadi KOŞATEPE<sup>3</sup> Murat ÇOLAK<sup>1</sup> Çağlar YÜKSEL<sup>2</sup>

**ÖZET:** Alüminyum ve alaşımlarının birçok avantajlı özelliği sayesinde metal dökümü endüstrisinde demir-çelikten sonra kendisine ikinci sırada yer bulmayı başarmıştır. Alüminyum üretimi cevherden ve hurdadan geri dönüşüm şeklinde temelde iki farklı prosesle elde edilmektedir. Alüminyumun en önemli hammaddesi boksittir ve birincil alüminyum bu cevherden elde edilir. Alüminyum üretiminde boksit cevherinden üretim, hurdadan geri dönüşüme nazaran çok daha fazla enerjiye ihtiyaç duymaktadır. Üretici girdisinde de ciddi ekonomik değere sahip olan ikincil alüminyum sanayide oldukça fazla kullanılmaktadır. Ancak geri dönüşüm yoluyla ikincil alüminyum kullanımında karşılaşılan en önemli problemler sıvı metal kalitesinin optimizasyonu ve ilave sıvı metal işlemlerinin gereksinimidir. Yüksek kaliteli alüminyum dökümler üretmek için, çözülmüş hidrojenin, çift katlı oksit filmlerinin (bifilm), katışıkların (inklüzyon) ve safsızlıkların (empürite) arındırılması gerekmektedir. Bu amaçla endüstride birçok sıvı metal temizleme yöntemi kullanılmakta ve her geçen gün alternatif yeni yöntemler geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Bu derlemede de bu perspektiften bakılarak, alüminyum ve alaşımlarının dökümünde güncel olarak yaygınca kullanılan sıvı metal temizleme yöntemlerinden; flaks kullanımı, rotary (döner tip) gaz giderme, kontrollü katılaştırma yöntemi, elektromanyetik yönlü gaz giderme, sprey gaz giderme, ultrasonik gaz giderme yöntemi, vakumlu gaz giderme yöntemleri ele alınmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Alüminyum döküm, metal temizleme, bifilm, inklüzyon, temizleme yöntemleri

#### **Investigation of Liquid Metal Cleaning Methods Commonly Used in the Casting of Aluminum Alloys**

**ABSTRACT:** Owing to several advantageous properties of aluminium and its alloys, this engineering alloy family has succeeded in finding itself the second place after iron and steel in metal casting industry. Production of aluminum is basically obtained by two different processes: recycling and ore. Bauxite is the leading raw material of aluminum, and primary aluminum is obtained from this ore. In addition, aluminum production from bauxite ore requires much more energy than recycling from scrap. Also, secondary aluminum having a serious economic value as a raw material for the manufacturers is widely used in the industry. However, the most important problems encountered in the use of secondary aluminum through recycling are the optimization of the liquid metal quality and the requirement of additional liquid metal processes. To produce high quality aluminum castings, the liquid metal is needed some compulsory phenomena such as free of dissolved excess hydrogen, double oxide surface films (bifilms), inclusions and impurities. For this purpose, many liquid metal cleaning methods are used in the industry and alternative new methods are being developed every day. In this review, the liquid metal cleaning methods that are widely used in the casting of aluminum and its alloys, namely the flux usage, rotary degassing, controlled solidification method, electromagnetic directional degassing, spray degassing, ultrasonic degassing method, and vacuum degassing method are discussed from the contemporary perspective.

**Keywords:** Aluminum casting, metal cleaning, bifilm, inclusion, cleaning methods

<sup>1</sup>Mehmet TOKATLI ([Orcid ID: 0000-0001-6001-0292](https://orcid.org/0000-0001-6001-0292)), Murat ÇOLAK ([Orcid ID: 0000-0002-8255-5987](https://orcid.org/0000-0002-8255-5987)) Bayburt Üniversitesi, Teknik Bilimler MYO, Bayburt, Türkiye

<sup>2</sup>Ferhat SAYDAM ([Orcid ID: 0000-0003-2679-7225](https://orcid.org/0000-0003-2679-7225)), Murat Hal ([Orcid ID: 0000-0001-6505-2336](https://orcid.org/0000-0001-6505-2336)), Çağlar YÜKSEL ([Orcid ID: 0000-0001-9591-6430](https://orcid.org/0000-0001-9591-6430)) Atatürk Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, Erzurum, Türkiye

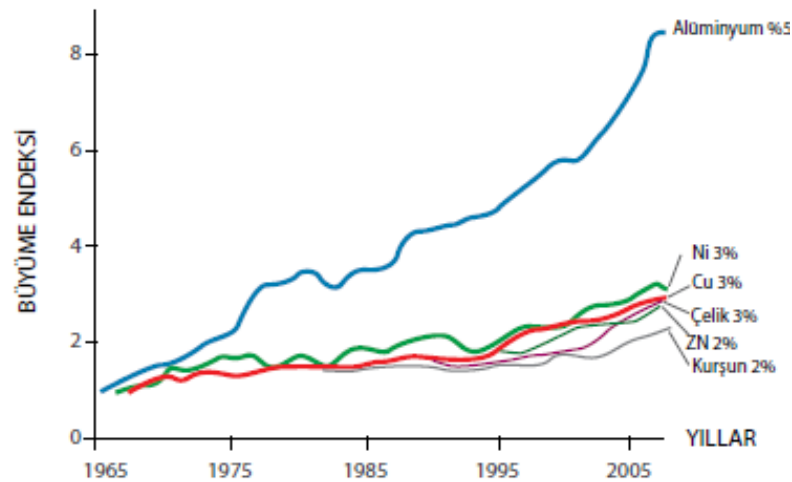
<sup>3</sup>Abdulhadi KOŞATEPE ([Orcid ID: 0000-0002-7767-4981](https://orcid.org/0000-0002-7767-4981)) Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Patnos MYO, Ağrı, Türkiye

\*Sorumlu Yazar: Mehmet TOKATLI, e-mail:meh.tokatli@hotmail.com

## GİRİŞ

Ergitilmiş sıvı metalin hazırlanmış kalıp boşluğuna doldurulması olarak adlandırılan döküm yöntemi en eski imalat yöntemlerinden birisidir (Campbell, 2004). Döküm üretimi üzerine yapılan bir çalışmada Amerika'daki metal döküm üretiminin 14 milyon tonun üzerinde olduğunu belirtilmiştir. Demir dışı metal döküm alaşımları arasında ise en çok üretimi gerçekleştirilen metalin alüminyum olduğu tespit edilmiştir. Bu oran toplam demir dışı metal üretimi arasında %73,3 gibi ciddi bir orana denk gelmektedir (Gallo, 2010). Ayrıca özellikle otomotiv sektöründe alüminyum alaşımlarına her geçen gün daha fazla oranda ihtiyaç duyulduğu ve bu oranın giderek arttığı belirtilmiştir (Chen et al., 1984).

Alüminyum alaşımları denilince ilk akla gelen özelliklerin arasında hafiflik, korozyon direnci, elektrik ve ısı iletkenliğinin yüksek olması, yüksek dayanım, sünek olması gelmektedir. Bu özelliklerinden dolayı birçok endüstride farklı uygulamalarda yaygınca kullanım bulmakta ve kullanımı her geçen gün artmaya devam etmektedir (Brooks, 1984). Alüminyum alaşımlarının kullanıldığı sektörleri başta otomotiv, havacılık, savunma, uzay endüstrisi, makine imalat, gıda endüstrisi şeklinde sıralamak mümkündür. Ayrıca yayınlanan bir raporda alüminyum döküm parçalarına talebin her yıl %10'a yakın oranda artması beklenmektedir. Bu oranın ülkemizde üretilen parçaların ağırlıklı olarak otomotiv sektöründe olduğu göz önüne alındığında daha da fazla olacağı düşünülmektedir. Bu üretimin % 85 gibi çok büyük oranının ihraç edileceği hesaba katıldığında, alüminyum metalinin önemi bir kez daha göz önüne sergilenmektedir (Alan, 2008). Alüminyum kullanımının büyüme oranının diğer metaller ile karşılaştırmasının yapıldığı çalışmaya ait sonucu Şekil 1'de verilmiştir. Şekilden de görüleceği gibi 1965 sonrası 40 yıllık süreçte diğer metallerden yaklaşık iki kat daha fazla büyüme sergilediği anlaşılmaktadır (Yılmaz, 2013).



Şekil 1. Alüminyum alaşımının diğer metaller ile karşılaştırmalı büyüme oranları (Mayr, 2011)

## Alüminyum Üretim Teknikleri

Alüminyum üretimi; cevherden birincil, hurdadan üretimi ikincil olarak ikiye ayrılmaktadır. Cevherden üretiminde, yeryüzünde çeşitli yerlerden çıkarılan çeşitli minerallerin bir kombinasyonu olarak bulunan boksit cevherinden birincil alüminyum elde edilir. Ekonomik değere sahip boksit cevheri çıkarılıp çeşitli prosesle belirli boyutlama yapıldıktan sonra uygulanabilirliği ekonomik olan Bayer Prosesi ile alümina elde edilir. Boksit cevherinden elde edilen alümina elektroliz (Hall-Herault prosesi) işlemi ile saf alüminyum elde edilir (Erman, 2019).

Ülkemizde, Dünya boksit rezervinin yaklaşık %1'i bulunmakta olup, bunun da büyük bir kısmı yaklaşık 422 milyon ton olarak Toroslar kuşağında yer aldığı rapor edilmektedir (Öztürk, 2005). Birincil alüminyum üretim prosesinde yaklaşık olarak 14500–17000 kWh arası enerji ihtiyacı söz konusudur. Ancak hurdadan geri dönüşüm ile üretim esnasında gerekli enerji miktarı neredeyse %5 kadar (750 kWh) enerji yeterli olmaktadır (Öztürk, 2005). Alüminyum geri dönüşebilirliği iyi olan bir metal olup birincil alüminyuma göre oldukça düşük enerji gereksinimi duyar. Alüminyumun geri dönüşüm ile yeniden değerlendirilmesi enerji sarfiyatı, maliyet ve çevreye olan olumlu etkilerinden dolayı yoğun ilgi görmektedir (Erman, 2019). Ayrıca kısıtlı rezerv ve her geçen gün azalan boksit kaynakları düşünüldüğünde, bu konuda ikincil üretimin önemi daha da artmaktadır. Üretici girdisinde de ciddi ekonomik değere sahip olan ikincil alüminyum sanayide oldukça fazla kullanılmaktadır. Ancak geri dönüşüm yoluyla ikincil alüminyum kullanımında karşılaşılan en önemli problem sıvı metal kalitesinin optimizasyonu ve hurdanın dökümünde ilave işlemler gereksinimidir.

Yüksek kaliteli alüminyum dökümler üretmek için, sıvı alüminyum içerisinde çözünmüş hidrojen gibi safsızlıklardan ve kendi yüzey oksidinin çeşitli formlara sahip çift katlı şekli olan bifilm gibi inklüzyonlardan arındırılması gerekmektedir. Alüminyum alaşımındaki çözünmüş hidrojen, metalik olmayan oksit filmler ve Cl, Fe gibi diğer bazı inklüzyon elementlerinin sıvı metal kalitesini olumsuz yönde etkileyen ve hurdadan gelme potansiyeli olan inklüzyonlar ve safsızlıklar olarak nitelenebilir. Hidrojen ve metalik olmayan oksitlerin kombinasyonu alaşımın mikro yapıları ve özellikleri üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Bu kirlilikler ergiyiğin akışkanlığını yitirmesine ve mikro gözeneklilik oluşumuna neden olabilirler. Metalde çatlakların kaynağı ve sert noktaların oluşmasına bile yol açabilirler, böylece işlenebilirlik, yüzey düzgünlüğü ve dökümün mekanik özellikleri, özellikle tokluk ve yorulma direncini de olumsuz yönde etkileyebilir (Cheisa et al., 2001; Tiryakioğlu ve ark., 2004; Kaufmann et al., 2005; Dışpınar ve ark., 2009).

Alüminyum döküm içerisinde önlenemeyen makro ya da mikro porozite hataları, üretilen üründe birçok olumsuz etkiye sebep olur. Bu hataların üretilen parçada düşük mukavemet, süneklik azalması, basınç altında sızdırmada ortaya çıkan problemlere sebep olabileceği, nihayetinde kullanımında kısıtlamalara sebep olacağı aşikârdır (Kaufmann et al., 2005; Dışpınar ve ark., 1999; Dışpınar ve ark., 2009). Bu hataların temel sebepleri olarak termal koşullar, yetersiz sıvı metal temizliği, hidrojenin tetiklediği döküm kusurları olduğu görülmektedir. Bu nedenle, alüminyum ergiyiğinden sıvı metalin saflığını arttırmak için hidrojen ve inklüzyonların uzaklaştırılması, özellikle hidrojen içeriğini kontrol etmek, alüminyum hurda dökümlerinin ve hurda parçalarının geri dönüşümü ve yeniden kullanımı üzerinde büyük öneme sahiptir (Divandari et al., 1999; Lapham et al., 2002; Atwood et al., 2008; Dışpınar ve ark., 2009; Dışpınar ve ark., 2011). Öte yandan, havacılık yapılarında ve otomotiv endüstrisinde geri dönüşüm alüminyum uygulamalarını genişletmek için çok önemli olan dökümlerin performanslarını ve güvenilirliklerini büyük ölçüde artırabilir.

### **Sıvı Metal Temizleme Yöntemleri**

Endüstride ciddi bir ekonomik değere sahip olan geri dönüşüm yoluyla kullanıma sunulan ikincil alüminyumun kaliteli ürünler üretilebilmesi için sıvı metal kalitesinin artırılması gerekmektedir. Hurda alaşımdan gelmesi muhtemel gaz, inklüzyon ve kalıntı gibi kirliliklerin ortadan kaldırılması veya asgari düzeye indirgenebilmesi gerekmektedir. Bu kapsamda çalışmalar ve araştırmalar devam etmekte ve inert gaz kullanımından, tablet kullanımına birçok uygulama karşımıza çıkmaktadır. Bu kapsamda geçmişten günümüze uzanan alüminyum alaşımlarının hurdadan geri dönüşümü esnasında kullanılan sıvı metal temizleme tekniklerini incelenmiştir.

## Flakslar (Eritken)

Sıvı metal içerisindeki inklüzyonları veya gaz halindeki safsızlıkları gidermek için kullanılan inert veya reaktif gazlar da bir çeşit flaks olarak tanımlanmaktadır. Flakslama terimi, içinde kimyasal bileşiklerin kullanıldığı ergimiş metale yönelik tüm katkı maddelerini tatbik edilmesi için kullanılır. Bu bileşikler genellikle inorganiktir ve gazdan arındırma, parçalama, temizleme ve alaşımlama gibi çeşitli işlevleri yerine getirebilirler (Utigard, 1998).

Kullanım amaçlarına göre katı flaks çeşitlerini; örtü, rafinasyon, curuf çekme, temizleme, duvar temizliği, alaşımlama, gaz giderme ana başlıkları altında sıralayabiliriz. Sadece sıvı metal temizliği değil ergitme sonrası içinde sıvı alüminyumu oksitlenmesini önlemek amaçlı tedbirleri de içeren birçok flaks çeşidi mevcuttur. Uygulanabilirliği ve maliyeti açısından en çok kullanılan flakslar içerisinde bulunan klor ya da flor içeren karışımlardır (Yüksel, 2016). Bu flakslar sıvı metale doğrudan, gaz giderme cihazları ya da tabletler şeklinde dahil edilirler (Gruzleski, 1990; Meidani et al., 2004). Bu tabletler içinde heksakloreten ( $C_2Cl_6$ ) en yaygın olarak kullanılan tablet türüdür. Hekzakloreten ergiyik metal içerisinde çözünerek klorür oluşturur bu da  $AlCl_3$  gaz kabarcıkları halinde hidrojeni sıvı metal yüzeyine taşır. Ancak çevresel ve insan sağlığı açısından ortaya çıkan gazlar zararlı olduğu bilinmektedir (Ertan ve ark., 2003). Alüminyum sıvı temizleme işlemi için hurda azot gazı ve tablet kullanımının karşılaştırmasının yapıldığı çalışmada her iki yöntemde uygulamasına bağlı olarak etkili sonuçlar verdiği gözlenmiş ancak tablet kullanımının çevreye olumsuz etkilerinden dolayı gaz ile temizleme yönteminin avantajlı olduğu tespit edilmiştir (Tan ve ark., 2011; Çolak ve ark., 2016).

## Rotary (Döner Tip) Gaz Giderme

Azot ve argon gibi inert gazların, sıvı metal içerisine daldırılan bir döner çark vasıtasıyla tatbik edilmesi ile hidrojen gazını ergimiş alüminyumdan uzaklaştırılması ile gerçekleştirilir. Hidrojen, herhangi bir kapalı alanda salınır gibi ergimiş metal boyunca dağılarak ergiyik boyunca sabit bir basınç sağlayacaktır. Alüminyumdan hidrojenin giderilmesi, ergiyikte çözülmüş halde bulunan hidrojenin yüksek basınçlı ortamdan daha düşük basınç içeren inert gazdaki ortama geçme ilkesine dayanmaktadır. Rotary gaz giderme, metale verilen inert bir gazın yüzey alanını artırma prensibine göre çalışır. İntert gaz kabarcıklarının yüzey alanı ne kadar büyükse, gaz giderme o kadar hızlı gerçekleşecektir. Belirli bir gaz hacmi için, kabarcık boyutu ne kadar küçükse, gazın toplam yüzey alanı o kadar büyük ve gazdan arındırma o kadar hızlı olacaktır (Simulator, 2021).

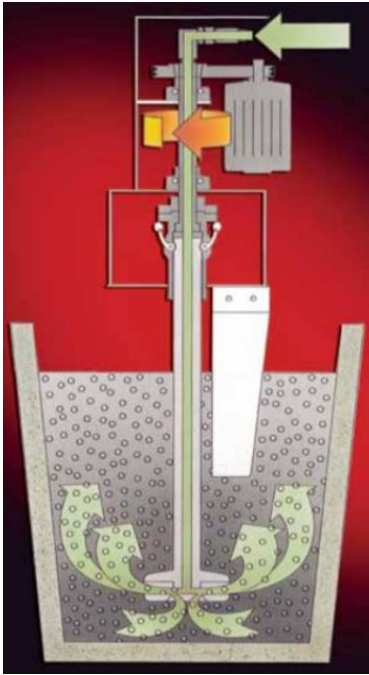
Şekil 2’de gösterilen dönen pervane tekniği yanlış kullanılırsa, ergiyikte kontrolsüz bir girdap oluşacak ve böylece atmosferdeki oksijen, ergiyikle ciddi şekilde reaksiyona girecektir. Sıvı metaldeki hidrojen içeriğinin belirli bir süre nispeten azaltılabilesine rağmen, mikro yapıda alaşımların mekanik özelliklerini azaltabilen birçok gözenek ve boşluk görünmeye devam edecektir (Ni et al., 2003).

## Yeniden Ergitme Gaz Giderme (Kontrollü Katılaştırma)

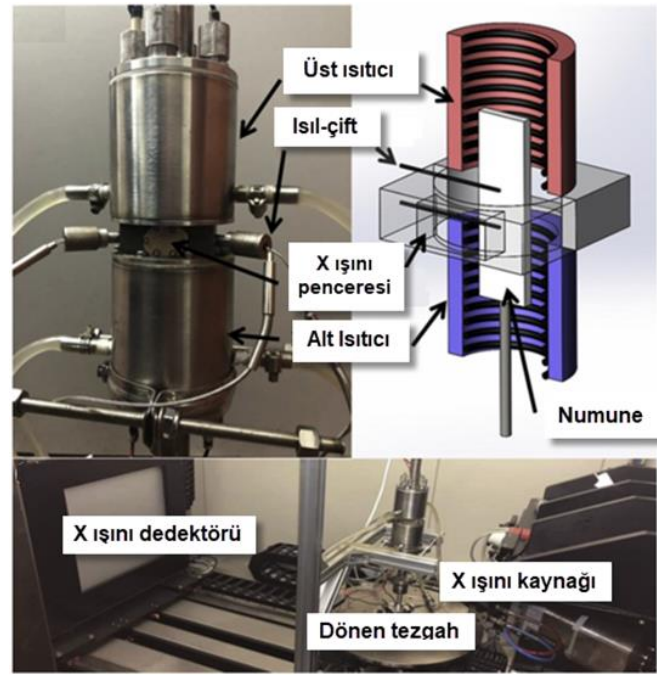
Yeniden ergitme tekniğinde sıvı metalin yeniden ergitme esnasında kontrollü yönlü katılma ile sıvı metal temizliği gerçekleştirilebilmektedir. Şekil 3’de belirtilen sistemde; fırının altında ve üstünde bulunan bağımsız olarak kontrol edilen iki ısıtma bölgesi, X-ışınının nüfuz etmesine izin veren bir pencere, sıcaklığı kontrol etmek ve ölçmek için ısı-çiftler içeren üç farklı bölümden oluşur. İki ısıtıcı arasındaki sıcaklık farkı, dikey bir sıcaklık gradyanı oluşturacak şekilde ayarlanır ve alt ısıtıcı, numunenin dikey olarak yukarı doğru katılması için daha düşük bir sıcaklığa ayarlanıp malzeme sistem içerisinde belirli bir hız, süre ve sıcaklıkla hareket ettirilir. Hidrojenin, sıvı alüminyumdaki çözünürlüğünün sıcaklıkla arttığından dolayı, gözeneklilikteki hidrojen molekülleri yeniden ergitme sırasında termodinamik olarak kararsız hale gelerek, sıvı metalde ayrılmak ve çözülmek ister. Yeniden ergitme işlemi sırasında gözenekler çözünen ve yüzen olmak üzere iki olası mekanizma ile kontrol edilir.

Yeniden ergitme işleminin ayrıca ergiyik içerisindeki inklüzyonları etkili bir şekilde azaltmaktadır. Geleneksel gaz giderme işleminde, inert gazların temizlenmesi gibi yeniden ergitme işleminde de oksitler ve inklüzyonlar etkin bir şekilde uzaklaştırılır (Lee et al., 2001).

Campbell, alüminyum dökümlerdeki gözeneklerin, oksit partiküllerinden veya bifilmelerden kaynaklandığını ileri sürmektedir. Bu yöntemde, ergiyiğin yüzeyi, yeniden ergitme işlemi boyunca durgun olduğundan geleneksel gaz giderme işlemlerine kıyasla ergiyikte çok daha az yeni oksit oluşacağından etkili bir gaz giderme yöntemi olduğu düşünülmektedir (Campbell, 2004; Zhao et al., 2012).



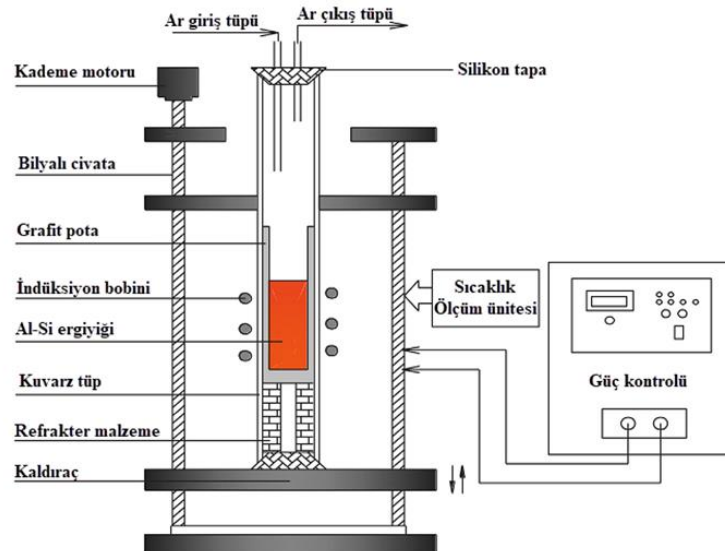
Şekil 2. Rotary gaz giderme metodu şematik gösterimi (Foseco, 2015)



Şekil 3. Yeniden Ergitme deney düzeneği şeması (Dong et al., 2020)

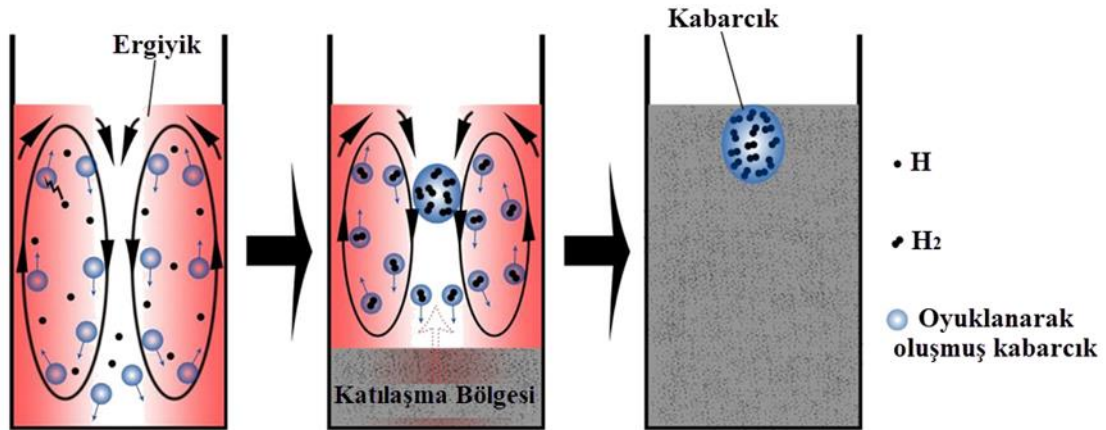
### Elektromanyetik Yönlü Gaz Giderme

İndüksiyon içerisinde alüminyum alaşımın ergitilmesinden sonra sıvı metalin aşağı çekilmesi ve çekmenin eşlik ettiği doğal katılma nedeniyle aşağıdan yukarıya doğru sistemli bir katılma sağlanması yöntemidir. Bu işlemler esnasında sıvı metalin oksitlenmesini önlemek için sisteme Şekil 4'de görüldüğü gibi argon gazı tatbik edilir.

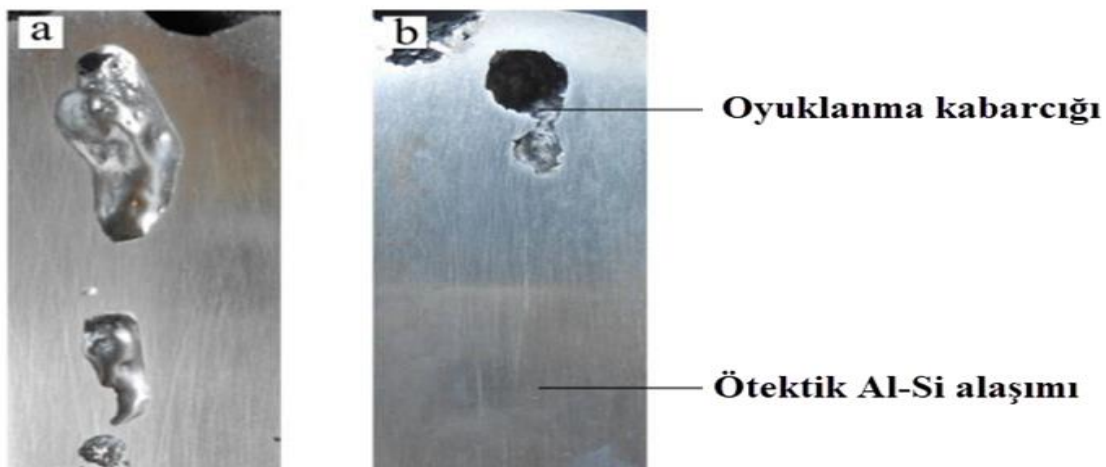


Şekil 4. Elektromanyetik yönlendirilmiş gaz giderme yönteminin şematik gösterimi (Ren et al., 2014)

Ergimiş alüminyumda çözünen hidrojen atomlarının çoğunun reaksiyona göre sıvı alüminyum yüzeyindeki su buharının ayrışmasından geldiği bilinmektedir. Başlangıçta, elektromanyetik karıştırmanın etkisi altında, hidrojen atomları tamamen ergiyik içine salınır ve daha küçük iç basınca sahip küçük kaviteasyon kabarcıkları üretilir. Dış hidrojen kısmi basıncına bağlı olarak küçük kaviteasyon kabarcıklarının oluşumu, kaviteasyon balonunun dış ara yüzünden daha büyük olduğunda, ergimiş alüminyumdaki hidrojen atomu bu kabarcıklara kolayca ve sürekli olarak yayılır ve aynı zamanda birbirleriyle etkileşime girer. Daha sonra, aşağı yönlü katılma sırasında, hidrojen büyüyen katı tarafından uzaklaştırılarak kalan sıvıya doğru yönlendirilir. Bu arada, ergiyik içinde oluşan sıvı akışının etkisi altında olan kabarcık bir hidrojen taşıyıcı olarak görev yapacak ve gaz giderme hızını büyük ölçüde hızlandırabilecek diğer kabarcıklarla bir araya gelme eğilimine sahip olacaktır. Sonunda, büyük miktarda küçük kaviteasyon kabarcıkları toplanır ve hacim genişler, ardından son katılma numunesinde nispeten daha yüksek hidrojen konsantrasyonunu içeren kabarcık boşluğu haline gelir. Ayrıca daha yavaş aşağı çekme oranıyla, zenginleştirilmiş kabarcık hacminin numunenin üst ucunda kademeli olarak arttığı gözlenmektedir (Ren et al., 2014). Şekil 5’de elektromanyetik yönlendirilmiş gaz giderme yönteminin işlem basamakları şematik olarak verilmiştir. Şekil 6’da da elektromanyetik yönlendirme olmaksızın ve elektromanyetik yönlendirmeye bağlı porozite oluşumuna dair döküm yapısı görüntüleri verilmiştir.



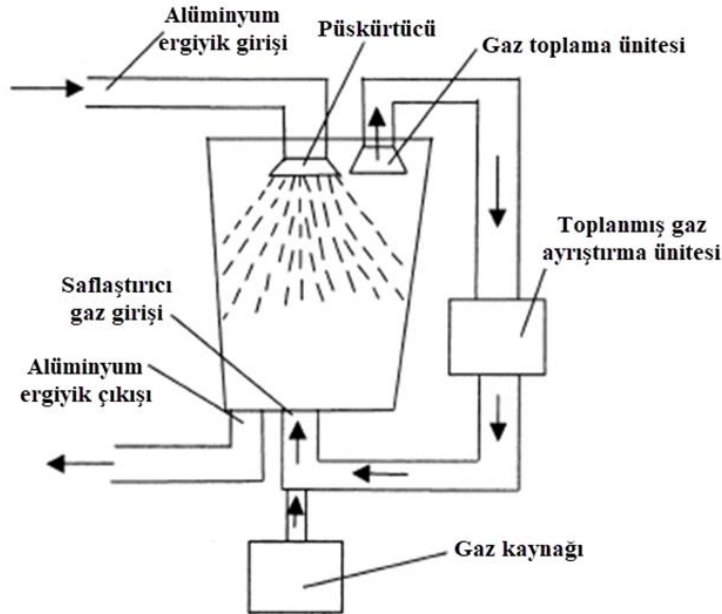
Şekil 5. Elektromanyetik yönlendirilmiş katılma gaz giderme mekanizması (Ren et al, 2014)



Şekil 6. a) Elektromanyetik katılma yönlendirmesi olmaksızın, b) Elektromanyetik katılma yönlendirmesi ile katılma döküm yapıları (Ren et al., 2014)

## Sprey Gaz Giderme

Sprey gaz giderme yönteminin şematik çizimi Şekil 7’de verilmiştir. Alüminyum ergiyik, bir girişten bir püskürtücüye getirilir. Püskürtücü aracılığıyla, ergiyik küçük damlacıklar halinde atomize edilir ve bir işleme tankına püskürtülür. Bir gaz besleme ünitesinden gelen temizleme gazı, bir gaz girişi vasıtasıyla işleme tankına verilir. Temizleme gaz yukarı doğru hareket eder ve ergiyik damlacıkları aşağı doğru hareket eder. Ergiyik damlacıkları temizleme gazı ile temas ettiğinde aralarındaki hidrojenin kısmi basınç farkı nedeniyle ergiyik damlacıklarındaki hidrojen temizleme gazına yayılır. Arıtma gazı, arıtma tankının tepesine yükseldikten sonra, bir gaz geri kazanım ünitesine çekilir ve geri kazanım gazındaki hidrojenin geri kazanım gazından ayrıldığı bir geri kazanım gazı ayırma ünitesine getirilir. Daha sonra geri kazanılan gaz, arındırıcı gaz girişi aracılığıyla yeniden kullanılabilir. Gazdan arındırıldıktan sonra, ergiyik damlacıkları işleme tankının dibinde toplanır ve bir çıkış yoluyla işleme tankından uzağa akar. Tüm gazdan arındırma işlemi sırasında, ergiyik damlacıklarının katılaşmasını önlemek için temizleme tankındaki gaz yüksek bir sıcaklıkta tutulur (Wu et al., 2005).

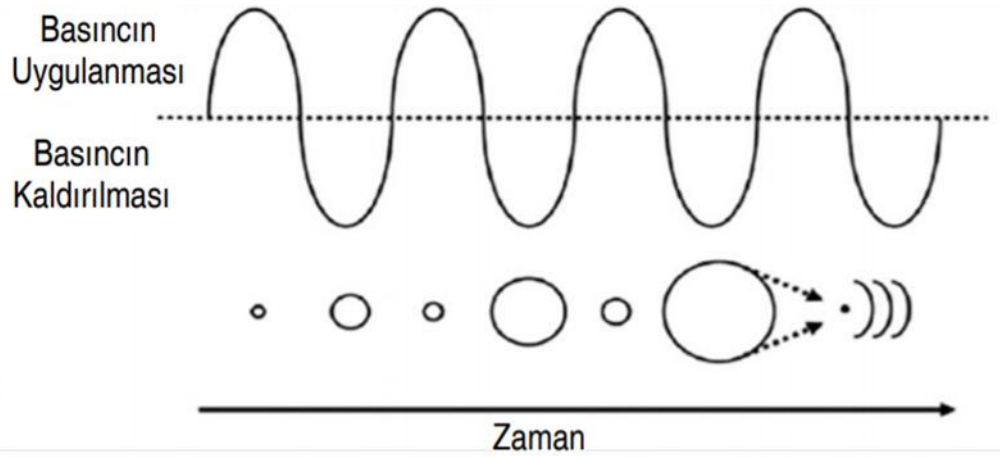


Şekil 7. Sprey gaz giderme yönteminin şematik çizimi (Wu et al., 2005)

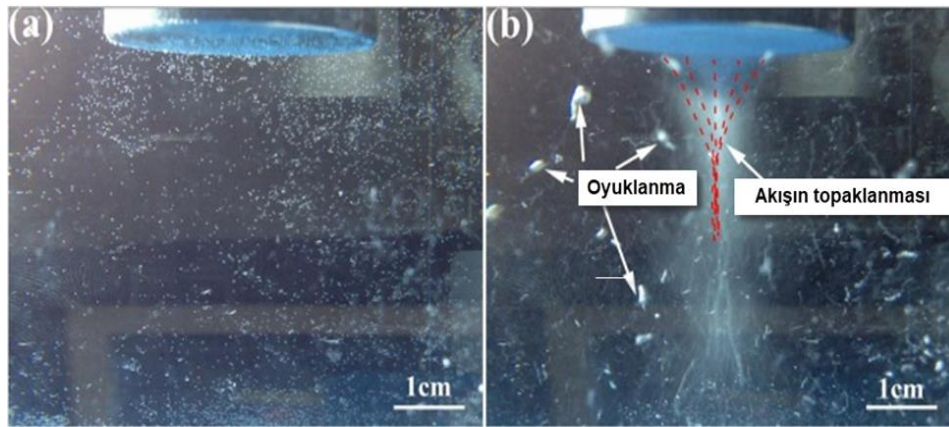
## Ultrasonik Gaz Giderme

Ultrasonik gaz giderme, sıvılarda akustik kaviteasyonun ilk potansiyel uygulamaları arasındadır. 1960-1980'lerde dökümhanelerde alüminyum eriyik gazdan arındırma için endüstriyel ölçekte denenmiş ve bazı özel ekipman ve kurulum gerektirmesine rağmen, temiz ve sağlam bir teknoloji olduğu kanıtlanmıştır (Eskin., 1965, Eskin at al., 2014). Son yıllarda çevre dostu olması ve potansiyel çok yönlülüğü nedeniyle bu teknolojiye olan ilgi artmıştır. Hidrojen miktarının, çok daha az cüraf oluşumu ile Ar gaz giderme durumunda olduğundan daha düşük seviyelere düşürülebileceği gösterilmiştir (Eskin et al., 2015). Yapılan bir çalışmada, alüminyum eriyiğinde gaz kabarcığı oluşumunu başlatmak için ultrasonik kaviteasyonun gerekli olduğu bildirilmektedir (Eskin, 2002). Ergiyikte (suyun aksine) serbest gaz kabarcıkları olmamasına rağmen, absorbe edilmiş atomik hidrojen tabakasına sahip oksit partikülleri ve hatta kaviteasyon çekirdeği görevi gören moleküler hidrojen inklüzyonunun yüzey kusurları gibi çok sayıda ara yüz olduğu belirtilmektedir (Eskin at al., 2014). Dalgalı ses alanında bir kabarcık titreşirken, her genişlemede eriyikten daha fazla hidrojen çıkaran bir pompa görevi görür. Bu nedenle kabarcıklar büyür ve ardından yüzeye çıkarak hidrojeni atmosfere bırakır. Ultrason kaynağı tarafından oluşturulan ergiyik akışları, kabarcıkların dağılımını ve dolayısıyla gaz gidermeyi kolaylaştırır (Eskin at al., 2014).

Sıvı metal yüksek yoğunluklu ultrasonik titreşimlere maruz kaldığında, titreşimlerin yüksek yoğunluğu, basıncın kavitasyon eşiğinin üzerinde değişmesine ve böylece çok sayıda boşluk oluşturmaya neden olur. Kavitasyon, hidrojenin ergiyikten gelişen kabarcıklara difüzyonunu hızlandıran kütle transfer süreçlerini yoğunlaştırır. Akustik kavitasyon zamanla ilerledikçe, bitişik kabarcıklara temas eder ve birleşir. Kabarcıklar yüzeye ulaşana kadar yerçekimine karşı sıvının içinden yükselmelerine izin verecek yeterli boyuta ulaşır (Xu et al., 2004). Şekil 8’de ultrason uygulamasının basınçla değişimi şematik olarak verilmiştir. Şekil 9’da ultrason uygulaması su testinde görünüşü verilmiştir.



Şekil 8. Ultrason uygulaması ile oluşan basınç değişimi (Fuchs, 2014)



Şekil 9. Ultrasonun su simülasyonu testleri, a) Ultrason kapalı, b) Ultrason açık (Liu et al., 2017)

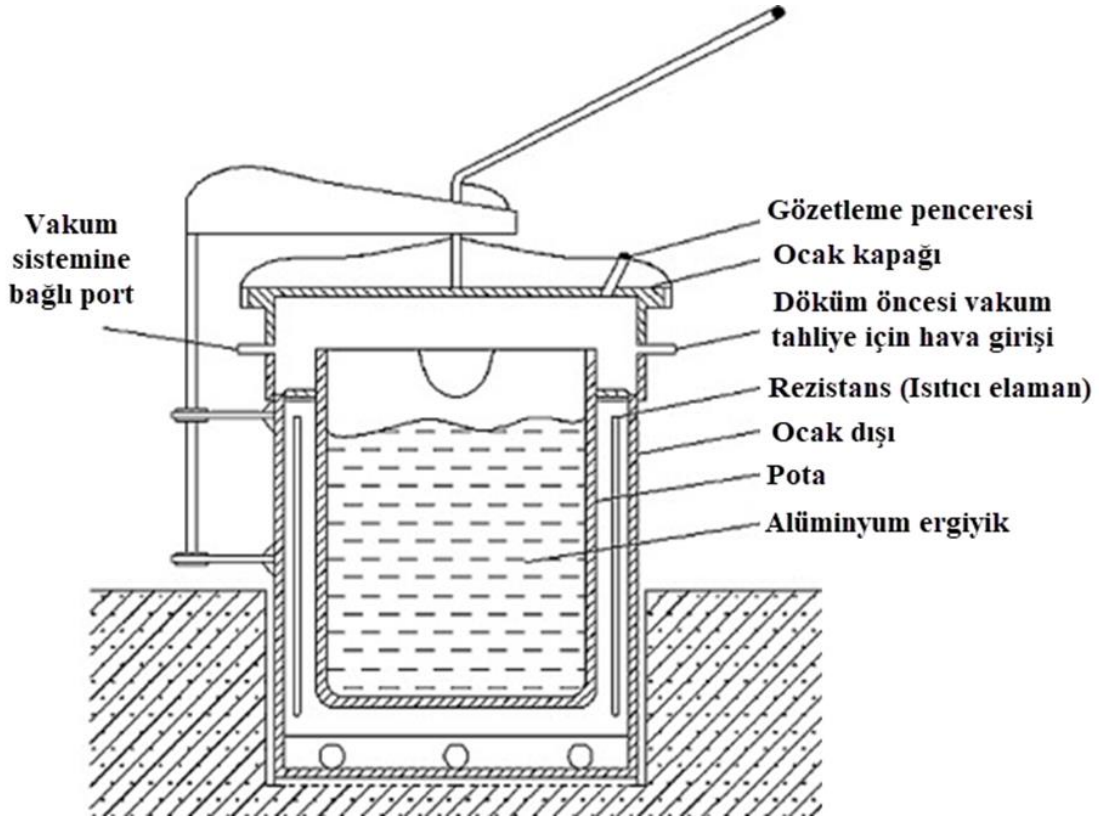
Ultrasonik gaz giderme işleminin, alüminyum ve magnezyum alaşımlarının gazdan arındırılması, filtrasyonu ve tane inceltmesi için etkili bir yöntem olduğu endüstriyel ölçekte kanıtlanmıştır (Eskin, 1988, Eskin et al., 2015). Ultrasonik gaz giderme sırasında sıvı metal hacmi önem arz etmekte ve boyut ve tonaj arttıkça etkinlik azalmasına yönelik problemler, son yıllarda yapılan çalışmalarla çok sayıda ultrasonik kaynak kullanılarak büyük eriyik hacimlerinin işlenmesi zorluğunu ortadan kaldırmıştır (Eskin et al., 2015, Eskin et al., 2019)

### Vakum Gaz Giderme

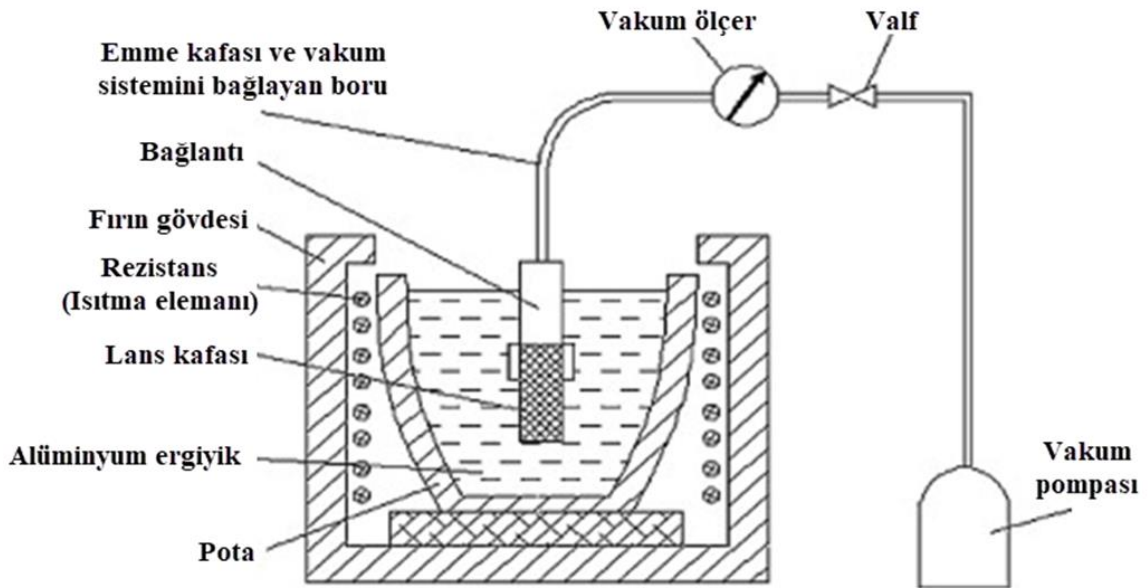
Bu işlemde pota, ergimiş alüminyum üzerinde kapalı bir boşluk bulunan bir hazneye yerleştirilir. Boşluğu vakumlamak, hidrojenin ergiyikten uzaklaşmasını sağlar (Şekil 10). Bu işlemin verimi; hidrojenin dışarıya transferini engelleyen ergiyik yüzeyini kaplayan oksit filmi ve ergiyiğin ortasındaki ve altındaki hidrojenin yüzeye dağılması ve çıkmasının uzun sürmesinden olumsuz etkilenmektedir. Bu eksikliklerin giderilmesine yönelik iç vakum emme yöntemi geliştirilmiştir (Şekil 11). Gözenekli bir



emme kafası, ergimiş alüminyuma daldırılır. Vakum sistemine bağlanmak için valf açılır. Bu şekilde, gözenekli kafanın içinde hidrojenin kısmi basıncı her zaman sıfırda tutulur. Böylelikle, ergiyük ve gözenekli kafa arasındaki ara yüzeyde büyük bir hidrojen konsantrasyonu gradyanı oluşturulur. Difüzyonla, hidrojen, alüminyum eriyikten boru vasıtasıyla vakum sistemine bağlanan emme kafasına aktarılması sağlanır (Zeng et al., 2012).



Şekil 10. Vakum gaz gidermenin şematik görüntüsü (Zeng et al., 2012)



Şekil 11. İç vakum emme sistemi şematik görüntüsü (Zeng et al., 2012)

## SONUÇ

Alüminyum ve alaşımlarının dökümünde enerji verimliliği, çevre şartları, kısıtlı boksit kaynakları ve maliyet göz önüne alındığında ikincil alüminyum (hurda) kullanımı önemli bir sanayi girdisi oluşturmaktadır. Ancak hurda alüminyum içerisindeki gaz, inklüzyon ve safsızlıkların giderilmesi yüksek kalite gereksinimi olan parça imalatında önem arz etmektedir.

Alüminyum dökümlerdeki temel gaz gözenekleri kaynağı, sıvı alüminyumda önemli çözünürlüğe sahip gaz olan hidrojen dir. Katılma noktasında, çözünürlükte büyük bir düşüş meydana gelir, bu düşüş hidrojen çökmesine ve gaz gözeneklerinin gelişmesine yol açar. Bu nedenle, ergimiş bir alaşımdaki hidrojen içeriği, özellikle yüksek mukavemetli döküm alaşımları ile uğraşırken mümkün olduğu kadar düşük tutulmalıdır. Sıvı metali temizleme işlemi için çeşitli yaklaşımlar araştırılmış ve uygulanan metotlar içinde azot, argon gibi inert gaz kullanarak gaz giderme metodları, kimyasal tablet kullanımı, katılma yönlendirmesi karşımıza çıkmaktadır. Yöntemleri avantaj ve dezavantajlarını aşağıda şekilde özetleyebiliriz;

Maliyet ve uygulama pratiği açısından en kolay temizleme yöntemi çeşitli kimyasal flaksların, alüminyum eriyiğinin rafine edilmesinde etkili olduğu bilinmektedir. Flakslar içerisinde bulunan klor ya da klor içeren karışımlar arasında yer alan heksakloreten ( $C_2Cl_6$ ) içeren tabletler, ergiyik metal içerisinde çözünerek klorür oluşturur, nihayetinde  $AlCl_3$  gazı ortaya çıkar. Ortaya çıkan bu gazlar çevre ve insan sağlığı açısından zararlı olduğundan birçok ülkede tablet kullanımı yasaklanmaya başlanmıştır. Ayrıca flaksların kullanımında etkili bir gaz giderme etkisi için kullanılan tabletlerin muhafazası önemli olup, nem içermeyen kuru ortamlarda tutulması gerekmektedir.

Döner tip gaz giderme tekniği, azot ve argon gazı gibi inert gazların, sıvı metale tatbik edilmesi ile hidrojen gazını ergimiş alüminyumdan uzaklaştırılmasının sağlandığı alüminyum dökümhaneleri için düşük maliyetle verimli çalışma sağlayan bir uygulamadır. Böylelikle çevreye ve insan sağlığına tehlikeli gaz giderme tabletleri kullanma ihtiyacını ortadan kaldırır. Ancak döner pervane tekniği yanlış kullanılırsa, ergiyikte şiddetli ve kontrolsüz bir girdap oluşacak, neticesinde atmosferdeki oksijen, ergiyikle ciddi şekilde reaksiyona girecektir. Hidrojen içeriğinin azaltılmasına karşın alaşımın mekanik özelliklerini azaltan birçok gözenek ortaya çıkabilecektir. Bu sebeple bu uygulamada sistem çalışması, gaz tatbiki, rotor devri gibi parametrelerin iyi ayarlanmış olması gerekmektedir.

Yeniden ergitme tekniğinde katılma sonrası malzemenin yeniden ergitilmesi ve kontrollü yönlü katılma ile sıvı metal temizleme gerçekleştirilmektedir. Yeniden ergitme işleminde geleneksel gaz giderme işlemlerine ilaveten gazların temizlenmesinin yanı sıra oksitler ve inklüzyonlarda etkin bir şekilde temizlenebilmektedir. Ayrıca bu yöntemde, ergiyiğin yüzeyi, yeniden ergitme işlemi boyunca durgun olduğundan çok daha oksit oluşacağından etkili bir gaz giderme söz konusudur. Ancak sistem kurulum maliyeti ve uygulama ilave maliyetler ortaya çıkarmaktadır.

Havacılık sektörü gibi yüksek kaliteli alüminyum alaşımlarının imalatı için kullanım bulan gaz giderme yöntemlerinden biri de elektromanyetik yönlendirilmiş gaz giderme tekniğidir. Temiz ve çevreye duyarlı gaz giderme yöntemlerinden biri olan bu yöntemde ilave uygulama ve yüksek kurulum maliyeti gerektirmektedir.

Sprey gaz giderme yöntemi ile gaz kabarcıklarını döner tip gaz giderme yönteminde olduğu gibi toplu ergiyik haline getirmek yerine, ergiyik küçük damlacıklar halinde atomize edilmesi ile gerçekleştirilir. Sprey gaz giderme yönteminde gaz giderme tankı atmosferden izole edilmiştir ve tankın tamamı temizleme gazı ile doldurulmuştur. Bu nedenle, ergiyik atmosferden  $H_2O$  ve  $H_2$ 'yi emmez. Temizleme gazı tüketimin büyük ölçüde azaltılabilmesi için geri dönüştürülebilir.

Ultrasonik gaz giderme yönteminde, alüminyum ergiyiklerinde hidrojen içeriğini azaltmakla birlikte aynı zamanda tane inceltmede, tane boyutunu azaltma, eş eksenli tanelerin oluşumu, fazların titreşimle incelenmesinde ve dağılımın artırılmasında, malzeme homojenliğini artırma, ikincil fazların ve inklüzyonların uniform olarak dağılımını sağlamaktadır. Ancak uygulamada ultrason, bir ergiyikte salınım enerjisini ve ses yoğunluğunu kaybederse yoğunluk hızla kavitasyon eşiğine düşer ve kavitasyon durur, bu durumda gaz giderme etkisi azalır.

Vakumlu gaz giderme işleminde pota, ergimiş alüminyum üzerinde kapalı bir boşluk bulunan bir odaya yerleştirilir. Boşluğu vakumlamak, hidrojenin ergiyikten serbest kalmasını sağlar. Prosesin hidrojeni uzaklaştırmada çok etkili olduğu kanıtlanmıştır, ancak uygunsuz çalışması, düşük verimliliği ve vakumlama sırasında sıcaklık kaybı nedeniyle gerçek dökümhane üretiminde nadiren kullanılmaktadır.

### Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederlerim.

### Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederim.

### KAYNAKLAR

- Alan, S. 2008. Alüminyum Raporu, Orta Anadolu İhracatçı Birlikleri Genel Sekreterliği, S. 30.
- Atwood, R. C., Sridhar, S., Zhang, W., Lee, P.D. 2008. Diffusion-Controlled Growth Of Hydrogen Pores İn Aluminium-Silicon Casting: In Situ Observation And Modelling, *Acta Materialia.*, 48: 405-417.
- Brooks, C.R. 1984. Heat Treatment, Structure And Properties Of Nonferrous Alloys, Asm, Ohio, Usa, 115-137.
- Campbell, J. 2004. Castings Practice The 10 Rules Of Castings, Butterworth Heinemann, Oxford, United Kingdom, 9-113.
- Chen, W.F., Lui, E.M. 2005. Handbook Of Structural Engineering, Crc Press, Abd.
- Chiesa, F., Regimbal, P. 2001. Distinguishing Microporosity From Macroshrinkage When Modelling Solidification Of A356 Castings, *Afs Transactions.*, 109: 347-357.
- Çolak M, Kayıkci R, Dispınar D. 2016. Melt Cleanliness Comparison Of Chlorine Fluxing And Ar Degassing Of Secondary Al-4Cu. *Metallurgical And Materials Transactions B*, 47: 2705-2709.
- Dispınar, D., Campbell, J. 2009. Alüminyum Ve Alaşımlarının Döküm Kalitesinin Belirlenmesi, Alüminyum Sempozyumu, İstanbul, 394-404.
- Dispınar, D., Nordmark, A., Di Sabatino, M., Arnberg, L. 2009. Alüminyum ve Alaşımlarının Dökümü Sırasında Gaz Giderme İşlemi Ve Döküm Kalitesi Üzerine Etkileri, Alüminyum Sempozyumu, İstanbul, 405-410.
- Dispınar, D., Campbell, J., Porosity. 2011. Hydrogen And Bifilm Content İn Al Alloy Castings, *Materials Science And Engineering A* 528, 3860-3865.
- Dıvancı, M., Campbell, J. 1999. The Mechanism Of Bubble Damage İn Castings, 1st International Conference On Gating, Filling And Feeding Of Aluminum Castings Afs Society., 49-63.
- Dong Y, Shuai S, Zheng T, Cao J, Chen C, Wang J, Ren Z. 2020. In-Situ Observation Of Solid-Liquid Interface Transition During Directional Solidification Of Al-Zn Alloy Via X-Ray İmaging. *Journal Of Materials Science & Technology*, 39: 113-123.
- Erman C. 2019. Birincil Alüminyum Üretimine Genel Bir Bakış, *Metalurji Dergisi*, Sayı:156, Sayfa 34-48.
- Ertan S, Kavaklıoğlu B, Büyükakkaş F. 2003. Alüminyum Sıvı Metal Temizliğinde Kullanılan Flakslar, 2. Aluminium Symposium, Seydişehir, Konya.
- Eskin, D., Alba-Baena, N., Pabel, T., da Silva, M., 2015. Ultrasonic degassing of alu-minium alloys: basic studies and practical implementation. *Mater. Sci. Technol.*31, 79-84.
- Eskin, D.G., Tzanakis, I, Wang, F., Lebon, G.S.B., Subroto, T., Pericleous, K., Mi, J. 2019. Fundamentals studies of Ultrasonic melt processing. *Ultrasonics - Sonochemistry* 52, 455-467.
- Eskin, G.I., 1965. Ultrasonic Treatment of Molten Aluminum. *Metallurjiya*, Moscow. Eskin, G.I., 1995. Cavitation mechanism of ultrasonic melt degassing. *Ultrason. Sonochem.* 2, 137-141.
- Eskin, G.I., 2002. Device for ultrasonic treatment of light alloy melt. Russian PatentRU2186147, July 27, 2002.
- Eskin, G.I., Eskin, D.G., 2014. Ultrasonic Treatment of Light Alloy Melts, second ed. CRC Press, Boca Raton.

- Eskin G.I., Ultrasonic Treatment of Molten Aluminium, second ed., Metallurjiya, Moscow, 1988.
- Eskin G.I., Eskin D.G., Ultrasonic Treatment of Light Alloys Melts, second ed., CRC Press, Boca Raton, 2015.
- Fuchs, F. J. 2014. "Ultrasonic Cleaning: Fundamental Theory and Application," [http://www.mrclab.com/Media/Uploads/Principles\\_of\\_ultrasonic\\_cleaning\(1\).pdf](http://www.mrclab.com/Media/Uploads/Principles_of_ultrasonic_cleaning(1).pdf), son erişim tarihi: 26.08.2014
- FOSECO, 2015. "FDU Foundry Degassing Unit - Kullanım Kılavuzu".
- Gallo, R. 2010. Circumstances Of The Automotive Industry Impact On Aluminium Foundries, American Foundry Society, Schaumburg, Il Usa, Paper 10.004, Page 1 Of 17, Afs Proceedings.
- Gruzleski Je, Closset Bm. 1990. The Treatment Of Liquid Aluminum-Silicon Alloys, American Foundrymen's Society. Inc. Des Plaines, Illinois, Usa.
- Kaufmann, J.G., Rooy, E.L. 2005. Aluminum Alloy Castings, Properties, Processes, And Applications, Asm International, American Foundry Society, Usa.
- Lapham, D.P., Schwandt, C., Hills, M.P., Kumar, R.V., Fray, D.J. 2002. The Detection Of Hydrogen In Molten Aluminium, Ionics, 391-401.
- Lee P, Hunt J.2001. Hydrogen Porosity In Directionally Solidified Aluminium Copper Alloys: A Mathematical Model. Acta Materialia, 49: 1383-1398.
- Liu X, Zhang C, Zhang Z, Xue J, Le Q. 2017. The Role Of Ultrasound In Hydrogen Removal And Microstructure Refinement By Ultrasonic Argon Degassing Process. Ultrasonics Sonochemistry, 38: 455-462.
- Nı Hj, Sun B, Jiang Hy, Ding Wj. 2003. Effects Of Rotating İmpeller Degassing On Microstructure And Mechanical Properties Of The A356 Scraps. Materials Science And Engineering A-Structural Materials Properties Microstructure And Processing, 352: 294-299.
- Mayr, E. 2011. Global Aluminium Frp Industry, 4th Aluminium Outlook Conference, Chicago
- Meıdanı An, Hasan M.A. 2004. Study Of Hydrogen Bubble Growth During Ultrasonic Degassing Of Al-Cu Alloy Melts. Journal Of Materials Processing Technology, 147: 311-320.
- Öztürk M. 2005. Kullanılmış Alüminyum Malzemelerinin Geri Kazanılması, Çevre Ve Orman Bakanlığı, Ankara.
- Ren Ys, Ma Wh, Wei Kx, Yu Wz, Dai Yn, Morita K. 2014. Degassing Of Aluminum Alloys Via The Electromagnetic Directional Solidification. Vacuum, 109: 82-85.
- Simulator Bd, Holiday Eds. Portable Rotary Degasser Lowers Aluminum Refining Cost. Simulation, 2021.
- Tan E, Tarakçılar A, Dıspınar D, Colak M, Kayıkçı R. 2011. Reproducibility Of Reduced Pressure Test Results In Testing Of Liquid Aluminum Gas Levels, 6th International Advanced Technologies Symposium (IATS'11), 16-18.
- Tiryakioğlu M, Staley Jt, Campbell J. 2004. Evaluating Structural İntegrity Of Cast Al-7% Si-Mg Alloys Via Work Hardening Characteristics: Ii. A New Quality İndex. Materials Science And Engineering: A, 368: 231-238.
- Utıgard T. 1988. The Properties And Uses Of Fluxes İn Molten Aluminum Processing. Jom, 50: 38-43.
- Wu R, Shu D, Sun B, Wang J, Lı F, Chen H, Lu Y. 2005. Theoretical Analysis And Experimental Study Of Spray Degassing Method. Materials Science And Engineering: A, 408: 19-25.
- Xu Hb, Jian Xg, Meek Tt, Han Qy. 2004. Degassing Of Molten Aluminum A356 Alloy Using Ultrasonic Vibration. Materials Letters, 58: 3669-3673.
- Yılmaz, M. 2013. Türkiye Alüminyum Sektörünün 2023 Projeksiyonu, Türk Döküm Dergisi, Sayı 29, Sayfa, 62-69, Ekim-Kasım-Aralık.
- Yüksel Ç. 2016. Alüminyum Alaşımlarının Sıvı Metal Kalitesinin Arttırılması. Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
- Zeng J, Gu P, Wang Y. 2012. Investigation Of Inner Vacuum Sucking Method For Degassing Of Molten Aluminum. Materials Science And Engineering: B, 177: 1717-1720.
- Zhao L, Pan Y, Liao H, Wang Q. 2012. Degassing Of Aluminum Alloys During Re-Melting. Materials Letters, 66: 328-331.

**Atf İçin:** Karta M, 2022. Fisher Denkleminin Yaklaşık Çözümü için Sayısal Metod. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 435-445.

**To Cite:** Karta M, 2022. Numerical Method for Approximate Solution of Fisher's Equation. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 435-445.

## **Numerical Method for Approximate Solution of Fisher's Equation**

Melike KARTA<sup>1</sup>

**ABSTRACT:** In this paper, Fisher's reaction diffusion equation has been solved numerically by Strang splitting technique depending on collocation method with cubic B-spline. For our purpose, the initial and boundary value problem consisting of Fisher's equation is split into two sub-problems to be one linear and the other nonlinear such that each one contains the derivative in terms of time. Then, the whole problem is reduced to the algebraic equation system using finite element collocation method combined with the cubic B-spline for spatial discretization and the convenient classical finite difference approaches for time discretization. The effective and efficiency of the newly given method have been shown on the four examples. In addition, the newly obtained numerical results are shown in formats graphical profiles and tables to compare with studies available in the literature.

**Keywords:** Fisher's equation, B-splines, Collocation method

<sup>1</sup> Melike KARTA ([Orcid ID: 0000-0003-3412-4370](https://orcid.org/0000-0003-3412-4370)), Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Matematik Bölümü, Ağrı, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Melike KARTA, e-mail: mkarta@agri.edu.tr

## INTRODUCTION

In this manuscript, we are going to consider one dimensional non-linear Fisher's equation

$$U_t = \gamma U_{xx} + \mu U(1 - U), \quad x_L \leq x \leq x_R, \quad t \geq 0 \quad (1)$$

with conditions given at the boundaries and the initial time

$$\begin{aligned} U(x, 0) &= U_0(x), \quad x_L \leq x \leq x_R \\ U(x_L, t) &= h_0(t), \quad U(x_R, t) = h_1(t) \\ U_x(x_L, t) &= f_0(t), \quad U_x(x_R, t) = f_1(t) \end{aligned} \quad (2)$$

Fisher's equation has influential implementations in many fields such as science and engineering. Firstly, Fisher's equation is investigated theoretically by (Kalmogoroff et.al., 1937; Canosa, 1973). Outside of theoretical works, the approximate solution of Fisher's equation has been handled by lots of authors. (Gazdag and Canosa, 1974) used a pseudo-spectral approach for equation. The numerical work of Fisher's equation has been described by a moving mesh method by (Qiu and Sloan, 1998). (Zhao and Wei, 2003) solved equation by discrete singular convolution (DSC) algorithm. The wavelet-Galerkin approach using complex harmonic wavelets has been presented by (Cattani and Kudreyko, 2008). (Mittal and Arora, 2010) applied equation finite difference method with cubic B-spline. The approximate solution of the equation has been investigated using Galerkin method with quadratic B-spline by (Dağ et al., 2010). (Mittal and Jain, 2012) proposed finite element collocation method with cubic B-spline to approximate the non-linear parabolic partial differential equation with Neumann's boundary conditions. The numerical approach of equation has been given via collocation method with modified cubic B-spline by (Mittal and Jain, 2013). Also, to find solutions of the equation, collocation method with the extended cubic B-spline has been used by (Ersoy and Dag, 2015). (Dag and Ersoy, 2016) applied exponential B-spline collocation method for the equation. The approximate solution of equation with a new method "extend modified cubic B-spline differential quadrature method "(EMCB-DQM) has been introduced by (Shukla and Tamsir, 2016). For Fisher's equation, (Tamsir et al., 2018) suggested an exponential modified cubic B-spline differential quadrature algorithm. They used Runge-Kutta method for this purpose. (Kapoor et al., 2020) proposed Hyperbolic B- spline based on differential quadrature method for the nonlinear Fisher's equation.

In this paper, we employ Strang splitting technique using collocation method with cubic B-spline for the numerical approach of given equation. For this purpose, firstly, in section 2, the finite element collocation method with cubic B-spline is explained and Fisher's equation split into two sub-equations and then the obtained sub-equations are applied Strang splitting technique with help of collocation method utilizing cubic B- spline with the proper conditions given at the boundaries and the initial time of problem. After that, the initial vector is formed using the condition at initial time and the conditions at the boundaries. In section 3, Fisher's equation is applied to four test problems and the error norms  $L_2$  and  $L_\infty$  are computed and then compared with existing studies in literature. In section 4, a brief conclusion is given.

## MATERIALS AND METHODS

For the numerical behavior of Equation (1), we consider the solution domain  $[x_L, x_R]$  and define  $x_L = x_0 < x_1 < \dots < x_N = x_R$  as uniform partition of the solution range by the nodal points  $x_m$  with  $h = x_{m+1} - x_m = \frac{x_R - x_L}{N}$ ,  $m = 0, 1, \dots, N$ . An approximate solution corresponding to the analytical solution  $U(x, t)$  can be given as

$$U_N(x, t) = \sum_{m=j-1}^{j+1} \delta_m(t) \varphi_m \quad (3)$$

where  $\delta_m(t)$  are unknown time-dependent parameters obtained using the boundary conditions and equation (1). It is presented cubic B-spline functions on the domain  $[x_L, x_R]$  in terms of nodal points  $x_m$  by (Prenter, 1975) as follows

$$\varphi_m(x) = \frac{1}{h^3} \begin{cases} (x - x_{m-2})^3, & [x_{m-2}, x_{m-1}] \\ h^3 + 3h^2(x - x_{m-1}) + 3h(x - x_{m-1})^2 - 3(x - x_{m-1})^3, & [x_{m-2}, x_{m-1}] \\ h^3 + 3h^2(x_{m+1} - x) + 3h(x_{m+1} - x)^2 - 3(x_{m+1} - x)^3, & [x_{m-2}, x_{m-1}] \\ (x_{m+2} - x)^3, & [x_{m-2}, x_{m-1}] \\ 0, & \text{otherwise} \end{cases} \quad (4)$$

where  $\{\varphi_1, \varphi_0, \dots, \varphi_N, \varphi_{N+1}\}$  is a base on the domain  $[x_L, x_R]$ . Equation (1) contains the term  $U_m$ , the first and second derivatives of  $U_m$ . So, we need the values of the 1st  $U'_m$ , the 2nd  $U''_m$  with respect to space variable  $x$  and the values  $U_m$  in terms of cubic B-spline functions using the approximations (3), (4) and time-dependent parameters  $\delta(t)$ . These values are obtained as follows

$$\begin{aligned} U_m &= U(x_m) = \delta_{m-1} + 4\delta_m + \delta_{m+1} \\ U'_m &= U'(x_m) = (3/h)(-\delta_{m-1} + \delta_{m+1}) \\ U''_m &= U''(x_m) = \left(\frac{6}{h^2}\right)(\delta_{m-1} - 2\delta_m + \delta_{m+1}). \end{aligned} \quad (5)$$

The time split form of Equation (1) is as follows

$$U_t - \gamma U_{xx} - \mu U = 0, \quad (6)$$

$$U_t + \mu U U = 0 \quad (7)$$

By substituting the values  $U_m$ ,  $U'_m$  and  $U''_m$  in system (5) in equations (6) and (7), we obtain the 1st order system of ODE as follows:

$$\dot{\delta}_{m-1} + 4\dot{\delta}_m + \dot{\delta}_{m+1} - \frac{6}{h^2} \gamma (\delta_{m-1} - 2\delta_m + \delta_{m+1}) - \mu (\delta_{m-1} + 4\delta_m + \delta_{m+1}) = 0 \quad (8)$$

$$\dot{\delta}_{m-1} + 4\dot{\delta}_m + \dot{\delta}_{m+1} + \mu z_m (\delta_{m-1} + 4\delta_m + \delta_{m+1}) = 0. \quad (9)$$

Here “.” denotes derivative in terms of time variable  $t$  and for linearization form, the value of  $z_m$  is taken as

$$z_m = (\delta_{m-1} + 4\delta_m + \delta_{m+1}).$$

When it is written  $\frac{\delta_m^{n+1} + \delta_m^n}{2}$  instead of the parameter  $\delta_m$  and  $\frac{\delta_m^{n+1} - \delta_m^n}{\Delta t}$  instead of the  $\dot{\delta}_m$ , we have the following equations

$$v_1 \delta_{m-1}^{n+1} + v_2 \delta_m^{n+1} + v_3 \delta_{m+1}^{n+1} = v_4 \delta_{m-1}^n + v_5 \delta_m^n + v_6 \delta_{m+1}^n \quad (10)$$

$$z_1 \delta_{m-1}^{n+1} + z_2 \delta_m^{n+1} + z_3 \delta_{m+1}^{n+1} = z_4 \delta_{m-1}^n + z_5 \delta_m^n + z_7 \delta_{m+1}^n \quad (11)$$

respectively and here

$$\begin{aligned} v_1 &= 1 - \frac{3\gamma\Delta t}{h^2} - \frac{\mu\Delta t}{2}, & v_2 &= 4 + \frac{6\gamma\Delta t}{h^2} - 2\mu\Delta t, & v_3 &= 1 - \frac{3\gamma\Delta t}{h^2} - \frac{\mu\Delta t}{2}, \\ v_4 &= 1 + \frac{3\gamma\Delta t}{h^2} + \frac{\mu\Delta t}{2}, & v_5 &= 4 - \frac{6\gamma\Delta t}{h^2} + 2\mu\Delta t, & v_6 &= 1 + \frac{3\gamma\Delta t}{h^2} + \frac{\mu\Delta t}{2}, \end{aligned}$$



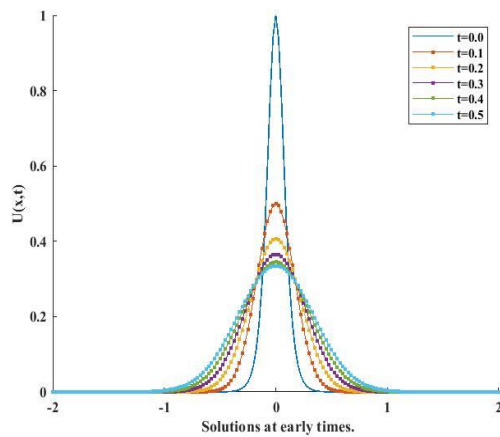


### Example 1

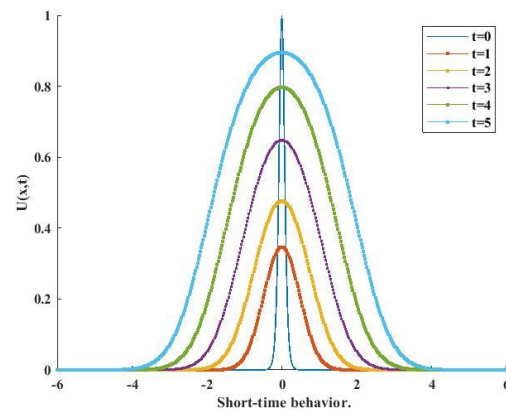
In the present example, we are going to deal with Equation (1) with BCs  $U(x_L, t) = U(x_R, t) = 0$  and IC given by

$$U_0(x) = \text{sech}^2(10x).$$

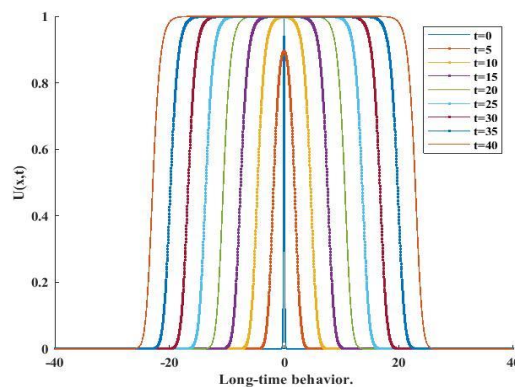
For this problem, discretization parameters are chosen as  $h = 0.025, \Delta t = 0.05$  on the domain  $[-50, 50]$  for  $\gamma = 0.1, \mu = 1$  as in the studies (Dağ et al., 2010) and (Dağ and Ersoy, 2016). Physical behaviour of equation (1) has been drawn in graphical profiles. In Figure 1, for different time level  $t = 0$  to  $t = 0.5$ , we have seen that near  $x = 0$ ,  $U(x, t)$  reaches maximum value  $U = 1$ . However, the peak rapidly comes down since diffusion term  $U(1-U)$  dominates over reaction. Because of the reaction influence, Figure 2 indicates that the peak value is gradually increasing in time from  $t = 0$  to 5. Also it is seen that the peak value reaches until the top  $U = 1$  in at the time levels 0,5,10,15,20,25,30,40 in Figure 3. Tables 1 presents a comparison of the relative error at various times and shows that our results are much better.



**Figure 1.** The numerical approaches of Example 1 for  $t = 0(0.1)5$



**Figure 2.** The numerical approaches of Example 1 for  $t = 0(1)5$



**Figure 3.** The numerical approaches of Example 1 for  $t = 0(5)40$

**Table 1.** Comparison of relative errors for Example 1 at various times.

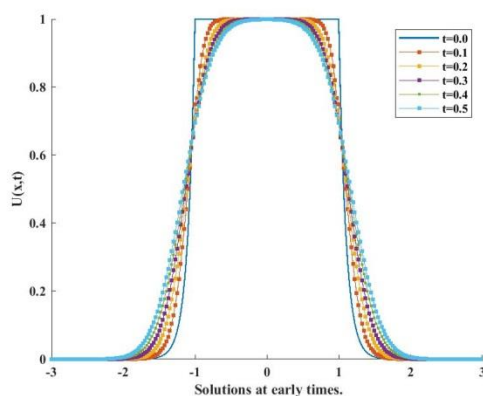
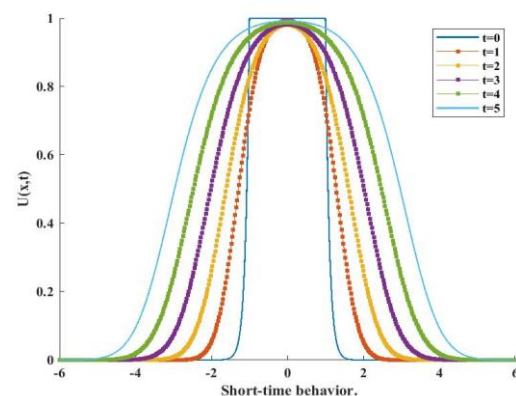
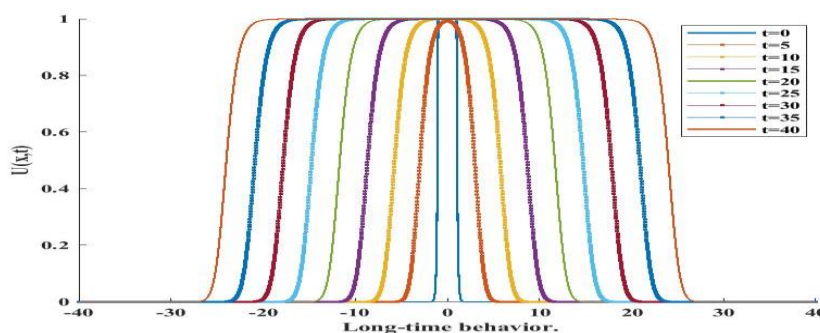
Relative Error	t=5	t=10	t=15	t=20	t=40
Present	1.383E - 2	7.835E - 3	6.029E - 3	5.067E - 3	3.417E - 3
(Dağ et al., 2010)	1.386E - 2	7.860E - 3	6.054E - 3	5.090E - 3	3.434E - 3

**Example 2**

In this example, Fisher's equation is taken with local boundary condition and initial condition as follows:

$$\begin{cases} e^{10(x+1)}, & x < -1 \\ 1, & -1 \leq x \leq 1 \\ e^{-10(x-1)}, & x > 1 \end{cases}$$

or this problem, we use coefficients  $\alpha = 0.1$ ,  $\beta = 1$  and parameters  $h = 0.025$ ,  $\Delta t = 0.05$  as in the first problem over domain  $[-50, 50]$  until time 40 considering to studies (Dağ et al., 2010) and (Dağ and Ersoy, 2016). In Figure 4 and 5, it is graphically performed the solutions at early times. In these figures, the reaction-diffusion effective is quite minor. Because the reaction effect is more effective than the diffusion effect. Thus, they become smooth from having sharp. Also, figure 6 shows that the top of the wave have risen and shown that it is getting more and more flat. Table 2 submits a comparison of the relative error at various times and indicates that our results are much better.

**Figure 4.** The numerical approaches of Example 2 for  $t = 0(0.1)0.5$ **Figure 5.** The numerical approaches of Example 2 for  $t = 0(1)5$ **Figure 6.** The numerical approaches of Example 2 for  $t = 0(5)40$

**Table 2.** Comparison of relative errors for Example 2 at various times.

Relative Error	t=5	t=10	t=15	t=20	t=40
Present	9.397E - 3	6.892E - 3	5.590E - 3	4.804E - 3	3.335E -3
(Dağ et al., 2010)	9.435E - 3	6.917E - 3	5.614E - 3	4.825E - 3	3.352E -3

**Example 3**

In the present example, we handle Eq. (1) with BCs  $U(x_L, t) = 1$ ,  $U(x_R, t) = 0$ ,  $t \geq 0$  and the analytical solution given as follows:

$$U(x, t) = \left[ 1 + \exp\left(\sqrt{\frac{\mu}{6}}x - \sqrt{\frac{5\mu}{6}}t\right) \right]^{-2}$$

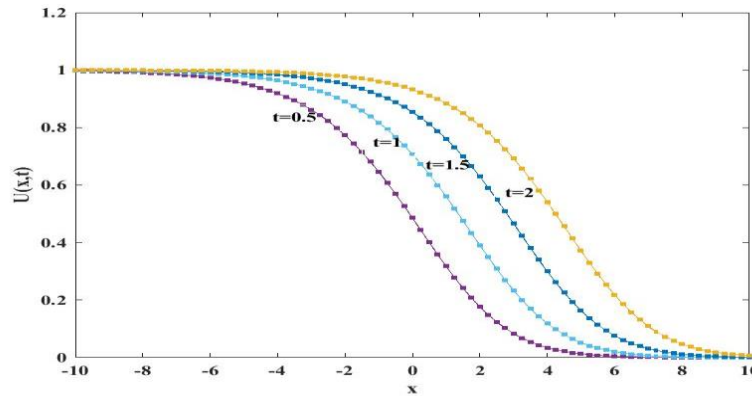
In Table 3, we have firstly presented a comparison of the error norms  $L_2$  and  $L_\infty$  of Equation (1) with discretization parameters  $h=1$ ,  $\Delta t=0.01$  on range  $-10 \leq x \leq 10$  for reaction-diffusion coefficients  $\gamma=1$  and  $\mu=2$  by considering the study (Mittal and Jain, 2012) and also, we have calculated the error norms  $L_2$  and  $L_\infty$  for values  $h = 0.5$ ,  $\Delta t = 0.01$  at times  $t = 5, 10, 15, 20$  in Table 4. For values  $h=0.25$ ,  $\Delta t=0.01$ ,  $t \leq 2$ , in Figure 7, it is shown graphically together a comparison of analytical and numerical scheme of Example 3. Secondly, in Table 5, we have presented a comparison of the error norms  $L_2$  and  $L_\infty$  for the numerical approach of Example 3 by taking  $N = 64, 150$  and  $\Delta t = 0.000005$  at times  $t = 0.0005, 0.0015, 0.0025, 0.0035$  over region  $[-0.2, 0.8]$  with reaction-diffusion coefficient  $\gamma=1$ ,  $\mu = 10000$  taking into account some studies in literature. Table 3 shows that our results are very good and Table 4 indicates that we have achieved very low results. Figure 7 exhibits that the numerical scheme of the problem show fairly a good physical behaviours for  $h=0.25$ ,  $\Delta t=0.01$  at times  $t \leq 2$ . Table 5 displays that results of the error norms  $L_2$  and  $L_\infty$  computed by Strang splitting technique utilizing collocation method combined with cubic B-spline are better than in (Dağ and Ersoy, 2016), CN (Qiu and Sloan, 1998) and close to results in (Dağ et al., 2010), ASD (Qiu and Sloan, 1998) and it shows that the results of DSC (Qiu and Sloan, 1998) are better than the presented method. Also, it is seen that solution profiles and absolute error distributions in Figure 8 exhibit fairly accurate physical behaviors for parameters  $N = 200$  and  $\Delta t = 0.000005$  at times  $t = 0.0005, 0.001, 0.0015, 0.002, \dots, 0.0035$  as in (Dağ et al., 2010). So, the method presented can be recommended as alternative solution to other non-linear equations such as the Fisher's equation. Additionally, to indicate the effectiveness and performance of the suggested method, it is presented together the numerical and analytical solution graphically at different times in Figure 9 taking  $\mu = 2000$  and  $5000$  for  $N = 200$  with  $\Delta t = 0.00001$  on the solution region  $[-0.2, 0.8]$  as in studies (Mittal and Jain, 2013) and (Kappoor and Joshi, 2020).

**Table 3.** Comparison of the error norms  $L_2$  and  $L_\infty$  for  $\Delta t = 0.01, h = 1$  of Example 3.

t	Present		(Mittal and Jain, 2012)	
	$L_2$	$L_\infty$	$L_2$	$L_\infty$
0.5	1.77E-03	1.10E-03	1.76E-03	1.10E-03
1	2.93E-03	1.75E-03	2.92E-03	1.75E-03
1.5	3.65E-03	1.85E-03	3.67E-03	1.86E-03
2	4.28E-03	2.93E-03	4.50E-03	3.00E-03

**Table 4.** The error norms  $L_2$  and  $L_\infty$  for  $\Delta t = 0.01, h = 1$  of Example 3 at some various times.

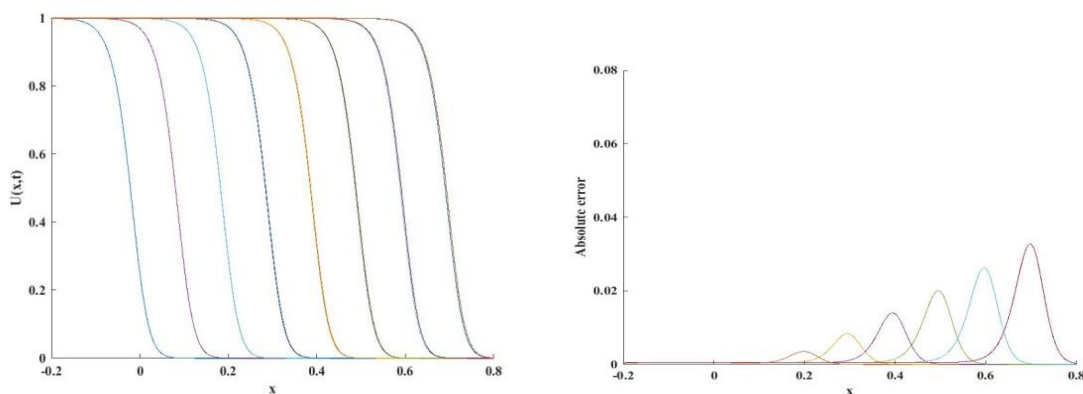
Errors	t=5	t=10	t=15	t=20
$L_2$	1.66E-03	1.30E-03	1.76E-03	1.10E-03
$L_\infty$	0.33E-03	0.08E-03	2.92E-03	1.75E-03



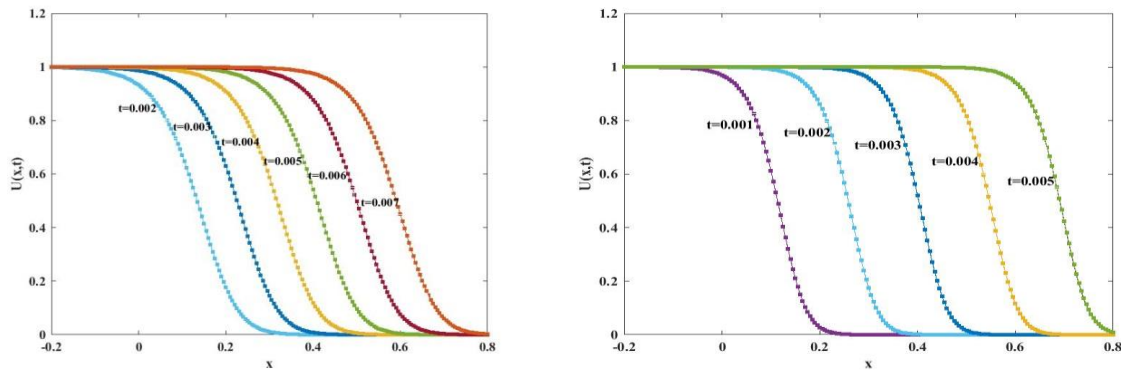
**Figure 7.** The numerical solutions of Example 3 for  $t \leq 2$  ( $\Delta t = 0.01, h = 0.25$ )

**Table 5.** Comparison of the error norms  $L_2$  and  $L_\infty$  at various times  $t$  of Example 3 for  $\alpha = 1, \beta = 10000$

Method	N	Error	t			
			0.0005	0.0015	0.0025	0.0035
Present	64	$L_2$	1.50E - 3	0.21E - 1	4.99E - 2	0.79E - 1
		$L_\infty$	6.41E - 3	0.89E - 1	2.12E - 1	3.25E - 1
Present	150	$L_2$	4.45E - 4	0.36E - 2	0.86E - 2	1.40E - 2
		$L_\infty$	3.27E - 2	1.52E - 2	3.64E - 2	5.90E - 2
Present	200	$L_2$	0.35E - 3	0.02E - 1	0.48E - 2	0.78E - 2
		$L_\infty$	2.84E - 3	0.83E - 2	2.00E - 2	3.27E - 2
Dağ et.al., 2010	150	$L_2$	6.89E - 5	1.30E - 2	1.55E - 2	8.82E - 3
		$L_\infty$	2.57E - 4	5.65E - 2	6.63E - 2	3.93E - 2
Dağ and Ersoy, 2016 (p = 1)	64	$L_\infty$	1.10E - 2	1.49E - 1	3.44E - 1	5.08E - 1
CN(Zhao and Wei, 2003)	64	$L_2$	1.92E - 3	2.65E - 2	6.18E - 2	9.91E - 1
		$L_\infty$	1.03E - 2	1.25E - 1	2.80E - 1	4.48E - 1
ASD(Zhao and Wei, 2003)	64	$L_2$	2.09E - 3	1.06E - 2	2.02E - 2	2.35E - 2
		$L_\infty$	1.07E - 2	4.93E - 2	9.37E - 2	9.44E - 1
DSC(Zhao and Wei, 2003)	64	$L_2$	1.24E - 6	5.92E - 7	1.16E - 6	1.64E - 6
		$L_\infty$	6.28E - 6	1.98E - 6	4.46E - 6	6.22E - 6



**Figure 8.** Solution profiles and absolute errors and of Example 3 for  $N = 200$



**Figure 9.** The approximate solutions for  $\beta = 2000$  at times  $t = 0.002, 0.003, 0.004, 0.005, 0.006, 0.007$  and  $\beta = 5000$  at times  $t = 0.001, 0.002, 0.003, 0.004, 0.005$  for  $N = 200$  of Example 3

**Example 4**

In the last example, we get non-linear Fisher's equation given as

$$U_t - \alpha U_{xx} = -\alpha_1 U^2 + \beta_1 U; -\infty \leq x \leq \infty, t \geq 0,$$

having the following initial and boundary conditions

$$U(x, t) = -\frac{\beta_1}{4\alpha_1} \left[ \operatorname{sech}^2 \left( -\sqrt{\frac{\beta_1}{24c}} x \right) - 2 \tanh \left( -\sqrt{\frac{\beta_1}{24c}} x \right) - 2 \right],$$

$$U(x_L, t) = 0.5, \quad U(x_R, t) = 0.$$

The analytical solution for the present problem is taken as

$$U(x, t) = -\frac{\beta_1}{4\alpha_1} \left[ \operatorname{sech}^2 \left( \pm \sqrt{\frac{\beta_1}{24c}} x + \frac{5\beta_1}{12} t \right) - 2 \tanh \left( \pm \sqrt{\frac{\beta_1}{24c}} x + \frac{5\beta_1}{12} t \right) - 2 \right].$$

The coefficients in this problem are chosen as  $\alpha=1, \alpha_1=1, \beta_1=0.5, c=1$  for  $h=0.25, \Delta t=0.01$  at times  $t=2$  and  $t=4$  on solution domain  $[-30,30]$  as in studies (Cattani and Kudreyko, 2008), (Mittal and Arora, 2010) and (Mittal and Jain, 2013). Table 6 and Table 8 report a comparison of the presented method solutions with those obtained in (Cattani and Kudreyko, 2008) and (Mittal and Arora, 2010). Also, Tables 7 and 9 give a comparison of the absolute error results found out by the presented method. From these tables, it is seen that our results are better than those of the previous studies. Figure 10 clearly illustrates a comparison between numerical and analytical solutions at times  $t = 1, 2, 3, 4, 5$  and this figure displays that it can be found a good conformity with those given the earlier studies.

**Table 6.** Comparison of approximate solutions of Example 4 at various values of  $x$  for  $t = 2$ .

x	Cattani and Kudreyko,2008	Mittal and Arora, 2010	Present	Exact
-20	0.498681	0.498653	0.498650	0.498652
-16	0.495130	0.495745	0.495739	0.495740
-12	0.486758	0.486679	0.486668	0.486669
-8	0.459576	0.459478	0.459476	0.459478
-4	0.386681	0.386742	0.386787	0.386791
2	0.158878	0.159011	0.158859	0.158850
6	0.041822	0.041877	0.041852	0.041851
10	0.006455	0.006426	0.006465	0.006465
14	0.000750	0.000746	0.000754	0.000755
18	7.617E-05	7.79E-05	7.91E-05	7.92E-05

**Table 7.** Comparison of absolute error at various values of  $x$  for  $t = 2$  of Example 4.

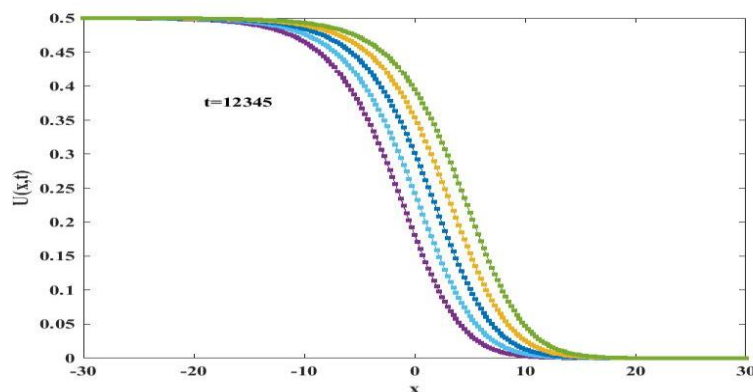
$x$	Mittal and Arora, 2010	Present
-20	1.52E -0 6	1.37E -0 6
-16	4.56E -0 6	1.15E -0 6
-12	9.42E -0 6	7.78E -0 7
-8	2.39E -0 7	1.24E -0 7
-4	4.91E -0 5	4.37E -0 6
2	1.61E -0 4	8.77E -0 6
6	2.54E -0 5	8.28E -0 6
10	3.92E -0 5	2.65E -0 6
14	9.46E -0 6	6.30E -0 7
18	1.23E -0 6	8.24E -0 8

**Table 8.** Comparison of numerical approach at various values of  $x$  for  $t = 4$  of Example 4.

$x$	Cattani and Kudreyko, 2008	Mittal and Arora, 2010	Present	Exact
-20	0.498678	0.499412	0.499411	0.499413
-16	0.498525	0.498146	0.498140	0.498142
-12	0.494757	0.494149	0.494139	0.494140
-8	0.481776	0.481763	0.481754	0.481756
-4	0.445508	0.445372	0.445394	0.445398
2	0.279025	0.280082	0.279947	0.279941
6	0.116980	0.117196	0.116975	0.116963
10	0.025927	0.025881	0.025967	0.025974
14	0.003695	0.003559	0.003618	0.003622
18	0.000409	0.000395	0.000405	0.000406

**Table 9.** Comparison of absolute error at various values of  $x$  for  $t = 4$  of Example 4.

$x$	Mittal and Arora, 2010	Present
-20	1.35E -0 6	1.93E -0 6
-16	4.01E -0 6	1.86E -0 6
-12	8.86E -0 6	1.40E -0 6
-8	7.28E -0 6	1.40E -0 6
-4	2.53E -0 5	3.51E -0 6
2	1.41E -0 4	5.96E -0 6
6	2.33E -0 4	1.20E -0 5
10	9.30E -0 5	7.02E -0 6
14	6.29E -0 5	4.20E -0 6
18	1.12E -0 5	7.45E -0 7

**Figure 10.** Approximate and exact solutions of Example 4 for  $\Delta t = 0.01, h = 0.25$ . at  $t = 1$  to  $t = 5$

## CONCLUSION

In the current study, the approximate results of nonlinear Fisher's equation have been obtained via Strang splitting technique using finite element collocation method combined with cubic B-spline. To display the correctness and validity of the presented method, the four examples given with suitable the initial-boundary condition available in literature have been considered and computed the error norms  $L_2$  and  $L_\infty$ . It has been seen that numerical results acquired with the presented method are very good. Consequently, we can say that the solutions of this study gotten Strang splitting technique can be both effectively implemented and considered as an alternative to obtain numerical results of these type of problems.

## REFERENCES

- Canosa J, 1973. On a nonlinear diffusion equation describing population growth, *IBM J Res Dev* 17: 307–313.
- Cattani C, Kudreyko A, 2008. Mutiscale Analysis of the Fisher Equation, ICCSA , Part I, Lecture Notes in Computer Science, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, Vol. 5072: 1171–1180.
- Dag I, Sahin A, Korkmaz A, 2010. Numerical investigation of the solution of Fisher's equation via the B-spline Galerkin method. *Numer Methods Partial Differ Equ* 26(6): 1483–1503.
- Dag I, Ersoy O, 2016. The exponential cubic B-spline algorithm for Fisher equation. *Chaos Solitons Fractals* 86: 101–106.
- Dag I, 1994. Studies of B-spline finite elements, Ph.D. thesis, University College of North Wales, Bangor, Gwynedd.
- Ersoy O, Dag I, 2015. The extended B-spline collocation method for numerical solutions of Fishers equation. *AIP Conf Proc* 1648: 370011.
- Strang G. (1968) On the construction and comparison of difference schemes, *SIAM J. Numer. Anal.* 5: 506-517.
- Gazdag J, Canosa J, 1974. Numerical solution of Fisher's equation, *J Appl Prob* 11: 445–457. Geiser J, Bartecki K, 2008. Additive, multiplicative and iterative splitting methods for Maxwell equations, *Algorithms and applications*, AIP Conf. Proc. vol. 1978 p. 470002.
- Hundsdoerfer W, Verwer J, 2003. Numerical Solution of Time-Dependent Advection-Diffusion-Reaction Equations (First Edition), Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kolmogoroff A, Petrovsky I, Piscounoff N, 1937. Study of the diffusion equation with growth of the quantity of matter and its application to biology problems, *Bulletin de l'Université d'état à Moscou, Série Internationale, Sec. A* 1, 1–25.
- Kapoor M, 2020. Solution of non-linear Fisher's reaction-diffusion equation by using Hyperbolic B-spline based differential quadrature method *Journal of Physics: Conference Series* 1531 -012064 IOP Publishing doi:10.1088/1742-6596/1531/1/012064.
- Madzvamuse A, 2006. Time stepping schemes for moving grid finite elements applied to reaction-diffusion systems on fixed and growing domains, *J Comput Phys* 214, 239–263.
- Mittal R.C, Arora G. 2010. Efficient numerical solution of Fisher's equation by using B-spline method *Int. J. Comput. Math.* 87 (13): 3039–51.
- Mittal R.C, Jain R. (2012) Cubic B-splines collocation method for solving nonlinear parabolic partial differential equations with Neumann boundary conditions *commun Nonlinear sci. Numer. Simulat* 17: 4616-4625.
- Mittal R.C, Jain R.K., (2013) Numerical solutions of nonlinear Fisher's reaction-diffusion equation with modified cubic B-spline collocation method *Math. Sci.* 7 (12): 1–10.
- Qiu Y, Sloan D. M. (1998) Numerical solution of Fisher's equation using a moving mesh method, *J Comput Phys* 146: 726–746.
- Prenter P. M. (1975) *Spline and variational methods*, Wiley, New York.
- Shukla H.S, Tamsir M. (2016) Extended modified cubic B-spline algorithm for nonlinear Fisher's reaction-diffusion equation. *Alexandria Engineering Journal* 55(3): 2871-79.
- Tamsir M, Srivastava V.K, Dhiman N. (2018) Chauhan, Numerical Computation of Nonlinear Fisher's Reaction–Diffusion Equation with Exponential Modified Cubic B-Spline Differential Quadrature Method. *Int. J. Appl. Comput. Math* 4-6.
- Zhao S, Wei G.W. (2003) Comparison of the discrete singular convolution and three other numerical schemes for solving Fisher's equation, *SIAM J Sci Comput* 25: 127–147.

**Atıf İçin:** Toyran N, Alotaibi H, 2022. Farklı Hücresel Modellerde *Cdh1*'in Grhl3 Tarafından Transkripsiyonel Düzenlemesinin Değerlendirilmesi. İğdir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 446-454.

**To Cite:** Toyran N, Alotaibi H, 2022. Evaluating The Transcriptional Regulation of *Cdh1* by Grhl3 in Different Cellular Models. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 446-454.

### Evaluating The Transcriptional Regulation of *Cdh1* by Grhl3 in Different Cellular Models

Neslihan TOYRAN<sup>1</sup>Hani ALOTAIBI<sup>2,3,\*</sup>

**ABSTRACT:** The calcium-dependent adhesion protein E-cadherin encoded by the *Cdh1* gene is a member of a large family conferring proper establishment of adherens junction. The expression of *Cdh1* is critical and is observed in epithelial cells. E-cadherin expression is also essential for establishing the pluripotent state in embryonic stem cells. *Cdh1* transcriptional regulation has been the focus of research for many years; early reports identified repressors of *Cdh1* since its downregulation is essential for the initiation of the epithelial to mesenchymal transition. Restoring the expression of *Cdh1* is thought to be simply due to the disengagement of *Cdh1* silencers from its promoter. Recent studies supported the presence of dedicated activators of *Cdh1* expression, including members of the Grhl and Ets family of transcription factors. Here we evaluated the regulatory potential of Grhl3 on the *Cdh1* promoter in different cellular models to understand the extent of the transcriptional relationship with *Cdh1*. We utilized several approaches, such as the correlation of expression by loss and gain of function, ChIP, and luciferase reporter assays. As a result, we found that Grhl3 is a potent regulator of *Cdh1* in cells of epithelial origin. Moreover, Grhl3 was sufficient to re-establish *Cdh1* expression in the murine hepatoma cells Hepa1-6. Improved understanding of the regulation of *Cdh1* is essential for the perception of how the epithelial to mesenchymal and the mesenchymal to epithelial transitions are regulated, as they play a crucial role in metastasis, which will pave the way for better management of the metastatic disease.

**Keywords:** E-cadherin, transcriptional regulation, *Grhl3*

<sup>1</sup> Neslihan TOYRAN ([Orcid ID: 0000-0001-8334-8616](https://orcid.org/0000-0001-8334-8616)), Vocational School of Health Services, Dokuz Eylül University, Izmir, Turkey; neslihan.toyran@deu.edu.tr (N.T.)

<sup>2</sup>Hani ALOTAIBI ([Orcid ID: 0000-0001-7423-9653](https://orcid.org/0000-0001-7423-9653)) Izmir Biomedicine and Genome Center, Izmir, Turkey; hani.alotaibi@ibg.edu.tr (H.A.)

<sup>3</sup> Izmir International Biomedicine and Genome Institute, Dokuz Eylül University

\*Corresponding Author: Hani ALOTAIBI, e-mail: hani.alotaibi@ibg.edu.tr



## INTRODUCTION

E-cadherin (E-cad), encoded by the gene *Cdh1*, is a member of the cadherin superfamily. E-cad is a  $\text{Ca}^{+2}$ -dependent cell-cell adhesion glycoprotein, which shares about 70% similarity with N-cadherin (N-cad) (Bedzhov et al., 2013). Cadherins anchor the cytoskeleton through interactions with p120-catenin, alpha-catenin, and beta catenins to form adherens junctions (Stemmler, 2008). E-cad and N-cad are expressed in a mutually exclusive manner; E-cad is restricted to epithelial cells, while N-cad is expressed in mesenchymal cells. The cadherin switch is a vital step during the epithelial to mesenchymal transition (EMT) (Stemmler, 2008). EMT is a critical developmental process hijacked by tumor cells during metastasis (Brabletz et al., 2018; Kalluri and Weinberg, 2009; Terashima et al., 2018). During EMT, E-cad is downregulated after the activation of a repertoire of silencers dubbed the EMT inducers, including Snail and Zeb1, among others (Stemmler, 2008; Thiery et al., 2009). While E-cad repression during EMT is well studied (Fazilaty et al., 2019; Lavin and Tiwari, 2020), its reactivation during mesenchymal to epithelial transition (MET) is not fully understood, and only recently has it been under investigation (Alotaibi et al., 2015; Sengez et al., 2019; Werth et al., 2010). Understanding how *Cdh1* is regulated is of great importance to better comprehend the biological processes it is involved in, understand metastasis, and develop novel therapeutics for the management of the disease.

Few regulators of *Cdh1* have been reported (Alotaibi et al., 2015; Li et al., 2010; Sengez et al., 2019; Werth et al., 2010). One of the earlier reports revealed Klf4 as a key regulator of *Cdh1* (Li et al., 2010). During the initiation of induced pluripotent stem cells (iPSC), the activation of *Cdh1* expression via direct binding of exogenous Klf4 to specific sites at the promoter (Li et al., 2010) triggers MET, which is then followed by the activation of the endogenous transcription factors of the core pluripotency network (Li et al., 2010). More recently, members of the Grhl family of transcription factors have been reported to activate *Cdh1* expression, thus contributing to MET initiation (Alotaibi et al., 2015; Werth et al., 2010). Grainyhead-like 2 (Grhl2) was found to activate *Cdh1* expression by binding to an intronic enhancer during the formation of uretic bud (Werth et al., 2010). We have also reported that Grhl3 plays a crucial role in the initiation of MET. After activating *Hnf4 $\alpha$*  expression, both Grhl3 and *Hnf4 $\alpha$*  bind to separate enhancers in intron 2 and physically interact to activate *Cdh1* expression (Alotaibi et al., 2015). Despite the presence of several publications focusing on how *Cdh1* expression is downregulated during EMT, the positive regulation of *Cdh1* expression is limited to a few reports. Studies regarding E-cad function or regulation are usually limited to few cellular models such as embryonic stem cells for its role in pluripotency (Bedzhov et al., 2013; Niwa, 2007; Redmer et al., 2011; Voutsadakis, 2015), or EMT/MET models where its expression is modulated by extracellular signals such as TGF $\beta$  (Alotaibi et al., 2015). This limits the potential of discovering novel aspects of its regulation. To overcome this limitation, we carried out several experiments to assess the regulatory potential of Grhl3 in different cellular models. We included cell lines of embryonic, epithelial, and cancer origins. The variety of cells would allow us to better understand *Cdh1* expression. We found that the E-cad negative cell line Hepa1-6 is an excellent cellular model for analyzing *Cdh1* transcriptional regulation, which could be used to identify novel regulators of *Cdh1* that are not limited to pluripotency or EMT/MET.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell Lines

**E14.1**; mouse embryonic stem cells, **NMuMG**; normal murine mammary gland cell line, **CSG**; Murine submandibular gland carcinoma cell line, **Hepa1-6**; hepatoma cell line, **P19** and **F9**; mouse embryonic carcinoma cell line, and **CMT**; mouse polyploid carcinoma cell line were obtained from ATCC. In general, cells were cultured at 37°C in an incubator supplied with 10% CO<sub>2</sub>. The culture

medium was DMEM (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 10 U ml<sup>-1</sup> Penicillin/Streptomycin, 0.1 mM non-essential amino acids, and 2 mM L-glutamine (Gibco). For NMuMG cells medium, 10 µg ml<sup>-1</sup> insulin (Sigma) was added. **E14.1** ES cells were cultured on mitotically inactivated embryonic fibroblasts (MEFs) in complete ES cell medium as explained in (Bedzhov et al., 2013). Culture media were replenished every couple of days. Cell passaging was performed at 80-90% confluence.

### mRNA Expression Level Analysis

For gene expression analysis, RNA isolation and cDNA synthesis were performed using the methods and reagents as described previously (Alotaibi et al., 2015). qPCR analysis and quantification were performed using the  $\Delta\Delta C_t$  method. For knock-down (loss-of-function) experiments, cultured cells were transfected with 50 nM siRNAs against *Grhl3* (siGrhl3, Ambion) or a non-targeting control scrambled siRNA (siCtrl, Ambion) using the Lipofectamine RNAi Max (Invitrogen) and collected 72 h later. For over-expression (gain-of-function) experiments, cells were transfected with a *Grhl3* expressing plasmid or an empty vector (Mock) using the X-tremeGENE 9 (Roche). RNA used for cDNA synthesis was isolated 48 hours after transfection.

### Luciferase Reporter Assays

The *Cdh1* promoter (1.5kb region) and the *Cdh1* enhancer at 7.8 kb were cloned in the pGL4.10 and pGL4.23 plasmids, respectively. Details about the reporter plasmids were described previously (Alotaibi et al., 2015). In brief, transfection was done in 48-well plates, and the cells were transfected using the X-tremeGENE 9 (Roche) and 100 ng of each reporter plasmid containing 5 ng pRL-TK (Promega) as an internal control. Luciferase activity was measured in the Centro LB 960 luminometer (Berthold Technologies) using the Dual-Glo Luciferase Assay kit (Promega). Fold induction is relative to the empty vector calculated by normalizing Firefly luciferase values to the Renilla control.

### Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

For ChIP analysis, cells were cultured in 6-well plates. Following cross-linking with formaldehyde and then lysis, chromatin containing cell lysates were sonicated using the S2 ultrasonicator (Covaris) at the following conditions: frequency sweeping mode and 15 cycles of 60 s at maximum intensity and 15 % duty cycle performed at 4°C. Immunoprecipitation was carried out at 4°C for 16 h using the ChIP-grade antibodies against *Grhl3* (S-19, Santa Cruz) and a rabbit control IgG (sc-2027, Santa Cruz). Quantification was performed with qPCR as described previously (Alotaibi et al., 2015).

### Statistical Analysis

Luciferase reporter assays and qPCR experiments were performed in triplicates. Statistical evaluation of the results was performed using the Student's t-test; a 95 % confidence interval was applied. All experiments were performed at least three times. Error bars depict "standard error of the mean".

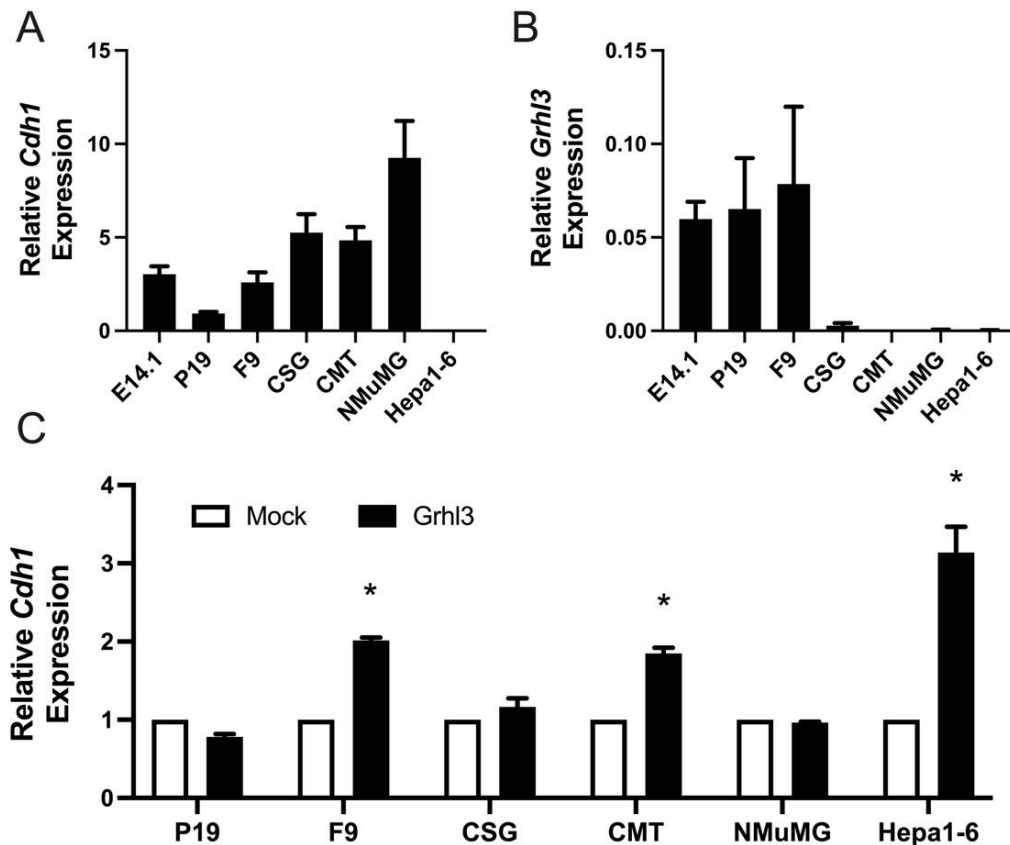
## RESULTS AND DISCUSSION

### Correlation of Expression Between *Grhl3* and *Cdh1*

Initially, we assessed the expression levels of *Cdh1* and *Grhl3* in the cell lines used in this study. Three cell lines are of embryonic origin (E14.1, P19, and F9); these cells express *Cdh1*, among other pluripotency and epithelial genes. Also, somatic cells such as NMuMG, CSG, and CMT express *Cdh1* as well. On the other hand, Hepa1-6 cells lack *Cdh1* expression (Figure 1A). As for *Grhl3*, we detected the transcript in most cells but at varying levels. *Grhl3* expression was highest in E14.1, P19, and F9

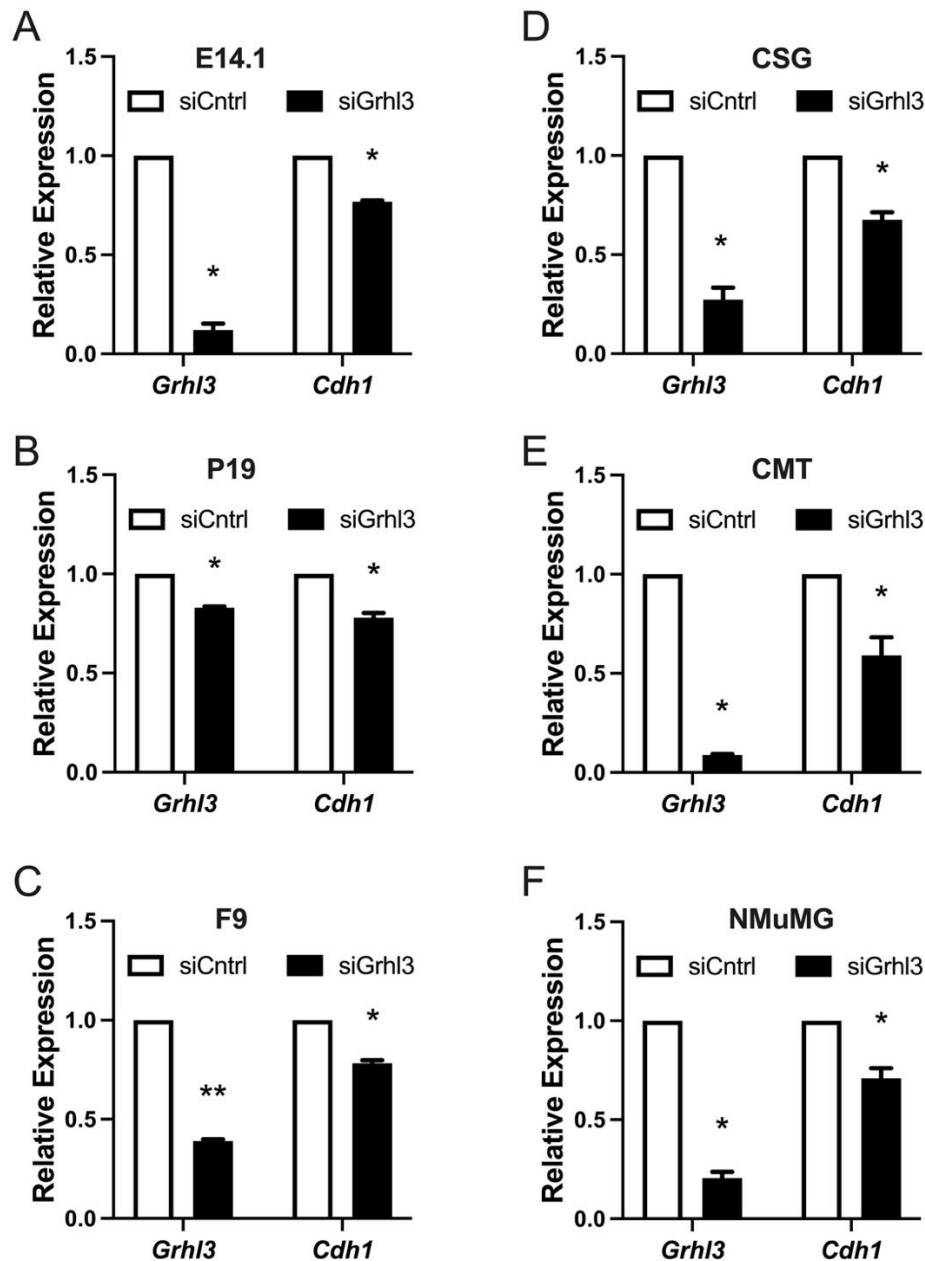
(Figure 1B). The overall evaluation of mRNA levels of *Cdh1* and *Grhl3* revealed that *Cdh1* expression is considerably higher than that of *Grhl3*.

To assess the correlation of expression between the two genes in the cell lines used in this study, we first ectopically expressed *Grhl3* from a plasmid and compared the expression levels of *Cdh1* to those in mock-transfected cells. As a result, *Cdh1* mRNA levels increased 2-fold in F9 and CMT cell lines. On the other hand, the *Cdh1* negative cell Hepa1-6 response was strongest among the other cell lines tested, with a more than 3-fold increase (Figure 1C).



**Figure 1.** Correlation of expression between *Grhl3* and *Cdh1*. qPCR analysis of the basal expression levels of *Cdh1* (A) and *Grhl3* (B) in different cell lines. C) *Grhl3* over-expression leads to an increased *Cdh1* expression in 3 of the cell lines studied. Results represent 3 independent experiments. \*:  $P < .05$ , \*\*:  $P < .01$

We extended the correlation of expression studies to loss of function experiments. For this purpose, we utilized siRNAs against *Grhl3* and transfected the cell lines with either siGrhl3 or siCntrl siRNAs. After 72 hours of treatment, RNA was isolated, and changes in *Grhl3* and *Cdh1* mRNA levels were determined by qPCR (Figure 2). The *Grhl3* depletion efficiency was assessed by the apparent decrease in *Grhl3* levels, while P19 cells were not responsive to the siRNA treatment (Figure 2B). The overall knock-down of *Grhl3* was efficient, ranging from 70-90% in different cell lines. mRNA levels of *Cdh1* were measured in response to *Grhl3* depletion, although the decrease in *Cdh1* expression was up to 40% (Figure 2E), the overall decrease among the cell lines was statistically significant, which is in support of the previously measured positive correlation (Sengez et al., 2019). In conclusion, we have established experimental evidence for the correlation of expression between *Grhl3* and *Cdh1* in different cellular models.

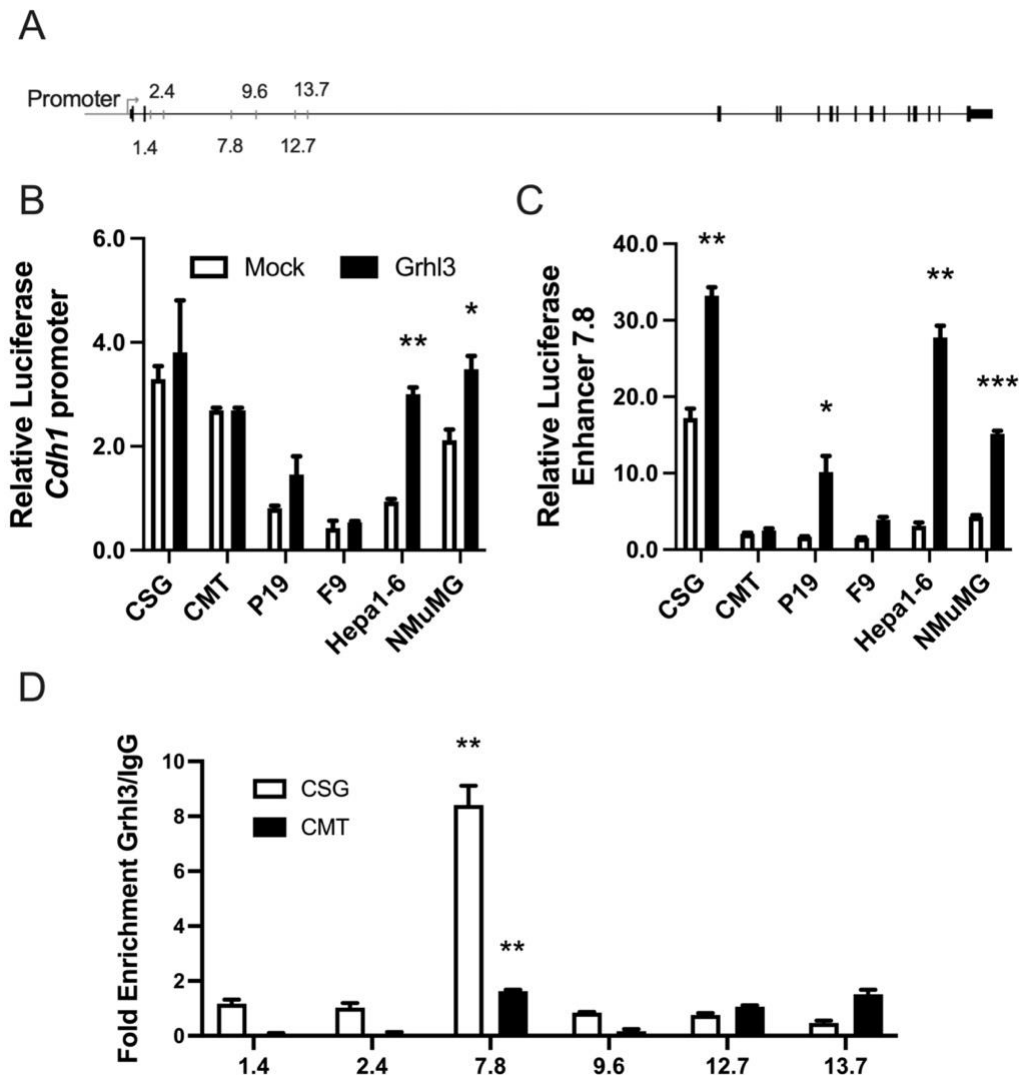


**Figure 2.** Correlation of expression between *Grhl3* and *Cdh1*. qPCR analysis of *Grhl3* and *Cdh1* in response to the siRNA mediated silencing of *Grhl3* in different cell lines. Each panel represents the results of a distinct cell line as indicated on top of each panel. The expression of *Grhl3* indicates the silencing efficiency. Results represent 3 independent experiments. \*:  $P < .05$ , \*\*:  $P < .01$

### **Grhl3 Can Activate the Promoter of *Cdh1***

After establishing the correlation of expression between *Cdh1* and *Grhl3*, we investigated the regulatory potential of *Grhl3* over the *Cdh1* promoter and the previously annotated enhancers (Alotaibi et al., 2015). A graphical representation of these enhancers within the *Cdh1* locus is shown in Figure 1A. We first transfected different cell lines with a luciferase reporter construct containing the *Cdh1* promoter. *Cdh1* promoter responded to *Grhl3* only in two cell lines, NMuMG and Hepa1-6 (Figure 3B). The observed promoter activation was in agreement with the results presented in figure 1C. We then studied the activation of the *Grhl3*-activated enhancer (enhancer at position 7.8 in Figure 3A), which we identified previously (Alotaibi et al., 2015); unlike the promoter, this enhancer within the second intron

of *Cdh1* was responsive in four cell lines; in addition to NMuMG and Hepa1-6, CSG and P19 showed responsiveness to Grhl3 activation (Figure 3C). To better understand the regulatory potential of Grhl3 on *Cdh1* expression, we performed ChIP experiments using antibodies against Grhl3 and measured its enrichment on the intronic enhancer. For this, we only used CSG and CMT cells. We measured a strong enrichment of Grhl3 in CSG cells only on the enhancer at position 7.8kb, and in agreement with the results from the reporter assay, Grhl3 was not enriched on any of the other enhancers (Figure 3D).



**Figure 3.** Regulation of *Cdh1* by Grhl3. Ectopic expression of *Grhl3* activates the *Cdh1* promoter (A) and the intronic enhancer (B) as measured by luciferase reporter assay. In A and B, the effect of *Grhl3* induction was compared to a mock plasmid. C) qPCR results of ChIP experiments indicating the enrichment of Grhl3 at the intronic enhancer in two cell lines, CSG and CMT. Results represent 3 independent experiments. \*:  $P < .05$ , \*\*:  $P < .01$ , \*\*\*:  $P < .001$

We have previously reported a strong correlation of the expression between *Grhl3* and *Cdh1* with a correlation score (Rho) of more than 0.81 with a  $P$ -value of  $2.22e-16$  (Sengez et al., 2019). This high correlation also reflected the expression of these two genes between the epithelial and mesenchymal states. Members of the Grhl family of transcription factors have been described as regulators of *Cdh1* expression (Alotaibi et al., 2015; Werth et al., 2010). While *Grhl3* was attributed to the regulation during the mesenchymal to epithelial transition, its regulatory potential in other models remained unclear. The

expression of *Cdh1* in the studied cell lines clearly reflected an epithelial and a mesenchymal state, yet the expression level varied between different cell lines; this might be due to the tissue origin of the cell line.

On the other hand, the expression pattern of *Grhl3* reflected its expression between developmental and post-natal patterns. *Grhl3* expression is known to be expressed at higher levels during embryonic development and then gradually decreases after birth and becomes restricted at a low level in a few tissues (Auden et al., 2006). The expression of *Grhl3* in cancer cells is different and was found elevated in some cancer types (Frisch et al., 2017; Mlacki et al., 2015; Xu et al., 2014; Zhao et al., 2016). In a previous study, we observed a high correlation of *Grhl3* and *Cdh1* expression in human breast cancer data sets (Alotaibi et al., 2015). The status of *Cdh1* or *Grhl3* expression in cancer cells is not entirely in accordance with that in normal cells, *i.e.*, in contrast between the mesenchymal and epithelial states (Zhao et al., 2016). This might explain the expression of *Grhl3* in the *Cdh1* negative Hepa1-6 cells. Nevertheless, the other cancer cells used in this study (CSG and CMT) showed a positive correlation between *Cdh1* and *Grhl3* in agreement with the other cell lines under study.

The regulation of *Cdh1* expression has been the focus of several studies in recent years. The repression of *Cdh1* expression by the EMT inducers is well known and is essential for the progression of EMT (Brabletz, 2012; Kalluri and Weinberg, 2009). It was also clear that the activation of *Cdh1* expression cannot be simply explained by the absence of the repressors (Alotaibi et al., 2015; Stemmler et al., 2005; Stemmler et al., 2003). On the other hand, the activation of *Cdh1* expression has been explained by the direct involvement of a distinct set of transcription factors other than the EMT inducers (Alotaibi et al., 2015; Li et al., 2010; Werth et al., 2010). Besides *Klf4* (Li et al., 2010) and *Hnf4a* (Alotaibi et al., 2015), the *grhl* family of transcription factors appears to be the major *Cdh1* regulators (Alotaibi et al., 2015; Werth et al., 2010). This may not be a surprise considering the regulation of the *Cdh1* ortholog in *Drosophila* (*Shotgun*) by Grainyhead (*Grh*) (Almeida and Bray, 2005). Using cell lines of several origins provides the advantage of discovering new cellular models to study *Cdh1* regulation. We have previously used NMuMG cells to study *Cdh1* regulation during MET (Alotaibi et al., 2015). The implications of modulating *Cdh1* expression go beyond MET and pluripotency; thus, exploring its regulation in different cellular models is of utmost importance. Our results indicate that CSG cells are a good candidate cell line to study different aspects of *Cdh1* regulation; the previously annotated enhancer (Alotaibi et al., 2015) within the *Cdh1* intron is active and can be regulated by *Grhl3*.

Moreover, P19 cells also show activation of both *Cdh1* promoter and enhancer. In addition to these results, the activation of *Cdh1* expression in Hepa1-6 cells is of great importance; The *Cdh1* promoter and the intronic enhancer in these cells were found responsive to the *Grhl3* induction; this was accompanied by an increase in *Cdh1* mRNA levels. This observation needs to be further investigated to better understand the capacity of *Grhl3* to initiate MET in other cellular models of mesenchymal origin, such as in mouse embryonic fibroblasts or cancer cells of mesenchymal background. Research in this field is growing to identify new therapeutics for the management of advanced cancer and metastasis.

## CONCLUSION

In this study, we investigated the regulatory potential of *Grhl3* on the activation of *Cdh1*. We used several cell lines of different backgrounds to assess the diversity of the regulation. The overall results obtained here are in agreement with the current literature; they also provide new insights on the ability of *Grhl3* to initiate *Cdh1* transcription in mesenchymal cells.

In summary, we have studied the regulatory potential of *Grhl3* in different mouse cell lines. One of the major findings of this study is the capacity of *Grhl3* to reactivate *Cdh1* expression in *Cdh1* negative

cells. These results will serve as the basis for future studies where modulation of *Cdh1* expression is required and eventually pave the way for developing novel therapeutics.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by TÜBİTAK Grant 219Z034.

## Conflict of Interest

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

## Author's Contributions

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

## REFERENCES

- Almeida, MS and Bray, SJ, 2005. Regulation of post-embryonic neuroblasts by *Drosophila* Grainyhead. *Mech Dev* 122 (12): 1282-1293.
- Alotaibi, H, Basilicata, MF, Shehwana, H, Kosowan, T, Schreck, I, Braeutigam, C, Konu, O, Brabletz, T and Stemmler, MP, 2015. Enhancer cooperativity as a novel mechanism underlying the transcriptional regulation of E-cadherin during mesenchymal to epithelial transition. *Biochimica Et Biophysica Acta- Gene Regulatory Mechanisms* 1849 (6): 731-742.
- Auden, A, Caddy, J, Wilanowski, T, Ting, SB, Cunningham, JM and Jane, SM, 2006. Spatial and temporal expression of the Grainyhead-like transcription factor family during murine development. *Gene Expr Patterns* 6 (8): 964-970.
- Bedzhov, I, Alotaibi, H, Basilicata, MF, Ahlborn, K, Liszewska, E, Brabletz, T and Stemmler, MP, 2013. Adhesion, but not a specific cadherin code, is indispensable for ES cell and induced pluripotency. *Stem Cell Res* 11 (3): 1250-1263.
- Brabletz, T, 2012. To differentiate or not--routes towards metastasis. *Nat Rev Cancer* 12 (6): 425-436.
- Brabletz, T, Kalluri, R, Nieto, MA and Weinberg, RA, 2018. EMT in cancer. *Nat Rev Cancer* 18 (2): 128-134.
- Fazilaty, H, Rago, L, Kass Youssef, K, Ocana, OH, Garcia-Asencio, F, Arcas, A, Galceran, J and Nieto, MA, 2019. A gene regulatory network to control EMT programs in development and disease. *Nat Commun* 10 (1): 5115.
- Frisch, SM, Farris, JC and Pifer, PM, 2017. Roles of Grainyhead-like transcription factors in cancer. *Oncogene* 36 (44): 6067-6073.
- Kalluri, R and Weinberg, RA, 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119 (6): 1420-1428.
- Lavin, DP and Tiwari, VK, 2020. Unresolved Complexity in the Gene Regulatory Network Underlying EMT. *Front Oncol* 10: 554.
- Li, R, Liang, J, Ni, S, Zhou, T, Qing, X, Li, H, He, W, Chen, J, Li, F, Zhuang, Q, Qin, B, Xu, J, Li, W, Yang, J, Gan, Y, Qin, D, Feng, S, Song, H, Yang, D, Zhang, B, Zeng, L, Lai, L, Esteban, MA and Pei, D, 2010. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 7 (1): 51-63.
- Mlacki, M, Kikulska, A, Krzywinska, E, Pawlak, M and Wilanowski, T, 2015. Recent discoveries concerning the involvement of transcription factors from the Grainyhead-like family in cancer. *Exp Biol Med (Maywood)* 240 (11): 1396-1401.
- Niwa, H, 2007. How is pluripotency determined and maintained? *Development* 134 (4): 635-646.

- Redmer, T, Diecke, S, Grigoryan, T, Quiroga-Negreira, A, Birchmeier, W and Besser, D, 2011. E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming. *EMBO Rep* 12 (7): 720-726.
- Sengez, B, Aygun, I, Shehwana, H, Toyran, N, Tercan Avci, S, Konu, O, Stemmler, MP and Alotaibi, H, 2019. The Transcription Factor Elf3 Is Essential for a Successful Mesenchymal to Epithelial Transition. *Cells* 8 (8).
- Stemmler, MP, 2008. Cadherins in development and cancer. *Mol Biosyst* 4 (8): 835-850.
- Stemmler, MP, Hecht, A and Kemler, R, 2005. E-cadherin intron 2 contains cis-regulatory elements essential for gene expression. *Development* 132 (5): 965-976.
- Stemmler, MP, Hecht, A, Kinzel, B and Kemler, R, 2003. Analysis of regulatory elements of E-cadherin with reporter gene constructs in transgenic mouse embryos. *Dev Dyn* 227 (2): 238-245.
- Terashima, M, Ishimura, A, Wanna-Udom, S and Suzuki, T, 2018. MEG8 long noncoding RNA contributes to epigenetic progression of the epithelial-mesenchymal transition of lung and pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 293 (47): 18016-18030.
- Thiery, JP, Acloque, H, Huang, RY and Nieto, MA, 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139 (5): 871-890.
- Voutsadakis, IA, 2015. The network of pluripotency, epithelial-mesenchymal transition, and prognosis of breast cancer. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 7: 303-319.
- Werth, M, Walentin, K, Aue, A, Schonheit, J, Wuebken, A, Pode-Shakked, N, Vilianovitch, L, Erdmann, B, Dekel, B, Bader, M, Barasch, J, Rosenbauer, F, Luft, FC and Schmidt-Ott, KM, 2010. The transcription factor grainyhead-like 2 regulates the molecular composition of the epithelial apical junctional complex. *Development* 137 (22): 3835-3845.
- Xu, H, Liu, C, Zhao, Z, Gao, N, Chen, G, Wang, Y and Cui, J, 2014. Clinical implications of GRHL3 protein expression in breast cancer. *Tumour Biol* 35 (3): 1827-1831.
- Zhao, P, Guo, S, Tu, Z, Di, L, Zha, X, Zhou, H and Zhang, X, 2016. Grhl3 induces human epithelial tumor cell migration and invasion via downregulation of E-cadherin. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 48 (3): 266-274.



**Atıf İçin:** Kolcuoglu Y, Çakmak U, 2022. *Enterobacter carcerogenus*'tan L-Asparaginazın Klonlanması ve Saflaştırılması. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 455-463.

**To Cite:** Kolcuoglu Y, Çakmak U, 2022. Cloning and Purification of L-Asparaginase from *Enterobacter carcerogenus*. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 455-463.

### Cloning and Purification of L-Asparaginase from *Enterobacter carcerogenus*

Yakup KOLCUOĞLU<sup>1\*</sup> and Ummuhan ÇAKMAK<sup>1</sup>

**ABSTRACT:** In this study, the gene coding for *EcL-ASP* from *Enterobacter carcerogenus* was identified in full sequence and cloned into a mesophilic organism. The gene encoding L-asparaginase was transferred to the pET-28a (+) vector to ensure its expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS. The recombinant protein containing the N-terminal histidine tail (6xHis tag) was purified by Nickel affinity chromatography. As a result of SDS-PAGE, it was determined that the purified protein consisted of a single type of polypeptide. In the theoretical calculation, the subunit molecular weight of the recombinant protein containing the histidine tail was found to be 37 kDa. It was observed that the cloned enzyme had low L-glutaminase activity. The pH and temperature at which the recombinant enzyme showed the best activity were determined as 7.0 and 37 °C, respectively. From the drawn Lineweaver-Burk graph, it is estimated that the  $K_m$  value is 0.06 mM and the  $V_{max}$  value is 666.7 U mg<sup>-1</sup> protein.

**Keywords:** *Enterobacter carcerogenus*, L-asparaginase, Recombinant DNA, Protein purification

<sup>1</sup>Yakup KOLCUOĞLU ([Orcid ID: 0000-0002-4611-2433](https://orcid.org/0000-0002-4611-2433)), Ummuhan ÇAKMAK ([Orcid ID: 0000-0001-8719-2436](https://orcid.org/0000-0001-8719-2436)) Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Trabzon, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Yakup KOLCUOĞLU, e-mail: yakupkolcuoglu@yahoo.com

**Eğer varsa kongre beyanı veya Tez alıntısı:** 26-29 Ekim 2019 tarihinde Antalya'da düzenlenen "Euroasia Biochemical Approach and Technologies Congress" de poster olarak sunulmuştur.

## INTRODUCTION

Enzymes, an important class of biomolecules, have important roles in living organisms and are indispensable for food, agriculture, health, textile, cosmetics and many other fields. To date, many enzymes have been identified and their properties characterized. Researchers have a particular interest on a very small number of these enzymes. According to Hammes (Hammes 2008), these enzymes have specific experimental advantages L-asparaginase (L-asparagine amidohydrolase, EC 3.5.1.1), which has antineoplastic activity, is among these enzymes (Kumar and Verma, 2012).

Because of its hydrolytic properties, asparaginase is very important for ALL treatment. Normal and cancerous cells (leukemic cells) need L-asparagine. In normal cells, L-aspartate is converted to asparagine by asparagine synthetase. Neoplastic cells cannot synthesize asparagine due to the absence of this enzyme. Therefore, the ability of such cells to grow and multiply depends on asparagine (Savitri and Azmi, 2003). Consequently, combining tumor cells with L-asparaginase results in the conversion of all circulating asparagine before it enters the cancerous cell. This situation causes cancer cells to die slowly due to the lack of resources they need (Dhanam and Kannan, 2013).

To date, L-asparaginase has been reported in a variety of organisms (Patro et al., 2011). L-asparaginases obtained from gram-negative bacteria can be divided into two classes as Type I and Type II. Type II L-asparaginase has higher specific activity on L-asparagine than Type I (Mario et al., 2007). Currently, L-asparaginase from *Escherichia coli* and *Erwinia carotovora* is in clinical use in the treatment of ALL. (Borek and Jaskolski, 2001).

In addition to its therapeutic properties, L-asparaginase is widely used as a food additive. When starchy foods are fried or cooked at 120 °C, acrylamide (neurotoxin) formation is observed as a result of the Millard reaction (Lingnert et al., 2002; Mottram et al., 2002). Since L-asparaginase can convert L-asparagine to L-aspartate, it is used in the processing of starchy foods to prevent the Millard reaction. Therefore, the risk of formation of acrylamide is reduced (Pedreschi et al., 2008).

In this study, L-asparaginase gene from *Enterobacter carcerogenus* strain, which was determined to be a new subtype by various morphological, physiological, biochemical, molecular and DNA hybridization analysis (Kacagan et al., 2013), was cloned into the pET-28a (+) vector and expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS strain. The expressed protein was purified and the presence of pure protein was determined electrophoretically. In addition, the presence of enzyme activity was determined by spectroscopic methods and its biochemical and kinetic properties were also investigated.

## MATERIALS AND METHODS

### Crude enzyme extract

*Enterobacter carcerogenus* (*E. carcerogenus*), was grown under appropriate conditions (Kacagan et al., 2013). Cells were precipitated by centrifugation at 10.000 rpm for 10 min at 4 °C. The harvested cells were suspended in buffer, lysozyme (0.5 mg mL<sup>-1</sup>) was added to the mixture and left incubated at 37 °C for 30 minutes. The cells were then sonicated at a rate of 80% for 5 minutes at 1 cycle. The resulting crude mixture is centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes at 4 °C and the supernatant obtained will be used as crude enzyme extract. The presence of *E. carcerogenus* L-asparaginase (*EcL-ASP*) was determined by performing activity assay from the crude extract.

### Cloning of *EcL-ASP*

gDNA isolation from *E. carcerogenus* was performed using Genomic DNA Purification Kit. In order to obtain the gene encoding *EcL-ASP* from gDNA, the sequences of genes of similar organisms previously studied were overlapped using NCBI database and forward and reverse degenerate primers

were designed from the appropriate regions of the gene (Forward: 5'-CAGTAAATAGTGAAGTTTAGT-3' and Revers: 5'-AAWRBSCWKYMMGWYWSYRS - 3'). Then, inverse PCR was performed based on the identified gene sequence in order to find the missing gene sequence of L-asparaginase gene. Dream Taq master mix was used for PCR. The PCR process was amplified with 30 cycles: denaturation, annealing, extension and extension, respectively, at 95 °C for 2 minutes, at 60 °C for 1.30 minutes; 72 °C for 2 minutes and 72 °C for five minutes. The PCR products were purified using Promega kit and inserted into the p GEM-T easy vector (Promega). They were sequenced after plasmid isolation. Based on the obtained L-asparaginase gene sequence, inverse PCR was performed to complete the deficiencies in the beginning and end of the gene. (Forward: 5'-CGCCATTGTGTCGGTACCATG-3', Revers: 5'- TGCATGTCCGGTAAAGTCAAC-3'). Inverse PCR was performed in 30 cycles following the protocol in the presence of Dream Taq master mix: denaturation, 95 °C for 2 min; annealing, 55 °C for 1.30 min; extension, 72 °C and additional extension for 2 minutes. 72 °C for 5 minutes.

In order to amplify the gene encoding *EcL-ASP*, a set of forward and reverse primers were designed considering the exact sequence of the gene (Forward: 5'-GGCTAGCATGGAGTTTTTGCAGAAGACG-3', *Nhe* I site underlined; Reverse: 5'-GAAATGTTTAACCACTAAGCTTG-3', *Hind* III site underlined). The primers were designed to be suitable linkers for the His tail at the N-terminus of the gene and to include the stop codon at the end, utilizing the pET-28 a (+) vector. The procedure used to perform this PCR: first denaturation, 95 °C for two min; annealing, 55 °C for one min; and extension, 72 °C for two min and additional extension five min at 72°C. The amplified fraction was purified from agarose gel with the aid of the kit (Promega), It was digested simultaneously with *Nhe*I and *Hind* III and then cloned into pET-28a(+). The amino acid sequence of the resulting enzyme was determined using the BLAST tool on the NCBI website (Figure 1).

<i>E. coli</i>	MEFFKKTALAALVMGFSGAALALPNITILATGGTIAGGGDSATKSNYTAGKVGVENLVNA	60
<i>E. carcerogenus</i>	MEFLQKTALKSIYVAYTGGTIGMQRGYIPVS-GRHGGGRNSTTK--FSKSLVSVASTVIS	57
	***:***: : : : : * : : * . * * : * * : : . * . * . * :	
<i>E. coli</i>	VPQLKDIANVKGEQVNVNIGSQDMNDNVWLTLLAKKINTDCDKTDGFIHTGTDMEETAYF	120
<i>E. carcerogenus</i>	NPLITPARALP-VAPPMLTLPMDHQVCVRLTTTIPRSL----ALFLPTVPSSFRNSPFC	112
	* : : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
<i>E. coli</i>	LDLTVKCDKPVVMVGAMRPSTSMS-----ADGPFNLYNAV-VTAADKASANRGLVV	171
<i>E. carcerogenus</i>	GALPTPERRISAFWTGWRRLRTSAEIPGIVTTPSPLPLTRSQVAASDEQSVRPPCSAQ	172
	* . : : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
<i>E. coli</i>	MNDTVLDGRDVTKTNTTDVATFKSVNYGPLGYIHNGKIDYQRTFARKHTSDTPFDVSKLN	231
<i>E. carcerogenus</i>	VG-CPKPRRIWMP-----ASSGCRFGEAKASKPSACAFVLLPR-----YSRLLKNS	220
	: . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
<i>E. coli</i>	ELPKVAIVYNYA-----NASDLPKALV-----DAGYDGIIVSAGVGNGLYKSV	275
<i>E. carcerogenus</i>	DTPKVGIFVNRVICCHIQRVEQVDLPVRTQLRQRNLGDDGLAQILQRHEG-----	272
	: * * . * . : : * * : : : * * * : . * :	
<i>E. coli</i>	FDTLATAAKNGTAVVRSRVPVTGATTQDAEVDDAKYGFVASGTLNPKARVLLQL----	330
<i>E. carcerogenus</i>	-----ECRGG-----KR--HCVGTMQDQHKAVVLLVMMRMA	301
	. . . * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
<i>E. coli</i>	-----ALTQTKDPQQIQQIFNQY	348
<i>E. carcerogenus</i>	LWALISSITSEFAAACRSTIWESSQRVELTPDEEMFNQY	340
	: * : : : * * * :	

**Figure 1.** Amino acid sequence alignment of *EcL-ASP*

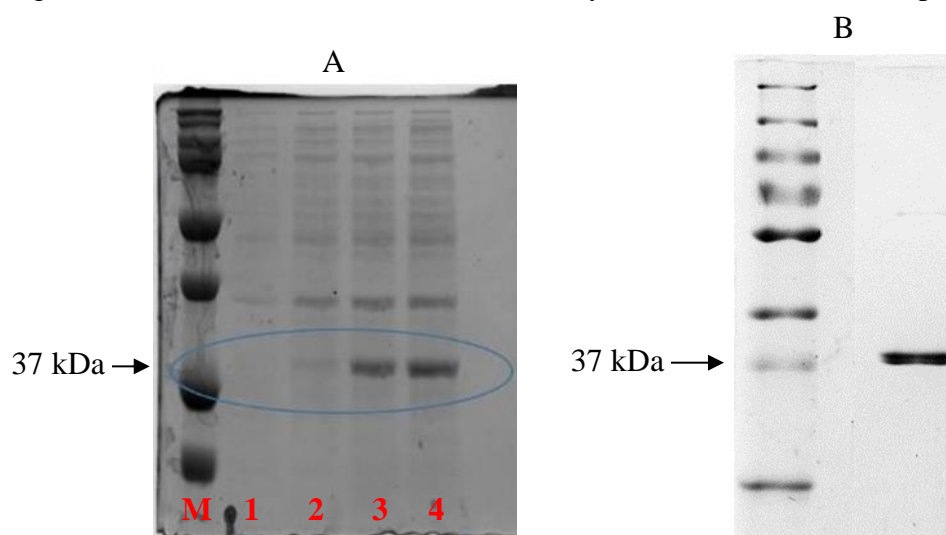
### Expression of L-asparaginase gene

The gene cloned into the expression vector was transferred to *E. coli* BL21 strain. Colonies containing recombinant plasmids were grown in Luria-Bertani medium containing 50 µg mL<sup>-1</sup> kanamycin and grown overnight at 37 °C and inoculated to a new medium at a ratio of 1: 100. Induction

was performed by adding 1.0 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside when the optical density (600 nm) was in the range of 0.6-0.8. It was then grown for another 3 hours at 37 °C (Kolcuoglu et al.,2010). Induced and uninduced cell proteins were visualized by SDS-PAGE (Figure 2A).

### Purification of L-asparaginase

Expressed cells were precipitated by centrifugation at 10,000 rpm for 10 minutes at 4 °C. The collected cells were suspended in 1 mL of 100 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer; lysozyme was added to the mixture containing 0.5 mg mL<sup>-1</sup> and incubated for 30 minutes at 37 °C. The cells were then sonicated in an ice bath at a rate of 80% for 5 minutes in 1 cycle. The resulting crude mixture was centrifuged for 10 minutes at 10.000 rpm at 4 °C and supernatant was used as crude enzyme extract. The *EcL*-ASP protein was purified in a single step using the MagneHis Protein Purification System (Promega) containing the nickel affinity column (Figure 2B). Protein purification using the polyhistidine tag relies on the binding affinity of histidine residues for an immobilized metal such as nickel. This affinity interaction is thought to be the result of the coordination of an empty coordination site on the metal and a nitrogen on the imidazole moiety of the polyhistidine. Polyhistidine tags offer distinct advantages for protein purification. The small size of the polyhistidine tag renders it less immunogenic than other larger tags. For this reason, the label does not usually need to be removed in operations following purification.



**Figure 2.** SDS PAGE. **A)** M: Marker, 1: First sample, 2: One-hour induction, 3: Two-hour induction, 4: Three-hour induction. **B)** Purification of recombinant L-asparaginase

### Enzyme activity assay

For *EcL*-ASP activity, 0.9 mL of 0.01 M substrate was prepared in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) and incubated with 0.1 mL of enzyme for 30 min at optimum temperature. At the end of the incubation period, 0.1 mL of TCA (15% w/v) was added to the reaction mixture. The reaction mixture was centrifuged at 10000 x g and the precipitate was removed. The released ammonia was found by measuring the absorbance at 436 nm by adding 0.1 mL of Nessler reagent, 0.1 mL of supernatant and 0.8 mL of distilled water (Singh et al.,2013). In the case of glutaminase activity, glutamine was used as the substrate in the above method (Singh and Banik, 2013).

### Optimum pH and Temperature

The optimum pH of *EcL*-ASP activity was determined with buffer solutions prepared at different pHs and using L-asparagine as substrate. For this purpose, Mcilvaine buffer (citric acid/disodium hydrogen phosphate buffer, pH 3.0-6.0) and Tris-HCl buffers (pH 7.0-9.0) prepared at 50 mM concentration were used.

To determine the effect of temperature on enzyme activity, activity measurements were made in increments of 10 °C. Buffer and substrate solution mixtures were incubated for 30 min at the optimum pH and specified temperature values. The effect of substrate concentration and protein content on enzyme activity was investigated by using the optimum pH and temperature values.

### Effect of enzyme concentration

In order to examine the change in enzyme activity by varying the *EcL*-ASP concentration and to determine the optimum amount of protein with the highest activity, the activity change was plotted against varying amounts of protein (0.01-1 mg mL<sup>-1</sup>) at predetermined optimum pH and temperature and constant amount of substrate.

### Substrate concentration

In order to determine the optimal substrate concentration at which the enzyme showed activity, enzyme activity was determined against varying amounts of substrate (0.005-30 mM) under the optimum conditions previously described. Using the obtained data,  $K_m$  and  $V_{max}$  values were calculated with the help of Lineweaver-Burk graph.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Obtaining the Full Sequence of *EcL*-ASP Gene by PCR

The results obtained from the sequence analysis of the PCR product revealed that the recombinant gene consisted of 1044 nucleotides and encoded 340 amino acid units (www.expaty.org). The molecular weight of the recombinant L-asparaginase expressed in *E. coli* was calculated to be 37.3 kDa (Anonymous, 2021).

Using the BLAST program, it was observed that the sequence of *EcL*-ASP was similar to those of *Enterobacter* species. As a result of the examination, it was found that it was 81% similar to *E. ludwigii* L-asparaginase, 81% to *E. cloacae* EcWSU1 L-asparaginase and 81% to *E. mori*L-asparaginase.

### Expression and purification of *EcL*-ASP

The recombinant gene cloned into the pET-28a (+) vector was expressed to contain 6xHis-tag in *E. coli* BL21 (DE3)pLysS in the presence of kanamycin and 1 mM IPTG at 37 °C. Expressed protein sample and protein obtained by purification were visualized on SDS-PAGE (Figure 2A). The fact that the pure protein is in a single band on the chromatogram indicates that the enzyme does not comprise or contain subunits of different molecular weight (Figure 2B). It has been reported in the literature that recombinant L-asparaginase has been purified from different sources using Ni-affinity chromatography. L-asparaginase enzyme from *Enterobacteriaceae*, a thermotolerant bacterium, (Vidya and Pandey 2012), from *E. coli* (Zhang et al. 2017) and from *Thermococcus gammatolerans* EJ3 (Zuo et al. 2014) were purified by nickel affinity chromatography. Electrophoretic studies have shown that the enzyme is effectively expressed and purified when compared to non-induced *E. coli* intracellular proteins. Single band was observed in SDS polyacrylamide gel electrophoresis after purification. As a result of the electrophoresis, the monomer molecular weight of *EcL*-ASP was determined as 37 kDa.

In the literature, the molecular weight of *Bacillus licheniformis* L-asparaginase with glutaminase-free activity was calculated to be approximately 37 kDa from SDS gel electrophoresis (Sudhir et al., 2014).

Molecular weight of *Erwinia chrysanthemi* L- asparaginase 37.2 kDa (Kotzia and Labrou, 2007), *Pseudomonas stutzeri* MB-405 L-asparaginase molecular weight 34 kDa (Manna et al., 1995), *Eschericia coli* L-asparaginase II 37 kDa (Khushoo et al., 2004), *Streptomyces gulbargensis* L-

asparaginase molecular weight 85 kDa (Amena et al., 2010) and *Acinetobacter calcoaceticus* L-asparaginase molecular weight were calculated 25 kDa (Joner, 1976).

### Determination of Enzyme Activity

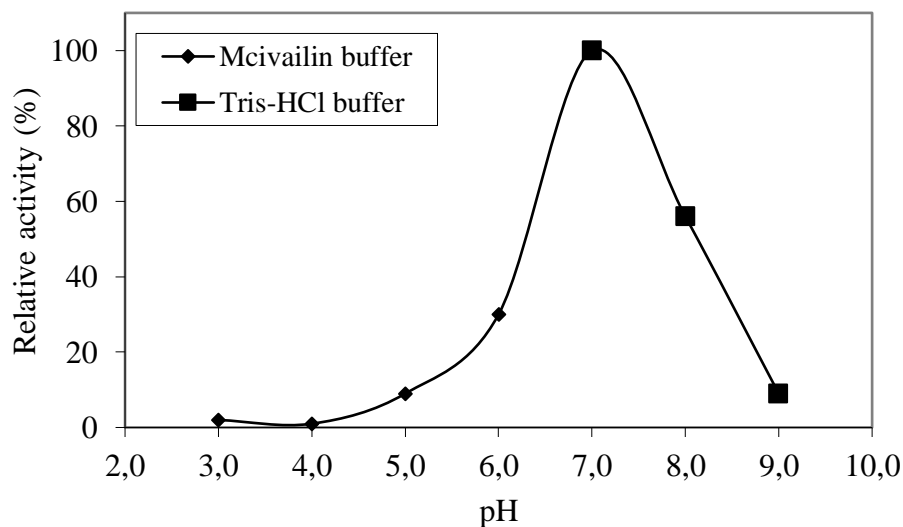
In order to perform characterization studies, L-asparagine and L-glutamine were used as substrates for activity for pure enzyme. According to the findings, the activity of the enzyme against L-asparagine substrate was higher (Table 1).

**Table 1.** Relative activity values obtained in the presence of L-asparagine and L-glutamine substrates

Substrate	Activity (%)
L-asparagine	100
L-glutamine	40

### Effect of pH on *EcL-ASP*

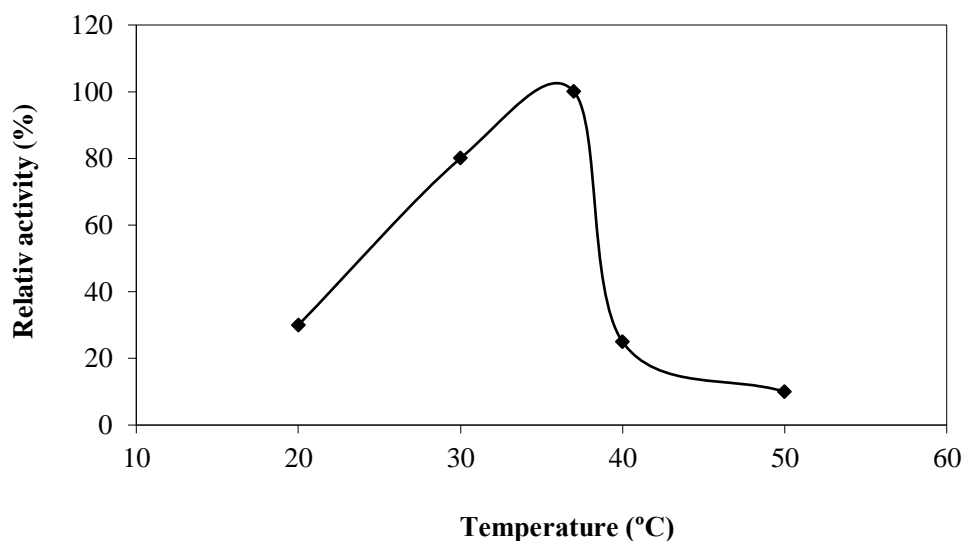
To determine the optimum pH value of *EcL-ASP*, enzyme activity was determined by using buffers solutions at different pHs with L-asparagine substrate. Using these obtained activity values, pH-% relative activity curve was plotted (Figure 3). When the pH dependency of recombinant *EcL-ASP* was examined, a single peak was observed in the obtained graph and the optimum pH value was determined as 7.0. In the literature, optimum pH 7.0 in *Corynebacterium glutamicum*, *Flammulina velutipes* L-asparaginases (Mesas et al., 1990; Eisele et al., 2011); *Erwina carotovora* L-asparaginase pH 8.6 (Kamble et al., 2006) and *Pseudomonas stutzeri* L-asparaginase has been reported as the optimum pH 9.0 (Manna et al., 1995).



**Figure 3.** pH effect on recombinant *EcL-ASP* activity

### Effect of Temperature on *EcL-ASP*

The change in *EcL-ASP* activity with respect to temperature was tested between 20 °C and 50 °C in increments of 10 °C and the temperature-% relative activity graph is shown in Figure 4. It was observed that the enzyme activity reached an optimum at 37 °C and maintained its activity at approximately 20% at 40 °C. When similar studies were examined in the literature, pure L-asparaginases obtained from *Corynebacterium glutamicum* and *Flammulina velutipes* showed optimum activity values at 40 °C (Mesas et al., 1990; Eisele et al., 2011), *Erwina carotovora* L-asparaginase at 35 °C (Kamble et al., 2006) and *Pseudomonas stutzeri* L-asparaginase showed optimum activity at 37 °C (Manna et al., 1995).



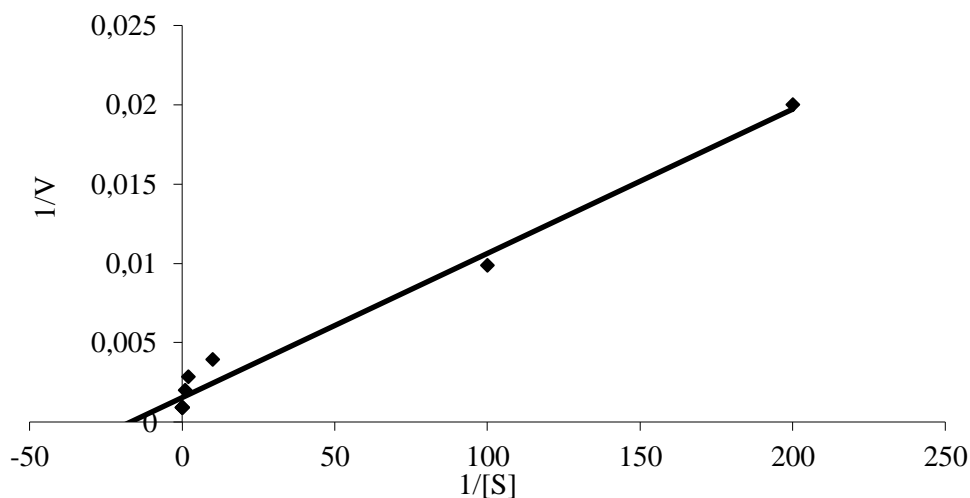
**Figure 4.** Effect of temperature on *EcL-ASP* activity

#### Effect of Enzyme Concentration on Activity

In order to investigate the dependence of *EcL-ASP* activity on the amount of protein, the variation of the activities depending on the amount of protein in the reaction mixture was examined. Activity determinations were made using enzyme solutions to contain protein at the final concentration of 0.01-1 mg mL<sup>-1</sup> in the reaction mixture. Optimal enzyme concentration was determined as 0.4 mg mL<sup>-1</sup> from hyperbolic curve obtained by graphing activity values against protein concentration.

#### Effect of Substrate Concentration on *EcL-ASP*

In order to examine the effect of substrate concentration on *EcL-ASP* activity, activity determinations were performed in the presence of L-asparagine at the final concentration of 0.005-30 mM in the reaction mixture while keeping the enzyme concentration constant. Lineweaver-Burk (Figure 5) graphs were drawn with the help of the data obtained after the activity measurements performed. The enzyme showed the highest activity in the presence of 10 mM L-asparagine; On the Lineweaver-Burk graph, it was calculated that  $K_m$  value was 0.06 mM and  $V_{max}$  was 666.7 U mg<sup>-1</sup> protein.



**Figure 5.** Lineweaver-Burk plot for *EcL-ASP*

## CONCLUSION

Considering all these data, It was determined that the enzyme which was cloned from *E. carcerogenus* and transferred to *E. coli* BL21 (DE3) pLysS strain, expressing and purified with six His tails at the head, was L-asparaginase, an enzyme that breaks down L-asparagine. It has been found that this partially characterized enzyme has an optimum temperature at 37 °C, which is desirable human metabolism temperature. The optimum pH value of 7.0 was found with a physiological pH. However, at acidic pH (5.0-6.0) where cancer cells live, activity is observed to be around 40%. As a result, it is contemplated that the resulting recombinant enzyme may be used in the bakery sector for pre-treatment with dough to reduce the formation of acrylamide or to treat ALL by shifting the optimum pH to acidic pH with mutation.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by KTU-BAP (Project number is FBA-2016-5615). The authors wish to thank Prof.Dr. Sabriye Çanakçı due to her contribution in providing bacteria.

## Conflict of Interest

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

## Author's Contributions

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

## REFERENCES

- Amena S, Vishalakshi N, Prabhakar M, Dayanand A, Lingappa K, 2010. Production, purification and characterization of l-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. *Brazilian Journal of Microbiology* 41:173-178.
- Anonymous, 2021. ProtParam tool. <https://web.expasy.org/protparam/>(Date of access: 07 May 2021)
- Borek D, Jaskolski M, 2001. Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. *Acta Biochimica Polonica* 48:893-902.
- Dhanam JG, Kannan S, 2013. L-asparaginase: types perspectives and applications. *Advance Biology Technology* 13:1-5.
- Eisele N, Linke D, Bitzer K, Na'amnieh S, Nimtz M, Berger RG, 2011. The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*. *Bioresource Technology* 102:3316-3321.
- Hammes GG, 2008. How do enzymes really work? *Journal of Biological Chemistry* 283(33):22337-22346.
- Joner PE, 1976. Purification and properties of l-asparaginase b from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 438:287-295.
- Kacagan M, Inan K, Belduz AO, Canakci S, 2013. Flavobacterium anatoliense sp nov., isolated from fresh water, and emended description of *Flavobacterium cети*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63:2075-2081.
- Kamble VP, Rao RS, Borkar PS, Khobragade CN, Dawane BS, 2006. Purification of L-asparaginase from a bacteria *Erwinia carotovora* and effect of a dihydropyrimidine derivative on some of its kinetic parameters. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 43:391-394.
- Khushoo A, Pal Y, Singh BN, Mukherjee KJ, 2004. Extracellular expression and single step purification of recombinant *Escherichia coli* L-asparaginase II. *Protein Expression and Purification* 38:29-36.



- Kolcuoglu Y, Colak A, Faiz O, Belduz AO, 2010. Cloning, expression and characterization of highly thermo- and pH-stable maltogenic amylase from a thermophilic bacterium *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4. *Process Biochemistry* 45:821-828.
- Kotzia GA, Labrou NE, 2007. L-asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* 3937: Cloning, expression and characterization. *Journal of Biotechnology* 127:657-669.
- Kumar K, Verma N, 2012. The various sources and application of L-asparaginase. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research* 3:197-205.
- Lingnert H, Grivas S, Jägerstad M, Skog K, Törnqvist M, Åman P, 2002. Acrylamide in food: mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods. *Scandinavian Journal of Nutrition* 46:159-172.
- Manna S, Sinha A, Sadhukhan R, Chakrabarty SL, 1995. Purification, characterization and antitumor-activity of l-asparaginase isolated from *Pseudomonas stutzeri* Mb-405. *Current Microbiology* 30:291-298.
- Mario S, Sandra K, Igor P, 2007. Structure, substrate complexation and reaction mechanism of bacterial asparaginases. *Current Chemical Biology* 1:75-86.
- Mesas JM, Gil JA, Martin JF, 1990. Characterization and partial-purification of l-asparaginase from *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of General Microbiology* 136:515-519.
- Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT, 2002. Food chemistry: Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 419:448-449.
- Patro KKR, Satpathy S, Gupta N, 2011. Evaluation of some fungi for L-asparaginase production. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences* 1:219-221.
- Pedreschi F, Kaack K, Granby K, 2008. The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries. *Food Chemistry* 109:386-392.
- Savitri NA, Azmi W, 2003. Microbial L-asparaginase: a potent antitumor enzyme. *Indian Journal of Biotechnology* 2:184-194.
- Singh P, Banik RM, 2013. Biochemical Characterization and Antitumor Study of L-Glutaminase from *Bacillus cereus* MTCC 1305. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 171:522-531.
- Singh Y, Gundampati RK, Jagannadham MV, Srivastava SK, 2013. Extracellular l-Asparaginase from a Protease-Deficient *Bacillus aryabhatai* ITBHU02: Purification, Biochemical Characterization, and Evaluation of Antineoplastic Activity In Vitro. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 171:1759-1774.
- Sudhir AP, Dave BR, Prajapati AS, Panchal K, Patel D, 2014. Subramanian, R. B., Characterization of a Recombinant Glutaminase-Free L-Asparaginase (ansA3) Enzyme with High Catalytic Activity from *Bacillus licheniformis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 174:2504-2515.
- Vidya J, Pandey A, 2012. Recombinant expression and characterization of L-asparaginase II from a moderately thermotolerant bacterial isolate. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167:973-980.
- Zhang Y, Li D, Li Y, 2017. Expression and purification of L-asparaginase from *Escherichia coli* and the inhibitory effects of cyclic dipeptides. *Natural Product Research* 18:2099-2106.
- Zuo S, Xue D, Zhang T, Jiang B, Mu W, 2014. Biochemical characterization of an extremely thermostable l-asparaginase from *Thermococcus gammatolerans* EJ3. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 109:122-129.

**Atf için:** Çomaklı E, Bilgili A, Öztaş T, Çomaklı T, 2022. Determination of Carbon, Nitrogen and Phosphorus Stocks and Stoichiometry in Broadleaf Mixed Forest Soil and Litterfall: A case study in Oltu district, Erzurum. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12(1): 464-475.

**To Cite:** Çomaklı E, Bilgili A, Öztaş T, Çomaklı T, 2022. Determination of Carbon, Nitrogen and Phosphorus Stocks and Stoichiometry in Broadleaf Mixed Forest Soil and Litterfall: A case study in Oltu district, Erzurum. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 12(1): 464-475.

## **Determination of Carbon, Nitrogen and Phosphorus Stocks and Stoichiometry in Broadleaf Mixed Forest Soil and Litterfall: A case study in Oltu district, Erzurum**

Emre ÇOMAKLI<sup>1\*</sup>, Adnan BİLGİLİ<sup>2</sup>, Taşkın ÖZTAŞ<sup>3</sup>, Tuğba ÇOMAKLI<sup>2</sup>

**ABSTRACT:** It is necessary to provide plant nutrients in soil at optimal levels for the sustainability of forest ecosystems. The soil stoichiometry of total carbon (C), total nitrogen (N) and total phosphorus (P) allow monitoring and assessment of ecosystem structures and variations in nutrient cycle. Studies on determination of C-N-P stoichiometry in forest ecosystems, however, are somewhat inadequate. This study aims to determine change of C-N-P stoichiometry depending on litterfall condition and soil depth in broadleaf mixed forest (European Hophornbeam - *Sypisrensis* Oak) soil and the C-N-P stocks in soil. In this context, we were determined both C-N-P stoichiometry and C-N-P stock in soil and litterfall by conducting field studied at 10 different points in the Broad Leaf Mixed Forest of Erzurum-Oltu district. The results indicated that as the depth of the soil increased, the C-N ratio decreased, whereas the N-P and the C-P ratios increased. Positive correlations were observed between C-N in all soil depths, but negative correlations between C-P and N-P. The correlation coefficients between C and N ( $r_{0-10}= 0.58$ ,  $r_{10-20}= 0.52$  and  $r_{20-30}= 0.44$ ) and between C and P ( $r_{0-10}= 0.64$ ,  $r_{10-20}= 0.54$  and  $r_{20-30}= 0.42$ ) and between N and P ( $r_{0-10}= 0.52$ ,  $r_{10-20}= 0.35$  and  $r_{20-30}= 0.36$ ) decreased as soil depth increased. The mean scores of the C-N-P stocks were determined as 5.9, 1.3, and 0.2 ton ha<sup>-1</sup> in litterfall and 157.68, 24.60, and 2.68 tons ha<sup>-1</sup> in soil, respectively. It is important to rehabilitate degraded forests and minimize the negative effects of erosion in order to increase the amount of carbon captured in forest soils. In addition, the variable C: N: P stoichiometry in forest ecosystems; It can be considered as a leading indicator of soil degradation and drought and climate changes.

**Keywords:** Stoichiometry, soil organic carbon, nitrogen and phosphorus stocks, litterfall, broadleaf forest, climate change

<sup>1</sup>Emre ÇOMAKLI ([Orcid ID: 0000-0001-8477-7076](https://orcid.org/0000-0001-8477-7076)), Environmental Problems Research and Application Center, Atatürk University, 25240, Erzurum, Turkey

<sup>2</sup>Adnan BİLGİLİ ([Orcid ID: 0000-0002-2151-3521](https://orcid.org/0000-0002-2151-3521)), Tuğba ÇOMAKLI ([Orcid ID: 0000-0002-0699-9818](https://orcid.org/0000-0002-0699-9818)), Eastern Anatolia Forestry Research Institute, 25050, Erzurum, Turkey

<sup>3</sup>Taşkın ÖZTAŞ ([Orcid ID: 0000-0001-5001-103X](https://orcid.org/0000-0001-5001-103X)), Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Atatürk University, 25240, Erzurum, Turkey

\*Corresponding Author: Emre ÇOMAKLI, e-mail: emrecomakli@atauni.edu.tr

## INTRODUCTION

Most of the ecological processes, including energy balance of ecosystem and the contributions of elements to these mechanisms and the composition of carbon, nitrogen, and phosphorus cycles in soil, are related to stoichiometry. Information regarding nutrient cycle fluctuations and biological processes in the ecosystems is also provided by ecological stoichiometry (Alberti et al., 2015; Qiao et al., 2020; Yang et al., 2017; Zechmeister-Boltenstern et al., 2015). The existence of organisms in terrestrial ecosystems is attributed to the presence of C-N-P and is one of the essential components of research about ecological stoichiometry (Chen et al., 2016; Tan and Wang, 2016). Comprehending C-N-P stoichiometry in the soil is important for the protection of the environment, C retention and soil quality preservation (Alberti et al., 2015; Yang et al., 2017). Commonly, stocks of C, N, and P vary with soil depth. However, these variations also differ. To illustrate, most of the C substrate is distributed in the topsoil and litterfall layer. (Hu et al., 2008; Jobbagy and Jackson, 2001; Lal, 2009; Wang et al., 2019). For regulating the carbon and nutrient cycle, litterfall decomposition plays a vital role. However, the process of litter decomposition depends on different factors, such as climate, carbon input quality, soil, chemical, and physical characteristics of litterfall and also soil biota. Additionally, one of the most significant considerations influencing litterfall decomposition and thus C-balance in the soil is the composition of the plant organisms (Barantal et al., 2014; Magill and Aber, 2000).

Plants uptake nitrogen in forms of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$ . The transformation of inorganic nitrogen into a structure beneficial to the plant relies on the decomposition of organic material by microorganisms. Bonding of N and mineralization are carried out microbially in soil system. Particularly in ecosystem conditions where the N amount is high, the management of immobilization processes requires an unstable carbon source. Soil pH also takes a significant role in nitrogen mineralization (Qualls et al., 1991). Whereas the soil C / N ratio is a significant indicator of soil quality and nutritional balance, it also impacts the quality of soil pH, nutrient, aggregation and humic matter (Jiang et al., 2018; Zhang et al., 2011). The solubility of organic matter in the soil, the production of organic carbon, and its mobility depend, especially in sandy soils, on the chemical composition of organic materials and the C/N ratio of them. On top of this fact, mineralization of soil organic matter increases soil carbon stock and regulates  $\text{CO}_2$  emissions which have critical significance in terms of climate change (Ostrowska and Porębska, 2015; Silveira et al., 2011). Litterfall decomposition, microbial N fixation and decomposition of parent material also affect N accumulation in soil. This deposition, however, creates an imbalance along with the profile in N distribution that differs as per different soil depths (Andres, 2019; Houlton et al., 2018; Morford et al., 2016).

The main source of P is decomposition process of bedrock. However, in the short term, litterfall decomposition also affects the amount of P (Xia et al., 2015). While the amount of P is generally low in older soils, several studies have also revealed that the P content of soil increased with forest age (Frizano et al., 2002; Zarin and Johnson, 1995). By decreasing both leaf area index and photosynthesis rate of leaves, P deficiency obviously influences photosynthetic performance of plants. It also has an indirect effect on symbiotic and asymbiotic N fixation phase in roots (Augusto et al., 2013; Gough et al., 2010; Ise and Moorcroft, 2010; Pourhassan et al., 2016; Zhong et al., 2020). N accumulation stimulates plant development and facilitates P uptake of plants (Deng et al., 2016).

Determination of stoichiometric variations in litterfall and soil contributes to ecosystem's sustainable management by offering knowledge on ecosystem's working mechanisms. In several studies contradictory findings regarding the change (increase or decrease) of the C, N, and P stocks corresponding to soil depth were reported (Chen et al., 2016; Makineci, 2005; Qiao et al., 2020; Tashi

et al., 2016; Ward et al., 2016). Different results gained in several studies raise the ambiguity concerning soil C-N-P stoichiometry. It is therefore essential to ascertain whether correlations between C-N-P and soil depth in broadleaf forests change and, how if it happens. This research assessed distribution of the soil C-N-P stoichiometry in three soil depths (0–10, 10–20, and 20–30 cm) and litterfall C-N-P stock in deciduous broadleaf mixed forests in the Erzurum region. The soil depth and C, N, and P ratios in soil were assumed to vary in this ecosystem, and the factors causing the spatial variation in soil concentrations of C, N, and P accepted as not differing between levels of soil depth.

## MATERIALS AND METHODS

### Research Area

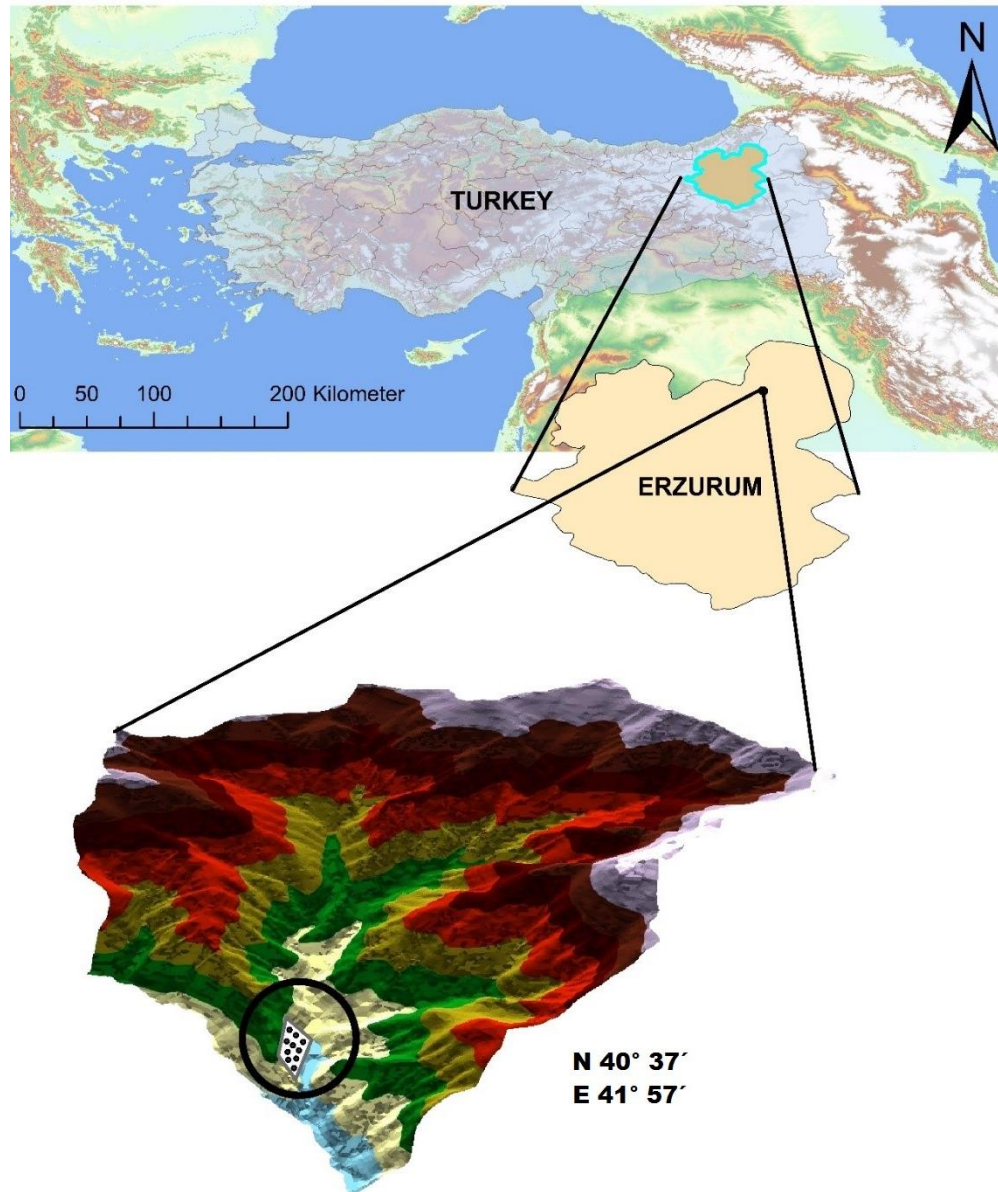
This study was carried out in a deciduous forest area with broadleaf trees in the Erzurum - Oltu region (Turkey) (40 ° 37 'N, 41° 57' E). The altitude of the experimental area from sea level varies between 1760 m and 1820 m with a mean of 1790 m. The mean slope gradient in the experimental area is 40% and the mean exposure is northeast. For sampling, an area of approximately 1.5 hectares representing a mixed forest was defined (Figure 1). Height and exposure variation in the basin where the research area is situated generates the development of microclimatic areas. The research area, which can be characterized as the semi-arid, low humidity climate type, and its annual precipitation mean is 390.5 mm. The annual mean temperature is 9.9 °C, and the coldest month is January (-3.6 °C) while the hottest month is august (22.5 °C). The dominant soil type in the study area is Brown Earth soil formed on Oligocene gypsiferous marl sediment. Dominant tree species are European Hophornbeam (*Ostrya carpinifolia* Scop.) and Sypirensis Oak (*Quercus macranthera* subsp. *sypirensis* (K.Koch) Menitsky). According to the stand canopy classification, the area is in the "very dense forest" (>70%) class.

### Sampling and laboratory analysis

The pH of the soils was measured in 1: 2.5 soil-water suspension with a glass electrode and the electrical conductivity value was determined as dS m<sup>-1</sup> with an electrical conductivity meter (FAO, 2020). Organic matter content was determined by the modified Walkey-Black (Chapman and Pratt, 1962), soil texture by Bouyoucos hydrometer (Gee et al., 1986) and lime content according to the Scheibler calcimeter method (Allison and Moodie, 1965). Bulk density was estimated using the cylinder method. Undisturbed soil samples were taken using a steel cylinder 5 cm high and 5 cm in diameter (98.125 cm<sup>3</sup>).

The litterfall and soil sampling were taken from 10 locations and three samples were taken from each location. Litterfall samples were collected as mixed from 0.25 m<sup>2</sup> areas (50cm x 50cm). In addition to the disturbed soil samples collected from a depth of 0-30 cm indicating the areas where litterfall sampling was conducted, steel cylinder were used to assess the bulk density at 3 soil depths (0-10 cm, 10-20 cm, 20-30 cm) from each sample point for undisturbed soil samples. The litterfall and soil samples gathered were delivered to the laboratory and fully prepared for analysis. The ambient temperature and moisture content at sampling was determined via the Hobo MX1101 data logger. Using a computer program called ArcMap 10.5, slope, exposure and height of the sampling area were determined. The litterfall samples were dried for 48 hours in an oven at 70 °C and their moisture contents and oven-dry weights were measured. It was then pulverized (<100 mm) for analysis. The soil samples were washed from roots and stones, dried in the oven at 105 °C for 24 hours, and sifted through a 2 mm sieve. It was also sifted through a 0.25mm sieve for C, N, and P analysis. C and N concentration in litterfall and soil samples were measured in the Leco CHNS-932 elementary chemical analyzer using a combustion element analysis. The soil and litterfall samples were carefully combined for the assessment of the P

concentration, weighing approximately 0.3 grams from each sample for the purpose of analysis. Then, in the Milestone Ethos Up brand microwave machine, the burning process needed for analysis was conducted. 3 ml of nitric acid, 1 ml of hydrogen peroxide, and 6 ml of hydrochloric acid were added to the litterfall samples. Soil samples are left in a microwave for 1 hour after adding 9.9 ml of nitric acid and 0.1 ml of HF (Çomaklı and Bingöl, 2021). The samples were diluted 100 times with distilled water after these phases and the Agilent 7800 brand ICP-MS system was used to estimate their P concentrations. Also we calculated average molar ratios (C: N, C: P and N: P) of both the total soil and the litterfall.



**Figure 1.** The location of the research area

The following formula was used to calculate the stocks of soil organic carbon (SOC), soil total nitrogen (STN), and soil total phosphorus (STP) per hectare in soil (IPCC GPG 2003): (Example is given only for C)

$$\text{SOC (ton C ha}^{-1}\text{)} = [\text{SOC}] * \text{SBD} * \text{SD} * \text{SR} * 10^4$$

Where, SOC is organic carbon content (g C per kg soil), SBD is soil bulk density in  $\text{mg m}^{-3}$ , SD is soil depth in m, and SR is proportion of soil mass  $<2$  mm in the sample (1 -% skeleton rate), the conversion factor to adjust for the area was  $10^4$  ( $\text{m}^2 \text{ha}^{-1}$ ).

### Statistical analysis

In order to assess the distribution and concentrations of C, N, and P at various soil depths (0-10 cm, 10-20 cm, 20-30 cm), the SPSS 20.0 software was used to evaluate non-parametric tests. Depth-dependent changes in C, N, and P amounts were determined by regression analysis while the degree of bivariate analysis between C, N, and P was determined with the help of Nonparametric Spearman rank-correlation coefficients analysis.

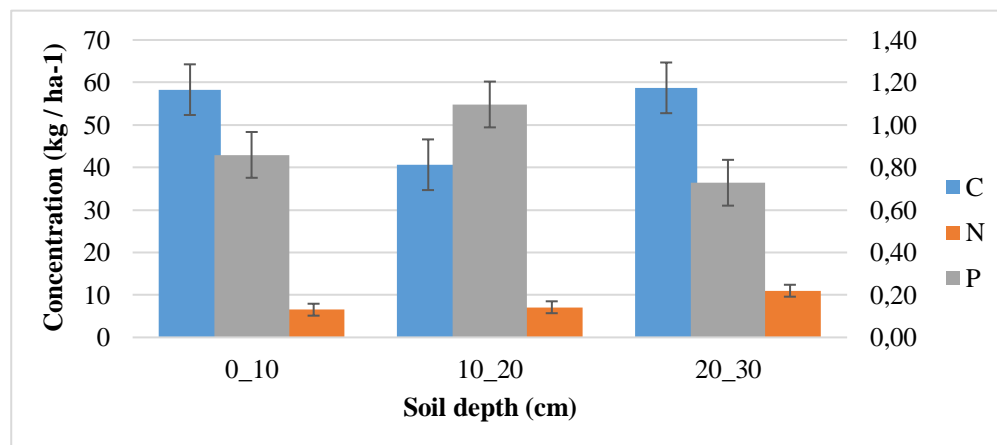
## RESULTS AND DISCUSSION

The soils of the research area are sandy loam (SL) textured and containing 3.79% organic matter, on the average (Table 1). The soils are 'moderately alkaline' and 'slightly calcareous' without salinity problem.

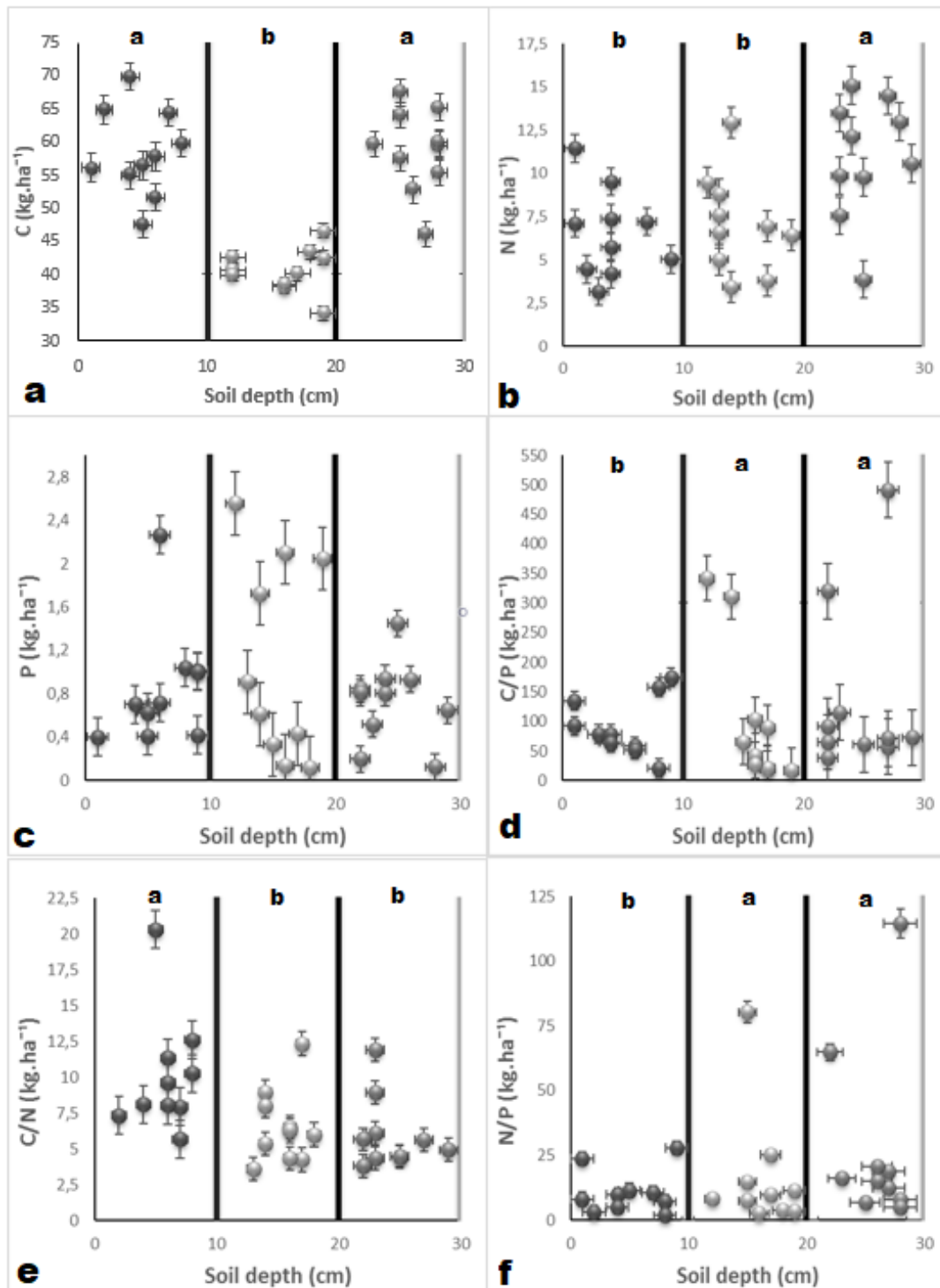
**Table 1.** Some soil characteristics of the research area

Sand %	Silt %	Clay %	Texture class	pH	Organic matter %	EC $\text{dS m}^{-1}$	$\text{CaCO}_3$ %
72.5	20.8	6.7	SL	8.33	3.79	0.092	1.10

The C: N ratios at 0-10 cm, 10-20 cm, and 20-30 cm depths were determined as  $10.12 \text{ kg ha}^{-1}$ ,  $6.55 \text{ kg ha}^{-1}$  and  $6.02 \text{ kg ha}^{-1}$  respectively, while the C: P ratios as  $90.89 \text{ kg ha}^{-1}$ ,  $103.62 \text{ kg ha}^{-1}$  and  $140.62 \text{ kg ha}^{-1}$ , and the N: P ratios as  $10.89 \text{ kg ha}^{-1}$ ,  $16.69 \text{ kg ha}^{-1}$  and  $28.23 \text{ kg ha}^{-1}$  respectively (Table 3 and Figure 2). The C, N, and P concentrations were  $52.56 \text{ kg ha}^{-1}$ ,  $8.20 \text{ kg ha}^{-1}$ , and  $0.90 \text{ kg ha}^{-1}$ , respectively. C content decreased dramatically at 0-20 cm soil depth but increased again at 20-30 cm soil depth. The mean scores of SOC concentrations were  $58.31 \text{ kg ha}^{-1}$  at 0-10 cm depth,  $40.64 \text{ kg ha}^{-1}$  at 10-20 cm depth, and  $58.74 \text{ kg ha}^{-1}$  at a depth of 20-30 cm. Similar to C concentrations, P concentrations decreased at 0-20 cm and increased again at 20-30 cm of soil depth. While the P concentration mean scores were  $0.86 \text{ kg ha}^{-1}$  at 0-10 cm depth,  $1.10 \text{ kg ha}^{-1}$  at 10-20 cm depth, and  $0.73 \text{ kg ha}^{-1}$  at a depth of 20-30 cm, no increases were observed in N concentrations depending on soil depth. Depending on the depth levels, N concentration mean scores were reported as  $6.52 \text{ kg ha}^{-1}$ ,  $7.09 \text{ kg ha}^{-1}$  and  $10.98 \text{ kg ha}^{-1}$  respectively. While the ratios C:N and C:P did not change substantially based on the depth, the ratios N:P rose with the depth of the soil (Figure 3).



**Figure 2.** Variation of C-N-P mean concentrations according to soil depth levels



**Figure 3.** Vertical distributions of C (a), N (b), and P (c) and the ratios of C: P (d), C: N (e), and N: P (f) at different soil depths (0-10 cm, 10–20 cm, and 20–30 cm). Different lower case letters in the boxes suggest differences among different depths ( $P < 0.05$ ).

Considering three soil depth levels, the correlation coefficient ( $r$ ) between C and N decreased slightly from 0,34 (0–10 cm) and 0,27 (10–20 cm) to 0,20 (20–30 cm). The  $r$  between N and P concentrations decreased from 0.27 (0-10 cm) to 0.13 (20-30 cm). Likewise, the  $r$  value between the C and P concentrations decreased to 0.18 (20-30 cm) from 0.41 (0-10 cm) (Table 2).

**Table 2.** Correlation coefficients of C-N-P at different soil depth levels

		C			N			P		
		0-10	10-20	20-30	0-10	10-20	20-30	0-10	10-20	20-30
C	0-10	1								
	10-20	-0,49	1							
	20-30	0,03	0,04	1						
N	0-10	0,58	-0,47	0,05	1					
	10-20	-0,72	0,52	-0,18	-0,63	1				
	20-30	-0,22	0,55	0,44	0,06	-0,13	1			
P	0-10	-0,64	0,72	0,18	-0,52	0,70	0,33	1		
	10-20	-0,08	0,54	-0,19	-0,25	0,34	0,19	0,51	1	
	20-30	0,62	-0,27	-0,42	0,02	-0,23	-0,36	-0,28	0,45	1

**Table 3.** C-N-P concentrations and their ratio in different depth levels (kg ha<sup>-1</sup>)

Variable	0–10 cm	10–20 cm	20–30 cm	Mean
C	58.31 ± 6.62a	40.64 ± 5,95b	58.74 ± 6.29a	<b>52.56± 10.15</b>
N	6.52 ± 2.55b	7.09 ± 2.83b	10.98 ± 3.43a	<b>8.20± 3.50</b>
P	0.86 ± 0.55	1.10 ± 0.92	0.73 ± 0.38	<b>0.90± 0.65</b>
C:N*	10.12 ± 4.11a	6.55 ± 2.62b	6.02 ± 2.52b	<b>7.56± 2.51</b>
C:P*	90.89 ± 49.29b	103.62 ± 121.34a	140.62 ± 154.32a	<b>111.71± 20.65</b>
N:P*	10.89 ± 8.51b	16.69 ± 23.33a	28.23 ± 34.83a	<b>18.60± 13.21</b>

Significant differences between soil depths are shown in different lower case letters (P < 0.05) after mean ± standard deviation (SD). \* The values given are the ratios of the averages.

The C, N, and P stocks in the 0-30 cm depth level of soil were determined as 157.68 tons ha<sup>-1</sup>, 24.60 tons ha<sup>-1</sup> and 2.68 tons ha<sup>-1</sup>, respectively. Concentrations of C, N, and P in litterfall were estimated to be greater than soil concentrations between 1 and 5 times. The amount of litterfall was calculated as 21.7 tons ha<sup>-1</sup>. The litterfall's mean amount of C was 27%, N was 6%, and P was only 1%. The mean scores of C, N and P amounts in the litterfall were determined as 5.9 tons ha<sup>-1</sup>, 1.3 tons ha<sup>-1</sup>, and 0.2 tons ha<sup>-1</sup>, respectively. As a change in C-N-P stocks in soil (0-30 cm) and litterfall samples were taken from the research area was analyzed, it was observed that the C and N stocks in the soil exhibited less variability than the C and N stocks in the litterfall. So, it was concluded that C and N stocks in the soil are more important. However, when the amount of P was examined, it was noticed that the P stock value in the litterfall was lower than in the soil. In this situation, while the amount of P stock in the soil (2.68 tons ha<sup>-1</sup>) was higher than the stock in litterfall, the P stock value in litterfall could be deemed more significant (Table 4). That's being said, P concentrations change depending on the change of microbial activity in the litterfall (Ilg et al., 2009).

**Table 4.** C-N-P stocks in soil layer (0-30 cm) and litterfall (ton ha<sup>-1</sup>)

	n	Mean	Min.	Max.	S.D.	Cv
<b>Soil C stock</b>	10	157.68	139.08	171.39	8.79	5,6
<b>Litterfall C stock</b>	10	5.90	2.87	10.77	2.23	37,8
<b>Soil N stock</b>	10	24.60	18.38	30.12	3.97	16,1
<b>Litterfall N stock</b>	10	1.34	0.82	2.19	0.50	37,3
<b>Soil P stock</b>	10	2.68	0.88	4.56	1.42	53,0
<b>Litterfall P stock</b>	10	0.24	0.11	0.36	0.07	29,2

The soil pools of C, N, and P and their stoichiometric properties play a vital role in maintaining the sustainability of ecosystems. Since the C, N, and P pools in the soil are both vast and vulnerable to



environmental influences in terrestrial ecosystems, detecting changes in these pools can promote adaptation to climate change by helping to the sustainable management of the ecosystem (Bui and Henderson, 2013; L. Liu et al., 2020; Reysers et al., 2017; Tipping et al., 2016).

N concentrations increased as the mean C concentrations increased depending on soil depth. This could be explained by the fact that the N dynamics of soil play an essential part in controlling C retention over the long term (Liu et al., 2018; Luo et al., 2004; Rastetter et al., 1997). Once more, decreasing P concentrations with increasing N concentrations depending on depth showed a negative correlation. As a result, by promoting P uptake and plant formation, N accumulation leads to a decline in soil P concentrations.

The C-N ratio varies drastically depending on forest type, management, and environmental factors. C-N ratio in soil and litterfall is one of the significant indicators of soil productivity and soil organic matter. The ratio of C: N that ranges from 12 to 16 suggests that the organic matter is well degraded. C: N ratios below 10 generally were observed in subsoil. (Bui and Henderson, 2013; Paul, 2015; Rayment and Higginson, 1992; Zeller et al., 2000). Besides, at values below 15, the litterfall is decomposed by oxidation, therefore, carbon is emitted into the air as CO<sub>2</sub> (Kantarci, 2000). C: N ratios in the soil of the research area were greater than 10 at some points, but the mean score was less than 10. On the other hand, the mean score of this ratio was 4 in the litterfall. Decreases in this ratio could be an indicator of increased soil degradation (Sarıyıldız et al., 2020). It may also be attributable to the season in which the sampling was carried out. Indeed, the C: N ratio may be lower in forest areas in the dry season compared to the rain season. (García-Oliva et al., 2006).

The C:P ratio of soil and litterfall also offers details on the origins and condition of decomposition of organic matter. Generally, the condition of C: P <200 is explained by net mineralization, while the C: P > 300 refers to net immobilization. C: P between 200 and 300 refers to the change in soluble P concentrations (Paul, 2015). High C:P ratios also suggest the net immobility of nutrients (Bui and Henderson, 2013; Güsewell and Verhoeven, 2006). In this research, this ratio ranged between 514 and 20 in the soil, with a mean of 112. In the litterfall, this ratio was 39.1. Commonly, when the ratio of C: P is >100, phosphorus is immobilized by microorganisms. Yet again, the change in the C: P ratio is considered to be a result of the high carbon and low phosphorous intake combination by microorganisms.

N and P concentrations and stoichiometry are the main limitations for plant development in terrestrial environments. In general, the N:P mass ratio of less than 14 indicates that plant growth is restricted to N, while the N:P mass ratio of greater than 16 signifies that plant growth is restricted to P (Koerselman and Meuleman, 1996; Xie et al., 2019). The mean N: P ratios were higher than 16 in this research, suggesting that the possible P limit for plant growth is found in the area under examination. However, this value was lower than 14 at the 0-10 cm depth level. This situation could be explained by washing away. Moreover, to analyze the scale of change with time, long-term analysis is needed.

N and P content generally affects productivity. The amounts of N and P in litterfall potentially suggest productivity. This increases the organic matter input into the soil. (Tang et al., 2018; Wu et al., 2018). C and N in the soil are highly dependent on the physical and chemical properties and composition of the litter. Also, the N contribution to the soil is impacted by litterfall, which is the primary source of soil organic matter (Song et al., 2016). In the compilation work conducted to measure the amount of organic carbon in forest soils in Turkey, the weighted mean of carbon for mixed forests was estimated as 161.4 tons ha<sup>-1</sup> and soil organic carbon stock was calculated as 158.6 tons ha<sup>-1</sup> (Tolunay and Çömez, 2007). Although there are several studies on the stock status of nutrients (especially carbon) in forest

environments, the subject remains unclear due to the lack of sufficient research on whether C-N-P stoichiometry changes according to parameters such as age, soil depth and climate.

## CONCLUSION

The findings of this study clearly indicated that forests could be a tool to be used as a mechanism for mitigating climate change in the short and long term. In particular, the positive correlation between the C-N ratios and the decrease in this ratio depending on the depth is an important factor that is taken into account. Also; C: P needs to be evaluated in long-term follow-up studies as it can be indicative of nutrient limitation in a forest. Policies need to be established that recognize the carbon accumulation capacity of forests which are the primary sources of carbon storage when establishing forest ecosystem management and silviculture implementations. In order to bond more carbon to forest soils, it is essential to improve the conditions particularly in disturbed forest areas, increase effective afforestation and prevent soil erosion. Particularly for forest ecosystems, there is no standard soil nutrient stoichiometry. In this sense, it is possible to consider C: N: P stoichiometries as an indication of ecosystem nutrient constraints, soil degradation and drought.

## Conflict of Interest

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

## Author's Contributions

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

## REFERENCES

- Allison LE, Moodie CD (1965) Carbonate. In: Black et al. (eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2, Agronomy*, American Society of Agronomy, Wisconsin.
- Alberti, G., Vicca, S., Inghima, I., Belelli-Marchesini, L., Genesio, L., Miglietta, F., Cotrufo, M. (2015). Soil C:N stoichiometry controls carbon sink partitioning between above-ground tree biomass and soil organic matter in high fertility forests. [Soil C:N stoichiometry controls carbon sink partitioning between above-ground tree biomass and soil organic matter in high fertility forests]. *iForest - Biogeosciences and Forestry*, 8(2), 195-206. doi:10.3832/ifer1196-008
- Andres, E. G. (2019). Interactions between Climate and Nutrient Cycles on Forest Response to Global Change: The Role of Mixed Forests. *Forests*, 10(8). doi:ARTN 609 10.3390/f10080609
- Augusto, L., Delerue, F., Gallet-Budynek, A., & Achat, D. L. (2013). Global assessment of limitation to symbiotic nitrogen fixation by phosphorus availability in terrestrial ecosystems using a meta-analysis approach. *Global Biogeochemical Cycles*, 27(3), 804-815.
- Barantal, S., Schimann, H., Fromin, N., & Hättenschwiler, S. (2014). C, N and P fertilization in an Amazonian rainforest supports stoichiometric dissimilarity as a driver of litter diversity effects on decomposition. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1796), 20141682.
- Bui, E. N., & Henderson, B. L. (2013). C: N: P stoichiometry in Australian soils with respect to vegetation and environmental factors. *Plant and Soil*, 373(1-2), 553-568.
- Chapman, H. D., & Pratt, P. F. (1962). *Methods of analysis for soils, plants and waters*. *Soil Science*, 93(1), 68.
- Chen, L. Y., Li, P., & Yang, Y. H. (2016). Dynamic patterns of nitrogen: Phosphorus ratios in forest soils of China under changing environment. *Journal of Geophysical Research-Biogeosciences*, 121(9), 2410-2421. doi:10.1002/2016jg003352
- Çomaklı, E., & Bingöl, M. S. (2021). Heavy metal accumulation of urban Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) plantation. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(4), 1-13. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-08921-6>

- Deng, M., Liu, L., Sun, Z., Piao, S., Ma, Y., Chen, Y., . . . Li, P. (2016). Increased phosphate uptake but not resorption alleviates phosphorus deficiency induced by nitrogen deposition in temperate *Larix principis-rupprechtii* plantations. *New Phytologist*, 212(4), 1019-1029.
- FAO. 2020. Soil testing methods – Global Soil Doctors Programme - A farmer-to-farmer training programme. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca2796en>
- Frizano, J., Johnson, A. H., Vann, D. R., & Scatena, F. N. (2002). Soil Phosphorus Fractionation during Forest Development on Landslide Scars in the Luquillo Mountains, Puerto Rico 1. *Biotropica*, 34(1), 17-26.
- García-Oliva, F., Lancho, J. F. G., Montano, N. M., & Islas, P. (2006). Soil carbon and nitrogen dynamics followed by a forest-to-pasture conversion in western Mexico. *Agroforestry Systems*, 66(2), 93-100.
- Gee, G. W., Bauder, J., & Klute, A. (1986). Methods of soil analysis, part 1, physical and mineralogical methods. *Soil Science Society of America, American Society of Agronomy*.
- Gough, C. M., Vogel, C. S., Hardiman, B., & Curtis, P. S. (2010). Wood net primary production resilience in an unmanaged forest transitioning from early to middle succession. *Forest Ecology and Management*, 260(1), 36-41.
- Gülçur, F. (1974). Toprağın Fiziksel ve Kimyasal Analiz Metodları, İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Yayınları. *İ. Ü. Yayın*(1970).
- Güsewell, S., & Verhoeven, J. T. (2006). Litter N: P ratios indicate whether N or P limits the decomposability of graminoid leaf litter. *Plant and Soil*, 287(1-2), 131-143.
- Houlton, B. Z., Morford, S. L., & Dahlgren, R. A. (2018). Convergent evidence for widespread rock nitrogen sources in Earth's surface environment. *Science*, 360(6384), 58-+. doi:ARTN aan4399 10.1126/science.aan4399
- Hu, Y. L., Zeng, D. H., Fan, Z. P., Chen, G. S., Zhao, Q., & Pepper, D. (2008). Changes in ecosystem carbon stocks following grassland afforestation of semiarid sandy soil in the southeastern Keerqin Sandy Lands, China. *Journal of Arid Environments*, 72(12), 2193-2200. doi:10.1016/j.jaridenv.2008.07.007
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2003. Good Practice Guidance for Land Use, Land-Use Change and Forestry. Institute for Global Environmental Strategies, Hayama .<http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp> .
- Ilg, K., Wellbrock, N., & Lux, W. (2009). Phosphorus supply and cycling at long-term forest monitoring sites in Germany. *European journal of forest research*, 128(5), 483-492.
- Ise, T., & Moorcroft, P. R. (2010). Simulating boreal forest dynamics from perspectives of ecophysiology, resource availability, and climate change. *Ecological research*, 25(3), 501-511.
- Jackson, M. (1958). Soil chemical analysis.,(Constable & Co Ltd: London).
- Jiang, Y.-F., Zhong, S., Li, J., Wang, L.-K., & Guo, X. (2018). [Spatial and Temporal Variability of Soil C-to-N Ratio of Yugan County and Its Influencing Factors in the Past 30 Years]. *Huan jing ke xue= Huanjing kexue*, 39(3), 1386-1395. doi:10.13227/j.hjcx.201706186
- Jobbagy, E. G., & Jackson, R. B. (2001). The distribution of soil nutrients with depth: Global patterns and the imprint of plants. *Biogeochemistry*, 53(1), 51-77. doi: 10.1023/A:1010760720215
- Kantarçı, D. (2000). *Toprak İlimi* (2 ed.). İstanbul: İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Yayınları.
- Koerselman, W., & Meuleman, A. F. (1996). The vegetation N: P ratio: a new tool to detect the nature of nutrient limitation. *Journal of applied Ecology*, 1441-1450.
- Lal, R. (2009). Sequestering Carbon in Soils of Arid Ecosystems. *Land Degradation & Development*, 20(4), 441-454. doi:10.1002/ldr.934
- Liu, L., Zhang, L., Pan, J., Niu, J., Yuan, X., Hu, S., . . . Deng, B. (2020). Soil CNP pools and stoichiometry as affected by intensive management of camellia oleifera plantations. *PloS one*, 15(9), e0238227.
- Liu, X., Yang, T., Wang, Q., Huang, F., & Li, L. (2018). Dynamics of soil carbon and nitrogen stocks after afforestation in arid and semi-arid regions: A meta-analysis. *Science of the Total Environment*, 618, 1658-1664.

- Luo, Y., Su, B., Currie, W. S., Dukes, J. S., Finzi, A., Hartwig, U., . . . Parton, W. J. (2004). Progressive nitrogen limitation of ecosystem responses to rising atmospheric carbon dioxide. *Bioscience*, 54(8), 731-739.
- Magill, A. H., & Aber, J. D. (2000). Dissolved organic carbon and nitrogen relationships in forest litter as affected by nitrogen deposition. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(5), 603-613.
- Makineci, E. (2005). Sapsız Meşe (*Quercus petrea* (Matlusch) Lieb.) Baltalık Ormanında Aralamaların Çap Artımı ve Bazı Toprak Özelliklerine Etkileri. *Türkiye Ormanlık Dergisi*, 6(2), 1-10.
- Morford, S. L., Houlton, B. Z., & Dahlgren, R. A. (2016). Geochemical and tectonic uplift controls on rock nitrogen inputs across terrestrial ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles*, 30(2), 333-349. doi:10.1002/2015gb005283
- Ostrowska, A., & Porębska, G. (2015). Assessment of the C/N ratio as an indicator of the decomposability of organic matter in forest soils. *Ecological Indicators*, 49, 104-109.
- Paul, E. A. (2015). *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry* (4 ed.). London: Elsevier Inc.
- Pourhassan, N., Bruno, S., Jewell, M. D., Shipley, B., Roy, S., & Bellenger, J.-P. (2016). Phosphorus and micronutrient dynamics during gymnosperm and angiosperm litters decomposition in temperate cold forest from Eastern Canada. *Geoderma*, 273, 25-31.
- Qiao, Y., Wang, J., Liu, H. M., Huang, K., Yang, Q. S., Lu, R. L., . . . Xia, J. Y. (2020). Depth-dependent soil C-N-P stoichiometry in a mature subtropical broadleaf forest. *Geoderma*, 370. doi:ARTN 114357 10.1016/j.geoderma.2020.114357
- Qualls, R. G., Haines, B. L., & Swank, W. T. (1991). Fluxes of dissolved organic nutrients and humic substances in a deciduous forest. *Ecology*, 72(1), 254-266.
- Rastetter, E. B., Ågren, G. I., & Shaver, G. R. (1997). Responses of N-limited ecosystems to increased CO<sub>2</sub>: A balanced-nutrition, coupled-element-cycles model. *Ecological Applications*, 7(2), 444-460.
- Rayment, G., & Higginson, F. R. (1992). *Australian laboratory handbook of soil and water chemical methods*: Inkata Press Pty Ltd.
- Reyserhove, L., Muylaert, K., Vanoverberghe, I., & Decaestecker, E. (2017). Synergistic effects of dual parasitism in *Daphnia magna* under nutrient limitation. *Belgian Journal of Zoology*, 147(1).
- Sarıyıldız, T., Parlak, S., & Tanı, M. (2020). Bursa-Karacabey subasar ormanlarının kavak ve fıstıkçanı plantasyonlarına dönüştürülmesinin toprak karbon ve azot stoklarına etkisinin araştırılması. *Ağaç ve Orman*, 1(1), 28-35.
- Silveira, M. L., Reddy, K. R., & Comerford, N. B. (2011). Litter decomposition and soluble carbon, nitrogen, and phosphorus release in a forest ecosystem. *Open J Soil Sci*, 1, 86-96.
- Song, Q.-n., Ouyang, M., Yang, Q.-p., Lu, H., Yang, G.-y., Chen, F.-s., & Shi, J.-M. (2016). Degradation of litter quality and decline of soil nitrogen mineralization after moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) expansion to neighboring broadleaved forest in subtropical China. *Plant and Soil*, 404(1-2), 113-124.
- Tan, Q. Q., & Wang, G. A. (2016). Decoupling of nutrient element cycles in soil and plants across an altitude gradient. *Scientific Reports*, 6. doi:ARTN 34875 10.1038/srep34875
- Tang, Z., Xu, W., Zhou, G., Bai, Y., Li, J., Tang, X., . . . Xiong, G. (2018). Patterns of plant carbon, nitrogen, and phosphorus concentration in relation to productivity in China's terrestrial ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(16), 4033-4038.
- Tashi, S., Singh, B., Keitel, C., & Adams, M. (2016). Soil carbon and nitrogen stocks in forests along an altitudinal gradient in the eastern Himalayas and a meta-analysis of global data. *Global Change Biology*, 22(6), 2255-2268.
- Tipping, E., Somerville, C. J., & Luster, J. (2016). The C: N: P: S stoichiometry of soil organic matter. *Biogeochemistry*, 130(1-2), 117-131.
- Tolunay, D., & Çömez, A. (2007). *Orman Topraklarında Karbon Depolanması ve Türkiye'deki Durum*. Paper presented at the Küresel İklim Değişimi ve Su Sorunlarının Çözümünde Ormanlar, İstanbul.

- Wang, X. Y., Ma, Q. L., Jin, H. J., Fan, B. L., Wang, D. B., & Lin, H. L. (2019). Change in Characteristics of Soil Carbon and Nitrogen during the Succession of *Nitraria Tangutorum* in an Arid Desert Area. *Sustainability*, 11(4). doi:ARTN 1146 10.3390/su11041146
- Ward, S. E., Smart, S. M., Quirk, H., Tallowin, J. R., Mortimer, S. R., Shiel, R. S., . . . Bardgett, R. D. (2016). Legacy effects of grassland management on soil carbon to depth. *Global Change Biology*, 22(8), 2929-2938.
- Wu, A.-P., Liu, J., He, F.-F., Wang, Y.-H., Zhang, X.-J., Duan, X.-D., . . . Qian, Z.-Y. (2018). Negative relationship between diversity and productivity under plant invasion. *Ecological research*, 33(5), 949-957.
- Xia, S.-W., Chen, J., Schaefer, D., & Detto, M. (2015). Scale-dependent soil macronutrient heterogeneity reveals effects of litterfall in a tropical rainforest. *Plant and Soil*, 391(1-2), 51-61.
- Xie, J., Fang, H., Zhang, Q., Chen, M., Xu, X., Pan, J., . . . Zhang, L. (2019). Understory Plant Functional Types Alter Stoichiometry Correlations between Litter and Soil in Chinese Fir Plantations with N and P Addition. *Forests*, 10(9), 742.
- Yang, Z. P., Baoyin, T., Minggagud, H., Sun, H. P., & Li, F. Y. (2017). Recovery succession drives the convergence, and grazing versus fencing drives the divergence of plant and soil N/P stoichiometry in a semiarid steppe of Inner Mongolia. *Plant and Soil*, 420(1-2), 303-314. doi:10.1007/s11104-017-3404-9
- Zarin, D. J., & Johnson, A. H. (1995). Nutrient accumulation during primary succession in a montane tropical forest, Puerto Rico. *Soil Science Society of America Journal*, 59(5), 1444-1452.
- Zechmeister-Boltenstern, S., Keiblinger, K. M., Mooshammer, M., Penuelas, J., Richter, A., Sardans, J., & Wanek, W. (2015). The application of ecological stoichiometry to plant-microbial-soil organic matter transformations. *Ecological Monographs*, 85(2), 133-155. doi:10.1890/14-0777.1
- Zeller, B., Colin-Belgrand, M., Dambrine, E., Martin, F., & Bottner, P. (2000). Decomposition of 15 N-labelled beech litter and fate of nitrogen derived from litter in a beech forest. *Oecologia*, 123(4), 550-559.
- Zhang, C., Wang, Z., Ju, W., & Ren, C. (2011). Spatial and temporal variability of soil C/N ratio in Songnen plain maize belt. *Huan jing ke xue= Huanjing kexue*, 32(5), 1407-1414.
- Zhong, Z., Zhang, X., Wang, X., Dai, Y., Chen, Z., Han, X., . . . Wang, X. (2020). C: N: P stoichiometries explain soil organic carbon accumulation during afforestation. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 1-17.

**Atf İçin:** Bozkurt SG, 2022. Kentleşmenin Safranbolu (Karabük)'nun Kültürel Peyzaj Değişimi Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 476-488.

**To Cite:** Bozkurt SG, 2022. Investigation of the Impact of Urbanization on the Cultural Landscape Change of Safranbolu (Karabuk). Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 476-488.

## **Kentleşmenin Safranbolu (Karabük)'nun Kültürel Peyzaj Değişimi Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi**

Selvinaz Gülçin BOZKURT

**ÖZET:** Safranbolu ilçesi Osmanlı dönemine ait geleneksel yapıları ve şehir dokusu ile sit alanı ilan edilmiş ülkemizin nadir yerleşimlerinden biridir. Bu özelliklerinden dolayı alan UNESCO tarafından 1994 yılında kültürel miras alanı olarak Dünya Miras Listesine alınmıştır. Ancak son yıllarda küresel değişimin hızla artması, kentleşme hareketleri, endüstrileşme faaliyetleri, turizm talepleri, nüfus artışı ve ekonomik kaygılar alanın yapısal ve kültürel açıdan giderek değişmesine neden olmuştur. Bu nedenle bu çalışmada kentleşmenin artmasının Safranbolu'nun kültürel peyzaj değişimi üzerindeki etkisi incelenmeye değer görülmüştür. Çalışmada Safranbolu'nun kentleşmesi ve buna bağlı olarak kültürel peyzaj değişiminin analizi yerinde yapılan gözlem ve incelemeler ile alanın kültürel peyzaj kriterlerine uygunluğu değerlendirilerek yapılmıştır. Bu değerlendirmede alan; estetik, sanatsal, sosyal, bilimsel, tarih ve arkeoloji ile kimlik değerleri açısından incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda Safranbolu'da sit alanları dışında ki yerleşim alanlarında geleneksel dokudan giderek uzaklaşıldığı ve kültürel peyzajın da değişime uğradığı sonucu elde edilmiştir. Bu değişimin çoğunlukla kimlik, sosyal ve sanatsal değerler açısından yaşandığı belirlenmiştir. Sonuç olarak çalışmada kültürel mirasımızın en önemli alanlarından biri olan Safranbolu'nun bir bütün olarak, kültürel peyzaj değerlerinin korunması ve gelecek nesillere aktarılması gerektiğinin önemi vurgulanmış ve buna yönelik öneriler getirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kentleşme, kültürel peyzaj, kültürel peyzaj değişimi, Safranbolu

## **Investigation of the Impact of Urbanization on the Cultural Landscape Change of Safranbolu (Karabük)**

**ABSTRACT:** Safranbolu district is one of the rare settlements of our country, which has been declared a protected area with its traditional structures and urban texture from the Ottoman period. Due to these features, the area was included in the World Heritage List by UNESCO in 1994 as a cultural heritage site. However, the rapid increase in global change in recent years, urbanization movements, industrialization activities, tourism demands, population growth and economic concerns have caused the area to change in terms of structural and cultural aspects. For this reason, in this study, the effect of increasing urbanization on the cultural landscape change of Safranbolu was considered worth examining. In the study, the urbanization of Safranbolu and the analysis of the cultural landscape change were made by evaluating the compliance of the area with the cultural landscape criteria with on-site observations and examinations. The area in this evaluation; It has been examined in terms of aesthetic, artistic, social, scientific, history and archeology with identity values. As a result of the examinations, it was concluded that the traditional texture was gradually moved away from the settlement areas outside the protected areas in Safranbolu and the cultural landscape was also changed. It has been determined that this change is mostly experienced in terms of identity, social and artistic values. As a result, in the study, the importance of protecting the cultural landscape values of Safranbolu, which is one of the most important areas of our cultural heritage, as a whole, and transferring them to future generations has been emphasized and suggestions have been made for this.

**Keywords:** Urbanization, cultural landscape, cultural landscape change, Safranbolu

Selvinaz Gülçin BOZKURT ([Orcid ID: 0000-0003-0775-2005](https://orcid.org/0000-0003-0775-2005)), Fenerbahçe Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, İç Mimarlık ve Çevre Tasarımı Bölümü, İstanbul, Türkiye

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Selvinaz Gülçin BOZKURT, e-mail: [sbozkurt00@gmail.com](mailto:sbozkurt00@gmail.com), [gulcin.bozkurt@fbu.edu.tr](mailto:gulcin.bozkurt@fbu.edu.tr)

## GİRİŞ

Ülkemizde kentleşme hareketlerinin artmasının en önemli sebebi 1950 yılında başlatılan sanayi devrimidir. Nitekim bu dönemden önce kırsal alanlardan kentsel alanlara göç oldukça sınırlı iken bu dönemden sonra büyük fabrikaların ve sanayi kuruluşlarının artmasıyla birlikte kente göç hızlanmıştır. Kentleşme, her ne kadar kent sayısının artması ve kentlerde yaşayan nüfusun artmasını ifade etse de, kentleşme olayının incelenmesinde, kentlerdeki nüfus artışlarının veri olarak alınması, kentleşme olgusunun sadece bir nüfus artışı olarak görüldüğü izlenimi verebilir. Oysa kentleşme, sanayileşmeye ve ekonomik gelişmeye bağlı olarak kent sayısının artması, mevcut kentlerin büyümesine yol açan, toplumda artan ranta iş bölümü ve uzmanlaşma yaratan, insan davranış ve ilişkilerinde kentlere özgü değişikliklere yol açan bir nüfus birikim sürecidir (Keleş, 1997). Bu süreç korunması gereken kültürel peyzajları da tehdit etmeye başlamış ve bu alanların korunması gerektiği bilinci, Dünya’da ve ülkemizde giderek yaygınlaşmıştır.

Kültürel peyzajlar sadece ait oldukları milletler için değil tüm insanlık için önemli ve paha biçilemez değerlerdir. Bu alanların özgün niteliklerinin bozulması veya kaybolması dünyanın bütün toplumlarının değerlerinin yok olmasına neden olur. Bu nedenle kültürel peyzaj kavramı uluslararası bir öneme sahiptir. İnsanlık tarihi, doğa ve kültürler arasında süre giden ilişkilerin birikimidir. Doğanın insan tarafından değiştirilmesi tarımın başlamasıyla birlikte belirginleşmiştir. İnsanoğlunun etkisinin görüldüğü ve şekillendirdiği alanlar basit anlamıyla kültürel peyzajlar olarak tanımlanabilir. IUCN’ye göre kültürel peyzajlar; kültürel ve doğal kaynakları ve bu bağlamda yaban hayatı ve evcil hayvanları içeren, tarihi bir olay ve bir etkinlikle birlikte anılan ya da çeşitli kültürel ve estetik değerler sergileyen coğrafi alanlar olarak tanımlanmaktadır. Aslında tüm peyzajların kültürel öğeleri vardır. Çünkü tüm bu alanlar insan eliyle oluşmuş eserleri, öğeleri içerirler. Ancak, bir alanın “kültürel peyzaj” alanı niteliği kazanması için doğa/insan birlikteliğinin zaman içerisinde önemli ürünler vermesi ve bu ürünlerin uyum içerisinde olması gerekmektedir (Özsüle, 2005). Dünyanın farklı bölgelerinde ve oldukça geniş bir çeşitliliğe sahip olan kültürel peyzajlar, kültür ve doğal çevre arasındaki karşılıklı etkileşimle zaman içinde değişen, değer kazanan ve bu nedenle doğal, kültürel, görsel, anlamsal nitelikleriyle ifade edilebilen alanlardır. Bazı kültürel peyzajlar doğal değerlerini (örn. biyolojik çeşitlilik gibi) sürdürürken, bazıları sanatsal ve tarihsel değerleriyle ön plana çıkmaktadır. Tarihi çok eski zamanlara dayanan tarımsal amaçlı yapılan teraslamalar, halk yapı sanatının ortaya koyduğu geleneksel konutlar, kutsal mekanlar, bahçeler ve örneklerini artırabileceğimiz birçok kültürel peyzajlar insanoğlunun sosyokültürel gelişiminin, yaratıcılığının ve ruhsal zenginliğinin yansımasıdır ve ortak kimliğimizin parçalarını oluşturmaktadır.

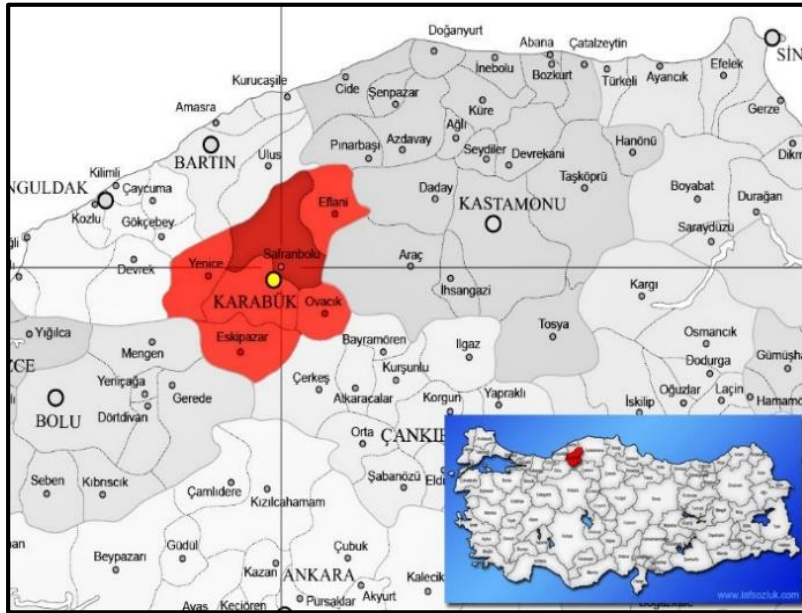
“Günümüzde gittikçe önemli bir kavram haline gelen kültürel peyzaj kavramı, peyzajların sahip olduğu değeri anlamak ve değerlendirmek açısından önem taşımaktadır” (Arkun, 2012). “Kültürel peyzaj, ülkemizde henüz yeterince yerleşmiş bir kavram olmamasına rağmen dünyada son yıllarda giderek artan bir öneme kavuşmuştur” (Özsüle, 2005). “Ülkemizin sahip olduğu kültürel peyzaj değerleri açısından bakıldığında tarihi, arkeolojik, estetik, sembolik, sanatsal gibi özellikleri ile ön plana çıkan alanların oldukça fazla olduğu görülmektedir” (Arkun, 2012). Ancak tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de bu değerler gün geçtikçe azalmakta veya değişime uğramaktadır. Özellikle son yıllarda yaşanan köklü ve hızlı değişimler kültürel peyzajları negatif yönde etkilemiştir (Antrop, 2004, 2005; Plieninger&Bieling, 2012). Bununla birlikte değişimin, kültürel peyzajların bugünkü yapısının oluşmasında da rol oynadığı görülmektedir (Fairclough, 2003, 2006). Önemli olan kültürel peyzajın karakterini zayıflatmayacak ve kimlik değerlerini bozmayacak bir hızda değişime izin verilmesidir. Buradaki önemli nokta değişim ile muhafaza arasındaki dengenin iyi kurulmasıdır (Roberts, 1994;

Fairclough, 2003; Lozny, 2006; Plieninger&Bieling, 2012; Taylor vd., 2015). Safranbolu ilçesi de özellikle geleneksel konut mimarisinin yansıtıldığı, tarihi ve kültürel kent dokusuna sahip önemli bir kültürel peyzaj alanıdır. Ancak tüm dünyada olduğu gibi çalışmaya konu olan Safranbolu ilçesinde de gerek nüfus artışı ve kentleşme faaliyetleri, gerekse de turizm faaliyetlerinin giderek artması alanın doğal ve kültürel değerlerini tehdit eder boyuta ulaşmıştır. Bu nedenle bu çalışma kapsamında Safranbolu'nun kültürel peyzaj değerlerinin belirlenmesi ile kültürel peyzaj değişiminin ortaya konulması amaçlanmıştır ve bu değişimin önlenmesine yönelik öneriler getirilmiştir.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Bu çalışmanın ana materyalini Safranbolu ilçesi ve ilçenin kültürel peyzaj değerleri oluşturmaktadır. Coğrafi olarak Safranbolu, Batı Karadeniz Bölgesi'nde Karabük iline bağlı bir ilçe olup Karabük merkeze 8 km uzaklıktadır. Safranbolu, 1013 km<sup>2</sup> yüzölçümü ile ilin en büyük ilçesi konumundadır. İlçede rakım; en alçak noktasında 300 m, en yüksek noktasında 1750 m'dir. 41-15 kuzey enlemi ile 32-41 doğu boylamında içerisinde yer alan Safranbolu; Ulus (Bartın), Eflani (Karabük), Araç (Kastamonu), Ovacık ve Yenice (Karabük) ilçelerine komşudur (Anonim, 2017) (Şekil 1).



Şekil 1. Safranbolu ilçesinin Türkiye'deki konumu (Anonim, 2009)

Safranbolu ilçesinde sıcak ve ılıman bir iklim görülmektedir. En kurak aylarda bile yağış miktarı oldukça fazladır. İlçenin yıllık ortalama sıcaklığı 12.8 °C olup yıllık ortalama yağış miktarı 597 mm'dir (Anonim, 2021). İlçede farklı vejetasyon tipleri görülmektedir. Kuzey kesimlerinde yaprak döken ormanlar, orta kesimlerde ise çam (*Pinus sp.*) ve meşe (*Quercus sp.*) ormanları hakimdir. Kanyon içlerinde ve güney kesimlerde ise Akdeniz iklim tipine uygun bitkisel elemanlar görülmektedir. İlçenin batı kesiminde yer alan Sarıçiçek bölgesinde ise köknar ormanları bulunmaktadır (Sarı ve Ören, 2016). Safranbolu'nun en önemli bitki türü ilçeye adını veren safran (*Crocus sativus*) bitkisidir. Alan jeolojik olarak farklı büyüklükteki kanyonlara da ev sahipliği yapmaktadır. Bunların başlıcaları; Tokatlı, Sırçalı, Düzce ve Sakaralan Kanyonlarıdır (Şekil 2). İlçedeki en önemli akarsular; Araç Çayı, Soğanlı Çayı ve Ovacıma Deresi'dir. Safranbolu ilçesinin nüfusu 2019 yılı verilerine göre 68 440'dır. 2007 verilerine göre 49821 olan nüfusun giderek arttığı görülmektedir (Anonim, 2020).



Alan coğrafi konumu nedeniyle tarih boyunca yerleşime konu olmuş, idari ve ticari bir merkez olma özelliği ile öne çıkmıştır. Tarihsel geçmişine bakıldığında alanda sırası ile Hititler, Frigler, dolaylı yoldan Lidyalılar, Persler, Helenistik Krallıklar (Pondlar), Romalılar, Selçuklular, Çobanoğulları, Candaroğulları ve Osmanlılar egemenlik kurmuşlardır. Safranbolu, 1196 tarihinde Selçuklu Sultanı II. Kılıç Arslan'ın oğlu Muhiddin Mesut Şah zamanında Türklerin eline geçmiştir. 1402 ve 1423 yılından itibaren de Osmanlıların egemenliğine girmiştir (Anonim, 2008). 14. yüzyılın başlarından itibaren Türklerin hakimiyetinde olan Safranbolu, 18. yüzyılda Asya ve Avrupa arasındaki ticaretin önemli bir merkezi olmuştur. Türk kentsel tarihinin bozulmamış bir örneği olan şehir, geleneksel kent dokusu, ahşap yığma evleri ve anıtsal yapılarıyla bir bütün olarak kentsel sit alanı ilan edilmiş ender kent yerleşmelerinden birisi (Albayrak, 2013) olup UNESCO Dünya Miras Komitesi'nin hazırladığı Dünya Miras Listesi'nde 1994 tarih ve 614 sıra numarası ile kayıtlıdır (Şekil 2).



Şekil 2. Safranbolu'dan bir görünüm (Orjinal, 2020)

Safranbolu'nun tarihi dokusu Çarşı, Kıranköy ve Bağlar olmak üzere 3 bölgeye ayrılmıştır. Bu bölgelerden Çarşı ticaretin yoğun olarak yapıldığı şehir merkezi konumundaki yerleşim yeridir. Bu alanın etrafı tepelerle çevrili olduğundan rüzgârlara karşı korunaklıdır. Bu sayede kışın soğuktan olumsuz etkilenmez ancak yazın sıcak olur. Bu nedenle XIX. yüzyıldan itibaren daha serin ve yaylaların olduğu Bağlar bölgesine yazlığa gidilmiştir (Günay, 1989). Kıranköy Mevkii ise, tarihi süreçte genellikle gayrimüslim halkın yerleştiği bir alan olmuştur. Safranbolu'nun çok eski zamanlardan itibaren yerleşim yeri olmasının nedenleri araştırıldığında coğrafi ve topografya unsurlarının etkisi dikkat çekmektedir. Yörenin su kaynakları bakımından zengin olması, toprak yapısının tarıma elverişli olması, çevresinde ormanların bulunması yerleşik hayata olanak sağlamıştır (Yazıcıoğlu, 1982 ve Kuban, 2001).

Safranbolu, tipik bir Osmanlı kenti özelliği göstermekte olup Han-Hamam-Cami-Çarşı'nın bir arada bulunduğu bir yerleşim alanıdır. Sokaklar çarşı doğrultusunda açılmakta, çarşının orta yerinde de, kıymetli eşyaların satıldığı, bedesten bulunmaktadır. Arazinin durumuna göre çarşı çukur yerlere, evler ise birbirinin manzarasını engellemeyecek biçimde yamaçlara konumlandırılmıştır. Kentin muhtelif kesimlerinde cami yer almaktadır ancak kentin en önemli camii daima kentin merkezinde bulunmakta bu cami etrafında dükkânlar sıralanmaktadır (Tuncel, 1980). Nitekim Eski Safranbolu'da hemen tüm caddeler, şehrin merkezi durumundaki Cinci Hanı, İzzetpaşa ve Köprülü Camileri, Yeni Hamam ve Kazdağlı Camii, Arasta dükkânları ile pazaryerinin olduğu bölgeye doğru açılmaktadır (Hacısalihoğlu, 1995).

Safranbolu çarşısı, Osmanlı ekonomik düzeninin ve Lonca denilen esnaf kuruluşlarının yönetimindeki ticaret biçimlerinin hüküm sürdüğü dönemlere ait somut örneklerle sahiptir: Köprülü Mehmet Paşa Camii avlusuna bitişik *yemeniciler arastası* bu konudaki en tipik örnektir (Ulukavak, 1976).

Safranbolu'nun kültürel miras kaynakları içinde en çekici olanları ise geleneksel Safranbolu evleridir. Safranbolu evleri, 18 ve 19 yy. Türk toplumunun geçmişini, kültürünü, ekonomisini, yaşama biçimini ve teknolojisini yansıtan en önemli örneklerden biridir. Ulaşımın sınırlı olması nedeniyle geleneksel yaşamını diğer bölgelere oranla daha sıkı dolayısıyla daha uzun süre korumuştur. Evler sokağın doğal çizgisini izleyen yüksek bir duvar üzerine kurulmuştur. İslam geleneklerine göre ev yaşantısı dışarıya gösterilmez. Bu gelenek sonucu evlerin giriş katlarının taş duvarları penceresiz olarak üst kat tabanına kadar yükselmekte onun üzerinde ise başka bir düzen gelişmektedir. Üst kat çıkmalı ve bol pencerelidir (Günay, 1989). Safranbolu evi en güzelinden özgün bir barınma ve konfor modeli olduğu kadar, aynı zamanda bir ekonomik işletmedir. Kapalı aile ekonomisinin özelliklerini taşır. Çarşı'daki evler kışlık besin, Bağlar'daki ise yazlık besin üretimi için donatılmıştır (İnce, 1976). Böylece, eğimli arazide dar sokaklarla birbirine yaklaşan fakat biri diğerini gölgelemeyen, ahşap, taş ve kerpicing kullanıldığı iki-üç katlı, ataerkil aile yapısına uygun çok sayıda odası olan, çatısı eğimli ve oluklu kiremit örtülü, büyük-konak görünümlü evler ortaya çıkmıştır (Özdemir, 2007). Kent, Türk kültürünün ve mimarisinin bir zirvesini oluşturduğu için, mimaride yeni tarz aranmamış ve 1940'lara kadar fazla değişikliğe uğramadan bakım ve onarımlarla günümüze kadar koruna gelmiştir (Somuncu ve ark., 2009). Safranbolu Belediyesi verilerine göre alanda somut kültürel miras olarak 105 adeti çeşme olmak üzere, sayıları 1360'a ulaşan ve "Korunması Gerekli Taşınmaz Kültür Varlığı" olarak tescil edilmiş yapı bulunmaktadır (Anonim, 2008).

## Yöntem

Bu çalışma kapsamında uygulanan yöntem aşamaları;

1. Konu ve araştırma alanı ile ilgili verilerin taranması ve toplanması,
2. Edinilen bilgiler doğrultusunda alanın kültürel peyzaj öğelerinin tespit edilmesi (Safranbolu Belediyesi veya diğer kaynaklardan edinilen bilgiler doğrultusunda), yerinde yapılan gözlem ve incelemeler ile ilgili öğelerin fotoğraflanması,
3. Alanın 1936, 1968, 1990 ve 2010 yıllarına ait imar planlarının incelenmesi (Alanın imar planları daha önce alanla ilgili olarak yapılmış çalışmalardan elde edilmiştir (Yetiş vd., 2018)) ve kentsel sit alanı sınırlarının ne ölçüde etkilediğinin belirlenmesi,
4. Araştırma alanının Arkun (2012)'un belirlediği kültürel peyzaj kriterleri kapsamında analizinin yapılması (Bu aşamada bu kriterlere bağlı olarak alanın geçmiş ve günümüz fotoğrafları ile yerel halkın anlatımları etkili olmuştur)

Buna göre bir alanın kültürel peyzaj kriterleri şu şekilde sınıflandırılmıştır.

- a) *Estetik Değer*: Bir alanın manzara değeri, görünümü, doku ve form özellikleri o alanın estetik değerini belirler.
- b) *Kimlik Değeri*: Kimlik, bir nesnenin veya objenin diğerlerinden farklılığı, özgünlüğü ve tekliği ile ayrılmasını belirlemeye yarayan özelliklerin bütünüdür. Her kentin de bir kimliği vardır. Kentsel kimlik, bir kenti tanımlayan ve diğerlerinden ayıran belirleyici nitelikteki bileşenlerin ve kentin karakteristik özelliklerinin bütünüdür (Şahin, 2008).
- c) *Sanatsal Değer*: "Ingerson'a (2003) göre kentlerde yoğunlaşan, kültür ve sanat eylemleri, kentsel dokunun oluşmasında başlıca etmenlerden biridir. Resim ve heykel, ahşap, taş, alçı, oymacılık ve süsleme sanatları, vitray, cam, mozaik vb. yapılarda ve çevre oluşumunda kullanılan sanat dallarıdır" (Tunçer, 2008).

- d) *Tarihi ve Arkeolojik Değer*: Bir bölgede yaşanan efsaneler, savaşlar, tarihi olaylar ve tarihe geçmiş kişiler o bölgenin tarihi ve arkeolojik değerini oluşturur.
- e) *Sosyal Değer*: Bir bölgenin gelenek ve görenekleri, dini tutum ve davranışları, etnik yapısı ve geleneksel el sanatları gibi toplumsal ortak davranışları, o bölgenin sosyal değerlerini oluşturur.
- f) *Bilimsel Değer*: Alanın doğal, kültürel ve sosyoekonomik özelliklerinden dolayı araştırma potansiyeli içermesi ve bu nedenle mimarlık, edebiyat, resim, ve heykel gibi sanat dallarına olan katkısı o alanın bilimsel değer taşıdığını gösterir.

5. Alanda meydana gelen kentleşmenin kültürel peyzajlar üzerindeki etkisinin nedenlerinin ve sonuçlarının ortaya konulması ve alanın korunmasına yönelik önerilerin getirilmesi şeklindedir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Safranbolu'nun Kültürel Peyzaj Ögeleri

Alanı kültürel peyzaj ögeleri açısından değerlendirdiğimizde; Safranbolu Tablo 1'de görüldüğü gibi özellikle Osmanlı geleneksel konut mimarisi ile tanınmaktadır. Bunun yanı sıra bu yapıların haricinde alanı temsil eden bir diğer önemli değer ise ilçeye adını veren ve doğal bir peyzaj ögesi olan Safran (*Crocus sativus*) bitkisidir (Şekil 3). Bu iki değer alanın en önemli peyzaj ögelerini oluşturmaktadır.

**Tablo 1.** Safranbolu'nun en önemli kültürel peyzaj ögeleri

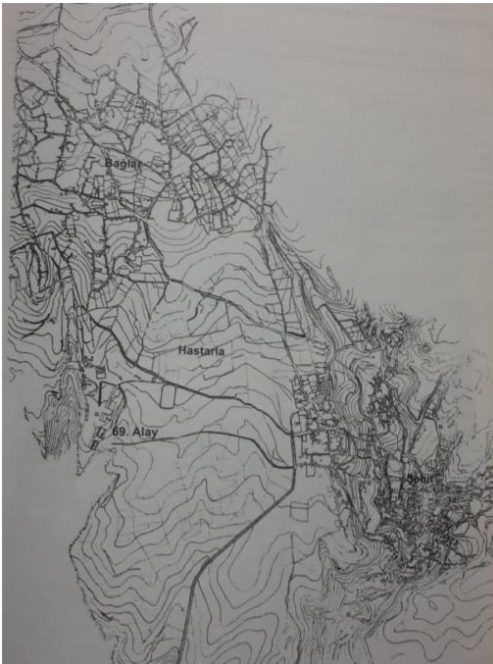
Yapı Adı	Yapım Tarihi	Mevcut durumu
Kazdağlı Camii	1779	Tescilli
Safranbolu Saat kulesi	1794-1797	Tescilli
İzzet Mehmet Paşa Camii	1796	Tescilli, Restore edilmiş
Rum Hamamı	Bilinmiyor	Tescilli, Restorasyonu devam ediyor
Eski Hamam	Bilinmiyor	Tescilli
Rum Erkek Okulu	1863	Tescilli, Restore edilmiş
Ulu Camii	1872	Tescilli, Restore edilmiş
Eski Camii	Bilinmiyor	Tescilli, Restore edilmiş
Taş Minareli Camii	Bilinmiyor	Tescilli
Kabasofta Camii	1873	Tescilli
Lütfiye Camii	1878-1879	Tescilli
Rum Kız Okulu	1881	Tescilli, Restore edilmiş
Frenge ve Gureba Hastanesi	1890	Tescilli, Restorasyonu devam ediyor
Müftühanı Camii	1800'ler	Tescilli
Cephane/Eski Cezaevi Binası	1890-1906	Tescilli
Eski Hükümet Konağı-Kent Tarihi Müzesi	1904-1906	Tescilli, Restore edilmiş
Köyiçi Camii	1905-1907	Tescilli
Hidayetullah Camii	1719	Tescilli, Restore edilmiş
Dağdelen Camii	1767-1768	Tescilli
Kaçak (Lütfiye) Camii	1878-1879	Tescilli
Köyiçi Ortaokulu	1915	Tescilli
Safranbolu Belediye Binası	1922	Tescilli, Restore edilmiş
Tabakhane Deri Fabrikası	1924-1925	Tescilli-Metruk halde
Kavaklar Camii	1945	Tescilli
Köprülü Mehmet Paşa Camii	1661	Tescilli, Restorasyonu devam ediyor
Safranbolu Kalesi	Bilinmiyor	Temel duvarları mevcut
Cinci Han	1645	Tescilli, Restore edilmiş
Cinci Hamam	1645	Tescilli, Restore edilmiş
Yemeniciler Arastası	1661	Tescilli, Restore edilmiş
Küçük ve Büyük Göztepe Tümülüsü	Bilinmiyor	Tescilli



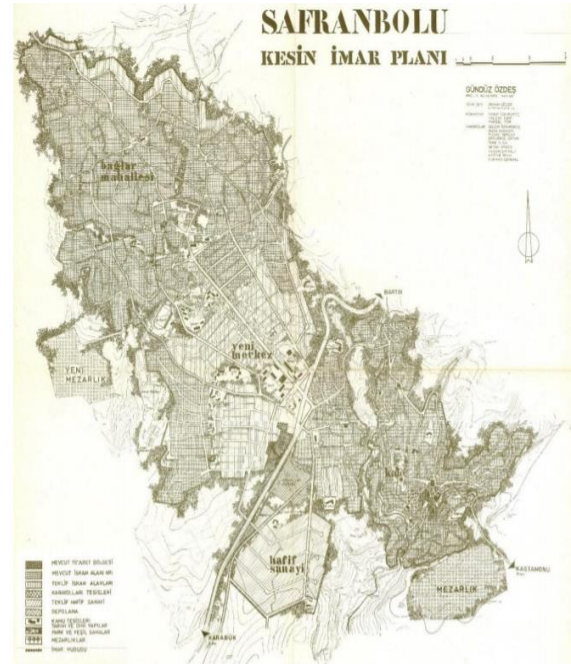
Şekil 3. Safranbolu'da kültürel peyzaj öğeleri (Orijinal, 2020)

### Safranbolu'nun Kültürel Peyzaj Değişimi Üzerinde Kentleşmenin Etkisi

İlçenin kentsel gelişimi incelendiğinde 1936'dan 1968'e kadar geçen sürede alanda uygulanan imar planı hareketleri kentleşmeyi artırmıştır (Şekil 4-a,b). İlçenin ilk imar planı 1936 yılında yapılmıştır. Bu tarihten itibaren ilçenin tarihi yerleşim alanları dışındaki mahallelerde çeşitli tipolojilerde işçi konutları inşa edilmeye başlamıştır. Bağlı olduğu Karabük'te kurulacak olan Demir-Çelik Fabrikası'nın yeni konut ihtiyacını karşılamak amacıyla tarihi merkezlerin etrafındaki boş alanlar imara açılmıştır. Karabük'e açılan demir-çelik fabrikası insanların yaşam standartlarını değiştirmiş ve bu değişim geleneksel konutlar üzerinde de dönüştürücü bir etki yaratmıştır. Özellikle Emek ve Hüseyin Çelebi Mahallesi'ndeki çok katlı yapılaşmalar bu değişimin somut bir göstergesi olmuştur. Safranbolu'da bu tarihlerden sonra kentleşme hızı giderek artmaya başlamış, özellikle işçi ve memurlar için tek, iki, üç katlı konutlar inşa edilmeye başlamıştır. Hatta tarihi yapıların yanlarına bu yapılarla hiçbir şekilde uyum göstermeyen yapılar yapılarak alanın geleneksel dokusundan giderek uzaklaşmıştır (Şekil 5).



a.1936 yılında Safranbolu kentsel gelişimi (Ongun, 1936 ve Kuş, 2009; Yetiş vd., 2018).



b.1968 yılı Nazım İmar Planı (İller Bankası, 1968; Yetiş vd., 2018).

Şekil 4. Safranbolu'nun 1936 ve 1968 İmar Planları



Şekil 5. Safranbolu'da geleneksel dokudan giderek uzaklaşıldığını gösteren yapılaşmaya bir örnek (Orijinal, 2021)

Bu yeni gelişmeler ile birlikte aynı dönemde “Bağlar mevkiinde geleneksel ev tipolojisinden mekânsal olarak uzaklaşamayan ancak çağdaş yapım teknikleri ile yapılan konutlara da rastlanmıştır. Apartman tipolojisine bürünen bu yapılar Safranbolu’da II. Dönem Yapıları olarak literatüre girmiştir (Aktüre ve Şenyapılı, 1976)” (Şekil 6).



Şekil 6. Safranbolu'da geleneksel yapı tipolojisini taklit eden müstakil yapılar (Orijinal, 2021)

1936 İmar Planının ardından hazırlanan 1968 ve 1981 tarihli imar planlarında ise Safranbolu, Karabük ile birlikte ele alınmıştır. “1968 İmar Planının en önemli katkısı kooperatifleşme yoluyla konut yapımını teşvik etmesidir” (Çabuk ve ark., 2016). 1968 yılında alanda tarihi dokunun korunması gerektiği bilinci oluşmuş ve 1975 yılında başlayan koruma faaliyetleri, kentin geleneksel dokusunun korunması kaygısı ile şekillenen bir imar planı yapılması gerektiğini düşündürmüştür. Ancak ilçedeki yerleşim alanı ihtiyacının artması nedeni ile 1990 ve 2010 yılındaki Koruma Amaçlı İmar Planları uygulanıncaya kadar geçen sürede, doğal, arkeolojik ve kentsel sit alanları çevresinde kentin silüetini değiştiren yapılaşmalar meydana gelmiştir (Şekil 7, a-b). Bu durum özellikle korunması gereken kültürel peyzaj alanlarını tehdit etmeye başlamıştır. Bu dönemde Yenimahalle ve Emek Mahallesi çeşitli işçi konutları ve apartman blokları yapılmıştır (Şekil 8). 2010 tarihinde yapılan İmar Planında da sit alanlarının etrafına “Etkileme Geçiş Alanı” tanımlanmış ve bu tarihten itibaren kent hızla yapılaşmıştır (Şekil 7-b). Bu yapılaşma genellikle gelenekseli taklit eden bir yapılaşma şeklinde olmuştur. Bu durum kentleşmenin artmasına ve dolayısıyla kültürel peyzajın da değişmesine neden olmuştur.



dokusuyla uyumlu olmayan bir kentsel görünüm kazanmasına ve dolayısıyla kültürel peyzajın değişmesine neden olmuştur.

### Kentleşme Etkisi Sonucu Safranbolu'nun Kültürel Peyzaj Kriterleri Kapsamında Analizi

Çalışma kapsamında araştırma alanının kültürel peyzaj kriterlerine göre analizi Arkun (2012)'a göre yapılmıştır. Buna göre alanı estetik açıdan değerlendirdiğimizde; alanda çoğunlukla Osmanlı dönemine ait yapıların olduğu bilinmektedir. Bu yapılar dönemin estetik anlayışını yansıtan tasarımlardır. Bu yapılardan en önemlileri Tablo 1'de verilmiş olup pek çoğu günümüze kadar korunarak gelmiştir. Bu yapıların çevresinde bulunan açık alanlardaki ağaçlar ve donatı elemanları alanın estetik değerine katkı sunmaktadır.



Şekil 9. Safranbolu'nun estetik değerine katkı sunan ahşap donatı elemanları (Orjinal, 2021)

Alanı kimlik değeri açısından değerlendirdiğimizde; Safranbolu'nun çok eski tarihlerden itibaren yerleşime konu olması alan için önemli bir kimlik değeri oluşturmaktadır. Bu yapılardan Kent Tarihi Müzesi olarak kullanılan alan ile Saat Kulesi, Cinci Han, Yemeniciler Arastası alan için önemli bir kimlik değeri taşımaktadır. (Şekil 10).



Şekil 10. Safranbolu'nun kimlik değeri taşıyan önemli yapıları; Kent tarihi müzesi ile saat kulesi ve geleneksel konutları (Orjinal, 2021)

Ancak 1950'li yıllardan itibaren başlayan kentleşme hareketleri ve tarihi dokuyla uyumsuz yapılaşma alanın kimlik değerini olumsuz yönde etkilemeye başlamıştır. Özellikle sit alanlarının çevresinde geleneksel konut dokusunun korunduğu ancak bu alanların dışındaki yerleşmelerde betonarme, çok katlı ve site şeklinde binaların yapıldığı, kültürel dokunun bozulduğu belirlenmiştir. Özellikle ilçenin yüksek kesimlerinden bakıldığında tarihi ve kültürel yapıların algılanmadığı çok katlı yapıların alana hakim olduğu gözlenmiştir (Şekil 11). Bu durum alanın kimlik değerini olumsuz yönde etkilemektedir.



Şekil 11.Safranbolu'nun estetik ve görsel açıdan değişimi (Orijinal, 2021)

İlçeyi tarihi ve arkeolojik açıdan değerlendirdiğimizde Safranbolu'nun paleolitik dönemden itibaren yerleşmeye konu olmuş bir alan olduğu görülmektedir. İlçe Hititlerden Roma'ya, Bizans'tan Osmanlı'ya değin birçok medeniyete ev sahipliği yapmış ve bu medeniyetlerin izlerini taşıyan bir yer olmuştur. Alanda bulunan höyükler, kaya mezarları ve kabartmalar geçmiş medeniyetlerin izlerini taşımaktadır. Arkeolojik sit alanı olarak korunan bu alanlar ilçenin Hacılar Obası, Sırçalı, Pelitören, Çavuşlar, Yukarı Çiftlik, Apadıgüney, Kuzyaka Öteköyünde yer almaktadır. Osmanlı döneminden kalma tarihi ve kültürel yapılar ise kentsel sit alanı olarak korunmaktadır. Tarihin birçok kültürel katmanını barındıran alan bu özellikleri nedeniyle çok önemli bir tarihi ve arkeolojik değere sahiptir.

Safranbolu'yu sosyal değer açısından incelediğimizde; alanda bulunan yapıların özellikle restore edilerek korunmaya alınmış (Cinci Han, Hamam, Yemenciler Arastası gibi) yapıların alanda yerleşmiş halk ve ülkemiz için önemli bir sosyal ve kültürel değer taşıdığı söylenebilir. İlçenin tarihi geçmişinde Osmanlı döneminde Kıranköy bölgesinde yaşamış olan Rumlar alanı sosyal, dini-etnik ve kültürel çeşitlilik açısından etkilemiş olsa da günümüzde bu durum yer almamaktadır. Bunun yanı sıra alan günümüzde gelişen ve değişen toplumsal yapımızın izlerini taşımaktadır. Özellikle alanda 20. yy'ın ikinci yarısından itibaren kalabalık aile yaşantısının terkedildiği ve çekirdek aile yaşantısına geçildiği görülmektedir. Ayrıca teknolojinin gelişmesine bağlı olarak alanda geleneksel el sanatlarından ahşap işleciliği, yemencilik, dericilik ve demircilik gibi el sanatlarının da giderek azaldığı hatta yok olmaya yüz tuttuğu tespit edilmiştir. Bu durum Safranbolu'nun gelenek ve göreneklerinden giderek uzaklaştığını ve sosyal değerlerinin kaybolduğunu göstermektedir.

Alanı sanatsal değer açısından incelediğimizde; özellikle Osmanlı dönemine ait birçok anıtsal ve sivil yapının halen sanatsal değerini koruyarak işleyişini sürdürdüğü görülmektedir. Bu yapılar yapıldıkları dönemin sanat anlayışı ve estetik duygusunu yansıttıkları için oldukça önemli bir değer taşımaktadır. Bu yapılarda dönemin ahşap ve cam işçiliği, oymacılığı, taş ustalığı ve süsleme sanatları görülmektedir. Ancak kentsel sit alanları dışında yöresel bu sanat ve zanaatlar yok olmuştur.

Safranbolu'yu bilimsel açıdan değerlendirdiğimizde alanın tarihi geçmişi, sosyokültürel çeşitliliği ve alanda bulunan geleneksel konutların yapım teknolojisi ilçeyi tarih, arkeoloji, sanat tarihi, sosyoloji, mimarlık ve peyzaj mimarlığı gibi birçok bilim dalı açısından önemli kılmaktadır. Bu nedenle alan günümüze kadar pekçok çalışma ve teze konu olmuştur.

## SONUÇ

Teknolojinin gelişmesi, sanayileşme ve nüfus artışı gibi etmenler dünyada olduğu gibi ülkemizde de kentleşmenin hızla artmasına neden olmaktadır. Bu durumda özellikle tarihi ve kültürel değerleriyle ön plana çıkan kültürel peyzajları tehdit etmektedir. Kültürel peyzajlar geçmişten günümüze insanların sosyokültürel gelişimi ile doğayı kendi amaçları doğrultusunda kullanmaları sonucunda ortaya çıkmış alanlardır. Bu alanlar tarihi, arkeolojik, sanatsal, bilimsel, işlevsel ve kültürel değerleri ile geçmiş ve günümüz arasında bir bağ kurmakta ve taşıdıkları önem nedeni ile korunması gereken alanlar olarak



nitelendirilmektedir. Safranbolu da özellikle geç Osmanlı dönemini yansıtan mimari, anısal, kültürel, tarihi ve sembolik yapıları barındırması nedeniyle UNESCO tarafından korunmaya alınmış bir alandır. Ancak son yıllarda ilçede özellikle kentleşmenin artmasına bağlı olarak korunan sit alanları dışındaki alanlarda hızlı bir değişim yaşanmakta, özellikle turizm ve endüstrileşmeye bağlı olarak artan nüfusun ihtiyaçlarını karşılamak için çok katlı konutların yapımı hız kazanmıştır. Bu durum alanın kültürel peyzajının da değişmesine neden olmuştur.

Araştırma kapsamında uygulanan yöntem ile Safranbolu'nun kültürel peyzaj öğelerinin tesbiti yapılarak alanın kültürel peyzaj kriterlerininin değişimi belirlenmiştir. Bu yöntem kapsamında yapılan değerlendirme sonucunda, ülkemizin önemli kültürel peyzaj öğelerini barındıran Safranbolu'nun, zengin tarih ve kültürel mirası ile bazı değerleri günümüze taşımış olduğu ancak bu değerlerin önemli bir kısmının da yitirdiği tespit edilmiştir. Özellikle alanda kimlik, sosyal ve sanatsal değerlerin büyük oranda değiştiği sonucuna varılmıştır. Safranbolu, ilçede yaşanan nüfus artışı, hızlı kentleşme, sanayileşme ve denetimsiz yapılaşmanın artması sürecinden olumsuz etkilenmiştir. Alanda koruma amaçlı bir imar planı yapılmış olsa da gün geçtikçe tarihi kent kimliği zedelenmiş ve eski geleneksel dokusunu kaybetmiştir. Kentin kimliğinin yaşatılabilmesi için kentin kültürel peyzaj alanlarının korunması, tarihi yapıların çevreleriyle birlikte değerlendirilmesi ve kentsel kalitenin yükseltilmesi gerekmektedir. Aksi takdirde kentler, kimliksiz mekânlar olmaktan öteye geçemeyecektir. Bir ülkeye değil tüm dünyaya mal olmuş ve birçok değere sahip olan Safranbolu gibi bir kültürel peyzaj alanının korunması, yaşatılması, geliştirilmesi ve sürdürülebilirliğinin sağlanmasına yönelik projeler oluşturulurken, alanın sorunları doğru tespit edilmeli ve bu sorunlara yönelik strateji, plan ve uygulamalar gerçekleştirilmelidir. Özellikle tüm dünyada ulusal kimliklerin korunmasının önemini anlaşıldığı bu süreçte Osmanlı medeniyetinin kültürel özelliklerinin mekân bulduğu ve bu izlerin yaşatıldığı bir alan olan Safranbolu'nun mutlaka korunması gerekmektedir. Bu nedenle alanda gerçekleştirilecek her türlü kentleşme, yapılaşma, restorasyon ve peyzaj tasarımı çalışmalarının alanın kültürel ve yapısal özellikleri dikkate alınarak estetik, kimlik, sanatsal, sosyal, bilimsel, tarihi ve arkeolojik değerlerini bozmayacak şekilde yapılmasına özen gösterilmelidir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmaya katkı sunan Fenerbahçe Üniversitesi İç Mimarlık ve Çevre Tasarımı bölümü öğrencisi, sevgili öğrencim Mehmet Ali Eken'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## KAYNAKLAR

- Anonim, 1968: (İller Bankası) Karabük-Safranbolu İmar Plan Etütleri, Ankara.
- Anonim, 2017: <https://www.safranboluevleri.net/safranbolunun-cografi-durumu/> [Erişim: 17-01-2021]
- Anonim, 2009: <https://www.google.com/search?q=safanbolu+il%C3%A7e+haritas>, [Erişim: 17-01-2021]
- Anonim, 2010: (Abad Proje Proje Yapı Turizm Sağlık Enerji San. ve Tic. A.Ş.) Safranbolu (Karabük) (Korumanın Başkenti) Koruma Amaçlı Revizyon + İlave Nazım ve Uygulama İmar Planı Araştırma Raporu.
- Anonim, 2021: <https://tr.climate-data.org/asya/tuerkiye/karabuek/safanbolu-8505/> [Erişim: 17-01-2021]
- Anonim, 2020: [https://www.nufusu.com/ilce/safanbolu\\_karabuk-nufusu](https://www.nufusu.com/ilce/safanbolu_karabuk-nufusu) [Erişim: 17-01-2021]
- Anonim, 2008: <https://www.tarihikentlerbirlii.org/wp-content/uploads/SAFRANBOLU.pdf>, [Erişim: 17-01-2021]
- Antrop M, 2004. Landscape Change and The Urbanization Process in Europe, Landscape and Urban Planning, 67(1), 9–26. [https://doi.org/10.1016/S0169-2046\(03\)00026-4](https://doi.org/10.1016/S0169-2046(03)00026-4)
- Antrop M, 2005. Why landscapes of The Past are Important for The Future, Landscape and Urban Planning, 70(1), 21–34. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2003.10.002>
- Aktüre S ve Şenyapılı T, 1976. Safranbolu'da Mekansal Yapının Gösterdiği Nitelikler ve Koruma Önerilerinin Düşündürdükleri, ODTÜ Mimarlık Fakültesi Dergisi, 2 (1).
- Albayrak A, 2013. Alternatif Turizm, Detay Yayıncılık, Ankara.

- Arkun AK, 2012. Ulus tarihi kent merkezi kültürel peyzaj öğelerinin değişimi ve dönüşümü, Yayınlanmamış Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Peyzaj Mimarlığı Anabilim Dalı, Ankara.
- Çabuk S, Demir K, Gökyer E, 2016. Cumhuriyet'in Yeni Kenti Karabük'ün 1937–1988 Dönemi Mekânsal Gelişimi ve Şehir Planları, Karabük Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi, Özel Sayı 2, (20-39).
- Fairclough G, 2003. Cultural Landscape, Sustainability and Living With Change, İçinde Jeanne Marşé Tettonico and Frak Meteo (ed) Managing chance: sustainable approaches to the conservation of the built environment proceedings (ss. 23–47). Philadelphia: Getty Publications.
- Fairclough G, 2006. A New Landscape for Cultural Managment Characterisation As A Management Tool, İçinde Landscape under pressure theory and practice of cultural heritage research and preservation Ludomir R. Lozny (Ed) (ss. 55–75). Springer.
- Günay R, 1989. Geleneksel Safranbolu Evleri ve Oluşumu, Kültür Bakanlığı Yay.No:456. Tanıtma Eserleri Dizisi No:23, İkinci Baskı, Ankara.
- Hacısalıhoğlu İY, 1995. Geleneksel Türk Şehri: Safranbolu, Türk Coğrafya Dergisi, Sayı:30, İstanbul, s.409-434.
- Ingerson AE, 2003. home.comcast.net/~jay.paul/landscapes.doc . Erişim: [23.02.2010].
- İnce Y, 1976. Safranbolu Tarihsel Kent Dokusunun Korunması, Türkiye Turing ve Otomobil Kurumu Belleteni, Sayı: 54/333, İstanbul, s.25-28.
- Keleş R, 1997. Kentleşme Politikası, İmge Kitabevi Yayınları, Ankara.
- Kuban D, 2001. Türkiye'de Kentsel Koruma Kent Tarihleri ve Koruma Yöntemleri, Tarih Vakfı Yurt Yayınları, İstanbul, s.187-209.
- Lozny LR, 2006. Landscape Under Pressure Theory and Practice of Cultural Heritage Research and Preservation. New York: Springer.
- Ongun BA, 1936. Safranbolu İmar Planı Raporu: Belediyeler Dergisi, 1 (11), 60-73.
- Özdemir Ü., 2007. Safranbolu'nun Kültürel Miras Kaynakları ve Korunması, Çeşme Ulusal Turizm Sempozyumu, (21-23 Kasım 2007), ss.129-142.
- Özsüle Z, 2005. Geleneksel Yerleşimlerin Korunmasının Kültürel Peyzaj Açısından Değerlendirilmesi, (Yayımlanmamış Doktora Tezi), İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
- Plieninger T & Bieling C, 2012. Resilience And The Cultural Landscape: Understanding And Managing Chance. Cambridge University Press.
- Roberts G, 1994. The Cultural Landscape, Landscape Research, 19(3), 133–136. <https://doi.org/10.1080/01426399408706442>
- Safranbolu Belediyesi Arşivi, (2016). 1990 yılı koruma imar planı.
- Sarı B ve Ören M, 2016. Safranbolu İlçesi (Karabük) Briyofit Florası, Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 2016, 16 (1): 157-168.
- Somuncu M, Yiğit T, Bölükbaşı-Ertürk E, 2009. "Safranbolu Raporu", İçinde: Türkiye'nin Dünya Miras Alanları-Koruma ve Yönetimde Güncel Durumlar, UNESCO Türkiye Milli Komisyonu Somut Kültürel Miras İhtisas Komitesi, s. 215-240, Ankara.
- Şahin P, 2008. Tarihi çevreleri koruma sürecinde yaşanan fiziksel ve sosyokültürel değişim, Ankara-Ulus Tarihi Kent Merkezi İstiklal Mahallesi Örneği, (Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi), Gazi Üniversitesi, Ankara, Türkiye.
- Taylor K, Clair A, & Mitcehell NJ, (2015). Conserving Cultural Landscape Challenges And New Directions. Routledge.
- Tuncel M, 1980. Türkiye'de Kent Yerleşmelerinin Tarihçesine Toplu Bir Bakış, İ.Ü. Coğrafya Enstitüsü Dergisi, Sayı:23, İstanbul, s.123-157.
- Tunçer M, 2008. Ankara'da kentsel kimlik oluşumu, değişimi, bu bağlamda kentsel koruma ve dönüşüm projeleri, Kent Kimliği, Mekansal-Kültürel Değişim Dosyası, Mimarlar Odası Ankara Şubesi, Ankara. <http://www.mimarlarodasiankara.org/dosya/dosya10-1.pdf>.
- Ulukavak K, 1976. Mimari Mirasının Korunması İstenen Bir Kent: Safranbolu, Bilim Birlik Başarı Dergisi, Yaşar Holding Yayını, İstanbul.
- Yazıcıoğlu H, 1982. Safranbolu, Safranbolu-Karabük-Ulus-Eflani, Özer Matbaası, 1. Baskı, Karabük.
- Yetiş R, 2016. Kentsel Sit Alanları Çevresinde Yer Alan Etkileme Geçiş Alanlarındaki Yeni Yapılaşmaların İrdelenmesi; Safranbolu Örneği: Yüksek Lisans Tezi, Karabük Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Karabük, (98-154).
- Yetiş R, Turcan Y, Dinçer AE, 2018. Safranbolu Kent Formunun Tarihsel Serüveni ve Morfolojik İnceleme, Türkiye Kentsel Morfoloji Araştırma Ağı II. Kentsel Morfoloji Sempozyumu, ISBN: 978-605-80820-1-4.

**Atf İçin:** Sahin Demirel A N, Yercan M, 2022. Organik Ürün Pazarındaki Tüketicilerde Organik Ürün Bilinci: İstanbul ve İzmir İlleri Örneği. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 489-501.

**To Cite:** Sahin Demirel A N, Yercan M, 2022. Organic Product Awareness among Consumers in the Organic Product Market: The Case of Istanbul and Izmir Provinces. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 489-501.

## **Organik Ürün Pazarındaki Tüketicilerde Organik Ürün Bilinci: İstanbul ve İzmir İlleri Örneği**

Ayça Nur ŞAHİN DEMİREL<sup>1\*</sup>, Murad YERCAN<sup>2</sup>

**ÖZET:** Bu araştırmada, organik ürün pazarına gelen tüketicilerin organik ürün bilincini ölçmek amaçlanmıştır. Bu amaç kapsamında, İzmir ve İstanbul'da ki organik ürün pazarlarında 271 tüketici ile yüz yüze anket yapılmıştır. Anket analiz sonucunda organik pazara gelen organik ürün tüketicilerinin çoğunlukla orta yaşlı, evli, kadın ve yüksek eğitim seviyelerinde olduğu belirlenmiştir. Yapılan anketler sonucunda organik ürün pazarlarına gelen tüketicilerin %97.8'i organik tarımın ne olduğunu bildiklerini beyan etmişler ve bunlardan %97.7'si ise organik tarımı doğru tanımlayabilmiştir. Çalışma kapsamındaki organik tüketicilerin organik ürünlerle ilgili bilgi kaynaklarının genellikle internet ve sosyal medya olduğu (%45.4) ve bunu takiben aile ve arkadaş çevresinin de (%33.6) bilgi ediniminde etkili olduğu ortaya konmuştur. Bu kapsamda organik ürün tüketimini arttırmaya yönelik; organik tarım, organik ürün, organik ürün sertifikaları ve organik ürün pazarlarıyla ilgili yapılacak olan bilgilendirme, tanıtım gibi konularda internet ve sosyal medyanın daha etkili bir yöntem olacağı belirlenmiştir. Çalışma sonucunda organik ürün pazar sayısının Türkiye genelinde artırılması, organik ürün tüketimini arttırabileceği ve uzun vadede ise üretim miktarlarını, üretici sayısını, üretim alanlarını ve dolayısıyla ithalat ve ihracat miktarlarını pozitif yönde etkileyeceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Organik Ürün, Organik Tüketici, Organik Pazar

### **Organic Product Awareness Among Consumers in the Organic Product Market: The Case of Istanbul and Izmir Provinces**

**ABSTRACT:** In this research, it is aimed to measure the organic product awareness of consumers coming to the organic product market. For this purpose, face-to-face surveys were conducted with 271 consumers in organic product markets in Izmir and Istanbul. As a result of the survey analysis, it was determined that the organic product consumers coming to the organic market are mostly middle-aged, married, female and at higher education levels. As a result of the surveys, 97.8% of the consumers who came to the organic product markets declared that they knew what is the organic agriculture, and 97.7% of them were able to define the organic agriculture correctly. Within the scope of the study, it has been revealed that the sources of information about organic products for organic consumers are generally the internet and social media (45.4%), followed by family and friends (33.6%), which are also effective in acquiring information. In this context, to increase the consumption of organic products; It has been determined that the internet and social media will be a more effective method for information and promotion about organic agriculture, organic products, organic product certificates and organic product markets. As a result of the study, it is thought that increasing the number of organic product markets in Turkey may increase the consumption of organic products and in the long term, it will positively affect the production amounts, the number of producers, production areas and thus the import and export quantities.

**Keywords:** Organic Product, Organic Consumer, Organic Bazaar.

<sup>1</sup> Ayça Nur ŞAHİN DEMİREL ([Orcid ID: 0000-0003-2988-8448](https://orcid.org/0000-0003-2988-8448)), İğdır Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Ekonomisi Bölümü, İğdır, Türkiye

<sup>2</sup> Murad YERCAN ([Orcid ID: 0000-0002-8061-0882](https://orcid.org/0000-0002-8061-0882)), Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Ekonomisi Bölümü, İzmir, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Ayça Nur ŞAHİN DEMİREL, e-mail: aycanur.sahin@igdir.edu.tr

Bu çalışma Ayça Nur ŞAHİN DEMİREL'in Doktora tezinden üretilmiştir

## GİRİŞ

Geçmişten günümüze gelen süreçte artan eğitim kalitesi ve bilinç düzeyi, dünya genelinde insanları daha sağlıklı bir yaşama yönlendirmektedir (Cantu ve ark., 2021). Özellikle son yıllarda tüm dünyanın başına gelen öncü felaketlerden biri olan Covid-19 salgını beslenme modellerinde bağışıklığı destekleyen gıdalara yönelimi bir kat daha arttırmıştır (Çulfa ve ark., 2021). Bu süreçte daha sağlıklı, hijyenik, ambalajlı ve güvenilir olan organik gıdalar ile beslenme ön plana çıkmıştır.

Ülkemiz genelinde organik ürün tüketimi her geçen gün artmış ve 2006-2019 yılları arasında FIBL istatistik verilerine göre 1 Milyon Euro'dan 46 Milyon Euro'ya kadar artış gözlemlenmiştir (FiBL, 2021). Bu durum gelişmiş ülkelerin (Amerika Bileşik Devletleri, Fransa, İngiltere vb.) organik ürün tüketim verileri ile kıyaslandığında bu ülkelerde her geçen yıl düzenli bir artış söz konusu iken, ülkemizde organik ürün tüketiminin 2014-2019 yılları arasında durağan seyrettiği görülmüştür (FiBL, 2021). Özellikle bu durumda tüketicilerin organik ürün tüketimi hakkında ne kadar bilgili olduğu ve çevresine yaydığı konusunda bir merak ortaya çıkmıştır. Söz konusu durağanlığın sebebinin daha iyi anlaşılması için Türkiye organik ürün iç pazarında organik ürün üreticisi ile tüketicisinin bir araya geldiği organik ürün pazarları bu çalışmanın temelini oluşturmuştur. Organik ürün pazarlarından ilkinin kurulduğu yer olması açısından İstanbul, organik ürün üretim ve ihracatının ilk başladığı yer olması açısından da İzmir illeri bu çalışmanın pilot illeri olarak tercih edilmiştir (Eti İçli ve ark., 2016; Şahin, 2019).

Yapılan çalışma kapsamında İstanbul ilinden Türkiye'de ilk ve en büyük organik ürün pazarı olması ile ön plana çıkan Şişli (Feriköy) Ekolojik Pazarı ile ikinci olarak kurulan Kartal Ekolojik Pazarı tercih edilirken, İzmir ilinden ise Bostanlı, Karşıyaka ve Mavişehir Ekopazarları tercih edilmiştir. İzmir'deki bu organik ürün pazarları hem sertifikalı organik ürünlerin satıldığı yer olması hem de Ekolojik Tarım Organizasyonu (ETO) tarafından denetlenen pazarlar olmaları ile dikkat çekmektedirler (Eti İçli ve ark., 2016; Şahin, 2019). Çalışmanın ana materyalini bu pazarlara gelen tüketiciler ile yüz-yüze görüşme vasıtasıyla yapılan anketler oluşturmuştur. Organik ürün kavramını anlayabilmek için öncelikle organik tarım kavramının bilinmesi gerekmektedir (Okudum ve ark., 2017). Organik Tarım Hareketi (IFOAM)'a göre organik tarım; toprak, ekosistem ve insan sağlığını devam ettiren, sağlıklı olmasını sağlayan bir üretim sistemidir. Sistem, olumsuz etkisi olan girdilerin kullanımı yerine ekolojik işleme süreçleri, biyolojik çeşitlilik ve yerel koşullara uyum sağlamış döngülere dayanır. Organik tarım, içinde bulunduğumuz çevreye fayda sağlamak, adil ilişkiyi ve tüm ilgili taraflar için iyi bir yaşam kalitesini yaygınlaştırmak adına gelenek, yeni buluşlar ve bilimi bir araya getirir (IFOAM, 2021). Organik ürünler, işlenmesi, ambalajlanması, etiketlenmesi, üretilmesi organik tarım metoduyla gerçekleştirilen, insan, fauna, flora ve toprağın sağlık ve güvenlik konularını gözlemleyerek gıda verimliliğini en üst düzeye çıkaran sertifikalı ürünlerdir (Şahin, 2019). Dolayısıyla çalışma kapsamında tüketicilerin sahip olduğu organik ürün bilincini ölçmek için öncelikle organik tarım kavramıyla ilgili bilgiler sorulmuş, bu bilgilere hangi kaynaklardan ulaştıkları, organik ürünlerle ilgili sertifikasyon bilgileri, organik ürün alışveriş yerleri ve sıklıklarıyla ilgili tercihleri anketler vasıtasıyla öğrenilmiştir. Elde edilen veriler frekans, ortalama ve yüzde gibi tanımlayıcı istatistiklere tabi tutularak, tüketicilerde organik ürün bilincinin artırılmasına yönelik bilgilendirme yapılması, bu bilgilendirmenin hangi kaynaklardan tüketiciye ulaştırılacağı, organik ürün pazarlarının sayıca arttırılarak organik ürüne ulaşılabilirliğinin kolaylaştırılması gibi sonuçlar ile Türkiye'deki iç tüketim durağanlığına çözüm önerileri üretilmesi amaçlanmıştır (Kartal, 2012; Tekin, 2019; Yılmaz ve ark., 2018).

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Bu araştırmanın ana materyalini, İstanbul ili Şişli ve Kartal ilçeleri ile İzmir ili Balçova ve Karşıyaka ilçelerindeki organik pazarlara gelen tüketicilerle 2017 yılında yüz yüze yapılan anketlerden elde edilen birincil nitelikli orijinal veriler oluşturmaktadır. Araştırmanın ikincil nitelikli verilerini ise konuyla ilgili yapılmış yerli yabancı kaynaklar ile TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu), FiBL (Organik Tarım Araştırma Enstitüsü) gibi resmi istatistik sitelerinden elde edilen veriler oluşturmaktadır.

### Metot

#### Verilerin Toplanması ve Kullanılan Yöntem

2017 yılı Karşıyaka, Balçova, Kartal ve Şişli'deki toplam hane halkı sayısı yaklaşık olarak 285.735 bulunmuştur (TÜİK, 2017). Organik pazara gelen tüketicilerden çalışma kapsamına gireceklerin sayısını belirlemek üzere, oransal örnek hacmi formülü (1) kullanılmıştır (Newbold, 1995). Görüşülecek tüketicilerin sayısında (örnek hacmi) maksimuma ulaşmak için  $p=0.50$  alınmıştır. Örnek hacmi %5 hata payı ve %90 güven aralığına göre 271 olarak hesaplanmıştır.

$$n = \frac{Np(1-p)}{(N-1)\sigma_{px}^2 + p(1-p)} \quad (1)$$

**n:** Örnek hacmi

**N:** Balçova, Karşıyaka, Şişli ve Kartal'daki tüketici sayısı

**p:** Organik pazara gelenlerin oranı (maksimum örnek hacmi için 0.5)

**$\sigma_{px}^2$ :** Oranın varyansı (%90 güven aralığı, 0.05 hata payı için  $1.645 \cdot \sigma_p = 0.05$  eşitliğinden  $\sigma_p = 0.03039$ )

Örnek hacminin ilçelere ve bu ilçelerdeki organik pazarlara göre dağılımı Çizelge 1' de verilmiştir. Çalışma örnekleme kapsamında 2017 yılında, İzmir ili Karşıyaka ilçesine bağlı Bostanlı organik pazarından 66 tüketici, Mavişehir/Mavibahçe organik pazarından 13 tüketici ile Balçova ilçesine bağlı Balçova organik pazarından da 19 tüketici olmak üzere toplamda İzmir ilinde 98 tüketici ile anket yapılmıştır. İstanbul ilinde ise Şişli/Feriköy organik pazarında 65 tüketici, Kartal organik pazarında ise 108 tüketici ile toplamda 173 tüketici ile anket yapılmıştır. İzmir ve İstanbul illerinde görüşülen 271 kişi organik pazara gelen tüketicilerden oluşmuştur.

**Çizelge 1.** Örnek hacmi ve dağılımı

İZMİR	Hane Halkı Sayısı	Sayı	%
Balçova	19 530	19	6
Bostanlı	69 603	66	25
Mavişehir	13 710	13	5
İSTANBUL		Sayı	%
Kartal	114 388	108	40
Şişli	68504	65	24
Toplam	285 735	271	100.0

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Yapılan anketlere verilen yanıtlardan elde edilen orijinal veriler analiz edilerek çalışmanın sonuçları, tablolar halinde özetlenip yorumlanarak ilgili literatür desteğinde tartışılması bu bölümde incelenmiştir. Bulunan sonuçlar tüketicilerin sosyo-demografik özelliklerini, organik tarıma yönelik

bilgi düzeylerini, organik ürünlerin sertifikasyon durumlarına yönelik bilgi düzeylerini, organik ürünlere yönelik bilgi kaynaklarını, alışveriş yer ve sıklıklarını içermektedir.

### **Tüketicilerin Demografik Özellikleri**

Ankete katılan tüketicilerin (271 kişi) cinsiyet ayrımına bakıldığında, yaklaşık %60.1'i kadın, %39.9'u erkeklerden oluşmaktadır. İllere göre dağılıma bakıldığında ise, İstanbul'daki tüketicilerin (173 kişi) %54.3'ü kadınlardan, %45.7'si erkeklerden oluşurken, İzmir'deki tüketicilerin (98 kişi) %60.1'i kadınlardan, %39.9'u ise erkeklerden oluşmaktadır. Bu durum organik ürün pazarlarında alışverişe çoğunlukla kadınların geldiğini göstermektedir. Tüketicilerin yaş ortalaması yaklaşık 45 olarak bulunmuştur. Ankete katılan en büyük tüketicinin yaşı 75 iken, en küçüğünün ise 20'dir. Tüketicilerin yarısından fazlası %52.4 ile 36-55 yaş grubunda yer alırken, %25.8'i 35'den küçük, %21.8'i ise 56'dan büyük yaş grubunda yer almaktadır. Tüketicilerin eğitim seviyeleri incelendiğinde, büyük çoğunluğunun %57.6 (156 kişi) ile üniversite mezunu olduğu, %19.9'unun (54 kişi) lisansüstü eğitim almış olduğu, bunu takiben %15.1'inin (41 kişi) ise lise mezunu olduğu bulunmuştur. İllere göre dağılıma bakıldığında ise İstanbul'daki tüketicilerin %56.6'sının, İzmir'dekilerin ise %59.2'sinin yine üniversite mezunu olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu durum, organik ürün pazarına gelen tüketicilerin eğitim seviyelerinin yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Organik ürün pazarında ankete katılan tüketiciler %66.8'inin evli, %25.8'inin bekâr ve %7.4'ünün ise boşanmış veya eşinin vefat etmiş olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Medeni durumun illere göre dağılımına bakıldığında ise İzmir'deki tüketicilerin %79.6'sının, İstanbul'daki tüketicilerin ise %59.5'inin evli olduğu anlaşılmaktadır. Bu sonuca göre organik pazarlara ve dolayısıyla organik ürünlere evli kişilerin daha fazla talep gösterdiğini söylemek mümkündür (Çizelge 2).

Davies ve arkadaşlarının 1995 yılında yapmış oldukları çalışmada, genellikle kadınların organik ürünlere karşı daha duyarlı olduğu bulunmuştur. Tüketicinin yaşı ile organik ürün tercih etme ve satın alma davranışları arasında doğrusal bir ilişki olduğu da yine bu çalışmayla ortaya konmuştur (Davies ve ark., 1995). Bıyıkoglu (2010) tarafından yapılan yüksek lisans tezinde, organik gıda tüketiminde bayanların sayısının (%67) baylardan (%33) daha çok olduğu, organik gıdaların 15-40 yaş arası denekler tarafından daha fazla tüketildiği (%51.5), üniversite mezunlarının organik gıda tüketim oranı diğer öğrenim durumundaki deneklerin sayısından toplamından daha fazla (%64) olduğu anlaşılmıştır. Bu durum daha önce yapılmış organik ürün tüketicilerinin demografik yapılarına yönelik araştırma sonuçlarıyla bu araştırma sonuçlarının örtüştüğünü göstermektedir (Bıyıkoglu, 2010). İnci ve arkadaşlarının 2014 yılında yapmış olduğu çalışmada kadınların erkeklere nazaran daha fazla organik ürün tüketme eğiliminde olduğu, evli tüketicilerin bekâr bireylere nazaran bekâr tüketicilerin de diğer (dul veya boşanmış) bireylere nazaran daha fazla organik ürün tükettiklerini saptamıştır. Lise ve üniversite eğitim grubunda olan tüketicilerin ise diğer bireylere göre daha fazla organik ürün tükettiklerini ortaya koymuşlardır (İnci ve ark., 2014). Yukarıda değinilen üç çalışmanın spesifik sonuçları bu çalışmanın sonuçlarıyla örtüşmektedir.

### **Tüketicilerin Organik Üretim Yöntemi Hakkındaki Bilgi Düzeyleri**

Çalışmada ankete katılan tüketicilerin (271 kişi) organik tarım hakkında bilgi düzeyleri ölçülmüş, bu amaçla tüketicilere öncelikle adı geçen üretim yönteminin ne olduğunu bilip bilmediği sorulmuş, sonrasında ise bildiğini ifade edenlere birkaç farklı tanım yöneltilerek doğru tanımı seçmeleri istenmiştir. Bu sorgulama yöntemi, organik tarım farkındalığı ve bilinci, aynı zamanda organik ürün bilincini de ortaya koyduğundan oldukça büyük önem taşımaktadır. Çalışma organik pazarlarda yürütüldüğü için organik tarım farkındalığını illere göre detaylı olarak inceleme şansı yaratmıştır. Böylece tüketicilerin organik tarımı dolayısıyla organik ürünü ne kadar tanıdıkları ölçülmeye çalışılmıştır. İstanbul'daki

tüketicilerin (173 kişi) %99.4'ü organik tarımı bildiğini, %0.6'sı bilmediğini belirtmiştir. İzmir'deki tüketicilerin (98 kişi) ise %94.9'u organik tarımı bildiklerini, %5.1'i ise bilmediğini ifade etmiştir. Genel olarak tüketicilerin tamamına bakıldığında ise %97.8'i organik tarımı bildiklerini, %2.2'si ise bilmediklerini beyan etmişlerdir (Çizelge 3).

Çizelge 2. Tüketicilerin demografik özellikleri

Cinsiyet durumu	İL				GENEL	
	İZMİR		İSTANBUL		Sayı	%
	Sayı	%	Sayı	%		
Kadın	69	70.4	94	54.3	163	60.1
Erkek	29	29.6	79	45.7	108	39.9
<b>Toplam</b>	98	100	173	100	271	100

Yaş Kategorileri	İL				GENEL	
	İZMİR		İSTANBUL		Sayı	%
	Sayı	%	Sayı	%		
≤35	15	15.3	55	31.8	70	25.8
36-45	23	23.5	53	30.6	76	28.0
46-55	24	24.5	42	24.3	66	24.4
56≤	36	36.7	23	13.3	59	21.8
<b>Toplam</b>	98	100	173	100	271	100

Yaş	Alt değer= 20	Üst değer= 75
	Ortalama= 45.03	St. Sapma= 12.10

Medeni durumu	İL				GENEL	
	İZMİR		İSTANBUL		Sayı	%
	Sayı	%	Sayı	%		
Bekâr	15	15.3	55	31.8	70	25.8
Evli	78	79.6	103	59.5	181	66.8
Boşanmış / Eşi Ölmüş	5	5.1	15	8.7	20	7.4
<b>Toplam</b>	98	100	173	100	271	100

Eğitim durumu	İL				GENEL	
	İZMİR		İSTANBUL		Sayı	%
	Sayı	%	Sayı	%		
Okur-Yazar	5	5.1	-	-	5	1.8
İlk(okul)öğretim	7	7.1	5	2.9	12	4.4
Ortaokul	3	3.1	-	-	3	1.1
Lise	19	19.4	22	12.7	41	15.1
Üniversite	58	59.2	98	56.6	156	57.6
Lisansüstü	6	6.1	48	27.7	54	19.9
<b>Toplam</b>	98	100	173	100	271	100

Çizelge 3. Tüketicilerin organik tarım farkındalığı

		Organik tarım nedir biliyor musunuz?				Genel			
		Evet		Hayır		Evet		Hayır	
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
İzmir	Balçova	18	94.7	1	5.3	93	94.9	5	5.1
	Bostanlı	63	95.5	3	4.5				
	Mavişehir	12	92.3	1	7.7				
İstanbul	Kartal	107	99.1	1	0.9	172	99.4	1	0.6
	Şişli	65	100	-	-				
	<b>Toplam</b>								

İstanbul tüketicilerinden organik tanımı bildiklerini ifade edenlerden %3.5'i organik tarımı doğru tanımlayamazken, İzmir tüketicilerinin tamamı organik tarımı doğru tanımlayabilmişlerdir. Genel olarak tüm tüketicilerden organik tarımı bildiklerini ifade edenlerden ise %2.3'ü organik tarımın tanımını doğru ifade edememiştir (Çizelge 4). Dolayısıyla, tüketicilerin genel olarak organik tarımı ve organik tarım yöntemiyle üretilmiş olan organik ürünün ne olduğunu bildiklerini söylemek mümkündür.

**Çizelge 4.** Tüketicilerin organik tarımı doğru tanımlama durumu

		İstanbul		İzmir		Genel	
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
<b>Organik tarımın tanımı hangisi?</b>	Doğru tanım	166	96.5	93	100	259	97.7
	Yanlış tanım	6	3.5	-	-	6	2.3
<b>Toplam</b>		172	100	93	100	265	100

### Tüketicilerin Organik Ürünler Hakkındaki Bilgi Kaynakları

Çalışmada, ankete katılan organik ürün tüketicilerinin (271 kişi), organik taze sebze ve meyve hakkındaki bilgileri en çok hangi bilgi kaynaklarından öğrenmeyi tercih ettikleri araştırılmış ve Çizelge 5'de verilmiştir. Tüketiciler genel olarak taze sebze ve meyveyle ilgili bilgileri, büyük çoğunluğun yaklaşık %45.4'ünün (123 kişi) en çok internet ve sosyal medyadan, % 33.6'sının (91 kişi) aile çevresi ve arkadaşlarından, %8.5'inin (23 kişi) ise ürünleri satın aldıkları aracı veya üreticiden elde etmeyi tercih ettikleri ortaya çıkmıştır. Tüketicilerin ilgili bilgi kaynaklarından en az %0.7'sinin (2 kişi) radyoyu tercih ettiği, ikinci en az olaraksa %6.6'sının (18 kişi) görsel medyayı (Televizyon vs.) tercih ettiği belirlenmiştir.

**Çizelge 5.** Tüketicilerin organik ürünlerle ilgili bilgi kaynakları

<i>Organik taze sebze ve meyveyle ilgili bilgi kaynakları</i>	<b>Tercih Düzeyleri</b>	
	<i>En çok</i>	
	<i>Sayı</i>	<i>%</i>
Görsel medya	18	6.6
Radyo	2	0.7
Yazılı medya	14	5.2
İnternet /sosyal medya	123	45.4
Aile çevresi ve arkadaşlar	91	33.6
Üretici / çiftçi / aracı	23	8.5
<b>Toplam</b>	271	100

Elbaşlar'ın 2013 yılında Bursa ili kapsamında yapmış olduğu çalışmada organik ürün üretimi ve tüketiminin artırılması için özellikle medya ve internet üzerinden tüketiciyi bilgilendirme amaçlı yayınların yapılması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır (Erbaşlar, 2013). İnci ve ark. tarafından 2014 yılında yapılan çalışmada tüketicilerin organik ürün hakkındaki bilgi kaynaklarının tercih sırası internet (%47.7), televizyon (%31), eş dost tavsiyesi (%9.2), satış elemanı (%7.1) ve dergi, gazete (%4.8) olduğu bulunmuştur (İnci ve ark., 2014). Elde edilen bu sonuç yapmış olduğumuz çalışma ile uyum sağlamaktadır.

### Tüketicilerin Organik Ürünleri Satın Alma Yerleriyle İlgili Tercihleri

Çalışmada, organik pazara gelen ve ankete katılan organik ürün tüketicilerinin (271 kişi), organik taze sebze ve meyveyi hangi alışveriş yerlerinden ve ne sıklıkla almayı tercih ettikleri araştırılmıştır. Tüketicilerin, organik taze sebze ve meyveyi alışveriş yerlerinden satın alma sıklık ortalamalarına bakıldığında, organik taze sebze ve meyveyi daima organik pazardan satın almayı tercih ettikleri (%4.63) ortaya çıkmıştır. Sırasıyla hipermarket (%1.28), semt pazarı (%1.17), market (%1.14), manav (%1.10) ve seyyar satıcıyı (%1.01) ise neredeyse hiç tercih etmedikleri ortaya çıkmıştır. Tüketicilerin büyük



çoğunluğu, yaklaşık %73.1'i (198 kişi) organik taze sebze ve meyveyi daima organik pazarlardan satın aldıklarını, %19.2'si sık sık, %5.5'i bazen, %2.2'si ise nadiren organik pazarlardan satın aldıklarını beyan etmişlerdir (Çizelge 6).

**Çizelge 6.** Alışveriş yerlerinden organik taze sebze - meyveyi satın alma sıklığı

	Tercih Düzeyleri										Ort.	Std. Sapma		
	1		2		3		4		5				Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%			Sayı	%
Organik pazar	-	-	6	2.2	15	5.5	52	19.2	198	73.1	271	100	4.63	0.691
Semt pazarı	251	92.2	5	1.8	6	2.2	8	3.0	1	0.4	271	100	1.17	0.637
Manav	253	93.4	13	4.8	3	1.1	-	-	2	0.7	271	100	1.10	0.448
Seyyar satıcı	267	98.5	4	1.5	-	-	-	-	-	-	271	100	1.01	0.121
Market	249	91.9	13	4.8	2	0.7	6	2.2	1	0.4	271	100	1.14	0.562
Hipermarket	229	84.5	18	6.6	16	5.9	6	2.2	2	0.7	271	100	1.28	0.737

\* 1) Hiç 2) Nadiren 3) Bazen 4) Sık sık 5) Daima

Güngör' ün 2019'da yapmış olduğu çalışmada, ankete katılanların %42'si organik semt pazarlarından, %37.8'i ise marketlerden organik ürün satın aldıklarını belirlemiştir (Güngör 2019). Kurtuluş ve arkadaşlarının 2019'da yapmış oldukları çalışmada ise tüketicilerin önemli bir kısmının (%54.1) haftada bir kez organik pazara alışverişe geldiği, ayrıca çoğunluğun (%77.6) organik pazarlar haricinde başka yerlerden de organik ürünler satın aldığını göstermiştir (Kurtuluş ve ark., 2019). Literatürdeki bu çalışmalar ile birlikte, yapılan bu çalışma sonucu değerlendirildiğinde elde edilen verilerin literatür verileri ile örtüştüğü görülmüştür.

### Tüketicilerin Organik Tarım Ürünleri Hakkındaki Bilgi Düzeyleri

Araştırmada tüketicilere, organik pazarda yer alan organik ürünlerden, taze sebze meyve, paketli ve paketsiz kuru meyve, sebze, ambalajlı organik çerez, ekmek, unlu mamuller, zeytinyağı, paketli organik süt, et ve ürünleri ile organik yumurtayı satın alıp almadıkları, alıyorsa ne sıklıkta aldıkları ve aldıkları bu ürünlerin sertifika durumlarını bilip bilmedikleri sorulmuştur. Bu yanıtlarla tüketicilerin organik ürün tüketme eğilimleri ve tükettikleri organik ürünlerin sertifikaları hakkındaki bilgi düzeyleri ölçülmek istenmiştir.

Organik pazara gelen ve ankete katılan tüketicilerin (271 kişi), organik taze sebze ve meyve ile ilgili satın alma durumları, alışveriş sıklıkları ve sertifika durumları ile ilgili bilgileri Çizelge 7'de gösterilmiştir. Organik pazara gelen ve ankete katılan tüketicilerden yaklaşık %96'sı organik taze sebze satın aldıklarını, bu kişilerin ise yaklaşık %88'i her hafta organik taze sebze alışverişini yaptıklarını beyan etmişlerdir. Taze organik dökme sebze satın alan tüketicilerin (260 kişi) yaklaşık %57.3'ü bu ürünlerin sertifikasyon firmasına ait sertifikaya veya logoya sahip olduklarını belirtmişlerdir. Dolayısıyla tüketicilerin büyük çoğunluğu organik taze sebzelerin sertifika durumunu doğru bilirken kalan %42.3'lük kısım ise yanlış bilmektedirler. Ankete katılım sağlayan tüketicilerin yaklaşık %93.4 ile 260 kişisi organik meyve satın aldıklarını, bu tüketicilerin yaklaşık %83.8'i ise her hafta bu alışverişini gerçekleştirdiklerini dile getirmişlerdir. Organik meyve satın aldıklarını beyan eden tüketicilerin %12.3'ü iki haftada bir, %2.4'ü ara sıra, %1.6'sı ise ayda bir bu satın alımı gerçekleştirdiklerini beyan etmişlerdir. Ayrıca organik taze meyve satın alıcılarına (260 kişi) ürünlerin sertifikasyon durumu sorulduğunda, tüketicilerin yaklaşık %61.7'si organik taze dökme meyvelerin sertifikasyon firmasına ait sertifikaya veya logoya sahip olduklarını, %22'si bu ürünlerde sadece Tarım ve Orman Bakanlığı logosu, kalan %15.8'i ise sertifikasyon firmasına ve Tarım ve Orman Bakanlığına ait logoların ikisinin bir bulunduğunu beyan etmişlerdir. Bu durum, organik pazara gelen organik meyve tüketicilerinin büyük çoğunluğunun (%61.7) aldıkları organik meyvelerin sertifika durumunu bildiklerini, fakat geriye

kalanların (%38.3) satın aldıkları organik meyvelerin sertifika durumunu bilmediklerini ortaya çıkarmaktadır.

**Çizelge 7.** Tüketicilerin organik taze sebze - meyveyle ilgili bilgileri

		Sayı	%	Genel Toplam	
				Sayı	%
<b>Taze sebze satın alıyorum (açık-dökme)</b>	Evet	260	95.9	271	100
	Hayır	11	4.1		
<b>Sıklık</b>	Her hafta	228	87.7	260	100
	İki haftada bir	28	10.8		
	Ayda bir	4	1.5		
	Ara sıra alıyorum	-	-		
	Sertifikasyon firmasına ait sertifika veya logo	149	57.3		
<b>Sertifika durumu</b>	Sadece Tarım ve Orman Bakanlığı Logosu	61	23.5	260	100
	Sertifikasyon firması ve Tarım ve Orman Bakanlığı logosu	50	19.2		
<b>Taze meyve satın alıyorum. (açık-dökme)</b>	Evet	253	93.4	271	100
	Hayır	18	6.6		
<b>Sıklık</b>	Her hafta	212	83.8	253	100
	İki haftada bir	31	12.3		
	Ayda bir	4	1.6		
	Ara sıra alıyorum	6	2.4		
	Sertifikasyon firmasına ait sertifika veya logo	156	61.7		
<b>Sertifika durumu</b>	Sadece Tarım ve Orman Bakanlığı Logosu	57	22.5	253	100
	Sertifikasyon firması ve Tarım ve Orman Bakanlığı logosu	40	15.8		

Çizelge 8' de organik pazara gelen ve ankete katılan tüketicilerin, organik pazardan almış oldukları paketli organik kuru meyve ve sebze, açık-dökme organik kuru meyve ve sebze, paketli organik çerezler hakkındaki bilgi düzeyleri yer almaktadır.

Organik pazara gelen ve ankete katılan tüketicilerin yaklaşık %50'si, geldikleri bu organik pazarlardan paketli organik kuru meyve ve sebze aldıklarını, bu tüketicilerden ise %67.4'ü her hafta bu ürünlerden satın aldıklarını ifade etmişlerdir. Ne yazık ki paketli organik kuru meyve ve sebze aldıklarını beyan eden tüketicilerin büyük çoğunluğu %28.4 ile bu ürünlerin logosuz olduğunu, %23.9'u ürün paketlerinin üstünde sadece Tarım ve Orman Bakanlığı logosu olduğunu, %22.4'ü ise ürünlerin sertifikasyon firmasına ait sertifika veya logoya sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Dolayısıyla organik paketli kuru meyve sebze tüketicilerinin toplam % 74.6'sı bu ürünlerin sertifikasyon durumunu doğru ifade edememişlerdir. Tüketicilerin sadece %25.4'ü paketli olan bu organik kuru sebze ve meyvelerin, paketlerinin üzerinde hem sertifikasyon şirketine hem de Tarım ve Orman Bakanlığına ait logo bulunduğunu bilebilmişlerdir. Bu durum organik pazara gelen tüketicilerin büyük çoğunluğunun paketli kuru meyve ve sebzelerin sertifika durumundan habersiz olduğunu ortaya koymaktadır. Dolayısıyla bu tüketicilere doğru kaynaktan doğru bilgilendirmenin yapılması gerektiği anlaşılmaktadır.

Organik pazarlara gelen ve araştırma anketine katılan tüketicilerin (271 kişi) yine yaklaşık %50'si organik pazarlarda, açık ve dökme olarak satılan organik kuru meyve sebzelerden satın aldıklarını, bu alıcıların %65.2'si bu alışverişini her hafta gerçekleştirdiklerini beyan etmişlerdir. Tüketicilerden açık ve

dökme olarak satılan organik kuru meyve ve sebzelerden satın aldıklarını beyan edenlerin %71'i, bu ürünlerin sertifikasyon firmasına ait sertifika veya logoya sahip olduklarını bildiklerini belirtmişlerdir.

Ankete katılan tüketicilerden bir kısmı (%41.3) organik pazarlardan paketli organik çerez satın aldıklarını, organik çerez tüketicilerinin ise %68.8'i bu alışverişi her hafta gerçekleştirdiklerini ifade etmişlerdir. Organik çerez tüketicilerinden sadece %22.3'ü organik çerezlerin sertifikasyon durumunu, paketin üzerinde hem sertifikasyon firmasına hem de Tarım ve Orman Bakanlığına ait logo bulunur diyerek doğru bilebilmişlerdir. Organik çerez tüketicilerinin geriye kalan %87.7'si ise sertifika durumu konusunda yetersiz ve yanlış bilgiye sahiptirler. Bu durumda organik çerez tüketicilerinin, organik çerez paketlerinin üzerinde bulunması gereken logolar ile ilgili bilgilendirilmelerinin gerçekleştirilmesi gerektiği ortaya çıkmıştır.

**Çizelge 8.** Tüketicilerin organik kuru meyve, sebze ve çerezle ilgili bilgileri

		Sayı	%	Genel Toplam	
				Sayı	%
<b>Paketlenmiş kuru meyve ve sebze satın alıyorum.</b>	Evet	135	49.8	271	100
	Hayır	136	50.2		
<b>Sıklık</b>	Her hafta	91	67.4	135	100
	İki haftada bir	25	18.5		
	Ayda bir	7	5.2		
	Ara sıra alıyorum	12	8.9		
	Sertifikasyon firmasına ait sertifika veya logo	30	22.4		
<b>Sertifika durumu</b>	Sadece Tarım ve Orman Bakanlığı Logosu	32	23.9	135	100
	Logosuz	38	28.4		
	Sertifikasyon firması ve Tarım ve Orman Bakanlığı logosu	34	25.4		
<b>Kuru meyve ve sebze satın alıyorum. (açık-dökme)</b>	Evet	135	49.8	271	100
	Hayır	136	50.2		
<b>Sıklık</b>	Her hafta	90	65.2	135	100
	İki haftada bir	25	18.1		
	Ayda bir	11	8		
	Ara sıra alıyorum	12	8.7		
	Sertifikasyon firmasına ait sertifika veya logo	98	71		
<b>Sertifika durumu</b>	Sadece Tarım ve Orman Bakanlığı Logosu	35	25.4	135	100
	Logosuz	-	-		
	Sertifikasyon firması ve Tarım ve Orman Bakanlığı logosu	5	3.6		
<b>Çerez satın alıyorum.</b>	Evet	112	41.3	271	100
	Hayır	159	58.7		
<b>Sıklık</b>	Her hafta	77	68.8	112	100
	İki haftada bir	16	14.3		
	Ayda bir	11	9.8		
	Ara sıra alıyorum	8	7.1		
	Sertifikasyon firmasına ait sertifika veya logo	27	24.1		
<b>Sertifika durumu</b>	Sadece Tarım ve Orman Bakanlığı Logosu	27	24.1	112	100
	Logosuz	33	29.5		
	Sertifikasyon firması ve Tarım ve Orman Bakanlığı logosu	25	22.3		

Ankete katılan tüketicilerin (271 kişi) paketli organik süt, et ve ürünleri ile yumurta tüketim eğilimleri, satın alma sıklıkları ve sertifika durum bilgileri Çizelge 9'da verilmiştir. Araştırma kapsamındaki tüketici anketine katılan organik ürün tüketicilerinden %52.4'ü organik süt ve süt ürünlerini organik pazarlardan satın aldıklarını beyan etmişlerdir. Organik süt ve süt ürünleri tüketicilerinin %81.7'si (142 kişi) bu satın alımı her hafta yaptıklarını, %15.5'i iki haftada bir, %2.1'i ayda bir, geriye kalan %0.7'si ise arada sırada yaptıklarını belirtmişlerdir. Organik süt ve süt ürünleri tüketicisi olan bu 142 kişinin sadece %22.5'i bu ürün paketlerinin üzerinde hem sertifikasyon firmasına hem de Tarım ve Orman Bakanlığına ait logo bulunduğu dile getirmiştir. Geriye kalan %77.5'i ise organik süt ve süt ürünlerinin paketlerindeki sertifika durumunda yanlış ya da eksik bilgiye sahiptirler.

Tüketicilerin (271 kişi) yaklaşık %68'i organik yumurtayı organik pazarlardan satın aldıklarını, bunların yaklaşık %80'i ise bu satın almayı her hafta gerçekleştirdiklerini beyan etmişlerdir. Organik yumurta tüketicilerine sertifika durumu sorulduğunda ise sadece %19.6'sı paketlerin üzerinde, hem sertifikasyon firmasına ait hem de Tarım ve Orman Bakanlığına ait logo bulunduğunu bilebilmişlerdir. Geriye kalan %80.4'lük kısım ise organik yumurtaların sertifika durumu hakkında eksik ya da yanlış bilgiye sahiptir.

Araştırma anketine katılan tüketicilerin sadece %23.6'sı olan 64 kişinin organik et ve et ürünleri satın aldıkları ortaya çıkmıştır. Organik et ve et ürünleri tüketicilerinin % 69.1'i her hafta, %19.1'i iki haftada bir, %7.4'ü ara sıra, geriye kalan %4.4'ü ise ayda bir bu alışverişini gerçekleştirdiklerini beyan etmişlerdir. Organik pazara gelen, organik et ve et ürünleri tüketicisi olan 64 kişiden sadece 18'si (%26.5), organik et ve et ürünleri paketlerinin üzerinde hem sertifikasyon firmasına ait hem de Tarım ve Orman Bakanlığına ait logo bulunduğunu ifade ederek, doğru bilgiye sahip olduklarını göstermişlerdir. Geriye kalan 46 organik et ve et ürünleri tüketicisinin % 33.8'i bu ürünlerin paketlerinin üzerinde, sadece sertifikasyon firmasına ait sertifika veya logo bulunduğunu, %20.6'sı logosuz olduğunu ve %19.1'i ise sadece Tarım ve Orman Bakanlığının logosu bulunduğunu dile getirerek, yanlış veya eksik bilgilere sahip olduklarını göstermişlerdir.

Tüketicilerin organik süt, et ve ürünleri ile organik yumurta sertifika durumları hakkındaki bilgileri incelendiğinde, genel olarak organik pazara gelerek bu ürünlerden satın alan tüketicilerin, bu ürünlerle ilgili sertifikasyon bilgilerinde yetersiz kaldıkları ortaya çıkmıştır. Bu durum organik et, süt ve ürünleri ile organik yumurta tüketicilerinin ürün sertifikası ve bu sertifikalara ait logolarla ilgili bilgilendirilmeleri gerektiği sonucunu ortaya koymaktadır.

Araştırma kapsamında organik pazarlardaki tüketici anketlerine katılan, organik ürün tüketicilerinin paketli organik ekmek, unlu mamuller ve organik zeytinyağı satın alma sıklık durumları ile sertifika bilgileri Çizelge 10'da verilmiştir. Tüketicilerin %48'i olan 131 kişinin organik ekmek ve unlu mamulleri organik pazarlardan satın aldıkları ve bunların %89.6'sının (120 kişi) bu alışverişini her hafta gerçekleştirdiği ortaya çıkmıştır. Tüketicilerin (271 kişi) yaklaşık %60'ı ise organik zeytinyağı satın aldıklarını, bunların %55.2'si bu alışverişini her hafta gerçekleştirdiklerini ifade etmişlerdir. Organik ekmek ve unlu mamul tüketicilerinin sadece %19.4'ü, organik zeytinyağı tüketicilerinin ise sadece %18.4'ü sertifikaları konusunda doğru bilgiye sahiptir. Hem organik ekmek ve unlu mamul tüketicilerinin hem de organik zeytinyağı tüketicilerinin bu ürünler hakkında yanlış veya eksik sertifikasyon bilgisine sahip oldukları ortaya çıkarken, doğru bilgilendirilme yapılması gerektiği de ortaya konmuştur.

Çizelge 9. Tüketicilerin organik süt, yumurta ve etle ilgili bilgileri

		Sayı	%	Genel Toplam	
				Sayı	%
<b>Süt ve süt ürünleri satın alıyorum</b>	Evet	142	52.4	271	100
	Hayır	129	47.6		
<b>Sıklık</b>	Her hafta	116	81.7	142	100
	İki haftada bir	22	15.5		
	Ayda bir	3	2.1		
	Ara sıra alıyorum	1	0.7		
<b>Sertifika durumu</b>	Sertifikasyon firmasına ait sertifika/logo	39	27.5	142	100
	Sadece Tarım ve Orman Bakanlığı Logosu	35	24.6		
	Logosuz	36	25.4		
	Sertifikasyon firması ve Tarım ve Orman Bakanlığı logosu	32	22.5		
<b>Yumurta satın alıyorum</b>	Evet	184	67.9	271	100
	Hayır	87	32.1		
<b>Sıklık</b>	Her hafta	147	79.5	184	100
	İki haftada bir	31	16.8		
	Ayda bir	4	2.2		
	Ara sıra alıyorum	3	1.6		
<b>Sertifika durumu</b>	Sertifikasyon firmasına ait sertifika/logo	48	26.1	184	100
	Sadece Tarım ve Orman Bakanlığı Logosu	43	23.4		
	Logosuz	57	31.0		
	Sertifikasyon firması ve Tarım ve Orman Bakanlığı logosu	36	19.6		
<b>Et ve et ürünleri satın alıyorum</b>	Evet	64	23.6	271	100
	Hayır	207	76.4		
<b>Sıklık</b>	Her hafta	47	69.1	64	100
	İki haftada bir	13	19.1		
	Ayda bir	3	4.4		
	Ara sıra alıyorum	5	7.4		
<b>Sertifika durumu</b>	Sertifikasyon firmasına ait sertifika/logo	23	33.8	64	100
	Sadece Tarım ve Orman Bakanlığı Logosu	13	19.1		
	Logosuz	14	20.6		
	Sertifikasyon firması ve Tarım ve Orman Bakanlığı logosu	18	26.5		

Eti İçli ve arkadaşları 2016'da yapmış oldukları çalışmada, 620 kişi ile anket yapılmış ve ankete katılanlardan 387 (%62.4) kişinin haftada bir, 122 (%19.7) kişinin ayda birkaç kere, 56 (%9) kişinin ayda bir, 45 (%7.3) kişinin haftada birkaç kere ve 10 (%1.6) kişinin birkaç ayda bir organik gıda satın aldıklarını bulunmuştur (Eti İçli ve ark., 2016). Kurtuluş ve arkadaşlarının 2019'da yapmış oldukları çalışmada ise tüketicilerin organik ürünlerden sebze ve meyveyi diğer ürünlere göre daha sık aldığı ortaya çıkmıştır (Kurtuluş ve ark., 2019). Güngör' ün 2019 yılında yapmış olduğu çalışmada, süt ve süt ürünlerinin katılımcıların en fazla düzenli olarak satın aldıkları ürün grubu olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Katılımcıların %64.9'u düzenli olarak; %20.8'i ara sıra; %8.1'i nadiren süt ve süt ürünleri satın almışlardır (Güngör 2019). İnan ve arkadaşlarının 2021 yılında yapmış oldukları çalışmada, en çok tercih edilen ürünlerin sırasıyla taze sebze - meyve, zeytinyağı ve yumurta iken en az tercih edilen ürünler ise kuruyemişler, bebek mamaları, çay ve meyve suyu vb. içecekler olarak bulunmuştur (İnan ve ark., 2021). Literatürdeki bu çalışmalarla birlikte yapılan bu çalışma sonucu değerlendirildiğinde elde edilen verilerin birbirleri ile örtüştüğü görülmüştür.

Bir ürünün organik olup olmadığını anlamaya yarayan bir yöntem olan sertifika durumu, tüketicilerin mutlaka bilmeleri gereken bir husustur. Bu anlamda en fazla organik ürün çeşidini

bünyelerinde bulunduran organik ürün pazarlarında yapılmış olan bu çalışma kapsamında yukarıda belirtilen organik ürünlerle ilgili tüketicilere mutlaka bilgilendirme yapılmalıdır.

**Çizelge 10.** Tüketicilerin paketli bazı organik ürünler hakkındaki bilgileri

		Sayı	%	Genel	
				Sayı	%
<b>Ekmek ve unlu mamuller satın alıyorum.</b>	Evet	131	48.3	271	100
	Hayır	140	51.7		
<b>Sıklık</b>	Her hafta	120	89.6	131	100
	İki haftada bir	10	7.5		
	Ayda bir	2	1.5		
	Ara sıra alıyorum	2	1.5		
<b>Sertifika durumu</b>	Sertifikasyon firmasına ait sertifika/logo	34	25.4	131	100
	Sadece Tarım ve Orman Bakanlığı Logosu	32	23.9		
	Logosuz	42	31.3		
	Sertifikasyon firması ve Tarım ve Orman Bakanlığı logosu	26	19.4		
<b>Zeytinyağı satın alıyorum.</b>	Evet	163	60.1	271	100
	Hayır	108	39.9		
<b>Sıklık</b>	Her hafta	90	55.2	163	100
	İki haftada bir	20	12.3		
	Ayda bir	40	24.5		
	Ara sıra alıyorum	13	8.0		
<b>Sertifika durumu</b>	Sertifikasyon firmasına ait sertifika/logo	39	23.9	163	100
	Sadece Tarım ve Orman Bakanlığı Logosu	37	22.7		
	Logosuz	57	35.0		
	Sertifikasyon firması ve Tarım ve Orman Bakanlığı logosu	30	18.4		

## SONUÇ

Organik ürün pazarına gelen tüketicilerin organik ürün bilincini ölçmek için yapılan bu çalışmada, 271 tüketicinin büyük çoğunluğu orta yaş grubunda (%52.4) yer almakta ve genellikle kadınlardan (%60) oluşmaktadır. Bu tüketicilerin medeni durumuna bakıldığında %7.4'ü dul, %33'ü bekâr ve %67'sinin evli olduğu belirlenirken, eğitim seviyelerine bakıldığında ise %58'inin üniversite mezunu, %20'sinin ise lisansüstü eğitim seviyesinde olduğu belirlenmiştir. Bu veriler genel bazda değerlendirildiğinde organik pazara gelen organik ürün tüketicilerinin çoğunlukla orta yaşlı, evli, kadın ve yüksek eğitim seviyelerinde olduğu söylenebilir. Yapılan anketler sonucunda organik ürün pazarlarına gelen tüketicilerin %97.8'i organik tarımın ne olduğunu bildiklerini beyan etmişler ve bunlardan %97.7'si ise organik tarımı doğru tanımlayabilmiştir. Fakat tüketicilere ayrı ayrı ürünlerin sertifikasyon durumları sorulduğunda bilgi eksiklikleri olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla tüketicilerin organik ürünlerin sertifika durumları konusunda bilgilendirilmeleri gerekmektedir. Çalışma kapsamındaki organik tüketicilerin organik ürünlerle ilgili bilgi kaynaklarının genellikle internet ve sosyal medya olduğu (%45.4) ve bunu takiben aile ve arkadaş çevresinin de (%33.6) bilgi ediniminde etkili olduğu ortaya konmuştur. Bu kapsamda organik ürün tüketimini arttırmaya yönelik; organik tarım, organik ürün, organik ürün sertifikaları ve organik ürün pazarlarıyla ilgili yapılacak olan bilgilendirme, tanıtım gibi konularda konu ile ilgili kamu kurum ve kuruluşlarının, müteşebbislerin internet ve sosyal medyayı kullanması önerilmektedir. Ayrıca çalışma kapsamında tüketicilerin organik ürün alışverişi yaptığı yerler incelendiğinde tüketicilerin büyük çoğunlukla organik ürün pazarlarını tercih ettikleri belirlenmiştir. Sonuç olarak, bilgi kaynaklarının artışı ve bilgi içeriklerinin artırılmasının yanı sıra

organik ürün pazarlarının da ülke genelinde artırılması özellikle Türkiye çapında, organik ürün tüketimini arttıracakı düşünülmektedir. Böylesi bir durum uzun vadede değerlendirildiği zaman üretim miktarlarını, üretici sayısını, üretim alanlarını ve dolayısıyla ithalat ve ihracat taleplerini de arttırabileceğinden ülke ekonomisi için de faydalı olabileceği düşünülmektedir.

### Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

### Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

### KAYNAKLAR

- Bıyıkoglu Ş, 2010. Organik Gıdalarla İlgili Tüketici Davranışlarının Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 57s.
- Cantu PA, Sheehan CM, Sasson I, Hayward MD, 2021. Increasing Education-Based Disparities in Healthy Life Expectancy Among U.S. Non-Hispanic Whites, 2000–2010. *The Journals of Gerontology: Series B* 76(2): 319–329.
- Çulfa S, Yıldırım E, Bayram B, 2021. COVID-19 Pandemi Süresince İnsanlarda Değişen Beslenme Alışkanlıkları İle Obezite İlişkisi. *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi*, 6(1): 135-142.
- Davies A, Titterington A. ve Cochrane C. 1995. Who buys organic food? A profile of the purchasers of organic food in Northern Ireland. *British Food Journal*, 97(10): 17-23.
- Eti İçli GE, Anıl NK ve Kılıç B, 2016. Tüketicilerin organik gıda satın alma tercihlerini etkileyen faktörler. *Kırklareli Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi*, 5(2): 93-108.
- Erbaşlar G, 2013. Uludağ Üniversitesi Öğrencilerinin Organik Ürünler Konusunda Tüketici Bilincinin Ölçülmesi, Türkiye II. Organik Hayvancılık Kongresi 24-26 Ekim 2013 Bursa.
- FiBL, 2021. <https://statistics.fibl.org/world/key-indicators.html> (Erişim Tarihi: 14.06.2021)
- Güngör M, 2019. Organik Ürünlere Yönelik Tüketici İlgilenimi ile Satın Alma Nedenleri Arasındaki İlişkinin İncelenmesi Üzerine Bir Pilot Araştırma. İstanbul Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 125s.
- IFOAM, 2021. <https://www.ifoam.bio/why-organic/organic-landmarks/definition-organic> (Erişim Tarihi: 14.06.2021)
- İnan R, Bekar A, Uurlu H, 2021. Tüketicilerin Organik Gıda Satın Alma Davranışları ve Tutumlarına İlişkin Bir Değerlendirme, *Journal of Tourism and Gastronomy Studies*, 9: 220-235.
- İnci H, Karakaya E, Söğüt B, Şengül T, 2014. Organic Product Consumption and Customer Preferences in Urban Sections of Bingol Province. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi* 1(2): 255-261.
- Kartal T, 2012. İlköğretim Fen Bilgisi Öğretmen Adaylarının Eleştirel Düşünme Eğilimlerinin İncelenmesi. *Ahi Evran Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi Dergisi*, 13(2): 279-297.
- Kurtuluş S, Karapınar E, Özkan E, 2019. Organik Ürün Tüketicilerinin Tipolojisi: Gönüllü Sadelik, Çevre Bilinci ve Değerler Açısından Pazar Bölümlerinin İncelenmesi. *Tüketici ve Tüketim Araştırmaları Dergisi*, 11: 107-142.
- Şahin AN, 2019. İzmir ve İstanbul'da organik pazarların mevcut durumu ve en fazla tercih edilebilir organik pazar tasarımının geliştirilmesi. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Basılmış).
- Newbold, P., 1995. *Statistics for Business and Economics*, 4th ed. Prentice Hall International Editions, USA, 1016.
- Okudum R, Alaeddinoğlu F, Şeremet M, 2017. Literatürde Organik Tarım Terminolojisi: Organik Tarımla İlişkili Dergilerde Bir İçerik Analizi. *Karabük Üniversitesi Sosyal Bilimler Dergisi* 7(1): 14-28.
- Tekin O, 2019. Öğretmenlerin Sosyal Medya Bağımlılık Seviyelerinin Genel Erteleme Davranışlarıyla İlişkisi. *Türkiye Eğitim Dergisi*, 4(1): 36-47.
- TÜİK, 2017. Yaşlara ve Cinsiyete Göre İllerin Nüfus Bilgileri. Türkiye İstatistik Kurumu Web Sayfası. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=95&locale=tr>. Erişim Tarihi: (Erişim Tarihi: 5.09.2021)
- Yılmaz R, Yılmaz FGK, 2018. Eğitim Yöneticilerinin Hayat Boyu Öğrenme Süreçleri Bağlamında Bilgi ve İletişim Teknolojilerinden Yararlanma Durumlarının İncelenmesi, *International Congress on Science and Education*, 55-60.

**Atıf İçin:** Acar E, Balabanlı C, Bıçakçı E, 2022. Bucak Ekolojik Koşullarında İtalyan Çimi (*Lolium multiflorum* L.) Çeşitlerinin Bazı Verim ve Kalite Unsurlarının Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 502-508.

**To Cite:** Acar E, Balabanlı C, Bıçakçı E, 2022. A Research on Determination of Some Yield and Quality Elements of Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) Varieties on Bucak Ecological Conditions. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 502-508.

**Bucak Ekolojik Koşullarında İtalyan Çimi (*Lolium multiflorum* L.) Çeşitlerinin Bazı Verim ve Kalite Unsurlarının Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma**

Emrah ACAR<sup>1</sup>, Cahit BALABANLI<sup>1</sup>, Emre BIÇAKÇI<sup>\*</sup>

**ÖZET:** Bu araştırma, dokuz farklı italyan çimi çeşidinin bazı verim ve kalite özelliklerini incelemek amacıyla 2019-2020 yılı vejetasyon döneminde Burdur ili Bucak ilçesinde yürütülmüştür. Deneme, tesadüf blokları deneme desenine göre üç tekerrürlü olarak kurulmuştur. Araştırmada Medoacus, Reis, Rambo, Trinova, Alberto, Baqueno, Devis, Efe-82 ve Bigboss isimli italyan çimi çeşitlerinin, ana sap uzunluğu, ana sap kalınlığı, yeşil ot verimi, kuru ot verimi, ham protein oranı, ham protein verimi, ADF ve NDF oranları araştırılmıştır.

Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, italyan çimi çeşitlerinin ana sap uzunlukları 100.00-107.33 cm, ana sap kalınlıkları 2.53-3.95 mm, yeşil ot verimleri 3108-5550 kg da-1, kuru ot verimleri 1147.25-1634.43 kg da-1, ham protein oranları %11.23-15.47, ham protein verimleri 152.93-219.77 kg da-1, ADF oranları %33.51-36.61 ve NDF oranları %58.31-62.22 arasında bulunmuştur. Çeşitlerin ana sap kalınlıkları, yeşil ot verimleri, ham protein oranları, ADF ve NDF oranları arasındaki farklılıklar %1 düzeyinde önemli bulunurken, kuru ot verimleri ve ham protein verimi ortalamaları arasındaki farklılıkların %5 düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda en yüksek yeşil ot verimi, kuru ot verimi ve ham protein oranı Sorge, Rambo, Trinova çeşitlerinden elde edilmiş, ADF ve NDF değerleri bakımından ise en düşük değerler Notion ve Efe 82 çeşitlerinde tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Yeşil ot verimi, kuru ot verimi, ham protein oranı, ham protein verimi, ADF oranı, NDF oran

**A Research on Determination of Some Yield and Quality Elements of Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) Varieties on Bucak Ecological Conditions**

**ABSTRACT:** This research was carried out in Bucak district of Burdur province during the vegetation period of 2019-2020 to determine some yield and quality characteristics of nine different Italian ryegrass varieties. The experiment was established in randomized block design with three replications. In the study, the main stem length, main stem thickness, green herbage yield, hay yield, crude protein ratio, crude protein yield in Italian grass varieties named Medoacus, Reis, Rambo, Trinova, Alberto, Baqueno, Devis, Efe-82, and Bigboss. ADF rate and NDF rates have been investigated.

Main stem lengths of Italian grass varieties were determined between 100.00-107.33 cm, main stem thickness was 2.53-3.95 mm, green herbage yields were 3108-5550 kg da-1, hay yields were 1147.25-1634.43 kg da-1, crude protein ratio was 11.23-15.47%, crude protein yield was 152.93-219.77 kg da-1, ADF rates 33.51-36.61% and NDF rates 58.31-62.22%. While the differences between main stem thickness, green herbage yields, crude protein ratios, ADF and NDF ratios of the varieties were found to be significant at the level of 1%, the differences between the hay yields and crude protein yield averages of the varieties were found to be significant at the 5% level. The highest green herbage yield, hay yield and crude protein ratio were obtained from Sorge, Rambo, Trinova varieties, and the lowest values in terms of ADF and NDF values were determined in Notion and Efe-82 varieties.

**Keywords:** Green herbage yield, hay yield, crude protein ratio, crude protein yield, ADF, NDF ratio.

<sup>1</sup>Emrah ACAR ([Orcid ID: 0000-0001-6595-7493](https://orcid.org/0000-0001-6595-7493)), Cahit BALABANLI ([Orcid ID: 0000-0001-8894-6244](https://orcid.org/0000-0001-8894-6244)), Emre BIÇAKÇI ([Orcid ID: 0000-0002-0258-4885](https://orcid.org/0000-0002-0258-4885)), Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Isparta, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Emre BIÇAKÇI, e-mail: emrebicakci@isparta.edu.tr

Bu çalışma Emrah ACAR'ın Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.



## GİRİŞ

2019 yılı TÜİK verilerine göre, ülkemizde yaklaşık 18 milyon sığır, 37 milyon koyun ve 11 milyon keçi bulunmaktadır. Bu hayvanların beslenme gereksiniminin karşılanabilmesi için yılda yaklaşık 85 milyon ton kaba yeme ihtiyaç duyulmaktadır (TÜİK, 2019). Türkiye'nin 2019 yılı çayır, mera (11.7 milyon ton) ve yem bitkileri (55 500 000 ton) kaynaklı üretimi toplam 67 200 000 ton olarak belirlenmiştir. 500 kg canlı ağırlığındaki bir sığır (1 BBHB) için yaşama payı ham protein (HP) gereksinimi 370 gr, metabolik enerji gereksinimi 14000 kcal'dir. 1 BBHB'nin yaşama payı besin madde gereksinimini karşılamak için 4 kg gün<sup>-1</sup> kaliteli kuru ot ve 10 kg gün<sup>-1</sup> kaliteli yeşil ot veya silajlık mısır gerekmektedir. Buna göre 2019 yılında Türkiye'nin kaliteli kaba yem açığı, toplam yem bitkileri üretimine göre 28 400 000 ton civarındadır (Özkan, 2020; Alçiçek ve ark., 2010).

Buğdaygil yem bitkilerinden birisi olan italyan çimi (*Lolium multiflorum* L.), son zamanlarda ekim alanı artan yem bitkilerindedir. Ülkemizde kışları ılıman geçen, özellikle Akdeniz ve Ege bölgeleri başta olmak üzere hemen hemen her bölgede İtalyan çimi üretimi gerçekleştirilmektedir. İtalyan çimi, uygun iklim ve toprak koşulları sağlandığında hızlı gelişim gösterebilen ve birden fazla biçim verebilen, tek yıllık, diğer yem bitkileri ile karışıma girebilen ideal bir yem bitkisi olarak bilinmektedir (Çolak, 2015). Ayrıca; italyan çimi, süt ineklerinin beslenmesinde çok fazla yarar sağlamanın yanı sıra silo yemi üretiminde kullanılmakta ve toprak verimliliği uygun olmayan arazilerin ıslahında da etkin rol oynadığı bilinmektedir (Elçi, 2005).

Bucak yöresinde başlıca kaba yem kaynakları yonca ve mısır silajıdır (TÜİK, 2019). Araştırma alanı (Bucak), Akdeniz bölgesi ile Göller yöresi arasında geçiş güzergâhında bulunmakta olup, iklim koşulları itibari ile yarı ılıman iklim kuşağında yer aldığı için tek yıllık çim yetiştiriciliği açısından oldukça uygun bir alandır. Yöre, hayvancılık yönünden büyük bir potansiyele sahiptir. Süt besiciliğinde ülke sıralamasında birim hayvan başına en fazla süt verimine sahip olan Burdur ili ve ilçelerinde kaliteli kaba yem üretimi büyük önem arz etmektedir.

Bu araştırma; bitkisel üretim ve süt besiciliğinde ülke sıralamasında önemli bir yere sahip olan Bucak ekolojik koşullarında dokuz farklı italyan çimi çeşidinin ot verimi ve bazı kalite özelliklerinin belirlenmesi amacı ile 2019-2020 vejetasyon döneminde yürütülmüştür.

## MATERYAL VE METOT

Bu araştırma, 2019-2020 vejetasyon döneminde Burdur ili, Bucak ilçesine bağlı Kuşbaba Köyüde (37°27'21"K ve 30°26'04"D) çiftçi arazisinde yürütülmüştür. Denemenin kurulduğu tarla toprağı siltli tınlı yapısında olup, %1.7 organik madde içeriğine sahiptir. Deneme alanı toprağı, hafif tuzlu ve %23.6 CaCO<sub>3</sub> değeri ile fazla kireçli bir yapıya sahipken toprak reaksiyonu bakımından hafif alkali (pH= 7.9) özelliktedir.

Araştırma alanına ait iklim özellikleri Çizelge 1'de gösterilmiştir. Buna göre; 2019-2020 Ekim-Mayıs ayları arası toplam yağış miktarı 479.00 mm, vejetasyon dönemindeki ortalama sıcaklık değeri 9.86°C ve nispi nem ortalaması %68.78 olarak ölçülmüştür. Bu değerler uzun yıllar ortalamalarına oldukça yakındır.

Araştırmada materyal olarak kullanılan italyan çimi çeşitleri (Medoacus, Reis, Rambo, Trinova, Alberto, Baqueano, Devis, Efe-82 ve Bigboss), özel sektörden temin edilmiştir. Çalışma, 20 Kasım 2019 tarihinde tesadüf blokları deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak kurulmuş, araştırmada parseller sıra arası 30 cm olan 6 sıradan oluşturulmuş ve parsel uzunluğu 5 m, parsel eni 1.8 m olacak şekilde ekim yapılmıştır. Buna göre her bir parsel alanı 9 m<sup>2</sup> olup, parseller ve bloklar arasında 1'er metre boşluk bırakılmıştır. Ekimden önce deneme alanına sırasıyla pulluk, diskaro, tırmık çekilmiş olup, ekimden

sonra merdane ile toprak bastırılmıştır. Ekimde 5 kg da<sup>-1</sup> tohumluk kullanılmış, araştırma kıraç şartlarda gerçekleştirilmiş ve ekimle birlikte dekara 20 kg Azot ve 5 kg Fosfor uygulanmıştır (Türk ve ark., 2019).

**Çizelge 1.** Deneme alanına ait iklim verileri (\*)

Aylar	Yağış (kg m <sup>-2</sup> )		Sıcaklık (°C)		Nispi nem (%)	
	2005-2019	2019-20	2005-2019	2019-20	2005-2019	2019-20
<b>Ekim</b>	62.62	10.90	14.90	16.90	61.60	60.10
<b>Kasım</b>	43.22	38.90	9.90	10.70	70.70	73.90
<b>Aralık</b>	72.12	87.20	5.80	6.00	78.10	78.30
<b>Ocak</b>	111.82	62.00	2.90	3.10	78.60	66.70
<b>Şubat</b>	53.04	78.80	5.80	4.80	75.10	75.80
<b>Mart</b>	77.52	45.20	8.50	8.50	68.00	68.00
<b>Nisan</b>	22.30	46.40	12.30	12.00	61.70	67.00
<b>Mayıs</b>	45.76	109.60	16.50	16.90	64.40	60.40
<b>Toplam</b>	<b>488.40</b>	<b>479.00</b>				
<b>Ortalama</b>			<b>9.58</b>	<b>9.86</b>	<b>69.78</b>	<b>68.78</b>

(\*) Anonim., 2020

Hasat işlemleri bitkilerin tam çiçeklenme döneminde (20 Mayıs 2020) orak yardımıyla gerçekleştirilmiş olup, tek biçim yapılmıştır. Hasat yapılırken her parselin kenarlarından birer sıra, parsel başı ve sonundan 50'şer cm'lik kısımlar kenar tesiri olarak değerlendirme dışı bırakılmış, kalan kısım hasat ve gözlem alanı olarak kullanılmıştır.

Çalışma kapsamında ana sap uzunluğu, ana sap kalınlığı, yeşil ot verimi, kuru ot verimi, ham protein oranı, ham protein verimi, ADF ve NDF oranları incelenmiştir. Her parselden tesadüfi olarak alınan on bitkinin, ana sapının toprak seviyesinden en üst seviyesine kadar olan kısmı cetvel kullanılarak ölçülmüştür (Cevheri ve Avcıoğlu, 1998), bitki boyu ölçümü için seçilen bitkilerin saplarının 1. ve 2. boğumları arası 1 10 mm<sup>-1</sup> bölmeli kumpas ile ölçülerek ana sap kalınlığı saptanmıştır (Yazgan ve ark., 1992), her parselde gözlem ve hasat amacı ile ayrılan alan tam çiçeklenme döneminde biçilerek hasat edilmiş, elde edilen yeşil ot tartılmış ve bulunan değer dekara çevrilerek yeşil ot verimi hesaplanmıştır (Cevheri ve Avcıoğlu, 1998), her parselden biçilen yeşil otların arasından tesadüfen alınan 500 gramlık yeşil ot örnekleri, kurutma dolabında 48 saat boyunca 70°C'de materyaller sabit ağırlığa gelene kadar kurutulduktan sonra 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiş ve 1 gr hassasiyetli terazide tartılarak kuru ot ağırlıkları belirlenmiştir. Parsel bazında saptanan kuru ot oranlarının parsellerin yeşil ot verimi değerleri ile çarpılması sonucunda dekara kuru ot verimi değerleri elde edilmiştir (Cevheri ve Avcıoğlu, 1998). Parsellerden alınan örnekler kurutulduktan sonra öğütülmüş örnekler üzerinden Kjeldahl yöntemine göre azot tayini yapılmış, elde edilen oranlar 6.25 katsayısıyla çarpılarak ham protein oranları % olarak belirlenmiştir (Kacar ve İnal, 2008), Her bir parsel için elde edilen ham protein oranı ile kuru ot verimlerinin çarpımı sonucu ham protein verimleri elde edilmiş (Cevheri ve Avcıoğlu, 1998), parsellerden alınmış ve öğütülmüş numuneler üzerinden yapılmış olan analizlerle ADF ve NDF oranları Fiber Analyser cihazı kullanılarak ANKOM'un bildirdiği metoda göre yapılmıştır (ANKOM, 2020).

Araştırmadan elde edilen tüm veriler SAS istatistik paket programında "Tesadüf Blokları Deneme Desenine" uygun olarak varyans analizine tabi tutulmuştur. Varyans analizi sonucunda istatistiki açıdan önemli farklılıkların bulunduğu ortalamaların karşılaştırılmasında Duncan testinden yararlanılmıştır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Araştırma verilerinin varyans analiz sonuçları incelendiğinde, ana sap uzunluğu hariç bütün parametreler bakımından çeşitler arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar olduğu görülmektedir. Ana sap kalınlığı, yeşil ot verimi, ham protein oranı, ADF ve NDF değerleri bakımından çeşitler arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan %1 seviyesinde önemli bulunurken kuru ot verimi ve ham protein verimi değerleri açısından çeşitler arasındaki farklılıklar %5 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 2).

Araştırmada ele alınan italyan çimi çeşitlerinin verim bazı özelliklerine ilişkin ortalama değerler Çizelge 3'te verilmiştir. Buna göre çeşitlerin ana sap kalınlığı ortalamaları 2.53 mm ile 3.95 mm arasında değişiklik göstermiştir. En yüksek ana sap kalınlığı değer Sorge çeşidinde 3.95 mm olarak bulunmuş, en düşük değerler Devis ve Bigboss çeşitlerinde sırasıyla 2.53 ve 2.82 mm olarak ölçülmüştür. Çalışmamızda ana sap kalınlığına ilişkin elde ettiğimiz bulguların; Taşsever (2019)'in bildirdiği (3.00-3.61 mm), Darvishi (2009)'nin Ankara'da gerçekleştirdiği çalışmasında tespit ettiği (2.53-3.30 mm), Kayaalp (2019)'in Tokat koşullarında bazı tek yıllık çim çeşitlerinin adaptasyonunu araştırdığı çalışmasında belirttiği ana sap kalınlığı değerleri ile benzerlik gösterdiği görülmektedir.

**Çizelge 2.** İtalyan çimi çeşitlerinde incelenen özelliklere ait varyans analizi sonuçları

V.K.	Ana sap uzunluğu	Ana sap kalınlığı	Yeşil ot verimi	Kuru ot verimi	Ham protein oranı	Ham protein verimi	ADF oranı	NDF oranı
<b>Blok</b>	94.40	0.05	541 441	49 448	0.54	1749.30	0.01	0.56
<b>Çeşit</b>	17.40	0.47**	1 685 634**	86528*	5409**	1298*	2.7846**	3.58**
<b>Hata</b>	123.30	0.03	184 195	22 285	1066	398.00	0.51	0.39

(\*\*) P≤0.01 düzeyinde farklılık göstermektedir.

(\*) P≤0.05 düzeyinde farklılığı göstermektedir.

**Çizelge 3.** İtalyan çimi çeşitlerinde incelenen özelliklere ilişkin ortalama değerler\*

Çeşitler	Ana sap uzunluğu (cm)	Ana sap kalınlığı (mm)	Yeşil ot verimi (kg da <sup>-1</sup> )	Kuru ot verimi (kg da <sup>-1</sup> )	Ham protein oranı (%)	Ham protein verimi (kg da <sup>-1</sup> )	ADF oranı (%)	NDF oranı (%)
Medoacus	104.33	3.25bc	4440 b	1371.23 a-c	12.46 cd	171.77 bc	34.60 bc	60.07 bc
Sorge	100.00	3.95 a	5550 a	1474.55 ab	11.23 cd	165.46 bc	34.01 bc	58.99 cd
Rambo	104.67	3.15bc	4218 bc	1634.43 a	13.49 bc	219.77 a	36.61 a	62.22 a
Trinova	103.33	3.23bc	3552 cd	1207.75 bc	15.47 a	185.87 a-c	35.24 b	60.33 b
Notion	103.67	3.07 cd	4500 b	1491.53 ab	12.68 cd	189.67 a-c	33.75 c	58.31 d
Baqueno	105.33	3.10 cd	3108 d	1147.25 c	13.30bc	152.93 c	35.32 b	60.53 b
Devis	100.00	2.53 e	3256 d	1152.12 c	14.96 ab	171.57 bc	34.75 bc	60.26 b
Efe 82	105.00	3.46 b	4428 b	1473.62 ab	13.44 bc	197.58 ab	33.51 c	59.50 bc
Bigboss	107.33	2.82 de	4218 bc	1336.06 bc	12.06 cd	160.96 bc	34.16 bc	59.91 bc
Ortalama	103.74	3.17	4141.11	1365.39	13.23	179.51	34.66	60.01

\*: Aynı sütun içerisinde benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan testine göre P≤0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

En yüksek yeşil ot verimi değerleri 5550 kg da<sup>-1</sup> ile Sorge çeşidinden elde edilirken, en düşük verim 3108 kg da<sup>-1</sup>, 3256 kg da<sup>-1</sup> ve 3552 kg da<sup>-1</sup> ile sırasıyla Baqueno, Devis ve Trinova çeşitlerinde tespit edilmiştir. Yeşil ot verimi bakımından elde edilen veriler; Parlak (2005)'in Çukurova şartlarında elde ettiği 4583.33 kg da<sup>-1</sup>, Kayaalp (2019)'in Tokat koşullarında belirlediği 3428.55-4491.88 kg da<sup>-1</sup> ve Lale (2020)'nin Bingöl ekolojik şartlarında tespit ettiği 3377.3-4457.67 kg da<sup>-1</sup> yeşil ot verimi değerleri ile benzerlik gösterdiği buna karşın, Kuşvuran ve Tansı (2005)'nin Çukurova'da yaptığı araştırmadan alınan 6014.51-8075.37 kg da<sup>-1</sup>, Kesiktaş (2010)'in Karaman ekolojik koşullarında yürüttüğü çalışmasında aldığı 2479.7 kg da<sup>-1</sup> yeşil ot verimi değerleri ile uyum göstermediği görülmüştür. Bu farklılıkların, çalışmaların yapıldığı alanların ekolojik koşullarından ve çeşitlerin genetik yapılarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Denemeden elde edilen kuru ot verimi değerleri incelendiğinde en yüksek değerlerin 1634.43 kg da<sup>-1</sup> ile Rambo, 1491.53 kg da<sup>-1</sup> ile Notion, 1474.55 kg da<sup>-1</sup> ile Sorge, 1473.62 kg da<sup>-1</sup> ile Efe 82 çeşitlerinden; en düşük kuru ot verimi değerlerinin ise 1147.25 kg da<sup>-1</sup> ile Baqueno, 1152.12 kg da<sup>-1</sup> ile Devis, 1207.75 kg da<sup>-1</sup> ile Trinova ve 1336.06 kg da<sup>-1</sup> ile Bigboss çeşitlerinden elde olduğu görülmektedir (Çizelge 3). Çalışmada belirlenen kuru ot verimi değerleri; Açıkgoz (2001)'ün elde ettiği 1250-2000 kg da<sup>-1</sup>, Lale (2020)'nin bildirdiği 808.13-1051.83 kg da<sup>-1</sup>, Kuşvuran ve Tansı (2005)'nin Çukurova koşullarında yürüttükleri araştırmada elde ettikleri 1187.09-1493.2 kg da<sup>-1</sup>, Parlak (2005)'in Çukurova şartlarında yaptığı çalışmada elde ettiği 1243.2 kg da<sup>-1</sup> kuru ot verimi değerleri ile benzerlik göstermektedir.

Çalışmada ham protein oranı bakımından en yüksek değere sahip çeşitler %15.47 ile Trinova ve %14.96 ile Devis iken en düşük değere sahip çeşitler %11.23 ile Sorge, %12.06 ile Bigboss, %12.46 ile Medoacus ve %12.68 ile Notion çeşitleri olmuştur. Çalışmada %11.23 ile %15.47 arasında ortaya çıkan ham protein oranı ortalamaları; Taşsever (2019)'in Kahramanmaraş şartlarında elde ettiği (%8.07-13.45), Pak (2019)'in Isparta ekolojik koşullarında belirlediği (%8.13-13.90) ve Kesiktaş (2010)'in Karaman'da yaptığı araştırmada tespit ettiği (%7.90-14.60) sonuçlar ile uyumlu bulunmuştur.

Ham protein verimi ortalamaları incelendiğinde en yüksek değerlerin 219.77 kg da<sup>-1</sup> ile Rambo, 197.58 kg da<sup>-1</sup> ile Efe 82 çeşitlerinden elde edildiği, en düşük değerlerin ise 152.93, 160.96, 165.46, 171.57 ve 171.77 kg da<sup>-1</sup> ile sırasıyla Baqueno, Bigboss, Sorge, Devis ve Medoacus çeşitlerinden elde edildiği görülmektedir. Bulgularımız; Lale (2020)'nin Bingöl şartlarında yapmış olduğu denemede tespit ettiği 157.80-179.57 kg da<sup>-1</sup>, ve Serin ve ark., (1996)'nin elde ettiği 141.5 kg da<sup>-1</sup>, Akgül (2001)'ün bulduğu 79.8 kg da<sup>-1</sup> protein verimi, Kuşvuran ve Tansı (2005)'nin 182.97-231.88 kg da<sup>-1</sup> elde ettikleri ham protein verimi değerleri ile benzerlik göstermektedir.

Denemede çeşitlerin ADF oranı ortalamaları %33.51 ile %36.61 arasında değişim göstermiş, en yüksek ADF oranı %36.61 ile Rambo çeşidinden elde edilmiş, en düşük ADF oranları ise Efe 82 (%33.51), Notion (%33.75), Sorge (%34.01), Bigboss (%34.16), Medoacus (%34.60) ve Devis (%34.75) çeşitlerinden elde edilmiştir. Elde ettiğimiz verilerin; Özdemir (2017)'nin Bursa'da gerçekleştirdiği çalışmasında saptadığı %30.51-34.16, Meeske ve ark. (2009)'nin %31.4-32.3 arasında bildirdiği, Çolak (2015)'in Ankara koşullarında yürüttüğü denemelerinden elde ettiği %31.10-32.08 aralığındaki ADF oranı değerleri ile benzerlik göstermektedir.

İtalyan çimi çeşitlerinin NDF oranları %58.31 ile %62.22 arasında değişim göstermiştir. En yüksek NDF oranı %62.22 ile Rambo çeşidinde belirlenmiş, en düşük NDF oranları ise %58.31 ile Notion ve %58.98 ile Sorge çeşitlerinde tespit edilmiştir. Denemeden elde edilen NDF oranları; Teutsch ve Smith (2001)'in Virginia'da gerçekleştirdiği çalışmadan elde ettikleri %42.2-50.6, Viviani Rossi ve ark. (1994)'nin bildirdiği %47.7 ile %54.7, Çolak (2015)'in Ankara ekolojik koşullarında yürüttüğü

denemeden elde ettiği %54.14 ile %55.86 arasındaki NDF değerlerinden daha yüksek olup, Taşsever (2019)'in bildirdiği %57.32 - %62.38, Pak (2019)'ın Isparta koşullarında yürüttüğü çalışmasından elde ettiği %45.15-61.30 ve Kuşvuran ve ark. (2014) tarafından %58.7 olarak tespit edilen NDF değerleri ile uyum içerisindedir. Araştırma sonuçları arasında ortaya çıkan farklılıkların ekolojik koşulların yanında, denemelerde kullanılan çeşitler ve hasat zamanları gibi farklı uygulamalardan da kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

## SONUÇ

Bucak ekolojik koşullarında italyan çimi çeşitlerinin verim ve bazı kalite özelliklerinin incelendiği bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre; en yüksek ana sap kalınlığı ve yeşil ot verimi Sorge çeşidinden edilmiştir. Kuru ot verimi bakımından sırasıyla Rambo, Sorge, Notion, Efe 82 ve Medoacus çeşitlerinin denemede yer alan diğer çeşitlerden daha üstün olduğu saptanmıştır. Ham protein oranı bakımından Trinova ile Devis çeşitlerinin en yüksek değere sahip olduğu, ham protein verimi açısından ise Rambo, Trinova, Notion ve Efe 82 çeşitlerinin en yüksek değere sahip oldukları belirlenmiştir. En düşük ADF oranları sırasıyla Medoacus, Sorge, Notion, Devis ve Bigboss çeşitlerinde tespit edilirken, en düşük NDF oranları Sorge ve Notion çeşitlerinde belirlenmiştir.

Araştırmadan elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde gerek verim ve gerekse yüksek kaliteli ot üretimi için Bucak ve benzer ekolojik özelliklere sahip bölgeler için Rambo, Efe-82, Notion ve Trinova çeşitlerinin tercih edilmesinin daha uygun olacağı sonucuna varılmıştır. Ancak Bingöl ekolojik koşullarında yapılan çalışmada; en yüksek yeşil ot verimi bakımından Trinova, Baqueano ve Caramba çeşitlerinin, ham protein verimleri bakımından Baqueano, Devis ve Caramba çeşitlerinin, en yüksek kuru ot verimi bakımından Vallivert, Devis ve Caramba çeşitlerinin, en düşük NDF bakımından Vespolini çeşidi ve kuru madde tüketimi oranı ve nispi yem değeri bakımından ise Vallivert çeşidinin ön plana çıktığı belirlenmiştir. Dolayısıyla bu çalışmanın daha uzun süre denenmesi gerektiği önem arz etmektedir. Çeşitler hakkında daha sağlıklı bir karar verebilmek için çalışmanın ileriki yıllarda da yürütülmesinin faydalı olacağı kanaatine varılmıştır.

## Çıkar Çatışması veya Conflict of Interest

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı veya Author's Contributions

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Açıkgöz E, 2001. Yem Bitkileri. Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayınları, Bursa-Türkiye.
- Akgül F, 2001. Ankara şartlarında farklı sıra aralığı ile ekim ve azotla gübrelemenin tek yıllık çim (*Lolium multiflorum* L.)'in ot verimi ve kalitesine etkileri, Çanakkale On Sekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Aktar Y, 2019. Şanlıurfa koşullarında tek yıllık italyan çim bitkisi (*Lolium multiflorum* L.) çeşitlerinin verim ve verim unsurları üzerine araştırmalar, Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Alçipek A, Kılıç A, Ayhan V, Özdoğan M, 2010. Türkiye'de kaba yem üretimi ve sorunları. Ziraat Mühendisleri Odası Dergisi, 10 s.
- ANKOM 2020. <https://www.ankom.com/analytical-methods-support/fiber-analyzer-delta> (Erişim tarihi: 05.05.2020)
- Cevheri A C, Avcıoğlu R, 1998. Bornova koşullarında 11 farklı yonca çeşidinin verim ve diğer bazı verim özellikleri üzerinde araştırmalar; Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Çolak E, 2015. Azotlu gübre dozlarının italyan çimi (*Lolium italicum* L.) çeşitlerinin ot verimi, kalitesi ve bazı tarımsal özelliklerine etkisi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Darvishi A, 2009. Bazı tek yıllık çim (*Lolium multiflorum* L.) çeşitlerinin morfolojik özellikleri ve yem verimleri, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

- Elçi Ş, 2005. Baklagil ve Buğdaygil Yem Bitkileri. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Yayınevi Ankara-Türkiye.
- Kaçar B, İnal A, 2008. Bitki Analizleri. Nobel Yayınları Ankara-Türkiye.
- Kayaalp N, 2019. Tokat ekolojik şartlarında bazı tek yıllık çim (*Lolium multiflorum* Lam.) çeşitlerinin adaptasyonu, Yozgat Bozok Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Kesiktaş M, Tükel T, 2010. Karaman’da farklı ekim zamanları ve azotlu gübre dozu uygulamalarının italyan çiminin (*Lolium multiflorum* westernwoldicum Caramba) yem verimine etkileri. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Kuşvuran A, Kaplan M, Nazlı R İ, 2014. Effects of ratio and row spacing in hungarian vetch (*Vicia pannonica* Crantz.L.) and annual ryegrass (*Lolium multiflorum*Lam.) intercropping system on yield and quality under semi arid climate conditions. Turkish Journal of Field Crops. 19 (1) 118-128.
- Kuşvuran A, Tansı V, 2005. Çukurova koşullarında farklı biçim sayısı ve azot dozunun tek yıllık çim (*Lolium multiflorum* cv. Caramba)’in ot ve tohum verimine etkisinin saptanması. Türkiye 6. Tarla Bitkileri Kongresi. 5-9 Eylül, Antalya.
- Lale V, 2020. Bingöl şartlarında bazı italyan çimi (*Lolium multiflorum* Lam.) çeşitlerinin ot verimi ve kalitesinin belirlenmesi, Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Meeske R, Botha P R, Van Der Merwe G D, Greyling J F, Hopkins C, Marais J.P, 2009. Milk production potential of two ryegrass cultivars with different total non-structural carbohydrate contents. South African Journal of Animal Science 39 (1).
- OECD 2015. Meat Consumption (indicator), <https://data.oecd.org/agroutput/meat-consumption.html> (Erişim tarihi: 11 Aralık 2020).
- Özdemir S, 2017. Farklı azot dozlarının italyan çiminin (*Lolium multiflorum* western woldicum Caramba) ot verimi ve kalitesi üzerine etkiler, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Özkan U, 2020. Comparative overview and evaluation of Turkey’s forage crops. Agriculture. Turkish Journal of Agricultural Engineering Research (TURKAGER), 1(1), 29-43.
- Pak M, 2019. Azotlu gübre dozlarının bazı tek yıllık çim çeşitlerinin ot verimi ve kalitesi üzerine etkileri, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Parlak E L, 2005. Çukurova koşullarında bakla (*Vicia faba* L.)’nın, arpa (*Hordeum vulgare* L.) triticale (*Triticale*), Buğday (*Triticum aestivum* L.) ve tek yıllık çim (*Lolium multiflorum* Lam.) İle karışımlarının biomass üretim kapasitelerinin saptanması üzerine bir araştırma. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Serin Y, Tan M, Şeker H, 1996. Azotla gübreleme ve ekim oranının tek yıllık çim (*Lolium multiflorum* Lam.)’de ot ve ham protein verimi ile otun ham protein oranına etkileri. Türkiye 3. Çayır Mera ve Yem Bitkileri Kongresi, 17-19 Haziran 1996, Erzurum. 732-738.
- Simic A, Vuckovic S, Kresovic M, Vrbnicin S, Bozic D, 2009. Changes of crude protein content in italian ryegrass influenced by spring nitrogen application. Biotechnology in Animal Husbandry 25 (5-6), p 1171-1179. Belgrade–Zemun Serbia.
- T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2019 Mera Alanlarının Yıllar İtibariyle Değişimi. <https://www.tarimorman.gov.tr/Konular/Bitkisel-Uretim/Cayir-Mera-ve-Yem-Bitkileri?Ziyaretci=Ciftci> (Erişim tarihi: 10.08.2019).
- Taşsever M N, 2019. Kahramanmaraş şartlarında bazı tek yıllık çim (*Lolium multiflorum* Lam.) Çeşitlerinin bitkisel özellikleri ve yem değerleri, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Teutsch C, ve Smith R, 2001. Does annual ryegrass fit into Virginia’s pasture systems. Crop and Soil Environmental News, September 2001. USA.
- TÜİK, 2019. Hayvancılık İstatistikleri. [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1002](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1002) (Erişim Tarihi: 10.07.2020).
- Türk M, Pak M, ve Bıçakçı E, 2019. Farklı azotlu gübre dozlarının bazı tek yıllık çim (*Lolium multiflorum* l.) Çeşitlerinin ot verimi ve kalitesi üzerine etkileri. Ziraat Fakültesi Dergisi, 14(2), 219-225.
- Viviani Rossi E M, Gutierrez L M, Moreno E, Mazzanti A, 1994. Nitrogen fertilizer effects upon silage composition and quality of *Lolium multiflorum* L. CC 276, (7620) Argentina.
- Yazgan M E, Ekiz H, Karadeniz N, Kendir H, 1992. Ankara koşullarında yeşil saha tesisinde kullanılacak önemli çim türlerinin belirlenmesinde bazı morfolojik ve fenolojik karakterler üzerinde bir araştırma. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. No.1277.

**Atf İçin:** Karadeniz M, Kökten K, 2022. Elazığ Koşullarında İskenderiye Üçgülü ile İtalyan Çimi Karışım Oranlarının Verim ve Kalite Üzerine Etkileri. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 509-517.

**To Cite:** Karadeniz M, Kökten K, 2022. The Effects on Yield and Quality of Berseem Clover and Italian Ryegrass Mixture Ratios in Elazığ Conditions. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 509-517.

### Elazığ Koşullarında İskenderiye Üçgülü ile İtalyan Çimi Karışım Oranlarının Verim ve Kalite Üzerine Etkileri

Mustafa KARADENİZ<sup>1</sup>, Kağan KÖKTEN<sup>2\*</sup>

**ÖZET:** Bu çalışma farklı familyalara ait yem bitkilerinin farklı karışım oranları (İskenderiye üçgülü:İtalyan çimi; %100:0, %80:20, %60:40, %40:60, %20:80 ve %0:100) ile ot kalitesine ve verimine etkisinin belirlenmesi amacı ile yürütülmüştür. Çalışmada, materyal olarak Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsüne ait İskenderiye üçgülü (*Trifolium alexandrinum* L.)'nin Derya çeşidi ile Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsünden sağlanan İtalyan çimi (*Lolium multiflorum* Lam.)'nin Elif çeşidinde bitki boyu, yeşil ot ve kuru ot verimleri, yeşil otta ve kuru otta üçgül oranları, ham protein oranı ve verimi, asit deterjanda çözünmeyen lif, nötral deterjanda çözünmeyen lif, sindirilebilir kuru madde, kuru madde tüketimi oranları ve nispi yem değeri gibi karakterler araştırılmıştır. Deneme, 4 tekrarlamalı olarak tesadüf blokları deneme desenine göre 2020 yılının yaz döneminde Elazığ il merkezine ait Bahçekapı köyünde yürütülmüştür. Çalışma bulgularına göre; karışımların ortalama yeşil ot verimi 3784.9 kg da<sup>-1</sup>, kuru ot verimi 1210.8 kg da<sup>-1</sup>, ham protein verimi 146.6 kg da<sup>-1</sup> olarak tespit edilmiştir. Karışımların ham protein, asit deterjanda çözünmeyen lif (ADF), nötral deterjanda çözünmeyen lif (NDF), sindirilebilir kuru madde (SKM), kuru madde tüketimi (KMT) oranları ve nispi yem değeri (NYD) sırasıyla %12.04, %35.7, %50.9, %61.0, %2.36 ve 112.15 olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda; Elazığ ekolojik koşullarında kuru ot, yeşil ot, ham protein oranı ve verimi bakımından en uygun karışım oranlarının %80 İskenderiye üçgülü + %20 İtalyan çimi karışımı ile %60 İskenderiye üçgülü + %40 İtalyan çimi karışımı olduğu belirlenmiştir. Karışımlarda İskenderiye üçgülünün daha yoğun olduğu parsellerde kuru ot, yeşil ot ve ham protein verimleri ile ham protein oranlarının daha yüksek çıktığı görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** İskenderiye üçgülü, İtalyan çimi, ham protein oranı ve yeşil ot verimi.

#### The Effects on Yield and Quality of Berseem Clover and Italian Ryegrass Mixture Ratios in Elazığ Conditions

**ABSTRACT:** This study was carried out with the aim of determining the effect of forage plants belonging to different families on herbage quality and yield with different mixing ratios (Berseem clover:Italian ryegrass; 100:0%, 80:20%, 60:40%, 40:60%, 20:80% and 0:100%). In the study, plant height, green herbage and dry herbage yields, clover ratios in green herbage and dry herbage, crude protein ratio and yield, acid detergent fiber (ADF), neutral detergent fiber (NDF), digestible dry matter (DDM), dry matter intake (DMI) rates and relative feed value (RFV) were investigated in Derya variety of berseem clover (*Trifolium alexandrinum* L.) belonging to Eastern Mediterranean Agricultural Research Institute and Elif variety of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) obtained from Aegean Agricultural Research Institute. The experiment was carried out with 4 replications according to the randomized blocks trial design in the summer term of 2020 in Bahçekapı village of Elazığ city center. According to the study findings; the average green herbage yield of mixtures was found to be 3784.9 kg da<sup>-1</sup>, dry herbage yield was 1210.8 kg da<sup>-1</sup>, and crude protein yield was 146.6 kg da<sup>-1</sup>. Crude protein, acid detergent fiber (ADF), neutral detergent fiber (NDF), digestible dry matter (DDM), dry matter intake (DMI) ratios and relative feed value (RFV) of the mixtures were determined as 12.04%, 35.7%, 50.9%, 61.0%, 2.36%, and 112.15, respectively. As a result of this study; it was determined that the most suitable mixture ratios in terms of dry herbage, green herbage and crude protein yields and crude protein ratio were 80% Berseem clover + 20% Italian ryegrass and 60% Berseem clover + 40% Italian ryegrass mixtures in Elazığ ecological conditions. It was observed that the dry herbage, green herbage and crude protein yields and crude protein ratios were higher in the plots where the Berseem clover was more concentrated in the mixtures.

**Keywords:** Berseem clover, Italian ryegrass, crude protein ratio and green herbage yield

<sup>1</sup>Mustafa KARADENİZ (Orcid ID: 0000-0002-4833-0207), Bingöl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri ABD, Bingöl, Türkiye

<sup>2</sup>Kağan KÖKTEN (Orcid ID: 0000-0001-5403-5629), Bingöl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Bingöl, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Kağan KÖKTEN, e-mail: kkokten@bingol.edu.tr

<sup>†</sup>Bu çalışma Mustafa KARADENİZ'in Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

## GİRİŞ

Ülkemizdeki mevcut hayvancılık faaliyetlerinin en başta gelen sorunlardan biri yeterli ve kaliteli kaba yem üretiminin azlığıdır. Besleyicilik değeri yüksek olan kaba yemin temin edildiği alanlardan birisi olan çayır ve meralar yıllardır yapılan yanlış ve düzensiz uygulamalar ile aşırı ve erken otlatmalar sonucunda çayır meraların verim ve kalite yönünden değer kaybetmiş, farklı sebeplerle tarla tarımına açılmaları nedeniyle mera alanlarında azalmalar olmuştur (Şimşek, 2015). Çayır ve meralar hayvanların temel kaba yem kaynağı olmasının yanı sıra, yaban hayatına ev sahipliği yapması, doğal kaynakların sürdürülebilirliği ve korunması, canlıların çeşitliliği ve genetik kaynaklar yönünden büyük bir potansiyele sahip olması gibi çok sayıda ekolojik değere sahip tabii bitki örtüleridir (Ayan ve ark., 2020). Hayvancılığın geliştirilebilmesi için kaba yem ihtiyacının karşılanmasında nitelikli, bol ve ucuz bir yem kaynağına düzenli olarak ulaşabilme kabiliyetinin geliştirilmesi gerekmektedir. Yeşil yemler, kuru otlar ve silajlar gibi kaba yemlerin üretim maliyetlerinin çok fazla olmaması hayvancılık işletmelerinin daha karlı olmasını sağlamaktadır (Bilgen ve ark., 1996). Hayvancılık işletmelerinin ihtiyacı olan kaliteli kaba yem miktarını karşılayabilmek amacıyla çayır ve meraların ıslahı, yem bitkisi üretiminin artırılması, alternatif ve ucuz olan kaba yem bitkilerinin hayvansal üretimdeki kullanıma dahil edilmesi ve daha kaliteli kaba yem üretmek için yeni tekniklerin çiftçilere anlatılması gerekmektedir (Serin ve Tan, 2001, Yolcu ve Serin, 2008).

Günümüzde yüksek verimli, kalitesi yüksek ve ucuz kaba yem kaynağı olabilecek önemli yem bitkileri bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi de İtalyan çimi (*Lolium multiflorum* L.)'dir (Özkul ve ark., 2012). İtalyan çimi geniş yapraklı, çok lezzetli ve kolay sindirilebilen tek yıllık bir bitki olup, yüksek rakıma sahip yerlerde iki yıllık özellik de gösterebilmektedir. İtalyan çiminin enerji ve protein değeri yüksek olup, yeşil ot, kuru ot ve silajlık olarak değerlendirilebilmesi de mümkündür (Mut ve ark., 2020). Bitki gövdesinin çabucak sertleşmeden biçim zamanına kadar taze kalması nedeniyle ülkemizdeki mevcut hayvanlarımızın kaba yem ihtiyacını gidermek için iyi bir bitki olabileceği görülmektedir. Biçilip taze bir şekilde veya otlatılmak suretiyle hayvan beslemede kullanılan İtalyan çimi, kuru ot olarak ve silajı yapılarak da değerlendirilmektedir (Özkul ve ark., 2012). Birçok Akdeniz ülkesinde uzun yıllardan bu yana yetiştiriciliği yapılmakta olan İskenderiye üçgülü yıllık, yarı kurak bölgelere iyi adapte olabilen, serin mevsim baklagil yem bitkisidir. Bir defa biçilebildiği gibi birden fazla biçime sahip çeşitleri de bulunmaktadır. En yüksek ot verimi daha çok 1. ve 2. biçimlerden alınmakla birlikte, yem değeri yonca kadar önemli olan bir baklagil yem bitkisidir (Iannucci ve ark., 1996; Ranjbar, 2008). İskenderiye üçgülü yalın veya buğdaygillerle karışım halinde yetiştirilerek kaliteli kaba yem elde edilmektedir (Yücel ve ark., 2017).

Bu çalışmada, baklagil yem bitkisi olan İskenderiye üçgülü ve buğdaygil yem bitkisi İtalyan çiminin farklı karışım oranlarının ot verimi ve kalitesine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırma sonucunda elde edilecek veriler Elazığ ve bölgeye yakın illerdeki hayvancılık yapan işletmelerin kaba yem ihtiyacının giderilmesi amacıyla gerekli bilgi birikimine katkısının araştırılması açısından önemi oldukça büyüktür.

## MATERYAL VE METOT

Araştırma, 2020 yılının yaz döneminde Elazığ il merkezine ait Bahçekapı köyünde yürütülmüştür. Materyal olarak Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsüne ait olan baklagil yem bitkilerinden İskenderiye üçgülünün Derya çeşidi ile Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsüne ait olan buğdaygil yem bitkilerinden İtalyan çiminin Elif çeşidi kullanılmıştır. Deneme alanının denizden yüksekliği 920 m'dir. Deneme alanı 38 33' 31" Kuzey enlemleri ile 39 16' 13" Doğu boylamları arasında yer almaktadır. Deneme yerinden alınan toprak numunesinin analizi, Elazığ İl Tarım ve Orman Müdürlüğü Toprak



Analiz Laboratuvarında yapılmıştır. Yapılan analiz sonucuna göre; toprak killi-tınlı, az kireçli, hafif alkali, tuz seviyesi zararsız, fosfor bakımından orta, potasyum bakımından zengin ve organik maddece yetersiz seviyededir. Ayrıca araştırma parselinin drenajı iyi olup taban suyu problemi bulunmamaktadır. 1980-2020 yılları arasında denemenin yapıldığı aylara (Mart-Temmuz) ait Elazığ ilinin aylık ortalama sıcaklığı 17.1 °C, ortalama nispi nem %48.5 ve toplam yağış 179.1 mm olarak kayıt altına alınmıştır. Araştırmanın yürütüldüğü 2020 yılı üretim periyodunun (Mart-Temmuz) 1980-2020 yılları ortalamasından daha sıcak (18.2 °C) ve yağışlı (242.1 mm) ve nispi nemin ise daha az (%46.2) olduğu belirlenmiştir (DMGM, 2020). Araştırma, 4 tekrarlamalı olarak tesadüf blokları deneme desenine göre kurulmuştur. Ekim 24 Nisan 2020'de yapılmıştır. Parseller 5 x 0.8 = 4 m<sup>2</sup> olup, tohumlar 5 m uzunluğunda, 20 cm sıra arasındaki 4'er sraya ekilmiştir. Ekim işlemi el ile aynı sraya tohumlar karıştırılarak yapılmıştır. Tohumun ekim derinliği 1.5-2 cm, tohumluk miktarı saf ekim olarak İtalyan çiminde 4 kg da<sup>-1</sup>, İskenderiye üçgülünde de 3 kg da<sup>-1</sup> olacak şekilde uygulanmıştır. Denemede İskenderiye üçgülü ile İtalyan çiminin karışım oranları sırasıyla %100:0, %80:20, %60:40, %40:60, %20:80 ve %0:100 olacak şekilde ekimleri yapılmıştır. Bitki gelişimini teşvik etmek için ekimden önce deneme alanına 3 kg da<sup>-1</sup> saf azot ve 8 kg da<sup>-1</sup> saf fosfor hesabı ile DAP gübresi atılmıştır (Soya, 2009), bitkiler çıkış yaptıktan sonra 2 kez yabancı ot mücadelesi yapılmıştır.

Araştırmada biçim zamanları İskenderiye üçgülüne göre belirlenmiş ve 27 Haziran 2020 tarihinde İskenderiye üçgülü tam çiçeklenme döneminde iken, araştırmaya konu olan tür ve karışımların hepsi hasat edilmiştir. Hasat sırasında, her bir parselde yalın ve karışımlar için tesadüfi olarak seçilen 10 bitkinin toprak üstü ile en uç noktasına kadar olan kısmı cm cinsinden ölçülerek bitki boyu elde edilmiştir. Deneme alanındaki her bir parselde bulunan 4 sıradan kenarlardaki birer sıra ve parsel başı ve sonundan 50 cm kenar tesiri olarak biçilmiş ve geriye kalan alan hasat edilerek alandan elde edilerek yeşil ot tartılmış ve belirlenen rakamlar dekara çevrilerek yeşil ot verimi bulunmuştur. Daha sonra, her bir parselden biçilen otlardan 0.5 kg'lık ot örnekleri alınmış ve etüvde 48 saat 70 °C'de kurutulduktan sonra 24 saat oda şartlarında bekletilip 0.001 g hassasiyetli terazide tartılmış ve kuru ot ağırlığı belirlenmiştir. Elde edilen kuru ot verileri dekara verime çevrilmiştir. Kurutulup öğütülen ot örneklerinin Kjeldahl metodu ile azot içerikleri tespit edilmiştir. Tespit edilen azot içeriği 6.25 katsayısıyla çarpılmış ve ham protein oranı belirlenmiştir (AOAC, 1990). Kuru otta tespit edilen ham protein oranı ile kuru ot verimi çarpılarak ham protein verimleri bulunmuştur. ADF ve NDF oranları Van Soest ark. (1991)'nin bildirdikleri yöntemle göre belirlenmiştir. SKM oranı = 88.9 - (0.779 x %ADF), KMT oranı = 120 / %NDF ve NYD = (SKM x KMT) / 1.29 formülleri kullanılarak hesaplanmıştır (Morrison, 2003). Araştırma sonucunda tespit edilen rakamlara JMP istatistik paket programı yardımı ile varyans analizi yapılmış ve grupların farklılıkları LSD testi ile karşılaştırılmıştır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Bitki Boyu (cm)

Yapılan analizlere göre, karışım oranlarının hem İskenderiye üçgülü hem de İtalyan çimine ait bitki boylarını istatistiki olarak etkilemediği tespit edilmiştir. İskenderiye üçgülünün farklı karışım oranlarında tespit edilen bitki boyu değerleri 69.85-75.85 cm arasında değişim göstermiştir. Yalın İskenderiye üçgülü ve farklı karışım oranlarındaki İskenderiye üçgülü bitki boyları ortalaması 72.48 cm olarak elde edilmiştir. İtalyan çimi bitki boyları 65.65-72.05 cm arasında değişim göstermiştir. Yalın İtalyan çimi ve farklı karışım oranlarındaki İtalyan çimi bitki boyu ortalamasının ise 68.80 cm olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 1).

Daha önce yapılmış olan baklagil + buğdaygil karışımları ile ilgili çalışmalarda ortalama bitki boylarını; Yücel ve ark. (2017) 102.4-117.3 cm; Turan ve Seydoşoğlu (2020) 67.67 cm olarak

belirlemişlerdir. Diğer taraftan, İtalyan çiminde bitki boyuna ilişkin yapılan çalışmalarda bitki boyunu; Kavut (2016) 53.01 cm, Özdemir ve ark. (2019) 48.69-63.51 cm arasında, Sabancı ve Ürem (1993) 90-130 cm arasında elde etmişlerdir. Çalışma sonucunda elde ettiğimiz veriler ile diğer araştırmacıların tespit ettikleri bulgular arasında oluşan farklılıkların; denemelerde kullanılan bitki çeşitlerinin, karışımdaki oranların ve uygulama yapılan bitkilerin farklı olması, bakım aşamasında karşılaşılan hastalık ve zararlı etkisi, denemelerin yürütüldüğü arazilerin topraklarının ve iklim koşullarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

**Çizelge 1.** İskenderiye üçgülü ve İtalyan çiminin farklı karışım oranlarındaki bitki boyu değerlerine ilişkin ortalama değerler (cm)

Karışım Oranları	İskenderiye Üçgülü	İtalyan Çimi
	Bitki Boyu (cm)	
%100 İÜ	74.75	-
%100 İÇ	-	66.40
%80 İÜ + %20 İÇ	71.55	65.65
%60 İÜ + %40 İÇ	75.85	70.80
%40 İÜ + %60 İÇ	69.85	69.10
%20 İÜ + %80 İÇ	70.40	72.05
<b>Ortalama</b>	<b>72.48</b>	<b>68.80</b>

#### Yeşil ve Kuru Ot Verimleri (kg da<sup>-1</sup>)

Karışım oranlarının hem yeşil ot ve hem de kuru ot verimlerini istatistiki açıdan %1 seviyesinde etkilediği saptanmıştır (Çizelge 2). Çizelge 2 incelendiğinde, en fazla yeşil ot verimi 4123.8 kg da<sup>-1</sup> ile %80 İÜ + %20 İÇ parselinden elde edilmiş ve %100 İÇ ve %20 İÜ + %80 İÇ parselleri dışındaki tüm parseller istatistiksel olarak aynı grupta yer almıştır. En az yeşil ot verimi ise 3178.8 kg da<sup>-1</sup> ile %20 İÜ + %80 İÇ parselinden elde edilmiştir. Yalın ve farklı karışım oranlarındaki yeşil ot verimi ortalaması 3784.9 kg da<sup>-1</sup> olarak saptanmıştır. En fazla dekara kuru ot verimi 1659.2 kg ile %80 İÜ + %20 İÇ parselinde saptanmış, en az kuru ot verimi ise 670.2 kg da<sup>-1</sup> ile %100 İÇ parselinden elde edilmiştir. Yalın ve farklı karışım oranlarındaki kuru ot verimi ortalaması 1210.9 kg da<sup>-1</sup> olarak saptanmıştır (Çizelge 2).

**Çizelge 2.** Saf ve karışımların yeşil ve kuru ot verimlerine (kg da<sup>-1</sup>) ilişkin ortalamalar

Karışım Oranları	Yeşil Ot Verimi	Kuru Ot Verimi
	(kg da <sup>-1</sup> )	
%100 İÜ	3973.1 AB**	909.3 D**
%100 İÇ	3694.4 B	670.2 E
%80 İÜ + %20 İÇ	4123.8 A	1659.2 A
%60 İÜ + %40 İÇ	3890.0 AB	1434.5 B
%40 İÜ + %60 İÇ	3849.4 AB	1396.8 B
%20 İÜ + %80 İÇ	3178.8 C	1195.5 C
<b>Ortalama</b>	<b>3784.9</b>	<b>1210.9</b>

\*\*\*) Benzer harf ile belirtilen rakamlar %1 düzeyinde istatistiki olarak birbirinden farklıdır.

Daha önce yapılmış olan tek yıllık baklagil + buğdaygil karışımları ile ilgili çalışmalarda Hakyemez ve Sancak (2005) Ankara ekolojisinde İskenderiye üçgülünün adaptasyonu ve veriminin hasat sırasına göre değişiminin belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada birinci biçimde yeşil ot veriminin 1600.82-1791.04 kg da<sup>-1</sup>, kuru ot veriminin ise 384.09-429.57 kg da<sup>-1</sup> arasında değiştiğini

bildirmişler, Yücel ve ark. (2017) ise İskenderiye üçgülünde yeşil ot verimini 3773-5087 kg da<sup>-1</sup>, kuru ot verimini 894-1222 kg da<sup>-1</sup> arasında olduğunu belirtmişlerdir.

### Yeşil Otta ve Kuru Otta İskenderiye Üçgülü Oranı (%)

Karışım oranlarının hem yeşil otta ve hem de kuru otta üçgül oranlarını istatistiki açıdan çok önemli düzeyde etkilediği saptanmıştır (Çizelge 3). Çizelge 3 incelendiğinde, en fazla yeşil otta üçgül oranı yalın İskenderiye üçgülü (%100.0) parsellerinden elde edilirken, en az yeşil otta üçgül oranı ise %20 İskenderiye üçgülü + %80 İtalyan çimi parsellerinden %20.5 olarak elde edilmiştir. Yalın ve farklı karışım oranlarındaki yeşil otta üçgül oranı ortalaması %51.4 olarak bulunmuş, en fazla kuru otta üçgül oranı yalın İskenderiye üçgülü (%100.0) parselinde saptanırken, en az kuru otta üçgül oranı ise %20 İÜ + %80 İÇ parsellerinde (%46.9) saptanmıştır. Yalın ve farklı karışım oranlarındaki kuru otta üçgül oranı ortalaması %63.6 olarak elde edilmiştir (Çizelge 3).

Geren ve ark. (2003) yaptıkları denemede yeşil otta fiğ oranını %84.8, kuru otta fiğ oranını %84.1 olarak tespit etmiş, Gündüz (2010) Macar fiği + Buğday karışımı ile ilgili yaptığı çalışmada, en fazla kuru otta Macar fiği oranını %24.3 ile %75 MF + %25 B karışımından, en az kuru otta fiğ oranını ise %4.4 ile %25 MF + %75 B parsellerinde belirlemiş, Şimşek (2015) Kırşehir şartlarında farklı Macar fiği + İtalyan çimi karışımlarının verim ve kaliteye etkisi üzerine yaptığı çalışmada kuru otta Macar fiği oranı en yüksek %67.9 ile %80 MF + %20 İÇ karışımında, en düşük %29.3 ile %20 MF + %80 İÇ karışımında olduğunu tespit etmişlerdir.

**Çizelge 3.** Saf ve karışımların yeşil otta ve kuru otta üçgül oranlarına (%) ilişkin ortalamalar

Karışım Oranları	Yeşil Otta	Kuru Otta
	Üçgül Oranı (%)	
%100 İÜ	100.0 (90.0 <sup>+</sup> ) A**	100.0 (90.0 <sup>+</sup> ) A
%80 İÜ + %20 İÇ	56.8 (49.5) B	62.2 (52.6) B
%60 İÜ + %40 İÇ	46.3 (43.5) C	58.5 (50.5) C
%40 İÜ + %60 İÇ	33.3 (35.9) D	50.1 (45.6) D
%20 İÜ + %80 İÇ	20.5 (27.6) E	46.9 (43.8) E
<b>Ortalama</b>	<b>51.4</b> <b>(32.6)</b>	<b>63.6</b> <b>(56.5)</b>

\*\*\*) Benzer harf ile belirtilen rakamlar %1 düzeyinde istatistiki olarak birbirinden farklıdır.

+) Açık değeri

### Ham Protein Oranı (%) ve Verimi (kg da<sup>-1</sup>)

Karışım oranlarının hem ham protein oranlarını ve hem de ham protein verimlerini istatistiki açıdan %1 seviyesinde etkilediği saptanmıştır. En fazla ham protein oranı %100 İÜ parsellerinden (%12.99) elde edilmiş ve %100 İÇ ve %20 İÜ + %80 İÇ parselleri dışındaki tüm parseller istatistiksel olarak aynı grupta yer almıştır. Yalın ve farklı karışım oranlarındaki ham protein oranı ortalaması %12.04 olarak elde edilmiştir. En fazla ham protein verimi %80 İÜ + %20 İÇ parselinden (205.5 kg da<sup>-1</sup>) elde edilmiş ve bunu %60 İÜ + %40 İÇ parseli izlemiştir. En az ham protein verimi ise %100 İÇ parselinden (76.3 kg da<sup>-1</sup>) elde edilmiştir. Yalın ve farklı karışım oranlarındaki ortalama ham protein verimi 146.6 kg da<sup>-1</sup> olarak saptanmıştır (Çizelge 4).

**Çizelge 4.** Saf ve karışımların ham protein oranına (%) ve verimine (kg da<sup>-1</sup>) ilişkin ortalamalar

Karışım Oranları	Ham Protein Oranı (%)	Ham Protein Verimi (kg da <sup>-1</sup> )
%100 İÜ	12.99 A**	118.1 C**
%100 İÇ	11.38 B	76.3 D
%80 İÜ + %20 İÇ	12.37 A	205.5 A
%60 İÜ + %40 İÇ	12.53 A	179.5 AB
%40 İÜ + %60 İÇ	12.30 A	171.9 B
%20 İÜ + %80 İÇ	10.71 B	128.1 C
<b>Ortalama</b>	<b>12.04</b>	<b>146.6</b>

\*\*\*) Benzer harf ile belirtilen rakamlar %1 düzeyinde istatistik olarak birbirinden farklıdır.

Ham protein oranlarına ait elde edilen değerler, Hakyemez ve Sancak (2005) tarafından Ankara koşullarında yapılan araştırmada İskenderiye üçgülü ham protein oranı ortalamaları %18.46-19.35 arasında değişim göstermiştir. Lale ve Kökten (2020) tarafından İtalyan çimi çeşitleriyle yapılan çalışmada ortalama ham protein oranı %17.58 olarak tespit edilmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler, bu araştırmacıların verilerinden daha düşük, Turan ve Seydoşoğlu (2020) tarafından %100 İtalyan çiminde %8.09 olarak elde edilen ham protein değerlerinin ise üzerindedir. Kavut (2016) tarafından yapılan İtalyan çimi + Baklagil karışımında ham protein oranı ilk biçimde %12.6 oranında belirlenmiş olup çalışmadan elde edilen değerlerle benzerlik göstermektedir. Şimşek (2015) ham protein verimini 23.7-50.18 kg da<sup>-1</sup>, Bulut (2019) Siirt İli kuru şartlarında İskenderiye üçgülünün Derya çeşidinin ham protein verimini 42.22 kg da<sup>-1</sup>, Lale ve Kökten (2020) ham protein verimi ortalamasını 168.5 kg da<sup>-1</sup>, Yıldırım ve Turan (2020) ham protein verimini 161.64 kg da<sup>-1</sup> olarak elde ettiklerini bildirmişlerdir.

#### ADF ve NDF Oranları (%)

Karışım oranlarının hem ADF ve hem de NDF oranlarını istatistik açıdan önemli seviyede etkilemediği tespit edilmiştir. ADF oranları %35.0-36.4 arasında değişim göstermiş ve karışım oranlarındaki ADF oranları ortalaması %35.8 olarak elde edilmiştir. NDF oranlarının %47.4-54.4 arasında değişim gösterdiği, yalın ve farklı karışım oranlarındaki NDF oranları ortalamasının %50.9 olarak elde edildiği görülmüştür (Çizelge 4).

**Çizelge 5.** Karışımlarda ADF ve NDF oranlarına (%) ilişkin ortalama değerler

Karışım Oranları	ADF Oranı (%)	NDF Oranı (%)
%100 İÜ	35.0	47.4
%100 İÇ	35.5	54.4
%80 İÜ + %20 İÇ	35.9	49.5
%60 İÜ + %40 İÇ	35.4	49.6
%40 İÜ + %60 İÇ	36.2	52.4
%20 İÜ + %80 İÇ	36.4	52.3
<b>Ortalama</b>	<b>35.8</b>	<b>50.9</b>

Daha önce yapılmış olan tek yıllık baklagil+buğdaygil karışımları ile ilgili çalışmalarda Şimşek (2015) tarafından ADF oranları %28.7-39.7, NDF oranları %37.1-59.7, Yücel ve ark. (2017) tarafından ADF oranları %36.2-41.0, NDF oranları %47.3-53.3, Kavut ve Geren (2018) tarafından ADF oranları %34.9, NDF oranları %48.1, Özdemir ve ark. (2019) tarafından ADF oranları %30.5-34.2, NDF oranları %48.3-50.9, Turan ve Seydoşoğlu (2020) tarafından ADF oranı %37.8, NDF oranı %56.8 olarak tespit edilmiştir.

**SKM ve KMT Oranları (%)**

Karışım oranlarının hem SKM ve hem de KMT oranlarını istatistiki açıdan önemli seviyede etkilemediği saptanmıştır. Çizelge 6 incelendiğinde, SKM oranları %60.52-61.64 arasında değişim gösterdiği, yalın ve farklı karışım oranlarındaki SKM oranları ortalamasının %61.04 olarak elde edildiği görülmektedir. KMT oranları ise %2.21-2.54 arasında değişim göstermiş, yalın ve farklı karışım oranlarındaki KMT oranları ortalaması %2.36 olarak elde edilmiştir.

**Çizelge 6.** Karışımlarda SKM ve KMT oranlarına (%) ilişkin ortalama değerler

Karışım Oranları	SKM Oranı (%)	KMT Oranı (%)
%100 İÜ	61.64	2.54
%100 İÇ	61.21	2.21
%80 İÜ + %20 İÇ	60.90	2.43
%60 İÜ + %40 İÇ	61.29	2.42
%40 İÜ + %60 İÇ	60.71	2.30
%20 İÜ + %80 İÇ	60.52	2.30
<b>Ortalama</b>	<b>61.04</b>	<b>2.36</b>

Daha önce yapılmış olan tek yıllık baklagil + buğdaygil karışımları ile ilgili araştırmalarda Yücel ve ark. (2017)'nin Çukurova koşullarında kışlık ara ürün olarak yetiştirilebilecek, yüksek verimli ve kaliteli yeni İskenderiye üçgülü çeşitlerinin geliştirilmesini amaçladıkları çalışmada KMT oranının %2.27-2.55 arasında değişim gösterdiği, Lale ve Kökten (2020)'in Bingöl ekolojik koşullarında İtalyan çimi çeşitleri üzerine yapmış oldukları araştırmada SKM oranının %58.32 ve KMT oranının %2.03, Turan ve Seydoşoğlu (2020)'nin Siirt ilinde yapmış oldukları çalışmada SKM oranının %59.46 ve KMT oranının %2.11, Yıldırım ve Turan (2020)'in İskenderiye üçgülü üzerine yapmış oldukları çalışmada SKM oranının %66.45 ve KMT oranının %3.3 olduğu tespit edilmiştir.

**Nispi Yem Değeri (NYD)**

Karışım oranlarının nispi yem değerini istatistiki açıdan önemli seviyede etkilemediği saptanmıştır. Çizelge 7 incelendiğinde, nispi yem değerleri 104.92-121.44 arasında değişim göstermiştir. Yalın ve farklı karışım oranlarındaki nispi yem değerleri ortalaması 112.15 olarak elde edilmiştir.

**Çizelge 7.** Saf ve karışımların NYD'ne ilişkin ortalamalar

Karışım Oranları	Nispi Yem Değeri
%100 İÜ	121.44
%100 İÇ	104.92
%80 İÜ + %20 İÇ	114.66
%60 İÜ + %40 İÇ	115.35
%40 İÜ + %60 İÇ	108.66
%20 İÜ + %80 İÇ	107.91
<b>Ortalama</b>	<b>112.15</b>

Konu ile ilgili Yücel ve ark. (2017)'nin yapmış oldukları çalışmada nispi yem değerinin 80.5-102.2 arasında değişim gösterdiği, Lale ve Kökten (2020)'in Bingöl ekolojik koşullarında İtalyan çimi çeşitleri üzerine yapmış oldukları çalışmada nispi yem değerinin 91.63, Turan ve Seydoşoğlu (2020)'nin Siirt ilinde yapmış oldukları çalışmada nispi yem değerinin 97.47, Yıldırım ve Turan (2020)'in İskenderiye üçgülü üzerine yapmış oldukları çalışmada nispi yem değerinin 170.09 olduğu tespit edilmiştir.

## SONUÇ

Çalışma sonucunda, karışımlarda İskenderiye üçgülünün daha yoğun olduğu parsellerde kuru ot, yeşil ot ve ham protein verimleri ile ham protein oranlarının daha yüksek çıktığı görülmüştür. Çalışmada; en yüksek yeşil ot verimi 4123.8 kg da<sup>-1</sup> ve 3890.0 kg da<sup>-1</sup>, kuru ot verimi 1659.2 kg da<sup>-1</sup> ve 1434.5 kg da<sup>-1</sup>, ham protein verimi 205.5 kg da<sup>-1</sup> ve 179.5 kg da<sup>-1</sup>, ham protein oranı %12.37 ve %12.53 olarak elde edilen %80 İÜ + %20 İÇ ve %60 İÜ + %40 İÇ karışımlarının en uygun karışımlar olduğu belirlenmiştir. Tek yıllık çalışma sonucunda Elazığ ekolojik koşullarına en uygun karışım oranlarının belirlendiği, ancak bu çalışmanın birkaç yıl daha denenmesi gerektiği önem arz etmektedir.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- AOAC, 1990. Association of Official Analytical Chemists. Official Method of Analysis. 15th.ed. Washington, DC. USA. 66 p.
- Ayan İ, Acar Z, Mut H, Can M, Kaymak G, Tunalı U, 2020. Çayır ve Mera Alanlarında Mevcut Durum Sürdürülebilirlik ve Gelecek, Türkiye Ziraat Mühendisliği IX. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı-1, Ocak syf 105.
- Bilgen H, Alçıçek A, Sungur N, Eichhorn H, Walz OP, 1996. Ege bölgesi koşullarında bazı silajlık kaba yem bitkilerinin hasat teknikleri ve yem değeri üzerine araştırmalar. Hayvancılık Ulusal Kongresi, Cilt 1, 781-789.
- Bulut H, 2019. Ankara koşullarında bor dozlarının bazı İskenderiye üçgülü (*Trifolium alexandrinum* L.) çeşitlerinde verim ve verim öğelerine etkisi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı. Doktora tezi.
- DMGM (Devlet Meteoroloji Genel Müdürlüğü) 2020. Elazığ ili iklim verileri. <https://elazig.mgm.gov.tr/Default.aspx>. (Erişim tarihi: 14.06.2021).
- Geren H, Soya H, Avcıoğlu R, 2003. Yıllık İtalyan çimi ve tüylü fiğ karışımlarında farklı hasat zamanlarının bazı kalite özelliklerine etkisi üzerinde araştırmalar. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 40(2): 17-24.
- Gündüz E, 2010. Diyarbakır koşullarında karışım oranının Macar fiği (*Vicia pannonica* Crantz)+ Buğday (*Triticum aestivum* var. *aestivum* L.) karışımında ot verimi ve kalitesine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı.
- Hakyemez BH, Sancak C, 2005. Bazı İskenderiye üçgülü (*Trifolium alexandrinum* L.) çeşitlerinin Ankara sulu koşullarına uyumu ve verimin biçim sırasına göre değişimi. Tarım Bilimleri Dergisi, 11(4): 406-410.
- Iannucci A, Di Fonzo N, Martiniello P, 1996. Effects of harvest management on the growth dynamics forage and seed yield in berseem clover, European J. Argon., 14: 303-314.
- Kavut YT, Geren H, 2018. İtalyan çimi (*Lolium multiflorum* L.) + Tüylü fiğ (*Vicia villosa* L.) karışımlarında farklı hasat zamanları ve karışım oranlarının verim ve kalite özelliklerine etkisi. Mediterranean Agricultural Sciences, 31(3): 283-287.

- Kavut YT, 2016. Farklı hasat dönemlerinde biçilen İtalyan çimi ve bazı yıllık baklagil yembitkisi karışımlarının ot verimi ve diğer bazı özellikleri üzerine bir araştırma. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 25(Özel sayı-2): 253-258.
- Lale V, Kökten K, 2020. Bingöl şartlarında bazı İtalyan çimi (*Lolium multiflorum* Lam.) çeşitlerinin ot verimi ve kalitesinin belirlenmesi. Türk Doğa ve Fen Dergisi, Cilt 9, özel sayı, sayfa 46-50.
- Morrison JA, 2003. Hay and Pasture Management, Chapter 6. Illinois Agronomy Handbook, 72 p.
- Mut H, Gülümser E, Çopur Doğrusöz M, Başaran U, 2020. Koca fiğ (*Vicia narbonensis* L.) ile İtalyan çimi (*Lolium multiflorum* L.) karışımlarının silaj kalitesinin belirlenmesi. ÇOMÜ Zir. Fak. Derg. (COMU J. Agric. Fac.), 8 (2): 391-396.
- Özdemir S, Budaklı Çarpıcı E, Aşık BB, 2019. Farklı azot dozlarının İtalyan çiminin (*Lolium multiflorum westerwoldicum* Caramba) ot verimi ve kalitesi üzerine etkileri. KSÜ Tar. Doğa Derg., 22(1): 131-137
- Özkul H, Kırkpınar F, Tan K, 2012. Ruminant beslemede karamba (*Lolium multiflorum* cv.Caramba) otunun kullanımı. Hayvansal Üretim, 53(1): 21-26.
- Ranjbar GA, 2008. Using leaf production efficiency as an effective criterion for evaluation of berseem clover (*Trifolium alexandrinum* L.) cultivars. Journal of Agriculture & Social Science, 4: 107-111.
- Sabancı CO, Ürem C, 1993. Anadolu üçgülü (*Trifolium resupinatum* L.) ve yıllık çimin (*Lolium multiflorum* Lam.) değişik karışım oranlarının yeşil ot ve kuru madde verimine etkisi. Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi, 3(2): 60-72.
- Serin Y, Tan M, 2001. Yem Bitkileri Kültürüne Giriş. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 206, 217 s.
- Soya, H., 2009. İskenderiye üçgülü (*Trifolium alexandrinum* L.). In: Yembitkileri, Baklagil Yembitkileri Cilt II, Avcıoğlu, R., Hatipoğlu, R., Karadağ Y. (eds.), 363-368 pp., T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü, İzmir.
- Şimşek S, 2015. Kırşehir koşullarında farklı Macar fiği (*Vicia pannonica* Crantz) + İtalyan çimi (*Lolium multiflorum* Lam.) karışım oranlarının verim ve kalite üzerine etkilerinin belirlenmesi. Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Turan N, Seydoşoğlu S, 2020. Farklı oranlarda karıştırılan yonca, korunga ve İtalyan çimi hasıllarının silaj ve yem kalitesine etkisinin araştırılması. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 7(3): 526-532.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA, 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci., 74: 3583-3597.
- Yıldırım F, Turan N, 2020. Tek yıllık bazı baklagil yem bitkilerinin verim ve verim unsurları ile bazı silaj özelliklerinin belirlenmesi. İSPEC Tarım Bilimleri Dergisi, 4(3): 477-491.
- Yolcu H, Serin Y, 2008. Ülkemiz Yem Bitkileri Tarımına Genel Bir Bakış, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi, 14(3): 303-312.
- Yücel C, Avcı M, İnal İ, Akkaya MR, 2017. İskenderiye üçgülü (*Trifolium alexandrinum* L.) ıslah çalışmaları. KSÜ Doğa Bil. Derg., 20 (Özel Sayı): 17-21.

**Atf İçin:** Yılmaz Ü, 2022. Meralarda Otlayan Hayvanları Tehdit Eden Çayır Tetanisi Riski. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(1): 518-526.

**To Cite:** Yılmaz Ü, 2022. The Risk of Grass Tetany Threatening Grazing Cattles in Grasslands. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(1): 518-526.

## **Meralarda Otlayan Hayvanları Tehdit Eden Çayır Tetanisi Riski**

Ülkü YILMAZ<sup>1\*</sup>

**ÖZET:** Çayır tetanisi sığır ve koyunlarda kandaki düşük magnezyum eksikliğine bağlı gelişen metabolik bir bozukluktur. Bu bozukluğun başlıca sebebi ise merada otlanılan bitkilerin bazı besin elementi konsantrasyonları arasındaki dengesizliktir. Bu nedenle, meralarda doğal olarak yetişen bitkilerin makro besin elementi konsantrasyonları ve bunların birbirlerine olan oranının bilinmesi hayvan sağlığı açısından önemlidir. Hayvan sağlığını tehdit eden bu rahatsızlığın önüne geçebilmek için öncelikli olarak meralarda çayır tetanisi risk durumlarının belirlenmesi ve bu doğrultuda bölgeye özgü uygun gübreleme programları geliştirilmelidir. Bu makale ile çayır tetanisinin nedenleri bitki-toprak-hayvan etkileşimleri göz önüne alınarak değerlendirilmiş ve daha önce yapılmış çalışmalar doğrultusunda ülkemizde meraların çayır tetani risk durumları karşılaştırılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Çayır tetanisi, Mera, Hayvansal üretim, Hipomagnezemi

### **The Risk of Grass Tetany Threatening Grazing Cattles in Grasslands**

**ABSTRACT:** Grass tetany is a metabolic disorder in cattle and sheep due to low magnesium deficiency in the blood. The main cause of this disorder is the imbalance between the nutrient concentrations of the grasses grazing on the grassland. Therefore, it has become a necessity to know the macro nutrient concentration of grasses growing naturally in grasslands and their ratio to each other. In order to prevent this disease that threatens animal health, grass tetany risk situations in grasslands should be determined and appropriate fertilization programs specific to the region should be developed accordingly. In this article, the causes of grass tetany were evaluated by considering plant-soil-animal interactions, and grass tetany risk status of grasslands in our country was compared in line with previous studies.

**Keywords:** Grass tetany, Grassland, Animal production, Hypomagnesaemi

<sup>1</sup>Ülkü YILMAZ ([Orcid ID: 0000-0001-5031-0523](https://orcid.org/0000-0001-5031-0523)), Çankırı Karatekin Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümü, Çankırı, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Ülkü YILMAZ, e-mail: [ulkudikmen@karatekin.edu.tr](mailto:ulkudikmen@karatekin.edu.tr)



## GİRİŞ

Çayır tetanisi buzağı ve etçil ırk sığırlarda yavaş, sütçül ırk sığırlarda ise hızlı gelişen bir rahatsızlıktır (Vallentine, 2000). Laktasyon dönemindeki koyun ve sığırlar, artan magnezyum ( $Mg^{+2}$ ) ihtiyaçları nedeniyle çayır tetanisine karşı oldukça hassastırlar (Roukos ve ark., 2011; Martens ve ark., 2018; Doncel ve ark., 2019; da Silva ve ark., 2020). Özellikle laktasyon başlangıcından sonraki dönemde kandaki  $Mg^{+2}$  seviyesinin sığırlarda 12 mg/l, koyunlarda 5 mg/l altına düşmesi çayır tetani olasılığını daha da yükseltmektedir (Underwood ve Suttle, 1999). Hayvan sindirim sisteminde  $Mg^{+2}$ 'nin çözünmeyen bir forma dönüşmesi ile hayvan vücudundaki  $Mg^{+2}$  miktarının azalması çayır tetanisine neden olmaktadır (Vallentine, 2000; Kumssa ve ark., 2019). Hayvanlarda  $Mg^{+2}$  alımı rumen içerisindeki çözünür  $Mg^{+2}$  konsantrasyonuna ve rumen epitel hücreleri boyunca apikal membran potansiyeline (AMP) bağlıdır (Şekil 1). Hayvan rumeninde yüksek potasyum ( $K^+$ ) konsantrasyonu  $Mg^{+2}$  emilimini de engelleyerek  $Mg^{+2}$  seviyesinin düşmesine neden olarak tetani riskini artırmaktadır (Elliot, 2009; Schonewille, 2013; Doncel ve ark., 2019).

Sığır ve koyunlarda sinir sistemini etkileyen çayır tetanisinin tek nedeni  $Mg^{+2}$  eksikliği değildir (Elliot, 2009; Vallentine, 2000; Doncel ve ark., 2019). Yüksek  $K^+$  içerikli bitkiler, hayvanlarda mineral elektrolit dengesizliğinin yanında iyon antagonizması nedeniyle de  $Na^+$  eksikliğine de neden olmaktadır (Swerczek, 2018). Bitkilerde  $Na^+$  içeriği düştükçe hayvanlarda çayır tetanisi görülme riski artmaktadır (Martens ve ark., 2018; da Silva ve ark., 2020). Çayır tetanisi ile ilgili literatürün kapsamlı bir şekilde incelemesi sonucunda sodyumun ( $Na^+$ ) çayır tetanisini önlemede etkili olduğu anlaşılmıştır.

Bitkiler için  $Na^+$  gerekli olmasa da hayvanlar için hayati öneme sahiptir (O'Connor ve ark., 2000; Chhabra, 2017). Hayvanlarda yetersiz  $Na^+$  alımı aldosteron hormonun salgılanmasını tetikler ve hayvanlarda hem tükürük hem de işkembe sıvısındaki  $Na^+$ 'nin azalmasına  $K^+$ 'nin artmasına neden olur (Çizelge 1). İşkembe içerisinde artan  $K^+$  konsantrasyonu ise  $Mg^{+2}$ 'nin plazmadaki konsantrasyonunun azalmasına neden olur (Schonewille ve ark., 1999). Leonhard-Marek ve ark. (1998), izole edilen işkembe sıvısında  $K^+$  konsantrasyonu 25-75 mmol/l olduğunda  $Mg^{+2}$  emiliminin düştüğünü, ancak 75-100 mmol  $K^+$ /l konsantrasyonunda  $Mg^{+2}$  içeriğinde bir değişim olmadığını gözlemlemişlerdir.

Hayvan dokuları için kritik öneme sahip olan  $Mg^{+2}$  ve kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) (Underwood ve Suttle, 1999; Martens ve Stumpff, 2019) elementlerinin eksikliği sindirim sisteminin zayıflamasına (Schonewille, 2013) ve buna bağlı olarak midede gaz oluşmasına neden olmaktadır (Swerczek, 2018). Yeni Zelanda'da yapılan bir çalışmada  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  noksanlığının görüldüğü meralarda sığırlar için yeterli tuz sağlandığı takdirde akut şişkinliğinin önüne geçildiği bildirilmiştir (Netthisinghe ve ark., 2020). Benzer şekilde Swerczek, (2018) yüksek nitrat ( $NO_3^-$ ) içermeyen yem bitkileri ve yeterli tuzla beslenen buzağılarda ölüm oranlarının düşük olduğunu ifade etmiştir. Sığırlar azot (N) içeriği bakımından yüksek yem tükettiğinde, işkembede önemli miktarda amonyak ( $NH_3$ ) üretilir (Allison ve Chris 2003). İşkembedeki  $NH_3$ ,  $Mg^{+2}$ 'yi çözünmeyen hidroksit formuna dönüşmesine neden olarak, hayvanların kan ile dokularında  $Mg^{+2}$  konsantrasyonu azalmasına neden olarak tetani riskini artırır (Allison ve Chris 2003). Bu nedenle, bitkideki besin elementi noksanlığının tespit edildiği meralarda akut şişkinliğinin önüne geçebilmek için hayvanların kolay ulaşabileceği yerlere tuzluklar konulabilir.

Mera vejetasyonu içerisinde yer alan bitkilerin  $[K^+]/[Ca^{+2}+Mg^{+2}]$  oranı çayır tetani riskinin belirlenmesinde kullanılan önemli bir kriterdir (Şahinoğlu, 2010; Gür, 2014; Doncel ve ark., 2019; Kumssa ve ark., 2020). Eğer bu oran 2,2 ve üzerinde ise ilgili merada otlayan hayvanlarda çayır tetanisi görülme olasılığı artmaktadır (Roukos ve ark., 2011; Hamilton ve ark., 2012; Schonewille, 2013; Tran ve ark., 2018; Kumssa ve ark., 2019; Loudon ve ark., 2021).

**Çizelge 1.** Na<sup>+</sup> eksikliği ve yüksek K<sup>+</sup> alımında rumen içerisindeki K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> ve Mg<sup>+2</sup> durumları (Martens ve ark., 2018)

	Rumen			
	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Epitel dokudaki potansiyel fark	Mg <sup>+2</sup> adsorbsiyonu
Yüksek K <sup>+</sup> alımı	↑	↓	↑	↓
Na <sup>+</sup> eksikliği	↑	↓	↑	↓

↑: artma, ↓: azalma

Toprak çözeltisi içerisindeki Mg<sup>+2</sup>'nin bitkiler tarafından alınabilmesinde bazı faktörler etkilidir (Schonewille, 2013). Bu faktörler toprağın tekstürü, pH'sı, kil mineralojisi ve katyon değişim kapasitesidir (Brady ve Weil 2002; Gobat ve ark., 2004; Herrick ve ark., 2006; Dong ve ark., 2012). Toprağa uygulanan Mg<sup>+2</sup> içerikli gübreler sonucunda bitkideki Mg<sup>+2</sup> artışı çayır tetanisini önlemede yeterli olmayabilir. Düşük fosfor (P) içerikli topraklarda yapılan bir çalışmada, bitkideki Mg<sup>+2</sup> konsantrasyonunu artırabilmek için tek başına Mg<sup>+2</sup> içerikli gübrelerin uygulanmasının etkili olmadığı, P ile birlikte Mg<sup>+2</sup> içerikli gübrelerin toprağa uygulanması ile bitkide Mg<sup>+2</sup> seviyesinin arttığı görülmüştür (Lock ve ark., 2000). Ancak fosforlu gübreleme yapılırken de çok dikkat edilmesi gerekir (Macdonald ve ark., 2017). Çünkü fosfor, toprak pH'sı 5,5 altında Fe ve Al ile pH>7,2'de ise Ca<sup>+2</sup> ile bağlanarak bitkiler tarafından alınamaz forma dönüşmektedir (Tisdale ve ark., 1993; McDowell, 1996). Asitli topraklarda dolomit uygulaması ile toprak pH'sı yükseltilerek (6 -7) toprak çözeltisi içerisindeki Mg<sup>+2</sup>'nin bitkilerin tarafından alınabilecek forma getirilmesi sağlanabilir (Whitehead, 2000; Hamilton ve ark., 2012; Schonewille, 2013).

Ayrıca besin elementi içeriği ile ilişkili toprak özelliklerinin zamansal ve uzaysal olarak değişiminin bilinmesi, besin elementlerinin arazide noksanlık oluşturabileceği noktaların belirlenmesinde oldukça önemlidir (Klaus ve ark., 2013). Böylece meralarda daha etkin ve ekonomik bir gübreleme programı oluşturularak hem bitki hem de toprakta besin elementi noksanlıkları önlenmiş olur. Bazı araştırmacılar bitkideki Mg<sup>+2</sup> içeriğini artırmak amacıyla toprağı gübrelemek yerine rasyonlara uygun miktarda Mg<sup>+2</sup> eklenmesini önermektedirler (Schonewille, 2013; Kumssa ve ark., 2019). Ancak hayvanlara ek olarak Mg<sup>+2</sup> takviyesinin maliyeti ayrı bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Çayır tetani riskini azaltmak için Mg<sup>+2</sup> içerikli ek gıdaların kullanılmasının (Lock ve ark., 2000) maliyeti, gübreleme uygulamalarına göre daha yüksektir (Martens ve ark., 2018). Çayır tetanisi oluşumunu en aza indirmek için mera vejetasyonu içerisinde Ca<sup>+2</sup> ve Mg<sup>+2</sup> açısından zengin baklagil yem bitki oranları artırılmalıdır (Roukos ve ark., 2011; Doncel ve ark., 2019).

Bitkilerin Mg<sup>+2</sup> içeriği iklim koşullarına göre değişkenlik gösterebilir. Bazı iklim koşullarında bitkilerdeki alınabilir Mg<sup>+2</sup> konsantrasyonları çok düştüğü için otlayan hayvanlarda tetani riski artmaktadır (Dalley, 2002; Loudon ve ark., 2021). Özellikle bitkilerin yeni büyümeye başladığı erken ilkbahar döneminde bitkideki K<sup>+</sup> ve N içerikleri yüksek olduğu için bitkideki Mg<sup>+2</sup> eksikliğinin görülme ihtimali daha yüksektir (Whitehead, 2000; Tran ve ark., 2018). Aydın ve Uzun (2008)'un yaptığı bir çalışmada bulutlu ve yağmurlu gün sayısının fazla olduğu Karadeniz Bölgesi ve benzeri koşullarda, hayvanlarda çayır tetanisi riskinin daha yüksek olduğunu ifade etmişlerdir. Ani sıcaklık değişimleri sonucunda oluşan dolu olayları da bitkideki bazı elementlerin azalmasına neden olmaktadır (Doncel ve ark., 2019).

İlkbaharda gerçekleşen don olayları esnasında bitkide alınabilir N çoğunlukla amonyum formundadır ve bitkideki amonyum Mg<sup>+2</sup> ve Ca<sup>+2</sup> alımının önemli ölçüde azalmasına neden olarak NH<sub>3</sub><sup>-</sup> konsantrasyonu artırır (Netthisinghe ve ark., 2020). Yüksek NH<sub>3</sub><sup>-</sup> içerikli bitkilerin otlanması ile hayvan rumeninde NH<sub>3</sub><sup>-</sup> konsantrasyonunun artmasına neden olur (Martens ve Schweigel, 2000). Rumen

içerisindeki yüksek  $\text{NH}_3^-$  konsantrasyonu da rumen içi pH'nın artmasına neden olarak sığırlarda rumen içerisinde  $\text{Mg}^{+2}$  emilimini azaltır (Dalley ve ark., 1997). Amerika'da 2001 yılında yapılan çalışmaya göre, ilkbaharın sonlarında gerçekleşen don olayları sonucunda meradaki bitkilerde  $\text{K}^+$  içeriğinin arttığı buna bağlı olarak da otlayan hayvanlarda çayır tetanisine bağlı ölümlerin meydana geldiği bildirilmiştir (Swerczek, 2018).

**Çizelge 2.** Türkiye'de meralarda yapılan çalışma sonuçlarına göre bitkideki  $[\text{K}^+]/[\text{Ca}^{+2}+\text{Mg}^{+2}]$  oranları

Araştırmacılar	Araştırma Alanı	$[\text{K}^+]/[\text{Ca}^{+2}+\text{Mg}^{+2}]$
Koç ve ark., (2000)	Erzurum	2.11
Alp ve ark., (2001)	Balıkesir	0.93
Alp ve ark., (2001)	Bilecik	1.20
Alp ve ark., (2001)	Bursa	1.25
Alp ve ark., (2001)	Çanakkale	0.97
Alp ve ark., (2001)	Edirne	1.15
Alp ve ark., (2001)	Kırklareli	0.92
Alp ve ark., (2001)	Kocaeli	1.00
Alp ve ark., (2001)	Sakarya	1.23
Alp ve ark. (2001)	Tekirdağ <sup>□</sup>	1.11
Alp ve ark. (2001)	Yalova	0.90
Bakoğlu ve Koç (2002)	Erzurum	1.51
Tekeli ve ark. (2003)	Tekirdağ	0.91
Orak ve ark. (2004)	Tekirdağ	1.12
Ayan ve ark. (2006)	Samsun	2.54
Ates ve ark. (2010)	Tekirdağ	1.69
Şahin ve ark. (2010)	Erzurum	0.60
Bayraktar (2012)	Tekirdağ	1.51
Alatürk (2012)	Çanakkale	0.54
Gökkuş ve ark., (2013)	Çanakkale	0.86
Gür (2014)	Tekirdağ	1.54
Eğritaş ve Önal Aşçı (2015)	Ordu	0.48
Parlak ve ark. (2015)	Çanakkale	1.55
Aydın ve Başbağ (2017)	Diyarbakır	1.72
Algan ve Aydın (2017)	Samsun	0.82
Can ve Ayan (2017)	Samsun	3.11
Gülümser ve ark., (2017)	Yozgat	1.56
Gürsoy ve Macit (2017)	Erzurum	2.49
Özyazıcı ve Yıldız (2017)	Van	2.07
Aygün ve ark., (2018)	Eskişehir	0.53
Karan ve Başbağ (2018)	Elazığ	1.03
Turan ve ark. (2018)	Siirt	1.70
Başbağ ve ark., (2019)	Diyarbakır	0.94
Başbağ ve ark., (2019)	Siirt	0.95
Başbağ ve ark., (2019)	Şırnak	0.90
Başbağ ve ark., (2019)	Mardin	1,12
Başbağ ve ark., (2019)	Batman	0.74
Başbağ ve ark., (2019)	Şanlıurfa	0.65
Başbağ ve ark., (2019)	Gaziantep	1.13
Polat ve Bayraklı (2019)	Konya	0.81
Şahin (2019)	Ordu	2.13
Başbağ ve ark., (2020)	Adıyaman	1.15
Başbağ ve ark., (2020)	Diyarbakır	0.79
Başbağ ve ark., (2020)	Mardin	1.13
Başbağ ve ark., (2020)	Siirt	1.13
Başbağ ve ark., (2020)	Şırnak	1.51
Çaçan ve Arslan (2020)	Bingöl	0.60
Tüzen Şahin ve ark., (2020)	Samsun	0.96

Çayır tetanisi, süt ve besi sığırı üretiminde hayvancılığın karşılaştığı en büyük ekonomik sorunlardan biri olarak kabul edilmektedir. ABD’de çayır tetanisi nedeniyle ölen sığırların yıllık maliyetinin yaklaşık 300 milyon dolar (Lock ve ark., 2000), Avusturya’da ise 16 milyon dolar olduğu hesaplanmıştır (Sackett ve ark., 2006). Türkiye’de çayır tetanisini ekonomik açıdan değerlendiren çalışmalar henüz yapılmamış olup çayır tetanisi bakımından riskli meraların belirlenmesine yönelik çalışmalar da sınırlı sayıdadır. Ülkemizde mera vejetasyonun makro ve mikro besin elementi içeriklerine yönelik çalışmalar doğrultusunda belirlenen  $[K^+]/[Ca^{+2}+Mg^{+2}]$  oranları Çizelge 2’de verilmiştir. Yapılan bu çalışma sonuçlarına göre çayır tetani riski bakımından en yüksek  $[K^+]/[Ca^{+2}+Mg^{+2}]$  oranı Gürsoy ve Macit (2017), Ayan ve ark. (2006) ile Can ve Ayan (2017) tarafından bildirilmiştir. Tetani bakımından risk taşıyan bu meralarda sadece bitkideki değil toprak ve bu meralarda otlayan hayvanlardaki besin elementi konsantrasyonları belirlenmelidir.

## SONUÇ

Çayır tetanisi hayvan sağlığını tehdit eden ciddi bir problemdir ve bunu önleyebilmek için mera vejetasyonu içerisinde yer alan bitkilerin besin elementi içeriklerinin bilinmesi gerekmektedir. Bitkilerin besin elementi konsantrasyonu yetiştiği toprağın özelliklerine ve iklim koşullarına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bitkilerdeki besin elementi noksanlıklarını gidermek için kaba yem kullanılması maliyetin artmasına ve antagonistik etkiler nedeniyle diğer elementlerin eksikliklerine yol açabilir. Bu nedenle verimli ve sürdürülebilir bir hayvancılığın yapılabilmesi için mera vejetasyonu içerisindeki bitkilerin besin elementi konsantrasyonlarını etkileyen toprak özelliklerinin de çok iyi anlaşılması gerekmektedir. Ekonomik bir hayvancılık yapılabilmesi için meralarda toprak-bitki-hayvan etkileşimleri tüm boyutları ile incelenmelidir. Öncelikli olarak meraların besin elementi konsantrasyonlarına ilişkin bölgesel olarak yüzey haritaları çıkarılmalıdır. Bölgesel olarak meralarda toprak ve bitkideki besin elementi içeriklerine ilişkin bir veri tabanının oluşturulması, çayır tetanisi bakımından riskli bölgelerin tespit edilmesine yardımcı olacak ve bu doğrultuda bölgeye özgü gübreleme programlarının oluşturulmasını sağlayacaktır.

## Çıkar Çatışması

Makalenin yazımının, makalenin tek yazarı olarak tarafından yapıldığını beyan ederim.

## KAYNAKLAR

- Alatürk F, 2012. Gübrelemenin Çanakkale İli Meralarında Verim ve Otun Kimyasal Bileşimine Etkileri. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi.
- Algan D, Aydın İ, 2017. Üstten Tohumlanan Ve Gübrelenen Merada Otların Nitrat Ve Makro Element İçerikleri. *Anadolu Journal of Agricultural Sciences*, 32(3): 374–382.
- Allison J, Chris H, 2003. Controlling Grass Tetany in Livestock. Cooperative Extension Service. *College of Agriculture and Home Economics New Mexico* 1–4.
- Alp M, Kahraman R, Kocabağlı N, Özçelik D, Eren M, Türkmen I, Dursun Ş, 2001. Marmara Bölgesi’ndeki Yem Bitkilerinin Mineral Madde Düzeylerinin Saptanması ve Koyunlarda Beslenme Bozuklukları ile İlişkisi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 25(4): 511–520.
- Ates E, Coskuntuna L, Tekeli AS, 2010. Plant Growth Stage Effects on the yield Feeding Value and Some Morphological Characters of the Fiddleneck (*Phacelia tanacetifolia* Benth.). *Cuban Journal of Agricultural Science*, 44(4): 425–428.
- Ayan I, Acar Z, Mut H, Basaran U, Asci O, 2006. Morphological Chemical and Nutritional Properties of Forage Plants in a Natural Rangeland in Turkey. *Bangladesh Journal of Botany*, 35(2): 133-

142.

- Aydın A, Başbağ M, 2017. Karacadağ'ın Farklı Yükseltilerindeki Meraların Durumu ve Ot Kalitesinin Belirlenmesi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 32(1): 74–84.
- Aydın I, Uzun F, 2008. The Possibility of Compensating Potential Tetany Hazard Arising from N and K Fertilization to Rangelands by Mg Treatments. *European Journal of Agronomy*, 29(1): 33–37.
- Aygün C, Kara İ, Oral HH, Erdoğan İ, Atalay AK, Sever AL, 2018. Bazı Çalı Bitkilerinin Sezonluk (İlkbahar Yaz Sonbahar) Yaprak Örneklerindeki Makro ve Mikro Besin Elementi İçerikleri. *Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi*, 7(1): 51–65.
- Bakoğlu A, Koç A, 2002. Otlatılan ve Korunan İki Farklı Mera Kesiminin Bazı Toprak ve Bitki Örtüsü Özelliklerinin Karşılaştırılması. *F.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 14(1).
- Başbağ M, Çağan E, Sayar MS, Fırat M, 2019. Güneydoğu Anadolu Bölgesinin Farklı Lokasyonlarından Toplanan Boynuzlu Geven (*Astragalus hamosus* L.) Otunun Bazı Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi*, 5(2): 346–354.
- Başbağ M, Sayar MS, Çağan E, 2020. Güneydoğu Anadolu Bölgesinin Farklı Lokasyonlarından Toplanan *Salvia multicaulis* VAHL. Türünde Ot Kalite Değerlerinin Belirlenmesi. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 8(7): 1492–1496.
- Bayraktar E, 2012. Taban ve Orman İçi Meralarda Bitki Örtülerinin Verimleri Tür Bileşimi ve Önemli Türlerin Bazı Özellikleri Üzerinde Bir Araştırma (Namık Kemal Üniv). Retrieved from <http://acikerisim.nku.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/20.500.11776/270/0040144.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Brady NC, Weil RR, 2002. Nature and Properties of Soils. In Prentice Hall: Upper Saddle River NJ (15 Edition).
- Can M, Ayan İ, 2017. Domuz Ayrığı (*Dactylis glomerata* L.) Popülasyonlarında Gelişme Dönemlerine Göre Verim ve Bazı Özelliklerin Değişimi. *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*, 20(2): 160–166.
- Chhabra S, 2017. Hypomagnesemia in a Herd Fed on High Protein Diet. *Journal of Veterinary Medicine and Surgery*, 1(1): 1–8.
- Çağan E, Arslan İ, 2020. *Ranunculus constantinopolitanus* Bitkisinin Bazı Bitkisel Özellikleri Besleme Değeri ve Tohumlarına Ait Çimlenme Oranlarının Belirlenmesi. *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 8(7): 1553–1558.
- Dalley DE, 2002. Diseases of Dairy Animals Noninfectious Grass Tetany. In H. Roginski (Ed.) *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 833–838). Elsevier.
- Dalley DE, Isherwood P, Sykes AR, Robson AB, 1997. Effect of in vitro Manipulation of pH on Magnesium Solubility in Ruminal and Caecal Digesta in Sheep. *Journal of Agricultural Science*, 129(1) 107–111.
- Dougherty CT, Wells KL, Mitchell GE, 1995. Sodium in Pasture Species and Grazing Livestock. Cooperative Extension Service University of Kentucky College of Agriculture. Lexington Ky. 40546 28(5).
- Eğritaş Ö, Önal Aşçı Ö, 2015. Yaygın Fiğ- Tahıl Karışımlarının Bazı Mineral Madde İçeriğinin Belirlenmesi. *Akademik Ziraat Dergisi*, 4(1): 13–18.
- Elliot M, 2009. Grass Tetany in cattle - Treatment And Prevention. Primefacts (APrIL) 1–4. Retrieved from [http://www.dpi.nsw.gov.au/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0008/110888/Grass-tetany-in-cattle-treatment-and-prevention.pdf](http://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0008/110888/Grass-tetany-in-cattle-treatment-and-prevention.pdf)
- Gökkuş A, Parlak AÖ, Baytekin H, 2013. Akdeniz Kuşağı Çalılı Meralarında Otsu Türlerin Mineral İçeriklerinin Değişimi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 10(1).
- Gülümser E, Mut H, Çopur Doğrusöz M, Başaran U, 2017. Baklagil Yem Bitkisi Tahıl Karışımların Ot

- Kalitesi Üzerinde Tohum Oranlarının Etkisi. Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 31(3): 43–51.
- Gür M, 2014. Korunan Otlanan ve Sürülüp Terk Edilen Doğal Meraların Bazı İşlevleri ile Kimi Ekolojik Faktörler Arasındaki İlişkiler. Namık Kemal Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı (137s).
- Gürsoy E, Macit M, 2017. Erzurum İli Çayır ve Meralarında Doğal Olarak Yetişen Bazı Baklagil ve Buğdaygil Yem Bitkilerinin Mineral Madde Kompozisyonlarının Belirlenmesi. Alın Teri Zirai Bilimler Dergisi, 32(1): 1–9.
- Hamilton EJ, Miles RJ, Lukaszewska K, Remley M, Massie M, Blevins DG, 2012. Liming of Two Acidic Soils Improved Grass Tetany Ratio of Stockpiled Tall Fescue Without Increasing Plant Available Phosphorus. Journal of Plant Nutrition, 35: 497–510.
- Herrick JE, Bestelmeyer BT, Archer S, Tugel AJ, Brown JR, 2006. An Integrated Framework for science-Based Arid land Management. Journal of Arid Environments. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2005.09.003>
- Karan H, Başbağ M, 2018. Korunan ve Otlatılan Meralarda Ot Kalitesinin Karşılaştırılması. Fırat Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 30(1): 125–132.
- Klaus VH, Hölzel N, Boch S, Müller J, Socher SA, Prati D, Kleinebecker T, 2013. Direct and Indirect Associations Between Plant Species Richness and Productivity in Grasslands: Regional Differences Preclude Simple Generalization of productivity-Biodiversity Relationships. Preslia 85 97–112.
- Koç A, Gökkuş A, Bakoğlu A, Özasan A, 2000. Palandöken Meralarının Farklı Kesimlerinden Alınan Ot Örneklerinde Bazı Kimyasal Özelliklerin Otlatma Mevsimindeki Değişimi. Nternational Animal Nutrition Congress 471-478.
- Kumssa DB, Lovatt JA, Graham NS, Palmer S, Hayden R, Wilson L, Broadley MR, 2020. Magnesium Biofortification of Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) Via Agronomy and Breeding as a Potential Way to reduce Grass Tetany in Grazing Ruminants. Plant and Soil, 457(1–2): 25–41.
- Kumssa DB, Penrose B, Bone PA, Lovatt JA, Broadley MR, Kendall NR, Ander EL, 2019. A reconnaissance Survey of farmers' Awareness of Hypomagnesaemic Tetany in UK Cattle and Sheep Farms. PLoS ONE, 14(10): 1–14.
- Leonhard-Marek S, Gäbel G, Martens H, 1998. Effects of Short Chain Fatty Acids and Carbon Dioxide on Magnesium Transport Across Sheep Rumen Epithelium. Experimental Physiology, 83(2): 155–164.
- Lock TR, Kallenbach RL, Blevins DG, Reinbott TM, Crawford RJJ, Massie MD, Bishop-Hurley GJ, 2000. Phosphorus Fertilization of Tall Fescue May Prevent Grass Tetany. Better Crops With Plant Food, 84(3): 12–13.
- Loudon KMW, Tarr G, Lean IJ, McLerie L, Leahy N, Pethick DW, McGilchrist P, 2021. Short Term Magnesium Supplementation to Reduce Dark Cutting in pasture Finished Beef Cattle. Meat Science 180(January) 108560. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108560>
- Lunnan T, Øgaard AF, Krogstad T, 2018. Potassium Fertilization of Timothy-Based Cut Grassland- Effects on Herbage Yield Mineral Composition and critical K Concentration on Soils with Different K Status. Grass and Forage Science, 73(2): 500–509.
- Macdonald KA, Penno JW, Lancaster JAS, Bryant AM, Kidd JM, Roche JR, 2017. Production and Economic Responses to Intensification of pasture-Based Dairy Production Systems. Journal of Dairy Science, 100(8): 6602–6619.
- Martens H, Leonhard-Marek S, Röntgen M, Stumpff F, 2018. Magnesium Homeostasis in Cattle:

- Absorption and Excretion. *Nutrition Research Reviews*, 31(1): 114–130.
- Martens H, Schweigel M, 2000. Pathophysiology of Grass Tetany and other Hypomagnesemias: Implications for Clinical Management. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16(2): 339–368.
- Martens H, Stumpff F, 2019. Assessment of Magnesium Intake According to Requirement in Dairy Cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103(4): 1023–1029.
- Masters DG, White CL, 1996. Detection and Treatment of Mineral Nutrition Problems in Grazing Sheep. In *Detection and treatment of mineral nutrition problems in grazing sheep*. Australian: Canberra.
- Mayland HF, Shewmaker GE, 2001. Animal Health Problems caused by Silicon and Other Mineral Imbalances. *Journal of Range Management*. <https://doi.org/10.2307/4003115>
- McDowell LR, 1996. Feeding Minerals to Cattle on Pasture. *Animal Feed Science and Technology*. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(96\)00983-2](https://doi.org/10.1016/0377-8401(96)00983-2)
- Netthisinghe A, Galloway H, De Graves F, Agga GE, Sistani K, 2020. Grain Yield and Beef Cow–Calf Growth Performance in Dual-Purpose and Conventional Grain Wheat Production Systems and Stockpiled Tall Fescue Pasturing. *Agronomy*, 10(10): 1–13.
- Netthisinghe A, Galloway H, De Graves F, Agga GE, Sistani K, 2020. Grain Yield and Beef Cow-Calf Growth Performance in dual-Purpose and Conventional Grain Wheat Production Systems and Stockpiled Tall Fescue Pasturing. *Agronomy*, 10(10): 1–13.
- O'Connor MB, Hawke MF, Waller JE, Rotherham JR, Coulter SP, 2000. Salt Supplementation of Dairy Cows. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, 62: 49–53.
- Orak A, Ates E, Varol F, 2004. Macar Fiği (*Vicia pannonica* Crantz.)'nin Farklı Gelişme Dönemlerindeki Bazı Morfolojik ve Tarımsal Özellikleri ile Besin İçeriği İlişkileri. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 10(4): 410–415.
- Özyazıcı MA, Yıldız A, 2017. Türkiye'nin Doğusunda Yer Alan Doğal Bir Meranın Toprak ve Bitki Örtüsünün Beslenme Dinamiği. *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*, 20(özel sayı): 109–115.
- Parlak AÖ, Parlak M, Gökkuş A, Demiray HC, 2015. Akdeniz (Çanakkale) Meralarının Ot Verimi ve Kalitesi ile Botanik Kompozisyonu ve Bazı Toprak Özellikleri. *ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 3(1): 99–108.
- Polat H, Bayraklı F, 2019. Konya Bölgesi Doğal Meraları İçerisindeki Bazı Bitkilerin Ham Protein ve Besin Elementi İçerikleri. *Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi*, 8(1): 132–147.
- Roukos C, Papanikolaou K, Karalazos A, Chatzipanagiotou A, Mountousis I, Mygdalia A, 2011. Changes in Nutritional Quality of Herbage Botanical Components on a Mountain Side Grassland in North-West Greece. *Animal Feed Science and Technology*, 169(1–2): 24–34.
- Sackett D, Holmes P, Abbott K, Jephcott S, Barber M, 2006. Assessing the Economic Cost of Endemic Disease on the Profitability of Australian Beef Cattle and Sheep Producers. *Meat and Livestock (MLA) Limited: Sydney*.
- Schonewille JT, 2013. Magnesium in Dairy Cow Nutrition: An overview. *Plant and Soil*, 368(1–2): 167–178.
- Schonewille JT, Van't Klooster AT, Wouterse H, Beynen AC, 1999. Effects of Intrinsic Potassium in Artificially Dried Grass and Supplemental Potassium Bicarbonate on Apparent Magnesium Absorption in Dry Cows. *Journal of Dairy Science*, 82(8): 1824–1830.
- Swerczek TW, 2018. Sodium for the Prevention of Grass Tetany and Fetal Losses Associated with Nitrate Toxicosis in Herbivores. *Nutrition & Food Science International Journal*, 8(1): 8–11.
- Şahin E, Tosun M, Haliloğlu K, Aydın M, 2010. Yabani Domuz Ayırığının (*Dactylis glomerata*) Olu Ekotipine Ait Hatlarda Bazı Tarımsal ve Kalite Özellikleri. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 5(1): 24–35.

- Şahin N, 2019. Ordu İli Yayla Vejetasyonlarında Doğal Olarak Bulunan Makromantarların Bitkilerin Besin Elementi İçeriklerine ve Toprak Özelliklerine Etkisi. Ordu Üniversitesi.Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi. 71s.
- Şahinoğlu O, 2010. Bafra İlçesi Koşu Köyü Merasında Uygulanan Farklı Islah Yöntemlerinin Meranın Ot Verimi Yem Kalitesi ve Botanik Kompozisyonu Üzerine Etkileri. Ondokuz Mayıs Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri ABD. Doktora Tezi.136s.
- Tekeli AS, Avcıoğlu R, Ateş R, 2003. İran Üçgülü (*Trifolium resupinatum* L.)’nde Bazı Morfolojik ve Kimyasal Özelliklerin Zamana ve Toprak Üstü Biomasa Bağlı Olarak Değişimi. Tarım Bilimleri Dergisi, 9(3): 352–360.
- Tisdale SL, Nelson WL, Havlin L, 1993. Soil Fertility and Fertilizers (Fifth Edit). New York: Macmillan USA.
- Turan N, Özyazıcı MA, Açıkbaş S, Seydoşoğlu S, 2018. Fiğ (*Vicia* sp.) Cinslerine Ait Genotiplerin Bazı Makro Element Kapsamlarının Belirlenmesi. III. Uluslararası Mesleki Ve Teknik Bilimler Kongresi (October) 3705–3712. Gaziantep.
- Tüzen Şahin E, Acar Z, Can M, Ayan İ, 2020. Araştırma Orman üçgülü (*Bituminaria bituminosa* C. H. Stirt) Bitkisinde Bazı Özelliklerin Mevsimsel Değişiminin Belirlenmesi. Akademik Ziraat Dergisi, 9(1): 93–102.
- Underwood EJ, Suttle NF, 1999. The Mineral Nutrition of Livestock (3rd ed.). UK: CABI Publishing.
- Vallentine JF, 2012. Grazing Management. In Grazing Management. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-02468-4>
- Whitehead DC, 2000. Nutrient Elements in Grassland. Introduction. In Nutrient elements in grassland: soil-plant-animal relationships. <https://doi.org/10.1079/9780851994376.0001>.