

FEN BİLİMLERİ VE MATEMATİK ALANINDA GÜNCEL TARTIŞMALAR

Editör

Doç. Dr. Aykut DEMİRÇALI



**FEN BİLİMLERİ VE MATEMATİK
ALANINDA GÜNCEL TARTIŞMALAR**

Editör

Doç. Dr. Aykut DEMİRÇALI



Fen Bilimleri ve Matematik Alanında Güncel Tartışmalar
Editör: Doç. Dr. Aykut DEMİRÇALI

Genel Yayın Yönetmeni: Berkan Balpetek
Kapak ve Sayfa Tasarımı: Duvar Design
Baskı: Ekim 2022
Yayıncı Sertifika No: 49837
ISBN: 978-625-8109-78-8

© Duvar Yayınları
853 Sokak No:13 P.10 Kemeraltı-Konak/İzmir
Tel: 0 232 484 88 68

www.duvar yayinlari.com
duvarkitabevi@gmail.com

İÇİNDEKİLER

1. Bölüm	5
Merkezi Kompozit Tasarım Yöntemi ile Sıvı Kromatografik Ayırma Koşullarının Optimizasyon Stratejisi A. Hakan AKTAŞ, Uğur YAVAŞ	
2. Bölüm	21
<i>İn vitro</i> Şartlarda Double Haploid Bitki Üretim Yöntemleri Büşra YAZICILAR, İsmail BEZİRGANOĞLU	
3. Bölüm	51
Katı Yüzezlere Özgül Peptitlerin Protein Saflaştırma Etiketleri Olarak Uygulamaları: SILTAG Peptit Afinite Etiketleri Deniz ŞAHİN, Candan TAMERLER	
4. Bölüm	67
Gecikme Terimi İçeren Singüler Pertürbe İntegro-Diferansiyel Denklemin Yaklaşık Çözümü Derya ARSLAN	
5. Bölüm	77
Aktinobakteri İzolasyonunda Kullanılan Yöntemler Eda TÜRK, Fadime ÖZDEMİR KOÇAK	
6. Bölüm	95
Sıcaklık Sensörleri, Kalibrasyon ve Ölçüm Belirsizliği Tahmini Melda PATAN ALPER	
7. Bölüm	109
Adıyaman İlinin (Türkiye) Sucul Böcek Çeşitliliği Gani Erhan Taşar, Murat Kızılkaya, Selda Kızılkaya	
8. Bölüm	127
ZnO Nanoparçacık Katkılı Nematik Sıvı Kristal Yapının Dielektrik Özelliklerinin Araştırılması Gülnur ÖNSAL, Mustafa AKSOY	

9. Bölüm	139
<i>Ananas Comosus</i> Kabuğundan Çinko Oksit Nanopartiküllerin (zno-np) Biyosentezi ve Yapısının Aydınlatılması Kadri KURT	
10. Bölüm	159
Tıbbi Bitkilerden Selenyum Nanoparçacıkların Yeşil Sentezi: Karakterizasyon ve Uygulama Alanları Mahmut Yıldıztekin, Senem Öztuğcu, Hatice Becerekli, Kadri Kurt	
11. Bölüm	173
Endüstriyel Enzim: α - Amilaz Sema AGÜLOĞLU FİNCAN	
12. Bölüm	189
Kaynak Sularında FMS-SPE (Otomatik Katı Faz Ekstraksiyon) Sistemi Kullanılarak Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların (PAH) Kromatografik Tayini Serpil Kılıç, Murat Kılıç	
13. Bölüm	199
Fotovoltaik Hücrelerde Kullanılmak Üzere ZnO Nanorod Yapıların Üretimi Sinan TEMEL, Enes Arslan	
14. Bölüm	223
<i>Diospyros kaki</i> L (Trabzon hurması) Meyvesi Kabuklarından Gümüş Nanopartikül (AgNP) Sentezi ve Katalitik Etkisi Üzerine Bir Araştırma Tuğba ÖZBUCAK, Sinem Dağ, Görkem GÜRKAN	
15. Bölüm	245
Hastalıklarla İlişkili SNV'lerin Etki Mekanizmalarının Belirlenmesinde RiboSNitch Yaklaşımı Sertaç ATALAY	

1. Bölüm

Merkezi Kompozit Tasarım Yöntemi ile Sıvı Kromatografik Ayırma Koşullarının Optimizasyon Stratejisi

A. Hakan AKTAŞ¹

Uğur YAVAŞ²

1 Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Isparta-Türkiye

2 Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Isparta-Türkiye

1. Giriş

Analitik yöntem geliştirme, formülasyon geliştirme süreçlerinin vazgeçilmez bir parçasıdır. Farmasötik araştırmalarındaki ilerlemeler, ilaç endüstrilerinin gelişimi ile birlikte, çoğu durumda mevcut ilaçların kısmi modifikasyonları veya yeni dozaj biçimleri olabilen ilaç pazarındaki türlerin sayısını sürekli olarak artırmaktadır. Bu tür formülasyonların tahlil prosedürleri, Farmakopeye resmi olarak dahil edilmeyebilir. Bu nedenle, rutin ilaç analizi için hızlı, basit, kesin, spesifik, uygun maliyetli, doğrulanmış ve kararlı analitik yöntemlerin geliştirilmesi günümüzde ciddi bir gereklilik haline gelmektedir. İlaç taşıma sisteminin tasarımı bununla ilgili olduğu için analitik yöntem geliştirme zorunlu bir gereklilik haline gelir. Ayrıca dissolüsyon çalışmalarının çeşitli aşamalarında ve formülasyon tasarımında da ilaç analizinin gerekli olduğu açıktır¹⁻³. LC – MS, LC – ESI – MS / MS gibi yaygın kullanım bulan karmaşık teknikler analitik araştırmalara girse de en büyük dezavantajları pahalı olmalarıdır. Bu yöntemlerin numune hazırlama adımları da oldukça karmaşıktır. Ayrıca analizlerin zaman açısından uzun sürmesi de küçük ölçekli sanayilerin hızlı analiz teknikleri olarak tercih edilmemesinin nedenidir⁴. UV görünür spektrofotometrik yöntemi, ilaç endüstrilerinde ilaç tahmini için uygulama bulan en eski, ancak aynı zamanda çok kolay, kesin ve daha uygun maliyetli yöntemlerden biridir. HPLC ise analiz işlemlerinde kesin, hızlı ve basit olması nedeniyle rutin işlemlerde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir⁵.

Deneyisel tasarım metodolojisi (DOE) günümüzde farklı bilim alanlarında çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. DOE, minimum deney⁶ ile en güvenilir ve değerli bilimsel bilgiyi elde etmenin yollarını gösteren tanımlanmış bir yöntemdir. Analitik Kimyada DOE, örnekleme, onarım faktörleri, faktörler sütunu, dedektör faktörleri, araç faktörleri veya çevresel faktörler^{7,8} gibi çeşitli faktörleri optimize etmek için kromatografik analitik yöntem geliştirme için kullanılır. Deneyisel tasarım metodolojisinin temel amacı, en iyi analitik sonuçları veren koşulları optimize etmektir. Literatür incelendiğinde, özellikle kimyada bir yöntemin optimizasyonunda çeşitli deneyisel tasarım yaklaşımlarının uygulandığı görülmektedir⁹⁻¹¹.

Hipertansiyon tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de önemli bir sorundur. Anket çalışmalarına bakıldığında, bireylerde hipertansiyonun ortaya çıktığı yaşın önemli ölçüde azaldığı görülmektedir. ACE inhibitörleri kan basıncını kontrol etmek için etkili bir şekilde kullanılır. Bunlar tek başına veya diüretik hidroklorür ve/veya kinapril vb. olarak antihipertansif etkileri arttırmak için kullanılabilir, antihipertansif ajanlar ile ikili kombinasyon halinde kullanılır. Son yıllarda, ACE inhibitörü tahmini için HCT veya kinapril vb. birkaç HPLC yöntemi bildirilmiştir. İkili karışımlarında kinapril ve hidroklorotiyazidin eş zamanlı

kantitatif analizi UV spektrofotometri¹², UV ve HPLC¹³, HPLC^{14,15} ve UV-FT-IR ve RP-HPLC¹⁴ ile gerçekleştirilmiştir.

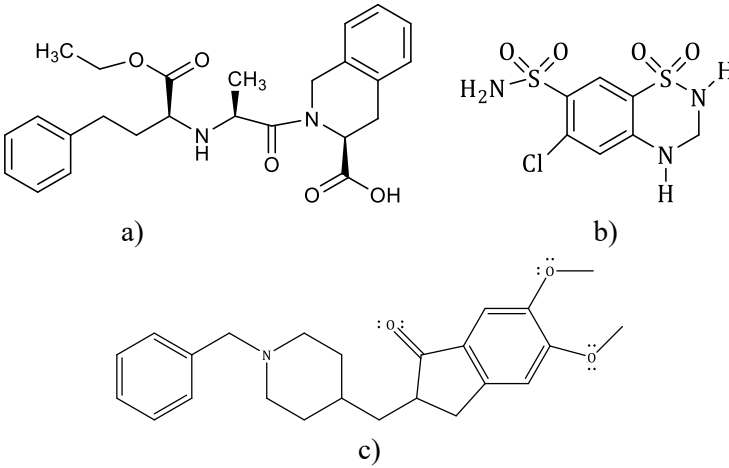
Optimizasyon stratejilerinin amacı, sınırlı sayıda deney gerçekleştirirken en yüksek kalitede bilgiyi elde etmektir. Bu nedenle, deneysel tasarım kullanılarak kombine tablet dozaj formundan kinapril ve hidroklorotiyazidin eşzamanlı tahmini için optimal kromatografik koşulların elde edilmesi için bir deney tasarımının uygulanması işlemine karar verilmiştir.

2. Deneysel

2.1. Kimyasal ve reaktifler

Doğru ilaç analizi, büyük ölçüde numunelerin doğru kullanımına bağlıdır. Kinapril (KIN), hidroklorotiyazid (HCT) ve donepezil (DON), Sigma Chemical Company'den (St. Louis, MO, ABD) satın alındı. Deneylerde kullanılan su Milli-Q arıtma sistemi kullanılarak üretilmiş ve deneylerin her aşamasında kullanılmıştır. HPLC saflıkta asetonitril, Merck'ten satın alındı. Kullanılan diğer kimyasallar en saf haliyle piyasadan temin edilmiştir.

Piyasadan temin edilen (ACCUZIDE® FORT tablet, Pfizer Pharm. Ind., İstanbul, Türkiye) ticari bir farmasötik ürün olarak analiz edildi. Satın alınan firma tarafından beyan edilen ilaç içeriği aşağıdaki gibidir. Her kapsülde KIN 20 mg ve HCT 25 mg.



Şekil 1 Çalışılan bileşiklerin kimyasal yapıları a) KIN b) HCT c) DON

2.2. Enstrümantal Cihaz

HPLC analizleri, Shimadzu LC Solution veri sistemi yazılımı (Shimadzu Technologies, Kyoto, Japonya), sistem kontrol ünitesi (CBM-20 A), bir pompa (LC-20AD), bir UV Görünür dedektörü ile Shimadzu sınıfı HPLC sistemi

kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SPD-20A) diyot dizi dedektörü (SPD-M 20 A) (PDAD), kolon fırını (CTO-10AS) ve gaz giderme ünitesi (DGU-20 A3). Kullanılan kolon Purospher® STAR RP-18 uç başlıklı 5 µm kolondu (4,6 x 250mm) Merck tarafından sağlanan tespitlerde 25°C'de kullanıldı. Enjeksiyon hacmi 20 µL'ye ayarlandı ve akış hızı 1,0 mL/dk olarak ayarlandı. Günlük hazırlanan mobil faz içeriği, bir membran filtreden süzüldü.

2.3. İstatistiksel yazılım

Yöntemin optimizasyonu için Design Expert ® (Sürüm 12), Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, ABD ve Minitab 17 (Minitab Inc, ABD) istatistik yazılımları kullanıldı. Diğer hesaplamalar Microsoft Excel 2010 Yazılımı (Microsoft, ABD) ile yapılmıştır.

2.4. Mobil faz

100 mL mobil faz hazırlamak için asetonitril ve su (37,8553: %62,1447 v/v) kullanıldı. Karışıma 30 mM orto-fosforik asit (H₃PO₄) eklenmiş ve suda hazırlanan sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi ile hareketli fazın pH değeri istenilen çalışma değerine yükseltilmiştir. Mobil faz, ultrasonik karıştırıcıda gazdan arındırıldıktan sonra kullanılmıştır.

2.5. Örnek hazırlama

Piyasadan satın alınan ticari ilaç numunesinden toplam 10 tablet tartılarak toz haline getirildi. Bir tablete eşdeğer miktar, 100 mL'lik şişelerde mobil fazda çözündürüldü. 30 dakikalık bir çalkalama işleminden sonra çözelti süzülerek yıkandı ve mobil faz ile son hacim 100 ml'ye tamamlandı. Nihai çözelti, aynı çözücü ile 1: 100 oranında seyreltildi.

Süzdükten sonra uygun hacimsel şişe açık filtreden geçirildi. 1 mL iç standart (I.S.) bu şişeye çözelti olarak eklenmiş ve hacmi mobil faz ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Optimize edilmiş durum kullanılarak nihai çözümü doğrudan Purospher ® Star RP-18 kolonuna enjekte ederek, ilgili regresyon denklemlerinden KIN ve HCT miktarları hesaplandı.

2.6. Analitik Prosedürlerin Validasyonu

Uygulanan yöntemi doğrulamak için Avrupa İlaç Ajansı tarafından yayınlanan ICH Q2 (R1)'e göre çeşitli parametreler gözden geçirildi. Bu parametreler, örneğin, sistem uygunluğu, doğrusalılık, LOD, LOQ, sağlamlık ve özgüllüktür.

2.6.1. Sistem uygunluk

Sistem uygunluk testleri, sıvı kromatografi ve diğer ayırma tekniklerinde yöntem geliştirmenin bir parçasını oluşturan testlerdir. Bu çalışmada uygulanan sistem uygunluk parametreleri alikonma sũresi, kuyruk faktũrũ ve teorik katman sayısı değerleri olarak seçilmiştir.

2.6.2. Doğrusallık

Yũntemin doğrusallığı, iç standart olarak kullanılan maddenin pik alan oranı, çalışılan bileşiklerin daha ōnce açıklanan konsantrasyon aralıkları içinde gerçekleştirilerek oluşturulmuştur. Uygulanan yũntem, elde edilen korelasyon katsayısı ve kesişim değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir.

2.6.3. Doğruluk ve kesinlik

Doęruluk ve kesinlik çalışmaları genellikle uygulanan yũntemin kalitesini değerlendirmek için yapılır. Başlatılan analizin kesinliği gũn içi ve gũnler arası kesinlik ile değerlendirildi. KIN için 8, 12 ve 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ve HCT için 10, 15 ve 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olmak ūzere ū farklı konsantrasyon, aynı tekrarlanabilirlik ve ara kararlılık için 3 gũn boyunca sũrekli olarak analiz edildi. Őlũlen bir değerin bilinen bir değere yakınlığı doğruluk olarak bilinir. Bu tanıma gũre uygulanan yũntemin ticari ilaç ōrneęine uygulanacak kadar doğru ve kesin olduğu sonucuna varılmıştır.

2.6.4. Tespit sınırı (LOD) ve miktar tayini sınırı (LOQ)

Bu alışmanın LOD ve LOQ' su, tepe alanının standart sapmasından ve KIN ve HCT'nin doğrusallık eğrilerinin eğiminden hesaplanmıştır.

2.6.5. Őzgũllũk

Yũntemin ōzgũllũęũnũn değerlendirilmesi, ticari ilaç numunelerinden elde edilen kromatogramlar ile standart ilaç numunelerinin karşılaştırılmasıyla yapılmıştır.

2.6.6. Sağlamlık

Sağlamlık, çeşitli laboratuvarlarda elde edilen sonuçların yeniden ūretilbilmesi ya da beklenmeyen farklı koşullar altında farklılıklar olarak yorumlanabilmesi yũntemler ve bir yũntemin sağlamlığını sağlamlık testi olarak değerlendirmek için deneysel bir kurulumdur. Őnerilen yũntemin kapasitesini kontrol etmek için, kolon fırın sıcaklığındaki (25-35°C), akış hızındaki (1-1,5 mL/dk) ve enjeksiyon hacmindeki (15-25 μL) bir değişiklik gibi farklı faktũrler bilerek değiştirildi.

3. Sonuçlar ve tartışma

3.1. Yazılım destekli yöntem optimizasyonu

Bu çalışmada, yöntemin geliştirilmesi ve optimizasyonunda merkezi kompozit tasarımı kullanılmıştır. Yöntem geliştirmede uygun mobil fazın seçilmesi önemlidir. Yöntem geliştirme için ve mobil fazdaki organik çözücülerin hacim oranı, tampon ve merkezi kompozit tasarımı (CCD) olası aşırı olmayan koşullar (bağımsız değişkenin minimum veya maksimum seviyeleri) ve 3 değişken dahil olmak üzere çeşitli faktörler dikkate alındı. Onlara tam olarak cevap veren tasarım buna göre gerekli olduğu için bu tasarımı seçmiş ve 20 deney kurulmuştur. Kullanılan 3 faktörlü tasarım, yanıt yüzeyini keşfetmek içindir ve Design Expert® (sürüm 12 Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN ABD) farklı modeller oluşturmak için uygun kabul edilmiştir.

Çalışmada, tam faktöriyel tasarımda düzenlenmiş 20 deneyden elde edilen veriler, KIN, HCT ve DON'un (I.S.) alıkoyma davranışını modellemek için kullanılmıştır. Organik değiştirici yüzdesinin (x_1), mobil fazın pH'ının (x_2) ve kolon sıcaklığının (x_3) seçilen yanıt faktörleri üzerindeki etkisi detaylı olarak incelenmiştir. 3 faktörlü 2 seviyeli tam faktörlü deney tasarımına faktörlerin “yüksek” (+) ve “düşük” (-) değerlerle uygulanmasıyla tasarım oluşturulmuştur. Asetonitril konsantrasyonunun optimizasyonu için tam faktöriyel tasarım verileri, mobil fazın pH değeri ve kolon sıcaklığı Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1 Merkezi bileşik tasarımda kullanılan deneysel faktörler ve bunlara karşılık gelen seviyeler

Bağımsız faktörler	Düşük (-)	Orta (0)	Yüksek (+)
(x_1) acetonitrile (%)	35	40	45
(x_2) mobil fazın pH'sı	6.5	7.0	7.5
(x_3) sıcaklık (°C)	25	30	35

Çalışılan yöntem, bu faktörler kullanılarak elde edilen faktör değerlerinin logaritmasına dayanmaktadır. Yirmi deney yapıldı ve her bir tepe noktası için tutma faktörü değerlerinin logaritmaları hesaplandı. Tablo 2'de her bir deney koşulu için kalıcılık faktörü değerleri verilmiştir.

Tam faktöriyelli merkezi bileşik tasarım istatistik programı kullanılarak bağımsız deney koşulları altında toplanan orijinal veriler üç değişkenle ilişkilendirilir ve bir matematiksel model oluşturulur. Matematiksel modeller Design Expert® (versiyon 12 Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN ABD) istatistik programı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve yanıt değerleri aşağıdaki denklem ile modellenmiştir.

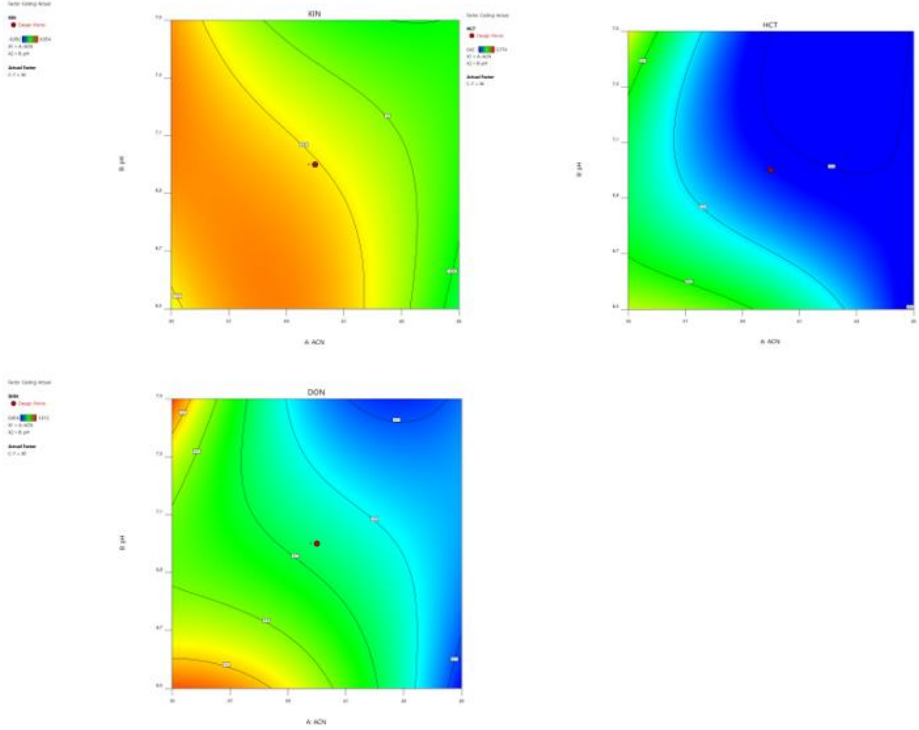
$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 - b_{23}x_2x_3 - b_1x_1^2 + b_2x_2^2 + b_3x_3^2 + b_{12}x_1^2x_2 + b_{13}x_1^2x_3 + b_{13}x_1x_3^2 + b_{13}x_1^2x_3^2 \quad (1)$$

y, faktör düzeylerinin her bir kombinasyonuna bağlı ölçülen yanıt (bağımlı değişken) olduğunda, b_0 , denklemlerin kesişimini sembolize eder ve 20 çalışmanın tüm nicel sonuçlarının ortalama aritmetik ortalamasını temsil eder, x_1, x_2, x_3 ana etkileri temsil eder, x_1x_2 , x_2x_3 ana etkiler arasındaki iki yönlü etkileşimlerdir ve $x_1^2, x_2^2, x_3^2, x_1^2x_2, x_1^2x_3, x_1x_3^2, x_1^2x_3^2$ ana etkiler arasındaki iki ve üç yönlü etkileşimlerdir¹⁶.

Tablo 2 Tam faktöriyel merkezi kompozit tasarım deney çalışmaları.

Deney sayısı	Faktörler			Cevaplar		
	ACN %	pH	T(°C)	KIN	HCT	DON (IS)
1	35,000	6,500	25,000	0,038	0,704	0,986
2	45,000	6,500	25,000	-0,092	0,452	0,480
3	35,000	7,500	25,000	0,058	0,726	0,994
4	45,000	7,500	25,000	-0,080	0,468	0,492
5	35,000	6,500	35,000	0,026	0,744	0,996
6	45,000	6,500	35,000	-0,067	0,456	0,470
7	35,000	7,500	35,000	0,044	0,758	1,012
8	45,000	7,500	35,000	-0,056	0,460	0,584
9	31,591	7,000	30,000	0,032	0,732	0,866
10	48,409	7,000	30,000	-0,050	0,470	0,454
11	40,000	6,159	30,000	0,028	0,774	0,962
12	40,000	7,841	30,000	-0,046	0,465	0,464
13	40,000	7,000	21,591	0,042	0,732	0,950
14	40,000	7,000	38,401	-0,076	0,454	0,508
15	40,000	7,000	30,000	0,018	0,420	0,666
16	40,000	7,000	30,000	0,021	0,422	0,668
17	40,000	7,000	30,000	0,022	0,422	0,669
18	40,000	7,000	30,000	0,025	0,424	0,669
19	40,000	7,000	30,000	0,021	0,423	0,666
20	40,000	7,000	30,000	0,019	0,426	0,667

Çalışılan bileşikler için çözücü olarak seçilen asetonitril, log k üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Seçilen diğer faktörler olan mobil faz pH ve kolon sıcaklık değerlerinin log k üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı belirlendi. log k'nin x_1 ve x_2 ile değişiminin kontur diyagramları Şekil 2'de gösterilmiştir.



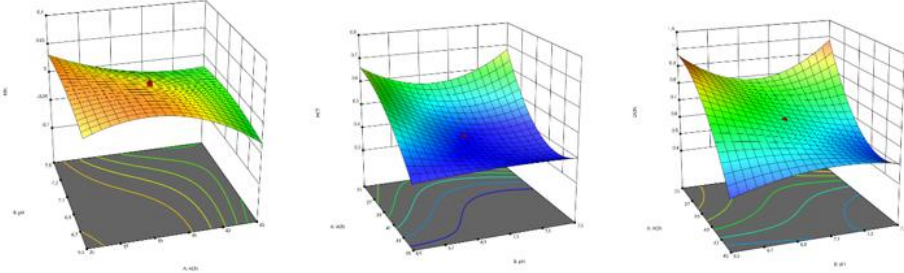
Şekil 2 Asetonitril yüzdesinin ve hareketli fazın pH'ının, çalışılan bileşiklerde bulunan alıkonma değerlerinin logaritmaları üzerindeki etkileri.

Kullanılan yazılım çıktısı olarak elde edilen modelin varyans analizi (ANOVA) sonuçları Tablo 3'te verilmiştir. Elde edilen yüksek R^2 değerleri ve nispeten düşük standart sapma (%CV), deneysel veriler ve kurulan model verilerinde en önemli etkilerden biri olan p değerinin 0,05'ten küçük olduğu gözlemlenmiştir. Tahmini R^2 değerleri, tüm yanıtlar için düzeltilmiş R^2 değerleri ile kabul edilebilir bir uyum içindedir.

Tablo 3 Program tarafından elde edilen ANOVA sonuçları.

Yanıtlar	\pm SD	Ortalama	% C.V.	r^2	Düzeltilmiş R^2	Tahmini R^2	Doğruluk	p değeri
KIN	0.0021	-0.0039	54.88	0.9993	0.9981	1.0000	85.8545	<0.0001
HCT	0.0020	0.5466	0.3569	0.9999	0.9998	1.0000	215.1569	<0.0001
DON	0.0136	0.7115	1.92	0.9986	0.9957	1.0000	49.9768	<0.0001

Optimizasyonu destekleyen bir etki, pozitif bir değerle temsil edilirken, tersi olan negatif bir değer, faktörler ve yanıt arasında ters bir ilişki olduğunu gösterir. 3-D tepki yüzey çizimleri, mobil fazda asetonitril bileşimi, pH gibi faktörlerin etkisini ortaya koydu. Yanıtlar için temsili grafikler Şekil 3'te gösterilmektedir.

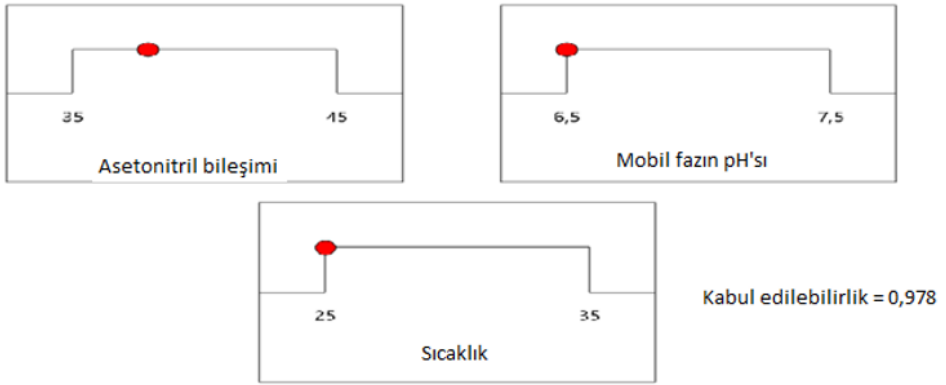


Şekil 3 3D yüzey grafikleri

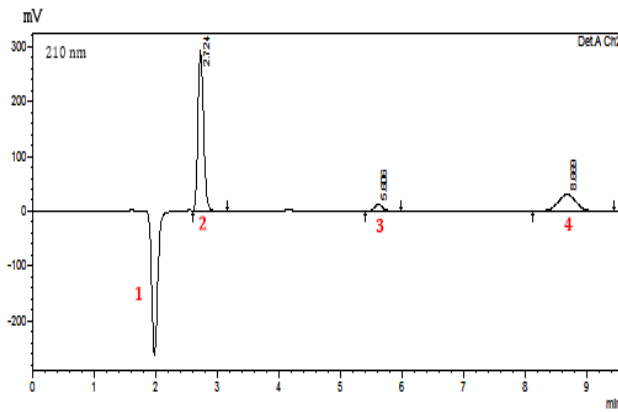
Şekil 3'teki grafiklerin ANOVA sonuçları incelendiğinde aşağıdaki sonuçlara ulaşılabilir. KIN CCD RSM ve modeli için yapılan ANOVA anlamlı bulundu ($p < 0,0001$). Doğrusal açıdan ACN, pH ve T anlamlıdır ($p_{ACN} < 0,0001$, $p_{pH} < 0,0001$, $p_T < 0,0001$). Etkileşim açısından, sadece ACN ve pH etkileşimi anlamlı değildi ($p = 0,182$). ACN ve T'nin etkileşimi önemlidir ($p < 0,0001$). İkinci derece açıdan ACN^2 , pH^2 , T^2 önemlidir ($p_{ACN^2} < 0,0001$, $p_{pH^2} < 0,0001$, $p_{T^2} < 0,0001$). ANOVA modeli uyum eksikliği anlamlı olmadığı için RSM modeli iyi uyum göstermektedir ($p = 0,903$). HCT CCD RSM ve modeli için yapılan ANOVA anlamlıdır ($p < 0,0001$). Doğrusal açıdan ACN, pH ve T anlamlı bulunmuştur ($p_{ACN} < 0,0001$, $p_{pH} < 0,0001$, $p_T < 0,0001$). Etkileşim açısından bakıldığında, tüm etkileşimler anlamlıdır ($p_{ACN-pH} = 0,0273$, $p_{ACN-T} = 0,0001$, $p_{pH-T} = 0,011$). İkinci dereceden açıdan ACN^2 , pH^2 , T^2 anlamlıdır ($p_{ACN^2} < 0,0001$, $p_{pH^2} < 0,0001$, $p_{T^2} < 0,0001$). ANOVA modeli uyum eksikliği anlamlı olmadığı için RSM modeli iyi uyum göstermektedir ($p = 0,5193$). DON CCD RSM ve modeli için yapılan ANOVA anlamlıdır ($p < 0,0001$). Doğrusal açıdan ACN, pH ve T anlamlıdır ($p_{ACN} < 0,0001$, $p_{pH} < 0,0001$, $p_T < 0,0001$). Etkileşim açısından, sadece ACN ve T'nin etkileşimi anlamlı değildir ($p = 0,2107$). ACN ve pH etkileşimi önemliydi ($p < 0,0382$) ve pH ve T etkileşimi önemliydi ($p < 0,029$). İkinci dereceden açıdan, yalnızca ACN^2 anlamlı değildir ($p = 0,4259$). pH^2 , T^2 anlamlıdır ($p_{pH^2} = 0,0039$, $p_{T^2} = 0,0015$). ANOVA modeli uyum eksikliği anlamlı olduğu için RSM modeli uymamaktadır ($p < 0,0001$).

Şekil 4'te gösterilen nicel optimizasyon sırasında, Merkezi Kompozit tasarımı optimize edilmiş kromatografik koşullar için 20 çözüm sunmakla beraber hedefler belirlenerek çözümler azaltılmıştır. Faktörler ve tepkiler için çeşitli

kısıtlamalar belirlenmiş ve kromatografik koşulların optimizasyonu için bir çözüm seçilmiştir. Kromatografik koşulun deneysel değerinin beklenen değere çok yakın olduğu açıkça gösterilmiş, böylece, optimize edilmiş kromatografik koşullar, asetonitril bileşimi (%37,8553), sıcaklık (25°C) ve mobil fazın pH'ı (6.5), sırasıyla KIN ve HCT' nin kromatogramı Şekil 5'te gösterilmiştir. Alıkonma faktörü (k) 1 ile 5 arasında en iyi olarak kabul edilir. Kinaprilin alıkonma süresinin de çözücü tepesinden tam ayrılmaya izin verecek kadar yüksek olduğu bulunmuştur. Son ayrılan bileşiğin alıkonma süresi 9 dakikadan azdır. Sonuçlar, tüm piklerin simetrik olduğunu göstermiştir (kuyruklanma faktörleri $\approx 1,0$).



Şekil 4 Kromatografik koşullar için sayısal optimizasyon



Şekil 5 Standart karışımın kromatogramı.

1. Çözücü, 2. HCT (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 3. IS (DON)(10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 4. KİN (8 $\mu\text{g mL}^{-1}$).
Kromatografik prosedürdeki deney koşullarıdır.

3.2. Validasyon

Sistem uygunluğu, doğrusalılık, kesinlik ve doğruluk, tespit sınırı (LOD) ve miktar tayin sınırı (LOQ), özgüllük ve sağlamlık iddiasını doğrulamak için optimize edilmiş kromatografik koşullar uygulandı.

3.2.1. Sistem uygunluk

Numune analizi başlamadan önce kromatografik sistemi değerlendirmek için sistem uygunluk testleri uygulanır. Bu çalışmada alıkonma süresi, kuyruk faktörü ve teorik katman sayısı değerleri hesaplanmıştır. Alıkonma süresi (dk) optimize edilmiş koşullar altında KIN, HCT ve DON için sırasıyla 8,760; 2,710 ve 5,379 dir. Kuyruklanma faktörleri KIN, HCT ve DON için sırasıyla 1,031; 1,289 ve 1,410 dir. Teorik plaka sayısı (N) KIN, HCT ve DON için sırasıyla 4070, 3743 ve 6086 dir.

3.2.2. Doğrusallık

KIN ve HCT için kalibrasyon eğrileri ve denklemleri, KIN için 4-20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ve HCT için 5-25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aralığındaki bileşiklerin konsantrasyonuna karşı bu bileşiklerin I.S' ye tepe alan oranları çizilerek hesaplandı (Tablo 4). Lineer regresyon analizi sonucunda bu bileşikler için RP-LC sisteminin tepkisinin lineer olduğu bulunmuştur. Eğim ve kesişim SE'nin düşük değerleri ve tüm bileşikler için 0,999'dan yüksek korelasyon katsayısı değerleri önerilen yöntemlerin kesinliğini ortaya koymuştur.

Tablo 4 KIN ve HCT kalibrasyon verilerinin RP-LC ile istatistiksel değerlendirilmesi.

Analit	Doğrusallık aralığı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Eğim	Kesim	S.E. nin eğimi	S.E. nin kesimi	Korelasyon katsayısı
KIN	4-20	0,2876	0,0524	0,004	0,054	0,999
HCT	5-25	0,9254	0,2842	0,010	0,198	0,999

3.2.3. Hassasiyet ve doğruluk

Farklı numunelerin analizinin ardından gerçekleştirilen gün içi, günler arası ve tam kesinlik ve sonuç verileri Tablo 5'te verilmiştir. Kesinlik değerlerinin %1'den az olması uygulanan yöntemin tekrarlanabilir ve kesin olduğunu göstermektedir. Doğruluk çalışmalarında en büyük sapma %0,840 olup mevcut yöntemin doğru olduğunu göstermektedir.

Tablo 5 Çalışmanın doğruluk ve kesinliği

Analit	Standart konsantrasyon ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Günler arası ölçümlerin ortalaması	Geri kazanım (%)	RSD%	Günler içi ölçümlerin ortalaması	Geri kazanım (%)	RSD%
KIN	4	4,067	101,67	0,342	4,022	100,55	0,768
	12	11,886	99,05	0,584	12,058	100,48	0,840
HCT	5	4,988	99,76	0,658	4,848	96,96	0,750
	20	19,854	99,27	0,242	19,946	99,73	0,610

3.2.4. Tespit sınırı (LOD) ve miktar tayini sınırı (LOQ)

Çalışılan analitler için saptama sınırı ve kantitasyon sınırı, KIN için 0,724 ila 2,224 ve HCT için 0,682 ila 2,082 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aralığında bulunmuştur.

3.2.5. Özgüllük

Çalışılan HPLC yönteminin, farklı bileşenlerin tutulmasında hiçbir inhibitör pik gözlemlenmediği için spesifik ve seçici olduğu gözlemlendi.

3.2.6. Sağlamlık

Bu analizin sağlamlığı, kromatografik koşullarda amaçlanan küçük değişiklikler yapılarak sağlandı. Başlatılan yöntemin sağlamlık çalışması, asetonitril konsantrasyonu ($35\text{-}45 \mu\text{g mL}^{-1}$), kolon fırın sıcaklığı ($25\text{-}35^\circ\text{C}$) ve mobil fazın pH'ı ($6,5\text{-}7,5$) gibi farklı faktörler kullanılarak değerlendirildi. Faktörlerin her birinin etkisi belirlendi ve faktörlerin hiçbiri zirvenin ötesine geçmedi, bu da bu şekilde çalışılan bağımsız değişkenlerin sonuçları etkilemediğini gösterdi. Ayrıca, KIN ve HCT etken maddeleri alıkonma süresinde bir miktar etkileşim göstermediği için ilk yöntemin spesifik olduğu bulundu.

3.3. Ticari tablet formülasyonunun analizi

Önerilen yöntemin çeşitli etkilerini kontrol etmek için, çalışılan bileşiklerin bilinen formüllerine önceden belirlenmiş miktarlarda saf ilaç bileşikleri eklenmiş ve geri kazanım testleri ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, önerilen yöntemin yeterli hassasiyet ve doğruluğa sahip olduğunu ve sonuç olarak seçilen formülasyonda kullanılan aktif olmayan bileşenlerden herhangi bir müdahale olmaksızın KIN ve HCT'nin belirlenmesine uygulanabileceğini göstermiştir (Tablo 6). Uygulanan yöntemin tablet dozaj formuna uygulanacak kadar doğru ve kesin olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 6 Ticari ilaç numunesinin analiz sonuçları

	KIN	HCT
İlaçtaki miktar (mg)	25,0	20,0
Bulunan miktar (mg)*	25,21	19,52
RSD %	0,267	0,672
Hata %	-0,857	0,672
Xortalama±SD	25,214±0,167	19,526±0,325

*Beş deney tekrarının ortalama değerleri

4. Sonuç

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde kombinasyon halinde KIN ve HCT aktif bileşenlerinin optimum şekilde ayrılması için merkezi kompozit tasarım yöntemi kullanılarak hızlı, basit ve hassas bir yöntem geliştirilmiş ve optimize edilmiştir. Uygulanan yöntem, çalışılan analitlerin farklı dozaj formlarının analizinde de rahatlıkla kullanılabilir. Çünkü yazılım programı, yöntem uygulanırken geliştirilmiş ve doğrulanmıştır. Geliştirilen yöntemin ilaç analizlerinde kalite kontrol örneklerine uygulanabileceği düşünülmektedir. Bu, kalite kontrol laboratuvarlarında basit izokratik kromatografik koşullar, numune hazırlama ve hızlı analiz, numunelerin rutin analizi için daha uygun hale getirir.

Yazar Katkıları

A. Hakan Aktaş'ın katkısı, çalışmaların ve deneysel koşulların planlanması ve makalenin yazılması, Uğur Yavaş'ın katkısı ise deneyler yaparak yazıya katkı sağlamaktır.

References

1. A. Douglas, F. Skoog and J. Holler, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Brooks/Cole publications, Stamford, 2009.
2. The Merck Index, *An encyclopedia of chemicals drugs and biologics*, 14th edition, Merck and Co., New Jersey, 2006.
3. S.C. Sweetman (eds), *The Complete Drug Reference*, 33rd edition, Pharmaceutical Press, London, 2002.
4. M. Dousa, P. Gibala, Rapid determination of ambrisentan enantiomers by enantioselective liquid chromatography using cellulose-based chiral stationary phase in reverse phase mode, *Journal of Separation Science*, 2012, 35, 798- 803.
5. R. Nirogi, V. Kandikere, P. Komarneni, R. Aleti, N. Padala and I. Kalaikadhiban, LC-ESI-MS/MS method for quantification of ambrisentan in plasma and application to rat pharmacokinetic study, *Biomedical Chromatography*, 2012, 26, 1150-1156.
6. S. Furlanetto, S. Orlandini, P. Mura, M. Sergent and S. Pinzauti, How experimental design can improve the validation process. Studies in pharmaceutical analysis, *Anal Bioanal. Chem.*, 2003, 377, 937-944.
7. D.M. Dhumal, S.B. Ganorkar, M.U. Patil, D. Singh, M.C. Sharma and K.S. Bhadoriya, RP-HPLC-PDA analyses of tapentadol: Application of experimental design, *J. Anal. Chem. Lett.*, 2016, 6, 214-223.
8. H. Ebrahimi-Najafabadi, R. Leardi and M. Jalali-Heravi, Experimental design in analytical chemistry–part I: Theory, *J. AOAC Int.*, 2014, 97, 1-9.
9. P.W. Araujo, G.J. Brereton, Experimental design I. Screening, *TRAC-Trend. Anal. Chem.*, 1996, 15, 26-31.
10. P.W. Araujo, G.J. Brereton, Experimental design II. Optimization. *TRAC-Trend. Anal. Chem.*, 1996, 15, 63-70.
11. P.W. Araujo, G.J. Brereton, Experimental design III. Quantification, *TRAC-Trend. Anal. Chem.*, 1996, 15, 156-163.
12. P.A. Kokane, B.A. Bhairav and R.B. Saudagar, UV Spectrophotometric Method Development and Validation of Benazepril Hydrochloride, *Asian J. Research Chem.*, 2016, 9, 369-372.
13. D. Bonazzi, R. Gotti, V. Andrisano and V. Cavrini, Analysis of ACE Inhibitors in Pharmaceutical Dosage Forms by Derivative UV Spectroscopy and Liquid Chromatography (HPLC), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1997, 16, 431–438.
14. V.T. Gawande, P.B. Miniyar, D.D. Bhandari, M.K. Ghag, D.B. Rajput and A.A. Mahajan, Simultaneous Estimation of Quinapril Hydrochloride and

- Hydrochlorothiazide from Pharmaceutical Formulation by Using UV, IR and RP-HPLC, *Asian Journal of Chemistry*, 2014, 26, 3799-3804.
15. G.M. Khomushku, A.A. Zhloba, V.S. Puchnin, M.V. Arkhipova and S.M. Moiseeva, Analysis of the Angiotensin- Converting Enzyme Inhibitors Perindopril, Lisinopril, and Quinapril by HPLC, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2011, 44, 619-623.
 16. E.Ç. Demiralay, An Experimental Design Approach to Optimization of the Liquid Chromatographic Separation Conditions for the Determination of Metformin and Glibenclamide in Pharmaceutical Formulation, *Acta Chim. Slov.*, 2012, 59, 307-314.

2. Bölüm

İn vitro Şartlarda Double Haploid Bitki Üretim Yöntemleri

Büşra YAZICILAR¹

İsmail BEZİRGANOĞLU²

1 Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,
busra.yazicilar21@erzurum.edu.tr

2 Doç. Dr., Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,
İsmail.bezircanoglu@erzurum.edu.tr

GİRİŞ

Haploid bitki, hücrelerdeki gametik kromozom sayısının (n) varlığına göre isimlendirilmiştir. Bu bitkiler genellikle erkek veya dişi gametik hücrelerden türemiştir. Dikotiledonlarda, haploid bitkiler hem erkek hem de dişi gamet hücrelerinden üretilirken monokotiledonlarda ise, sadece tek gamet hücresiyle üretilmiştir. Haploid bitki üretiminde 100 angiosperm içinde en çok tercih edilen çeşitler *Triticum aestivum* (Inagaki, 2003), *Zea mays* (Gaillard,1991), *Hordeum vulgare* (Hagberg ve Hagberg, 1980), *Oryza Sativa* (Bishnoi, 2000), *Panicum miliaceum* (Powell,1975), *Sorghum Poaceae* (Brown, 1943), *Avena sativa* (Nishiyama, 1961), *Brassica napus* (Thompson, 2004a), *Solanum lycopersicum* (Kirillova ve Bogdanova, 1978), *Erythroxyton coca* (Lanaud, 1988) ve *Gossypium hirsutum* (Tulecke 1964)'dur.

Haploid bitki üretiminde, *in vitro* şartlarda izole edilmiş çok sayıda embriyogenik mikrosporun bulunması önemlidir, bu da bitki genetiğiyle uğraşan bilim insanlarının, daha büyük ölçekte double haploid (DH) bitki üretiminin sağlanması için yeni haploid bitki üretim yöntemlerinin keşfedilmesini sağlamıştır (Kimber ve Riley, 1963). Yeni haploid bitki üretim yöntemleri;

- Somatik hibridizasyon,
- Partenogenez,
- Yabancı dölleme,
- Tozlaşma (polinasyon)'dır (Kasha ve Maluszynski, 2003). Yeni double haploid üretim yöntemlerinden biri olan partenogenesis ile *Z.mays* bitkisinde denenmiştir ve başarılı bir şekilde embriyolar üretilmiştir (Guha ve Maheswar, 1964). Bourgin ve Nitsch (1967) aynı prosedür izlemiş ve *N. tabacum* ve *N. sylvestris*'te haploidler üretmiştir.

În vitro şartlarda haploid üretiminde mikrospor, anter ve ovul kültür teknikleri çeşitli mahsulleri üretmek için kullanılmıştır. Haploid bitki gelişimi türden türe ve genotipe göre farklılık göstermiştir. Haploid bitki üretiminde genellikle kullanılan model bitkiler *B. napus*, *H. vulgare* ve *N. tabacum*'dur. Baklagiller haploid üretime dirençliken, tahılgillerde haploid üretimi daha çok genotipe bağlıdır. Tahılgiller, albino bitkileriyle kıyaslandığında haploid üretim frekansı daha yüksektir (Holme, 1999).

1. *In Vitro* Şartlarda Haploid Bitki Üretim Yöntemleri

Haploid bitki üretmek için erkek ve dişi gametlerde embriyogenezi indüklenmesi için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Maluszynski (2003), pek çok mahsulde haploidler veya DHs üretmek için çeşitli yöntemleri ve protokolleri kapsamlı bir şekilde gözden geçirmişlerdir. Embriyogenezi indüklemek için geliştirilen yöntemler,

- Androgenesis (anter kültürü ve mikrospor kültürü),
- Ginogenesis,
- Partenogenesis (eşeysiz üreme)'dir.

Androgenesis: Kromozomları yalnızca erkek ebeveyn embriyosundan oluşan zigota denir. Androgenez, embriyogenez anter veya mikrosporlarda kallus oluşumu yoluyla doğrudan veya dolaylı olarak indüklenmiştir. En çok tercih edilen yöntemlerden biridir.

Ginogenesis: Bu yöntemde, infertil yumurtalık ya embriyo kesesini ya da yumurta hücrelerini doğrudan dölleyerek bir tane embriyo gelişimine neden olmuştur.

Partenogenesis: Bir çeşit aseksüel çoğalma türüdür; döllenenmemiş bir dişi gametin, apogamiye dönüşmesidir.

1.1. Androgenesis: Double Haploid (DH) Bitki Üretim Süreci

Androgenesis, DH üretmek için bitki ıslah programlarında yaygın olarak kullanılan en önemli yöntemlerden biridir. Olgun polen tanesi yerine mikrospor embriyogenez kullanılarak bir haploid embriyo oluşturma esasına dayanmaktadır.

Mikrospor embriyogenez oluşumu, anterlerin ya da mikrosporların çevresel şartları değiştirilerek sporofitik büyüme ve gelişme yolundaki gametofitik yolu yeniden programlandırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Doğal şartlar altında mikrospor generatif (üretken) ve vejetatif çekirdeği kapsayan olgun bir polen tanesine dönüşmesidir. Generatif (üretken) çekirdek iki sperm çekirdeğine dönüşmesidir. Dolayısıyla, mikrosporlardaki gamet hücreleri hâlâ totipotent olduğunda, sporofitik gelişim hücre bölünmesinin başlangıcından önce başlatılmalıdır. Bununla birlikte, mikrosporların embriyogenik aşaması türleri arasında büyük farklılık göstermektedir (Ferrie ve Möllers, 2011; Germanà, 2011). Mikrosporlar androgenesise uygundur ve haploid bitkiler oluşturulmuştur. Androgenesis üç aşamada gerçekleşmektedir:

1. Embriyogenez indüksiyonu,
2. Haploidlerin rejenerasyonu,
3. Yapay kromozom katlanması.

Androgenesis yoluyla haploidlerin veya DH üretimi mikrospor kültürü veya anter kültürü izolesi vasıtasıyla elde edilmiştir.

1.1.1. Mikrospor kültürü

Mikrospor kültürü (polen kültürü), bitki üreticileri için, hibridizasyon yapıldıktan sonra tek nesil homozigotluğu sabitleyerek üreme işlemlerini hızlandırmalarını sağlayan DH bitkilerini daha büyük bir ölçekte geliştirmeleri

için fırsat sunmaktadır. İzole edilmiş mikrospor kültürü (IMC) yardımı ile çeşit geliştirme süresini önemli ölçüde azaltılmıştır. IMC, olgunlaşmamış polenlerin veya mikrosporların anterlerden elde edilmesini ve bunu takiben onları büyüme ortamında, büyüme ve gelişmeleri için gerekli olan optimum çevre koşulları altında kültürlenmesini ve gametofitik yolaklarını çeşitli stres muameleleri kullanarak sporofitik yeniden programlamayı içermektedir (Chandler ve Roberson, 2009; Domozych, 2012). Mikrospor kültürün, anter kültüründen ayıran özellikler:

- Anter kültüründe hem haploid hem de diploid bitkiler elde edilirken, mikrospor kültüründe daima haploid bitkiler elde edilmiştir.
- Anter kültürü uzun zaman alan ve zahmetli bir yöntemken, mikrospor bunun tam tersidir.
- Anter kültürü, mikrosporlar dışındaki anter dokularını, gelişmekte olan bir mikrosporların büyümesi ve gelişimi üzerinde yıkıcı bir etkiye sahip olabilir ve bir dereceye kadar gelişim süreçlerini etkileyebilmiştir.
- Gelişmekte olan mikrosporlar IMC sırasında üniform besleyici erişime sahiptir.
- IMC, her bir embriyogenez evresini ayrı ayrı izlenmesine olanak sağlar ve mikrospor embriyogenezine katkıda bulunan en önemli faktörlerin daha iyi anlaşılmasını sağlayarak, mikrospor embriyogenez yolunu daha iyi izlemek için bir fırsat sağlamıştır.
- IMC, hedeflenen mutagenез için bir platform sunar ve moleküler biyologların hedeflerinin piramit genlerine daha kısa sürede yönlendirebilen etkili bir gen transfer tekniği sunmuştur. Böylece, transgenik bitkilerin yaşam döngüsünün çok erken bir evresinde tanımlanabilmiştir.
- Gametofitikten sporofitik yola geçme ve mikrospor embriyogenezinin başlatılması sırasında hücre değişiklikleri çalışmaları IMC sırasında kolayca gerçekleştirilebilmiştir.
- Embriyogenik yapılar, anter kültürü ile karşılaştırıldığında IMC'de on kat daha fazladır.

Mikrospor embriyogenezisi, 1960'dan sonra önem kazanmaya başlamıştır. Guha ve Maheswari (1964), belirli çevre koşulları sağlayarak, *Datura innoxia*'nın olgunlaşmamış polen tanelerinin anterlerinden kolaylıkla üretilebildiğini keşfettiğinde, bu teknik çok hızlı gelişmiştir. Bu teknolojinin etkinliğini arttırmak için IMC'nin her adımı ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Çeşitli bitkilerde çok çeşitli protokoller oluşturulmuştur. Her bir genotipde, mikrospor

embriyogenesinin oluşumunda androgenesinin aşamaları spesifik olmasına rağmen bu tekniğe dahil olan ana aşamalar şunlardır:

1. Donör (Verici) bitki büyüme ve gelişim koşulları,
2. Çiçekli organların toplanması,
3. Ön muameleler
4. Mikrosporların izolasyonu ve saflaştırılması,
5. Besiyeri ortamının bileşenleridir.

1.1.1.1. Donör bitkinin büyümesi ve gelişim koşulları

Verimlilikle doğrudan bağlantılı olduğu için verici bitkinin büyüme ve gelişim koşulları IMC'nin tüm sürecini kapsayan en önemli noktalarından biridir. Optimum büyüme ve gelişim koşulları, böcekler ve zararlılardan kaynaklanan hastalık oluşumunu ve enfestasyonunu en aza indireyen kontrollü koşullar altında optimum ışık, nem, sıcaklık ve fotoperiyodun sağlanması yoluyla sağlıklı ve dayanıklı donör bitkiler elde edilebilmiştir (Dahleen, 1999). Mikrosporları izole etmek için tarla yetiştirilen bitkiler kullanılmıştır ancak daha az embriyogenik yanıt gözlemlenmiştir. Donör bitkilerin yetiştirme koşulları sadece embriyogenez üzerinde değil aynı zamanda yeşil bitki sayısı üzerinde de doğrudan bir etkiye sahiptir. Büyüme koşulları arasında sıcaklık, birkaç çalışmada araştırılan büyük endişe kaynağıdır. Yüksek yoğunluk ve sıcaklıkla etkileşimi donör bitkilerin fizyolojik durumunu da etkilemiştir. Ayrıca donör bitkilerin genotipi mikrosporların embriyogenezise tepkisinde çok önemli bir rol oynar ve sadece türden türe farklı değildir. Aynı zamanda türler arasında önemli farklılıklar göstermiştir ve bu özellikle tritikale, arpa, buğday ve yulaf gibi hububat için geçerlidir. IMC sırasında embriyogenik tepkisi, belirli bir türde çeşitli varyasyonlara sebep olurken bazı türlerde ise herhangi bir varyasyona neden olmamıştır (Phippen ve Ockendon, 1990). Farklı türlerde androgenik tepkilerini araştırmak için bir dizi deney gerçekleştirilmiştir, böylece DH üretiminin genel tepkisini anlamak için model türler tanımlanmıştır.

1.1.1.2. Çiçekli organların toplanması

Mikrospor kültürünün etkinliği, aynı zamanda mikrospor izolasyonu için donör bitkilerden toplanan organların toplandığı polen evresi ve bitki yaşına da bağlıdır. Mikrospor izolasyonunun, donör bitkilerin daha sonraki hayat döngüsünde görüldüklerinden daha önce ortaya çıkan oral organlarla yapılması durumunda, daha büyük bir androgenik yanıt fark edilmiştir. Benzer bir eğilim, birincil filizlerin ikinci dereceden ve üçüncül filizlerden çok, anter ve mikrospor kültürüne daha iyi yanıt verdiği tahıl türlerinde görülmüştür.

1.1.1.3. Ön muameleler

Çeşitli türlerde ön muameleler, mikrosporum sporofitik gelişiminde yardımcı olabilecek stresleri indüklemektedir. Yaygın olarak kullanılan ön muameleler;

- a. Soğuk şoku,
- b. Isı şoku,
- c. Besin yetersizliğidir.

Tek başına veya kombinasyon halinde ön muameleler, gametofitik büyümeden sporofitik yolağa kadar mikrosporumların optimum bir dönüşümü sağlamak için tetikleyici faktörler veya uyarıcı olarak görev yapmıştır. Ayrıca, hayvan hücrelerinin bitki hücrelerine ek olarak, embriyogenezi indüklemek için stres şeklinde bir çeşit ön muameleye tabi tutulmasını da gerektirdiği gözlemlenmiştir; çünkü hayvan klonlaması durumunda "Dolly" kökeni, koyunlarda embriyogenik bir hücrenin gelişimi için ana bileşenlerden biri olarak stres ön-muamelesini gerektirmiştir.

a) Soğuk şoku

Mikrospor embriyogenezi başlatmak için birçok üründe soğuk ön muamele yapılmıştır. Anterlerin soğuk ön muamelesi, yalnızca normal gametofitik gelişimlerini durdurmakla kalmayıp, aynı zamanda mikrosporumların gelişimsel sürecini senkronize etmeye yardımcı olmuştur (Kasha ve Hu, 2001). Mısır (Gaillard, 1991), tritikale (Dubas, 2010), buğday (Indrianto, 1999), arpa (Sunderland ve Xu, 1982), çavdar (Immonen ve Anttila, 1999) gibi tahıl ürünlerinin yanı sıra turunçgiller (Germana, 2003) ve tütün (Sunderland ve Roberts 1979) gibi diğer bitkilerde de soğuk ön işlem uygulanması yapılmıştır. Soğuk şoku, mikrosporumların bozunumlarını azaltılmasında yardımcı olmuştur, böylece çürüyen materyal ve diğer zehirli maddelere maruz kalmalarını engellenmiştir.

b) Sıcak şok

Sıcak şok ön muamelesi, etkili bir embriyogenezi başlatıcısı olarak bulunmuştur. Mikrospor embriyogenezinden maksimum sonuç elde etmek için ya tek başına ya da az miktarda şekerle birlikte kullanılmıştır. Isı şoku, sadece embriyogenezi indüklemek için değil aynı zamanda embriyo veya embriyo benzeri yapılar (ELS) oluşturmak içinde kullanılmıştır. Ayrıca, yeşil bitki sıklığını arttırmak için brassica türlerinde IMC yaygın şekilde uygulanmıştır. *B. napus* ve *B. carinata*'nın tomurcukları, 32°C 'de 1-4 gün ısı şokuyla muamele edildiğinde, tüm tomurcuklarda embriyogenezi sürecini aktive etmiştir (Pechan ve Smykal, 2001). Tütünde, hafif ısı şokuyla, gametofitik gelişimin ve sporofitik yolağa doğru yeniden mikrospor programlanmasının geliştirilmesine yardımcı olmuştur. Isı şoklarının çok sayıda hücre modifikasyonuna neden olmuştur. Isı şok protein (HSP) sentezi, androjenizde önemli bir rolü sahip olduğu gözlemlenmiştir. HSP üretimi, sadece ısı işlemlerle bağlantılı değildir, aynı

zamanda soğuk muamele, ozmotik ve oksidatif stresle bağlantılıdır. HSP sentezi, embriyogenezis, meyve olgunlaşması, polen tane büyümesi ve gelişimi ve çimlenme gibi bitki büyümesinin farklı safhalarında yer almıştır (Parcellier, 2003). HSP'lerin başlıca bileşenlerinden ikisi olan HSP70 ve HSP90, mikrospor embriyogenezinin başlangıcından hemen sonra, embriyogenik indüksiyonun ekspresyon seviyelerini artırmıştır. Bu HSP'ler, polen tanecikleri büyümesi ve gelişimi için gerekli olan proteinlerin sentezini de engellemiştir. Dolayısıyla, HSP'ler, mikrosporların gametofitik gelişiminden sporofitik yolağa programlanması için çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu HSP'lerin, ısı şoklarına maruz kaldıklarında, indüksiyon veya kültür periyodu boyunca mikrosporların programlı hücre ölümü (PCD) veya mikrospor apoptozu ile baş etmede önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Zorinants, 2006).

c) Besin Yetersizliği

Bitkide strese neden olan besin yetersizliğinin ana bileşenleri glukoz ve azot'dur. Besin yetersizliğine maruz kalma, her zaman olgunlaşmamış polenlerin veya mikrosporların üniform popülasyonuna, çoğunlukla indüksiyon aşaması sırasında, mikrosporlar, sporofit gelişimini indüklemek için orta ila geç ünükleat faz arasında olduğunda uygulanmıştır. Gametofitik olmaktan ziyade sporofitik gelişim başlatmaya yönlendirmiştir. Mikrospor kültürü sırasında karbohidratların kullanımı esas olarak ortamın pH ve ozmotik basıncına bağlıdır. Düşük pH düzeyleri, örneğin pH 5.0-6.0 arasında olan bir ortamda mikrosporların indüklenmesi sukrozun etkin bir şekilde kullanılmasına ve sukrozun nişasta haline dönüştürülmesine neden olmuştur, böylece mikrosporlar gametofitik yol izledikten sonra polen tanecik gelişimine doğru yönlendirilmiştir. Tam tersi durumda ise mikrosporlar, pH seviyeleri 8.0 ya da daha yüksek olan bir ortama alınır, sakkaroz kullanımını önemli derecede azaltarak mikrosporları sporofitik yola yönlendirilmesi sağlanmıştır (Zorinants, 2005). Azot yetersizliği, mikrospor olgunlaşmasını inhibe ederek sporofitik gelişiminin başarılı şekilde gerçekleşmesi sağlanmıştır. Karbohidrat yetersizliği, çeşitli yapısal ve fizyolojik hücre modifikasyonlarına neden olduğu bilinmektedir;

1. Hücre çoğalmasının inhibisyonu,
2. Anlık veya hızlı karbohidrat alımı,
3. Hücre solunum hızındaki azalma,
4. Hücre proteinlerinin ve lipidlerin bozunması,
5. Serbest amino asitlerin hızlı birikimi,
6. P_i , fosforilholin ve glikolitik enzimlerin aktivitelerinde meydana gelen azalmalardır.

1.1.1.4. Mikrospor izolasyonu ve saflaştırılması

Tomurcuklar, yumrular ve çiçeğe ait organlar, herhangi bir böcek, zararlı, mantar veya bakteri bulaşmasını ortadan kaldırmak ya da uzaklaştırmak için mikrospor izolasyonundan önce kimyasallarla muamele edilmiştir. Kirleticilerin uzaklaştırılmasında kullanılan başlıca kimyasallar hipoklorit asit, etanol, sodyum hipoklorit ve civa klorürdür. Bununla birlikte, bu kimyasalların mikrosporlar üzerinde ölümcül etkilerinden kaçınmak için yüzey sterilizasyon süresine özen gösterilmelidir. Yüzey sterilizasyon için çiçeğe ait organlar %75 etanol veya %10 hipoklorit asitle 3-5 dakika süreyle muamele edilmiştir. Çiçek organları %15 sodyum hipoklorit ile 15-20 dakika yüzey sterilize edilmiştir. Birkaç çalışmada civa klorür (%0.1) ile yüzey sterilizasyonu yapılmıştır ancak toksik etkisinden dolayı fazla tercih edilmemiştir. Mikrospor izolasyon prosedürleri 4 gruba ayrılır;

- a. *Mikrospor dökülmesi*: Mikrospor dökülmesi yöntemi ilk olarak *N. tabacum*'da Sunderland ve Roberts (1977) tarafından rapor edilmiştir. Anter (somatik) dokuların toksik etkilerini ortadan kaldırmak için anterlerden ayrı bir besiyeri ortamında, indüksiyonunu takip eden sıvı besiyeri ortamındaki anterlerden salınan mikrosporlar içermektedir.
- b. *Maserasyon*
- c. *Manyetik çubukla karıştırma*: Manyetik çubuk karıştırma izolasyonu yöntemi, anterler tarafından örtülmüş olan mikrosporların çıkarılması için karıştırma kuvvetini içermektedir. Bu izolasyon prosedürü, doğal mikrospor dökülmesine kıyasla daha etkilidir. Çünkü mikrospor dökülmesi yönteminden çok daha fazla sayıda mikrospor elde edilmiştir (Cho ve Zapata, 1990).
- d. *Mikro-harmanlama*: Mikro harmanlama, yüzey sterilize edilmiş diseksiyon tomurcuklarının veya mekanik karıştırıcılardaki karışımların karıştırılması ile oluşan en yaygın yöntemlerden biridir. Daha önce açıklanan prosedürlere kıyasla mikrosporları daha etkin bir şekilde giderilmesi sağlanmıştır. Anterlerin somatik dokuları çeşitli boyutlarda (100-200 um) steril ağ vasıtasıyla elenerek mikrospordan etkili bir şekilde çıkarılmıştır. Mekanik mikro harmanlama, diğer metodlarla karşılaştırıldığında oldukça önemli prosedürdür, çünkü her zaman canlı mikrospor sayısını artmasını (%75) sağlamıştır.

1.1.1.5. Besiyeri ortamının bileşenleri

MN6, MS, B5, A2, MMS3, P4, P2, CHB3, NLN, N6 ve NPB99 gibi bazal besiyeri birçok ekin türünde anter ve mikrospordaki etkili bir şekilde kullanılmıştır. A2 (Touraev, 1996b) ve MMS3 (Hu ve Kasha, 1999) ile NLN (Lichter 1982) ve MS (Murashige ve Skoog, 1962), brassica için küçük değişikliklerle birlikte buğday, arpa ve tritikale gibi hububat türlerinde anter veya mikrospor kültürü sırasında rutin olarak

kullanılmıştır. Sıvı besiyeri ise, mikrosporlarda enerji üretiminde azalmaya ve yavaş metabolizmaya yol açan bir anaerobik ortam yaratmaya yol açmıştır. Bununla birlikte, bu problem besiyeri ortamına Ficoll eklenerek kolaylıkla çözülebilir (Castillo, 2009; Kasha 1970). IMC'nin etkinliği esas olarak aşağıdakilerden oluşan indüksiyon ortamının özelliklerine ve karakteristiklerine bağlıdır:

1. Mineral maddeler, karbonhidrat, pH ve osmolalite gibi besin unsurları,
2. Işık yoğunluğu, sıcaklık, fotoperiyot ve kültür süresi gibi kültürel çevre ve besiyeri ortamının yoğunluğudur.

Mikrospor kültüründe, besiyeri ortamının en önemli iki rolü: ilki, *in vitro* ortamda büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan tüm gerekli besin maddelerini mikrospora verir ve ikincisi, gametofitikten sporofite dönüştürmesine yardımcı olmasıdır. Mikrospora, gerekirse, makro ve mikro elementler, karbonhidratlar, vitaminler, azot kaynağı ve büyüme regülatörleri içeren gerekli besin öğelerini içeren zengin besin maddeleri verilmesi önerilmiştir. Besiyeri ortamında, kullanılan besin maddelerinin konsantrasyonu değişiklik göstermektedir. Besiyeri ortamında kullanılan büyüme düzenleyicilerinin embriyogenezde meydana gelen değişiklikleri tespit etmek için deneyler yapılmıştır. Arpa, tritikale ve buğday gibi tahıllarda, fenil asetik asit (PAA), naftalin asetik asit (NAA), indol asetik asit (IAA), absisik asit (ABA), benzilaminopurin (BAP), 2,4- D (2-4 diklorofenoksi asetik asit) ve kinetin'in embriyogenezin tamamını iyileştirmek için tek başına veya birbirleriyle kombinasyonu şeklinde kullanıldığı çok sayıdaki araştırma çalışmasında bildirilmiştir (Davies, 2003). Sukroz besiyerinde önemli bir karbon kaynağıdır. Sakkaroz konsantrasyonu mahsulün türüne göre değişiklik göstermektedir. Karbohidratlar sadece enerji kaynağıdır, ancak besiyeri ortamında belirli bir ozmotik basıncın korunmasında önemli role sahiptir.

1.1.2. Anter Kültürü

Haploid bitkiler, gametik kromozom sayısını taşıyan sporofitlerdir. Bir haploid spontan veya indüklenen kromozom çoğalması meydana geldiğinde, ortaya çıkan bitki DH olarak adlandırılır. Buna karşılık dihaploid bitkiler ($2n = 2x$), ototetraploidten ($2n=4x$) elde edilen haploid bitkilerdir (Kasha ve Maluszynsky, 2003). Haploid bitkiler:

1. Düşük frekansta kendiliğinden,
2. *In vivo* modifikasyon polinasyon yöntemleri (geniş hibridizasyon, kromozom eliminasyonu, ışınlanmış polen ile tozlanma, vb.),
3. Olgunlaşmamış gametofitlerin *in vitro* kültürü yöntemleriyle oluşmaktadır.

Gametik embriyogenez, bitki hücrelerinde mevcut olan embriyogenezin farklı yolları arasında yer almıştır ve gelişimin gametofitik yoldan sporfitik bir

yola geri dönüşümsüz şekilde gerçekleştirmek için erkek (mikrospor veya olgunlaşmamış polen tohumu) veya dişi (ginogenezis) gametofitlerin kapasitesinden oluşmuştur.

Bitki aleminde, belirli koşullar altında ve çevresel stresin bir sonucu olarak ortaya çıkan önemli bir hayatta kalma uyum mekanizmasıdır (Bonet, 1998). Geleneksel üreme yöntemleriyle kıyaslandığında:

- Gametik embriyogenez homozigot hatların üretimini mümkün kılmıştır,
- Homozigot ebeveynlerin üretilmesi için gerekli süreyi kısaltmıştır,
- Heterozigot ebeveynlerden tamamen homozigot ebeveynlerin tek aşamalı gelişimini sağlamıştır.

Haploidler ve DH'leri elde etme kabiliyeti polen biyoteknolojisinin bitki ıslahında ve genetiğindeki en önemli uygulamalardan biridir. Polen gelişimi ve fonksiyonunun manipülasyonunu yeniden programlanmasını içermiştir (Testillano, 2001). Polen embriyogenezi normalde anter veya izole edilmiş mikroskop kültürü yardımıyla indüklenmiştir. Anter kültürü genellikle DH üretimi için tercih edilen yöntemdir, çünkü geniş genotip aralığı uygulanmasına izin vermiştir. Mikrospor kültürü polen embriyogenezinde yer alan hücresel, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler süreçleri araştırmak için daha iyi bir yöntem olmasına rağmen, anter kültürü ile karşılaştırıldığında daha iyi ekipman ve daha fazla beceri gerektirmiştir (Bajaj ve Reinert, 1977).

1.1.2.1. Haploid ve DH üretimi için anter kültürüne genel yaklaşım

Güçlü bir ıslah aracı olan haploid ve DH'lerin kullanılması, düşük frekanslı embriyo indüksiyonu, albinizm, bitkinin hayatta kalması, genotipe ve mevsime bağlı bitki çeşitlerinin geliştirilmesinde ve geniş genotip aralıklarındaki bitkilerin rejenerasyon etkinliğini iyileştirmesinde güvenilir doku kültürü protokolleri kullanılmıştır. Kültürde anterlerin embriyogenik tepkisini sayısız endojen ve ekzojen faktörler etkilemektedir (Atanassov, 1995; Datta 2005; Pechan ve Smykal, 2001). Donör bitkilerin genotipi, fizyolojik durumu ve koşulları, polen gelişim evresi, çiçek tomurcukları veya anterlerin ön muamelesi, *in vitro* kültür ortamı ve koşulları, bunların etkileşimleri ile birlikte, anterlerin *in vitro* kültürdeki cevabını büyük ölçüde etkileyen faktörlerdir.

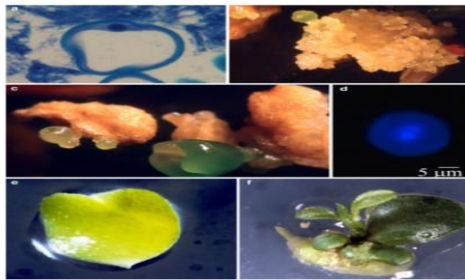
1.1.2.1.1. Genotip

Endojen faktörler arasında polen embriyogenezinde çalışan araştırmacıların çoğunun da belirttiği gibi genotip önemli bir rol oynamaktadır. Bir türün içindeki farklı çeşitlerin, anter kültüründe çeşitli tepkiler sergilediği defalarca bildirilmiştir. Örneğin, *Triticum aestivum*'un 21 çeşidinden, haploid doku yalnızca on çeşit anterden elde edilebilirken pirinçte japonica alt türleri indiya alt türlerinden daha

üretken bulunmuştur (Bajaj 1997). Embriyogenezise ("E-taneler", Sunderland ve Dunwell 1977 veya "P-tanecikleri", Heberle-Bors 1985) girmeye müsait mikrosporların oluşumu, sitoplazmik ve nükleer genler arasındaki etkileşim tarafından kontrol edilmiştir ve çevre tarafından modifiye edilmiştir.

1.1.2.1.2. Polen gelişme aşaması

Polen gelişme aşaması, anter kültürünün başarısını güçlü bir şekilde etkileyen karmaşık bir faktördür. Embriyogenik yeteneğin gelişme süreci, test edilen türüne bağlı olarak farklılık göstermiştir, ancak genel olarak endüktif muamelelere duyarlılık periyodu, ilk oluşumu polen mitozu civarındadır. Polen taneleri depolama rezervlerini biriktirmeye başladıktan sonra embriyogenik kapasitelerini kaybederler ve gametofitik gelişim yolunu takip edilmesini sağlamışlardır (Heberle-Bors 1985). Telmer (1995), *Brassica napus*'ta indüksiyon için en iyi aşamaların, geç polen mitozu civarında olduğunu bildirmiştir. *Nicotiana tabacum*'da, bisellüler evredeki polen taneleri, besin yetersizliği ön muamelesinde, genç uni-nucleate mikrosporunda ise ısı şoku kullanıldığında en iyi yanıtı vermiştir (Touraev, 1996a, b). Mikroskop evresinin, anter kültüründe üretilen bitkinin ploidi düzeyini etkileyeceğini bildirmişlerdir, çünkü bu çalışmalarda, uni-nucleate evredeki polenlerden elde edilen bitkilerin çoğunlukla haploid olduğu tespit edilmiştir. Anterlerin ve polenlerin farklı gelişim aşamalarını belirlemek için asetokarmin yöntemi ve DAPI (40, 6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorür) floresan boyama kullanılarak optik ve floresan mikroskop altında tespit edilmiştir. Ancak, aynı gelişimin farklı anterleri arasında olduğu gibi, farklı gelişim evreleri ve dolayısıyla da homojen olmayan bir başlangıç poleni popülasyonu gözlemlenmiştir (Chen 1985; Vasil 2008).



Şekil 1.1.2.1.2. a. *Prunus armeniaca L.* anter kültürü **b.** *Clementina hort* embriyogenik polen kaynaklı callus ve embriyoların farklı evrelerde. **c.** *Citrus* anterlerde 3 aylık kültürden sonra doğrudan mikrospor embriyogenezisi **d.** 3 haftalık anter kültüründen sonra çekirdeğin simetrik bölünmesi (*Olea europaea L.*) **e.** *Citrus clementina* kalp şeklindeki polen kaynaklı embriyo **f.** *Citrus clementina* Embriyo çimlenmesinden elde edilen mikrosporu.

1.1.2.1.3. Donör bitkilerde fizyolojik durum ve büyüme koşulları

P-tanelerinin sayısını etkileyen faktörler,

- Donör bitkilerin fizyolojik koşulları,
- Endojen hormon seviyeleri,
- Anterin dokularının beslenme durumudur.

Birçok genotipte, anter yanıtında önemli mevsimsel değişiklikler gözlemlenmiştir. Vasil (2008), yetiştirilen bitkilerden elde edilen anterlerin, sera yetiştirmiş bitkilerden alınanlardan daha iyi bir yanıt verdiğini gözlemlemiştir. Buna ek olarak, mevsimdeki ilk flush'tan anterlerin daha duyarlı oldukları bulunmuştur. Tütünde, ön kültür ortamının etkisi Dunwell (1981) tarafından araştırılmıştır ve hem fotoperiyodun hem de ışık yoğunluğunun mikrospor embriyo ve fidelerin verimini etkilediğini ortaya koymuştur. Aslında, donör bitkilerin büyüme koşulları ve fizyolojik durumu, açık havada yetiştirilen ve iklimsel (sıcaklık, fotopolimer ve ışık yoğunluğu), kültürel (budama, sulama, gübreleme vb.) ve pedolojik koşullar (özellikle de indüksiyon ve farklılaşma sırasında) etkilenen çok yıllık bitkilerin anter kültüründe standardize edilememesine sebep olmuştur (Germana, 2009).

1.1.2.1.4. Ön muameleler

Birçok genotipte, kültürden önce kesip çıkarılan tomurcuklara veya anterlere uygulanan fiziksel veya kimyasal ön-kültür işlemlerinin, sporofitik yolağın teşvik edilmesi için bir tetikleyici olarak görev yapması ve böylece verimli polen gelişimi gözlemlenmiştir. Soğutma, yüksek sıcaklık, yüksek nem, su stresi, anaerobik arıtma, santrifüj, sukroz ve azot yetersizliği, etanol, UV-C, mikrotübül yıkıcı ajanlar, elektrostimülasyon, yüksek veya orta pH, ağır metal arıtma gibi ön-işlemler özellikle anter kültürünü etkileyen faktörler arasında yer almaktadır. Sıcaklık şoku, polen embriyogenezi gelişimini etkileyen en etkili muamele olarak kabul edilmiştir. Muamele öncesi optimum sıcaklık ve süre, genotipe göre değişiklik göstermiştir (Powell 1975).

1.1.2.1.5. Yüzey sterilizasyonu, anter eksizyonu (kesip çıkarma)

Anter eksizyondan önce, yüzeyde bulunan mikroorganizmaların sterilizasyon yöntemiyle (Etil alkol, sodyum hipoklorit, civa klorür vb.) arındırılması gerekmektedir.

1.1.2.1.6. Ortam bileşenleri

Mikrospor embriyogenezinin indüksiyonunda kültür ortamının bileşenleri önemli bir rol oynamaktadır. Çeşitli genotipler, polen türevi bitki oluşumunu başlatmak için çok farklı bazal ortam gereklilikleri gösterilmiştir. Kesilen

anterlerin beslenme gereksinimleri, izole edilmiş mikrospordan daha basittir (Bajaj, 1977; Bajaj, 1990). Anter kültürü için en yaygın kullanılan bazal ortam N6 (Chu, 1978), MS ortamı (Murashige ve Skoog, 1962), ve B5'dir (Gamborg, 1968). Genellikle, Solanaceae için yarı kuvvetli MS tuzu karışımları ve tahıllar için N6 ortamı önerilmiştir (Chu 1978). Karbonhidrat kaynağı, ozmotik ve nutrisyonel etkileri nedeniyle anter kültüründe embriyo üretimi için gereklidir (Powell 1975). Sukroz, anter kültüründe kullanılan, genellikle % 2-4 seviyelerinde en yaygın karbon kaynağıdır. Olgun polenlerin tricellular durumda bırakıldığı bu türlerde (örneğin, *Gramineae*, *Cruciferae*) yüksek sukroz seviyeleri (%6-17) gereklidir (Dunwell ve Thurling 1985); buna karşın olgun polenlerin iki hücreli olanları (örn. Solanaceae) düşük düzeyleri, örneğin %2-5 gibi, genellikle yararlıdır (Dunwell 2010). Sukroz ısıya karşı kararsızdır ve otoklavlanmış ortam sakkaroz, D-glukoz ve D-fruktoz karışımını içerir (Powell, 1975). Maltoz, çoğunlukla indüksiyon ortamında 62 g/L'lik bir konsantrasyonda ve rejenerasyon ortamında bu miktarın yarısında arpa anter kültürü içindeki sukrozun yerine başarıyla kullanılmıştır. Maltoz, buğday, tritikale, çavdar ve pirinçten oluşan anter kültür ortamına 60 ila 90 g/L arasında değişen konsantrasyonlarda eklenmiştir (Dubas, 2010). Fruktoz ve glikozun, *Petunia* anter kültüründe polen embriyogenezisini inhibe ettiği gösterilmiştir. 18 g/L 'de laktoz ve 9 g/L 'de galaktoz düzenli olarak clementine anter kültüründe (Germana, 2003) kullanılmıştır. Sakarozla kombinasyon halinde gliserolün clementine'de kallus üretimi teşvik ettiği bulunmuştur (Germana, 2000a). Bitki büyüme düzenleyicilerin etkileri anter kültüründe geniş çapta araştırılmıştır. Birkaç model türü (örn., Solanaceae'nin çoğu üyesi), indüksiyon ortamına bir oksin hormonunun eklenmesini gerektirmez ve basit ortam üzerinde indüksiyon meydana gelirse, büyüme düzenleyicilerin (oksinler, sitokininler veya bir kombinasyonu) varlığı önemlidir. Oksin hormonlarının türü ve konsantrasyonu, 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) uyaran kallus oluşumu ve indol-3-karboksilik asidin mikrospor gelişiminin yolunu belirlemektedir. Direkt embriyogenezi teşvik eden büyüme düzenleyicileri indol asetik asit (IAA) ve a-naftalinasetik asit (NAA)'dir (Armstrong, 1987). Bazen de ortama giberellin ve absisik asit eklenmiştir. Aktive edilmiş odun kömürünün (0,5-2 g/L) ortama eklenmesi, mikrospor embriyogenezisinin çeşitli türlerde etkinliğini arttırmıştır (Bajaj, 1990). Bajaj (1977), bazal besiyeri %2 kömür ile takviye ederek tepki veren tütün anterlerinde %41'den %91'e bir artış elde etmiştir. Antioksidanlar ve aktif kömür ilavesi, bazı genotiplerde fenollerin neden olduğu doku kahverengileşmesini azalttığı için genellikle yararlıdır. Bazı aktif kömür görevi gören türevler glutamin, kazein, prolin, biyotin, inositol, hindistan cevizi suyu, gümüş nitrat (etilen antagonisti) ve polivinilpirolidon gibi kimyasallardır (Bajaj,

1977; Powell, 1975; Achar, 2002). Dahası, ekzojen alifatik poliaminlerin (KA'lar) kültür ortamına ilavesi, bazı Hint buğday çeşitlerinde (Guha ve Maheswvar, 1964), salatalıkta (Ashok Kumar, 2004) ve clementine'de (Chiancone, 2006) polen türevi embriyoların sayısını arttırmıştır.

1.1.2.1.7. Kültür Koşulları

Anter kültürleri genellikle 24-27°C'de, günde 14 saat ve 2.000 lux/m² inkübe edilmiştir. Ancak, her bir deney şartları için en uygun koşulların belirlenmesi gerekmektedir (Bhojwani ve Razdan, 1983). Işık, *in vitro* şartlarda polen morfogenezinin düzenlenmesinde önemli bir faktördür. Düşük yoğunluktaki ışık mikrosporların embriyogenik gelişimini olumlu etkilemektedir (Foroughi-Wehr, 1982; Bjørnstad et Al. 1989). Kültür yoğunluğu (kültür kabının hacmine veya birim hacim başına medyum başına kaplanan anter sayısı) ve ortam üzerinde eksplant yerleşiminin anter kültüründe önemli bir rol oynamaktadır.

1.1.2.2. Morfogenik gelişim, gen ifadesinin yeniden programlanması ve totipotensi

Kültür periyodu süresince veya muamele öncesinde mikrosporların gelişimleri durdurulmuştur, olgun bir polen tanesi haline gelmiştir, çok hücreli kallus benzeri bir yapı oluşturacak şekilde bölünmüştür veya mikrospor haline gelmiştir (MDE). Morfolojiden gen ekspresyonuna kadar birçok değişiklikler, indüksiyon sonrası ve embriyogenik gelişim sırasında mikrosporların ayırt edilmesine olanak sağlamaktadır. Stres ile embriyogenik potansiyel edinimi, strese bağlı hücrenin yanıtı, gametofitik gelişimin baskılanmasını, totipotent bir durumun kazanılmasını veya hücrelerin sitoplazmik ve nükleer yapılarının yeniden düzenlenmesi ve farklılaşmasını beraberinde getirmiştir. Morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler, sitoplazmanın genişlemesiyle büyük bir merkezi oda gerilimi oluşturarak alkalinizasyona doğru bir pH kayması içermiştir (Huang 1992; Ferrie ve Möllers, 2011; Germanà, 2011).). Büyük merkezi vakuole daha sonra radyal olarak yönlendirilmiş sitoplazmik ipliklerle serpiştirilmiş fragmanlara bölünmüş ve bu şekilde sitoskeleton yeniden düzenlemelerinin dahil olduğu "yıldız benzeri" olarak adlandırılan bir yapı elde edilmiştir (Gervais, 2000; Obert ve Barnabas, 1991). İndüksiyondan sonra, mikrosporlar da meydana gelen değişimler RNA ve proteinlerin birikimi ile karakterize edilmiş ve gen ifadesinde meydana gelen değişikliklerin stresle ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Bir sonraki safha ise, hücre duvarları ile eksin duvarı içerisinde çok hücreli yapıların (MCS'ler) oluştuğu tespit edilmiştir.

Raghavan'a (1986) göre, polen türevi embriyo oluşumunun 3 farklı yolu:

1. Vejetatif hücrenin tekrarlanan bölünmesi (A yolu). Sitokinesiz olmayan nükleer bölünme çok çekirdekli bir pro-embriyo üretilmesidir. Embriyo yerine kallus elde edilmiştir.
2. Generatif hücrenin ya da hem generatif hem de vejetatif hücrelerin bölünmesidir (E yolu). Hücre füzyonu, haploid olmayan kromozom sayılarına neden olmuştur (Sunderland 1974).
3. Mikrosporların simetrik bölünmesi (B yolu), ilk polen mitozundan önce toplandığında embriyo oluşumunun ana bir yoludur (Pechan ve Smykal, 2001).

Bir yolun diğerlerine oranla baskın olması, gelişim evresi ve ön muamele olarak uygulanan stres tipi gibi farklı faktörlere bağlıdır (Kasha, 2001). Sonraki aşamada, embriyo benzeri yapılar (ELS), polen mikrosporunun karşısında bulunan segmentin kopma noktası üreme alanına gelecek şekilde eksine duvardan dışarı bırakılmıştır. ELS'yi çevreleyen hücrelerin periklinal bölünmeleri daha sonra ortaya çıkmış ve epidermis farklılaşmasına yol açmıştır. Kallus ve embriyolar elde edildiğinde bile, bitkilere dönüşmeleri kaçınılmaz bir sonuç değildir. İndüksiyon oranının yüksek olması durumunda bile düşük rejenerasyon oranlarına ilişkin çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Dubas, 2010). Genel olarak, kallus kullanımı bitki rejenerasyon oranını artırmıştır ve bu da gametoklonal varyasyon şansını artırmıştır. Genotipe bağlı olarak, embriyogenik mikrosporun ilk bölümlerinde ve daha önemlisi bir nükleer füzyon mekanizmasıyla (Gonzalez-Melendi, 2015) haploid genomun çoğalması gözlemlenmiştir (Kasha 2003). Gametofitikten embriyogenik yola geçişte geniş bir gen ifadesinin düzenlenmesi, birincil metabolizma ile ilgili genlerin yukarı regülasyonu ve lipidlerin, karbonhidratların ve proteinlerin biyosenteziyle sağlanmıştır. Global olarak, farklı şekilde ifade edilen genlerin çoğu üç ana kategoriye ifade edilir:

1. Strese hücresel tepkinin ısı-şok proteinleri (HSP'ler) senteziyle,
2. Gametofitik programın bastırılması (Sitoplazmik temizleme, natürmort biyosentezinde ve birikiminde rol oynayan genlerin aşağı regülasyonu),
3. Embriyogenik programın ekspresyonudur (simetrik bölünme, dış tabaka içinde rastgele yönlendirilmiş bölümler, kutuplaşma oluşumu ve protoderm oluşumu).

1.1.2.3. Rejenere olmuş bitkilerin karakterizasyonu: Ploidi analizi

Rejenere olmuş bitkilerin kök uçları kullanılarak sitolojik yöntemle kromozom sayıları tespit edilmiştir. Ploidi seviyesi, akım sitometri (flow sitometri) analiziyle daha kolay değerlendirilmiştir. Ploidi seviyesi, stomatal koruyucu hücrelerdeki

kloroplast sayılarına ve plastid boyutlarına dayanan dolaylı yöntemlerden biridir (Lee, 2011; Yuan, 2011). *In vitro* anter kültürü ile sadece haploidler veya DH'ler elde edilmez ayrıca, non-haploid (diploid, triploid, tetraploid, pentaploid, hexaploid) embriyolar ve bitkiler elde edilmiştir (D'Amato, 1977; Dunwell, 2010). Anter kültüründen rejenere edilen triploidler, *Datura innoxia*, *Petunia hybrida* ve çeşitli meyve türlerinde tespit edilmiştir (Germana, 2006, 2009).

Bazı durumlarda, haploid olmayanların kökeni vejetatif ve gametatif çekirdekler arasındaki eksik hücre duvarı oluşumundan kaynaklandığı görülmüştür. Polen türevi bireylerin haploid genomunun çoğaltılması, endoreduplikasyon nükleer füzyon ve c-mitoz (kolşisin muamelesinden sonra gerçekleşen mitoz) olmak üzere üç mekanizma ile ortaya çıktığı düşünülmektedir; triploidler ise endoreduplikasyon sırasında ortaya çıkan bir süreçten kaynaklanmaktadır. Haploid kallus ve embriyolarda ortaya çıkan spontan kromozom ikiye katlanması nedeniyle, ploidi seviyesi analizi her zaman polen kaynaklı bitkileri tanımlanamaz. Aslında, anter kültürü birçok genotipte somatik embriyo ve bitki klonal yayılımı elde etmek için de kullanılmıştır (Germana `2003, 2005).

1.1.2.4. Rejeneratiflerin karakterizasyonu: Homozigotluk tespiti

Homozigotluğu tespit etmek için, izozim analizleri, rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) markörleri ve mikrosporlar kullanılmıştır. İzozim teknikleri, donör bitkinin diploid durumunda enzim heterozigotik olduğunda androgenetik ve somatik dokunun ayırt edilmesi sağlanmıştır ve rejenere olmuş bitkilerde alleldeki eksikliğin gösterilmesi sağlanmıştır. İzozim analizleri, armut, elma ve turunçgil kalluslarında ve fidelerinde gametik orijinini doğrulamak için kullanılmıştır (Germana `2006).

1.1.2.5. Haploidi durumunda kromozom katlanması

Kromozom katlanması, *in vitro* anter kültürü sırasında kendiliğinden de oluşabilir ya da mikrosporların genotipi, gelişim evresi ve ön muamele tipiyle de oluşabilmektedir. Düşük katlanma yüzdesine sahip olan türler için, *in vitro* şartlarda kültüre alınmış anterlerden, homozigot çift katlı haploid bitkilere dönüştürmek için en yaygın kullanılan anti-mikrotübül ajan kolşisindir. Kolşisinin dışında oryzalin ve trifluralin gibi diğer ajanlarda kullanılmıştır (Castillo, 2009).

1.1.2.6. Haploidlerin ve DH'lerin üretimi için anter kültürünün ilerlemesi

Bitkilerde yapılan DH araştırmalarında birçok tür incelenmiştir, ancak hepsi için haploid bitkiler elde edilmemiştir (Guha ve Maheshwari, 1964; Kasha ve

Maluszynski, 2003). Bu yaklaşımın başarılı olması için bitki ıslah programları kullanılmıştır. Bitki ıslah programları için, en sık çalışılan bitkiler (arpa, buğday, tritikale, mısır, pirinç ve kolza tohumları) kullanılarak anter kültürü protokolleri geliştirilmiştir. Sebze, meyve, süs, odunsu ve tıbbi türlerde önemli gelişmeler sağlanmış olsada, çoğu cevabın düşük seviyede kalmasına rağmen baklagil türlerinde haploid ve DH üretimi yüksek seviyededir (Dubas, 2010).

1.1.2.7. Bitki ıslahında genetik ve fonksiyonel genomiklerde haploidlerin ve DH'lerin uygulamaları

Bitki ıslahçıları, bitki biyolojisi ve genetiğinin çeşitli teorik ve pratik yönlerinin haploidi teknolojisinden yararlanabileceği bilgisine dayanan DH teknolojilerinin avantajlarını uzun zaman önce fark etmiştir (Forster ve Thomas 2005). Mahsul veriminin ve kalitesinin iyileştirilmesi için, DH hatları kullanılarak diploid veya allopoliploid türlerde homozigotluk elde edilmesi amaçlanmıştır. Böylece bir üreme programında birkaç kuşağı tasarruf etmiş ve F1 hibridleri için yeni homozigot çeşitler veya ebeveyn hatları üretilmiştir. Sebze mahsullerinde DH'lerin başlıca kullanım alanlarından biri, ebeveynlerin kullanılarak F1 hibrid tohum üretilmesidir. Seçilmiş homozigot erkekler ve dişiler arasındaki çaprazlamalar sonucu hibrid ürünler ebeveynlere benzemezler. F1 bitkileri, çoğunlukla, ebeveynler ile karşılaştırıldığında verimde dramatik bir artış olmuştur ve buna melez azmanlığı (heterosis) denmiştir (Kasha, 2001). DH'ler, homozigot hatlardaki hibrid performansın "sabitlenmesini" denemek ve melez tohum üretiminin basamağını önlemek için benzersiz bir sistem sağlanmıştır. Homozigot DH'ler, odunsu bitkilerde genetik çalışmalar ve bitki ıslahı için yeni fırsatlar da sunmuştur. Haploidleri bitki gelişimi için kullanmanın bir diğer yöntem ise kültüre alınmış gametik hücrelerden yenilenmiş bitkiler arasında gözlemlenen yapılarda morfolojik ve biyokimyasal karakteristiklerden oluşan "gametoklonal varyasyon" 'dur (Evans, 1984). Farklı varyasyon kaynakları, hücre kültürü prosedürleri, yeni genetik varyasyonlar, kromozom ikiye katlama prosedürünün neden olduğu yeni varyasyon ve diploid seviyede indüklenen yeni varyasyon gibi gametoklonal varyasyonlarla açıklanmıştır ve heterozigotluk göstermiştir (Li, 2012). Anter kültürüyle elde edilen triploid bitkiler, tüketicilerin arzuladığı çekirdeksiz meyvelerin üretimine olanak sağlayarak büyük bir ticari potansiyel oluşturmasına yardımcı olmuştur. Haploidler ve DH'ler, ürün ıslah programlarının etkinliğinin artırılmasına ek olarak, mutasyon çalışmaları, gen haritalama ve genomik gibi çalışmalarda yararlı olmuştur. Ekonomik açıdan önemli özellikleri sahip büyük genlerin ve niceliksel özellik lokuslarının (QTL'ler) yeri hakkında güvenilir bilgi edinmek için mükemmel materyal sağlamıştır (Dwivedi, 2015). Mikrospor

embriyogenezisi sırasında *in vitro* seçim, istenilen mutant özellikleri için etkili ve erken tarama prosedürü kullanılarak zamandan ve iş gücünden tasarruf edilmiştir. Transformasyon protokollerinde, mikrospor embriyogenezinin ve rejenerasyonun her aşamasında hücrelerin veya haploid embriyoların yanı sıra tek hücreli mikrosporlarında, transgen için homozigot olan doğrudan DH bitkileri elde etmek amacıyla, gen aktarımı için alıcı gen olarak kullanılmıştır. Kullanılan transformasyon yöntemleri:

- Mikroenjeksiyon,
- Elektroporasyon,
- Partikül bombardımanı,
- *Agrobacterium tumefaciens* aracılı transformasyondur (Ferrie ve Möllers, 2011; Germanà, 2011). Üstelik DH'ler, arpa, pirinç kolza tohumu ve buğday gibi çeşitli türlerde kromozom haritaları oluşturulmasında önemli bir yere sahiptir (Forster ve Thomas 2005).

Mikrosporlar, aynı zamanda haploid hücreler, dokular, organlar ve eksplantlar hem kimyasal hem de fiziksel mutajenlerin uygulanmasını içeren protokollerde mutajenik uygulamada hedefi olarak kullanılmıştır. DH sistemleri, özellikle mutasyona uğramış olan bitkilerin resesif olduğu tespit edilmiş ve mutajenik uygulama ikinci veya üçüncü (M2 veya M3) nesillerde ortaya çıkmıştır. Mutant çeşitlerinin yaklaşık %30'unda arzu edilen mutant alellerin elde edilmesiyle çapraz ıslah programları geliştirilmiştir. Genellikle biyotik ve abiyotik strese dirençli, daha yüksek verim ve kaliteye sahip yeni çeşitlerin geliştirilmesi sağlanmıştır.

1.2. Ginogenesis: Bitki yetiştiricileri için önemli bir araç

Ginogenesis, haploid bitkiler üretmek için en az kullanılan yöntemdir (Forster, 2007). Ginogenesis, *in vitro* şartlarda yumurtalıklar veya ovüller gibi döllenmemiş gametlerin kültüründen oluşmuştur, ancak zaman zaman çiçek tomurcuk kültürü içinde kullanılmıştır. Ginogenesis için dişi gametlerin veya çiçek tomurcuklarının olgunlaşmamış tohumdan önce toplanması önerilmiştir. Bununla birlikte, toplama, erkek steril veya kendi kendine uyumsuz türler için herhangi bir zamanda yapılmasına olanak sağlanmıştır. Toplanma amacıyla, mikrosporların evresi, dişi gametlere göre kesin zamanı belirlemek için mükemmel bir göstergedir. Sterilize etmek için genellikle yüzey sterilizasyonu prosedürleri androgeniz tekniklerine benzer şekilde kullanılmıştır. Sterilizasyon süresi ve ajanı türden türe farklılık göstermiştir. Ginogenez yoluyla haploid üretmek için en yaygın kullanılan besiyeri katıdır. Ginogenik başarıyı etkileyen en önemli faktörler uygulama zamanı ve uygulama dozudur. Ginogenezise etkileyen başlıca faktörler:

1. Genotip,
2. Dişı gametofit veya embriyo kesesinin gelişim evresi,
3. Ön muamele,
4. Ortam bileşenidir.

1.2.1. Genotip

Ginogenez yoluyla haploid üretimi, kullanılan genotip türüne bağlıdır ve türden türe büyük ölçüde değişkenlik göstermektedir. İndüksiyon cevabı (embriyoların sayısı), donör bitkisinin büyümesi ve gelişme koşulları ile dişı gametofitlerin kalitesine de bağlıdır. Pirinç (Rongbai, 1998), soğan (Bohanec, 1995) ve buğdayda (Mdarhri-Alaoui, 1998), haploid üretiminin ginogenik başarısı ile ilgili genotipik değişiklikler iyi sonuçlanmıştır. Çeşitli kökenli soğan genotiplerinde değişken ginogenik endüksiyon frekansı, 10 çeşit Polonyalı çeşit (Javornik, 1998) arasında %0-10, 22 Avrupa katılımında %0-17 arasında (Geoffriau, 1997) ve 39 Japon ve Amerika üyeliği arasında %0-22 arasında değişiklik göstermiştir (Bohanec ve Jakse, 1999).

1.2.2. Dişı gametofitin gelişim evresi

İndüksiyon için toplama ile ilgili dişı gametofitik (yumurta veya yumurtalık) kesin aşaması tespit etmek zordur. Ovüller indüksiyonu, mikrospor aralığı veya olgunlaşmamış tohum aşamasında ya da birkaçında kızarıklık tomurcuğunun gelişim evresi veya ovüllerin doğrudan gözlenmesi gerçekleştirilmiştir. Neredeyse olgun embriyo kesesi ginogenez sürecini başlatmak için iyi bir işaret olarak düşünülmüştür (Gemes-Juhasz, 2002; Keller ve Korzun, 1996); bununla birlikte, embriyo kesesinin tam aşamasını belirlemek için iyi eğitim almış ve yetenekli bir bitki embriyologa ihtiyaç vardır. Embriyo kesesi, yumurta hücresi, iki kutup çekirdeği, antipodal hücreler ve sinerjitlerden oluşmuştur. Çoğu durumda, pirinç ve arpada yumurta hücresi haploid embriyoyu oluşturmuştur (Zhou, 1986; Noeum, 1976).

1.2.3. Ön muamele

Çiçeğe ait organlar ön muameleye tabi tutulmuştur ve bu da dişı gametofitlerdeki sporofitik gelişim sürecini uyarmak için önemli bir faktör olarak düşünülmüştür. Androgenik yöntemlere benzer şekilde, açlık, ısı veya soğuk şoklar, stres koşullarını aktive etmek için tek başına veya birbirleriyle kombinasyon halinde verilmektedir. Bununla birlikte, süre öncesi, süresinin türü ve seviyesi türden türe farklılık göstermiştir. Pirinçte, 8°C'de 6-14 gün süreyle soğuk muamele, embriyogenik yanıtı daha fazla arttırmıştır (Rongbai, 1998).

1.2.4. Medyumun bileşeni

Medyumun bileşeni, ginogenezin başarı oranını önemli derecede etkileyen kritik bir faktördür. Medyum bileşenleri sadece yenilenme ve indüksiyon evreleri için değil aynı zamanda bitkiler arasında da farklılık arz etmektedir. Yenilenme evresinin ortamı, büyümeyi teşvik etmek için büyüme hormonu gerektirirken, bazen düşük konsantrasyonda bazen de herhangi bir büyüme hormonuna ihtiyaç duyulmaz. MS, Miller, N6 ve B5 ile büyüme düzenleyicileri, karbonhidrat ve azot kaynaklarında küçük değişiklikler yenilenme evresinde önemli bir yere sahiptir. En fazla kullanılan karbonhidrat olan sukroz ve ortamdaki konsantrasyonu 58 ila 348 mM veya %2 ila 12 arasında değişmektedir (Juhasz, 1997; Mdarhri-Alaoui, 1998). Ortamda %6'lık konsantrasyonda sukroz, buğday ginogenezinde embriyoların sayısını arttırmıştır ve somatik büyümeyi engellemiştir (Mukhambetzhonov, 1997); ancak yüksek konsantrasyonu karanfilde faydalı olduğuna inanılmakta ve kabaktaki embriyoların frekansı üzerinde olumsuz bir etkisi bulunmuştur (Sato, 2000). Öte yandan, az sayıdaki türde, maltozun aktivitesi sukrozdan daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Cordewener, 1995). Genomik haploid üretimi için sitokin ve oksin çoğunlukla çeşitli mahsul türlerinde kullanılmıştır ancak poliaminlerin büyüme hormonlarına kıyasla çok daha iyi sonuç verdiği gözlemlenmiştir (Martinez, 2000).

1.3. Partenogenez

Partenogenez yoluyla haploid bitki üretimi, embriyo kesesinde yumurta hücresinin sperm çekirdeği katılımı olmadan kültürle alınma şeklidir. Palmer ve Keller (2005) partenogenezin ginogenezden ayıran özellik, 'endosperm normal gelişimini ve embriyo oluşumunu *in vivo* şartlarda gerçekleştirmesidir" ancak ginogenez durumunda, endosperm zamanla dejenere olmuştur ve embriyonun laboratuvar koşullarında canlılığının devam ettirilmesi gerekmektedir. Chase (1949), partenogenez yoluyla mısırdaki iki misli haploid DH üretmiştir ve üreme programında bu haploidler kullanılmıştır. Mısır haploid bitkilerinin scutellar boğumunda bir kolşisin enjeksiyonu kullanarak kromozom çoğalmasını takip eden diploidlerden haploidleri (renksiz) ayırmak için polenatörde (tozlaştırıcıda) bir renk genetik markörü (baskın mor) kullanılmıştır. Partenogenez nadiren doğada görülmüştür, bu nedenle, diploidleri ve haploidleri ayırt etmek zordur. Bordes ve diğerleri (1997) tarafından elmada partenogenez ayırt etmek için genetik markörlerde polinatörler (tozlaştırıcılar) kullanılmıştır. Partenogenezin indüksiyonu genellikle ışınlanmış polen, ısı işlem ve gametosidal kimyasallar kullanılarak yapılmıştır. Mathur ve diğerleri tarafından (1980) mısırdaki polene ısıyla muamele edilmesiyle haploid üretiminde başarıya ulaşılmıştır.

KAYNAKÇA

1. Achar, P. N., 2002. A study of factors affecting embryo yields from anther culture of cabbage. *Plant Cell Tissue Organ*, 69, 183–188.
2. Armstrong, T. A., Metz, S. G., Mascia, P.N., 1987. Two regeneration system for the production of haploid plants from wheat anther culture. *Plant Sci*, 51, 231–237.
3. Ashok Kumar, H. G., Ravishankar, B. V., Murthy, H. N., 2004. The influence of polyamines on androgenesis of *Cucumis sativus* L. *Eur J Horti Sci*, 69, 201–205.
4. Atanassov, A., Zagorska, N., Boyadjiev, P., Djilianov, D., 1995. *In vitro* production of haploid plants. *World J Microbiol Biotechnol*, 11, 400–408.
5. Bajaj, Y. P. S., 1990. *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry, part I. Haploids in crop improvement*, vol 12. Springer, Berlin, pp 1–44.
6. Bajaj, Y. P. S., Reinert, J., Heberle, E., 1977. Factors enhancing *in vitro* production of haploid plants in anther and isolated microspore.
7. Barnabas, B., Phaler, P. L., Kovacs, G., 1991. Direct effect of colchicine on the microspore embryogenesis to produce dihaploid plants in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 81, 675–678.
8. Bhojwani, S. S., Razdan, M. K., 1983. *Plant tissue culture: theory and practice*, vol 5. Elsevier, New York.
9. Bishnoi, U., Jain, R. K., Rohilla, J. S., Chowdhury, V. K., Gupta, K. R., Chowdhury, J. B., 2000. Anther culture of recalcitrant indica × Basmati rice hybrids. *Euphytica*, 114(2), 93–101. doi: 10.1023/A:1003915331143
10. Bjørnstad, A., Opsahl-Ferstad, H. G., Aasmo, M., 1989. Effects of donor plant environment and light during incubation of anther cultures of some spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Plant Cell Tissue Organ*, 17, 27–37.
11. Bohanec, B., Jakse, M., 1999. Variations in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions. *Plant Cell Rep*, 18(9), 737–742.
12. Bohanec, B., Jakse, M., Ihan, A., Javornik, B., 1995. Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.) induction procedures and genetic-analysis of regenerants. *Plant Sci*, 104(2), 215–224. doi: 10.1016/0168-9452(94)04030
13. Bonet, F. J., Azhaid, L., Olmedilla, A., 1998. Pollen embryogenesis: atavism or totipotency *Protoplasma* 202, 115–121.

14. Bordes, J., de Vaulx, R. D., Lapiere, A., Pollacsek, M., 1997. Haplodiploidization of maize (*Zea mays* L.) through induced gynogenesis assisted by glossy markers and its use in breeding. *Agronomie*, 17(5), 291–297. doi: 10.1051/agro:19970504
15. Bourgin, J. P., Nitsch, J. P., 1967. Production of haploids nicotiana from excised stamens. *Annales De Physiologie Vegetale*, 9(4), 377–382.
16. Brown, M. S., 1943. Haploid plants in sorghum. *J Hered*, 34(6), 163–166.
17. Castillo, A. M., Cistue, L., Valles, M. P., Soriano, M., 2009. Chromosome doubling in monocots. Springer, Heidelberg, pp 329–338.
18. Chase, S. S., 1949. Monoploid frequencies in a commercial double cross hybrid maize, and in its component single cross hybrids and inbred lines. *Genetics*, 34(3), 328–332.
19. Chandler, D. E., Roberson, R. W., 2009. Bioimaging: current concepts in light and electron microscopy. Jones and Bartlett Publishers, USA.
20. Chen, Z., 1985. A study on induction of plants from Citrus pollen. *Fruit Var J*, 39, 44–50.
21. Chiancone, B., Tassoni, A., Bagni, N., Germana ` , M. A., 2006. Effect of polyamines on in vitro anther culture of Citrus clementina Hort. ex Tan. *Plant Cell Tissue Organ*, 87, 145–153.
22. Chu, C., 1978. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: *Proc Symp Plant Tissue Culture*. Science Press, Peking, pp 43–50.
23. Cho, M. S., Zapata, F. J., 1990. Plant regeneration from isolated microspore of india rice. *Plant Cell Physiol*, 31, 881–885.
24. Cordewener, J. H. G., Hause, G., Gorgen, E., Busink, R., Hause, B., Dons, H. J. M., Vanlammeren, A. A. M., Campagne, M. M. V., Pechan, P., 1995. Changes in synthesis and localization of members of the 70-kDa class of heat-shock proteins accompany the induction of embryogenesis in *Brassica napus* L microspores. *Planta*, 196(4), 747–755. doi: 10.1007/bf01106770
25. D'Amato, F. 1977. Cytogenetics of differentiation in tissue and cell cultures. *Plant cell, tissue, and organ culture*. Springer, Berlin, pp 343–356.
26. Dahleen, L. S., 1999. Donor-Plant Environment Effects on Regeneration from Barley Embryo-Derived Callus. *Crop Breeding, Genetics & Cytology*, 39, 3.
27. Davies, W. J., Zhang, J., 2003. Root Signals and the Regulation of Growth and Development of Plants in Drying Soil. *Annual review of plant biology*, 42(1), 55–76.

28. Datta, S. K., 2005. Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement. *Curr Sci*, 89, 1870–1878.
29. Domozych, D. S., 2012. The quest for four-dimensional imaging in plant cell biology: it's just a matter of time. *Ann Bot*, 110, 461–474.
30. Dubas, E., Wedzony, M., Petrovska, B., Salaj, J., Zur, I., 2010. Cell structural reorganization during induction of androgenesis in isolated microspore cultures of triticale (*x triticosecale wittm.*). *Acta Biol Cracov Bot*, 52(1), 73–86. doi:10.2478/v10182-010-0010
31. Dunwell, J. M., 1981. Stimulation of pollen embryo induction in tobacco by pretreatment of excised anthers in a water-saturated atmosphere. *Plant Sci Lett*, 21, 9-13.
32. Dunwell, J. M., 2010. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnol J*, 8(4), 377–424. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x
33. Dunwell, J. M., Thurling, N., 1985. Role of sucrose in microspore embryo production in *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *J Exp Bot*, 36, 1478–1491.
34. Dwivedi, S. L., Britt, A. B., Tripathi, L., Sharma, S., Upadhyaya, H. D., Ortiz, R., 2015. Haploids: constraints and opportunities in plant breeding. *Biotech Adv*. 33, 812–829. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.07.001
35. Evans, D. A., Sharp, W. R., Medina-Filho, H. P., 1984. Somaclonal and gametoclonal variation. *Am J Bot*, 71, 759–774.
36. Ferrie, A. M. R., Caswell, K. L., 2011. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 104, 301–309. doi: 10.1007/s11240-010-9800
37. Foroughi-Wehr, B., Friedt, W., Wenzel, G., 1982. On the genetic improvement of androgenetic haploid formation in *Hordeum vulgare* L. *Theor Appl Genet*, 62, 246–248.
38. Forster, B. P., Thomas, W. T. B., 2005. Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant Breed Rev*, 25, 57–88.
39. Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K., 1968. Nutrient requirement suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res*, 50: 151–158.
40. Gaillard, A., Vergne, P., Beckert, M., 1991. Optimization of maize microspore isolation and culture conditions for reliable plant regeneration. *Plant Cell Rep*, 10(2), 55–58. doi:10.1007/ BF00236456
41. Gemes-Juhasz, A., Balogh, P., Ferenczy, A., Kristof, Z., 2002. Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on *in vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Rep*, 21(2), 105–111. doi:10.1007/s00299-002-0482-8

42. Germanà, M. A., 2011. Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 104, 283–300. doi: 10.1007/s11240-010-9852
43. Germanà, M. A., 2003. Haploids and doubled haploids in *Citrus* spp. Kluwer/FAOIAEA, Dordrecht/Vienna, pp 303–308.
44. Germanà, M. A., 2005. Protocol of somatic embryogenesis from *Citrus* spp. anther culture. Kluwer, Dordrecht, pp 191–207.
45. Germanà, M. A., 2006. Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell Tissue Organ*, 86:131–146.
46. Germanà, M. A., 2009. Haploid and doubled haploids in fruit trees. Springer, Heidelberg, pp 241–263.
47. Germanà, M. A., Chiancone, B., 2003. Improvement of the anther culture protocol in *Citrus clementina* Hort. ex Tan. *Plant Cell Rep*, 22, 181–187.
48. Germanà, M. A., Crescimanno, F. G., Motisi, A., 2000a. Factors affecting androgenesis in *Citrus clementina* Hort. ex Tan. *Adv Hort Sci*, 14, 43–51.
49. Geoffriau, E., Kahane, R., Rancillac, M., 1997. Variation of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L). *Euphytica*, 94(1), 37–44. doi: 10.1023/a:1002949606450
50. Gervais, C, Newcomb, W., Simmonds, D. H., 2000. Rearrangement of the actin filament and microtubule cytoskeleton during induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Protoplasma*, 213, 194–202.
51. Gonzalez, A. J, Larraburu, E. E., Llorente, B. E., 2015. *Azospirillum brasilense* increased salt tolerance of jojoba during *in vitro* rooting. *Ind Crops Prod*, 76, 41–48. doi:10.1016/j.indcrop.2015.06.017
52. Guha, S., Maheshwari, S. C., 1964, *In vitro* production of embryos from anthers of datura. *Nature*, 204(495), 497. doi: 10.1038/204497a0
53. Hagberg, A., Hagberg, G., 1980. High-frequency of spontaneous haploids in the progeny of an induced mutation in barley. *Hereditas*, 93(2), 341–343.
54. Heberte-Bors, E., 1985. *In vitro* haploid formation from pollen: a critical review. *Theor. Appl Genet.*, 71, 361–374.
55. Holme, I. B., Olesen, A., Hansen, N. J. P., Andersen, S. B., 1999. Anther and isolated microspore culture response of wheat lines from northwestern and eastern Europe. *Plant Breed*, 118(2), 111–117. doi:10.1046/j.1439-0523.1999.118002111
56. Huang, B., 1992. Genetic manipulation of microspores and microspore-derived embryos. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 28(2), 53–58.

57. Hu, T. C., Kasha, K. J., 1999. A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. Genome, 42, 432–44.
58. Indrianto, A., Heberle-Bors, E., Touraev, A., 1999. Assessment of various stresses and carbohydrates for their effect on the induction of embryogenesis in isolated wheat microspores. Plant Science, 143, 71–79.
59. Immonen, S., 1999. Androgenetic green plants from winter rye, *Secale cereale* L., of diverse origin. Plant Breeding, 118, 319–322.
60. Javornik, B., Bohanec, B., Champion, B., 1998. Second cycle gynogenesis in onion, *Allium cepa* L., and genetic analysis of the plants. Plant Breed, 117(3), 275–278. doi:10.1111/j.1439-0523.1998
61. Juhasz, A. G., Simon-Sarkadi, L., Velich, I., Varro, P., 1997. Studies of non-ionic osmotic stress on bean (*Phaseolus vulgaris* L) callus and seedlings cultures. Acta Hort, 447, 455–456.
62. Kasha, K. J., Hu, T. C., Oro, R., Simion, E., Shim, Y. S., 2001. Nuclear fusion leads to chromosome doubling during mannitol pretreatment of barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores. J Exp Bot, 52(359), 1227–1238.
63. Kasha, K. J., Kao, K. N., 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Nature, 225, 874–876.
64. Kasha, K. J., Maluszynski, M., Forster, B. P., Szarejko, I., 2003. Doubled haploid production in crop plants. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 1–4.
65. Keller, E. R. J., Korzun, L., 1996. Haploidy in onion (*Allium cepa* L.) and other *Allium* species. Kluwer, Dordrecht, pp 51–75.
66. Kimber, G., Riley, R., 1963. The relationships of the diploid progenitors of hexaploid wheat. Can. J. Genet. Cytol., 5, 83–88.
67. Kirillova, G. A., Bogdanova, E. N., 1978. Comparative-study of haploid tomato form existing for a long-time and homozygous diploid form obtained from it. Genetika, 14(6), 1030–1037.
68. Lanaud, C., 1988. Origin of haploids and semigamy in *Theobroma cacao* Euphytica 38(3), 221–228. doi: 10.1007/bf00023524
69. Lee, S. S., Lee, S. A., Yang, J., Kim, J., 2011. Developing stable progenies of xBrassicoraphanus, an intergeneric allopolyploid between *Brassica rapa* and *Raphanus sativus*, through induced mutation using microspore culture. Theor Appl Genet, 22(5), 885–891. doi: 10.1007/ s00122-010-1494-3
70. Li, S., Huang, Y., Xiao, Y., Zhang, B., 2012. An observe of “Anther Culture in Pepper (*Capsicum annuum* L.) *in vitro*”. China Vegetables, (20), 1–6.

71. Lichter, R., 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 105, 427–434.
72. Martinez, L. E., Aguero, C. B., Lopez, M. E., Galmarini, C. R., 2000. Improvement of in vitro gynogenesis induction in onion (*Allium cepa* L.) using polyamines. *Plant Sci*, 156(2), 221–226. doi: 10.1016/S0168-9452(00)00263-6
73. Mathur, D. S., Aman, M. A., Sarkar, K. R., 1980. Induction of maternal haploids in maize through heat-treatment of pollen. *Curr Sci*, 49(19), 744–746.
74. Mdarhri-Alaoui, M., Saidi, N., Chlyah, A., Chlyah, H., 1998. Green haploid plant formation in durumwheat through in vitro gynogenesis. *CR Acad Sci Ser III Life*, 32, 25–30.
75. Mukhambetzhanov, S. K., 1997. Culture of nonfertilized female gametophytes in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 48(2), 111–119. doi:10.1023/a:1005838113788
76. Murashige, T., Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473–497.
77. Nishiyama, I., 1961. Cytogenetic studies in *avena*. 8. Haploid plant of sand oats (*Avena strigosa*). *Jpn J Genet*, 36(3–4), 72–75. doi:10.1266/jjg.36.72
78. Parcellier, A., Gurbuxani, S., Schmitt, E., Solary, E., Garrido, C., 2003. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochemical and biophysical research communications*. 304(3), 505–512.
79. Pechana, P. M., Smykal, P., 2001. Androgenesis: Affecting the fate of the male gametophyte. *physiologia plantarum*, 111, 1–8.
80. Powell, J. B., Hanna, W. W., Burton, G. W., 1975. Origin, cytology, and reproductive characteristics of haploids in pearl millet. *Crop Sci*, 15(3), 389–392.
81. Phippen, C., Ockendon, D. J., 1990. Genotype, plant, bud size and media factors affecting anther culture of cauliflowers (*Brassica oleracea* var. botrytis). *Theor Appl Genet*, 79, 33–38.
82. Noeum, L. H. S., 1976. Non-fertilized ovaries of *Hordeum vulgare* L. cultured in vitro (Haploides d'*Hordeum vulgare* L. par culture in vitro d'ovaires non fécondes.). *Annales de l'Amélioration des Plantes*, 26(4), 751–754.
83. Obert, B., Uvackova, L., Pret'ova, A., 2009. Maize doubled haploids via anther and microspore culture. In: Danforth AT (ed) *Corn crop production:*

- growth, fertilization and yield. Nova Science, Hauppauge, NY, pp 333–343.
84. Rongbai, L., Pandey, M. P., Pandey, S. K., Dwivedi, D. K., 1998. Exploiting the *in vitro* ovary culture technique to breed rice hybrids. *Int Rice Res Notes*, 23(1), 14.
 85. Sato, S., Katoh, N., Yoshida, H., Iwai, S., Hagimori, M., 2000. Production of doubled haploid plants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by pseudofertilized ovule culture. *Sci Hortic*, 83(3–4), 301–310. doi: 10.1016/s0304-4238(99)00090-4
 86. Sunderland, N., Xu, Z. H., 1982. Shed pollen culture in *Hordeum vulgare*. *Journal of experimental Botany*, vo.33, No: 136. pp. 1086-1095.
 87. Sunderland, N., Roberts, M., 1979. Cold-pretreatment of excised flower buds in float culture of tobacco anthers. *Ann Bot*, 43, 405-414.
 88. Sunderland, N., Dunwell, J. M., 1977. Pathways in pollen embryogenesis. In: Street HE (ed) *Tiss. Cult. Plant Sci.* Academic Press, London, (pp. 141–167).
 89. Raghavan, V., 1986. *Embryogenesis in Angiosperms: A Developmental and Experimental Study.* Cambridge University Press, New York
 90. Ramirez, C, Testillano, P. S., 2001. The early microspore embryogenesis pathway in barley is accompanied by concrete ultrastructural and expression changes. *The international journal of developmental biology* 45(1), 57-58.
 91. Telmer, C. A., Newcomb, W., Simmonds, D. H. 1995. Cellular changes during heat shock induction and embryo development of cultured microspores of *Brassica napus* cv. Topas. *Protoplasma* 185, 106–112. doi: 10.1007/BF01272758
 92. Thomas, P., 2004a. A three-step screening procedure for detection of covert and endophytic bacteria in plant tissue cultures. *Curr Sci (Banglore)*, 87, 67–72.
 93. Touraev, A., Pfosser, M., Vicente, O., Heberle Bors, E., 1996a. Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores – towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. *Planta*, 200, 144–152.
 94. Touraev, A., Ilham, A., Vicente, O., Heberle-Bors, E., 1996b. Stress induced microspore embryogenesis in tobacco an optimized system for molecular studies. *Plant Cell Rep*, 15, 561–565.
 95. Tulecke, W., 1964. Haploid tissue culture from female gametophyte of *Ginkgo biloba* Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum*

aestivum L.) induced by starvation at high temperatures. Sex Plant Reprod, in press.

96. Vasil, I., 2008. A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Rep*, 27, 1423–1440.
97. Yuan, L., Song, D., Gao, G., He, Y., 2011. Improvement of resistance to rice blast in PGMS line Y58S by molecular marker-assisted selection and anther culture. *Genomics Appl Biol*, 30(5), 620–625.
98. Zhou, C., Yang, H. Y., Tian, H. Q., Liu, Z. L., Yan, H., 1986. *In vitro* culture of unpollinated ovaries in *Oryza sativa* L. China Academic, Beijing, pp 165–181.
99. Zorinants, G., Kurnosikov, O., Jonge, W. J. M., Koopmans, B., 2006. Polarization Anomaly in Near-Field Magneto-optical Microscopy. George Zorinants *et al* 2006 *Jpn. J. Appl. Phys.* 45, 2111.

3. Bölüm

Katı Yüzeylere Özgül Peptitlerin Protein Saflaştırma Etiketi Olarak Uygulamaları: SilTAG Peptit Afinite Etiketi¹

Deniz ŞAHİN²

Candan TAMERLER³

¹ Bu çalışma Prof. Dr. Candan Tamerler danışmanlığında yürütülmüş olan Dr. Deniz Şahin'e ait doktora çalışması sonuçlarını içerir.

² Dr. Ar. Gör, İstanbul Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, ORCID: 0000-0003-3822-0319, sahinden@itu.edu.tr

³ Prof. Dr., University of Kansas, Department of Mechanical Engineering

1.Moleküler Biyomimetik ve GEPI Peptitleri

Moleküler biyomimetik doğada moleküler seviyede gerçekleşen süreçleri izleyerek, benzer sistemleri oluşturmayı ve fonksiyonel sistemler kurmayı amaçlayan yaklaşımdır. Bu yaklaşım doğrultusunda, canlıların milyonlarca yıl süren evrimsel süreçlerle elde ettikleri yararlı fonksiyonların gözlenmesi ile benzer fonksiyonel sistemler laboratuvar ortamında elde edilebilir. Moleküler biyomimetikin temelinde katı yüzeylere özgül olarak bağlanabilen ve inorganiklerin sentezlerini, oluşumlarını ve montajlarını kontrol edebilen peptit/proteinlerin belirlenmesi ve uygulamalarda kullanılması yatar. Bu peptit/proteinler sonuç olarak elde edilecek hibrit kompozit sistemin parçası olacaktır (Sarıkaya vd., 2003; Tamerler vd., 2007; Sarıkaya vd., 2004).

Genetik olarak modifiye edilmiş inorganığe bağlanabilen peptitler (GEPI- Genetically Engineered Peptides for Inorganics) (Sarıkaya vd., 2004) olarak adlandırılan bu tür inorganik bağlayıcı peptitlerin elde edilmesi için kombinatoriyal biyolojik teknikler yaygın olarak kullanılmaktadır (Sarıkaya vd., 2003; Naik vd., 2002). Sayısız inorganik malzemeye özgül peptit dizileri tanımlanmıştır. Malzemeler arasında soy metaller, örneğin altın (Brown vd., 2000; Hnilova vd., 2008), gümüş (Naik vd., 2002; Hnilova vd., 2012) ve platin (Seker vd., 2007); oksitler, örneğin SiO₂ (Oren vd., 2007), ZnO (Thai vd., 2004), Cu₂O (Thai vd., 2004) ve TiO₂ (Yazıcı vd., 2013); mineraller, örneğin HA (Gungormus vd., 2008), kalsit (Gaskin vd., 2000) ve safir (Krauland vd., 2007); yarı iletkenler, örneğin GaAs (Whaley vd., 2000), ZnS ve CdS (Lee vd., 2002); yanı sıra polimerler (Sanghvi vd., 2005) sayılabilir.

Katı yüzeylere özgül olarak bağlanabilen birçok peptidin belirlenmesi ile birlikte çok çeşitli alanlarda uygulamanın önü açılmıştır. Bunlar arasında, yüzey işlevselleştirme (Sarıkaya vd., 2003; Khatayevich vd., 2010; Tamerler vd., 2010), biyomineralizasyon (Gungormus vd., 2008), doku mühendisliği (Tamerler vd., 2010) ve rejeneratif tıp (Kretsinger vd., 2005) sayılabilir. Genetiği değiştirilmiş peptit bazlı ve protein bazlı materyallerin özgüllüğü ve tanıma fonksiyonları bu nedenle nanoteknolojide iki/çok fonksiyonlu moleküler yapılar ve cihazlar üretmek ve yeni pratik sistemlerin üretilmesi için yapı taşları olarak kullanılmıştır (Brown, 2001; Kacar vd., 2009; Sarıkaya vd., 2003).

2.Afinité Etiketleri ve Katı Yüzeylere Bağlanabilen Peptitlerin Protein Saflaştırma Etiketleri Olarak Uygulamaları

Katı yüzeylere bağlanan peptitlerin olası uygulama alanlarından biri, hücre ekstraktından istenen proteinin saflaştırılması amacıyla peptidin etiket molekülü olarak kullanılmasıdır.

Afinite Etiketleri: Afinite etiketleri, rekombinant proteinlerin hücre ekstraktından saflaştırılması amacıyla sıkça kullanılan ve özellikle tek adımda saflaştırmaya olanak sağlayarak protein saflaştırma alanında devrim yaratan moleküllerdir. Afinite etiketleri genellikle ekspresyon hedeflerinin N- veya C-terminaline eklenir ve kısa peptitlerden çok daha büyük tüm proteinlere kadar çok çeşitli örnekleri vardır. Özellikle son 30-40 yıl içinde çeşitli proteinler, protein bölgeleri ya da peptitler afinite etiketleri olarak geliştirilmiş ve protein saflaştırma amacıyla kullanılmıştır. Örneğin, heksahistidin etiketi (His-tag) (Hochuli vd., 1987), glutatyon S-transferaz, maltoz bağlayıcı protein (Smith vd., 1988), FLAG etiketi (Einhuauer vd., 2001), kalmodulin bağlayıcı peptit (Vailancourt vd., 2000) gibi peptit epitopları, Strep-tag veya Streptag II (Schmidt vd., 1993) ve biotin alıcı peptidin (Schatz, 1993) tümü, hücreden proteinlerin saflaştırılması için etiket sistemi olarak yaygın olarak kullanılan etiketler arasındadır.

Etiket peptit/proteinleri sayesinde hemen hemen her proteinin hücre ekstraktından yüz hatta bin kat saflaştırılması gerçekleştirilebilir. Uygulama sırasında nükleik asidi veya diğer hücresel materyali çıkarmak için ön saflaştırma adımlarına gerek yoktur. Basit deneysel prosedür ve hafif elüsyon koşulları ve bazı etiket sistemleri için verim, çözünürlük ve hatta füzyon ortaklarının katlanması üzerindeki olumlu etki, etiket sistemleriyle ilgili onları yüksek oranda özelleştirilmiş prosedürlerin olduğu geleneksel kromatografiye göre tercih edilebilir kılan güçlü niteliklerdir.

Protein saflaştırma amaçlı kullanılan afinite etiketlerinin bir kısmı katı yüzeylere bağlanabilen (solid-binding) peptitlerden oluşmaktadır. Bu peptitler, yapı veya işlevi etkilemeden inorganik veya sentetik arayüzlere bağlanma yeteneği kazandırmak için proteinlere eklenebilen kısa amino asit dizileridir. Peptitler seçicilik gösterir (yani, daha az özgül ortaklardan ziyade yüksek oranda özgül bağlanma ortağına bağlanır) ve metaller ve metal oksitler, yarı iletkenler, karbon bazlı malzemeler ve hatta polimerler gibi çok sayıda malzemeye kovalent olmayan etkileşimler yoluyla yüksek afinite ile bağlanırlar (Hochuli vd., 1987; Smith vd., 1988). Bağlanma, çeşitli çevresel koşullar altında ve ek bir kimyasal reaksiyona gerek kalmadan gerçekleşebilir (Smith vd., 1988). Ayrıca, katı yüzeye bağlanabilen peptit aracılı bağlantı, işlevselliklerini etkilemeden hareketsizleştirilmiş proteinlere/peptitlere yönsellik (directionality) ve yönlenme (orientation) sağlar (Smith vd., 1988). Bu nedenle, proteinlerin doğal veya sentetik materyaller üzerinde tek bir adımda saflaştırılmasına ve immobilizasyonuna izin verirken, geleneksel kimyasal immobilizasyon yöntemlerine “yeşil” ve verimli alternatifler olarak görünürler.

Silika yüzeye bağlanan Car9 peptidi (Soto Rodriguez vd., 2017; Coyle ve Baneyx, 2016), demir oksit nanopartiküllere bağlanabilen Glu6 peptidi (Schwaminger vd., 2019), +2 yüklü Ni iyonlarına bağlanabilen modifiye Histag (Blank Shim vd., 2017), demir parçacıklara bağlanabilen MagR büyük peptidi (Jiang vd., 2017), zeolite bağlanabilen pSN6 peptidi (McCarthy vd., 2018), silikaya bağlanabilen Sitag peptidi (Takeshi vd., 2011) son dönemde geliştirilen ve var olan katı yüzeylere bağlanarak peptid etiket amaçlı kullanılabilen peptidlere örnek olarak sayılabilir.

3. Moleküler Biyomimetik Yaklaşımlarla Peptit Etiketlerin Geliştirilmesi

Moleküler biyomimetik alanında kullanılan teknikler yoluyla hedef olarak belirlenen katı yüzeylere-inorganiklere seçici olarak ve yüksek afinite ile bağlanabilen peptitler belirlenebilir ve bu peptitler en temel uygulama alanı olarak protein saflaştırma amacıyla peptit-etiket olarak değerlendirilebilir.

GEPI'lerin belirlenmesi: Katı yüzeylere özgül ve yüksek afinite ile bağlanabilen peptitlerin belirlenmesi amacıyla izlenecek iki aşamadan oluşan yaklaşım daha özgül ve afinitesi yüksek peptidlerin belirlenmesine olanak verecektir. Öncelikle, kombinatoriyel biyolojik teknikler (faj gösterim, hücre yüzey gösterim metodları vb.) yoluyla istenilen inorganik malzemeye özgül peptitler bulunur ve bağlanma dereceleri sınıflandırılarak optimize edilir. Devamında ise, deneysel verilerden elde edilen bilgiler ışığında, biyoinformatik yöntemler ve benzerlik analizleri yoluyla daha iyi bağlanabilen peptitler elde edilir ve bu peptitler de test edilerek bağlanabilirliği kontrol edilir (Oren vd., 2007).

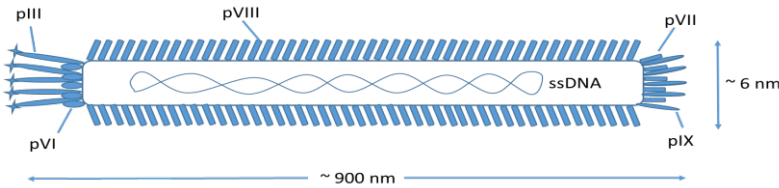
Kombinatoriyel biyoloji yöntemleri, faj gösterim yöntemi: 2018 Nobel Kimya Ödülü, evrimle ilgili iki konu arasında paylaşılmıştır. Ödülün yarısı "enzimlerin yönlendirilmiş evrimi" çalışmaları nedeniyle Frances H. Arnold'a verilirken, diğer yarısı ise "peptit ve antikor temelli faj gösterim yöntemi" çalışmaları nedeniyle George P. Smith ve Gregory P. Winter arasında paylaşılmıştır (URL1).

Faj gösterim yöntemi ilk olarak 1985 yılında George Smith tarafından peptitlerin bakteriyofaj kılıf proteinleri üzerinde gösterimi amacıyla geliştirilmiş ve teknik daha sonra bakteriyofaj kılıf proteinleri üzerinde antikor parçalarının gösterilmesi (ifade edilmesi) amacıyla Gregory P. Winter tarafından modifiye edilmiştir. Hedefe özgü peptitleri veya antikor parçalarını seçmek için belirli bir örnek hedef için büyük peptit/antikor kütüphanelerinin tarandığı yaygın ve etkili şekilde kullanılan bir yöntemdir (Marr vd., 2011).

Faj gösterim yöntemi günümüze kadar birçok çalışmada farklı organik veya inorganik hedef numunelere özgül binlerce peptit/antikor fragmanı belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır (Rojas vd., 2014). Faj gösterim yöntemi kullanılan örnek çalışmalar arasında; protein-protein etkileşimlerinin incelenmesi (Kiewitz vd., 1997; Caberoy vd., 2010), enzim-substrat etkileşimleri, enzimolojide katalitik bölge ve aktivatör-inhibitör tayini (Benhar vd., 2001; Diamond vd., 2007), proteomik, ilaç salınımı ve hücre içi süreçler için hedeflenen antikorların belirlenmesi (Smith vd., 1997; Benhar vd., 2001; Bratkovic vd., 2010), hücre yüzeyi reseptör yapısı için agonistlerin ve antagonistlerin saptanması (Deshayes vd., 2002; Koolpe vd., 2005), inorganik yüzeylere bağlanabilen peptitlerin seçimi (Whaley vd., 2000; Tamerler vd., 2007), insan kök hücresine özgü peptitlerin seçimi (Bignone vd., 2016) ve mide kanseri hücresine özgü peptitler (Sahin vd., 2018) örnek olarak verilebilir.

Faj gösterim yönteminin temelinde, kullanılan bakteriyofajın fenotip ve genotipi arasında kurulan bağlantı yatar. Bakteriyofajın genomuna eklenen rastgele peptit dizileri bakteriyofajın yüzeyinde bulunan proteinler üzerinde ifade edilir. Kısaca, genotipte gerçekleşecek bir değişiklik doğrudan fenotipte gözlenecektir.

Yöntem için kullanılan bakteriyofajlar filamentöz/ipliksi faj ailesine dahildir ve konak hücre olarak farklı gram negatif bakterileri kullanır. Yaygın olarak kullanılan M13 bakteriyofajı çubuk benzeri bir virüstür ve 6 nm'lik çapa ve ~ 900 nm uzunluğu sahiptir. Genom tek iplikli DNA'dır ve 5 farklı protein türü ile paketlenir. Yaklaşık 2800 pVIII ana kılıf proteini virüsü bir uçtan diğer uca çevrelerken, pIII ve pVI proteinlerinin beş kopyası bir ucu sonlandırır ve pVII ve pIX proteinleri diğer ucu kapatır [Deutscher vd., 2010) (Şekil 1).

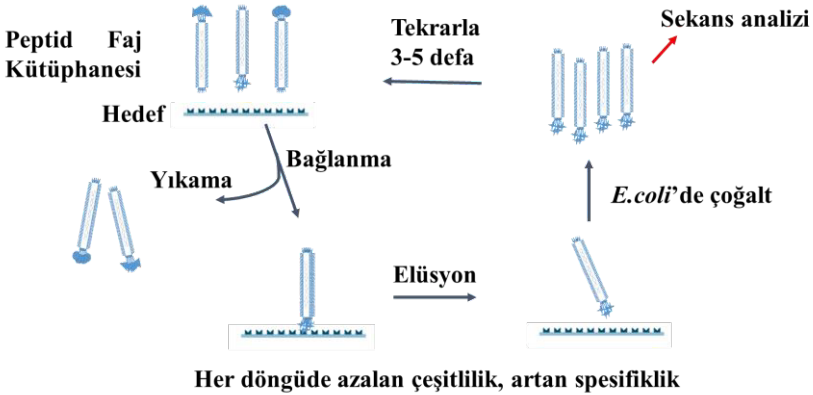


Şekil 1: M13 bakteriyofajın şematik diyagramı; 6407 nükleotid uzunlukta dairesel ssDNA'yı çevreleyen 2800 kopya pVIII majör kılıf proteini ve bir uçta pIII, pVI proteinleri ve diğer uçta pVII ve pIX proteinleri olmak üzere her minör kılıf proteininin 5 kopyasından oluşan protein kılıfı.

Faj gösterim peptit kütüphaneleri, kısa peptitleri (7-12 amino asit uzunluğunda kısa peptitler) veya nispeten daha büyük antikor parçalarını ifade etmek için hazırlanabilir. Peptitler, monoklonal antikorlara ve büyük protein ligandlarına göre küçük boyut, sentez kolaylığı, tümör taraması kolaylığı ve

yüksek biyoyumumluluk dahil olmak üzere birçok avantaja sahiptir. Ek olarak peptidin afinitesi, yükü, hidrofobikliği ve stabilitesi kimyasal olarak değiştirilebilir (Sun vd., 2012).

Belirli bir hedefe bağlanma afinitelerine dayalı olarak hedefe özgül peptitlerin izolasyonu için, faj kütüphanesi hedef molekül ile biyopanning veya afinite zenginleştirme olarak adlandırılan 3-5 döngü için inkübe edilir (Parmley vd., 1988) (Şekil 2). İlk olarak, özgül faj klonlarını yakalamak için peptid faj kütüphanesi istenen hedef numuneye (antijen, hücre, doku, vb.) maruz bırakılır. Daha sonra, seçici olmayan veya düşük afiniteli bağlanan faj klonları tekrarlanan yıkama aşamaları ile elimine edilir ve kalan güçlü bağlanan klonlar ayrıştırılır ve nihayet geri kazanılan fajlar uygun konak bakteriler kullanılarak çoğaltılır. Bu süreç bir biyopanning döngüsüdür ve son amplifiye faj havuzu, ikinci panning için faj kütüphanesi olarak kullanılır. Her biyopanning döngüsünden sonra, özgül ve yüksek afinite ile bağlanan faj klonlarının hedefe oranı artarken (zenginleştirme) faj çeşitliliği azalır (Deutscher vd., 2010).



Şekil 2: Faj gösterim tekniği biyopanning döngüleri; istenen hedefe bağlanan fajların seçilmesi amacıyla faj peptid kütüphanesinin hedef ile inkübasyonu, yıkama ve elüsyon adımları sonucu iyi bağlanan faj klonlarının belirlenerek peptid dizi bilgilerinin elde edilmesi.

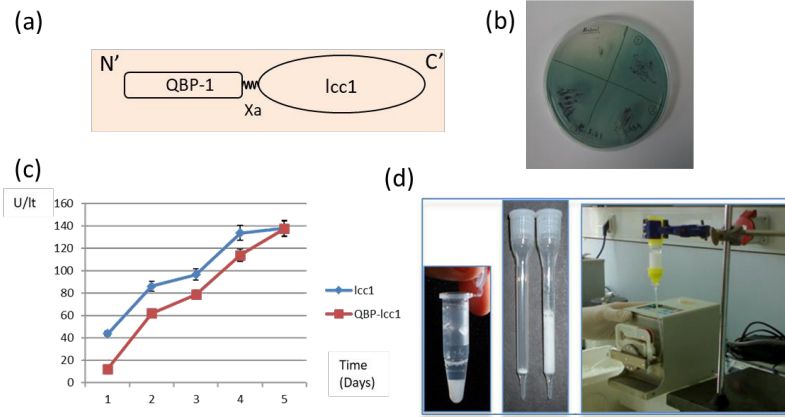
Hesaplamalı Seçim Metodolojisi, Deneysel Bilgiyi Biyoinformatik ile Birleştirmek: Faj gösterim yöntemi kullanılarak elde edilen peptitlerin hedefe özgüllük ve afiniteleri karakterize edilir ve seçilen en iyi peptidler uygulamalarda kullanılabilir. Bu peptidler başlangıç faj kütüphanesi içinde ifade edilmiş ve biyopanning döngüleri sonucunda seçilerek ortaya çıkmış faj klonlarının üzerinde ifade edilmektedirler. Bu yaklaşıma ek olarak, biyopanning döngüleri sonucu elde edilen deneysel bilgi hesaplamalı yaklaşımlar yoluyla

işlenerek aynı hedefe daha özgül ve yüksek afinite ile bağlanabilen teorik peptit dizilerinin dizaynı için kullanılabilir. Bu yaklaşım doğrultusunda peptitler deneysel olarak seçilir ve malzeme bağlama afinitelerine göre güçlü, orta ve zayıf olmak üzere üç dizi kümesinde gruplandırılacak şekilde karakterize edilir. Daha sonra, bu deneysel bilgi dizi hizalama yöntemleri (Needlema vd., 1970; Smith vd., 1981) ve standart puanlama matrisleri (Henikoff vd., 1992; Dayhoff vd., 1978) ile birleştirilerek bağlanmadan sorumlu özgül kalıplarını hesaba katan malzemeye özgül yeni dizi puanlama matrisi geliştirmekte kullanılır (Oren vd., 2007). Böylece, *de novo* yapı tahminleri yapılabilir ve son olarak, istenen afinite ve özgüllük için ayarlanmış GEPI'ler geliştirilebilir. Yüksek afiniteli GEPI'ler tasarlamak için rastgele diziler oluşturulabilir ve puanlama matrisleri kullanılarak dizi benzerlikleri deneysel olarak bilinen güçlü bağlama dizileriyle karşılaştırılabilir. Çoklu inorganik malzeme tanıma ve bağlama işlevlerine sahip GEPI'lerin seçimi için farklı malzemeye özgül matrisler birleştirilebilir (Tamerler vd., 2009).

4. SilTag, kuartza bağlanabilen peptitlerin tek adımlı protein saflaştırma amacıyla kullanılması

Araştırma grubumuzda, kuartza özgül ve yüksek afinite ile bağlanabilen peptitlerin seçilimi amacıyla 5 biyopanning döngüsünden oluşan faj gösterim yöntemi uygulandı. Yukarıda belirtildiği gibi, deneysel olarak belirlenen peptitlerden elde edilen dizi bilgileri hesaplamalı teknikler kullanılarak işlenmiş ve yüksek afinite ile bağlanması beklenen teorik peptit dizileri belirlendi (Oren vd. 2007). Bu yaklaşım ile belirlenen en yüksek afiniteli peptit olan kuartza bağlanan peptit (QBP-1, Quartz Binding Peptide) afinite etiket uygulaması amacıyla seçildi. Seçilen 12 amino asitlik QBP-1 peptidinin silika/kuartz malzemeye güçlü ve özgül olarak bağlanma yeteneği, onu protein saflaştırma amaçları için yeni bir etiket sistemi oluşturmak için güçlü bir aday yapmaktadır.

QBP1 peptidinin (-PPPWLPLYMPPWS-) lakkaz enziminin (lcc1) N terminal ucuna yerleştirilmesiyle elde edilen hibrit füzyon proteini *Pichia pastoris* maya hücrelerinde üretilmiştir. Buradaki amacımız, seçilebilir avantajlara sahip tek adımlı bir saflaştırma protokolü tasarlamaktır. İlk olarak, DNA seviyesinde füzyon proteini oluşturulmuş ve maya hücrelerine transforme edilmiştir. Ardından hibrit füzyon moleküllü protein seviyesinde ifade edildi. QBP-1 etiket peptidinin lcc1 lakkaz enziminin hücre dışına salınımı ya da enzim aktivitesi üzerinde önemli bir etkisi olmadığı gösterildi. Sonuç olarak, QBP1 peptidi hem doğal hem de denatüre koşullarda silika/kuartz dolgulu kolonlar yoluyla füzyon molekülünün saflaştırılması için bir "TAG-Etiket" moleküllü olarak kullanıldı (Şekil 3).

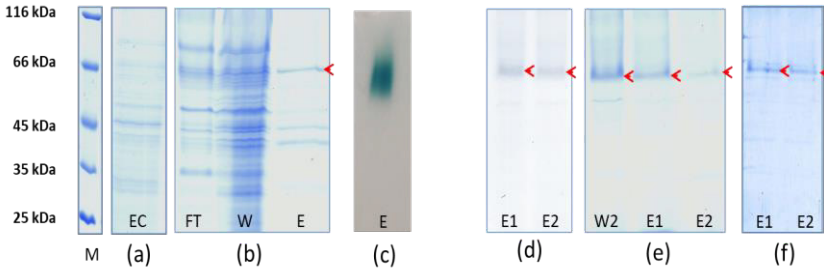


Şekil 3: (a) N terminal uçta yer alan QBP-1 peptidi ve lcc1 proteininin hibrit yapısının şematik gösterimi. QBP-1 peptidi ile lcc1 proteini arasında yer alan Factor Xa (IEGR) kesim bölgesi, etiket peptidin protein üzerinden kesilmesine olanak sağlamaktadır. (b) QBP-1 etiketli lcc1 proteini hücre dışına salınır ve aktivitesi devam etmektedir. (c) Seçilmiş *Pichia pastoris* kolonilerinden ve bir kontrol numunesinden alınan lakkaz aktivite seviyeleri, hücre dışı ortam içeren lakkazı ABTS ile reaksiyona sokarak ve absorbans seviyesini spektrofotometrik olarak ölçerek beş gün boyunca karşılaştırıldı. QBP-1 etiket peptidin lcc1 enzim aktivitesi üzerindeki etkisi uzun vadede ihmal edilebilir seviyededir. (d) Saflaştırma işlemleri yöntemleri. Mini santrifüj tüplerinde yıkama/santrifüj ile (batch) saflaştırma yapılabilir (solda), hücre dışı sıvı örneği rezin ile paketlenmiş kolonlardan yer çekimi yardımı (ortada), ya da peristaltik pompa (sağda) yardımı ile geçirilebilir.

Uygulanan tek adımlı purifikasyon protokolü ile SilTag etiketli lcc1 proteini hücre ekstraktından saflaştırıldı. Kullanılan rezin malzemesi silika (60 ila 200 μm çapında) ve kuartz (200-800 μm çapında) yapıdadır. Her iki malzeme de ucuzdur ve ticari olarak temin edilebilir. Saflaştırma adımlarından önce herhangi bir başlangıç işlemi gerektirmezler. Rezin malzemeleri sonik banyoda izopropanol, etanol ve distile su ile temizlenmiş ve ayrı kolonlarda paketlenildi (Şekil 3). Bağlanma tamponu olarak PC tampon (Potasyum fosfat/Sodyum karbonat tamponu, 55 mM KH_2PO_4 , 45 mM Na_2CO_3 , 200 mM NaCl pH.7,5) ve yıkama tamponu olarak PC tamponu (pH.6,5 + %0.5 Tween20) kullanılmıştır. Elüsyon tamponu olarak kullanılan çözeltiler arasında farklı pH ve Tween20 yüzdelerinde çözeltiler denendi. Son aşamada en yüksek verim PC tamponu (2 M MgCl_2 , pH.8) ile elde edilmiştir. Protein katlanmasının bağlanma üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla, hücre dışı protein numunesi proteinin doğal formda olduğu durumda PC tamponu (pH.7,5) içinde ya da proteinin denatüre

formda olması durumunda PC tamponu (pH.7,5 + 8M Üre) içinde uygulamaya alınmıştır. Saflaştırma adımları için hem kolon saflaştırma hem de mikrosantrifüj içinde yıkamalı prosedürler uygulandı. Silika/kvartz rezin malzemesi temizlendikten sonra boş saflaştırma kolonlarına dökülerek çökmesi beklenmiştir. Kolon durumunda, numuneler ve tamponlar, sıvı akış hızını düzenlemek için peristaltik mikro pompa kullanılarak kolondan geçirilmiştir. Mikro santrifüj tüpü uygulamasında rezin materyali üzerine yıkama ve elüsyon tamponları uygulanmış ve inkübasyon süresinden sonra rezin santrifüj edilerek çöktürülmüştür (Şekil 4).

Şekil 4'te *Pichia pastoris* hücrelerinde üretilen QBP1-lcc1 etiketli proteinin hücre dışı sıvı karışımından saflaştırma adımlarının Coomassie brilliant blue boyalı SDS-PAGE jel analiz sonuçları yer almaktadır. QBP1-lcc1 füzyon proteini *Pichia pastoris* maya hücrelerinde üretildiğinde etiketli protein doğrudan hücre dışına salınmaktadır. Üretim aşaması sonucunda santrifüj ile hücreler uzaklaştırılmış ve supernatant kısmı (hücre dışı sıvı) devam eden saflaştırma aşamalarına aktarılmıştır. Rezin olarak silika ve kvartz materyal kullanılmış ve saflaştırma tekniği olarak da kolon ve mikrosantrifüj içinde yıkama yöntemleri denenmiştir. Aynı zamanda protein doğal (native) ve denatüre formda saflaştırma işlemine sokulmuştur. Yıkama aşamaları ile çözelti içindeki derişimi arttırılan etiketli protein SDS-PAGE jel üzerinde net olarak ortaya çıkmaktadır. Denatüre olmayan koşullarda saflaştırılan proteinin jel üzerinde ABTS ile inkübe edildiğinde oluşan yeşil-mavi renk lcc1 proteinin fonksiyonel halde saflaştırıldığını ve QBP1 etiketli saflaştırma işleminin protein aktivitesi üzerinde etkisi olmadığını göstermektedir. Saflaştırma sonucunda yapılan hesaplamalarda % 60 verim ve 8 kat saflık elde edildiği görülmüştür.



Şekil 4: *Pichia pastoris* hücrelerinde üretilen QBP1-lcc1 etiketli proteinin hücre dışı sıvı karışımından saflaştırma adımlarının Coomassie brilliant blue boyalı SDS-PAGE jel analiz sonuçları. (a) Hücre dışı sıvı (b) Silika rezin, proteinin nativ formu ve kolon saflaştırma, (c) ABTS ile boyanmış SDS-PAGE sonucu üzerinde zimogram analizi, (d) Silika rezini, denatüre protein formu ve

kolon saflaştırması, (e) Kuartz rezini, denatüre protein formu ve kolon saflaştırması, (f) Silika rezini, denatüre protein formu ve yıkamalı tüp (batch) saflaştırma. (M: Protein belirteci, EC: Ekstraselüler-hücre dışı sıvı, FT: Akış, W: Yıkama, E: Elüsyon. E1: Birinci elüsyon adımı. E2: İkinci elüsyon adımı. Kırmızı oklar, QBP1-lcc1 bantlarını gösterir.

5.Sonuç

Peptit/protein etiketleri istenilen proteinin hücre ortamından yüksek verim ile saflaştırılması amacıyla yaygın olarak kullanılan devrimsel moleküllerdir. Katı yüzeylere yüksek özgüllük ve afinite ile bağlanabilen peptidlerin belirlenmesi, yeni ve daha verimli afinite saflaştırma süreçlerinin geliştirilmesine olanak vermektedir. Katı yüzeylere bağlanabilen peptidlerin seçiminde moleküler biyomimetik yaklaşımlar takip edilebilir. Bu doğrultuda, kombinatoriyal biyoloji ve hesaplamalı yöntemler birleştirilerek belirlenen katı yüzeylere daha yüksek afinite ve özgüllükte bağlanabilen peptidler belirlenebilir.

Örnek olarak verdiğimiz çalışmamızda, faj gösterim ve devamında hesaplamalı teknikler yoluyla belirlenen QBP1 peptidi (PPPWLPYMPPWS) lcc1 proteinin saflaştırılması amacıyla peptit etiket olarak kullanılmıştır. Öncelikle DNA seviyesinde oluşturulan füzyon protein *Pichia pastoris* hücrelerinde üretilmiş, oluşturulan füzyon protein ile lcc1 enziminin aktiviteleri karşılaştırılarak, QBP-1 peptidinin bağlanmış olduğu enzim aktivitesi üzerine etkisi ortaya konulmuştur. QBP1 peptidi, N-terminale bağlı olduğu halde, enzim aktivitesinde değişikliğe neden olmamaktadır. Bu ise bir “tag” molekülü olarak QBP1 için oldukça avantajlı bir özelliktir. Yapılacak uygulamaya göre, saflaştırma sonrasında tag molekülü, enzim ile bağlı olarak bırakılabilir.

Çalışmanın devamında QBP-1 peptidi bir “tag” peptit olarak görev yaptırılarak hücre ortamından füzyon proteinin saflaştırılmasında kullanılmıştır. Hazırlanan kuartz kolonlar ve batch sistem yollarıyla, QBP-1’in kuartz yüzeyine bağlanabilme özelliği kullanılarak füzyon proteini hücre ortamından saflaştırmak mümkün olmuştur. Saflaştırma yöntemi kolay uygulanabilen aşamalardan oluşmaktadır. Kullanılan rezin malzemeleri ucuz ve ticari olarak temin edilebilir materyallerdir. Gerektiğinde etiket peptidi proteaz kesim bölgesi kullanılarak enzimden kesilebilir. %60 verim ve 8 kat saflaştırma elde edilmiştir.

Sonuç olarak burada, Moleküler Biyobenzetim ve biyoinformatik tekniklerinin birlikte kullanılmasıyla, daha ucuz ve basit saflaştırma yöntemleri geliştirme amaçlı yeni TAG moleküllerinin elde edilebileceği gösterilmiştir. Kuartza seçici olarak bağlanabilen QBP1 peptidi, sahip olduğu özellikler sayesinde, mevcut ticari “tag” (afinite etiketi) sistemleri ile rekabet edebilecek bir tag molekülüdür.

Kaynaklar

1. Benhar I. Biotechnological applications of phage and cell display.” *Biotechnology advances*, 2001, 19(1),1-33.
2. Bignone PA, Krupa RA, West MD, Larocca D. Selection of Phage Display Peptides Targeting Human Pluripotent Stem Cell-Derived Progenitor Cell Lines. *Methods Mol Biol.* 2016;1357:269-83.
3. Blank-Shim SA, Schwaminger SP, Borkowska-Panek M, Anand P, Yamin P, Fraga-García P, Fink K, Wenzel W, Berensmeier S. Binding patterns of homo-peptides on bare magnetic nanoparticles: insights into environmental dependence. *Sci Rep.* 2017 Oct 25;7(1):14047.
4. Bratkovic T. Progress in phage display: evolution of the technique and its application. *Cell Mol Life Sci.* 2010 Mar;67(5):749-67.
5. Brown S, Sarikaya M, Johnson E. A genetic analysis of crystal growth. *J Mol Biol.* 2000 Jun 9;299(3):725-35.
6. Brown S. Protein-mediated particle assembly. *Nano Letters*, 2000, 1, 391–394
7. Caberoy NB, Zhou Y, Jiang X, Alvarado G, Li W. Efficient identification of tubby-binding proteins by an improved system of T7 phage display. *J Mol Recognit.* 2010 Jan-Feb;23(1):74-83. doi: 10.1002/jmr.983.
8. Coyle BL, Baneyx F. Direct and reversible immobilization and microcontact printing of functional proteins on glass using a genetically appended silica-binding tag. *Chem Commun (Camb).* 2016 May 19;52(43):7001-4.
9. Dayhoff MO, Schwartz RM, Orcutt BC. *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation: 1978, Washington DC.
10. Deshayes K, Schaffer ML, Skelton NJ, Nakamura GR, Kadkhodayan S, Sidhu SS. Rapid identification of small binding motifs with high-throughput phage display: discovery of peptidic antagonists of IGF-1 function. *Chem Biol.* 2002 Apr;9(4):495-505.
11. Deutscher SL. Phage display in molecular imaging and diagnosis of cancer. *Chemical reviews*, 2010, 110(5), 3196-3211.
12. Diamond SL. Methods for mapping protease specificity. *Curr Opin Chem Biol.* 2007 Feb;11(1):46-51.
13. Einhauer A, Jungbauer A. The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J Biochem Biophys Methods.* 2001 Oct 30;49(1-3):455-65.

14. Gaskin DJH, Starck K, Vulfson EN. Identification of inorganic crystal-specific sequences using phage display combinatorial library of short peptides: a feasibility study. *Biotechnology Letters*, 2000, 22, 1211–1216
15. Gungormus M, Fong H, Kim IW, Evans JS, Tamerler C, Sarikaya M. Regulation of in vitro calcium phosphate mineralization by combinatorially selected hydroxyapatite-binding peptides. *Biomacromolecules*. 2008 Mar;9(3):966-73.
16. Henikoff S, Henikoff JG. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Nov 15;89(22):10915-9.
17. Hnilova M, Liu X, Yuca E, Jia C, Wilson B, Karatas AY, Gresswell C, Ohuchi F, Kitamura K, Tamerler C. Multifunctional protein-enabled patterning on arrayed ferroelectric materials. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2012 Apr;4(4):1865-71.
18. Hnilova M, Oren EE, Seker UO, Wilson BR, Collino S, Evans JS, Tamerler C, Sarikaya M. Effect of molecular conformations on the adsorption behavior of gold-binding peptides. *Langmuir*. 2008 Nov 4;24(21):12440-5.
19. Hochuli E, Döbeli H, Schacher A. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr*. 1987 Dec 18;411:177-84.
20. Ikeda T, Motomura K, Agou Y, Ishida T, Hirota R, Kuroda A. The silica-binding Si-tag functions as an affinity tag even under denaturing conditions. *Protein Expr Purif*. 2011 Jun;77(2):173-7.
21. Jiang M, Zhang L, Wang F, Zhang J, Liu G, Gao B, Wei D. Novel Application of Magnetic Protein: Convenient One-Step Purification and Immobilization of Proteins. *Sci Rep*. 2017 Oct 17;7(1):13329.
22. Kacar T, Ray J, Gungormus M, Oren EE, Tamerler C, Sarikaya M. Quartz binding peptides as molecular linkers towards fabricating multifunctional micropatterned substrates. *Advanced Materials*, 2009, 21, 295–299
23. Khatayevich D, Gungormus M, Yazici H, So C, Cetinel S, Ma H, Jen A, Tamerler C, Sarikaya M. Biofunctionalization of materials for implants using engineered peptides. *Acta Biomater*. 2010 Dec;6(12):4634-41.
24. Kiewitz A, Wolfes H. Mapping of protein-protein interactions between c-myc and its coactivator CBP by a new phage display technique. *FEBS Lett*. 1997 Oct 6;415(3):258-62.
25. Koolpe M, Burgess R, Dail M, Pasquale EB. EphB receptor-binding peptides identified by phage display enable design of an antagonist with ephrin-like affinity. *J Biol Chem*. 2005 Apr 29;280(17):17301-11.

26. Krauland EM, Peelle BR, Wittrup KD, Belcher AM. Peptide tags for enhanced cellular and protein adhesion to single-crystalline sapphire. *Biotechnol Bioeng.* 2007 Aug 1;97(5):1009-20.
27. Kretsinger JK, Haines LA, Ozbas B, Pochan DJ, Schneider JP. Cytocompatibility of self-assembled beta-hairpin peptide hydrogel surfaces. *Biomaterials.* 2005 Sep;26(25):5177-86.
28. Lee SW, Mao C, Flynn CE, Belcher AM. Ordering of quantum dots using genetically engineered viruses. *Science.* 2002 May 3;296(5569):892-5.
29. Marr A, Markert A, Altmann A, Askoxylakis V, Haberkorn U. Biotechnology techniques for the development of new tumor specific peptides. *Methods.* 2011 Nov;55(3):215-22.
30. McCarthy DN, Edwards GC. Immobilized organo-mercurial lyase on zeolite using a solid binding peptide. *Int J Environ Bioremediation Biodegrad* 2018;6 (1):8–17.
31. Naik RR, Brott LL, Clarson SJ, Stone MO. Silica-precipitating peptides isolated from a combinatorial phage display peptide library. *J Nanosci Nanotechnol.* 2002 Feb;2(1):95-100.
32. Naik RR, Stringer SJ, Agarwal G, Jones SE, Stone MO. Biomimetic synthesis and patterning of silver nanoparticles. *Nat Mater.* 2002 Nov;1(3):169-72.
33. Needleman SB, Wunsch CD. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol.* 1970 Mar;48(3):443-53.
34. Oren EE, Tamerler C, Sahin D, Hnilova M, Seker UO, Sarikaya M, Samudrala R. A novel knowledge-based approach to design inorganic-binding peptides. *Bioinformatics.* 2007 Nov 1;23(21):2816-22.
35. Parmley SF, Smith GP. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene.* 1988 Dec 20;73(2):305-18.
36. Rojas G, Tundidor Y, Infante YC. High throughput functional epitope mapping: revisiting phage display platform to scan target antigen surface. *MAbs.* 2014;6(6):1368-76.
37. Sanghvi AB, Miller KP, Belcher AM, Schmidt CE. Biomaterials functionalization using a novel peptide that selectively binds to a conducting polymer. *Nat Mater.* 2005 Jun;4(6):496-502.
38. Sarikaya M, Tamerler C, Schwartz D, Baneyx F. Materials assembly and formation using engineered polypeptides. *Annu. Rev. Mater. Res.* 2004. 34:373–408

39. Sarikaya M, Tamerler C, Jen AK, Schulten K, Baneyx F. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. *Nat Mater.* 2003 Sep;2(9):577-85.
40. Schatz PJ. Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y).* 1993 Oct;11(10):1138-43.
41. Schmidt TG, Skerra A. The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Eng.* 1993 Jan;6(1):109-22.
42. Schwaminger SP, Blank-Shim SA, Scheifele I, Pipich V, Fraga-García P, Berensmeier S. Design of Interactions Between Nanomaterials and Proteins: A Highly Affine Peptide Tag to Bare Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Protein Separation. *Biotechnol J.* 2019 Mar;14(3):e1800055.
43. Seker UO, Wilson B, Dincer S, Kim IW, Oren EE, Evans JS, Tamerler C, Sarikaya M. Adsorption behavior of linear and cyclic genetically engineered platinum binding peptides. *Langmuir.* 2007 Jul 17;23(15):7895-900.
44. Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene.* 1988 Jul 15;67(1):31-40.
45. Smith GP, Petrenko VA. Phage display. *Chemical reviews,* 1997, (2), 391-410.
46. Smith TF, Waterman MS. Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol.* 1981 Mar 25;147(1):195-7.
47. Soto-Rodríguez J, Coyle BL, Samuelson A, Aravagiri K, Baneyx F. Affinity purification of Car9-tagged proteins on silica matrices: Optimization of a rapid and inexpensive protein purification technology. *Protein Expr Purif.* 2017 Jul;135:70-77.
48. Sun J. A novel mouse CD133 binding-peptide screened by phage display inhibits cancer cell motility in vitro. *Clinical & experimental metastasis,* 2012, 29(3), 185-196.
49. Tamerler C, Khatayevich D, Gungormus M, Kacar T, Oren EE, Hnilova M, Sarikaya M. Molecular biomimetics: GEPI-based biological routes to technology. *Biopolymers.* 2010;94(1):78-94.
50. Tamerler C, Khatayevich D, Gungormus M, Kacar T, Oren EE, Hnilova M, Sarikaya M. Molecular biomimetics: GEPI-based biological routes to technology. *Biopolymers.* 2010;94(1):78-94.

51. Thai CK, Dai H, Sastry MS, Sarikaya M, Schwartz DT, Baneyx F. Identification and characterization of Cu(2)O- and ZnO-binding polypeptides by Escherichia coli cell surface display: toward an understanding of metal oxide binding. *Biotechnol Bioeng.* 2004 Jul 20;87(2):129-37.
52. Vaillancourt P, Zheng CF, Hoang DQ, Breister L. Affinity purification of recombinant proteins fused to calmodulin or to calmodulin-binding peptides. *Methods Enzymol.* 2000;326:340-62.
53. Whaley SR, English DS, Hu EL, Barbara PF, Belcher AM. Selection of peptides with semiconductor binding specificity for directed nanocrystal assembly. *Nature.* 2000 Jun 8;405(6787):665-8.
54. Yazici H, Fong H, Wilson B, Oren EE, Amos FA, Zhang H, Evans JS, Snead ML, Sarikaya M, Tamerler C. Biological response on a titanium implant-grade surface functionalized with modular peptides. *Acta Biomater.* 2013 Feb;9(2):5341-52.
55. URL1: "Press release: The Nobel Prize in Chemistry 2018", [https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/press-release/\(01.12.2018\)](https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/press-release/(01.12.2018))

4. Bölüm

Gecikme Terimi İçeren Singüler Pertürbe İntegro-Diferansiyel Denklemin Yaklaşık Çözümü

Derya ARSLAN¹

¹ Doç. Dr., Department of Mathematics, University of Bitlis Eren, Bitlis, Turkey

1. GİRİŞ

Bu çalışmada, singüler pertürbe gecikme terimli lineer birinci mertebeden Volterra integro-diferansiyel denklemin başlangıç değer probleminin diferansiyel dönüşüm yöntemi (DTM) kullanılarak sayısal çözümü ile ilgilenilmektedir. Bu yöntem, problemlerin seri çözümünü elde etmek için yinelemeli bir prosedürdür. Bir örnek uygulama üzerinde yöntemin, pertürbasyon parametresine göre düzgün yakınsama gösterdiği ortaya çıkarılır. Sonuç olarak elde edilen sayısal veriler teoriyi destekler niteliktedir.

Gecikmeli diferansiyel denklemler ilk olarak 18. yüzyılda Laplace tarafından tanıtıldı. Gecikmeli integral diferansiyel denklemler ise mühendislik, mekanik, fizik, kimya, astronomi, biyoloji, ekonomi, potansiyel teorisi ve elektrostatik alanlarında kullanılmıştır [3,4]. Son zamanlarda, gecikmeli integral diferansiyel denklemlerin sayısal çözümüne artan bir ilgi vardır. Bunlar Taylor collocation, Chebyshev collocation, Chebyshev-Lobatto collocation, Lagrange collocation, Jacobi collocation, operasyonel Tau, Boubaker collocation ve Muntez-Legendre matris yöntemleri vb. [3,4]. Volterra gecikme-integro-diferansiyel denklemler ekoloji, tıp, fizik, biyoloji ve benzeri bilimler alanında büyük bir etkiye sahiptir [3,4].

Singüler pertürbe diferansiyel denklemler, diferansiyel denklemdaki en yüksek mertebeli türev teriminin bir çarpanı şeklinde küçük bir parametre olan ε ile karakterize edilir. Genel olarak, bu tür denklemlerin çözümleri ani ve hızlı değişimler sergiler. Bu değişim bölgeleri, uygun olduğu şekilde sınır katları olarak adlandırılır. Bu tür denklemler, örneğin yüksek Reynold sayısında sıvı akışı, elektrik ağları, kimyasal reaksiyonlar, kontrol teorisi, gözenekli ortamdaki akışı yöneten denklemler gibi bilim ve mühendisliğin matematik problemlerinde sıklıkla ortaya çıkar[5,6]. Standart yaklaşık yöntemlerin bu problemler için iyi çalışmadığı bilinmektedir, çünkü bunlar genellikle pertürbe parametresi ε küçüldükçe salınımlı çözümler üretir. Bu sorunu ortadan kaldırmak için uygun ve sağlam sayısal yöntemlerin seçilmesi gerekmektedir. Bu nedenle bu çalışmada diferansiyel dönüşüm yöntemi tercih edilmiştir. Öncelikle nümerik çözümü araştırılan denklem, diferansiyel dönüşüm teoremleri yardımı ile cebirsel bir denkleme dönüştürülür. Nümerik sonuçların ne kadar doğru ve hızlı elde edildiğini göstermek için örnek uygulaması yapılır. Uygun bir matematik programı kullanılarak elde edilen nümerik sonuçlar tablolar ve grafikler ile gösterilir.

Şimdi, singüler pertürbe gecikme terimli lineer birinci mertebeden Volterra integro-diferansiyel denklemin başlangıç değer problemi ele alınır [5]

$$\varepsilon u'(t) + b(t)u(t) - \int_{t-r}^t K(t,s)u(s)ds = g(t) \quad t \in (0,H], \quad (1)$$

$$u(t) = \phi(t), \quad t \in [-r,0], \quad r, \text{ sabit gecikme terimi} \quad (2)$$

burada $b(t) \geq 0$, $g(t)$, $\phi(t)$ ve $K(t,s)$ sürekli fonksiyonlardır.

2. YAKLAŞIK YÖNTEM (DTM)

Diferansiyel Dönüşüm Yöntemi (DTM), ilk olarak Zhou'nun elektrik devresi analizi [1] çalışmasıyla tanıtılan Taylor serisi açılımına dayalı bir yöntemdir. Son yıllarda, bu tekniği lineer olmayan diferansiyel denklemler, fark denklemleri, kesirli diferansiyel denklemler, gecikmeli diferansiyel denklemler, Volterra integral denklemi, Fredholm integral denklemi ve mühendislik problemleri gibi çeşitli denklem türlerine genişletmek için çok sayıda çalışma yapılmıştır [3,4,7,8,9,10].

Şimdi diferansiyel dönüşüm yöntemini aşağıdaki gibi tanımlayalım: Diferansiyel dönüşüm fonksiyonu $y(t)$ ile tanımlanır [2],

$$Y(k) = \frac{1}{k!} \left[\frac{d^k y(t)}{dt^k} \right]_{t=0}, \quad (3)$$

burada $y(t)$ orijinal fonksiyon ve $Y(k)$ ise onun diferansiyel dönüşüm fonksiyonudur.

$Y(k)$ ters diferansiyel dönüşüm fonksiyonu ise

$$y(t) = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{t^k}{k!} \left[\frac{d^k y(t)}{dt^k} \right]_{t=0}. \quad (4)$$

olarak tanımlıdır.

(3) ve (4) eşitliklerinden aşağıda verilen diferansiyel dönüşüm yöntemi serisi elde edilir:

$$y(t) = \sum_{k=0}^{\infty} Y(k) t^k = Y(0) + Y(1)t + Y(2)t^2 + Y(3)t^3 + \dots, \quad (5)$$

Şimdi diferansiyel dönüşüm yöntemi tanımından yararlanarak bulunan aşağıdaki teoremler verilir. Bu teoremler herhangi bir diferansiyel denklemin her bir terimine karşılık gelebilecek yeni terimlerdir. Böylece yeni denklem olarak cebirsel bir denklem elde edilir.

Teorem 1. Eğer $y(t) = \frac{dy(t)}{dt}$ ise $Y(k) = \frac{(k+1)!}{k!} Y(k+1) = (k+1)Y(k+1)$.

Teorem 2. Eğer $y(t) = t^a$ ise $Y(k) = \delta(k-a) = \begin{cases} k = a, & 1 \\ k \neq a, & 0 \end{cases}$, burada a sabittir.

Teorem 3. Eğer $y(t) = \alpha y(t)$ ise $Y(k) = \alpha Y(k)$, burada α sabittir.

Teorem 4. Eğer $y(t) = e^{\lambda t}$ ise $Y(k) = \frac{\lambda^k}{k!}$, burada λ sabittir.

Teorem 5. Eğer $y(t) = \int_{t_0}^t g(s) ds$ ise $Y(k) = \frac{G(k-1)}{k}$, $k \geq 1$.

Teorem 6. Eğer $y(t) = \int_{t_0}^t g(s+a) ds$ ise $Y(k) = \frac{1}{k} \sum_{h=k-1}^{\infty} \binom{h}{k-1} a^{h-k+1} G(h)$,

$k \geq 1$.

Teorem 7. Eğer $y(t) = \int_0^1 g(s+a) ds$ ise

$$Y(k) = \sum_{\kappa=1}^N \frac{1}{k} \sum_{h=k-1}^N \binom{h}{k-1} a^{h-k+1} G(h), \quad k \geq 1.$$

3. YAKLAŞIK YÖNTEMİN (DTM) UYGULAMASI

Bu bölümde nümerik çözüm sürecinin avantajlarını ve etkinliğini göstermek için bir örnek sunulur. Algoritma, şekiller ve tablolar uygun bir matematik programı ile oluşturulur.

Örnek 1. Önce gecikme terimi ve başlangıç koşulu ile birinci mertebeden lineer Volterra integro-diferansiyel denklemini ele alalım [5]

$$\varepsilon u'(t) + 2u(t) - \int_{t-1}^t u(s) ds = -\frac{\varepsilon}{2} \left(e^{\frac{2}{\varepsilon}} - 1 \right), \quad t \in (0,2],$$
$$u(t) = 1, \quad -1 \leq t \leq 0,$$
(6)

[6] probleminin $N = 2$ için çözüm akışı aşağıdaki gibidir:
Bu problemin kesin çözümü

$$u(t) = e^{\frac{-2t}{\varepsilon}}$$
(7)

şeklindedir.

İlk adım olarak, (6) problemine diferansiyel dönüşüm yöntemi uygulanır

$$\begin{aligned} \varepsilon y'(t) &\rightarrow (k+1)Y(k+1), \\ 2y(t) &\rightarrow 2Y(k), \\ -\frac{\varepsilon}{2} \left(e^{\frac{2}{\varepsilon}} - 1 \right) e^{\frac{-2x}{\varepsilon}} &\rightarrow -\frac{\varepsilon}{2} \left(e^{\frac{2}{\varepsilon}} - 1 \right) \frac{\left(\frac{-2}{\varepsilon} \right)^k}{k!}, \\ \int_0^t u(s-1) ds &\rightarrow \frac{1}{k} \sum_{h=k-1}^{\infty} \binom{h}{k-1} (-1)^{h-k+1} Y(h), \\ \int_0^1 u(s-1) ds &\rightarrow \sum_{k=1}^N (1-0)^k \frac{1}{k} \sum_{h=k-1}^N \binom{h}{k-1} (-1)^{h-k+1} Y(h), \\ \int_0^t u(s) ds &\rightarrow \frac{Y(k-1)}{k}. \end{aligned}$$

elde edilir.

İkinci olarak da yukarıda bulunan diferansiyel dönüşümler (6) problemine ait denkleme yazılır ve tekrar bağıntısı elde edilir.

$$Y(k+1) = \frac{1}{\varepsilon(k+1)} \left(\begin{aligned} & -2Y(k) + \frac{Y(k-1)}{k} - \frac{1}{k} \sum_{h=k-1}^{\infty} \binom{h}{k-1} (-1)^{h-k+1} Y(h) \\ & + \delta(k) \sum_{k=1}^N (1-0)^k \frac{1}{k} \sum_{h=k-1}^N \binom{h}{k-1} (-1)^{h-k+1} Y(h) - \frac{\varepsilon}{2} \left(e^{\frac{2}{\varepsilon}} - 1 \right) \frac{\left(\frac{-2}{\varepsilon} \right)^k}{k!} \end{aligned} \right),$$

Üçüncü olarak ise verilen başlangıç koşulları ve yukarıdaki tekrar bağıntısıyla,

$$Y(0) = 1,$$

başlangıç koşuluna karşılık gelen diferansiyel dönüşüm fonksiyonu bulunur. Elde edilen tüm diferansiyel dönüşüm fonksiyonları (5) serisinde yazılır.

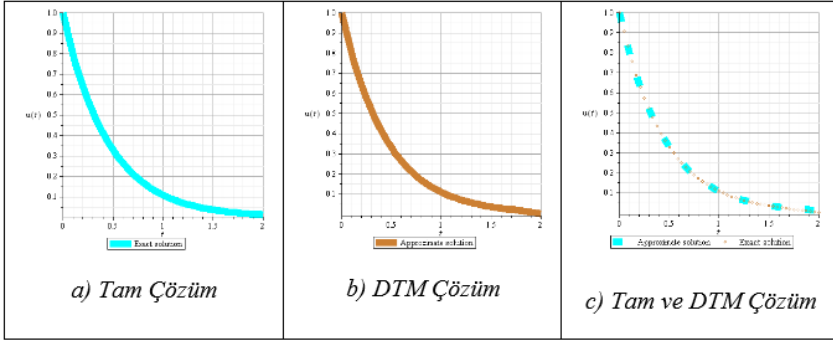
Son olarak, yukarıdaki bağıntıları kullanarak tekrar bağıntısında 14 iterasyon yaparak (6) probleminin $\varepsilon = 0.9$ için yaklaşık seri çözümüne aşağıdaki gibi ulaşılır:

$$\begin{aligned} \varepsilon = 0.9, y_{DTM} = & 1 - 2.222222222 * x + 2.469135802 * \\ & x^2 - 1.828989483 * x^3 + 1.016105268 * x^4 - .4516023412 * x^5 + \\ & .1672601263 * x^6 - 0.5309845279e - 1 * x^7 + 0.1474957021e - 1 * \\ & x^8 - 0.3641869188e - 2 * x^9 + 0.8093042639e - 3 * x^{10} - \\ & 0.1634958109e - 3 * x^{11} + 0.3027700202e - 4 * x^{12} - \\ & 0.5175555900e - 5 * x^{13} - 3.661151944 * 10^{(-15)} * x^{23} + \\ & 8.215168093 * 10^{(-7)} * x^{14}, \end{aligned}$$

(8)

Tablo 1. $\varepsilon = 0.9$ seçimi ile DTM ve Tam çözümler ile Hata değerlerinin karşılaştırılması.

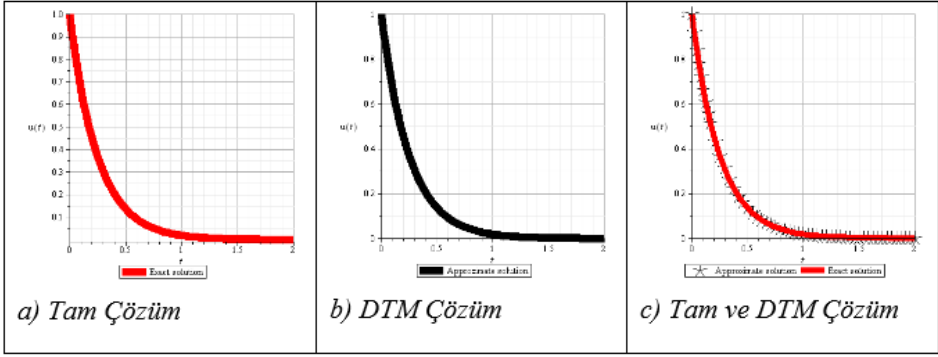
t	DTM Çözümü	Tam Çözüm	Hata
0.0	1.000000000000	1.000000000000	0.000000000000
0.4	0.411111229060	0.411111229050	1.10^{-10}
0.8	0.16901331850	0.16901331540	3.1×10^{-9}
1.2	0.06948505616	0.06948345127	0.00000160489
1.6	0.02868007280	0.02856550077	0.00011457203
2.0	0.01485563956	0.01174362846	0.00311201110



Şekil 1. a), b) ve c) $\varepsilon = 0.9$ için $[0,2]$ aralığında çözümler.

$\varepsilon=0.5$ seçildiğinde ise ancak 26 iterasyon yapılarak aşağıdaki yaklaşık çözüm elde edilir:

$$\begin{aligned}
 \varepsilon = 0.5, y_{DTM} = & 1 + 8.000000000 * x^2 - 10.666666667 * \\
 & x^3 + 10.666666667 * x^4 - 8.533333336 * x^5 + 5.688888890 * x^6 - \\
 & 3.250793651 * x^7 + 1.625396825 * x^8 - .7223985889 * x^9 + \\
 & .2889594356 * x^{10} - .1050761584 * x^{11} + 0.3502538613e - 1 * \\
 & x^{12} - 0.1077704188e - 1 * x^{13} + 0.3079154823e - 2 * x^{14} - \\
 & 0.8211079527e - 3 * x^{15} + 0.2052769882e - 3 * x^{16} - \\
 & 0.4830046781e - 4 * x^{17} + 0.1073343729e - 4 * x^{18} - \\
 & 0.2259671008e - 5 * x^{19} - 4.000000000 * x + 4.519342016 * \\
 & 10^{(-7)} * x^{20} - 8.608270505 * 10^{(-8)} * x^{21} + 1.565140092 * \\
 & 10^{(-8)} * x^{22} - 2.721982769 * 10^{(-9)} * x^{23} + 4.536637950 * \\
 & 10^{(-10)} * x^{24} - 7.258620720 * 10^{(-11)} * x^{25}. \quad (9)
 \end{aligned}$$



Şekil 2. a), b) ve c) $\varepsilon = 0.5$ için $[0,2]$ aralığında çözüm.

Tablo 2. $\varepsilon = 0.5$ seçimi ile DTM ve Tam çözümler ile Hata değerlerinin karşılaştırılması.

T	DTM Çözüm	Tam Çözüm	Hata
0.0	1.000000000000	1.000000000000	0.00000000
0.4	0.201896517900	0.2018965180000	$1.34456712 \times 10^{-10}$
0.8	0.040762202320	0.0407622039800	2.2148×10^{-9}
1.2	0.0082297298460	0.0082297470490	1.503×10^{-9}
1.6	0.0016597225700	0.0016615572730	0.000001835
2.0	0.000241521124	0.0003354626279	0.000576970000

Örnek 1'in hesaplama sonuçları, t 'nin farklı değerleri için $\varepsilon = 0.9$ ve $\varepsilon = 0.5$ ile Tablo 1 ve 2'de sunulmuştur. Tam çözüm grafiği, DTM çözümü ve bunların karşılaştırması, Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir.

SONUÇ

Çalışmada, problemin yaklaşık çözümü diferansiyel dönüşüm yöntemi kullanılarak elde edildikten sonra tam çözümü ile karşılaştırılmıştır. Teorik değerlendirme anlatılmış ve yöntemin geçerliliğini göstermek için bir örnek çözülmüştür. Önerilen bu yöntem, çözümün sadece 13 ve 26 iterasyon ile seri halinde istenilen doğru sonuçlarını vermiş ve bilinen yöntemlere göre daha hızlı ve basit performans göstermiştir. Literatüre bakılırsa DTM birçok denkleme rahatlıkla uygulanabilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Zhou, J.K. (1986) *Differential Transformation and Its Application for Electrical Circuits*, Huazhong University Press, Wuhan, China.
2. Ayaz, F. (2004) Applications of differential transform method to differential algebraic equations, *Applied Mathematics and Computation*, (152): 649-657.
3. Arikoglu, A. and Ozkol, I. (2005) Solution of boundary value problems for integro-differential equations by using differential transform method. *Applied Mathematics and Computation*, 168, 1145-1158.
4. Yavuz, M.T., Özkol, I. (2021) Solutions of Integro-Differential Difference Equations via Differential Transform Method, *Çankaya University Journal of Science and Engineering*, 18(1): 033-046.
5. Amiraliev, G.M., Yapman, Ö., Kudu, M. (2019) A fitted approximate method for a Volterra delay-integro-differential equation with initial layer, *Hacet. J. Math. Stat. Volume 48 (5)*, 1417 – 1429.
6. Nayfeh, A.H. (1993) *Introduction to Perturbation Techniques*, Wiley, New York.
7. Çakır, M., Arslan, D. (2015). The Adomian Decomposition Method and the Differential Transform Method for Numerical Solution of Multi-Pantograph Delay Differential Equations. *Applied Mathematics*, 6(08), 1332-1343.
8. Arslan, D. (2019). A novel hybrid method for singularly perturbed delay differential equations. *Gazi University Journal of Science*, 32(1), 217-223.
9. Altun, Y. (2021). Stability of certain neutral type differential equation and numerical experiment via differential transform method. *International Journal of Maps in Mathematics*, 4(2), 82-92.
10. Tabatabaei, K., Çelik, E., Tabatabaei, R. (2012). The differential transform method for solving heat-like and wave-like equations with variable coefficients *Turkish Journal of Physics*, 36(1), 87-98.

5. Bölüm

Aktinobakteri İzolasyonunda Kullanılan Yöntemler

Eda TÜRK¹

Fadime ÖZDEMİR KOÇAK²

1 Doç. Dr., Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi

2 Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik Bölümü, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi

Aktinobakteri üyeleri toprak, rizosfer, deniz göl, nehir sedimenti, bitki dokuları ve insan gibi farklı ortamlarda yaşayabilen ve birçok doğal bileşiğin üreticisi olan Gram + mikroorganizmalardır. Özellikle bu grup antibiyotik gibi doğal ilaçların, biyoaktif metabolitlerin ve enzimlerin üreticisi olmasından dolayı bilim insanlarının ilgisini çekmiş ve çekmeye devam etmektedir. Mikroorganizma kaynaklı 22,000'den fazla biyoaktif sekonder metabolitler (antibiyotikler dahil) tanımlanmış ve bu metabolitlerin yapıları literatürde belirtilmiştir. Tanımlanan bu bileşiklerin neredeyse yarısının Aktinobakteriler tarafından üretildiği görülmektedir. Günümüzde, tarımsal ve medikal alanda kullanılan antibiyotiklerin %70'inin Aktinobakteri kaynaklı olduğu bilinmektedir. Aktinobakteri kaynaklı yeni sekonder metabolit elde etme amacıyla yapılan çalışmalar yetersiz kalmaktadır. Doğal ortamlardan yapılan tarama çalışmaları sonucunda çok sayıda tanımlanan ve sekonder metabolit açısından taranan mikroorganizma olmasına rağmen, taraması yapılamayan mikroorganizmaların oranı neredeyse %90'lardadır ve bu organizmalar kültüre edilmemiştir. Bu kültüre edilmeyen mikroorganizmalar yeni ilaçların keşfinde ve tedavi süreçlerinde yeni umutlar sunabileceği düşünülmektedir.

Mikroorganizmalardan sekonder metabolit taramasında kullanılan genel yaklaşımlar yanında genomik temelli yaklaşımlar da kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle kültüre edilmesi zor veya kültüre edilemeyen gruplardan olası sekonder metabolitlerinin varlığını belirlemede, sekonder metabolit sentezleyebilen yeni gen kümelerinin taraması yapılmaktadır. Ayrıca yeni türlerin belirlenmesi olası yeni metabolit keşfine de olanak sağlayacağı düşünülmektedir. Özellikle ekstrem habitatlar, izolasyon amacıyla kullanılmamış ortamlardan elde edilecek yeni Aktinobakterilerin yeni metabolit kaynağı olabileceği öngörülmekte ve bununla ilgili yapılmış çalışmalar da bunu kanıtlamaktadır (Back ve ark., 2021; Dhakal ve ark., 2017). Başka bir deyişle, yeni mikroorganizmalar yeni sekonder metabolitler sentezleyebilen yeni gen kümeleri içermelidir. Dirençli mikroplara karşı güvenli ve etkili yeni antibiyotiklerin belirlenmesi amacıyla bitkiler, hayvan dışkıları ve likenler gibi farklı çevrelerden ve özellikle okyanus gibi ekstrem ortamlardan elde edilen Aktinobakteriler üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (Qin ve ark., 2019)

Aktinobakterilerin izolasyonu için çok farklı yöntem ve teknikler kullanılabilir. Bu çalışma ile farklı ortamlardan alınan örneklerden Aktinobakteri izolasyonunda kullanılan yöntemlerin verilmesi hedeflenmiştir.

Aktinobakterilerin doğal ortamlarındaki dağılımı:

Aktinobakteri'ler yaygın olarak toprakta bulunmalarına rağmen deniz, göl ve akarsu gibi akuatik ortamlarda, çöl, sıcak su kaynakları, kraterler ve derin deniz

dipleri gibi ekstrem koşullarda ve bitki, hayvan ve insan simbiyotiği olarak da bulunabildikleri bilinmektedir (Qin ve ark., 2019). Ozdemir Kocak ve ark.'larının yaptığı aktinobakteri izolasyon çalışmasında 17 toprak örneği farklı habitatlardan toplanmış ve konvensiyonel ve sükröz gradient metodu kullanılmıştır. Yapılan izolasyon çalışmasında 6 subordoya (Streptomycineae (*Streptomyces* 2 suş), Micromonosporineae (*Micromonospora* 3 suş), Micrococcineae (*Microbacterium* 1 suş), Streptosporangineae (*Actinomadura* 2 suş), Propionibacterineae (*Kribbella* 1 suş), Corynebacterineae (*Gordonia* 2 suş) ve (*Nocardia* 5 suş) ait olduğu belirlenen Aktinobakteriler 16S rRNA analizleri ile tanımlanmıştır (Ozdemir Kocak ve ark., 2014). Yapılan başka bir çalışmada Baltık Denizinden toplanan çok sayıdaki numune kullanılarak kültür edilebilen Aktinobakterilerin bu ortamlardaki çeşitliliği belirlenmiştir (Jiang ve ark., 2011). Farklı orman habitatlarından yapılan izolasyon çalışmalarında; Xishuangbanna'daki tropikal yağmur ormanlarından toplanan toprak örneklerinde 29 Aktinobakteri cinsi, Grand Shangri-La'daki balta girmemiş ormanlarından 19 Aktinobakteri cinsi ve Sichuan'da sekonder gelişim gösteren ormandan 13 Aktinobakteri cinsi izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Balta girmemiş orman topraklarındaki Aktinobakteri çeşitliliği sekonder gelişim gösteren ormana göre daha kompleks olduğu görülmüştür (Cao ve ark., 2009; Cao ve ark., 2010; Jiang ve ark., 2013).

Xishuangbanna'da yağmur ormanlarında bulunan tıbbi bitkilerden test örnekleri toplanmış ve saf kültürde 32 cins Aktinobakteri tanımlanmıştır. Benzer şekilde sadece 3 özel likenden 28 cins Aktinobakteri tanımlandığı da rapor edilmiştir (Qin ve ark., 2009).

Altı farklı kuş türünden alınan dışkı örneklerinden 28 Aktinobakteri cinsi tanımlanmıştır. (Chen ve ark., 2014). Bu çalışmada otuz farklı sekonder metabolit karakterize edilmiştir.

Ekstrem asitli, alkali, tuzlu, radyoaktif, sıcak (kaplıcalar), soğuk (kutup bölgesi ve karlı dağlar) ekstrem ortamlar kullanılarak yapılan çalışmalarda bu ortamlarda yaşayan benzersiz birçok mikroorganizma belirlendiği bildirilmiştir (Jiang ve ark., 2016).

Aktinobakterilerin izolasyonundaki temel prensipler

Genel olarak aktinobakterilerin izolasyonunda kullanılan üç farklı yaklaşım bulunmaktadır. İlk olarak, belirlenen bir ortamlardaki aktinobakteri topluluğunun çalışılmasıdır. Saf kültür olarak elde edilen aktinobakterilerin tamamının izole edilmesini ve tanımlanması içeren bir yaklaşımdır. Bu yaklaşımda hedefe ulaşmak için, kullanılan izolasyon ortamı aktinobakterilerin büyümesi için uygun olmalı ve diğer mikroorganizmaların gelişimini inhibe edici ajanlar içermelidir.

Total aktinobakterilerin izolasyonunu sağlayabilmek için en az farklı bileşenlere sahip üç ila beş ortam birlikte kullanılması önerilmektedir. Bu ortamların içeriğinde de Gram negatif bakteriler ve mantarlara karşı yeterli düzeyde inhibitörlerin eklenmesi çalışmanın daha sağlıklı olmasını sağlayacaktır.

İkinci yaklaşımda ise spesifik izolasyon yöntemi kullanılarak antibiyotiklere, kimyasallara, asitli, alkali, tuzlu, yüksek ve düşük sıcaklıklara dahil dirençli ve özel fizyolojik karakterdeki bazı çeşitli aktinobakterilerin ya da bu sınıfa ait bilinen tür veya cinslerin izolasyonunun yapılmasıdır. İzolasyon ortamı, hedeflenen aktinobakterilerin büyüme gereksinimlerini karşılamalı ve aynı zamanda istenmeyen mikroorganizmaların büyümesini inhibe etmelidir. Örneğin; halofitik aktinobakterilerin izolasyon ortamları için tuz konsantrasyonu %15 ila %25 olmalı ve termofilik aktinobakterilerin izolasyonu için ortam sıcaklığının 45-60 °C olması gerekmektedir.

Üçüncü yaklaşımda ise bilinmeyen Aktinobakterilerin izolasyonudur. Şimdiye kadar, tüm dünyada çeşitli habitatlardan sayısız aktinobakteri izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Bu nedenle en zoru ve en önemlisi bilinmeyen aktinobakterilerin izolasyonudur. Sadece Gram negatif bakteri ve mantarların değil, bazı Gram pozitif bakterilerle birlikte yaygın bulunan aktinobakterilerin büyümesinin de sınırlanması gerekir.

Aktinobakterileri izolasyonu yapan araştırmacıların, aktinobakterilerin ve diğer mikropların fizyolojisi ve taksonomileri ile her bir izolasyon faktörünün rolü (ortamın bileşenleri ve konsantrasyon, pH, inhibitör, kültür sıcaklığı vb.) hakkındaki tüm bilgilere aşina olmalı ve zengin deneyime sahip olmalıdır.

Test örneklerinin toplanması ve ön işlemleri

Farklı kaynaklardan toplanan test örnekleri

Aktinobakteriler toprak, okyanus, göl, bitki ve hayvan dahil çeşitli doğal habitatlarda saprofit olarak bulunur. Toprakta ve diğer substratlarda bulunan Aktinobakterilerin sayısı ve çeşitliliği, besin, hava, pH, sıcaklık, tuzluluk, nem gibi birincil ekolojik faktörlerden etkilenir. Toprak örnekleri 5 ila 20 cm arasındaki derinlikten toplanır ve steril plastik torbaya veya steril bir taşıma kabına konularak laboratuvara getirilir.

Aktinobakterilerin sucul ortamlarda yaygın olarak bulunduğu ve çok sayıda sekonder metabolit ürettiği belirlenmiştir. Sediment örnekleri, örnekleyici ile toplanır ve örnekler 4°C'de saklanmak için steril cam şişelere konulur.

Farklı bitkilerle endofitik olarak yaşayabilen aktinobakteriler antimikrobiyal ve antitümör ajanları olarak umut vericidir. Farklı bitki dokularından toplanan canlı örnekler hemen steril kaplara konulmalıdır. Canlı örnekler mümkün olan en kısa sürede Aktinobakteri izolasyonu için kullanılmalıdır.

İnsan ve hayvan feçesinde de bol miktarda bulunan aktinobakterilerin izolasyonunda dışkı örnekleri steril kaplara konulmalı, 4°C’de saklanmalı ve en kısa sürede Aktinobakteri izolasyonu için kullanılmalıdır. Mohamed ve ark. insan mikrobiyomundaki biyosentetik gen kümesini analiz edip yeni biyoaktif madde olan laktosilini keşfetmiş ve insan mikrobiyomunun devasa bir moleküler ilaç evi olduğunu belirtmiştir (Mohamed ve ark., 2014). Hayvan dışkıdaki keşfedilen Aktinobakterilerin yeni ilaçların kaynağı olabilme potansiyeline sahip olmasından dolayı önemli ve cezbedicidir.

Test numunelerinin ön işlemleri

Mantarlar ve diğer bakterilerden daha yavaş büyüme gösteren Aktinobakterilerin seçici izolasyonunda ön işlem çok önemlidir. Genel olarak ön işlem, istenmeyen mikroorganizmaları elemine ya da inhibe ederek hedef aktinobakterileri seçmekte fayda sağlamaktadır. Aktinobakterilerin izolasyonunda farklı fiziksel ve kimyasal ön işlemler kullanılmaktadır. Aktinobakteri sporları, çoğu bakteriden daha dirençli ve dayanıklıdır. Toprak, sediment, liken ve dışkı örneklerini oda sıcaklığında sadece hava ile kurutmak izolasyon plaklarında istenmeyen çoğu Gram negatif bakterileri elemine etmek için yeterli olacaktır. Hava ile kurutulmuş toprak ya da toprak süspansiyonları, özel aktinobakteriyel taksonların izolasyonundan önce ısıtılarak tutularak kullanılabilir. Jiang ve ark.’nın yapmış olduğu derlemede farklı ön ısıtma işlemleri sonucunda farklı Aktinobakteri gruplarının izole edilebildiğini belirtmişlerdir. Örneğin; Hava ile kurutulmuş ve 120°C’de 1 saat ısıtılmış topraktan yapılan izolasyon çalışmasında *Microbispora* ve *Streptosporangium* elde edilirken hava ile kurutulmuş ve 100°C’de 15 dakika ısıtılmış topraktan yapılan izolasyon çalışmasında ise *Actinomadura* sp. izolatlarının eldesinin sağlandığı gösterilmiştir (Jiang ve ark., 2016). Farklı ön ısıtma işlem uygulaması özellikle nadir aktinobakteri gruplarının eldesi için önerilebilir.

Isıl işlem dışında farklı yöntemlerde uygulanabilmektedir. Örneğin toprak süspansiyonlarının, 40 dk boyunca 180 W ultrasonik dalgalarla muamele edilmesidir. Bu işlem ile toprak granülleri içinde bulunan saprofitler süspansiyona bırakılırken örnekteki Aktinobakteri sayısında arttığı gözlemlenmiştir (Jiang ve ark., 2010).

Aktinobakteri izolasyonunda en önemli faktörlerden biride farklı bakteri ve fungus gruplarını inhibe edici ajanların kullanılmasıdır. Özellikle benzetoniyum klorid, klorheksidin glukonat, fenol, SDS ve çeşitli antibiyotikler gibi kimyasallar özel aktinobakteri taksonlarının izolasyonunda kullanılmaktadır. Antibiyotik dışındaki kimyasal ajanlarla izolasyon örneklerinin 30 dakika 30°C muamele edilmesi; aerobik, endospor oluşturan basiller ve Gram negatif hücrelerin ortadan

kalkmasını sağlarken aktinobakterilerin yoğunluğunu arttırmaktadır. Antibiyotikler ise besiyeri ortamlarına ilave edilerek Gram negatif, bazı Gram pozitif bakteriler ile fungusların inhibisyonunu sağlamaktadır.

Spesifik ortamın oluşturulması

İhtiyaç duyulan seçici izolasyon ortamının oluşturulması için; ortam bileşenleri, hedeflenen aktinobakteriyel takson ve inhibitörler gibi her bir faktörün değerlendirilmesi ve ona gore seçilmesi gerekmektedir. Seçici izolasyonun bileşeni (karbon ve nitrojen kaynakları), taksonomik ve fenotipik veri tabanlarından alınan bilgiler kullanılarak formüle edilebilir. Uygun inhibitörler, hedef aktinobakteriyel sporların antibiyotik ve kimyasallara dayanabilme yeteneklerine gore seçilmesi uygun olacaktır.

Farklı ortamlardaki Aktinobakterilerin izolasyon yöntemleri

Karasal ortamlardan izolasyon

Toprak, aktinobakterilerin en baskın olarak bulunduğu habitat olması nedeniyle birçok izolasyon çalışması bu ortamdan gerçekleştirilmiştir. İzolasyon çalışmalarında geleneksel bir yöntem olan dilüsyon plaka tekniği sıklıkla kullanılmaktadır. Karakum ölü'nden toplanan örneklerden yapılan bir çalışmada (Saygın, 2019) dilüsyon plaka yöntemi kullanılarak aktinobakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Toplanan toprak örnekleri önce 2 hafta süreyle oda sıcaklığında kurutulmuş ardından dilüsyon plaka yöntemi uygulanmıştır ve 28 °C'de 28 gün süreyle inkübe edilmiştir. Çok sayıda aktinobakteri izolasyonu yapılmış ve yeni türlerde literatüre kazandırılmıştır (Saygın, 2019)

Başka bir çalışmada ise Victoria Vadisi'nden toplanan toprak örneklerinden (Rego ve ark., 2019) aktinobakteri izole etmek için seri seyreltme yöntemi kullanılmıştır. Dilüsyon çözeltileri, antibiyotik ilaveli 16 farklı besiyerine inoküle edilmiş ve 28°C'de 28 gün süreyle inkübe edilmiştir. Bu çalışmada kültüre bağlı ve kültüre bağlı olmayan metotlarla mikroevredeki biyoçeşitliliğin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Özdemir Koçak ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, aygören Barajı gölü kıyısından toplanan toprak örneklerine seri dilüsyon yöntemi uygulanmıştır. Seyreltilen toprak örnekleri sikloheksimid (50 µg ml⁻¹), nalidiksik asit (10 µg ml⁻¹) ve rifampisin (0,5 µg ml⁻¹) içeren tripton-maya özütü-glikoz agar (TYG) üzerine inoküle edilmiştir (Özdemir Koçak ve ark., 2017). Çalışmada çok sayıda Aktinobakteri elde edilmiş ve bu izolatlardan biri ise yeni bir tür olarak literatüre kazandırılmıştır.

Bir başka çalışmada ise Mangrov Ormanı'ndan toplanan toprak numunelerinden aktinobakteri izolasyonudur (Lee ve ark., 2014). Toprak

örnekleri 1 hafta süreyle oda sıcaklığında kurutulmuş ve bir ön işleme tabii tutulmuştur. Ardından dilüsyon yöntemi kullanılmış ve dilüsyonları 3 farklı besiyeri ortamınlarına inoküle edilmiştir. Tüm besiyerlerine antibiyotik (sikloheksimid (50 mg/L), nistatin (50 mg/L) ve nalidiksik asit (20 mg/L)) ilave edilmiştir. 1 ila 4 hafta süreyle 28 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İzolatların antimikrobiyal etkinlikleri test edilmiş ve test edilen izolatların %10’nun antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Lee ve ark., 2014).

Çin’de bulunan Taklamakan Çölü’nün farklı yerlerinden toprak numuları toplanmış ve örnekler seri dilüsyon yöntemi uygulanmıştır. Farklı besiyerleri kullanılmış ve bu besiyerlerinin hepsine 20,50 ve 50 mg/L olacak şekilde nalidiksik asit, sikloheksimit ve potasyum dikromat ilave edilmiştir. 2 ila 12 hafta boyunca 30 °C’de inkübasyonun ardından farklı morfolojide olan koloniler seçilmiştir (Liu ve ark., 2021). Yapılan bu çalışmada antimikrobiyal aktivite taraması ve sonrasında da biyoaktif metabolit eldesi gerçekleştirilmiştir.

Rehan ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada tarım toprağından toplanan örneklerden seri dilüsyon yöntemi ile aktinobakteri suşları izole edilmiştir. Ardından besiyeri olarak potato dextrose agar (PDA) ortamı kullanılmıştır. 28 °C’de 1 hafta süreyle inkübe edilmiştir (Rehan ve ark., 2021). Bu çalışmadan elde edilen izolatlar ise bitki gelişim aktivitesini artırıcı özellikleri ve biyokontrol özellikleri açısından incelenmiştir (Rehan ve ark., 2021).

Ankara ilinin farklı bölgelerinden alınan topraklardan yapılan izolasyonda, seri dilüsyon tekniğı kullanılmıştır. Ardından azotsuz Burk’s Agar ve nutrient agar ortamına çizgi ekimi ile inoküle edilmiştir. 28±2 °C ‘de 72 saat süreyle inkübe edilip morfolojik analizler yapılmıştır (Özdoğan, 2020). Bu çalışmada bitki büyümesini teşvik edici bakterilerin izolasyonu amaçlanmıştır.

Toprak kadar aktinobakterilerin yaygın olarak bulunduğu bir diğer ortam rizosferdir. Özellikle bitki ile mutualistik ilişkileri olan aktinobakterilerin yoğun olarak bu ortamda bulunduğu bilinmektedir. Son dönemde yapılan çalışmalarda *Frankia* dışında *Micromonospora* cins üyelerinde nodül içinde bulunduğu belirlenmiştir (Trujillo ve ark., 2015). Ayrıca pek çok aktinobakteri grup üyesinin bitki gelişim özelliklerine sahip olduğu ve birçok bitkide büyümeyi teşvik ettiği de çalışılmıştır (Özdemir Koçak, 2019). Rizosferden yapılan izolasyon çalışmalarında da dilüsyon plaka tekniğı sıklıkla kullanılmaktadır. Özdemir Koçak’ın yapmış olduğu bir çalışmada *Humulus lupulus* (Şerbetçiotu) rizosfer toprağından *Streptomyces* izolasyonu için dilüsyon plaka tekniğı kullanılmıştır. Elde edilen izolatlar için kullanılan besiyerleri; hümik asit vitamin agar (HVA), tripton maya glikoz özü agar (TYGA), glukoz mayası malt özü agar (GYMA) ve triptik soya agar (TSA) gibi seçici ortamlardır. Her bir ortama sikloheksimid (50

$\mu\text{g mL}^{-1}$), rifampisin ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) ve nalidiksik asit ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) eklenmiştir. 30°C ve 45°C 'de 10 ile 14 gün süreyle inkübe edilmiştir (Özdemir Koçak, 2019). Elde edilen izolatlar bitki gelişimini teşvik edici özellikleri açısından taranmış ve iki *Streptomyces* suşu domates bitkisinde denenmiştir. Bitki denemelerinde suşların büyümeye katkı sağladığı belirlenmiştir.

Yapılan başak bir çalışmada pH'ın 4.5 olduğu rizosfer toprağından alınan örnekler oda sıcaklığında kurutulduktan sonra dilüsyon plaka tekniğı kullanılmıştır (Poomthongdee ve ark., 2015). Dilüsyon çözeltileri; sırasıyla $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlarda nalidiksik asit, nistain ve ketokonazol ilaveli asitleştirilmiş strach casein agar (SCA) ve asitleştirilmiş gauze no.1, pH 5.5, inoküle edilmiştir. 28 gün süreyle 28°C 'de inkübe edilmiştir. Elde edilen asidofilik aktinobakterilerin bitki için faydalı olabilecek özellikleri bu çalışma ile belirlenmiştir.

Farklı rizosfer toprağından alınan örneklerden, dilüsyon plaka yöntemi ve sükröz gradient santrifügasyon prosedürü (Yamamura ve ark., 2003) uygulanarak aktinomiset izolasyonu yapılmıştır. Nalidixic asit (10 mg/L), sikloheksimit (50 mg L^{-1}) ve klortetrasiklin (10 mg/L) seçici ajanlarının eklendiğı humic asit vitamin agar (HVA) izolasyon ortamı olarak kullanılmıştır. Plakalar 2 ila 3 hafta süreyle 30°C 'de inkübasyona bırakılmış, ardından mikroskop ile aktinobakterilerin morfolojisi gözlemlenmiş ve saflaştırılmıştır (Yamamura ve ark., 2003). Bu çalışmada nadir Aktinobakterilerin eldesinde yeni bir izolasyon metodu geliştirilmiş ve farklı agar kullanımların izolasyon başarısına etkileri değerlendirilmiştir.

Aktinobakterilerin biyoteknolojik kullanımları oldukça önemlidir ve ekstrem ortamlardan elde edilen aktinobakterilerden yeni sekonder metabolit eldesinin daha yüksek olduğu birçok çalışmada vurgulanmıştır (Xie ve Pathom-aree, 2021). Özellikle ekstrem ortam olan çöl gibi habitatlardan aktinobakteri izolasyonunda dilüsyon plaka tekniğinin düşük sayıda koloni eldesi nedeniyle yetersiz kaldığı ve farklı bir yöntem olarak serpme yönteminin daha etkin olduğu Xie ve Pathom-aree'nın yaptığı çalışmada gösterilmiştir. Çalışma sonucunda serpme tekniğı ile izolasyonda seri seyreltme yöntemiyle elde edilen koloni sayısından yaklaşık 10 - 20 kat kadar fazla elde edildiğı belirtilmiştir (Xie ve Pathom-aree, 2021).

Su ortamlarından izolasyon

Aktinobakteriler farklı sucul ortamlarda yaşayabilme özelliklerine sahiptirler. *Marinactinospira*, *Pseudonocardia*, *Marinispota*, *Micromonospora*, *Salinospora* gibi bazı cinslerin ağırlıklı olarak sucul ortamlardan izole edildiğı ve bu izolatlardan da önemli biyoaktif bileşiklerin elde edildiğı bilinmektedir (Dhokal ve ark., 2017). Sucul ortamlar denizel, göl, nehir ve içme suyu gibi farklı habitatları içermektedir. Derin deniz sedimentlerinden, denizel canlılarla mutualistik ilişki gösteren

aktinobakterilerden farklı biyoteknolojik kullanıma sahip enzim, antibiyotik gibi yeni metabolit eldesinin gün geçtikçe artması nedeniyle sucul ortamlardan yapılan izolasyon çalışmalarının önemi de artmıştır.

Göl kaynaklarından izolasyon

Göller kapalı havzaları dolduran tatlı ve tuzlu özellikte olabilen su kütleleridir. Dünya üzerinde farklı özelliklere sahip büyüklük ve derinlik olarak ta değişkenlik gösteren pek çok göl bulunmaktadır. Aktinobakterilerin farklı göl ortamlarından izolasyon ve tanımlaması ile ilgili pek çok çalışma mevcuttur. Yeniçağa Gölü'nde yapılan bir çalışmada sediment örnekleri toplanmış ve aktinobakteri izolasyonu için kullanılmıştır (Tokatlı, 2017). Çalışmada dilüsyon plaka yöntemi kullanılmıştır. Dilüsyon çözeltileri antibiyotik ilaveli 10 farklı besiyerine inoküle edilmiştir. Hazırlanan plaklar 30 gün süreyle 28 °C'de inkübe edilmiştir. Yapılan bu çalışmada biyoçeşitlilik belirlenmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada kaynağı Bolshaya Oreshnaya mağarası olan yer altı gölünden örnekler toplanmış ve aktinobakteri izolasyonu için kullanılmıştır (Axenov-Gibanov ve ark., 2016). Örnekler, antibiyotik (sikloheksimid (50 µg/mL), fosfomisin (100 µg/mL)) içeren MS agar üzerine yayılmış ve 28 °C'de 30 gün süreyle inkübe edilmiştir. Bu çalışmada yeni biyolojik aktif metabolit taraması gerçekleştirilmiştir.

Tlawng ve Tuirial Nehirlerinden ve Tamdil Gölünden toplanan örneklerden aktinobakteri izolasyonu gerçekleştirmeyi amaçlayan bir çalışmada (Passari ve ark., 2018) örnekler önce ön işleme tabii tutulmuş ardından seri dilüsyon ve yayma plaka tekniği kullanılmıştır. Çalışmada 7 farklı besiyeri kullanılmış ve tüm ortamlara nalidiksik asit (30 mg/ml) ve sikloheksamid (30 mg/ml) ilave edilmiştir. 7 ila 30 gün süreyle 28±1 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen izolatların farklı patojenlere karşı antimikrobiyal potansiyelleri belirlenmiştir.

Nehir kaynaklarından izolasyon

Nehir, taşımış olduğu su miktarı fazla olan ve göl, deniz ya da yeraltı kaynağına dökülen akarsudur. Aktinobakteri tarama çalışmalarında nehir sedimenti kullanılarak yapılan çalışmalar mevcuttur. Çiğdem'in yapmış olduğu çalışmada Sakarya Nehir kaynağından sediment örnekleri toplanmış ve dilüsyon plaka tekniği ile izolasyon gerçekleştirmiştir. Dilüsyonlardan alınan çözeltiler; sikloheksimid (50µg ml⁻¹) ve nalidiksik asit (10 mg ml⁻¹) içeren 3 farklı besiyerine inoküle edilmiş ve 6 ila 8 hafta süreyle 30 °C'de inkübe edilmiştir (Çiğdem, 2018). Elde edilen izolatların antimikrobiyal özellikleri farklı patojenlere karşı test edilmiştir.

Arango ve arkadaşları Arauca Nehrinden antimikrobiyal potansiye sahip olan aktinobakterilerin eldesi amacıyla izolasyon çalışmaları yapmışlardır. İzolasyon

öncesinde kalsiyum karbonat (C), fenol (F), termal (T), mikrodalga (M), sonikasyon (U) olmak üzere beş fizikokimyasal ön işlem seçilmiş ve kontrol olarak ön işlem yapılmadan doğrudan ekim yapılan bir grup kullanılmıştır. 50 mg/L nalidiksik asit ve 100 mg sikloheksimid içeren hümkik asit vitamin agar (HVA) ve oatmeal agar (ISP3) içeren besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. Tüm petri kapları 30 °C'de 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. Toplam 790 aktinobakteri benzeri izolat elde edilmiştir. Beş ön işlem seti ile ilgili olarak, en yüksek izolat yüzdesi mikrodalga (%20.9) ve fenol (%20) ön işlemi kullanılarak elde edilmiş daha sonra bunu kalsiyum karbonat (%18.2) ve sonikasyon (%18.1) kullanımı izlemiştir (Arango ve ark., 2018).

Deniz kaynaklı Aktinobakterilerin izolasyonu

Artan ilaç dirençlerine ve oluşan enfeksiyonların iyileşmeme süreçleri nedeniyle son yirmi yılda enfeksiyon kaynaklı ölümlerin arttığı bilinmektedir (Back ve ark., 2021). Özellikle mikrobiyal doğal ürünlerin ve türevlerinin eldesi, farmosötik, endüstri ve ziraat gibi alanlarda oldukça önemli olup yeni metabolit keşfi ile ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır. Bu keşif çalışmalarında çalışılmamış ekosistemler ve ekstrem habitatlar özellikle tercih edilmektedir (Abdel-Mageed ve ark., 2021; Igarashi ve ark., 2021; Primahana ve ark., 2020; Yang ve ark., 2019). Denizel ortamlardan yapılan çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Riberio ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada deniz sedimentinden toplanan örnekler, dilüsyon yöntemi kullanılarak M3 agar, NPS agar, nişasta kazein nitrat agar (SCN) üzerine yayılmıştır. Tüm ortamlara sikloheksimit (50 mg L⁻¹) ve streptomisin (50 mg L⁻¹) ilave edilmiştir. Plakalar 6 hafta süreyle 28 °C'de inkübe edilmiştir (Ribeiro ve ark., 2020). Riberio ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada çeşitlilik ve biyoaktif maddelerin tarama çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Deniz sediment örneklerinden aktinobakteri izole etmek için yapılan başka bir çalışmada ise önce plaka damga tekniği ardından dilüsyon tekniği kullanılmıştır. Ortam olarak; M1 (18 g agar, 1 L deniz suyu), M2 (18 g agar, 0.5 g manitol, 1 L deniz suyu) ve M3 (18 g agar, 1 g nişasta, 0.2 g baktopepton, 0.4 g maya özü, 1 L deniz suyu) kullanılmıştır. Ortamlara siklohesimit (100 µg ml⁻¹) ve rifamisin (5 µg ml⁻¹) ilave edilmiştir. 2 ila 6 hafta süreyle 25-28 °C'de inkübasyona bırakılmıştır (Mincer ve ark., 2002). Yapılan bu çalışma ile aktinobakteri çeşitliliği ve popülasyon dinamiği belirlenmiştir.

Meena ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise farklı derinliklerden alınan sediment örneklerinden aktinobakteri izolasyonunda nişasta kazein agar ortamı kullanılmıştır. Ortama nalidiksik asit (25 µg/mL) ilave edilmiştir. 21 gün süreyle oda sıcaklığında (28 ± 2 °C) inkübe edilmiştir (Meena ve ark., 2019). Yapılan bu çalışma ile halofilik aktinobakterilerin biyoçeşitliliği ve antibakteriyal özellikleri belirlenmiştir.

Baig ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada, deniz süngerlerinin minik doku örnekleri, deniz süngerinin olduğu ortamdaki su, sediment ve hava örnekleri toplanmıştır. Sediment örneklerine ve su örneklerine seri dilüsyon tekniği uygulanmıştır. Homojen hale getirilmiş sünger dokusuna da seri dilüsyon tekniği uygulanmıştır. Besiyeri olarak Zobell Marine agar (ZMA) ve zayıf Ravan salin agar (PRSA) kullanılmıştır. ZMA agarda 7 gün süreyle ve PRSA agarda 21 gün süreyle 30 °C'de inkübe edilmiştir (Baig ve ark., 2021). Bu çalışma bir ekosistem çalışması olup deniz süngeri ve çevresindeki aktinobakteri çeşitliliğini belirlemek hedeflenmiştir.

Yapılan farklı bir izolasyon çalışmasında ise Zhang ve arkadaşları (Zhang ve ark., 2013), Güney Çin Denizi'ndeki gorgon mercanlarından aktinobakteri izole etmeyi amaçlamışlardır. Gorgon mercanı örnekleri steril deniz suyu ile yıkanmış ve 1cm³ kadar minik parçalara ayrılıp homojen hale getirilmiştir. Ardından seri seyreltme yöntemi uygulanmıştır. Besiyeri olarak M1-M10 olarak kodladıkları 10 farklı besiyeri ortamını kullanmışlardır. Plaklar 1-3 hafta süreyle 28 °C'de inkübe edilmiştir. Yapılan bu çalışmada besiyerlerinin aktinobakteri izolasyonundaki etkinlikleri belirlenmiş ve M6 bsiyerinde en fazla aktinobakteri elde edilmesine rağmen M4 ve M5 besiyerlerinde nadir aktinobakteri eldesinin daha fazla olduğu belirlenmiştir. Ayrıca izolatların antibakteriyal aktiviteleri de bu çalışmada belirlenmiştir.

Farklı ortamlardan aktinobakteri izolasyonu

Aktinobakteriler toprak, rizosfer, su ortamları (göl, nehir ve deniz gibi) dışında çok farklı ortamlarda da yaşayabilme özelliklerine sahiptirler. Bazı aktinobakteri türlerinin havalandırma filtrelerinden, havadan, tarihi mezarlıklardan veya kutuplardan elde edildiği bilinmektedir. Fang ve arkadaşları (Fang ve ark., 2017), karstik mağaralardan örnekler toplayarak nadir aktinobakteri izolasyonu yapmışlardır. Çin'de bulunan Yunnan eyaletindeki karstik mağaralarda sert kaya formları ve ayrılmış kaya formları tortul kayalardan, mağara mercanlarından, kumlardan, saprolitlerden vb. gibi oluşmaktadır. Toplanan örnekler süspansiyon edilmiş ve ardından seri dilüsyon tekniği uygulanmıştır. Besiyeri olarak; Hümik-asit-vitamin ortamı (HV), Uluslararası *Streptomyces* Projesi (ISP), selüloz-kasamino asit (CC) ortamı, trehalo-prolin agar (HP), nişasta-casien (SC) ortamı ve B-4 ortamı kullanılmıştır. Besiyerlerinin her biri nistatin (50 mg L⁻¹) ve nalidiksik asit (20 mg L⁻¹) içermektedir. 28 °C'de 2 hafta süreyle inkübe edilmiştir (Fang ve ark., 2017). Yapılan bu çalışmada ön ısı uygulaması, kalsiyum ve pH'nın izolasyon üzerine etkileri incelenmiştir.

Singh ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, mantar kompost yığınının farklı yerlerinden örnekler toplamış ve seri dilüsyon yöntemi ile termofilik aktinobakteri

izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Dilüsyonun ardından M agar ortamında 45 °C’de inkübasyona bırakılmıştır (Singh ve ark., 2012).

Atık su arıtım tesisinden toplanan aktif çamurdan yapılan bir başka çalışmada da termofilik aktinobakteri izolasyonu yapılmıştır. Örnekler, oda sıcaklığında kurutulmuş ve ardından dilüsyon plaka yöntemi uygulanmıştır. Dilüsyon çözeltileri; sikloheksimid (50 µg ml⁻¹), nalidiksik asit (10 mg ml⁻¹) ve rifampisin (0.5 µg ml⁻¹) ilaveli tripton yeast ekstrakt agar (TYGA), gauze’s medium (SM3), nutrient agar (NA) ve starch casein agar (SCA) üzerine inoküle edilmiştir. 7 ila 14 gün süreyle 45, 50, 55 ve 60°C’de inkübe edilmiştir (Ertekin, 2020). Yapılan çalışmada izolatların enzim testleri yapılmış ve kompost hızlandırıcı olarak aday aktinobakteriler belirlenmiştir.

Tuzlu ve rizosfer olmayan toprak örnekleri dilüsyon tekniği ile izole edilmiştir (Hui ve ark., 2021). Dilüsyon çözeltilerinin inoküle edildiği ortamlar; nişasta kazein ortamı, gliserol asparajin ortamı, toprak ekstrakt ortamı, T3 ortamı, Horikoshi ortamı olarak verilmiştir. Gram negatif bakterileri inhibe etmek için tüm besiyerlerine (1L ortam için) 25-40 mg nalidiksik asit eklenmiştir. Halofilik aktinobakterilerin gelişimi çok yavaş olduğu için inoküle edilecek ortamın kalın olması ve nemini koruması gereken sürenin 25 ila 30 güne kadar sürdürülebilir olması önerilmiştir.

Dochhil çalışmasında endofitik aktinobakteri izolasyonu yapmıştır (Dochhil, 2013). İzolasyon aşamalarında; öncelikle bitki parçaları (kök, gövde yaprak vb.) toplamış ve yüzey sterilizasyonu gerçekleştirmiştir. Yüzey sterilizasyonu tamamlanmış olan örnekler aseptik olarak kesilmiş ve aktinomiset izolasyon agarına (AIA) yayılmıştır. Mantar ve Gram negatif bakterilerin gelişimini inhibe etmek için sırasıyla sikloheksamit (50 µg ml⁻¹) ve nalidiksik asit (15 µg ml⁻¹) besiyerine eklenmiştir. 3 ila 4 hafta süreyle 28 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Koloni oluşumu gözlenen aktinomisetler ISP2 ortamında saflaştırılmıştır. Elde edilen izolatların tohum çimlenmesini arttırıcı özellikleri belirlenmiştir.

Yapılan bir diğer çalışmada Fas’ın Taza vadisindeki aşırı tuzlu topraktan aktinobakteri izolasyonu için toprağın farklı bölgelerinden örnekler toplanmıştır. Toplanan örnekler süspanse edilmiş ve ardından su banyosunda 1 saat kadar çalkalamada bekletilmiştir. Seri dilüsyon yöntemi uygulanan örnekler casein starch agar (CSA) yüzeyine inoküle edilmiştir. Besiyeri, bakteri ve mantar gelişimini inhibe etmek için ampicillin (20 µg/ml) ve fluconazol (25 µg/ml) içermektedir. 4-6 hafta süreyle 28 °C’de inkübe edilmiştir (El Karkouri ve ark., 2019). Elde edilen izolatların antimikrobiyal potansiyelleri test edilmiştir.

Sonuç

Aktinobakteriler su ve kara ekosistemlerinde dağılım gösteren Gram pozitif bakterilerdir. Çoğunlukla toprakta bulunan bu bakteri grubunun, yapılan son çalışmalarla okyanus ekosisteminin de büyük bir yere sahip olduğu belirlenmiştir.

Genellikle mezofilik bakteriler olup çöller, kaplıcalar, tuz gölleri, aşırı tuzlu toprak, asidofilik ve halofilik gibi ekstrem ortamlarda da gelişim gösterdikleri bilinmektedir (Hui ve ark., 2021).

Sekonder metabolit üretebilme yetenekleri bulunan aktinobakterilerin bilinen cinsleri; *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nonomurae* ve *Kribella* olarak sıralanabilir. Aktinobakteri üyeleri; antibakteriyel, antifungal ve antiviral özelliklere sahiptirler. Bunların yanı sıra bitki gelişimini destekleyici ve toprağı iyileştirici özellikleri de bulunur. Ağır metallerin atık sularından temizlenmesi, kimyasal gübrenin zarar verdiği toprağı iyileştirilmesi, tarımda verimliliğın artırılması, enzim üretimi gibi endüstriyel alanlarda pek çok aktinobakteri çalışılmaktadır.

Doğaya pek çok yararı olan aktinobakteri türleri, bilim insanları için ilgi çekici olmuştur. Geniş bir alana dağılım göstermelerinden dolayı aktinobakterilerin çeşitli alanlardan izolasyonu gerçekleştirilmektedir. Sunulan bu çalışmada, bazı habitatlardan yapılan izolasyon metotlarına yer verilmiştir. Toprakdan ve su ekosisteminden izolasyon çalışmalarında genellikle seri seyreltme yöntemi kullanıldığı ve alternatif yöntemlerle ilgili çalışmalarda yapıldığı görülmüştür. Su ekosisteminden topladan farklı örnekler (deniz süngerleri, deniz yıldızı, mercanlar vb. deniz omurgasızları) ise öncelikle ön işleme tabii tutulup ardından seri dilüsyon tekniğı ile yapılan izolasyonlar yaygın olarak kullanılmıştır. Bu bölümde yer verilen çalışmalarda en çok *Streptomyces* türü izole edilmiştir. *Streptomyces* dışında *Micromonospora*, *Nonomurae*, *Actinomadura*, *Nocardia* ve diğer aktinobakteri türleri de izole edildiğı görülmektedir.

İzolasyon çalışmalarında uygulanan farklı ön işlemlerdeki başarı oranları da farklı çalışmalarda ele alınmıştır. Özellikle nadir aktinobakteri izolasyonlarında yapılan ön uygulama, seçilen besiyerleri ve seçici ajanların oldukça önemli olduğu yayınlarda görülmektedir. Bu kapsamda yapılması planlanan aktinobakteri veya nadir aktinobakteri izolasyonlarında ön işlem, besiyeri ve seçici ajan seçiminde iyi bir literatür taraması araştırmacılar için oldukça faydalı olacaktır. Sunulan bu çalışmada pek çok farklı ortamdan yapılan izolasyon çalışmaları ele alınmıştır. Yapılan izolasyon çalışmalarında elde edilen izolatların enzim, antibiyotik, bitki gelişim özellikleri, endüstriyel kullanım potansiyelleri, atık su arıtımı, boya giderimi gibi pek çok farklı özellik açısından incelendikleri görülmektedir.

Kaynak

1. Abdel-Mageed WM, Al-Wahaibi LH, Lehri B, Al-Saleem MS, Goodfellow M, Kusuma AB, Jaspars M, 2021. Biotechnological and Ecological Potential of *Micromonospora provocatoris* sp. nov., a Gifted Strain Isolated from the Challenger Deep of the Mariana Trench. *Marine Drugs*, 19(5): 243.
2. Arango C, Acosta-Gonzalez A, Parra-Giraldo C M, Sánchez-Quitian Z A, Kerr R, Díaz L E. 2018. "Characterization of Aktinobakteril communities from arauca river sediments (colombia) reveals antimicrobial potential presented in low abundant isolates". *The Open Microbiology Journal*, 12(1): 181–194.
3. Axenov-Gibanov DV, Voytsekhovskaya I V, Tokovenko BT, Protasov ES, Gamaiunov SV, Rebets YV, ... Timofeyev MA. 2016. "Aktinobakteri isolated from an underground lake and moonmilk speleothem from the biggest conglomeratic karstic cave in Siberia as sources of novel biologically active compounds". *Plos One*, 11(2): 1–12.
4. Baig U, Dahanukar N, Shintre N, Holkar K, Pund A, Lele U, ... Watve M. 2021. "Phylogenetic diversity and activity screening of cultivable Aktinobakteri isolated from marine sponges and associated environments from the western coast of India". *Access Microbiology*, 3(9).
5. Back CR, Stennett H L, Williams SE, Wang L, Ojeda Gomez J, Abdulle OM, . . . Jepson MA, 2021. A new *Micromonospora* strain with antibiotic activity isolated from the microbiome of a mid-Atlantic deep-sea sponge. *Marine Drugs*, 19(2): 105.
6. Cao Y, Jiang Y, Wang Q, Zhao L, Jin R, Jiang C. (2010). Diversity and bioactivity of cultured actinomycetes in Sichuan and Yunnan area. *Wei sheng wu xue bao*= *Acta microbiologica Sinica*, 50(8): 995-1000.
7. Cao Y, Jiang Y, Xu L. (2009). Actinomycete composition and bioactivities in Grand Shangri-La. *Acta Microbiol Sinica*, 49(1): 105-109.
8. Chen X, Qiu S, Jiang Y, Han L, Huang X, Jiang C. (2014). Diversity, bioactivity and drug development of cultivable Aktinobakteri in six species of bird feces. *American Journal of Bioscience*, 2(1): 13-18.
9. Çiğdem U. "Sakarya nehir kaynağı sedimentinden izole edilen prokaryotların 16S rRNA dizilemesi ile moleküler tiplendirilmesi" 2018.
10. Dhakal D, Pokhrel AR, Shrestha B, Sohng JK. 2017. "Marine rare Aktinobakteri: Isolation, characterization, and strategies for harnessing bioactive compounds". *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN).
11. Dochhil MSDADB. 2013. "International journal of pharma and bio sciences issn seed germination enhancing activity of endophytic

- Streptomyces* isolated from indigenous ethno-medicinal", 4(1): 256–262.
12. El Karkouri A, Assou SA, El Hassouni M. 2019. "Isolation and screening of actinomycetes producing antimicrobial substances from an extreme moroccan biotope". Pan African Medical Journal, 33: 1–9.
 13. Ertekin, Saadet Gizem. 2020. "Termofilik aktinomisetlerin izolasyonu, moleküler karakterizasyonu ve kompost karışımlarında etkilerinin belirlenmesi". Yüksek lisans tezi. BŞEÜ.
 14. Fang BZ, Salam N, Han MX, Jiao JY, Cheng J, Wei DQ, ... Li W. J. 2017. "Insights on the effects of heat pretreatment, pH, and calcium salts on isolation of rare Aktinobakteri from Karstic Caves". Frontiers in Microbiology, 8(AUG): 1–9.
 15. Hui MLY, Tan LTH, Letchumanan V, He YW, Fang CM, Chan KG, ... Lee LH. 2021. "The extremophilic Aktinobakteri: From microbes to medicine". Antibiotics, 10(6): 1–15.
 16. Igarashi M, Sawa R, Umekita M, Hatano M, Arisaka R, Hayashi C, ... Kato C, 2021. Sealutomicins, new enediyne antibiotics from the deep-sea actinomycete *Nonomuraea* sp. MM565M-173N2. The Journal of Antibiotics, 74(5): 291-299.
 17. Jiang Y, Cao Y, Zhao L, Wang Q, Jin R, He W, Xue Q. (2010). Ultrasonic treatment of soil samples for actinomycete isolation. Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica, 50(8): 1094-1097.
 18. Jiang Y, Chen X, Cao Y, Ren Z. (2013). Diversity of cultivable actinomycetes in tropical rainy forest of Xishuangbanna, China.
 19. Jiang Y, Li Q, Chen X, Jiang C. 2016. "Isolation and cultivation methods of Aktinobakteri". Intech Chapter 2.
 20. Lee LH, Zainal N, Azman AS, Eng SK, Goh BH, Yin WF, ... Chan KG. 2014. "Diversity and antimicrobial activities of Aktinobakteri isolated from tropical mangrove sediments in Malaysia". Scientific World Journal
 21. Liu S, Wang T, Lu Q, Li F, Wu G, Jiang Z, ... Sun C. 2021. "Bioprospecting of soil-derived Aktinobakteri along the alar-hotan desert highway in the Taklamakan Desert". Frontiers in Microbiology, 12(March).
 22. Meena B, Anburajan L, Vinithkumar NV, Kirubakaran R, Dharani G. 2019. "Biodiversity and antibacterial potential of cultivable halophilic Aktinobakteri from the deep sea sediments of active volcanic Barren Island". Microbial Pathogenesis, 132: 129–136.
 23. Mincer TJ, Jensen PR, Kauffman CA, Fenical W. 2002. "Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments". Applied and Environmental Microbiology, 68(10): 5005–

5011.

24. Mohamed SD, Peter C, Christopher JS, Laura CWB, John M, Makedonka M, Jon C, Roger GL, Michael AF: A systematic analysis of biosynthetic gene clusters in the human microbiome reveals a common family of antibiotics. *Cell*. 2014; 158:1402–1414.
25. Ozdemir-Kocak F, Isik K, Saricaoglu S, Saygin H, Inan-Bektas K, Cetin D, ... Sahin, N. 2017. "*Kribbella sindirgiensis* sp. nov. isolated from soil". *Archives of Microbiology*, 199(10): 1399–1407.
26. Özdemir Koçak F. 2019. "Identification of *Streptomyces* strains isolated from *Humulus lupulus* rhizosphere and determination of plant growth promotion potential of selected strains". *Turkish Journal of Biology*, 43(6): 391–403.
27. Özdoğan, Dilek Kaya. 2020. "Ankara ili topraklarından bitki büyümesini teşvik edici bakterilerin izolasyonu, tanımlanması ve genetik çeşitliliklerinin belirlenmesi". *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 21(1): 1–9.
28. Passari AK, Leo VV, Chandra P, Kumar B, Nayak C, Hashem A, ... Singh BP. 2018. "Bioprospection of Aktinobakteri derived from freshwater sediments for their potential to produce antimicrobial compounds". *Microbial Cell Factories*, 17(1): 1–14.
29. Primahana G, Risdian C, Mozef T, Sudarman E, Köck M, Wink J, Stadler M, 2020. Noncarboline A–E, β -carboline antibiotics produced by the rare actinobacterium *Nonomuraea* sp. from Indonesia. *Antibiotics*, 9(3): 126.
30. Poomthongdee N, Duangmal K, Pathom-Aree W. 2015. "Acidophilic actinomycetes from rhizosphere soil: Diversity and properties beneficial to plants". *Journal of Antibiotics*, 68(2): 106–114.
31. Qin S, Li J, Chen H-H, Zhao G-Z, Zhu W-Y, Jiang C-L, . . . Li W-J. 2009. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare Aktinobakteri from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19): 6176-6186.
32. Qin S, Li W-J, Klenk H-P, Hozzein WN, Ahmed I. (2019). Actinobacteria in special and extreme habitats: diversity, function roles and environmental adaptations (Vol. 10, pp. 944): *Frontiers Media SA*.
33. Rego A, Raio F, Martins TP, Ribeiro H, Sousa AGG, Séneca J, ... Magalhães C. 2019. "Aktinobakteri and cyanobacteria diversity in terrestrial Antarctic microenvironments evaluated by culture-dependent and independent methods". *Frontiers in Microbiology*, 10: 1–19.
34. Rehan M, Alsohim AS, Abidou H, Rasheed Z, Abdulmonem W Al. 2021.

- "Isolation, identification, biocontrol activity, and plant growth promoting capability of a superior *Streptomyces tricolor* strain HM10". Polish Journal of Microbiology, 70(2): 245–256.
35. Ribeiro I, Girão M, Alexandrino DAM, Ribeiro T, Santos C, Pereira F, ... Carvalho MF. 2020. Diversity and bioactive potential of Aktinobakteri isolated from a coastal marine sediment in Northern Portugal. Microorganisms, 8(11): 1–16.
36. Saygın H. 2019. "Karakum çölü (Türkmenistan) kültürlenebilir aktinobakteri biyoçeşitliliğinin genoma dayalı polifazik taksonomisi". PhD tezi.
37. Singh R, Kapoor V, Kumar V. 2012. Utilization of agro-industrial wastes for the simultaneous production of amylase and xylanase by thermophilic actinomycetes. Brazilian Journal of Microbiology, 43(4): 1545–1552.
38. Tokatlı A. 2017. "Bolu yeniçağa gölü Aktinobakteri biyoçeşitliliğinin belirlenmesi", 111.
39. Trujillo ME, Riesco R, Benito P, Carro L. 2015. "Endophytic Aktinobakteri and the interaction of *Micromonospora* and nitrogen fixing plants". Frontiers in Microbiology, 6: 1–15.
40. Xie F, Pathom-aree W. 2021. "Aktinobakteri From Desert: Diversity and Biotechnological Applications". Frontiers in Microbiology, 12.
41. Yang T, Yamada K, Zhou T, Harunari E, Igarashi Y, Terahara T, ... Imada C, 2019. Akazamicin, a cytotoxic aromatic polyketide from marine-derived *Nonomuraea* sp. The Journal of Antibiotics, 72(4): 202-209.
42. Yamamura H, Hayakawa M, Imura Y. 2003. "Application of sucrose-gradient centrifugation for selective isolation of *Nocardia* spp. from soil". Journal of Applied Microbiology, 95(4): 677–685.
43. Zhang XY, He F, Wang GH, Bao J, Xu XY, Qi SH. 2013. "Diversity and antibacterial activity of culturable Aktinobakteri isolated from five species of the South China Sea gorgonian corals". World Journal of Microbiology and Biotechnology, 29(6): 1107–1116.

6. Bölüm

Sıcaklık Sensörleri, Kalibrasyon ve Ölçüm Belirsizliği Tahmini

Melda PATAN ALPER¹

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Yeditepe Üniversitesi ,Fizik Bölümü

GİRİŞ

Metroloji, ölçüm bilimi, doğruluk düzeyleri ne olursa olsun ve hangi bilim veya teknoloji alanında ortaya çıkarsa çıksın ölçümlerin tüm yönlerini içerir.

Bir ölçümün tasarlanması, yürütülmesi veya sonuçlarının değerlendirilmesi gibi ölçümle ilgili olan her şey metroloji alanında incelenir. Ölçüm biliminin etkileri günlük yaşantımızdan tutun teknolojinin en yüksek seviyelerine kadar her yerde görülebilir, bu da insanların hayatlarını güvenle yaşamalarına ve ticari alışverişler yapmalarına imkân sağlar.

Sıcaklık; endüstri, tıp, meteoroloji ve teknolojideki kilit sektörlerde ve günlük yaşamda en sık ölçülen parametrelerden biridir. Sıcaklığın ölçülmesinin ve kontrol edilmesinin hayati bir parametre olduğu bazı önemli sektörler şunlardır:

- Üretim endüstrisi
- Gıda
- Isıtma-Soğutma
- Savunma
- Tıp
- Çevre

1. Sıcaklık Ölçüm Temelleri

Sıcaklık kalibrasyon işlemi oldukça pratik gözüktür, ölçmek istediğin termometre sensörünü referans bir sensörle aynı sıcaklık ortamına koy ve okuma yap ancak süreç yazıldığı kadar basit değildir, doğru ve güvenilir ölçüm için prosesi daha derinlemesine inceleyecek olursak:

- Sensör, referans değer için kullanılan ortamla iyi temas halinde olmalı ve gerekli sıcaklığa ulaşması için yeterince uzun süre kalmalıdır.
- Cihaz, girişi (örneğin sensörün elektrik direnci) çıkışa (sıcaklık değeri) gerekli hassasiyetle kullanılacak birime dönüştürmelidir.
- Ölçümlerin doğruluğu için referans sensörün kalibrasyonu sistematik olarak gerçekleştirilmelidir ve izlenebilir olmalıdır.
- Sensör, titreşim, elektromanyetik girişim, ısı radyasyonu vb. çevresel etkilerden etkilenmemelidir.

Bir termometrenin performansını etkileyen pek çok parametre vardır örneğin; boyut, sağlamlık, yapıldığı malzeme, veri iletimi ve maliyet vb. Gerçekleşecek ölçümün niteliğine ve kapsamına göre sıcaklık sensörünün özellikleri belirlenebilir. Ölçümlerin hassasiyeti, aralığı, ölçümlerin yapıldığı yer, malzeme ne tür bir sensöre ihtiyaç duyulacağı hakkında önemli bilgiler verir. Kesinliği ve doğruluğu yüksek ölçümlere ihtiyaç duyulmayan endüstriyel ortamlarda kırılğan,

doğruluğu yüksek ya da pahalı bir sensör kullanmak uygun ve ekonomik değildir. Aynı şekilde, ağır hizmet tipi, çelik kılıflı bir prob, sağlamlık gerekli olmadıkça yavaş yanıt vereceğinden kullanılmamalıdır.

1.1. Sıcaklık Nedir?

Basit bir ifadeyle sıcaklık, bir nesnenin sıcaklık derecesi veya ısı transferi potansiyelidir [1,2].

Ne olduğu ve ısıyla nasıl ilişkili olduğu konusunda tam bir anlayış, ancak on dokuzuncu yüzyılın sonlarında parçacıkların ortalama kinetik enerjisinin bir ölçüsü olarak netliğe kavuştu. Bahsedilen parçacıklar bir gazın, sıvının veya katının atomları veya molekülleri olabilir, ancak kapalı bir kara cisim boşluğu içindeki elektromanyetik radyasyonun "fotonları" da olabilirler.

İki nesne birbirine temas ederse, ısı daha sıcaktan soğuca doğru akar. Sonunda, artık ısı akışı olmadığında, birbirleriyle dengede olduklarını ve sıcaklıklarının aynı olduğunu söyleyebiliriz (termodinamiğin sıfırıncı yasası). Bu özelliği, bir termometreyi bir nesneyle temas edecek şekilde yerleştirdiğimizde sıcaklığı ölçmek için kullanırız: Termometrenin dengeye ulaştıktan sonraki okuması bize nesnenin sıcaklığının ne olduğunu söyler.

Sıcaklık ölçümlerinde ideal durum ölçmek istediğimiz niceliğin nesnelere ve çevrelerindeki ortamdan izole edilmesidir. Ayrıca termometrenin, ölçülen nesnenin sıcaklığını bozmayacak kadar küçük olmasını isteriz. Sıcaklığı ölçmenin zorluklarının çoğu, iyi bir termal temas elde edememekten kaynaklanır.

Sıcaklık ölçümünü nicel ve nesnel bir temele ve yeterli doğruluğa oturtmak için, üzerinde anlaşmaya varılmış bir birime ve sıcaklık ölçümüne ve çalışmak için güvenilir termometrelere ihtiyacımız var.

1.2. Uluslararası Sıcaklık Birimi

Diğer fiziksel niceliklerde olduğu gibi, sıcaklık ölçümü de bir birimin tanımlanmasıyla başlar. Tarihsel olarak, Celsius (santigrat) sisteminde birim, her ikisi de bir atmosfer basıncında buzun erime noktası ile suyun kaynama noktası arasındaki 100 °C 'lik sözde "temel aralık"a dayanıyordu. 1954'ten beri benimsenen birim 2019 yılına kadar, suyun üçlü noktasına 273.16 K değeri atanarak tanımlanan kelvin olmuştur; bu, suyun sıvı, katı ve buhar fazlarının bir arada dengede bulunduğu benzersiz sıcaklıktır.

Üçlü nokta, buhar basıncında buzun erime sıcaklığıdır.

2019 yılına kadar Uluslararası Birimler Sistemindeki (SI) kelvin tanımı şöyledir:

Termodinamik sıcaklığın birimi olan kelvin, suyun üçlü noktasının termodinamik sıcaklığının 1/273.16'dır [3].

2019 yılı itibarı yeni tanım:

Boltzmann sabitinin sabit sayısal değeri, $\text{JK}^{-1}(\text{kgm}^2\text{s}^{-2}\text{K}^{-1})$ birimi ile ifade edildiğinde, $1,380649 \times 10^{-23}$ alınarak tanımlanır. Bu ifadede kilogram, metre ve saniye sırasıyla Planck sabiti, ışık hızı ve sezyum frekansı üzerinden tanımlanır [4-6].

1.3. Sıcaklık Sensörleri :

1.3.1 Platin Dirençli Termometreler (PRT'ler)

Standart platin dirençli termometreler (SPRT'ler) en hassas ve tekrarlanabilir sıcaklık sensörleridir, bu nedenle geniş bir sıcaklık aralığında ITS-90'da kullanım için belirtilen cihazlardır [7]. $0\text{ }^\circ\text{C}$ 'de yaklaşık $0,4/^\circ\text{C}$ olan platinin elektrik direncinin pozitif sıcaklık katsayısına dayanırlar. Algılama direnci, silika (kuvars) bir cam oluşturucu üzerine gerilimsiz bir şekilde dikkatlice sarılmış $<0,1$ mm çapında ince bir platin tel kullanılarak yapılır. Başında bağlantı uçlarının esnek bir kablo uzunluğuna birleştirildiği uzun bir silika tüp (kılıf) içine yerleştirilmiştir. $0\text{ }^\circ\text{C}$ 'deki direnç normalde yaklaşık $25,5\ \Omega$ 'dur, bu da yaklaşık $0,1\ \Omega/^\circ\text{C}$ 'lik bir hassasiyet verir.

SPRT'ler çok kırılmandır ve saf platin çok yumuşaktır. Bu nedenle ikincil standartlar ve endüstriyel termometreler genellikle daha sağlam (daha güçlü) sensörlerle, daha az saf platin teller veya baskılı platin filmler kullanılarak yapılır. $0\text{ }^\circ\text{C}$ 'de direnç genellikle $100\ \Omega$ 'dur, bu nedenle hassasiyet yaklaşık $0,4\ \Omega/^\circ\text{C}$ 'dir ve paslanmaz çelik metal kılıflarla korunurlar. Bunlara genellikle Direnç Sıcaklık Dedektörleri (RTD'ler) veya Pt-100'ler denir [8-12].

Platin, iyi bir sıcaklık katsayısına sahip olması, çok yüksek sıcaklıklarda çalışabilmesi ($962\text{ }^\circ\text{C}$ 'ye kadar özel uygulamalarda) ve kimyasal saldırılara, özellikle oksidasyona karşı dirençli olması nedeniyle, direnç termometresinde neredeyse değişmez bir şekilde algılama direnci olarak kullanılır. Ancak pahalıdır ve bazen maliyet nedenleriyle bakır veya nikel kullanılır.

1.3.2 Termokupllar

Termokupllar, bilim ve endüstride, özellikle yüksek sıcaklıklarda ($2000\text{ }^\circ\text{C}$ 'ye kadar veya ötesinde) en yaygın olarak kullanılan sıcaklık sensörleridir. Bunlar, uzunlukları boyunca bir sıcaklık gradyanı olduğunda elektrik iletkenlerinde meydana gelen bir EMF (elektromotor kuvvet veya termovoltaj) üretimi olan Seebeck etkisine dayanır. Birbirinden izole edilmiş iki farklı tel, sıcaklığın ölçüleceği yerde bulunan 'ölçüm bağlantısında' birbirine bağlanır [13-15]. Diğer uçlarda teller, çıkışı ölçen bir voltmetreye veya başka bir ölçüm cihazına bağlanır. Termokuplların yapımı ve kullanımı çok basittir, ancak EMF'nin bağlantı noktasında değil teller boyunca üretildiğini anlamak önemlidir.

Platin ve rodyum alaşımları (Tip R, S ve B) kullanan termokupllar 1600 °C'ye kadar sıcaklık ölçümü için standart olarak kullanılır, ancak çeşitli nikel bazlı alaşımlı termokupllar 1200 °C'ye kadarki sıcaklıklarda (Tip J, K, T, E ve N) yaygın olarak kullanılırlar, çünkü daha hassas ve daha ucuzdurlar, Tablo 1.

Tablo 1. Termokupl Tipleri

Tip	Ölçüm Aralığı	Malzeme
B	0 – 1820°C	Platin – %30 Rodyum
E	-270 – 1000°C	Krom / Konstantan
J	-210 – 1200°C	Demir / Konstantan
K	-270 – 1372°C	Krom / Alümel
N	-270 – 1300°C	Nikrosil / Nisil
R	-50 – 1768°C	Platin – %13 Rodyum / Platin
S	-50 – 1768°C	Platin – %10 Rodyum / Platin

1.3.3 Termistörler (ısıya duyarlı dirençler):

Termistörler, çok yüksek sıcaklığa duyarlı elektrik direncine sahip, ucuz yarı iletken malzemeden üretilen sıcaklık sensörleridir. Genellikle dar sıcaklık aralıklarında, özellikle küçük boyutlarının ve yüksek hassasiyetlerinin önemli avantajlar olduğu tıbbi uygulamalarda ve akım sınırlayıcı olarak kullanıldıkları kapasitörler gibi elektronik bileşenlerde kullanılırlar. Termistörler, sıcaklık direnç katsayısı pozitif (PTC) veya negatif (NTC) olabilen çeşitli metal oksitlerden yapılır.

1.3.4 Sıvılı Cam Termometreler:

Cam termometreler 300 yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır ve sıcaklık ölçümü için en sık görselleştirilen termometrelerdir. Bir kılcal boruya kaynaşmış bir cam ampul, çoğunlukla cıva veya alkol olmak üzere bir sıvı ile doldurulur. Sıcaklık yükselip alçaldıkça sıvı genişip büzüldüğü için, sıvı menisküs kılcal boruda yukarı ve aşağı hareket eder. Sıcaklık, kılcal damara tutturulmuş veya üzerine oyulmuş bir ölçekte menisküs pozisyonu okunarak elde edilir. Petrol endüstrisi gibi özel uygulamalar için farklı sıcaklık aralıklarına ve hassasiyetlere uygun birçok termometre tasarımı vardır [16-18]. Hepsi, endüstriyel veri kaydına veya kontrole kolay bir arabirim olmadan kullanılsada, gözle okunma zorunluluğu kimi zaman sorun oluşturabilmektedir bu nedenlerden ötürü şu anda esas olarak uzman laboratuvarlarda ve evlerde kullanılmaktadırlar.

1.3.5 Bimetalik Termometreler:

Eski moda termostatların çoğunda çalışan basit mekanik sensör, iki metalin sıcaklığın bir fonksiyonu olarak farklı oranlarda genişmesi gerçeğine dayanır. Bimetalik şerit genişledikçe bükülür ve bir işaretçiyi ölçeğin üzerinde hareket ettirir veya bir elektrik bağlantısı kurar veya koparır.

1.3.6 Yarı İletken Sıcaklık Sensörleri:

Ticari sıcaklık sensörleri, birkaç yıldır yarı iletken diyotlardan yapılmaktadır. Sınırlı bir sıcaklık aralığında çalışarak, birçok kullanıma sahip basit, doğrusal, doğru ve düşük maliyetli cihazlardır.

2. Kalibrasyon Yöntemi

Sıcaklık sensörlerinden sıklıkla kullanılanları direnç sensörlü ve ısı çift sensörlü termometrelerdir. Kalibrasyon yöntemindeki genel fark, izolasyon direnci ölçümü, tavlama ve kompanzasyon (soğuk bağlantı denkleştirilmesi) işlemidir. Termometrelerin büyük kısmının kalibrasyonu, 1. bölümde de anlatıldığı gibi sıcaklık kaynağına (sıvı banyo veya kuru blok fırın) referans ve test edilecek termometrenin aynı anda daldırılarak denge durumunda ölçümlerin alınması suretiyle gerçekleştirilir. Termal denge durumunda izlenebilirliği sağlanmış referans termometre banyo yada fırının içerisinde gerçek sıcaklığını anlamamızı sağlar. Sıvılı cam termometreler dışında çoğu test edilecek yada kalibrasyonu gerçekleştirecek sensör tipi termometre referans ile aynı seviyede sıcaklık kaynağına daldırılır. Daldırma derinliği ölçüm belirsizliği açısından da önem teşkil eder, sonraki bölümde ölçüm belirsizliği hakkında bilgi verilecektir. Sıcaklık sensörlerinin kalibrasyonunda kullanılan genel yöntem aşağıda verilmiştir:

- Termometrenin tekrar üretilebilirlik ölçümleri için buz noktası hazırlanır ve kalibrasyona başlanmadan önce test termometresinin buz noktası değeri ölçülür.
- Kalibrasyon, negatif bölgelerde en düşük sıcaklıktan 0°C ye doğru, pozitif bölgelerde en yüksek sıcaklık değerinden 0°C ye doğru yapılır.
- Termometre banyoya ya da fırına referans termometre ile aynı derinlikte ve probun yarısından fazlası sıcaklık kaynağının içine girecek şekilde yerleştirilir. Termometrelerin daldırma derinliği önemli olduğundan kalibrasyon sertifikasına daldırma derinliği bilgisi eklenebilir.
- Banyolarda ya da fırınlarda ayarlanan sıcaklık değerlerinde denge durumu yakalandığında, referans ve test termometresi değerleri aynı anda alınır.

- Her ölçüm noktası için 30 saniye ara ile en az 10 değer alınır. Ölçüm sırası referans-test, test-referans şeklindedir.
- Kalibrasyonu yapılan termometrenin tüm ölçüm değerleri alındıktan sonra tekrar buz noktası değeri ölçülür.
- Kalibrasyon işleminin başında ve sonunda ölçülen buz noktası değerleri arasındaki fark bir belirsizlik bileşeni olan histerisizi verir.
- Ölçüm belirsizliği hesabı yapılarak bir kalibrasyon sertifikası hazırlanır.

3.0 Ölçüm Belirsizliği

Ölçüm sonucunun belirsizliği, ölçülen cihazın kesin değerinin bilinmesindeki eksikliği yansıtır. Fark edilen sistematik hataların düzeltilmesinden sonraki ölçüm sonucu, sistematik hatalardan ortaya çıkan sonuçların düzeltilmesi ve rastgele hatalardan dolayı ortaya çıkan belirsizlikten dolayı hala sadece bir tahminden ibarettir.

Ölçüm belirsizliği tayininde ve hesaplamalarındaki aşamalar [19]

- Ölçüm sistemini etkileyen bütün belirsizlik bileşenlerinin tespiti
- Belirsizlik bileşenlerinin sınıflandırılması ve değerlendirilmesi (A tipi ve B tipi).
- Belirsizlik bileşenlerinin büyüklüklerinin tespiti
- Belirsizlik bileşenlerinin dokümanite edilmesi
- Belirsizlik bileşenlerinin RSS (Root sum square) metodu kullanılarak birleştirilerek, birleştirilmiş belirsizlik bütçesi hesaplanır
- Genişletilmiş belirsizlik toplam standart belirsizliğin **k faktörü** ile çarpılması ile elde edilir
- Hesaplanan belirsizlik bütçesinin raporlanması.

Yapılan kalibrasyonun tahmini belirsizliğinin hesaplanmasını, aşağıda açıklandığı gibi iki ana grupta sınıflandırabiliriz.

A Tipi Belirsizlik: İstatistiksel standart sapmayı bulmaya yarayan bir dizi tekrar eden gözlemden hesaplanır. Sonuç olarak ortalama değerden sapma $\pm s$ olarak verilir. Ve bu değer A tipi tahmini belirsizliği temsil eder. Aynı ölçüm şartları altında birçok bağımsız gözlem giriş büyüklüklerinden bir tanesi için yapılmışsa A tipi Standard belirsiz değerlendirilmesi uygulanabilir.

$$\bar{X} = \sum_{m=1}^n X_m$$

\bar{X} alınan ölçümlerin ortalaması, n ise ölçüm sayısıdır, ölçümlerin standart sapması ise;

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{m=1}^n (X_m - \bar{X})^2$$

olarak verilir. Buna göre en iyi tahmini belirsizlik ise;

$$= s^2 / n$$

Bu metot genellikle istatistiksel ve tekrarlanabilirlik analizi için kullanılır. Genellikle iyi bir analiz için on ölçüm alınması gerekir.

B Tipi Belirsizlik:

Mevcut bilgilerin kullanılmasıyla elde edilir, örneğin; kullanılan cihazların, standartları belirsizlikleri, sıcaklık ve basınç değişimleri vb.

B tipi olarak üretici firma tarafından verilen belirsizlikler genellikle dikdörtgen dağılımı sonucunda çıkan belirsizliklerdir. Bunun Gauss (Normal) dağılımına çevrilmesi için $\pm a\sqrt{3}$ işlemi yapılması gerekir. B tipi standart belirsizlik bileşenleri, önceki ölçüm bilgilerinden;

ilgili materyallerin veya cihazların, özellikleri ve davranışlarına ait genel bilgilerden veya tecrübelerden, üreticinin belirttiği özelliklerden (şartnameler), kalibrasyondan ve diğer sertifikalardan sağlanan bilgilerden, el kitaplarından alınan ve referans bilgilerle saptanan belirsizliklerden türetilir.

Toplam belirsizlik A ve B tipi belirsizliklerin karelerinin toplamının kareköküdür.

$$s^2 = k \left[\sum_{m=1}^n A_m^2 + \sum_{m=1}^n B_m^2 \right]$$

k=1 (%66 güvenilirlik seviyesi)

k=2 (%95 güvenilirlik seviyesi)

k=3 (%99,7 güvenilirlik seviyesi)

Normal Dağılım

Belirsizlik değeri bir kalibrasyon sertifikasından alınıyor veya ardışık ölçümlerin standart sapmasından söz ediliyor ise olasılık dağılımı normal dağılımdır. Örneğin Termometre Kararlılığı, Banyo Stabilitesi, Buz Noktası Belirsizliği.

Dikdörtgen Dağılım

Belirsizlik değeri alt ve üst limite sahip ise bu dağılım dikdörtgen dağılımdır. Örneğin son iki sertifikaya bakılarak alınan referansın kayma değeri, banyo ya da fırın homojeniteleri, kendinden ısınma etkisi vb.

Ölçüm belirsizliğine etki edebilecek faktörlerin tespit edilmesi:

Bu aşama, ciddi bir beyin fırtınası toplantılarını içermektedir. Aşağıda ölçüm sonuçlarını etkileyecek önemli parametreler verilmektedir:

- Çevre koşulları (sıcaklık, nem, basınç, elektriksel gürültü vb.)
- Ölçüm aletlerinin teknik yeterliliği (duyarlılık, çözünürlük, kaymalar vb.)
- Ölçümlerin kararlılığı
- Kullanılan aletlerin kalibrasyonları
- Ölçümlerin tekrarlanabilirliği
- Ölçümlerin üretilebilirliği
- Kullanıcılar (personel yeterliliği)
- Ölçüm düzenekleri
- Kullanılan metotlar (geçerliliği ispatlanmış metotlar)
- Bilgisayar programları

Belirsizlik hesabını bir örnek ile inceleyecek olursak;

Tablo 2'de yer alan ilk belirsizlik bileşeni, referans standardın kalibrasyonundaki standart belirsizlikten gelen referans termometre belirsizliğidir, ikinci parametre, referans termometre kayması, termometreye ait son iki kalibrasyon sertifikasında ilgili sıcaklık değerlerindeki sıcaklık farkı hesaplanarak bulunur veya yeni bir termometre için üretici verilerinden elde edilen tahmini yıllık sapma değeridir. Referans termometre tekrarlanabilirlik parametresi, her kalibrasyon noktasında ölçümlerin standart sapması hesaplanarak tahmin edilir. Kalibrasyon sırasında referans standart ve dijital termometrenin en az on ölçümü yapılmış ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Gösterge belirsizliği, sensörün bağlı olduğu köprü veya multimetrenin kalibrasyon sertifikasından alınan veridir. Gösterge kayma belirsizlik parametresi ise son iki kalibrasyon sertifikasından alınan, termometre göstergesinin kaymasından kaynaklanan gösterge (okuma sistemi) belirsizliğidir veya yeni

gösterge için sapma değeri üretici verilerinden elde edilir. Banyo kararlılığı, banyonun uzun süreli stabilitesi nedeniyle oluşan sıcaklık düzeltilmesidir. Banyonun stabilitesi, banyoya yerleştirilen ve banyo içindeki sıcaklığı zamanın bir fonksiyonu olarak kaydeden referans termometre ile belirlenir. Referans termometrenin standart sapması, sıcaklık kaynağını (banyo veya fırın) stabilitesini verir. Banyo homojenliği, banyo içindeki sıcaklık gradyanı, iki eşdeğer referans termometre ile belirlenir. Birinci referans termometre banyo içinde, diğer termometre ise banyo içinde çeşitli konumlara sabitlenir. Termometre okumasının varyasyonu, banyonun homojenliği hakkında bilgi verir [20]. Buz noktası, referans sıcaklık (0 °C) olarak kabul edilir ve kendine ait belirsizlik değeri hesaplanarak bulunur. Her laboratuvar için elde edilme şekli farklı olduğundan sayısal değeri değişkenlik gösterebilir. Test termometre çözünürlük değeri, dijital termometrenin en az anlamlı basamağa göre çözünürlüğünden kaynaklanan belirsizliktir. Ölçümlerin tekrarlanabilirliği, kalibrasyon esnasında dijital termometre ile her kalibrasyon noktasında elde edilen ölçümlerin standart sapmasına eşittir. Ölçümün tekrar üretilebilirliği, kalibrasyonu gerçekleştiren cihazın tersine çevrilebilirliğinden (histerezis) kaynaklanan belirsizlik değeridir. Genel olarak histerezis, dijital termometre için kalibrasyon öncesi ve kalibrasyon sonrası sıcaklık aralığının ortasındaki sıcaklıkların değişimidir. Örneğin, termometrenin aralığı 0 °C ila 420 °C ise, sıcaklık aralığının ortası yaklaşık 200 °C'dir [21]. Kalibrasyondan sonra bu sıcaklıkta ölçüm tekrarlanacak ve aralarındaki fark histerezis veya tekrarlanabilirliğe eşit olacaktır. Referans termometrenin kendi kendine ısınmasından kaynaklanan belirsizlik bileşeni kendinden ısınma etkisi parametresi. Kendinden ısınma etkisi, ölçüm akımı artırılarak belirlenebilir. Üretilen ısı akımının karesi ile artar (yani güç = I^2R) [22], bu nedenle akım 1 mA'dan $\sqrt{2}$ mA'ya yükseltirse güç iki katına çıkar. Bu nedenle, 1 mA ile $\sqrt{2}$ mA arasındaki sıcaklıktaki (ve dirençteki) değişiklik, 1 mA'daki kendinden ısınma etkisine eşittir. Ölçüm belirsizliğini etkileyen parametreler, ölçüm sistemindeki her kalibrasyonda değişiklik gösterebilir. Matematiksel model, belirsizliği önemli ölçüde etkileyen tüm belirsizlik parametrelerini (girdi miktarları) içermelidir.

Tablo 2. Termometre Ölçüm Belirsizlik Bütçesi

Belirsizlik Bileşeni	Sembol	Tip	İstatistiksel Dağılım
Ref. Term. Belirsizliği	δT_{unc}	B	Normal
Ref. Term. Kayma	δT_{drf}	B	Dikdörtgensel
Ref. Term. Tekrarlanabilirlik	δT_{rep}	A	Normal
Gösterge Belirsizliği	δT_{inu}	B	Normal
Gösterge Kayma	δT_{ind}	B	Dikdörtgensel
Banyo Kararlılık	δT_{bs}	A	Normal
Banyo Homojenite	δT_{bu}	B	Dikdörtgensel
Buz Noktası	δT_{icp}	B	Normal
Test Term. Çözünürlük	δT_{ts}	B	Dikdörtgensel
Test Term. Tekrarlanabilirlik	δT_{tre}	A	Normal
Test Term. Tekrarüretilebilirlik	δT_{trp}	B	Dikdörtgensel
Kendinden Isınma	δT_{sfh}	B	Dikdörtgensel
Toplam Belirsizlik= $U_t = \sqrt{\delta T_{unc}^2 + \delta T_{drf}^2 + \dots}$			
Genişletilmiş Belirsizlik = $U = k \cdot U_t$			

Ölçümlerden ve önceki bilgilerden elde edilen sonuçlar yukarıda belirlenen parametrelerin sayısal olarak hesaplanmasında kullanılır. Ölçümü etkisi olan parametreler uluslararası standartlar yardımı ile tespit edilse de laboratuvarların kendi sistemlerinden gelen başka parametreleri de içerir bu sebeple belirsizlik sonuçları laboratuvarın sahip olduğu alt yapıya göre değişkenlik gösterebilir. Bu doğrultuda ölçüme etki ettiği düşünülen bütün parametreler değerlendirilerek hesaba katılmalıdır.

Teşekkür

Katkıları ve faydalı yorumlarından dolayı Dr. Richard Rusby'e en derin teşekkürlerim ve saygılarımla.

Kaynakça

- [1] Fischer J., Fellmuth B., Temperature metrology, , Rep. Prog. Phys. 68, 1043
- [2] Rusby R. , “Good Practice Guide No. 125 Introduction to Temperature Measurement”, NPL;ISSN 1368–6550, 2016
- [3] Quinn T. J., Temperature, Academic Press, 2013
- [4] Machin G., The kelvin redefined, Meas. Sci. Technol. 29 (2018) 022001 (11pp)
- [5] Mills I.M., Mohr P.J., Quinn T.J., Taylor B.N. and Williams E.R., Redefinition of the kilogram, ampere, kelvin and mole: a proposed approach to implementing CIPM recommendation 1 (CI-2005), Metrologia 43 (2006) 227–246
- [6] Fischer J., The Boltzmann Constant for the Definition and Realization of the Kelvin, Annalen der Physik, 2019
- [7] Preston-Thomas H., “The International Temperature Scale of 1990” (ITS-90), Metrologia 27, 107, 1990
- [8] Childs P. R. N., “6 – Resistance temperature detectors,” in Practical Temperature Measurement, Oxford: Butterworth-Heinemann, pp. 145-193, 2001
- [9] Bureau International des Poids et Mesures, BIPM, Guide to the Realization of the ITS-90, Platinum Resistance Thermometry, 2018
- [10] BS EN 60751:2008, Industrial platinum resistance thermometers and platinum temperature sensors
- [11] DKD-R 5-1 Calibration of resistance thermometers, DKD guidelines, 09/2018
- [12] Connolly J.J., Bentley R.E., Platinum Resistance Thermometry, First Edition, National Measurement Institute, 2004.
- [13] Bentley, R.E., Thermocouples in Temperature Measurement, National Metrology Institute of Australia, Lindfield, 2004
- [14] EURAMET CG8, “Calibration of Thermocouples”. European Association of National Metrology Institutes, Version 3.1, 02/2020
- [15] EN 60584-1:2013, Thermocouples – Part 1: EMF specifications and tolerances,
- [16] Wise, J. A., A Procedure for the Effective Recalibration of Liquid-in-Glass Thermometers, NIST SP 819, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, 1991
- [17] Wise, J. A., Liquid-in-Glass Thermometer Calibration Service, NIST SP 250-23, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, 1988

- [18] ASTM E 1-07, Standard Specification for ASTM Liquid-in-Glass Thermometers, ASTM, West Conshohocken, PA, 2007
- [19] ISO Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (the GUM), joint document of ISO, IEC, BIPM and others, 1993
- [20] ASTM E644 – 11 Standard Test Methods for Testing Industrial Resistance Thermometers, 2019
- [21] BS EN 60751:2008, Industrial platinum resistance thermometers and platinum temperature sensors
- [22] Connolly J. J., Bentley R. E., “Platinum Resistance Thermometry”, First Edition, National Measurement Institute, 2004

7. Bölüm

Adıyaman İlinin (Türkiye) Sucul Böcek Çeşitliliği

Gani Erhan Taşar¹

Murat Kızılkaya²

Selda Kızılkaya³

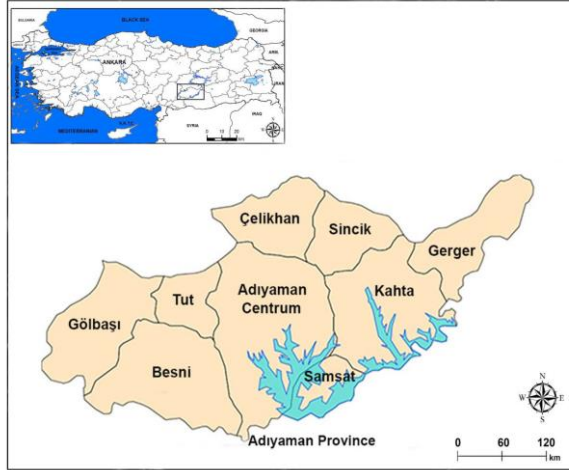
1 Doç. Dr., Adıyaman Üniversitesi, Kahta MYO.

2 Denizköşkler İlkokulu Avcılar / İstanbul, muratkizilkaya54@gmail.com

3 Abdulkadir Uztürk İlkokulu Avcılar / İstanbul, seldakizilkaya90@gmail.com

1. Giriş

Adıyaman ili ülkemizin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nin kuzey batısında yer almaktadır. Kuzeyde Doğu Anadolu Bölgesi'ne, batıda ise Akdeniz Bölgesi'ne sınırdır. Toros Dağları ilin kuzey kesimi boyunca uzanmaktadır. Yaklaşık %52'si (Tel et al., 2021) dağlık alanlardan oluşan Adıyaman ilinin güneyi ise düzlük ve verimli ovalarla kaplıdır (Şekil 1).



Şekil 1. Adıyaman il haritası (Taşar, 2017a)

Adıyaman ili coğrafik yapı bakımından birbirinden farklı özelliklere sahip olan dokuz ilçeden oluşmaktadır. Bunlar: Adıyaman-merkez, Besni, Çelikhan, Gölbaşı, Gerger, Kahta, Samsat, Sincik ve Tut ilçeleridir. Merkez ilçe Adıyaman 669 metre rakıma sahipken, ilin güneyinde yer alan düzlük ve ovalardan oluşan Samsat ilçesi deniz seviyesinden 610 metre yüksekliktedir. Tarihte yaşamış, Kommagene Krallığı gibi büyük medeniyetlere de ev sahipliği yapmış olan Nemrut Dağı 2150 metre yüksekliği ile ilin güney doğusunda, Kahta ilçesinde yer almaktadır. Şehir merkezi, Kahta ve Samsat ilçelerinin aynı zamanda Atatürk Baraj Gölü'ne de kıyıları bulunmaktadır. İlin batısında yer alan Gölbaşı ilçesinde, dikkate değer bir biyolojik çeşitliliğe sahip olan üç büyük göl (Büyük Göl, Azaplı ve İnekli Gölleri) ve birçok gölet bulunmaktadır. Çelikhan, Gerger ve Sincik ilçeleri ilin kuzeyi boyunca uzanan Toros Dağları üzerinde konumlanmışlardır. Tut ilçesi 1100 metre rakıma sahipken, Sincik 1325 metre ve Çelikhan ilçesi 1388 metre yüksekliktedir. 2250 metre yüksekliğe sahip Kımıl Dağı'nın yer aldığı Gerger ilçesinde ayrıca büyük kanyonlar ve baraj gölü de bulunmaktadır.

Adıyaman ilinde birçok doğal ve yapay sulak alan bulunmaktadır. Buna bağlı olarak sucul böcekler açısından zengin bir tür çeşitliliği görülmektedir.

Bu denli farklı coğrafik yapıya sahip Adıyaman ili iklim olarak yarı bozunmuş Akdeniz ve karasal iklimin etkisi altındadır. İlin kuzeyinde yer alan dağlık alanlarda yazlar kurak ve serin, kışlar yağışlı ve soğuktur. Rakımın daha düşük olduğu ve geniş düzlüklerin yer aldığı güney kesiminde ise yazlar kurak ve sıcak, kışlar yağışlı ve ılık geçer (Tel et al., 2021).

Akdeniz, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri arasında yer alan Adıyaman ili, her üç bölgenin de bitki çeşitliliğini içerisinde barındırmaktadır. Yaklaşık %18'i ormanlarla kaplı olan ilin, bitki örtüsü yüzey şekilleri ve iklime göre değişiklik göstermektedir. Ormanlarında karaçam, kızılçam, ardıç, meşe, sakız ve melengiç ağaçları yaygındır. Kuzeyinde meşe ağaçlarının hâkim olduğu ormanlarda, dağlık olarak geniş yapraklı bitki türleri de görülmektedir. Fırat nehri boyunca çayırliklar bulunmaktadır. Bataklık ve sazlikların yer aldığı alanlarda suyu seven bitki örtüsüne de rastlanmaktadır (Tel et al., 2021).

Adıyaman ilinin sucul böcek varlığını ortaya koymak için bugüne kadar az sayıda çalışmanın yapıldığı ve bunların da daha çok kınkanatlılar takımına yönelik olduğu görülmektedir.

2. Sucul Böcekler

Adıyaman ilinden bugüne kadar yedi takıma ait birçok sucul/yarı sucul böcek türünün varlığı kaydedilmiştir. Bu türler, ait oldukları takımlar ile birlikte alfabetik sıraya göre aşağıda sunulmuştur.

2.1. Coleoptera

Coleoptera kelimesi Aristo tarafından; Coleos=koruyucu şey, kalkan ve ptera=kanat anlamlarına gelen Yunanca kelimelerden türetilmiştir (Resh and Carde, 2009). Türkçe olarak ise “kınkanatlılar” diye adlandırılmıştır.

Adıyaman ilinden Kınkanatlılar takımına bağlı on familyadan 90 sucul taxanın varlığının kaydedildiği belirtilmektedir. Bu türlerden: *Hydrochus adiyamanensis* Taşar, 2017 ve *Bidessus anatolicus adiyaman* Aykut, Taşar & Fery, 2021 Adıyaman iline endemik olan türlerdir.

Adıyaman ilinden bilinen sucul/yarı sucul kolopter türlerinin listesi: Taşar, 2014a; 2014b; 2017a; 2017b; 2018; Aykut and Taşar, 2018; Aykut et al., 2021 yayınlarından faydalanılarak oluşturulmuştur.

Family Helophoridae

- 1) *Helophorus (Eutrichelophorus) micans* (Faldermann, 1835)
- 2) *Helophorus* (s. str.) *aquaticus* (Linnaeus, 1758)
- 3) *Helophorus* (s. str.) *grandis* (Illiger, 1798)
- 4) *Helophorus* (s. str.) *syriacus* Kuwert, 1885

- 5) *Helophorus (Rhopalohelophorus) brevipalpis brevipalpis* Bedel, 1881
- 6) *Helophorus (R.) daedalus* d'Orchymont, 1932
- 7) *Helophorus (R.) hilaris* Sharp, 1916

Family **Hydrochidae**

- 8) *Hydrochus adiyamanensis* Taşar, 2017
- 9) *Hydrochus elongatus* (Schaller, 1783)
- 10) *Hydrochus flavipennis* Kuster, 1852

Family **Hydrophilidae**

- 11) *Anacaena globulus* (Paykull, 1798)
- 12) *Anacaena limbata* (Fabricius, 1792)
- 13) *Anacaena rufipes* (Guillebeau, 1896)
- 14) *Paracymus chalceolus* (Solsky, 1874)
- 15) *Berosus* (s. str.) *affinis* Brullé, 1835
- 16) *Berosus* (s. str.) *byzantinus* Ganglbauer, 1904
- 17) *Chaetarthria seminulum* (Herbst, 1797)
- 18) *Chasmogenus livornicus* (Kuwert, 1890)
- 19) *Cymbiodyta marginella* (Fabricius, 1792)
- 20) *Enochrus* (s. str.) *melanocephalus* (Olivier, 1792)
- 21) *Enochrus (Lumetus) bicolor* (Fabricius, 1792)
- 22) *Enochrus (L.) calabricus* (Ferro, 1986)
- 23) *Enochrus (L.) halophilus* (Bedel, 1878)
- 24) *Enochrus (L.) ochropterus* (Marsham, 1802)
- 25) *Enochrus (L.) politus* (Küster, 1849)
- 26) *Enochrus (L.) quadripunctatus* (Herbst, 1797)
- 27) *Enochrus (Methydrus) affinis* (Thunberg, 1794)
- 28) *Enochrus (M.) coarctatus* (Gredler, 1863)
- 29) *Helochares* (s. str.) *lividus* (Forster, 1771)
- 30) *Helochares* (s. str.) *obscurus* (O. F. Müller, 1776)
- 31) *Hydrobius fuscipes* (Linnaeus, 1758)
- 32) *Limnoxenus niger* (Gmelin, 1790)
- 33) *Hydrochara dichroma* (Fairmaire, 1892)
- 34) *Brownephilus major* (İncekara *et al.*, 2009)
- 35) *Hydrophilus* (s. str.) *piceus* (Linnaeus, 1758)
- 36) *Laccobius (Dimorpholaccobius) bipunctatus* (Fabricius, 1775)
- 37) *Laccobius (D.) hauserianus* Kniz, 1914
- 38) *Laccobius (D.) hindukuschi* Chiesa, 1966
- 39) *Laccobius (D.) obscuratus aegaeus* Gentili, 1974
- 40) *Laccobius (D.) sinuatus* Motschulsky, 1849
- 41) *Laccobius (D.) sipylus* d'Orchymont, 1939

- 42) *Laccobius (D.) syriacus* Guillebeau, 1896
- 43) *Laccobius (Microlaccobius) alternus* Motschulsky, 1855
- 44) *Laccobius (M.) gracilis* Motschulsky, 1855
- 45) *Laccobius (M.) quaesitus* Gentili, 1988
- 46) *Coelostoma (s. str.) orbiculare* (Fabricius, 1775)
- 47) *Cercyon (s. str.) circumcinctus* Reitter, 1889d
- 48) *Cercyon (Paracycreon) laminatus* Sharp, 1873

Family **Dryopidae**

- 49) *Dryops jeanneli* Bollow, 1939
- 50) *Dryops lutulentus* Erichson, 1847
- 51) *Dryops nitidulus* Heer, 1841
- 52) *Dryops rufipes* Krynicky, 1832

Family **Elmidae**

- 53) *Elmis maugetii maugetii* Latreille, 1802

Family **Heteroceridae**

- 54) *Heterocerus fenestratus* Thunberg, 1734
- 55) *Heterocerus fuscus* Kiesenwetter, 1843

Family **Dytiscidae**

- 56) *Agabus biguttatus* (Olivier, 1795)
- 57) *Agabus bipustulatus* (Linnaeus, 1767)
- 58) *Agabus caraboides* Sharp, 1882
- 59) *Agabus conspersus* (Marsham, 1802)
- 60) *Agabus glacialis* Hochhuth, 1846
- 61) *Agabus nebulosus* (Forster, 1771)
- 62) *Bidessus anaticus adiyaman* Aykut, Taşar & Fery, 2021
- 63) *Colymbetes fuscus* (Linnaeus, 1758)
- 64) *Deronectes sahlbergi* Zimmermann, 1932
- 65) *Dytiscus marginalis* (Linnaeus, 1758)
- 66) *Graptodytes veterator veterator* Zimmermann, 1918
- 67) *Hydaticus seminiger* DeGeer, 1774
- 68) *Hydroglyphus geminus* (Fabricius, 1792)
- 69) *Hydroporus discretus* Fairmaire and Brisout, 1859
- 70) *Hydroporus marginatus* (Duftschmid, 1805)
- 71) *Hydroporus palustris* (Linnaeus, 1761)
- 72) *Hydroporus planus* (Fabricius, 1782)
- 73) *Hydroporus pubescens* (Gyllenhal, 1808)
- 74) *Hydroporus tessellatus* (Drapiez, 1819)
- 75) *Hydrovatus cuspidatus* (Kunze, 1818)
- 76) *Hygrotus impressopunctatus* (Schaller, 1783)

- 77) *Hygrotus inaequalis* (Fabricius, 1777)
78) *Hygrotus lernaeus* (Schaum, 1857)
79) *Ilybius chalconatus* (Panzer, 1796)
80) *Ilybius fuliginosus fuliginosus* (Fabricius, 1792)
81) *Laccophilus hyalinus* (De Geer, 1774)
82) *Laccophilus minutus* (Linnaeus, 1758)
83) *Laccophilus poecilus* Klug, 1834
84) *Liopterus haemorrhoidalis* (Fabricius, 1787)
85) *Nebrioporus stearinus suavis* (Sharp, 1882)
86) *Rhantus suturalis* (W.S. MacLeay, 1825)
87) *Scarodytes halensis* (Fabricius, 1787)

Family **Gyrinidae**

- 88) *Gyrinus distinctus* Aubé, 1838

Family **Haliplidae**

- 89) *Peltodytes caesus* (Duftschmid, 1805)

Family **Noteridae**

- 90) *Noterus clavicornis* (De Geer, 1774)

Adıyaman ilinden tespit edilen bazı kınkanatlı türlerinin gerçek görüntüleri aşağıda sunulmuştur.



Şekil 2. *Hydrophilus piceus* ergin



Şekil 3. *Hydrophilus piceus* larva



Şekil 4. *Dytiscus marginalis* ergin



Şekil 5. *Dytiscus marginalis* larva

2.2. Diptera

Latince bir kelime olan “dipteros”, Türkçe “iki kanatlılar” anlamına gelmektedir (Lancaster and Downes, 2013; Nair et al., 2015). İngilizce “true flies” (gerçek sinekler) de denilmektedir (Ivkovic et al., 2020). Türkçe iki kanatlılarda denilen bu takımın adı, sahip oldukları bir çift zarımsı kanattan gelmektedir. Birçoğunda birinci çift kanatlardan sonra gelen, uçarken dengeyi sağladığı düşünülen, kısalmış ve körelmiş kanat benzeri adına halter organı da denilen yapılar bulunmaktadır. Resim 5’te halter organı açıkça görülmektedir.

Adıyaman ilinden Diptera takımına bağlı bugüne kadar 18 sucul türün varlığı kaydedilmiştir. Adıyaman ilinden bilinen sucul/yarı sucul dipter türlerinin listesi; Ekingen et al., 1978; Karsavuran et al., 2005; Kılıç, 1999; 2006; Yavaşoğlu et al., 2019 yayınlarından faydalanılarak oluşturulmuştur.

Family **Culicidae**

- 1) *Anopheles sacharovi*
- 2) *Anopheles superpictus*

Family **Tabanidae**

- 3) *Chrysops* (s. str.) *caecutiens* (Linnaeus, 1758)
- 4) *Chrysops* (s. str.) *flavipes* Meigen, 1804
- 5) *Chrysops* (s. str.) *viduatus* (Fabricius, 1794)
- 6) *Chrysops* (*Petersenychrysops*) *hamatus* Loew, 1858
- 7) *Haematopota bigoti* Gobert, 1881
- 8) *Hybomitra acuminata* (Loew, 1858)
- 9) *Hybomitra caucasi* (Szilady, 1923)
- 10) *Hybomitra ciureai* (Seguy, 1937)
- 11) *Silvius* (s.str.) *algirus* Meigen 1830
- 12) *Tabanus anatolicus* Osufjev, Moucha & Chvala, 1967
- 13) *Tabanus bromius* Linnaeus, 1758
- 14) *Tabanus regularis* Jaenicke, 1866
- 15) *Tabanus spectabilis* Loew, 1858
- 16) *Tabanus leleani* Austen, 1920

Family **Chironomidae**

- 17) *Chironomus plumosus* (Linnaeus, 1758)

Chironomidae (Titrer sinekler) larvalarına ait gerçek görüntüler Resim 4 olarak aşağıda sunulmaktadır.



Şekil 6. Diptera: Chironomidae larva

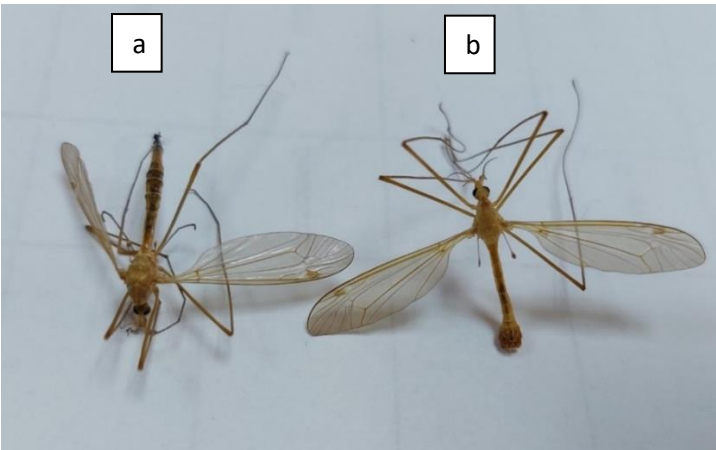
Family **Muscidae**

18) *Musca domestica* Linnaeus, 1758

Kozmopolit bir tür olan, yumurtalarını nemli ve organik atıkların bol olduğu yerlere bırakan ev sineklerini (*Musca domestica*'yı), Adıyaman'da da bol miktarda görmekteyiz. Literatürde doğrudan bulunmasa bile gözlemlerimiz neticesinde dipter listesine eklenmesi uygun görülmüştür.

Family **Tipulidae**

Adıyaman/Gölbaşı göllerinden bir dişi ve bir erkek olmak üzere Diptera: Tipulidae (Çayır sinekleri) familyasına ait örneklerde toplanmıştır. Tür seviyesinde teşhislerini yapamadığımız için listeye eklenmemiştir. Fakat örneklerimize ait gerçek görüntüler Şekil 7 olarak aşağıda sunulmaktadır.



Şekil 7. Diptera: Tipulidae ergin (a): dişi ve (b): erkek.

2.3. Ephemeroptera

Latince bir kelime olan “ephemeros”, Türkçe “bir gün süren” anlamına gelmektedir (Lancaster and Downes, 2013). İngilizce mayflies (mayıs sinekleri), dayflies (bir günlük sinekleri), fishflies (balık sinekleri) ve shadflies (gölge sinekleri) de denilmektedir (Jacobus et al., 2019). Bu takıma ait türlerin erginlerinin ömürleri çok kısa olduğu için “bir günlük sinekleri” olarak adlandırılmaktadırlar.

Adıyaman ilinden Ephemeroptera takımına bağlı bugüne kadar yedi sucul türün kaydı verilmiştir. Bu türlerden; *Oligoneuriella paulopilosa* Sroka in Sroka et al., 2015 ve *Oligoneuriella pectinata* Bojková & Soldán in Sroka et al., 2015 Adıyaman’a endemik olup, ilk kez 2015 yılında Sroka ve arkadaşları tarafından kaydedilmiştir. Adıyaman ilinden bilinen ephemeropter türlerinin listesi; Koch, 1988; Salur et al., 2016 yayınlarından faydalanılarak oluşturulmuştur.

- 1) *Baetis (Baetis) buceratus* Eaton, 1870
- 2) *Baetis (Baetis) lutheri* Müller-Liebenau, 1967
- 3) *Caenis macrura* Stephens, 1835
- 4) *Epeorus (Caucasiron) caucasicus* (Tshernova, 1938)
- 5) *Ephemeralla ignita* (Poda, 1761)
- 6) *Oligoneuriella paulopilosa* Sroka in Sroka et al., 2015
- 7) *Oligoneuriella pectinata* Bojková & Soldán in Sroka et al., 2015

2.4. Hemiptera

Latince bir kelime olan “hemi”, Türkçe “yarım”; “pteron” ise “kanat” anlamına gelmektedir. Bu takıma, adına hemielitra da denilen ön kanatlarının taban kısmı sertleşmiş, uç kısmı ise zarımsı olduğu için bu isim verilmiştir (Lancaster and Downes, 2013). Türkçe yarım kanatlılar denilmektedir.

Adıyaman ilinden Hemiptera takımına bağlı bugüne kadar bir sucul türün varlığı kaydedilmiştir. Bu türlerin listesi: Yazıcı, 2020 yayınından faydalanılarak oluşturulmuştur.

- 1) *Nepa cinerea* Linnaeus, 1758

2.5. Odonata

Latince bir kelime olan “odous”, Türkçe “diş” anlamına gelmektedir. Dişli, tırtıklı alt çenelerinden dolayı bu takıma bu isim verilmiştir (Lancaster and Downes, 2013). Yerel olarak “yusuçuk, su bakireleri, helikopter böcekleri” olarak adlandırılan bu takımın üyeleri, sahip oldukları iri gözleri, uzun karınları, güçlü görümlü kanatları, rengarenk dış görünüşleri ve erginlerinin hızlı ve manevralı uçuş yetenekleri ile diğer böceklerden kolaylıkla ayırt edilmektedirler.

Adıyaman ilinden bugüne kadar Odonata takımına bağlı 22 sucul taxanın varlığı kaydedilmiştir. Adıyaman ilinden bilinen odonat türlerinin listesi; Kalkman et al.,

2004; Salur and Öz Saraç, 2004; Kalkman and Van Pelt, 2006; Ayten and Özgökçe, 2009; Blow et al., 2021 yayınlarından faydalanılarak oluşturulmuştur.

- 1) *Anax parthenope* (Sélys, 1839)
- 2) *Brachythemis fuscopalliata* (Sélys, 1887)
- 3) *Calopteryx splendens intermedia* Sélys, 1887
- 4) *Cercion lindenii* (Sélys, 1840)
- 5) *Coenagrion ornatum* (Sélys, 1850)
- 6) *Crocothemis erythraea* (Brullé, 1832)
- 7) *Epallage fatime* (Charpentier, 1840)
- 8) *Ischnura elegans ebneri* Schmidt, 1938
- 9) *Ischnura intermedia* Dumont, 1974
- 10) *Ischnura pumilio* (Charpentier, 1825)
- 11) *Lestes barbarus* (Fabricius, 1798)
- 12) *Libellula depressa* (Linnaeus, 1758)
- 13) *Lindenia tetraphylla* (Vander Linden, 1825)
- 14) *Orthetrum brunneum* (Fonscolombe, 1837)
- 15) *Orthetrum cancellatum* (Linnaeus, 1758)
- 16) *Orthetrum coerulescens anceps* (Schneider, 1845)
- 17) *Orthetrum sabina* (Drury, 1770)
- 18) *Onychogomphus lefebvrei* (Rambur, 1842)
- 19) *Platycnemis dealbata* Sélys in Sélys & Hagen, 1850
- 20) *Platycnemis kervillei* (Martin, 1909)
- 21) *Sympetrum fonscolombii* (Sélys, 1840)
- 22) *Trithemis annulata* (Palisot de Beauvois, 1805)

Odonata takımına bağlı bir türün gerçek görüntüsü ve larvalara ait integüment kalıntıları aşağıda sunulmuştur.



Şekil 8. (a): Odonata ergin, (b): instar sonrası kalan integüment kalıntıları.

2.6. Plecoptera

Latince bir kelime olan “plektos”, Türkçe “örgülü, şeritli”; “pteron” ise “kanat” anlamına gelmektedir. Kanatlarının belirgin damarlanma özellikleri sebebiyle bu latince kelimeler kullanılarak adlandırılmışlardır (Lancaster and Downes, 2013). Türkçe “taş sinekleri” olarak bilinmektedirler.

Adıyaman ilinden Plecoptera takımına bağlı bugüne kadar iki sucul türün varlığı kaydedilmiştir. Bunlardan biri aynı zamanda ülkemize endemik olup, Adana, Adıyaman, Hatay, İçel, Kahramanmaraş, Kayseri, Malatya ve Niğde illerinden de kaydedilmiştir. Adıyaman ilinden bilinen plekolopter türlerinin listesi: Darılmaz et al., 2016 yayınından faydalanılarak oluşturulmuştur.

- 1) *Nemoura taurica* Zhiltzova, 1967
- 2) *Protonemura bacurianica adana* Vinçon & Zhiltzova, 2004

2.7. Trichoptera

Latince bir kelime olan “tricho”, Türkçe “saç, kıl”; “pteron” “kanat” anlamına gelmektedir (Lancaster and Downes, 2013; Sivaramakrishnan et al., 2018). Vücutlarının ve kanatlarının yüzeyi uzun, ipeksi kıllarla kaplı olduğu için bu isim verilmiştir. Kelebek ve güvelerden de bu yönleri ile ayırt edilmektedirler (Lancaster and Downes, 2013; Sivaramakrishnan et al., 2018; Morse et al., 2019).

Adıyaman ilinden Trichoptera takımına bağlı bugüne kadar sekiz türün varlığı kaydedilmiştir. Adıyaman ilinden bilinen trikopter türlerinin listesi; Darılmaz and Salur, 2015 yayınından faydalanılarak oluşturulmuştur.

- 1) *Rhyacophila nubila* Zetterstedt, 1840
- 2) *Stactobia forsslundi* Schmid, 1959
- 3) *Hydropsyche modesta* Navas, 1925
- 4) *Limnephilus tauricus* Schmid, 1964
- 5) *Micropterna muehleni* McLachlan, 1884
- 6) *Micropterna taurica* Martynov, 1917
- 7) *Micropterna testacea* Gmelin, 1789
- 8) *Stenophylax permistus* McLachlan, 1895

3. Tartışma ve Sonuç

Adıyaman ilinden bugüne kadar yedi takıma ait 148 sucul böcek türünün varlığı kaydedilmiştir. Yapılan literatür taramalarına göre; bunların bazılarının yabancı araştırmacılar tarafından yol kenarlarından yapılan örneklemeler neticesinde olduğu anlaşılmaktadır. Detaylı çalışmaların ise yerli araştırmacılar tarafından son yıllarda yapıldığı ve çok sayıda türün tespit edilerek kaydedildiği belirtilmektedir. Bunların içerisinde, Adıyaman ilimize ve ülkemize endemik olan türlerin de var olduğu görülmektedir. Özellikle Coleoptera takımına bağlı

Hydrochus adiyamanensis Taşar, 2017, *Bidessus anatolicus adiyaman* Aykut, Taşar & Fery, 2021 ve Ephemeroptera takımına bağlı *Oligoneuriella paulopilosa* Sroka in Sroka et al., 2015, *Oligoneuriella pectinata* Bojková & Soldán in Sroka et al., 2015 türleri ülkemize ve Adıyaman ilimize endemik olup, Plecoptera takımına bağlı *Protonemura bacurianica adana* Vinçon & Zhiltzova, 2004 alttürü ise ülkemize endemiktir.

Adıyaman coğrafik yapı olarak; kuzeyi Toros dağları, güneyi ise düzlük ve ovalarla kaplı olan bir ilimizdir. İlin dağlık kısımları birçok göl, gölet, dere, nehir ve su birikintilerine sahip olup, ilin batısında yer alan ve üç gölden (Büyük Göl, İnekli ve Azaplı göllerinden) oluşan Gölbaşı Gölleri, dikkate değer bir tür çeşitliliğine sahiptir. Uzun yıllardan beri var olan bu göl kompleksinin, birçok sucul böcek türene ev sahipliği yaptığını, barındırdığı tür sayısı ile görmekteyiz.

Sucul böcekler sucul ekosistemlerin önemli birer basamağını teşkil etmektedirler. Diğer birçok omurgasız ve omurgalı canlının besin kaynağını oluştururken, çürükçül beslenenler madde döngülerinde önemli bir yere sahiptirler. Parazit olan türlerin yanı sıra kanibalizm de görülmektedir.

Dünyanın çeşitli bölgelerinde, doğrudan ya da dolaylı, insan besin kaynağı olarak tüketilen birçok sucul böcek türü bulunmaktadır. Son dönemlerde böceklerin çiftlik hayvanlarının besin tedarikinde ucuz protein kaynağı olarak kullanılabileceğine dair çeşitli yaklaşımlar ve çalışmalar da olduğu bildirilmektedir (Taşar ve Canlı Taşar, 2022).

Adıyaman ilimizden bugüne kadar, sucul kınkanatlılar dışında diğer sucul takımlara ait detaylı bir çalışmanın yapılmadığı görülmektedir. Kınkanatlılar dışındaki diğer sucul türleri barındıran takımlara has ayrıntılı çalışmaların yapılmasıyla, Adıyaman ilimizin sucul böcek varlığının tespiti, tam olarak ortaya konulabilecektir. Bu çalışma, ileride yapılacak araştırmalara detaylı bir veri tabanı olacak ve bu konuda çalışan araştırmacılara da kolaylıklar sunacaktır.

4. Kaynaklar

1. Aykut, M., Taşar G. E., and Fery H. 2021. *Bidessus anatolicus adiyaman* ssp. n. from Adıyaman province, southern Turkey (Coleoptera, Dytiscidae, Bidessini). *Zootaxa* 5027: 4.
2. Aykut, M., and Taşar G. E. 2018. Contributions to the Knowledge of Adephegan Fauna in Adıyaman Province, Turkey (Coleoptera: Dytiscidae, Gyrinidae, Haliplidae and Noteridae). *Munis Entomology and Zoology* 13(1): 249-255.
3. Ayten, Y., ve Özgökçe, M. S. 2009. Van ve Çevresinde Bulunan Odonata Türleri, Yayılışları ve Habitatları. *YYÜ Tarım Bilimleri Dergisi* 19:1, 1-9.
4. Blow, R., Willink, B., and Svensson, E. I. 2021. A molecular phylogeny of forktail damselflies (genus *Ischnura*) reveals a dynamic macroevolutionary history of female colour polymorphisms. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 160:107134.
5. Darılmaz, M. C., Salur, A., Muranyi, D., and Vinçon G. 2016. Contribution to the Knowledge of Turkish Stonflies with Annotated Catalogue (Insecta: Plecoptera). *Zootaxa* 4074:1, 1-74.
6. Darılmaz, M. C., ve Salur, A. 2015. Annotated Catalogue of the Turkish Caddisflies (Insecta: Trichoptera). *Munis Entomology and Zoology* 10:2 521-734.
7. Ekingen, G., Şahin, Y., ve Özdemir, Y. 1978. Gölbaşı (Adıyaman) Gölü'nün Limnolojik Etüdü.
8. Ivkovic, M., Doric, V., Baranov, V., Mihaljevic, Z., Kolcsar, L-P., Kvitte, G. M., Nerudova, J., and Pont, A. C. 2020. Checklist of Aquatic Diptera (Insecta) of Plitvice Lakes Natinal Park, Croatia, a Unesco World Heritage Site. *Zookeys*, 918: 99-142.
9. Jacobus, L. M., Macadam, C. R., and Sartori, M. 2019. Mayflies (Ephemeroptera) and Their Contributions to Ecosystem Services. *Insects*, 2019-10-170.
10. Kalkman, V. J., Lopau, W., and Van Pelt, G. J. 2004. Hitherto unpublished records of dragonflies from Turkey (Odonata), *Libellula* (Suppl.) 5, 65-166.
11. Kalkman, V. J., and Van Pelt, G. J. 2006. New records of rare or uncommon dragonflies in Turkey (Odonata), *Brachytron* 10, 154-162.
12. Karsavuran, Y., Pehlivan, E., Tezcan, S., and Kılıç, A. Y. 2005. Notes on Tabanidae (Diptera) fauna of Turkey. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 29(3): 187-195.
13. Kılıç, A. Y. 1999. Checklist of Tabanidae (Diptera) from Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 23(2): 123-12.

14. Kılıç, A. Y. 2006. New Additions and Errata to the Checklist of Tabanidae (Insecta: Diptera) Fauna of Turkey. Turkish Journal of Zoology, 30(4): 335-343.
15. Koch, S. 1988. Mayflies of the Northern Levant (Insecta: Ephemeroptera). Zoology in the Middle East, 2: 89-112.
16. Lancaster, J., and Downes, B. J. 2013. Aquatic Entomology. Oxford University Press. 275pp.
17. Morse, J. C., Frandsen, P. B., Graf, W., and Thomas, J. A. 2019. Diversity and ecosystem services of Tricoptera. Insects. 10: 125.
18. Nair, G. A., Morse, J. C., and Marshall S. A. 2015. Aquatic insects and their societal benefits and risks. Journal of Entomology and Zoology Studies, 3(3): 171-177.
19. Resh, V. H., and Carde, R. T. 2009. Encyclopedia of Insects. Elsevier/Academic Press, 1132 pp. ISBN: 1849728062, 9781849728065.
20. Salur, A., ve Öz Saraç, Ö. 2004. Additional Notes on the Odonata Fauna of Çiçek Dağı (Kırşehir), Turkey. G. U. Journal of Science 17: 1, 11-19.
21. Salur, A., Darılmaz, M.C., and Bauernfeind, E. 2016. An Annotated Catalogue of the Mayfly Fauna of Turkey (Insecta, Ephemeroptera). Zookeys, 620 67-118.
22. Sivaramkrishnan, K. G., Selvakumar, C., and Subramanian, K. A. 2018. Insecta: Tricoptera (Caddisflies). Insect Biodiversity. Chapter 26: 419-428.
23. Sroka, P., Bojkova, J., Soldan, T., and Godunko, R. J. 2015. New species of the genus *Oligoneuriella* Ulmer, 1924 (Ephemeroptera: Oligoneuriidae) from Turkey, Zootaxa 4012(2): 329-350.
24. Taşar, G. E. 2014a. The Occurrence of the Subgenus *Methydrus* Rey, 1885 in Turkey (Coleoptera: Hydrophilidae), with Taxonomic and Distributional Notes. Munis Entomology and Zoology 9(1): 478-482.
25. Taşar, G. E. 2014b. A Contribution to the Knowledge of Turkish Dryopidae, Elmidae and Heteroceridae (Coleoptera: Byrrhoidea) Fauna. Archives of Biological Sciences, Belgrade 66(4): 1473-1478.
26. Taşar, G. E. 2017a. Hydrophiloidea (Coleoptera: Helophoridae, Hydrochidae and Hydrophilidae) Fauna of Adıyaman Province. KSÜ Journal of Naturel Sciences 20(2): 103-110.
27. Taşar, G. E. 2017b. *Hydrochus adıyamanensis* sp. n. from Adıyaman Province in south-eastern Turkey (Coleoptera: Hydrochidae). Zoology in the Middle East 63(4): 356-361.
28. Taşar, G. E. 2018. Checklist of Dryopidae and Elmidae (Coleoptera: Byrrhoidea) of Turkey. Biharean Biologist 12: 1 1-6.

29. Taşar, G. E., ve Canlı Taşar, Ö. 2022. İnsan Natural and Technology Sciences, Bölüm Adı: Yenilebilir Sucul Böcekler, Yayın Yeri: Duvar Kitabevi, Editör: Mustafa Tolga Çöğürçü, Mehmet Uzun, Sayfa sayısı: 416, Bölüm Sayfaları: 115-132. ISBN:978-625-8109-01-6.
30. Tel, A. Z., Furkan, M. K., ve Satıl, F. 2021. Adıyaman İlinde El Sanatlarında Yararlanılan Bitkiler Üzerine Etnobotanik Bir Araştırma. Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 22 (2): 229-238.
31. Yavaşoğlu, S. İ., Yaylagül, E. Ö., Akıner, M. M., Ülger, C., Çağlar, S. S., and Şimşek, F. M. 2019. Current insecticide resistance status in *Anopheles sacharovi* and *Anopheles superpictus* populations in former malaria endemic areas of Turkey. Acta Tropica, 193: 148-157.
32. Yazıcı, G. 2020. Overview of the Zoogeographical Distribution of Aquatic and Semi-Aquatic Hemiptera (Hemiptera) in Turkey. Journal of Insect Biodiversity and Systematics. 6(2): 135-155.

8. Bölüm

ZnO Nanoparçacık Katkılı Nematik Sıvı Kristal Yapının Dielektrik Özelliklerinin Araştırılması

Gülnur ÖNSAL¹

Mustafa AKSOY²

1 Temel Bilimler Bölümü, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, İzmir Bakırçay Üniversitesi, İzmir, TÜRKİYE, gulnur.onsal@bakircay.edu.tr

2 Akıllı Sistemler Mühendisliği Bölümü, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İzmir Bakırçay Üniversitesi, İzmir, TÜRKİYE

GİRİŞ

Sıvı kristal yapılar, moleküller arası bağ kuvvetleri zayıf olduğundan elektrik alan, manyetik alan, sıcaklık ve basınç gibi dış etkilere karşı yüksek hassasiyet gösterirler. Moleküler yönelimleri bu etkiler ile kolaylıkla değiştirilebildiği için araştırmacılar tarafından yoğun çalışılan, popüler malzemeler haline gelmişlerdir (Tripathi vd., 2013).

Sıvı kristaller morfolojik, elektro-optik ve dielektrik özelliklerinin iyileştirilmesi, kullanım alanlarında daha yüksek performans ve daha düşük enerji tüketimi gibi önemli özelliklerinin geliştirilmesi için kuantum noktaları, ftalosiyanimler, polimerler ve karbon nanotüpler gibi bazı özel malzemeler ile katılanmaktadır (Kocakulah vd., 2018). Ayrıca son yıllarda sıvı kristallerin Çinko oksit (ZnO) (Eskalen vd., 2021), Titanyum Dioksit (TiO₂) (Pathak vd., 2017), Baryum Titanat (BaTiO₃) (Dubey vd., 2017) gibi çeşitli nanoparçacıklar (NP) ile katılanmasının sıvı kristal yapıların performansını artırabildiği görülmekte ve sıvı kristal tabanlı cihazlar yoğun olarak araştırılmaktadır (Hsu vd., 2017). Literatür incelendiğinde, sıvı kristallerin özellikle metal oksit içerikli NP'lar ile farklı oranlarda katıldığı, katkının sıvı kristalin elektro-optik ve dielektrik özelliklerinde önemli iyileştirmelere neden olduğu görülmektedir (Monohar vd., 2009; Eskalen vd., 2015; Sharma vd. 2019).

Bu metal oksit nano malzemeler arasında, II-VI grubu bir bileşik olan ZnO, oda sıcaklığında yaklaşık 60 meV'lik bağlanma enerjisine ve 3,37 eV'lik doğrudan bant aralığına sahip, geniş bant aralıklı bir yarı iletkenidir. Ayrıca; şeffaflığı, yüksek elektron hareketliliği, zararsızlığı, düşük maliyetli olması, oda sıcaklığındaki kimyasal karakteristiği, optik ve elektriksel özellikleri nedeniyle ZnO opto-elektronik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Supreet vd., 2013).

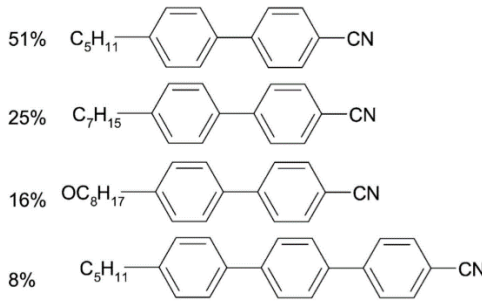
Birçok araştırmacı ZnO katkısının sıvı kristalin karakterizasyonuna olan etkisini araştırmıştır. Tripathi ve arkadaşları 2012'de MBBA sıvı kristaline %0,5, %1,0 ve %1,5 oranlarında katılanan %8 Cu²⁺ katkılı ZnO nanoparçacığının, sıvı kristalin eşik voltajını arttırdığı, fakat anahtarlama davranışında iyileşmeye neden olduğunu rapor etmiştir. 2013 yılında yapılan araştırmalarında ise MBEA nematik sıvı kristaline %0,5 ve %1 oranlarında yapılan ZnO katkısının, sistemin dielektrik özelliklerini güçlü bir şekilde etkilediği rapor edilmiştir (Tripathi vd., 2012; Tripathi vd., 2013). Eskalen ve arkadaşlarının 2015 yılında yapılan çalışmalarında E7 sıvı kristaline %1, %2 ve %4 oranlarında yapılan ZnO katkısının eşik voltajını önemli ölçüde düşürdüğü rapor edilmiştir (Eskalen vd., 2015). Aynı zamanda Sharma ve arkadaşları 2019 yılında yaptıkları araştırma ile E7 sıvı kristaline %0,5 oranında katılanan ZnO nanoparçacığının eşik voltajını

düşürdüğü, çift kırılma ve CR (kontrast oranı)'da artışa neden olduğunu bildirmişlerdir (Sharma vd., 2019).

Literatürde farklı kimyasal özelliklere sahip farklı sıvı kristal yapılara katılan ZnO nano malzemesinin sıvı kristal yapının özelliklerini önemli ölçüde etkilediği görülmektedir. Fakat incelenen özellikler daha çok elektro-optik parametrelerdir. Bu çalışmada E7 sıvı kristal yapıya ağırlıkça %1 oranında katılan ZnO nanoparçacığının saf sıvı kristal yapının dielektrik özelliklerine etkisi detaylı olarak araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada, kimyasal yapısı Şekil 1'de verilen ve ticari olarak Merck firmasında temin edilen E7 kodlu nematik sıvı kristal yapı kullanılmıştır (Eskalen vd., 2015). E7 düşük frekansta pozitif dielektrik anizotropiye sahip ($\Delta\epsilon' = +13,8$), geniş bir sıcaklık aralığında özelliğini koruyabilen, araştırmacılar tarafından çok tercih edilen bir sıvı kristaldir.



Şekil 1. E7 nematik sıvı kristal karışımının kimyasal bileşimi.

E7 saf sıvı kristal içerisine ağırlıkça %1 oranında ZnO NP katılmıştır. Homojenliğin sağlanması için karışım 50 °C'de 3 saat ultrasonik banyoda bekletilmiştir. ZnO NP'nin çözülmesi için çözücü olarak yapıya kloroform eklenmiştir ve örnekler tekrar 10 saat 50 °C'de ultrasonik banyoda karıştırılmıştır. Çözücünün uzaklaştırılması için örnekler 30 dakika 60 °C'de ısıya maruz bırakılmıştır ve 1 gece oda sıcaklığında bekletilmiştir. Elde edilen ZnO katkılı Sıvı Kristal kompozit yapının ölçümlerinin yapılabilmesi için indiyum kalay oksit (ITO) kaplı sıvı kristal hücrelere örnekler kılcallık yöntemi ile doldurulmuştur. Kullanılan ITO kaplı hücreler planar yönelimli 7,7 µm kalınlığında, 100 Ω/cm² yüzey direncine sahiptir ve INSTECH firmasından temin edilmiştir.

Saf ve ZnO katkılı kompozit yapının dielektrik ölçümü Novocontrol Alpha A Dielektrik/Empedans Analizörü kullanılarak 100 Hz-10MHz frekans aralığında, oda sıcaklığında yapılmıştır.

BULGULAR

Dielektrik spektroskopi, kutuplanabilme özelliğine sahip sıvı kristallerin, iletkenlik ve polarizasyon gibi farklı fiziksel özelliklerinin sıcaklık, voltaj ve frekansa bağlı olarak ölçülmesini sağlayan önemli bir araçtır. Bu ölçümler ile sıvı kristallerin moleküler arası etkileşim mekanizmaları hakkında ayrıntılı bilgi elde edilebilir (Jayoti vd., 2018). Sıvı kristal malzemelerin dielektrik özelliklerini belirlemede ana parametre olan karmaşık dielektrik sabiti (ϵ^*), şu şekilde ifade edilir (Kocakülah vd., 2015);

$$\epsilon^* = \epsilon' - \epsilon'' \quad (1)$$

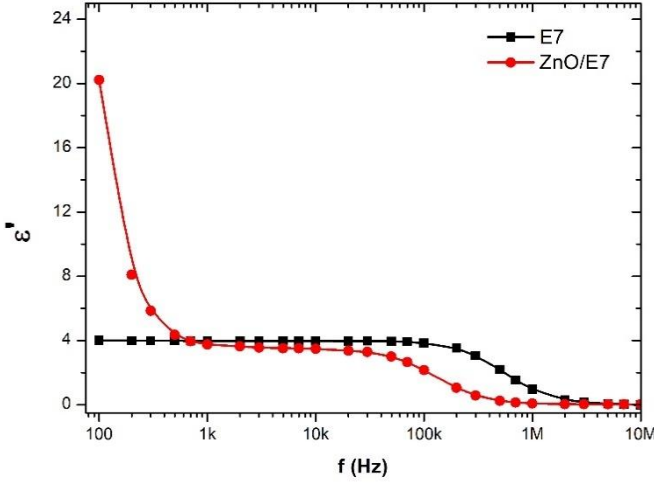
Burada ϵ' karmaşık dielektrik sabitinin gerçek kısmını, ϵ'' ise karmaşık dielektrik sabitinin sanal kısmını temsil eder ϵ' , malzemede depolanan enerjinin, ϵ'' ise malzemede enerji kaybının bir ölçüsüdür. Paralel iletken plakalar arasında yarı iletken sıvı kristal bulunan ve bir nevi kondansatör olan sıvı kristal hücrelerin dielektrik özellikleri aşağıdaki denklem ile ifade edilebilir;

$$\epsilon' = \frac{Cd}{\epsilon_0 A} = \frac{C}{C_0} \quad (2)$$

$$\epsilon'' = \frac{Gd}{\omega \epsilon_0 A} = \frac{G}{\omega C_0} \quad (3)$$

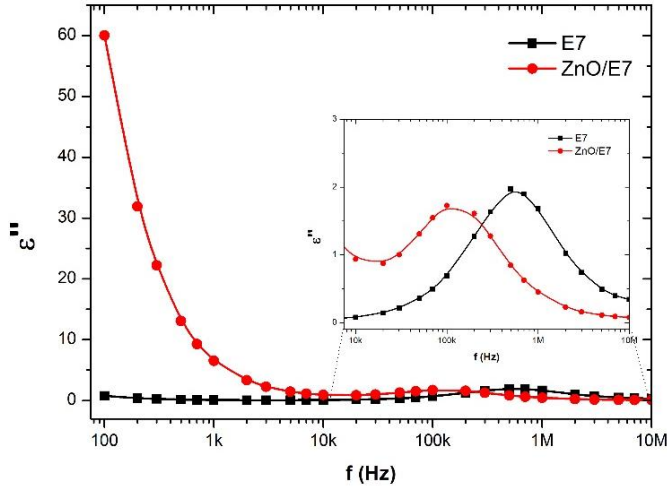
burada, C malzemelerin kapasitans değeri, G iletkenlik değerleridir. C_0 ortamda dielektrik malzeme olmadığı durumdaki kapasitansı, ϵ_0 boşluğun dielektrik sabitidir ($\epsilon_0 = 8,85 \times 10^{-14} F/cm$). A sıvı kristal hücrede iletken bölgenin yüzey alanıdır ve d sıvı kristal hücresinin kalınlığını ifade eder (Özmen vd., 2012).

Dielektrik sabitinin gerçek (ϵ') ve sanal (ϵ'') değerinin frekansa bağlı değişimi, saf ve ZnO katkılı sıvı kristal yapılar için incelenmiştir ve sırasıyla Şekil 2 ve Şekil 3 ile verilmiştir.



Şekil 2. Örneklerin $\epsilon' - f$ grafiği.

Şekil 2, 1 V gerilim değerinde, saf ve ZnO katkılı sıvı kristal kompozitlerin frekansa bağlı ϵ' değerlerini göstermektedir. Sıvı kristal hücresindeki dielektrik ortam, harici bir elektrik alanına maruz kaldığında, dielektrik gevşeme yoluyla yeni bir denge durumuna geçer, uygulanan elektrik alanın frekansın artması, dielektrik sabitin azalmasıyla sonuçlanır. Moleküllerin kutuplanabilirliği, iyonik iletkenlik ve yüzler arası yönelim nedeniyle artan frekansla ϵ' değerleri düşmüştür (Karakuş vd., 2011). Şekilde, ZnO katkılı sıvı kristal kompozit yapının ϵ' değerinin, saf sıvı kristale göre düşük frekans bölgesinde oldukça yüksek olduğu görülmektedir. ϵ' değerindeki artış, NP ve sıvı kristal arasındaki moleküler etkileşimin artmasıyla açıklanabilir. Bu etkileşimlerin kompozit yapıdaki net dipol momentinde bir artışa yol açtığı, bu nedenle ϵ' değerinin arttığı düşünülmektedir. Yaklaşık 1 kHz'den sonra ZnO katkısının ϵ' üzerindeki etkisinin değiştiği görülmektedir. ZnO NP katkılı sıvı kristal kompozit yapı bu frekanstan sonra saf sıvı kristalden daha düşük ϵ' değerlerine sahiptir. Moleküllerin anti-paralel yöneliminden dolayı net dipol momentinde azalma meydana geldiğinden dolayı ϵ' değerinin azaldığı düşünülmektedir (Eskalen vd., 2021 ; Kocakulah vd., 2020).



Şekil 3. Örneklerin $\epsilon'' - f$ grafiği.

Şekil 3, 1 V gerilim altında, saf ve ZnO katkılı sıvı kristal kompozitlerin frekansa bağlı ϵ'' değerlerini göstermektedir. Şekilde, ZnO NP katkısının özellikle düşük frekans bölgesinde saf sıvı kristale göre ϵ'' değerini arttırdığı görülmektedir. Bu durum, ZnO NP ve saf sıvı kristal molekülleri arasındaki boyut farkına bağlanabilir. Bu fark, NP'lerin sıvı kristal molekülleri için bir bariyer oluşturmasına neden olur. Bu nedenle katkılı sıvı kristal kompozit yapıda enerji kaybı daha yüksektir (Singh vd., 2013). Bu artışın diğer nedeni, katkı nedeniyle artan elektriksel iletkenlikten veya ZnO NP ve Sıvı Kristal ara yüz bölgeleriyle ilişkili olabilir (Prasad vd., 2013).

Relaksasyon frekansı, araştırılan sıvı kristal sistemlerinin polarize edilebilirliği ve moleküler hareketi hakkında bilgi veren önemli bir parametredir (Özmen vd., 2012). Relaksasyon frekansı (f_R), $\epsilon'' - f$ grafiğinin tepe noktasından bulunabilir. Bu nokta yaklaşık olarak $\epsilon' - f$ grafiğinin orta noktasıdır. Örneklerin f_R değerleri Çizelge 1'de verilmiştir. ZnO katkısı ile relaksasyon frekansının düşük frekans bölgesine doğru kaydığı Şekil 3'ten görülmektedir. Bunun sebebi sıvı kristal malzemeye yapılan ZnO katkısının, moleküler etkileşimi arttırdığı ve dolayısıyla ankraj kuvvetinin azalması olabilir (Kocakulah ve Köysal, 2022). Genellikle, sıvı kristal moleküler sistemi, kısa eksen ve uzun eksen etrafında dönme olan iki farklı moleküler harekete sahiptir. Relaksasyon frekansı yaklaşık kHz-MHz aralığında meydana gelirse, moleküllerin flip-flop hareketi olarak adlandırılan kısa eksen etrafında döndüğü söylenebilir (Sharma vd., 2019).

Çizelge 1. Kompozit yapıların bazı önemli dielektrik parametreleri.

	f_R (kHz)	τ (μ s)	$\delta\varepsilon'$	α
E7	560	0,283	3,984	0,991
ZnO/E7	125	1,291	3,525	0,974

Sıvı kristal moleküllerinin dielektrik relaksasyon davranışı Cole-Cole modeli ile detaylı olarak analiz edilebilir ve Cole-Cole denklemi aşağıdaki denklem olarak ifade edilir (Katariya Jain ve Deshmukh, 2019);

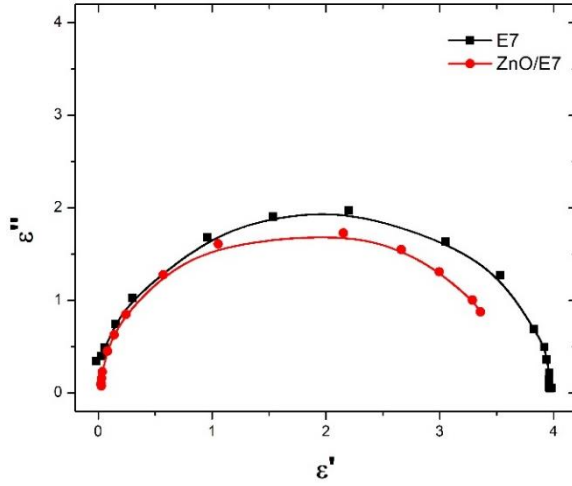
$$\varepsilon^* = \varepsilon'_{\infty} + \frac{\varepsilon'_s - \varepsilon'_{\infty}}{1 + (i\omega\tau)^{(1-\alpha)}} \quad (4)$$

burada ε'_s ve ε'_{∞} düşük ve yüksek frekans bölgesinde ε' değeridir. ω açısal frekans, τ relaksasyon zamanı ve α dağılım parametresini ifade eder. ε' ve ε'' parametreleri, Denklem (1)'i kullandıktan sonra cole-cole denklemi referans alınarak aşağıdaki şekilde ifade edilebilir (Kocakulah vd., 2020);

$$\varepsilon' = \varepsilon'_{\infty} + (\varepsilon'_s - \varepsilon'_{\infty}) \frac{1 + (\omega\tau)^n \cos\left(\frac{n\pi}{2}\right)}{1 + 2(\omega\tau)^n \cos\left(\frac{n\pi}{2}\right) + (\omega\tau)^{2n}} \quad (5)$$

$$\varepsilon'' = (\varepsilon'_s - \varepsilon'_{\infty}) \frac{(\omega\tau)^n \sin\left(\frac{n\pi}{2}\right)}{1 + 2(\omega\tau)^n \cos\left(\frac{n\pi}{2}\right) + (\omega\tau)^{2n}} \quad (6)$$

burada $n = (1 - \alpha)$ olarak ifade edilir. Cole–Cole denkleminden yararlanılarak, α , τ , $\delta\varepsilon'$ gibi bazı önemli dielektrik parametreler hesaplanmıştır ve değerler Çizelge 1 ile verilmiştir. τ değerinin ZnO katkısı ile arttığı görülmektedir. Relaksasyon zamanı relaksasyon frekansı ile ters orantılı olduğu için bu beklenen bir sonuçtur ($\tau = 1/2\pi f_R$). Bu artışın sebebi ZnO nanoparçacıklar ve sıvı kristal molekülleri arasındaki sürtünme nedeniyle moleküllerin ilk konumlarına dönmek için daha fazla zamana ihtiyacı duymasıdır (Kocakulah vd., 2020).



Şekil 4. Cole-Cole grafiği.

α , dağılım parametresi 0 ile 1 arasında herhangi bir değer alabilir. α sifıra eşit olduğunda, moleküller tek gevşeme davranışı gösterir; bu durum Debye modeline karşılık gelir. α sifıra eşit olmadığında ise, moleküller ikincil gevşeme davranışı gösterir, bu da Debye olmayan modele karşılık gelir. Yüksek frekans bölgesinde sıvı kristal moleküllerinin dielektrik relaksasyon davranışının kapsamlı değerlendirmesi için örneklerin Cole-Cole grafikleri de çizilmiştir (Şekil 4). E7 ve ZnO/E7 için Şekil 4 incelendiğinde Cole-Cole grafiğinin bir yarım daire oluşturduğu görülmektedir. Debye modelinde yarım dairelerin merkezi ϵ' ekseninin üzerinde yer alır. Yarım dairelerin merkezi ϵ' ekseninin altındaysa, numuneler Debye tipi olmayan gevşeme davranışı sergiler (Katariya Jain ve Deshmukh, 2019). α değerleri ve Cole-Cole grafiği birlikte değerlendirildiğinde, saf sıvı kristal yapının yaklaşık Debye tipi gevşeme davranışı gösterdiği görülmüştür.

Malzemeler için dielektrik dayanım ($\delta\epsilon' = (\epsilon'_s - \epsilon'_\infty)$) değeri kırılmanın meydana gelmesinden önce voltaja karşılık gelen değer olarak tanımlanır. ZnO katkılı sıvı kristal kompozit yapı için dielektrik dayanım değerinin saf E7'ye göre küçüldüğü görülmektedir. ϵ'_∞ değeri yüksek frekanslarda sifıra yaklaşırken, ϵ'_s farklı kompozitler için düşük frekanslarda değişken değerler alabilir. Bu sonuçlar ZnO katkısının sıvı kristalin dielektrik özelliklerini ve relaksasyon mekanizmasını önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada ZnO yarı iletken nano malzemenin E7 nematik sıvı kristal yapıların dielektrik özellikleri üzerindeki etkileri kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Deneysel sonuçlar, kompozit yapıda artan moleküler etkileşim nedeniyle ϵ' ve ϵ'' değerlerinin özellikle düşük frekans bölgesinde ZnO katkısı ile arttığını göstermektedir. Dielektrik özellikler için önemli parametreler olan relaksasyon frekansı ve relaksasyon zamanı da E7 ve ZnO/E7 için belirlenmiştir. Maksimum enerji kaybının olduğu frekans değerine karşılık gelen relaksasyon frekansı ZnO katkısı ile azalmıştır. Relaksasyon frekansı ile ters orantılı olan relaksasyon zamanı ise ZnO katkısı ile artmıştır. Ayrıca her bir örnek için $\delta\epsilon'$ ve α değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar örneklerin neredeyse Debye modeline yakın davrandığı göstermektedir. Tüm sonuçlar beraber değerlendirildiğinde, saf E7'nin dielektrik özelliklerinin, sıvı kristale ZnO katkılanmasıyla önemli ölçüde iyileştiği görülmektedir. Bu sebeple çalışmanın sıvı kristal tabanlı cihaz uygulamalarına önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma İzmir Bakırçay Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından TEZ.2021.004 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Dubey, R., Mishra, A., Singh, K. N., Alapati, P. R., & Dhar, R., 2017. Electric behaviour of a Schiff's base liquid crystal compound doped with a low concentration of BaTiO₃ nanoparticles. *Journal of Molecular Liquids*, 225, 496-501.
2. Eskalen, H., Özgan, Ş., ALVER, Ü., Kerli, S., 2015. Electro-Optical Properties of Liquid Crystals Composite with Zinc Oxide Nanoparticles. *Acta Physica Polonica*, A. 127.
3. Eskalen, H., Uruş, S., Özgan, Ş., 2021. Microwave-Assisted Synthesis of Mushrooms Like MWCNT/SiO₂@ZnO Nanocomposite: Influence on Nematic Liquid Crystal E7 and Highly Effective Photocatalytic Activity in Degradation of Methyl Blue. *J Inorg Organomet Polym* 31, 763–775.
4. Hsu, C. J., Lin, L. J., Huang, M. K., & Huang, C. Y., 2017. Electro-optical effect of gold nanoparticle dispersed in nematic liquid crystals. *Crystals*, 7(10), 287.
5. Jayoti, D., Malik, P., Prasad, S.K., 2018. Effect of ZnO nanoparticles on the morphology, dielectric, electro-optic and photo luminescence properties of a confined ferroelectric liquid crystal material. *Journal of Molecular Liquids* 250, 381–387.
6. Karakuş, Y., Okutan, M., Kösemen, A., San, S.E., Alpaslan, Z., Demir, A., 2011. Electrical properties of Zn-phthalocyanine and poly (3-hexylthiophene) doped nematic liquid crystal. *J. Nanomaterials* 2011, 2:1-2:5.
7. Katariya Jain, A., Deshmukh, R.R., 2019. Electro-optical and dielectric study of multi-walled carbon nanotube doped polymer dispersed liquid crystal films. *Liquid Crystals* 46, 1191–1202.
8. Kocakulah, G., Köysal, O., 2022. Electro-optical and dielectric response of quantum dot-doped cholesteric liquid crystal composites. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* 33, 5489–5500.
9. Kocakulah, G., Önsal, G., Goksen, K., Ercan, İ., Köysal, O., 2018. Concentration effect of Cadmium Selenide Sulphide/Zinc Sulphide quantum dots on electro-optic and dielectric properties in nematic liquid crystals composite. *Physica B: Condensed Matter* 550, 47–59.
10. Kocakulah, G., Önsal, G., Köysal, O., 2019. Dielectric properties of CdSeS/ZnS quantum dots doped PMMA/LC composite structure. *Phase Transitions* 92, 907–915.
11. Kocakulah, G., Yıldırım, M., Köysal, O., 2020. Effect of intermolecular charge transfer between Ni(II)Pc and CdSeS/ZnS QD on dielectric

- relaxation mechanism of 5CB nematic liquid crystals in the presence of UV illumination. *J Mater Sci: Mater Electron* 31, 2583–2590.
12. Manohar, R., Yadav, S.P., Srivastava, A.K., Misra, A.K., Pandey, K.K., Sharma, P.K., Pandey, A.C., 2009. Zinc Oxide (1% Cu) Nanoparticle in Nematic Liquid Crystal: Dielectric and Electro-Optical Study. *Jpn. J. Appl. Phys.* 48, 101501.
 13. Özmen, Ö.T., Goksen, K., Demir, A., Durmuş, M., Köysal, O., 2012. Investigation of photoinduced change of dielectric and electrical properties of indium (III) phthalocyanine and fullerene doped nematic liquid crystal. *Synthetic Metals* 162, 2188–2192.
 14. Pathak, G., Pandey, S., Katiyar, R., Srivastava, A., Dabrowski, R., Garbat, K., & Manohar, R., 2017. Analysis of photoluminescence, UV absorbance, optical band gap and threshold voltage of TiO₂ nanoparticles dispersed in high birefringence nematic liquid crystal towards its application in display and photovoltaic devices. *Journal of Luminescence*, 192, 33-39.
 15. Prasad, S.K., Kumar, M.V., Shilpa, T., Yelamaggad, C.V., 2013. Enhancement of electrical conductivity, dielectric anisotropy and director relaxation frequency in composites of gold nanoparticle and a weakly polar nematic liquid crystal. *RSC Adv.* 4, 4453–4462.
 16. Sharma, A., Malik, P., Dhar, R., Kumar, P., 2019a. Improvement in electro-optical and dielectric characteristics of ZnO nanoparticles dispersed in a nematic liquid crystal mixture. *Bull Mater Sci* 42, 215.
 17. Sharma, A., Malik, P., Kumar, P., 2019b. Electro-Optical and Dielectric Responses of ZnO Nanoparticles Doped Nematic Liquid Crystal in In-Plane Switching (IPS) Mode. *Integrated Ferroelectrics* 202, 52–66.
 18. Singh, D.P., Gupta, S.K., Pandey, K.K., Yadav, S.P., Varia, M.C., Manohar, R., 2013. Ferroelectric liquid crystal matrix dispersed with Cu doped ZnO nanoparticles. *Journal of Non-Crystalline Solids* 363, 178–186.
 19. Supreet, Kumar, S., Raina, K.K., Pratibha, R., 2013. Enhanced stability of the columnar matrix in a discotic liquid crystal by insertion of ZnO nanoparticles. *Liquid Crystals* 40, 228–236.
 20. Tripathi, P.K., Misra, A.K., Manohar, S., Gupta, S.K., Manohar, R., 2012. Improved dielectric and electro-optical parameters of ZnO nano-particle (8% Cu²⁺) doped nematic liquid crystal. *Journal of Molecular Structure* 1035, 371–377.
 21. Tripathi, P.K., Misra, A.K., Pandey, K.K., Manohar, R., 2013. Study on dielectric and optical properties of ZnO doped nematic liquid crystal in low frequency region. *Chem. Rapid Commun* 1, 20–26.

9. Bölüm

Ananas Comosus Kabuğundan Çinko Oksit Nanopartiküllerin (zno-np) Biyosentezi ve Yapısının Aydınlatılması

Kadri KURT¹

¹ Batman Üniversitesi, Beşiri OSB Meslek Yüksekokulu, Elektrik ve Elektronik Bölümü, Batman, Türkiye. Email: kadridewani@gmail.com, ORCID: 0000-0002-6507-8234

1. GİRİŞ

“Yeni yüzyılın sanayi devrimi” olan nanoteknoloji, nano ölçekli (1-100 nm) malzemelerin boyut ve şeklinin kontrollü manipülasyonu ile yapıların, sistemlerin ve cihazların tasarımı, karakterizasyonu ve uygulamasını içeren bir teknolojidir (Santhoshkumar ve ark., 2017; Basnet ve ark., 2018). Nano boyutlu partiküller, yüksek yüzey-hacim oranları nedeniyle geliştirilmiş termal iletkenlik, katalitik reaktivite, doğrusal olmayan optik performans ve kimyasal kararlılığa sahip parçacıklardır. Söz konusu yüksek yüzey-hacim oranları, yüzeydeki atomların merkezdekilerden daha aktif olma eğilimleri nedeniyle, nanomalzemenin yığın malzemedan daha reaktif olmasını sağlamaktadır (Agarwal ve ark., 2017; Jayachandran ve ark., 2021; Hatipoglu ve ark., 2022).

Metal oksit nanopartikülleri, yığın muadillerine kıyasla, ağır (ekstrem) koşullarda daha kararlıdır, düşük konsantrasyonlarda antimikrobiyal aktivite sergiler ve insanlar için toksisite düzeyi yok denecek kadar azdır (Malandrakis ve ark., 2019). Bu nanomalzemeler, tarım, eczacılık, tıp ve tekstilde kullanılmaya başlanmış, öte yandan güneş pilleri, fotodetektörler ve fotokatalizdeki potansiyel teknolojik uygulamaları nedeniyle son yıllarda yoğun bir şekilde üzerinde çalışılan ve bilim camiasında büyük ilgi gören malzemeler arasında yerini almıştır (Nava ve ark., 2017a; Akintelu ve Folorunso, 2020).

Özellikle geniş bant aralığı enerjisi (3.37 eV) ve yüksek eksiton bağlanma enerjisine (60 meV) sahip yarı iletken bir madde olan Çinko oksit (ZnO) benzersiz optik, termal ve kimyasal kararlılığa sahiptir. Düşük maliyetli ve toksik olmayan ZnO en güvenli metallerden biridir. ZnO’in dünya çapında üretimi silisyum dioksit (SiO₂) ve titanyum dioksitten (TiO₂) sonra en yüksek düzeydedir. Ayrıca yerkabuğunun içinde mineral bir çinkoit olarak bulunan ZnO, en sert malzemelerden biri olduğundan çalışma sırasında dislokasyon bozulmasından etkilenmez (Suresh ve ark., 2015; Mirzaei ve Darroudi, 2017; Nava ve ark., 2017b; Ramesh ve ark., 2021). ZnO nanopartiküllerinin, kaplama, antimikrobiyal tedavi, antioksidan aktivite, kozmetik, tıp, fotokataliz, güneş pilleri, elektrotlar, akıllı UV sensörleri, biyosensörler, pestisitler, güneş koruyucu malzemeler, tarım (kuraklık toleransını artıran ajan ve ürünlerin besin kaynağı) ve antimikrobiyal ajanlardaki uygulamaları dikkat çekicidir (Wang ve ark., 2018; Akintelu ve Folorunso, 2020; Pillai ve ark., 2020).

ZnO nanopartiküller kimyasal, fiziksel veya biyolojik yöntemler kullanılarak elde edilebilir. Kimyasal yöntemler, proste yüksek sıcaklık ve basınç koşulları gerektiğinde fazla miktarda enerji tüketimine yol açabilen mikroemülsiyon, homojen çökeltme, kimyasal indirgeme, hidrotermal ve sol-jel tekniklerini içerir. Kimyasal yöntemlere göre daha az kullanılmasına rağmen, ZnO nanopartiküllerin üretiminde mekanik öğütme, buhar biriktirme, plazma ve

ultrasonik ışınlama gibi fiziksel tekniklerle sentezlenebilir (Vijayakumar ve ark., 2018; Bandeira ve ark., 2020).

Geleneksel fiziksel ve kimyasal yöntemler genellikle pahalı, emek yoğun ve çevre için güvenli değildir. Bahse konu yöntemlerle elde edilen nanopartiküllerin kararlılığını korumak için kapaklama ajanları olarak genellikle toksik kimyasallar kullanılır. Bu nedenle kimyasal ve fiziksel yöntemlere göre alternatif olan, “yeşil sentez” olarak da bilinen biyolojik yöntemler çevre dostu olmalarının yanısıra, hızlı ve daha ekonomik yöntemler olarak karşımıza çıkmaktadır (Abdul Salam ve ark., 2014; Vijayakumar ve ark., 2018). Yeşil sentezde biyolojik materyal olarak bitkilerin çeşitli kısımları kullanılabilirdiği gibi (Alkhulaifi ve ark., 2020; Baran ve ark., 2021; Hatipoğlu, 2021; İlahi ve ark., 2021; Hatipoğlu, 2022; Keskin ve ark., 2022), algler (Chugh ve ark., 2021), deniz yosunları (Mansour ve ark., 2022), bakteriler (Javaid ve ark., 2017) ve funguslar (Wang ve ark., 2021) da kullanılabilmekte ve bu yönde yapılan bilimsel çalışmalar gittikçe artmaktadır. Nanoparçacık üretiminde kullanılan bitkilerin sekonder metabolitleri, metal iyonlarını indirgeyen ve üretilen nanoparçacıkların şeklini ve boyutunu stabilize eden bir kapatma maddesi görevi görür. Bu bitki metabolitlerinin en önemlileri, polifenoller, tanenler, flavanonlar, saponinler, proteinler, karbonhidratlar, terpenoidler ve alkaloidlerdir (Akintelu ve Folorunso, 2020; Swilam ve Nematallah 2020).

Yeşil sentezin ilkeleri şöyle özetlenebilir; 1) reaksiyon verimliliğini artırmak için atom ekonomisi, 2) yenilenebilir kaynaklardan yapılan kimyasalları kullanarak yenilenebilir hammaddeler, 3) enerji verimliliği, yüksek enerji tüketimi proseslerinden kaçınmak, 4) daha güvenli kimyasallar, proseslerin ve ürünlerin toksisitesini en aza indirmek, 5) bozunma için tasarım, biyolojik olarak parçalanabilen ve toksik olmayan ürünler tasarlamak, 6) önleme, sürecin her aşamasında atığı en aza indirmek, 7) daha az tehlikeli kimyasal sentez, daha güvenli sentez yolları tasarlamak, 8) kirliliği önleme, tehlikeli maddelerin salınımını önlemek, 9) türevleri azaltmak, koruyucu veya stabilizatör gibi türevlerin kullanımından kaçınmak, 10) kataliz, kataliz kullanmak enerji tüketimi veya verimliliği gibi süreçleri iyileştirmek, 11) daha güvenli solventler ve yardımcı maddeler, mümkün olan en az tehlikeli solvent veya kimyasal kullanmak ve 12) kaza önleme, kaza risklerini en aza indirmek (Bandeira ve ark., 2020).

Bugüne kadar *Aloe barbadensis miller* (Sangeetha ve ark., 2011), *Ocimum basilicum* (Abdul Salam ve ark., 2014), *Hibiscus subdariffa* (Bala ve ark., 2015), *Azadirachta indica* (Elumalai ve Velmurugan, 2015), *Lycopersicon esculentum*, *Citrus aurantifolia*, *Citrus paradisi*, *Citrus sinensis* (Nava ve ark., 2017a), *Camellia sinensis* (Nava ve ark., 2017b), *Eucalyptus globulus* (Reddy ve Mandal,

2017), *Nyctanthes arbor-tristis* (Jamdagni ve ark., 2018), *Citrus sinensis* (Luque ve ark., 2018), *Atalantia monophylla* (Vijayakumar ve ark., 2018), *Stevia* (Khatami ve ark., 2018), *Solanum torvum* (Ezealisiji ve ark., 2019), *Ailanthus altissima* (Awwad ve ark., 2020), *Eucalyptus globulus* (Barzinjy ve Azeez, 2020), *Punica granatum* (Ifeanyichukwu ve ark., 2020), *Mussaenda frondosa* (Jayappa ve ark., 2020), *Beta vulgaris*, *Brassica oleracea*, *Cinnamomum tamala*, *Cinnamomum verum* (Pillai ve ark., 2020), *Deverra tortuosa* (Selim ve ark., 2020), *Arthrospira platensis* (El-Belely ve ark., 2021), *Cayratia pedata* (Jayachandran ve ark., 2021), *Justicia adhatoda* (Pachaiappan ve ark., 2021), *Phoenix dactylifera* (Rambabu ve ark., 2021) ve *Thymbra spicata* (Gur ve ark., 2022) bitkilerinden ZnO nanopartiküllerinin biyosentezi bildirilmiştir.

Bu araştırmada biyolojik materyal olarak ananas (*Ananas comosus*) kabuğu kullanıldı. Ananasın kökeni Güney Amerika'nın tropikal bölgelerine kadar uzanır. Bromeliaceae ailesinin çok yıllık otsu bir bitkisi olan ananasın, meyvesi topaç şeklinde, yüksekliği 1-2 m ve genişliği de 1-2 m'ye ulaşabilmektedir. Meyve şekli, dikenlilik ve çiçek rengine göre Kraliçe, İspanyol, Pernambuco, Cayenne ve Perolera olmak üzere beş grup ananas tanımlanmıştır (Wakasa, 1989; Hassan ve ark., 2011). Ananas, meyvesinin yanı sıra hayvan yemi olarak kullanılabilir yüksek miktarda lif içeren yapraklara sahiptir. Ananasın kabukları, taç özütü ve çekirdek özleri glukoz, fruktoz ve sakaroz içerir. Meyvesinde terpenler, esterler, aldehitler, laktonlar, ketonlar, alkoller ve hidrokarbonlar dahil 280'den fazla uçucu bileşik tanımlanmıştır (Emeka ve ark., 2014).

Bu çalışma, çinko iyonlarının (Zn^{+2}) ananas kabuğu özütü ile çinko oksite (ZnO) indirgenmesi, kapatılması ve stabilizasyonuna yönelik potansiyelini araştırmak için tasarlandı. Bu araştırmada, ananas kabuğu özütü ile ZnO nanoparçacıklarının sentezi, yapısal ve termal karakterizasyonu yapılmış ve rapor edilmiştir. Amacımız sentez için çevresel atık olan meyve kabuğunu kullanmaktır. Sentezlenen ZnO nanopartiküller, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi, UV görünür (UV-vis.) Spektrofotometre, Enerji Dağıtıcı X-Ray (EDX), Emisyon Taramalı Elektron Mikroskopu (FE-SEM), Zetasizer, Termogravimetrik Analiz (TGA), Diferansiyel Termal Analiz (DTA) ve Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM) kullanılarak karakterize edildi.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

Araştırmada kullanılan ananas Diyarbakır'daki yerel marketlerden satın alındı. $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ tuzu Sigma-Aldrich'ten temin edildi.

2.2. Metot

2.2.1. Bitki Kabuk Özütünün Hazırlanması

Ananas comosus kabukları saf su ile iyice yıkandıktan sonra oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kurutulmuş *A. comosus* kabukları laboratuvar tipi öğütücü ile ince toz haline getirildi. Özüt için 20 gram toz alınarak 50 mL deiyonize suda kaynatıldı ve Whatmann 1 No'lu filtre kağıdı ile süzülde. Daha sonra elde edilen süzüntü $ZnO-NP$ 'lerin sentezinde kullanılmak üzere buzdolabında $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

2.2.2. Bitki Uyumlu $ZnO-NP$ 'lerin Biyosentezi

$ZnO-NP$ 'lerin biyosentezi için $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ katı formundan 50 mM sulu çinko çözeltisi hazırlandı. 25 mL özüt, 50 mM 10 mL $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ çözeltisi ile karıştırıldı ve $65\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 4 saat boyunca reaksiyona bırakıldı. Renk değişimi görüldükten sonra elde edilen çözelti 90 dakika boyunca (6000 rpm) santrifüjlendi. Altta biriken katı faz birkaç kez distile su ile yıkandı. Sentezlenen NP 'ler, bir fırında kurumaya bırakıldı ($80\text{ }^\circ\text{C}$ / 48 saat). Daha sonra katı kısım bir havanda toz haline getirildi.

2.2.3. Biyosentezi Yapılan $ZnO-NP$ 'lerin Yapısal Karakterizasyonu ve Termal Özellikleri

Sentezlenen $ZnO-NP$ 'ler UV-vis Spektrofotometre (300-800 nm) (Agilent Cary 60) ile tanımlandı. $ZnO-NP$ 'lerin morfolojileri, boyutları ve yüzey dağılımları FE-SEM (Quanta FEG240), AFM (PARK NX10), EDX (Quanta FEG240) ve Zetasizer (Malvern) ile ölçülerek ortaya konuldu. Özütte indirgemeye neden olan grupları belirlemek için FT-IR (Agilent Cary 630) analizi uygulandı. Elde edilen nanoparikülün kararlılığı ve dayanıklılığını tespit etmek için TGA/DTA analizi (TA Instruments SDT-Q600) uygulandı.

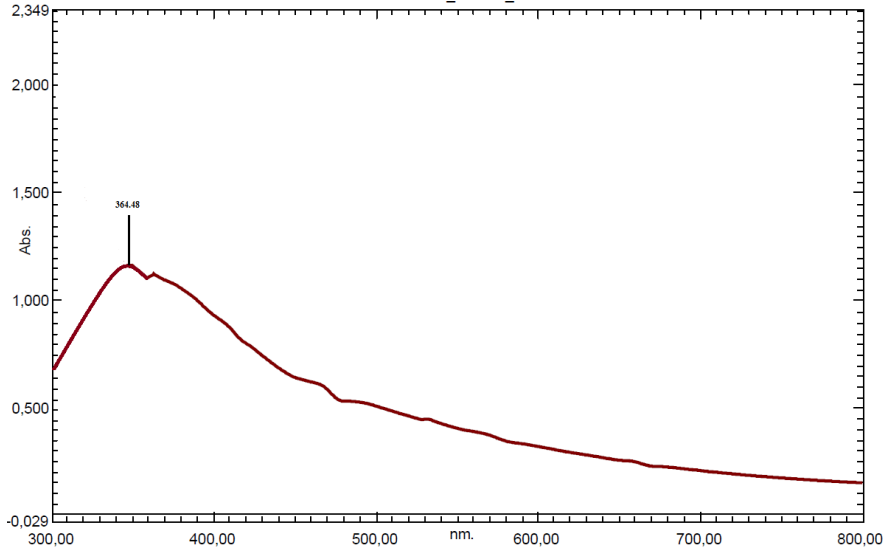
3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. UV-vis. Spektroskopi Analizi

Ananas kabuğunda bulunan sekonder metabolitler, çözeltideki çinko iyonlarını indirgeyip stabilize ederler. Biyosentezi yapılan $ZnO-NP$ 'lerin optik özelliği, sentezlenen nanoparçacıkların absorpsiyon spektrumundan gözlemlendi.

Yani 300-800 nm dalga boylarında UV-vis. spektrum analizi ile reaksiyonun varlığı doğrulanmış oldu.

Spektrum, 364.48 nm'de ZnO-NP'lerine özgü bir tepe noktası gösterdi. Bu tepe noktası önceki araştırmacıların ZnO-NP'ler için bildirdiği 217-376 nm dalga boyu değerleri ile uyumludur (Salem ve ark., 2015; Chikkanna ve ark., 2018; Ramesh ve ark., 2021). Bant aralığı enerjisi ($E_g=1240/\lambda$ eV) ise 3.4 eV olarak hesaplandı.

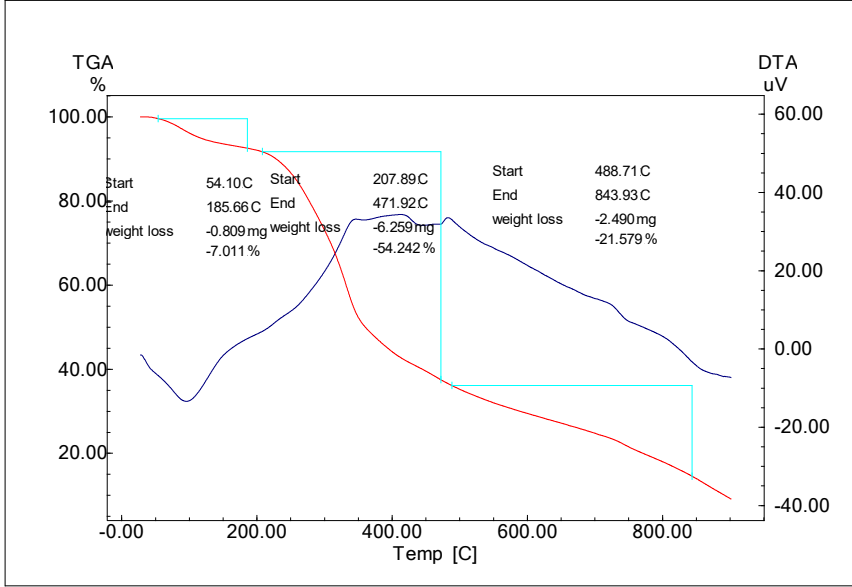


Şekil 1. Sentezlenen ZnO nanopartiküllerin UV-vis spektrumu

3.2. TGA-DTA Analizi

TGA, nanoparçacıkların ısı direncini ve farklı sıcaklıklarda ısıtma sırasındaki ağırlık kaybı miktarını belirlemek için kullanılan önemli bir analizdir (Hamelian ve ark., 2018). DTA ise ekzotermik/ endotermik reaksiyonlar sonucu meydana gelen sıcaklık değişimlerinin tespit edilmesi için kullanılmaktadır. Şekil 2, 0-1000 °C'de statik havada ölçülen bitki uyumlu ZnO-NP'lerin TGA ve DTA eğrilerini göstermektedir. Şekilde de görüldüğü gibi, 54.10-185.06 °C sıcaklık aralığında örnekteki kütle kaybı yaklaşık % 7 olarak gerçekleşti. En yüksek kütle kaybı 207.89-471.92 °C aralığında % 54.24 oldu. Daha yüksek sıcaklıklarda (207.89-471.92 °C) ise bahse konu kayıp % 21.58 olarak gerçekleşti. 207 °C'den sonraki kütle kayıpları, bitki özütünde bulunan organik bileşenlerden kaynaklanmaktadır. Bu durum nanomalzemenin yavaş yavaş bozunduğunu ve sentezlenen ZnO-NP'lerin yüksek sıcaklıklarda bile kararlı olduğunu göstermektedir. Nanopartiküllerin yüksek sıcaklıklardaki kararlı yapıları, *Azadirachta indica* (Handago ve ark., 2019), *Eucalyptus spp.* (Chauhan ve ark.,

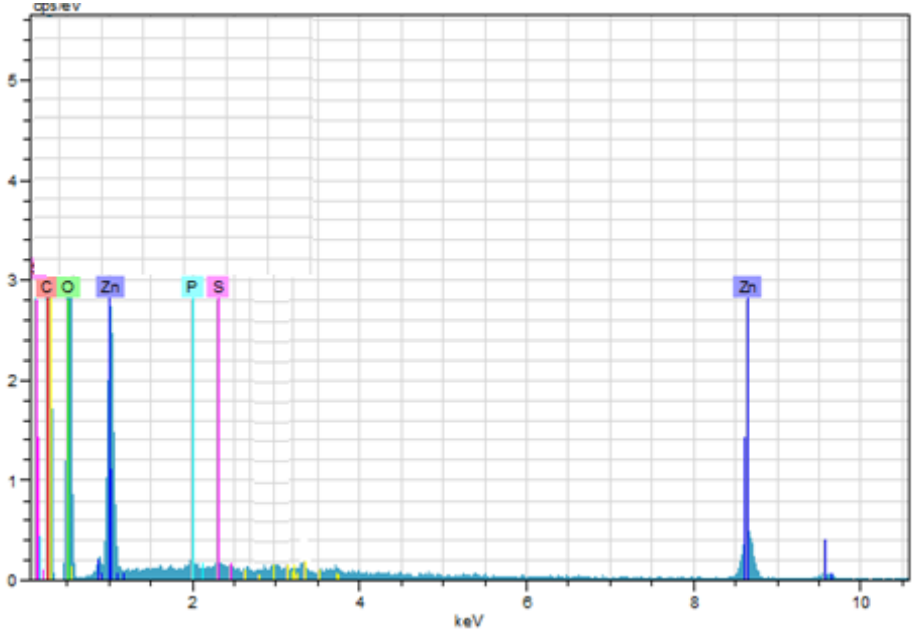
2020), *Moringa oleifera* (Dejen ve ark., 2020), *Alchemilla vulgaris* (Rajendrachari ve ark., 2021), *Tectona grandis* ve *Abutilon indicum* (Eswari ve ark., 2022) bitkilerinden sentezlenen ZnO-NP çalışmalarında da rapor edilmiştir.



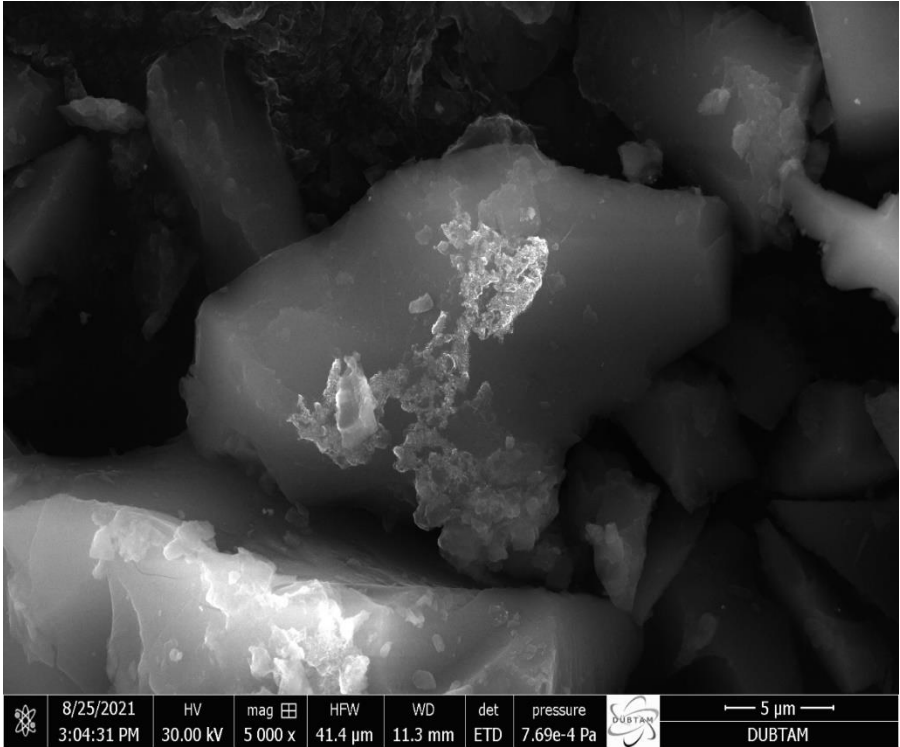
Şekil 2. Bitki uyumlu ZnO nanopartiküllerin TGA-DTA eğrileri

3.3. FE-SEM ve EDX Analizi

Karbon kaplı bakır ızgara üzerine sentezlenen örnekten çok az miktarda damlatılarak ince bir film oluşturuldu, fazla çözelti bir kurutma kağıdı ile uzaklaştırıldı ve ardından SEM ızgarası üzerindeki film kurumaya bırakıldı. İndirgenmiş ZnO-NP'lerine sahip ananas kabuk özütü damlası karbon film ile kaplanmış olarak kurutuldu ve EDX analizi termo EDX ekleri ile donatılmış SEM cihazında gerçekleştirildi. Şekil 3'te de görüldüğü gibi, numunenin elemental bileşiminde Zn dışında P, S, C, ve O elementleri de tespit edildi. Bu elementlerin varlığı, sentezlenen ZnO-NP'lerinin indirgenmesinde ve kapatılmasında bitki fitokimyasal gruplarının reaksiyona katıldığını göstermektedir (Bala ve ark., 2015). FE-SEM görüntüsünden biyosentezlenmiş ZnO-NP'lerinin çoğunlukla küre şeklinde olduğu görülmektedir (Şekil 4).



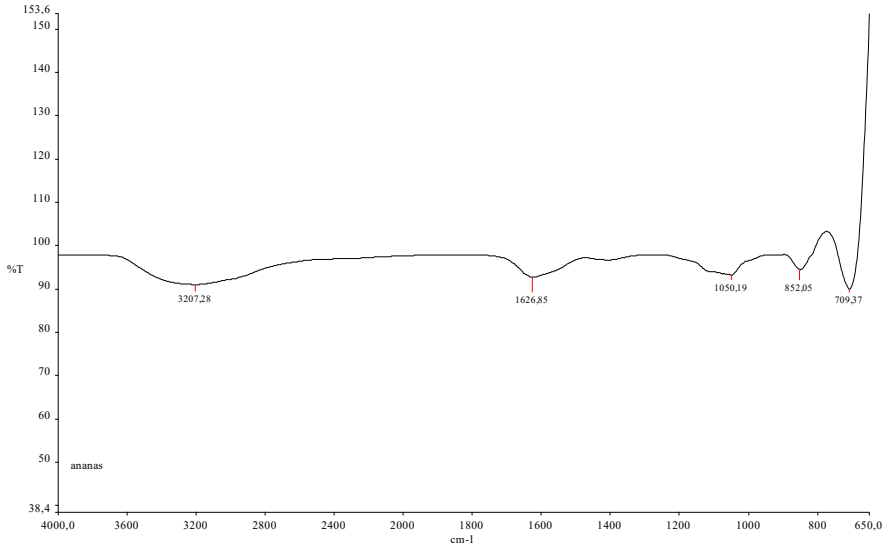
Şekil 3. Biyosentezi yapılan ZnO nanopartiküllerin EDX spektrumu



Şekil 4. Sentezlenen ZnO nanopartiküllerin FE-SEM görüntüsü

3.4. FT-IR Spektroskopi Analizi

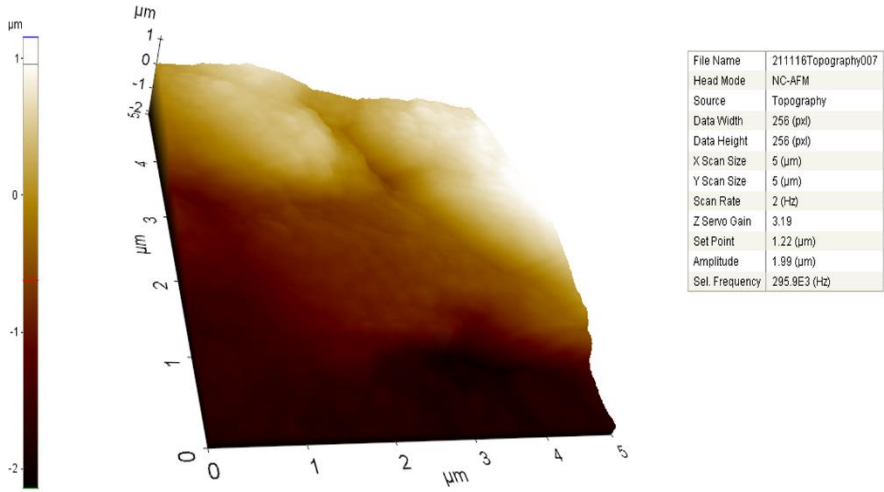
FT-IR analizi Çinko oksit nanoparçacıklarında yer alan olası fonksiyonel grupların belirlenmesine yardımcı oldu. Ananas yaprak özütünden sentezlenen ZnO-NP'lerin FT-IR spektrumunda 3207.28 cm^{-1} , 1626.85 cm^{-1} , 1319.70 cm^{-1} , 1050.19 cm^{-1} , 825.05 cm^{-1} ve 709.37 cm^{-1} 'de absorpsiyon bantları görülmektedir (Şekil 5). Bantlarda görülen indirgemeye -C=C- , -N-H , -O-H , $\text{-N}\equiv\text{O}$ ve -C-N fonksiyonel gruplarının neden olduğu söylenebilir. Söz konusu fonksiyonel gruplar tanenler, organik asitler, terpenoidler ve amidlere atfedilir. Proteinlerin amid grupları, aglomerasyonu önlemek için kapaklama maddesi olarak rol oynar ve böylece ZnO nanopartikül stabilizasyonuna yardımcı olur (Vijayakumar ve ark., 2018). Öte yandan Şekil 5' te 1050.19 , 825.05 ve 709.37 cm^{-1} 'de görülen pikler metal bağının oluştuğunun bir kanıtı olarak değerlendirilebilir.



Şekil 5. Biyosentezi yapılmış ZnO nanopartiküllerin FT-IR spektrumu

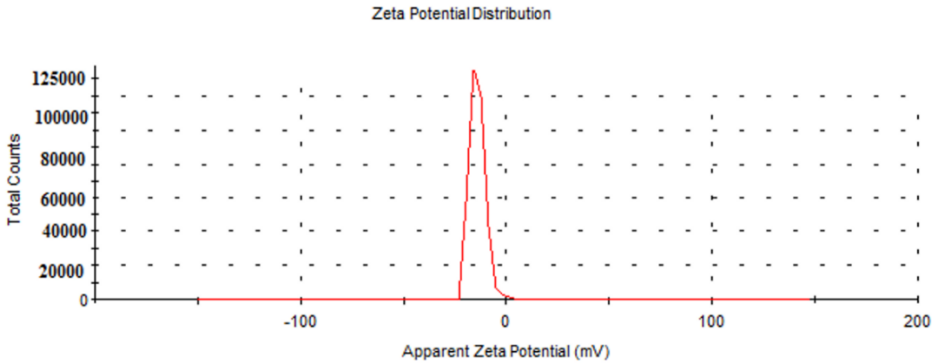
3.5. AFM ve Zetasizer Analizi

A.comosus kabuk özütünden sentezlenen ZnO-NP'lerin boyut ve şekil dağılımının üç boyutlu etkisi AFM ile analiz edildi (Şekil 6). AFM sonuçları, biyosentezi yapılmış olan nanopartiküllerin düzenli dağılımını doğruladı.



Şekil 6. Biyosentezi yapılan ZnO nanopartiküllerin AFM sonuçları

A.comosus aracılı ZnO-NP'lerin üzerindeki yüzey yükünü ortaya koymak için zeta potansiyeli ölçüldü (Şekil 7). Sentezlenen ZnO-NP'lerin zeta potansiyeli değeri -13.4 mV olarak ölçüldü. Bu negatif değer, ananas kaynaklı ZnO-NP'lerin hem kararlı hem de tekdüze bir yapıda olduğunu göstermektedir (Baran ve ark., 2022). Genellikle NP'lerin yüzey potansiyel değerleri -30 mV ile +30 mV arasında olmaktadır. Bu değerler sentezlenen nanomalzemenin kararlı yapıda olduğuna atfedilir (Irfan ve ark., 2020).



Şekil 7. Sentezlenen ZnO nanopartiküllerin zeta potansiyeli diyagramı

SONUÇ

Son yıllarda kozmetik, tarım ve tıp gibi kritik alanlardaki benzersiz uygulamaları nedeniyle bilim insanları nanopartikül çalışmalarına yoğunlaştı. Bu çalışmada atık bir materyal olan *Ananas comosus* kabuğunun çinko ile biyosentezi başarılı bir şekilde gerçekleştirildi. Bahse konu biyosentez hızlı, çevreye zararı olmayan, basit ve ekonomiktir. Bitki uyumlu biyosentezi, UV-vis spektroskopisi ve EDX analizleri doğrulandı. Sentezlenen ZnO-NP'lerin termal stabilitesinin ve kararlılığının yüksek olduğu TGA-DTA analizleri ile ortaya konuldu. FE-SEM ve AFM çalışmaları, ananas kabuk özütünden sentezlenen ZnO-NP'lerin ağırlıklı olarak küresel şekilli olduğunu gösterdi. Mevcut çalışmaya benzer şekilde diğer bitkisel atık materyallerden de nanopartiküller üretilmeli ve bu yönde yapılacak çalışmalar desteklenmelidir. Üretilen nanomalzemelerin antimikrobiyal, antioksidan, sitotoksik ve farmakolojik aktiviteleri gibi ileri düzey analizleri de yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Abdul Salam, H., Sivaraj, R., & Venkatesh, R. (2014). Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles from *Ocimum basilicum* L. var. *purpurascens* Benth.-Lamiaceae leaf extract. *Materials Letters*, 131, 16–18. doi:10.1016/j.matlet.2014.05.033
2. Agarwal, H., Venkat Kumar, S., Rajeshkumar, S. (2017). A review on green synthesis of zinc oxide nanoparticles – An eco-friendly approach. *Resource-Efficient Technologies*, 3, 406-413. doi: 10.1016/j.reffit.2017.03.002
3. Akintelu, S. A., & Folorunso, A. S. (2020). A Review on Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Plant Extracts and Its Biomedical Applications. *BioNanoScience*, doi:10.1007/s12668-020-00774-6
4. Alkhulaifi, M. M., Alshehri, J. H., Alwehaibi, M. A., Awad, M. A., Al-Enazi, N. M., Aldosari, N. S., Hatamleh, A. A., Abdel- Raouf, N. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles using *Citrus limon* peels and evaluation of their antibacterial and cytotoxic properties. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12), 3434-3441. doi:10.1016/j.sjbs.2020.09.031
5. Awwad, A.M., Amer, M. W., Salem, N.M. & Abdeen, A. O. (2020). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) using *Ailanthus altissima* fruit extracts and antibacterial activity. *Chemistry International*, 6(3), 151-159. doi: 10.5281/zenodo.3559520
6. Bala, N., Saha, S., Chakraborty, M., Maiti, M., Das, S., Basu, R., Nandy, P. (2015). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Hibiscus subdariffa* leaf extract: effect of temperature on synthesis, anti-bacterial activity and anti-diabetic activity. *RSC Advances*, 5, 4993–5003, doi:10.1039/C4RA12784F
7. Bala, N., Saha, S., Chakraborty, M., Maiti, M., Das, S., Basu, R., & Nandy, P. (2015). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Hibiscus subdariffa* leaf extract: effect of temperature on synthesis, anti-bacterial activity and anti-diabetic activity. *RSC Advances*, 5(7), 4993–5003. doi:10.1039/c4ra12784f
8. Bandeira, M., Giovanela, M., Roesch-Ely, M., Devine, D. M., & da Silva Crespo, J. (2020). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: A review of the synthesis methodology and mechanism of formation. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 15, 100223. doi:10.1016/j.scp.2020.100223
9. Baran, A., Hatipoğlu, A., Baran, M. F., Aktepe, N. (2021). Alıç (*Crataegus monogyna*) Meyve Özüünden Altın Nanopartiküllerin Sentezi ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Değerlendirilmesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, Özel Sayı 32, 974-978. doi: 10.31590/ejosat.1040122

10. Baran, A., Baran, M. F., Keskin, C., Hatipoğlu, A., Yavuz, Ö., İrtegün Kandemir, S., Adican, M. T., Khalilov, R., Mammadova, A., Ahmadian, E., Rosić, G., Selakovic, D., Eftekhari, A. (2022). Investigation of antimicrobial and cytotoxic properties and specification of silver nanoparticles (AgNPs) derived from *Cicer arietinum* L. green leaf extract. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 855136. doi: 10.3389/fbioe.2022.855136
11. Barzinjy, A. A., & Azeez, H. H. (2020). Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using *Eucalyptus globulus* Labill. leaf extract and zinc nitrate hexahydrate salt. *SN Applied Sciences*, 2(5). doi:10.1007/s42452-020-2813-1
12. Basnet, P., Inakhunbi Chanu, T., Samanta, D., & Chatterjee, S. (2018). A review on bio-synthesized zinc oxide nanoparticles using plant extracts as reductants and stabilizing agents. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 183, 201–221. doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.04.036
13. Basnet, P., Inakhunbi Chanu, T., Samanta, D., & Chatterjee, S. (2018). A review on bio-synthesized zinc oxide nanoparticles using plant extracts as reductants and stabilizing agents. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 183, 201–221. doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.04.036
14. Chauhan, A. K., Kataria, N., & Garg, V. K. (2020). Green fabrication of ZnO nanoparticles using *Eucalyptus spp.* leaves extract and their application in wastewater remediation. *Chemosphere*, 125803. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.125803
15. Chikkanna, M. M., Neelagund, S. E., & Rajashekarappa, K. K. (2018). Green synthesis of Zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) and their biological activity. *SN Applied Sciences*, 1, 117. doi:10.1007/s42452-018-0095-7
16. Chugh, D., Viswamalya, V.S. & Das, B. (2021). Green synthesis of silver nanoparticles with algae and the importance of capping agents in the process. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19, 126. doi: 10.1186/s43141-021-00228-w
17. Dejen, K. D., Zereffa, E. A., Murthy, H. C. A., & Merga, A. (2020). Synthesis of ZnO and ZnO/PVA nanocomposite using aqueous *Moringa oleifera* leaf extract template: antibacterial and electrochemical activities. *Reviews on Advanced Materials Science*, 59(1), 464-476. doi: 10.1515/rams-2020-0021

- 18.El-Belely, E. F., Farag, M. M. S., Said, H. A., Amin, A. S., Azab, E., Gobouri, A. A., & Fouda, A. (2021). Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO-NPs) Using *Arthrospira platensis* (Class: Cyanophyceae) and Evaluation of their Biomedical Activities. *Nanomaterials*, 11(1), 95.
- 19.Elumalai, K., & Velmurugan, S. (2015). Green synthesis, characterization and antimicrobial activities of zinc oxide nanoparticles from the leaf extract of *Azadirachta indica* (L.). *Applied Surface Science*, 345, 329–336. doi:10.1016/j.apsusc.2015.03.176
- 20.Emeka, E. E., Ojiefoh, O. C., Aleruchi, C., Hassan, L. A., Christiana, O. M., Rebecca, M., Dare, E. O., Temitope, A. E. (2014). Evaluation of antibacterial activities of silver nanoparticles green-synthesized using pineapple leaf (*Ananas comosus*). *Micron*, 57, 1-5. doi:10.1016/j.micron.2013.09.003
- 21.Eswari, K. M., Asaithambi, S., Karuppaiah, M., Sakthivel, P., Balaji, V., Ponelakkia, D. K., Yuvakkumar, R., Kumar, P., Vijayaprabhu, N., Ravi, G. (2022). Green synthesis of ZnO nanoparticles using *Abutilon indicum* and *Tectona grandis* leaf extracts for evaluation of anti-diabetic, anti-inflammatory and in-vitro cytotoxicity activities. *Ceramics International* (in press).
- 22.Ezealisiji, K. M., Siwe-Noundou, X., Maduelosi, B., Nwachukwu, N., & Krause, R. W. M. (2019). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Solanum torvum* (L) leaf extract and evaluation of the toxicological profile of the ZnO nanoparticles–hydrogel composite in Wistar albino rats. *International Nano Letters*, 9, 99-107. doi:10.1007/s40089-018-0263-1
- 23.Gur, T., Meydan, I., Seckin, H., Bekmezci, M., & Sen, F. (2022). Green synthesis, characterization and bioactivity of biogenic zinc oxide nanoparticles. *Environmental Research*, 204, 111897. doi:10.1016/j.envres.2021.111897
- 24.Hamelian, M., Varmira, K., & Veisi, H. (2018). Green synthesis and characterizations of gold nanoparticles using Thyme and survey cytotoxic effect, antibacterial and antioxidant potential. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 184, 71-79. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.05.016
- 25.Handago, D. T., Zereffa, E. A., & Gonfa, B. A. (2019). Effects of *Azadirachta indica* Leaf Extract, Capping Agents, on the Synthesis of Pure And Cu Doped ZnO-Nanoparticles: A Green Approach and Microbial Activity. *Open Chemistry*, 17(1), 246-253. doi:10.1515/chem-2019-0018

26. Hassan, A., Othman, Z., & Siriphanich, J. (2011). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits, 194-217, 218e. doi:10.1533/9780857092618.194
27. Hatipoğlu, A. (2021). Green synthesis of gold nanoparticles from *Prunus cerasifera pissardii nigra* leaf and their antimicrobial activities on some food pathogens. Progress in Nutrition, 23(3), e2021241. doi: 10.23751/pn.v23i3.11947.
28. Hatipoğlu, A. (2022). Gümüş Nanopartiküllerin Yeşil Sentezi ve Bazı Gıda Patojenleri Üzerindeki Antimikrobiyal Etkileri. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 26(1), 106-114. doi: 10.19113/sdufenbed.970654
29. Hatipoglu, A., Yavuz, O., Gunes, Z. (2022). Synthesis, characterization and determination of antimicrobial activities of silver nanoparticles derived from black cabbage (*Brassica oleracea* L.) leaf waste. International Target Medicine Journal, 1(2), 45-50. doi: 10.29228/targetmedj.62678
30. Ifeanyiichukwu, U. L., Fayemi, O. E., & Ateba, C. N. (2020). Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles from Pomegranate (*Punica granatum*) Extracts and Characterization of Their Antibacterial Activity. Molecules, 25(19), 4521. doi:10.3390/molecules25194521
31. Ilahi, I., Khuda, F., Umar Khayam Sahibzada, M., Alghamdi, S., Ullah, R., Zakiullah, Dablood, A. S., Alam, M., Khan, A., Khan Khalil, A. A. (2021). Synthesis of silver nanoparticles using root extract of *Duchesnea indica* and assessment of its biological activities. Arabian Journal of Chemistry, 14(5), 103110. doi: 10.1016/j.arabjc.2021.103110
32. Irfan, M., Ahmad, T., Moniruzzaman, M., Bhattacharjee, S., Abdullah, B. (2020b). Size and stability modulation of ionic liquid functionalized gold nanoparticles synthesized using *Elaeis guineensis* (oil palm) kernel extract. Arabian Journal of Chemistry, 13(1), 78-85. doi: 10.1016/j.arabjc.2017.02.001
33. Jamdagni, P., Khatri, P., & Rana, J. S. (2018). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using flower extract of *Nyctanthes arbor-tristis* and their antifungal activity. Journal of King Saud University - Science, 30(2), 168-175. doi:10.1016/j.jksus.2016.10.002
34. Javaid, A., Oloketuyi, S. F., Khan, M. M. & Khan, F. (2017). Diversity of Bacterial Synthesis of Silver Nanoparticles. BioNanoScience, 8(1), 43-59. doi: 10.1007/s12668-017-0496-x.
35. Jayachandran, A., T.R., A., & Nair, A. S. (2021). Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using *Cayratia pedata* leaf

- extract. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 26, 100995. doi:10.1016/j.bbrep.2021.100995
36. Jayachandran, A., T.R., A., & Nair, A. S. (2021). Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using *Cayratia pedata* leaf extract. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 26, 100995. doi:10.1016/j.bbrep.2021.100995
37. Jayappa, M. D., Ramaiah, C. K., Kumar, M. A. P., Suresh, D., Prabhu, A., Devasya, R. P., & Sheikh, S. (2020). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles from the leaf, stem and in vitro grown callus of *Mussaenda frondosa* L.: characterization and their applications. *Applied Nanoscience*, 10, 3057-3074. doi:10.1007/s13204-020-01382-2
38. Keskin, C., Baran, A., Baran, M. F., Hatipoğlu, A., Adican, M. T., Atalar, M. N., Huseynova, I., Khalilov, R., Ahmadian, E., Yavuz, Ö., İrtegün Kandemir, S., Eftekhari, A. (2022). Green Synthesis, Characterization of Gold Nanomaterials using *Gundelia tournefortii* Leaf Extract, and Determination of Their Nanomedicinal (Antibacterial, Antifungal, and Cytotoxic) Potential. *Journal of Nanomaterials*, 2022, 1-10. doi: 10.1155/2022/7211066
39. Khatami, M., Alijani, H. Q., Heli, H., & Sharifi, I. (2018). Rectangular shaped zinc oxide nanoparticles: Green synthesis by Stevia and its biomedical efficiency. *Ceramics International*, 44(13), 15596-15602. doi:10.1016/j.ceramint.2018.05.224
40. Luque, P. A., Soto-Robles, C. A., Nava, O., Gomez-Gutierrez, C. M., Castro-Beltran, A., Garrafa-Galvez, H. E., Vilchis-Nestor, A.R., Olivas, A. (2018). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Citrus sinensis* extract. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 29(12), 9764–9770. doi:10.1007/s10854-018-9015-2
41. Malandrakis, A. A., Kavroulakis, N., & Chrysikopoulos, C. V. (2019). Use of copper, silver and zinc nanoparticles against foliar and soil-borne plant pathogens. *Science of The Total Environment*, 670, 292-299. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.03.210
42. Mansour, A.T., Alprol, A.E., Khedawy, M., Abualnaja, K.M., Shalaby, T.A., Rayan, G., Ramadan, K.M.A., Ashour, M. (2022). Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Red Seaweed for the Elimination of Organic Toxic Dye from an Aqueous Solution. *Materials*, 15, 5169. doi: 10.3390/ma15155169
43. Mirzaei, H., & Darroudi, M. (2017). Zinc oxide nanoparticles: Biological synthesis and biomedical applications. *Ceramics International*, 43(1), 907–914. doi:10.1016/j.ceramint.2016.10.05

44. Nava, O. J., Luque, P. A., Gómez-Gutiérrez, C. M., Vilchis-Nestor, A. R., Castro-Beltrán, A., Mota-González, M. L., & Olivas, A. (2017b). Influence of *Camellia sinensis* extract on Zinc Oxide nanoparticle green synthesis. *Journal of Molecular Structure*, 1134, 121–125. doi:10.1016/j.molstruc.2016.12.06
45. Nava, O. J., Soto-Robles, C. A., Gómez-Gutiérrez, C. M., Vilchis-Nestor, A. R., Castro-Beltrán, A., Olivas, A., & Luque, P. A. (2017a). Fruit peel extract mediated green synthesis of zinc oxide nanoparticles. *Journal of Molecular Structure*, 1147, 1–6. doi:10.1016/j.molstruc.2017.06.078
46. Pachaiappan, R., Rajendran, S., Ramalingam, G., Vo, D.-V. N., Priya, P. M., & Soto-Moscoco, M. (2021). Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles by *Justicia adhatoda* Leaves and Their Antimicrobial Activity. *Chemical Engineering & Technology*, 44(3), 551–558. doi:10.1002/ceat.202000470
47. Pillai, A. M., Sivasankarapillai, V. S., Rahdar, A., Joseph, J., Sadeghfar, F., Anuf A, R., Rajesh, K., Kyzas, G. Z. (2020). Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles with antibacterial and antifungal activity. *Journal of Molecular Structure*, 128107. doi:10.1016/j.molstruc.2020.128107
48. Rajendrachari, S., Taslimi, P., Karaoglanli, A. C., Uzun, O., Alp, E., & Jayaprakash, G. K. (2021). Photocatalytic degradation of Rhodamine B (RhB) dye in waste water and enzymatic inhibition study using cauliflower shaped ZnO nanoparticles synthesized by a novel One-pot green synthesis method. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(6), 103180. doi: 10.1016/j.arabjc.2021.103180
49. Rambabu, K., Bharath, G., Banat, F., & Show, P. L. (2020). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Phoenix dactylifera* waste as bioreductant for effective dye degradation and antibacterial performance in wastewater treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 123560. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.123560
50. Ramesh, P., Saravanan, K., Manogar, P., Johnson, J., Vinoth, E., & Mayakannan, M. (2021). Green synthesis and characterization of biocompatible zinc oxide nanoparticles and evaluation of its antibacterial potential. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 31, 100399. doi:10.1016/j.sbsr.2021.100399
51. Reddy, S. B., & Mandal, B. K. (2017). Facile green synthesis of zinc oxide nanoparticles by *Eucalyptus globulus* and their photocatalytic and antioxidant activity. *Advanced Powder Technology*, 28(3), 785-797. doi:10.1016/j.appt.2016.11.026

52. Salem, W., Leitner, D. R., Zingl, F. G., Schratte, G., Prassl, R., Goessler, W., Reidl, J., & Schild, S. (2015). Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 305(1), 85-95. doi:10.1016/j.ijmm.2014.11.005
53. Sangeetha, G., Rajeshwari, S., & Venkatesh, R. (2011). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by aloe barbadensis miller leaf extract: Structure and optical properties. *Materials Research Bulletin*, 46(12), 2560-2566. doi:10.1016/j.materresbull.2011.07.046
54. Santhoshkumar, J., Venkat Kumar, S., Rajeshkumar, S. (2017). Synthesis of zinc oxide nanoparticles using plant leaf extract against urinary tract infection pathogen. *Resource-Efficient Technologies*, 3, 459-465. doi: 10.1016/j.reffit.2017.05.001
55. Selim, Y. A., Azb, M. A., Ragab, I., & H. M. Abd El-Azim, M. (2020). Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Aqueous Extract of *Deverra tortuosa* and their Cytotoxic Activities. *Scientific Reports*, 10, 3445. doi:10.1038/s41598-020-60541-1
56. Suresh, D., Nethravathi, P. C., Udayabhanu, Rajanaika, H., Nagabhushana, H., & Sharma, S. C. (2015). Green synthesis of multifunctional zinc oxide (ZnO) nanoparticles using *Cassia fistula* plant extract and their photodegradative, antioxidant and antibacterial activities. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 31, 446-454. doi:10.1016/j.mssp.2014.12.023
57. Swilam, N., & Nematallah, K.A. (2020). Polyphenols profile of pomegranate leaves and their role in green synthesis of silver nanoparticles. *Scientific Reports*, 10: 14851.
58. Vijayakumar, S., Mahadevan, S., Arulmozhi, P., Sriram, S., & Praseetha, P. K. (2018). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Atalantia monophylla* leaf extracts: Characterization and antimicrobial analysis. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 82, 39-45. doi:10.1016/j.mssp.2018.03.017
59. Wakasa, K. (1989). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). In: Bajaj, Y.P.S. (eds) *Trees II. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol 5. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-61535-1_2
60. Wang, D., Xue, B., Wang, L., Zhang, Y., Liu, L., Zhou, Y. (2021). Fungus-mediated green synthesis of nano-silver using *Aspergillus sydowii* and its antifungal/antiproliferative activities. *Scientific Reports*, 11, 10356. doi: 10.1038/s41598-021-89854-5

61. Wang, X. P., Li, Q. Q., Pei, Z. M., & Wang, S. C. (2018). Effects of zinc oxide nanoparticles on the growth, photosynthetic traits, and antioxidative enzymes in tomato plants. *Biologia Plantarum*, 62, 801-808. doi:10.1007/s10535-018-0813-4

10. Bölüm

Tıbbi Bitkilerden Selenyum Nanoparçacıkların Yeşil Sentezi: Karakterizasyon ve Uygulama Alanları

Mahmut Yıldıztekin¹

Senem Öztuğcu²

Hatice Becerekli³

Kadri Kurt⁴

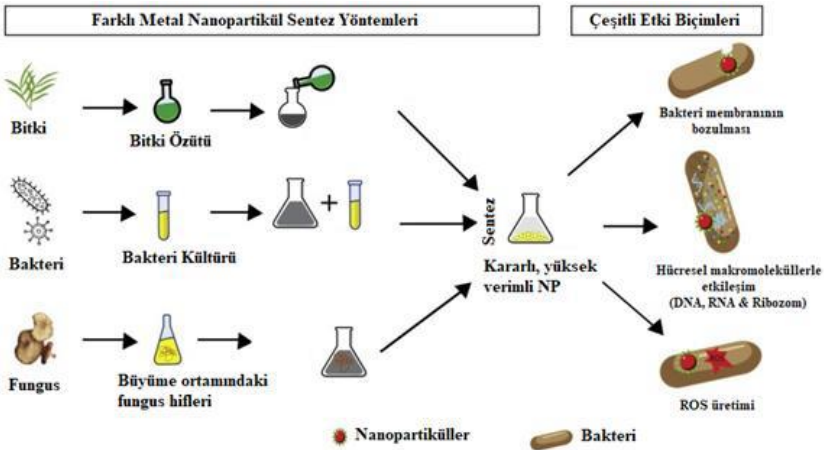
1 Sorumlu yazar, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Köyceğiz Meslek Yüksekokulu, Muğla/Türkiye, mahmutyildiztekin@mu.edu.tr

2 Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla/Türkiye

3 Batman Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Batman/Türkiye

4 Batman Üniversitesi, Beşiri Organize Sanayi Bölgesi Meslek Yüksekokulu, Batman/Türkiye

Yeşil sentez terimi, mikroorganizmaları, enzimleri ve doğal ekstraktları kullanan üretim tekniklerini ifade etmektedir. Çevre dostu, çevresel açıdan sürdürülebilir ve düşük maliyetli olması, onu geleneksel fiziksel ve kimyasal yöntemlere göre daha çekici hale getirmektedir (El-Seedi vd., 2019). Şöyle ki, nanoparçacıkların fiziksel ve kimyasal yöntemlerle sentezi için kullanılan kimyasallar çok tehlikeli olup yüksek maliyet gerektirmektedir. Ayrıca bu yöntemde çevre dostu olmayan ve toksik olduğu bildirilen harici bir stabilizatör kullanılmakta ve üretilen nanopartiküller biyolojik uygulamalarını kısıtlayacak toksik yapıya sahip olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, gerek maliyet gerekse toksisite göz önünde bulundurularak çevre dostu nanopartikülleri (NP) geliştirmek için alternatif bir yöntem arayışı zorunlu hale gelmiştir. Bu bilgiler ışığında, araştırmacılar bitki özlerini veya biyomoleküllerin indirgeyici ve stabilize edici ajanlar olarak kullanılabileceği ve dolayısıyla harici stabilizatöre ihtiyaç duyulmadığı nanopartiküllerin yeşil sentez çalışmalarını alternatif bir yol olarak sunmaktadırlar (Akhtar vd., 2013). Yeşil sentez yöntemleri için, bitki kaynaklı özler, algler, bakteriler ve mantarlar gibi (Şekil 1) biyolojik materyaller kullanılmaktadır (Günalan vd., 2012; Teimouri vd., 2018).



Şekil 1. NP sentez yöntemleri ve etki biçimleri (Özlu, 2021)

Bitki kaynaklı ekstraktların kullanımı, mantar veya bakteri sentezine kıyasla, nanomateryalleri üretken bir ölçekte sentezlemek için basit ve daha kolay bir prosedür olduğu bildirilmiştir (Shanker vd., 2016). Yani, bitkiler özellikle de tıbbi bitkiler aracılığıyla gerçekleştirilen sentez ekstra avantajlar sunmakta ve karmaşık protokoller veya metodolojiler gerektirmemektedir.

Bitkiler, çeşitli biyoaktif fitokimyasalların zengin bir kaynağıdır. Farklı bitki parçaları, çeşitli morfolojilerdeki NP'leri sentezlemek için farklı yeteneklere

sahiptir. Bitki tohumları, yapraklar, kabuklar, kökler ve meyvelerinden hazırlanan ekstraktlar, çeşitli morfolojilerdeki NP'leri sentezleme yeteneklerini açıklayan farklı fitokimyasallara sahiptir (Altemimi vd., 2017; Rai vd., 2008). Fitokimyasallar hem indirgeyici hem de yüzey stabilize edici madde olarak işlev görmektedirler ve ilave indirgeyici veya yüzey stabilize edici maddelere ihtiyaç duyulmamaktadır (Borase vd., 2014).

Nanoteknoloji, biyomedikal alanda gelişmiş özellikleri ve sayısız uygulamayı kanıtlayan, uyarlanabilir nano ölçekli materyallerin - nanomalzemelerin geliştirilmesi de dahil olmak üzere, şimdiye kadar teknolojik yeniliklere olağanüstü katkılar sağlayan, nano ölçekli maddeler olup, umut verici ve hızla gelişen bir bilim alanıdır (Khan vd., 2018; Mahdavi vd., 2019; Mostafa vd., 2019; Pal vd., 2019). Nanoteknolojinin; gıda paketleme, hayvancılık, elektronik, tarım, tıp ve sağlık hizmetleri gibi hayatın her alanında çok sayıda uygulaması bulunmaktadır (Silva, 2004; Bachandar vd., 2019). Bu bağlamda, başta gümüş, altın ve demir gibi metaller olmak üzere farklı elementlerin nanoparçacıkları, etkili antimikrobiyal aktiviteleri nedeniyle kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Öne çıkan diğer bir element ise, nanoparçacıkların yüksek biyoaktiviteye ve antibakteriyel etkiye sahip olduğu selenyumdur. Derleme çalışmamızın amacı; tıbbi bitki temelinde selenyum nanopartikül (SeNP) sentezi, karakterizasyonu ve uygulama alanlarını ortaya koymaktır. Selenyum destekli metal oksit nanoparçacıkları (Se-MO NP'ler), hücresel organellerde güçlü redoks potansiyeli sağladığından, ilaç dağıtımı ve antikanser tedavisi için etkili bir terapötik ajan olarak ortaya çıkmaktadır (Majeed vd., 2020; Liu vd., 2016). Son çalışmalar, selenyumun metal oksit nanoparçacıklarının ortalama boyutlarını düşürmek için metal oksitlerdeki geçiş metallerinin yerini kolayca aldığı, geniş bir yüzey alanı/hacim oranı oluşturduğunu ve böylece çok sayıda aktif substrata bağlanarak gelişmiş aktivitelere yol açtığını ortaya koymuştur (Dutta vd., 2014; Ahmad vd., 2020).

SeNP'lerin yeşil sentezi

Selenyum nanopartiküllerinin yeşil sentezinde bitkilerin parçaları, yaprak, tohum ve kabukların özleri ya da tamamı kullanılmaktadır. Bitki ekstraktlarında bulunan biyomoleküller, selenyum nanopartikülü sentezinde hem stabilize edici hem de indirgeyici ajan olarak işlev görmektedir (Kumar ve Prasad, 2021). Nanopartiküllerin sentezinde asıl amaç, minimum parçacık boyutu ile maksimum stabilite elde etmektir. Elde edilen partikülleri, pH, sıcaklık, ekstraktın konsantrasyonu ve çeşidi gibi faktörler etkilemektedir.

Tipik bir deneyde, önceden yıkanmış ve öğütülmüş bitki ekstraktları selenyum öncüsü (sodyum selenat veya selenit, sodyum selenosülfat, selenöz asit) ile

belirlenen oranlarda karıştırılmaktadır. Bazı yöntemlerde askorbik asit indirgeme reaksiyonunun başlatıcısı olarak ortama eklenmektedir. Reaksiyona giren çözelti, oda sıcaklığında belirli zaman aralıklarında karıştırılmaktadır. Karıştırma süreci prosedüre göre farklılıklar göstermekte, 12 saatten 72 saate ve bazı prosedürlerde de karanlıkta 5 ila 7 gün arasında sürebilmektedir. Süreç sonrasında karışımın rengi kırmızıya dönmekte ve bu renk değişimi ortamda selenyum nanopartiküllerinin varlığını göstermektedir (Şekil 2). Daha sonra elde edilen karışım yüksek hızda santrifüjleme işlemine tabi tutulmakta ve sonrasında yıkanarak içeriğindeki SeNP'lerin ayrıştırılması gerçekleştirilmektedir (Pyrzynska ve Sentkowska, 2022).



Şekil 2. SeNP'lerin biyolojik sentezi (Pyrzynska ve Sentkowska, 2022)

SeNP'lerin boyutları ne kadar küçük olursa, antioksidan kapasiteleri de bir o kadar büyük olmaktadır. Yeşil sentezde kullanılan tıbbi bitkiler, beslenme, gıda, ilaç ve kozmetik sektöründe uzun zamandır kullanılmaktadır. Sınır otu (*Plantago lanceolata* L.), civanperçemi (*Achillea millefolium* L.) ve ısırgan otu (*Urtica dioica* L.) gibi geleneksel olarak kullanılan şifalı bitkiler ile Sentkowska'nın 2022'de yaptığı çalışmada kullanılan bitkilerde *in vivo* olarak meydana gelen ve biyomoleküllere zarar verebilecek reaktif oksijen türlerinden olan hidroksil radikallerinin temizlenmesi yeteneklerinde farklılıklar gözlenmiş ve en iyi aktivitenin %86'lık bir oranla ısırgan otunda gözlendiği ifade edilmiştir. Ayrıca ısırgan otundan diğerlerine göre daha küçük boyutlar elde edilmiştir. Limon bitkisinin yaprak ekstreği kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, sodyum selenit çözeltisi indirgenmiş ve koloidal selenyum nanopartiküllerinin sentezinde kullanılmıştır. Üretilen SeNP'ler hücre canlılığı testlerinde kullanılmış ve düşük hücre ölümü insidansları elde edilmiştir (Prasad vd., 2013). Selenyum ve nanopartikülleri geniş bir uygulama alanına sahiptir (Tablo 1). Bu nedenle, selenyum nanopartiküllerinin biyofabrikasyonu çeşitli alanlarda

potansiyel olarak yararlı olabilir. *Vitis vinifera*'nın meyve özü ile yapılan sentezde yaklaşık 3-18 nm boyutlarında partiküller elde edilmiştir (Sharma vd., 2014).

Tablo 1. SeNP'lerin sentezi için kullanılan bazı bitki ve malzemeler

Kaynak	Öncü malzeme	İndirgeyici bitki kısmı	Boyut	Kaynak
<i>Withania somnifera</i>	Selenik asit	Yaprak ekstraktı	45-90 nm	<u>Alagesan ve Venugopal, 2019</u>
<i>Ceropegia bulbosa</i>	Selenöz asit	Yumru özü	50–200 nm	<u>(Cittrarasu vd, 2021)</u>
<i>Psidium guajava</i>	Sodyum selenit	Yaprak ekstraktı	8 –20 nm	<u>(Alam vd., 2019)</u>
<i>Crataegus orientalis</i>	Sodyum selenit	meyve ekstraktı	ort. 113 nm	<u>(Cui vd., 2018)</u>
<i>Citrus limon</i>	Sodyum selenit	Sulu yaprak ekstraktı	60–80 nm	<u>(Prasad vd., 2013)</u>
<i>Aloe vera</i>	Sodyum selenit	Yaprak ekstraktı	ort. 121 nm	<u>(Fardsadegh ve Jafarizadeh-Malmiri, 2019)</u>
<i>Solanum nigrum</i>	Sodyum selenit	Meyve ekstraktı	100-115 nm	<u>(Saranya vd., 2022)</u>

Vyas ve Rana, (2018)'e göre *Allium sativum* özütü kullanılarak sentezlenen SeNP'ler gram pozitif bakterilere karşı etkin bir antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Dahası, sentezlendikleri andan itibaren 8 ila 52 nm arasında gözlemlenen boyutlarıyla iki aydan fazla süre kararlı formda kalabilmektedirler. Antibakteriyel etkinin araştırıldığı bir başka çalışmada grefurt ve limon özleri kullanılarak SeNP sentezi gerçekleştirilmiş ve standart bir antibiyotik olan siprofloksasin ile karşılaştırıldığında *E. coli*, *B. Subtilis*, *K. Pneumoniae* ve *M. luteus*'a karşı farklı dozlarda uygulanmış ve tüm patojenlere karşı önemli ölçüde antimikrobiyal aktivite gözlemlenmiştir (Alvi vd., 2021).

SeNP'lerin karakterizasyonu

Yeşil sentez yöntemiyle elde edilen naopartiküllerin karakterizasyonunu belirlemek amacıyla geçirimli elektron mikroskobisi (TEM), Atomik güç

mikroskobu (AFM), Termal gravimetrik analiz (TGA), Raman spektroskopisi, Taramalı elektron mikroskobu (SEM), Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), UV spektrofotometre, Zeta potansiyeli ölçümü gibi yöntemler kullanılmaktadır.

FTIR analizinde, nanopartiküller üzerindeki fonksiyonel varlığın belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu teknik ile örneklerin tepe noktalarını elde edebilmek için kızılötesi radyasyon (IR) kullanılmaktadır. Nanopartikülün belirli dalga boyunda ışığı nasıl emdiğini belirlemek için yapılır. Domates bitkisi kullanılarak gerçekleştirilen yeşil sentezden elde edilen selenyum nanopartiküllerinin FTIR analizi absorpsiyon değerleri hidroksil grubu, alkoller, fenoller ve NH bağ uzantılarının varlığını doğrulamıştır (Zahra vd., 2022).

Sentezi gerçekleştirilen SeNP'lerin boyutu ve morfolojisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen SEM yöntemi, *Calendula officinalis* özütleri kullanılarak sentezlenen selenyum nanopartiküllerinden geri saçılan elektronlar kullanılarak gerçekleştirilmiş ve yeşil sentezlenen SeNP'lerin yaklaşık 100 nm büyüklüğünde monodispers küresel bir morfoloji sunduğu gözlenmiştir. Bunun yanında selenyum nanopartiküllerinin şeklini ve boyutunu doğrulamak için de TEM tekniği kullanılmaktadır. SeNP'lerin mikrograflarında küresel bir morfoloji ve 40 ila 60 nm arasında çap değerleri gözlemlenmiştir (Hernández-Díaz vd., 2021).

Bir nanopartikülün zeta potansiyeli, yüzeyindeki yüklerin yoğunluğunun ölçüsü olarak tanımlanmaktadır. Nanopartiküllerin stabilitesi etkilemekle birlikte biyolojik sistemler ile etkileşime girme şeklini de belirlemektedir. Zeta potansiyelinde meydana gelecek olan değişimden kaynaklı ölçülebilen yüzey modifikasyonu, mukus taşınmasını, çözünürlüğünü ve hücresel taşımayı etkileyebilmektedir. Zeta potansiyelinde ölçülecek negatif değerler de düşük sitotoksitenin bir göstergesi olmaktadır (Galić vd., 2022).

UV-vis spektrum analizi organik bileşiklerin, metal iyonlarının ve biyomoleküllerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Spektral tarama sonucunda selenyum nanopartiküllerinin sentezini farklı yöntemlerle doğrulamak amacıyla UV-vis spektrofotometre kullanılarak 250 nm ila 750 nm dalga boyu arasında gerçekleştirilmektedir. Alam vd. (2019)'nin *Psidium guajava* yaprak özütü kullanarak selenyum nanopartikülleri sentezledikleri çalışmada UV-vis ölçümlerinin maksimum absorpsiyonu 381 nm'de gösterdiğini ve maksimum sentezin 25 mM sodyum selenit konsantrasyonu kullanılması sonucunda meydana geldiğini ifade etmişlerdir.

SeNP'lerin uygulama alanları

Nano selenyum antikanser ve DNA hasarı çalışmalarında, besin takviyesi olarak, nanobiyosensör üretimleri gibi tıptan sağlığa ve tarıma birçok alanda geniş bir kullanıma sahiptir. Bu kadar çeşitli alanlara hitap etmesinin temelinde çevre dostu olması ve düşük toksisite göstermesi yatmaktadır (Pyrzynska ve Sentkowska, 2022).

Cui ve diğerlerinin 2018'de yaptıkları bir çalışmada alıç meyvesi özünden selenyum nanopartikülleri sentezlemişler ve bu parçacıkların reaktif oksijen türlerinin teşvikiyle mitokondri yolu aracılığıyla aracılık edilen HepG2 hücrelerinin apoptozunu indüklediğini bildirmişlerdir. İnsan serviks kanseri hücre hattı üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise selenyum nanopartiküllerinin HeLa rahim ağzı kanseri hücrelerinin çoğalması üzerinde bir baskı oluşturup oluşturmayacağı incelenmiş ve bunu belirlemek için mitokondriyal redüktaz aktivitesi, MTT substratı kullanılarak ölçülmüştür. Çalışma, SeNP'lerin HeLa hücrelerinin çoğalmasını zamana ve doza bağlı bir şekilde önemli derecede baskıladığını göstermiştir (Pandey vd., 2021).

Limon bitkisinin sulu yaprak ekstraktından sentezlenen selenyum nanopartikülleri ile gerçekleştirilen MTT testi, tek hücreli jel elektroforezi ve kuyruklu yıldız testi sonuçları SeNP'lerin lenfosit hücrelerinin daha az ölümüne sebep olduğunu ve UVB'ye maruz bırakılan hücrelerde oluşacak DNA hasarını engellediğini ortaya koymuştur. Ayrıca selenyum nanopartiküllerinin floresan özelliği tanı çalışmalarında kullanılabilmesi ifade edilmektedir (Prasad vd., 2013).

Selenyum memelilerde beslenme üzerinde etkili bir mineraldir. Selenosistein aminoasidinin yapısında bulunmaktadır ve selenoproteinlerin oluşumunda etkilidir. Birçok selenyum proteini hücrelerde ya redoks durumlarının düzenlenmesine katıldıkları antioksidanlara karşı savunma sürecinde, ya da tiroit hormonları metabolizmasında kullanılmaktadırlar. Genel olarak gıdalardan temin edilen selenyum beslenmesinde eksiklik olması ve bazı hastalıklar (kardiyovasküler hastalıklar, tiroit hastalıkları, HIV vb.) durumlarında günlük alımlarının artırılması gerekmektedir. Sıklıkla kullanılan selenyum takviyesi formu, organik SeMet ya da SeMet bakımından zengin selenyum mayaları ve inorganik sodyum selenittir. Fakat; takviye olarak SeNP alımının inorganik selenyuma veya selenyum içeren aminoasitlere göre daha yüksek bir biyoyararlanım aktivitesine sahip olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca, düşük çaplı selenyum nanopartikülleri selenit ve selenometiyonine oranla daha düşük toksisite göstermektedir. Selenyum toksisitesini göz önünde bulundurken; formu, oksidasyon durumu ve iç ortam koşullarının hep birlikte değerlendirilmesi daha doğru sonuçlar ortaya çıkaracaktır (Skalickova vd., 2017).

Biyosensörler, biyolojik bileşenleri fizikokimyasal dedektörlerle birleştiren bir analitin tespiti amacıyla kullanılmaktadırlar. Nano ölçekli biyosensörler nanobiyosensörler olarak adlandırılmaktadır ve nanopartiküller, nanotüpler ve nanoteller örnek olarak verilebilmektedir. Hastalıkların teşhisinde, ilaç dağıtım sistemlerinde, çevre kirliliği ve toksisite tespitlerinde, yeraltı suyu taraması ve tarımsal izleme çalışmalarında kullanılmaktadırlar. Selenyum nanopartikülleri nanobiyosensörlerin üretiminde kullanılmakta ve hastalıkları tedavi etmek amaçlı ilaçların hedeflenen bölgelere dağıtımını için ilaçlarla entegre edilmektedir. Ayrıca, SeNP'ler yarı iletken doğası sebebiyle birçok hastalığın erken teşhisinde kullanılan nanocihazların yapımında kullanılmaktadır (Kumar ve Prasad, 2021).

Tarımsal uygulamalarda nanopartikül kullanımı bu alanda gerçekleştirilen büyük bir yeniliği temsil etmektedir. Daha verimli ve uygun maliyetli ürünler sayesinde tarım endüstrisini kalkındırır. Esas olarak, tarımda SeNP kullanımı sayesinde mantar ve patojenler gibi zararlı organizmaların neden olduğu hasarların ve hastalıkların kontrolünde; zirai kimyasalların kontrollü salınımında; bitkinin fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerinin geliştirilerek mahsul büyümesinin, veriminin ve kalitesinin artırılmasında temel besin elementleri olarak; abiyotik stresin azaltılmasında ve gıdaların besin değerlerinin artırılmasında kullanılmaktadır (Garza-García vd., 2021).

SONUÇ VE ÖNERİLER

SeNP'lerin bitki özleri yoluyla sentezi, basit prosedürleri, maliyet etkinliği, çevre dostu olması ve toksik olmaması nedeniyle yakın geçmişte büyük önem kazanmıştır. Birçok bitki özünü, biyosentez yoluyla SeNP'leri üretmek için etkin bir şekilde kullanılmıştır. Nanoparçacık sentezi sürecini yönlendirebilecek çeşitli biyomoleküllerdeki malzemelerin bolluğu, devrim niteliğindeki yeşil yaklaşımlar kullanılarak daha büyük ölçekte nanoparçacıkların üretilmesi için ekonomik olarak uygun araçlara yol açacaktır. Bitki bazlı SeNP'lerin çevresel strese karşı korumak için süreci iyi yönetmek ve mekanizmayı anlamak için birçok bilim alanının işbirliğine ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Ahmad, A., Ullah, S., Ahmad, W., Yuan, Q., Taj, R., Khan, A. U., ... & Khan, U. A. (2020). Zinc oxide-selenium heterojunction composite: Synthesis, characterization and photo-induced antibacterial activity under visible light irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 203, 111743.
2. Akhtar, M. S., Panwar, J., & Yun, Y. S. (2013). Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 1(6), 591-602.
3. Alagesan, V., & Venugopal, S. (2019). Green synthesis of selenium nanoparticle using leaves extract of withania somnifera and its biological applications and photocatalytic activities. *Bionanoscience*, 9(1), 105-116.
4. Alam, H., Khatoun, N., Raza, M., Ghosh, P. C., & Sardar, M. (2019). Synthesis and characterization of nano selenium using plant biomolecules and their potential applications. *BioNanoScience*, 9(1), 96-104.
5. Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D. G., & Lightfoot, D. A. (2017). Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*, 6(4), 42.
6. Alvi, G. B., Iqbal, M. S., Ghaith, M. M. S., Haseeb, A., Ahmed, B., & Qadir, M. I. (2021). Biogenic selenium nanoparticles (SeNPs) from citrus fruit have anti-bacterial activities. *Scientific Reports*, 11(1), 1-11.
7. Balachandar, R., Gurumoorthy, P., Karmegam, N., Barabadi, H., Subbaiya, R., Anand, K., ... & Saravanan, M. (2019). Plant-mediated synthesis, characterization and bactericidal potential of emerging silver nanoparticles using stem extract of *Phyllanthus pinnatus*: a recent advance in phytonanotechnology. *Journal of Cluster Science*, 30(6), 1481-1488.
8. Borase, H. P., Salunke, B. K., Salunkhe, R. B., Patil, C. D., Hallsworth, J. E., Kim, B. S., & Patil, S. V. (2014). Plant extract: a promising biomatrix for ecofriendly, controlled synthesis of silver nanoparticles. *Applied biochemistry and biotechnology*, 173(1), 1-29.
9. Cittrarasu, V., Kaliannan, D., Dharman, K., Maluventhen, V., Easwaran, M., Liu, W. C., ... & Arumugam, M. (2021). Green synthesis of selenium nanoparticles mediated from *Ceropegia bulbosa* Roxb extract and its cytotoxicity, antimicrobial, mosquitocidal and photocatalytic activities. *Scientific reports*, 11(1), 1-15.
10. Cui, D., Liang, T., Sun, L., Meng, L., Yang, C., Wang, L., ... & Li, Q. (2018). Green synthesis of selenium nanoparticles with extract of hawthorn fruit induced HepG2 cells apoptosis. *Pharmaceutical biology*, 56(1), 528-534.

11. Dutta, R. K., Nenavathu, B. P., & Talukdar, S. (2014). Anomalous antibacterial activity and dye degradation by selenium doped ZnO nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 218-224.
12. El-Seedi, H. R., El-Shabasy, R. M., Khalifa, S. A., Saeed, A., Shah, A., Shah, R., ... & Guo, W. (2019). Metal nanoparticles fabricated by green chemistry using natural extracts: Biosynthesis, mechanisms, and applications. *RSC advances*, 9(42), 24539-24559.
13. Fardsadegh, B., & Jafarizadeh-Malmiri, H. (2019). Aloe vera leaf extract mediated green synthesis of selenium nanoparticles and assessment of their in vitro antimicrobial activity against spoilage fungi and pathogenic bacteria strains. *Green Processing and Synthesis*, 8(1), 399-407.
14. Galić, E., Radić, K., Golub, N., Vitali Čepo, D., Kalčec, N., Vrček, E., & Vinković, T. (2022). Utilization of Olive Pomace in Green Synthesis of Selenium Nanoparticles: Physico-Chemical Characterization, Bioaccessibility and Biocompatibility. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9128.
15. Garza-García, J. J., Hernández-Díaz, J. A., Zamudio-Ojeda, A., León-Morales, J. M., Guerrero-Guzmán, A., Sánchez-Chiprés, D. R., ... & García-Morales, S. (2021). The role of selenium nanoparticles in agriculture and food technology. *Biological Trace Element Research*, 1-21.
16. Gunalan, S., Sivaraj, R., & Rajendran, V. (2012). Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens. *Progress in Natural Science: Materials International*, 22(6), 693-700.
17. Hernández-Díaz, J. A., Garza-García, J. J., León-Morales, J. M., Zamudio-Ojeda, A., Arratia-Quijada, J., Velázquez-Juárez, G., ... & García-Morales, S. (2021). Antibacterial activity of biosynthesized selenium nanoparticles using extracts of calendula officinalis against potentially clinical bacterial strains. *Molecules*, 26(19), 5929.
18. K.S. Prasad, H. Patel, T. Patel, K. Patel, K. Selvaraj, K. Suranjit, H. Patel, T. Patel, K. Patel, K. Selvaraj, K.S. Prasad. (2013). Biosynthesis of Se nanoparticles and its effect on UV-induced DNA damage *Colloids Surf. B*, 103 (2013), pp. 261-266, 10.1016/j.colsurfb.2012.10.029
19. Khan, S. A., Noreen, F., Kanwal, S., Iqbal, A., & Hussain, G. (2018). Green synthesis of ZnO and Cu-doped ZnO nanoparticles from leaf extracts of *Abutilon indicum*, *Clerodendrum infortunatum*, *Clerodendrum inerme* and investigation of their biological and photocatalytic activities. *Materials Science and Engineering: C*, 82, 46-59.

20. Kumar, A. ve Prasad, K. S. (2021). Role of nano-selenium in health and environment. *Journal of Biotechnology*, 325, 152-163.
21. Liu, W., Golshan, N. H., Deng, X., Hickey, D. J., Zeimer, K., Li, H., & Webster, T. J. (2016). Selenium nanoparticles incorporated into titania nanotubes inhibit bacterial growth and macrophage proliferation. *Nanoscale*, 8(34), 15783-15794.
22. Mahdavi, B., Saneei, S., Qorbani, M., Zhaleh, M., Zangeneh, A., Zangeneh, M. M., ... & Ghaneialvar, H. (2019). Ziziphora clinopodioides Lam leaves aqueous extract mediated synthesis of zinc nanoparticles and their antibacterial, antifungal, cytotoxicity, antioxidant, and cutaneous wound healing properties under in vitro and in vivo conditions. *Applied Organometallic Chemistry*, 33(11), e5164.
23. Majeed, A., Javed, F., Akhtar, S., Saleem, U., Anwar, F., Ahmad, B., ... & Sohail, M. F. (2020). Green synthesized selenium doped zinc oxide nano-antibiotic: Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial, nanotoxicity and teratogenicity potential. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(36), 8444-8458.
24. Mostafa, E., Fayed, M. A., Radwan, R. A., & Bakr, R. O. (2019). Centaurea pumilio L. extract and nanoparticles: A candidate for healthy skin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 182, 110350.
25. Özlü, B. (2021). Termotolerant bakterilerin nanopartikül üretim yeteneğinin araştırılması. İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 53s.
26. Pal, G., Rai, P., & Pandey, A. (2019). Green synthesis of nanoparticles: A greener approach for a cleaner future. In *Green synthesis, characterization and applications of nanoparticles* (pp. 1-26). Elsevier.
27. Pandey, S., Awasthee, N., Shekher, A., Rai, L. C., Gupta, S. C., & Dubey, S. K. (2021). Biogenic synthesis and characterization of selenium nanoparticles and their applications with special reference to antibacterial, antioxidant, anticancer and photocatalytic activity. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(12), 2679-2696.
28. Prasad, K. S., Patel, H., Patel, T., Patel, K., & Selvaraj, K. (2013). Biosynthesis of Se nanoparticles and its effect on UV-induced DNA damage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, 261-266.
29. Pyrzyńska, K. ve Sentkowska, A. (2022). Biosynthesis of selenium nanoparticles using plant extracts. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 12, 467-480.

30. Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2008). CRC 675—current trends in phytosynthesis of metal nanoparticles. *Critical reviews in biotechnology*, 28(4), 277-284.
31. Saranya, T., Ramya, S., Kavithaa, K., Paulpandi, M., Cheon, Y. P., Harysh Winster, S., ... & Narayanasamy, A. (2022). Green Synthesis of Selenium Nanoparticles Using Solanum nigrum Fruit Extract and its Anti-cancer Efficacy Against Triple Negative Breast Cancer. *Journal of Cluster Science*, 1-11.
32. Sentkowska, A. (2022). The potential of traditionally used medicinal plants for the synthesis of selenium nanoparticles. *Natural Product Research*, 1-5.
33. Shanker, U., Jassal, V., Rani, M., & Kaith, B. S. (2016). Towards green synthesis of nanoparticles: from bio-assisted sources to benign solvents. A review. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 96(9), 801-835.
34. Sharma, G., Sharma, A. R., Bhavesh, R., Park, J., Ganbold, B., Nam, J. S., Lee, S. S. (2014). Biomolecule-mediated synthesis of selenium nanoparticles using dried Vitis vinifera (raisin) extract. *Molecules*, 19(3), 2761-2770.
35. Silva, G. A. (2004). Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surgical neurology*, 61(3), 216-220.
36. Skalickova, S., Milosavljevic, V., Cihalova, K., Horiky, P., Richtera, L., & Adam, V. (2017). Selenium nanoparticles as a nutritional supplement. *Nutrition*, 33, 83-90.
37. Teimouri, M., Khosravi-Nejad, F., Attar, F., Saboury, A. A., Kostova, I., Benelli, G., & Falahati, M. (2018). Gold nanoparticles fabrication by plant extracts: synthesis, characterization, degradation of 4-nitrophenol from industrial wastewater, and insecticidal activity—a review. *Journal of Cleaner Production*, 184, 740-753.
38. Vyas, J. ve Rana, S. (2018). Synthesis of selenium nanoparticles using Allium sativum extract and analysis of their antimicrobial property against gram positive bacteria. *The Pharma Innovation*, 7(9), 262-266.
39. Zahra S., Iqbal, M. S., Abbas, K., & Qadir, M. I. (2022). Synthesis, characterization and evaluation of biological properties of selenium nanoparticles from Solanum lycopersicum. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(7), 103901.

11. Bölüm

Endüstriyel Enzim: α -Amilaz

Sema AGÜLOĞLU FİNCAN¹

¹ Doç. Dr., Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Diyarbakır-Türkiye

Doğal katalizörler olarak görev yapan enzimler, hücrede meydana gelen çok sayıdaki tepkimenin hızını ve özgülüğünü belirlemektedir (Bahar 1996). Binlerce yıldır bilinçsizce de olsa peynir, ekme, yoğurt, bira ve şarap yapımında, deri, çivit, keten işlemede kullanılmışlardır. (Kirk ve ark. 2002). İlk bulgular eski Mısır'a kadar dayanmaktadır. Modern üretim teknikleri ile birlikte enzim endüstrisi ve enzim biyoteknolojisinde önemli gelişmeler kaydedilmiş, böylece enzimlerin ekonomik olarak bol miktarda üretimi sağlanmıştır.

Bir enzimin endüstriyel alanda kullanılabilmesi için alerjik ya da toksik etkiye sahip olmaması, ekonomik olarak elde edilebilmesi ve çeşitli alanlarda kullanılabilirliğinin olması gerekir (Wiseman 1987). Endüstriyel olarak üretilen enzimlerin %75'ini kullanan başlıca endüstriler; deterjan (%37), tekstil (%12), nişasta (%11), fırıncılık (%8) ve hayvan yemidir (%6) (Das ve ark. 2011).

Enzimler; kimya, kâğıt, deri, biyoyakıt, kauçuk, fotoğraf, gıda endüstrisinde, boya ve temizlik maddeleri üretiminde, ziraatte, kontak lens temizleyicilerinde, endüstriyel atıkların değerlendirilmesinde, tıpta teşhis ve tedavi ile biyolojik savaşa kadar geniş alanlarda geniş kullanım alanı bulmuştur (Enez ve Agüloğlu Fincan 2016, Agüloğlu-Fincan ve ark. 2014, Özdemir ve ark. 2018, Müderriszade ve ark. 2001).

Endüstriyel olarak üretilen ilk enzim amilaz olup tedavi amaçlı kullanılmıştır (Sarıkaya ve Gürgün 2000). Kirchoff 1811 yılında buğdayda ilk nişasta parçalayıcı enzimi, α -amilazı keşfetmiştir (Gupta ve ark. 2003). 1831'de Erhard Leuchs tarafından tükürükte, 1846'da Magendie tarafından serumda, 1862'de Alexander Jakulowitsch Danilewsky tarafından pankreasta, 1863'te Cohnheim tarafından idrarda tanımlanmıştır (Nater ve ark. 2007). 1951 yılında Bernfeld ise tükürüğün sahip olduğu bu özelliğe, Persoz ve Payen'in diastaz, Berzelius'un ise pityalin adının verildiğini belirtmektedir. Günümüzde ise nişastayı parçalayan

Nişasta ve glikojen gibi polisakkaritleri parçalayabilen genellikle bakteri, mantar ve maya gibi çeşitli organizmalarda bulunan amilazlar, gıdadan biyoyakıtlara kadar çeşitli endüstriyel sektörlerde yer almaları nedeniyle büyük biyoteknolojik potansiyele sahiptir. Amilazlar bitki, hayvan ve mikroorganizma gibi doğal kaynaklardan elde edilebilir.

Ancak mikrobiyal enzimlerin bitki ve hayvan enzimlerine göre ekonomik oluşları ve sınırlı yer ve zamanda büyük ölçekte kolayca üretilip saflaştırılabilmeleri nedeniyle ticari uygulamalar için çeşitli mikroorganizmalar endüstriyel amilaz kaynakları olarak kullanılmaktadır (Ortakaya ve ark. 2017, Agüloğlu ve ark. 2000). *Bacillus türleri*, *Aspergillus niger*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Cephalosporium*, *Neurospora* başlıca amilaz üreten mikroorganizmalardır (Rakaz ve ark. 2021, Aladejena ve ark 2020, Abd-elaziz

ve ark. 2020, Kannan ve ark. 2019, Kalyani ve ark. 2018, Wolfgang 2007, Du ve ark. 2018, Al-Johani ve ark. 2017).

α -Amilaza olan yüksek talep nedeniyle sentezi, rekombinant DNA teknolojisi, farklı fermentasyon yöntemleri kullanılarak ve fermentasyon sırasında sıcaklık, pH ve fermentasyon süresi gibi çeşitli parametrelerin optimize edilmesiyle enzim üretimi arttırılabilmektedir. Biyoteknoloji bakımından önemli endüstrilerde ve alkol fermentasyonu, nişasta hidrolizi, silaj üretimi, kağıt, gıda, tekstil, deterjan klinik, eczacılık, medikal, analitik kimya gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Agüloğlu Fincan ve ark. 2021, Balakrishnan ve ark. 2021, Farooq ve ark 2021, Savaner ve Sohani 2020, Rezzukoğlu ve ark. 2018, Agüloğlu-Fincan ve Enez 2014). Son 5 yılda yapılan patent araştırmalarında alfa-amilaz kullanımına ilişkin 186 patent bulunmaktadır. Bunların dağılımı şu şekildedir; 84 (biyoyakıt), 41 (içecek), 16 (ilaç), 15 (deterjan), 11 (gıda), 10 (hayvan yemi), 9 (tekstil) (Ferreira ve ark. 2020).



Şekil 1 α -Amilazın yapısı (Janecek and Balaz 1992)

Amilaz Türleri:

Ohlsson malttan elde ettiği parçalayıcı enzimleri, alfa (α) ya da beta (β) amilaz olarak isimlendirmiştir. Mybrach ve Neamuler ise amilazları endoamilaz ve ekzoamilaz olarak sınıflandırmışlardır. Günümüzde ise etki mekanizmaları ve oluşturdukları ürünlere bağlı olarak α -amilaz, β -amilaz ve γ -amilaz olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır. (Simair 2017).

α -Amilaz

Alfa-amilaz (1,4- α -D-glukan glukanohidrolaz; E.C.3.2.1.1), glikoz ve maltoz gibi ürünler elde etmek için nişastadaki α -1,4-glikosidik bağların hidrolizini katalizleyen bir hidrolaz grubuna bağlı bir kalsiyum metalloenzimdir (Sundarram 2014). Amilaz nişasta molekülünde bulunan α -1,4 bağları üzerine rastgele etki ederek maltoz ve glukoz oluşturmaktadır. Nişastanın enzimatik hidrolizi sonunda oluşan ürünler α -optik konformasyonu göstermektedir. Bu nedenle bu enzimler α -amilazlar olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca bu enzimler nişastanın iç kısımlarında bulunan α -1,4 bağlarını etkilediklerinden dolayı endoamilazlar olarak ifade edilmektedir (Ray ve ark. 2008).

β – Amilaz

Beta-amilaz (E.C.3.2.1.2), maltoz üretmek için α -1,4 bağlarını hidrolize eder (Kossmann ve Lloyd, 2000). 1,4- α -D-glukanmaltohidrolaz, glikojenaz veya sakarogen amilaz olarak ta bilinir. Nişasta molekülünün hidrolizi sonucu açığa çıkan ürünler β -optik konformasyonu gösterdiklerinden dolayı bu enzimlere β -amilazlar adı verildiği belirtilmiştir (Gomes ve ark. 2003).

γ – Amilaz

Gama-amilaz, (E.C.3.2.1.3) glukan 1, 4- α -glukosidaz, amiloglukosidaz, ekso-1, 4- α -glukozidaz, glukoamilaz, lizozomal α -glukosidaz veya 1,4- α -D-glukanglukohidrolaz olarak ta bilinir (Tateno ve ark., 2007). γ -Amilazlar amilopektin ve amiloz moleküllerini indirgen olmayan uçlarından keserek maltoz, glukoz, oligomaltoz ve maltotrioz oluşumuna neden oldukları belirtilmiştir (Hsieh ve ark. 2008). Diğer amilaz türlerinden farklı olarak, γ -amilaz asidik ortamda en aktiftir, optimum pH değeri 3'tür (Kumar ve ark. 2009).

α -Amilazın Kullanım Alanları

Sürdürülebilir kalkınmanın artan önemi, biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik kaynaklar kullanılarak üretilebilen enzimleri çeşitli alanlarda kullanma konusunda insanlara ilham vermiştir. Enzim, fruktoz şurubu üretimi, çevre açısından güvenli deterjanlar ve fırınlanmış ürünler dahil olmak üzere çok önemli uygulamalara sahiptir. Fosil yakıtların tükendiği ve alternatif enerji biçimleri üretmeye yönelik çalışmalara bu enzim, bir umut ışığı olmuştur. Rekombinant DNA teknolojisinden faydalanılarak, enzim kullanımı giderek yaygınlaşmış ve üretimi de büyük miktarlara ulaşmıştır (Gessese 1999).

Nişasta Endüstrisi

α -Amilazın en yaygın kullanımını nişasta endüstrisinde nişastayı fruktoza ve glukoz şuruplarına dönüştüren nişasta sıvılaştırma işlemidir (Rakaz 2021, Nielsen ve ark. 2000). Nişastanın parçalanması ile açığa çıkan glukoz ve fruktoz gibi ürünlerinin üretimi, alkolsüz içecek endüstrisinde tatlandırıcı özelliklerinden dolayı en büyük pazarı oluşturmaktadır (Souza ve Magalhães 2010). Günümüzde gıda endüstrisinde önemli bir ürün olan yüksek fruktoz içerikli mısır şurubu üretimi daha çok mısır nişastasının enzimatik hidrolizi ile gerçekleştirilmekte ancak kimyasal yöntemlerle üretime de halen devam edilmektedir. (Parker ve ark. 2010). Nişastanın enzimatik dönüşüm aşamaları şunlardır: nişasta granüllerinin çözünmesini ve böylece viskoz bir süspansiyon oluşturmayı içeren *jelatinleştirme*; kısmi hidroliz ve viskozite kaybı içeren *sıvılaştırma*; ve daha fazla hidroliz yoluyla glikoz ve maltoz üretimini içeren *sakarifikasyon* (Gupta ve ark. 2003, Prakash ve ark. 2009).

Deterjan Endüstrisi

α -Amilaz nişasta içeren zorlu lekelerin temizlenmesi amacı ile deterjanlarda patates, makarna, muhallebi, çikolata vb. nişastalı gıdaların kalıntılarını dekstrinlere ve alkali pH ve daha düşük sıcaklıklarda aktiviteye sahip olan diğer daha küçük oligosakkaritlere ayrıştırmak için çamaşır ve bulaşık deterjanlarında kullanılmaktadır (Mukherjee ve ark. 2009). Nişasta, toz partikülünü kumaşın yüzeyinde tutar, α -amilaz ise nişastalı bileşenleri bozarak kumaşın beyazlığını ve parlaklığını artırır. Benzer şekilde kullanılmış yemek kaplarında bulunan nişastalı gıda kalıntıları da α -amilaz tarafından uzaklaştırılır. Özellikle sıvı deterjanların içeriğinin %90'dan fazlası amilazdır. Deterjanlardaki enzim ilavesi ile daha iyi temizleme sağlanmakta ve ortam koşulları yumuşatılmaktadır. İlk üretilen enzimsiz deterjanların ahşap malzemelere ve çin porselenlerine zarar verdiği tespit edilmiştir. Deterjan endüstrisinde kullanılan amilazlar *Bacillus* veya *Aspergillus*'tan elde edilir (Priyadarshini ve Ray 2019, Mitidieri ve ark. 2006).

Tekstil Endüstrisi:

Ticari amaçlı α -amilaz ilk olarak 1905'te Japonya'da tekstil endüstrisi için haşıl alma işleminde kullanılmak üzere üretilmiştir. Tekstil endüstrisinde dokuma sırasında ipliklerin sağlam ve düzgün olması amacıyla kumaş üretiminden önce nişasta gibi haşıl maddeleri ipliğe uygulanır. Yüksek nişastaya maruz bırakılma işlemine haşıllama (*sizing*) denir. Haşıllama için genellikle ucuz ve kolay elde edilebildiğinden nişasta tercih edilmektedir. Kumaş dokunduktan sonra, kullanılan nişastanın fazlası sonlandırma işleminde uzaklaştırılır (şimşek 2006).

Bu işlem de “haşıl alma” (desizing) olarak adlandırılır (Kıran ve ark. 2006). Sağlam liflerin yapımı için tekstil fibrillerinin haşılınmasında çözünmeleri önlemek için haşıl alma ajanı olarak α -amilaz kullanılmaktadır. α -Amilaz liflere zarar vermeden çözümlü ipliğinin kopmasını önlemek için güçlendirme ajanı olarak görev yapan nişastanın kumaştan çıkarılmasını sağlar (Ahlawat ve ark. 2009, Feitkenhauer 2003, Gupta ve ark. 2003). Dericilikte ise α -amilaz, derinin renklendirme ve koyulaştırma işlemlerinde kullanılmaktadır (Şimşek 2006).

Gıda Endüstrisi:

α -Amilazlar fırıncılık, içecek ve çikolata gibi işlenmiş gıda endüstrilerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Ekmek ve unlu mamüller

α -Amilaz ekmekçilikte önemli bir yere sahiptir (Gupta ve ark. 2003). Fırıncılık endüstrisinde, hamurdaki nişastayı hidrolize etmek için α -amilaz kullanılır. Bu işlem, unlu mamullerde özellikle daha iyi kabarma, daha iyi renk, daha lezzetli ürün eldesi ve raf ömrünü uzatmak amacıyla uygulanmaktadır (Ghorai ark. 2009, Mitidieri ve ark. 2006). Hamurda mayalanma süreci ve pişirme başlangıcında oluşan değişiklikler α -amilaz aktivitesine bağlıdır. α -Amilaz fermantasyon oranını arttırmak suretiyle, hamur mayalanma süresini kısaltmakta ve böylece daha çok ekmek üretimine neden olmaktadır. α -Amilaz etkisi ile oluşan şeker, pişme sırasında karamelizasyona neden olarak dış kabuk rengini ve tadını arttırmakta, aynı zamanda maya tarafından kullanılarak açığa çıkan karbondioksit gazının fırın sıcaklığında genişleyerek ekmeğin daha hacimli, daha düzgün kolay sindirilebilir olmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda α -amilaz ekmeğin bayatlama sürecini yavaşlatarak raf ömrünü uzatması açısından da önemlidir. Fırınlama yapıldıktan sonra, fırınlanmış ürünlerin saklanması sırasında değişiklikler olabilir. Ekmek içi sertliğinin artması, kabuğun gevrekliğinin kaybolması, ekmek içi nem içeriğinin azalması ve ekmeğin lezzetinin kaybolması gibi istenmeyen değişikliklerin tümüne bayatlama denir. α -Amilazın fermente olabilen ürünleri, bayatlama önleyici maddeler olarak işlev görerek kırıntı sertliği, kabuğun gevrekliğinin kaybolması ve nem içeriğinin azalması gibi bayatlama etkilerini önler. Ayrıca glukozdan üretilen fruktoz şurubu pasta yapımında kullanılmaktadır (Şimşek 2006).

İçecek endüstrisi

Amilazlar meyve sularının berraklaştırılmasında kullanılır (Mitidieri ve ark. 2006, Ahlawat ve ark.2009). Endüstride meyve suyu üretiminde kullanılan meyvelerden henüz olgunlaşmamış olanları nişasta açısından oldukça yüksek

içeriğe sahip olduklarından bulanıklığa neden olmaktadır. α -Amilaz ise armut, elma gibi meyvelerin sularını berraklaştırma işleminde başarıyla kullanılmaktadır (Li ve ark. 2005).

Çikolata endüstrisi

Alfa amilaz, kakao bulamaçlarından çikolata şurubu üretiminde kullanılır (Saini ve ark. 2017). Çikolata şurubu, dondurulmuş çikolata, aromalı şekerlemeler, vb. imalatında kullanılan, oda sıcaklığında yüksek stabilite ve akış özelliklerine sahip kakao aromalı bir bileşiktir (Kumari ve ark. 2012; Dey ve Banerjee 2014).

Biyoyakıt Üretimi için Nişastanın Etanole Fermantasyonu

Etanol, birçok ülkede çevre kirliliği ve küresel ısınmaya karşı savaşta biyoyakıt olarak kullanılmakta, substrat olarak da düşük maliyeti ve maksimum kullanılabilirliği nedeniyle nişasta tercih edilmektedir. Amilazlar, biyorafineri endüstrilerinde bioetanol üretimi için daha çok fermantasyondan önce gerekli olan nişasta enzimi hidrolizi için kullanılan ana enzim grubudur (Pervez ve ark. 2014, Hesham 2013).

Nişasta İşleme Atık Sularının Arıtılması

Nişasta, tekstil, kağıt, şeker, unlu mamuller, şekerleme, biracılık vb. gibi çeşitli endüstrilerin atık suyunda bulunur. Endüstriyel atıklardan atıkların uzaklaştırılması pahalı bir işlemdir ve bazen çevrede biyokimyasal tehlikeler oluşturur. Nişastalı atıkların α -amilaz ile muamele edilerek işlenmesi hem ekonomik olarak hem de çevre açısından önemli bir uygulamadır. (Kumar ve ark. 2014).

Yem Sektörü ve Hayvan Besleme

Hayvanlar özellikle tahıl ağırlıklı yemlerle beslendiklerinde bazı sindirim bozukluklarına sebebiyet vermektedir. Bu nedenle indirim sisteminde nişasta, protein ve yağları parçalayarak sindirimin desteklenmesi amacı ile hayvan yemlerine enzim ilavesi yapılmaktadır. Bunlardan amilaz da tek başına veya çeşitli enzimlerle kombine olarak yemlere katılmak suretiyle yem sanayinde kullanılmaktadır. Enzim kullanımı ile yemlerin sindirilme dereceleri, metabolik enerji değerleri ve hayvanların yemden yararlanma oranları artırılması sağlanmaktadır. Yem katkı maddesi olarak mantar ve bakteri kökenli enzimler tercih edilir. Kümes hayvanlarına da kuluçka çıkışından itibaren ilk 10 günde yeterince amilaz üretimi üretilmediği durumda kaliteyi arttırmak amacıyla yemlerine %0.1 düzeyinde α -amilaz eklenmektedir (Özdemir ve Özcan 2020).

Kağıt Endüstrisi

Enzim kullanabilecek en önemli alanlardan birisi kağıt endüstrisidir (Fukara 2007, Ağuloğlu-Fincan ve Enez 2014). Tekstilde olduğu gibi, kağıt da nişasta ile kaplanarak mekanik hasarlara karşı korunması sağlanmaktadır. α -Amilazların kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde kullanımı, nişastanın kağıt kaplama için modifiye edilmesi ile olmaktadır. Doğal nişastanın yoğunluğu çok fazla olduğundan amilaz kullanılarak nişastanın belirli düzeyde hidrolizasyonu ile nişastanın istenilen yoğunluğa ulaşması sağlanmaktadır. Bu işlemle, son ürün halindeki kağıdın kalitesi, sertliği, direnci, pürüzsüzlüğü, yazma ve silinebilirlik kapasitesi arttırılmaktadır.

Klinik Uygulamalar

Aspergillus oryzae kaynaklı α -amilaz sindirime yardımcı olmak amacıyla hazımsızlık tedavisinde kullanılır. Sindirim ilaçlarının sıvı ve kapsül formları piyasada mevcuttur. α -Amilaz ayrıca pankreatik fistül, akut stres, mide aspirasyonu vb. için bir biyobelirteç görevi görür (Saini 2017). Böylece, biyosensör aracılı amilaz tespiti, hiperamilazemi için teşhis aracıdır (Gupta ve ark. 2014).

Kaynakça

1. Abd-Elaziz, A. M., Karam, E. A., Ghanem, M. M., Moharam, M. E., & Kansoh, A. L. (2020) Production of a novel α -amylase by *Bacillus atropheus* NRC1 isolated from honey: Purification and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 292-301.
2. Agüloğlu Fincan S., Özdemir, S., Karakaya, A., Enez, B., Demiroğlu Mustafafov, S., Ulutaş, M. S. & Şen, F. (2021) Purification and characterization of thermostable α -amylase produced from *Bacillus licheniformis* So-B3 and its potential in hydrolyzing raw starch, *Life Sciences*, Volume 264, 118639 .
3. Agüloğlu Fincan, S. & Enez, B. (2014) Production, purification, and characterization of thermostable α -amylase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*, *Starch-Starke*; 66: 182–189.
4. Agüloğlu Fincan S., Enez B., Özdemir S. & Matpan Bekler F, (2014) Purification and characterization of thermostable α -amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus*. *Carbohydrate Polymers*; 102:144– 150.
5. Agüloğlu S., Ensari, N.Y., Uyar, F. & Otludil B. (2000) The effects of amino acids on production and transport of α -amylase through bacterial membranes. *Starch/Starke*, 52, 290-295.
6. Ahlawat, S., Dhiman, S.S., Battan, B., Mandhan, R.P. & Sharma, J. (2009) Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. *Process Biochemistry*, 44, 521–526.
7. Aladejana, O. M., Oyedeji, O., Omoboye, O. & Bakare, M. (2020) Production, purification and characterization of thermostable alpha amylase from *Bacillus subtilis* Y25 isolated from decaying yam (*Dioscorea rotundata*) tuber. *Notulae Scientia Biologicae*, 12(1), 154-171.
8. Al-Johani, N.B., Al-Seeni, M.N. & Ahmed, Y.M. (2017) Optimization of alkaline α -amylase production by thermophilic *Bacillus subtilis*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(1), 288-301.
9. Bahar, T. (1996) Enzim immobilizasyonu için manyetik polistiren partiküllerin hazırlanması ve bu partiküllerdeki immobilize edilmiş glukoamilazın manyetik olarak stabilize edilmiş akışkan yatak reaktör (MSAYR)'de kullanılması. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara. 3-17.

10. Balakrishnan, M., Jeevarathinam, G., Kumar, S.K.S., Muniraj, I. & Uthandi, S. (2021) Optimization and scale-up of α -amylase production by *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation of edible oil cakes. *BMC Biotechnology*, 4;21(1):33.
11. Dey, T.B. & Banerjee, R. (2014) Application of decolourized and partially purified polygalacturonase and α -amylase in apple juice clarification. *Brazilian Journal of Microbiology*, 19;45(1):97
12. Das, S., Singh, S., Sharma, V. & Soni, M.L. (2011) Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme. *International Journal of Pharmacy Biology and Science*, 2(1):486-96.
13. Du, R., Song, Q., Zhang, Q., Zhao, F., Kim, R. C., Zhou, Z. & Han, Y. (2018) Purification and characterization of novel thermostable and Ca-independent α -amylase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* BH072. *International journal of biological macromolecules*, 115, 1151-1156.
14. Enez, B. & Ağuloğlu Fincan, S. (2016) Isolation, Partial Purification and Characterization of Thermostable Xylanase from Thermophilic *Anoxybacillus* sp. Isolated from Hot Springs. *Fresenius Environmental Bulletin*. Volume 25: 3028-3038,
15. Farooq, M.A., Ali, S., Hassan, A., Tahir, H.M., Mumtaz, S. & Mumtaz, S. (2021) Biosynthesis and industrial applications of α -amylase: a Review. *Archives Microbiology*, 203(4):1281-1292.
16. Feitkenhauer, H. (2003). Anaerobic digestion of desizing wastewater influence of pretreatment and anionic surfactant on degradation and intermediate accumulation. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 250–258.
17. Ferreira, A.V.F., Silva, F.F., Silva, A.A.M., Azevedo, L.S., da Fonseca S.T.D., Camilo, N.H., Dos Santos, K.P.E., de Carvalho, L.C., Tarabal, V.S., da Silva, J.O., Machado, J.M., Nogueira, L.M., Torres, F.A.G. Galdino, A.S (2020) Recent Patents on the Industrial Application of Alpha-amylases. *Recent Patents of Biotechnology*, 14(4):251-268.
18. Gessese, A. (1999) Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable α -amylase from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25: 433-438.
19. Ghorai S, Banik SP, Verma D, Chowdhury S, Mukherjee S, Khowala S. (2009). Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food Research International*, 42:577-587.
20. Gomes, I., Gomes, J. & Steiner, W. (2003). Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus*

- marinus*: production and partial characterization. *Bioresource Technology*, 90: 207–214.
21. Greenwood, C.T. (1970). Carbohydrates, *Chemistry and Biochemistry*, Vol II, second edition, Academic Press, New York. 471-514.
 22. Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, K. V., & Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective, *Process Biochemistry*, 11, 1599-1616.
 23. El-Enshasy, H.A., Abdel Fettah, Y.R. & Othman, N.Z. (2013). Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers. Amylases: characteristics, sources, production, and applications. Book Editor(s): Shang-Tian Yang, Hesham A El-Enshasy, Nuttha Thongchul First published: 12 July 213
 24. Fukara, G. (2007). Bazı ekstrem termofil bakterilerin amilazlarının özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, AÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.
 25. Hsieh, M. S., Yin, L. J. & Jiang, S. T. (2008). Purification and characterization of the amylase from a small abalone *Haliotis sieboldii*. *Fisheries Science*, 74(2), 425-432.
 26. Janecek, A. & Balaz, A. (1992). Alpha amylases and approach leading to their enhanced stability. *FEBS Letters*, 304:1–3
 27. Li, W.F., Zhou, X.X. & Lu, P., Structural features of thermozyms. *Biotechnology Advances*, 23: 271–281, 2005.
 28. Kalyani, G. & Rajesh, E.M. (2018). Production and Purification of Amylase from *Bacillus subtilis* Isolated from Soil. *International Journal of Engineering and Management Research*, Volume-8, Issue-3, 246-254
 29. Kannan TR. & Kanagaraj C. (2019). Molecular characteristic of α -AMYLASE enzymes producing from *Bacillus lichenformis* (JQ946317) using solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20 -101240
 30. Kıran, E.Ö. & Çömlekçioğlu U. (2003). Zeytin İlıcısı (Kahramanmaraş)'ndan termofil alkalifilik amilolitik *Bacillus sp.* suşlarının izolasyonu ve amilaz üretme yetenekleri üzerine azot kaynaklarının etkisi. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 6(2): 41-48
 31. Kirk, O., Borchert, T.V. & Fuglsang, C.C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion Biotechnology*, 3:345-35.
 32. Kossmann J. & Lloyd J (2000) Understanding and influencing starch biochemistry. *Critical Reviews Biochemistry Molecular Biology* 35: 141-196.

33. Kumar, P. (2009). Significance of the ratio of Exhaust temperature to coolant temperature and Its effect on various engine working parameters. *Proceedings of the World Congress on Engineering*, Vol. 2, 1-5.
34. Kumari, N., Jain, V. & Malhotra, S. 2013. Purification and characterization of extracellular acidophilic α -amylase from *Bacillus cereus* MTCC 10205 isolated from soil. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 7 (48): 5440-5448
35. Mitidieri S, Martinelli, A.H.S., Schrank, A. & Vainstein MH. (2006). Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresource Technology*, 97:1217-1224.
36. Mukherjee, A. K., Borah, M. & Rai, S. (2009). To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular α -amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid-state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α -amylase in laundry detergent formulations. *Biochemical Engineering Journal*, 43(2):149-156.
37. Müderriszade A, Ensari NY, Ağuloğlu S. & Otludil B (2001). Purification and characterization of alkaline proteinase from alkalophilic *Bacillus* sp. *Applied Biochemistry of Microbiology*, 37:574-577
38. Nater, U.M., Rohleder, N., Schlotz, W., Ehlert, U., Kirschbaum, C. (2007). Determinants of the diurnal course of salivary alpha-amylase. *Psychoneuroendocrinology*, 32(4):392-401.
39. Nielsen, J.E. & Borchert, V. (2000). Protein engineering of bacterial-amylases. *Biochimica et Biophysica ACTA*, 1543: 253-274.
40. Ortakaya, V. & Ağuloğlu Fincan, S. (2019). SmF yöntemiyle topraktan izole edilen *Bacillus subtilis* ' den amilaz üretimi. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 12(3), 57-64.
41. Ortakaya, V., Ağuloğlu Fincan, S. & Enez, B. (2017). α -Amylase from *Bacillus simplex* production, characterization and partial purification. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26(7), 4446-4455.
42. Özdemir, G. & Özcan, B.D. (2020). Sıcaklığa Dirençli Alfa-amilaz Enzimi Üreten Mezofilik Bakteri İzolasyonu ve Enzimin Kısmi Karakterizasyonu. *OKU Journal of Natural and Applied Sciences*, 3 (2), 75-82.
43. Özdemir, S., Ağuloğlu Fincan, S., Karakaya A. & Enez, B (2018). A Novel Raw Starch Hydrolyzing Thermostable α -Amylase Produced by Newly Isolated *Bacillus mojavensis* SO-10: Purification, Characterization and Usage in Starch Industries. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, ISSN 1678-4324 Online Edition v.60

44. Pervez, S., Aman, A., Iqbal, S., Siddiqui, N.N. & Qader, S.A.U. (2014) Saccharification and liquefaction of cassava starch: an alternative source for the production of bioethanol using amylolytic enzymes by double fermentation process. *BMC Biotechnol*, 14:49
45. Priyadarshini, S. & Ray P. (2019) Nov Exploration of detergent-stable alkaline α -amylase AA7 from *Bacillus sp* strain SP-CH7 isolated from Chilika Lake. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1;140:825-832.
46. Prakash, B., Vidyasagar, M., Madhukumar, M.S., Muralikrishna, G., Sreeramulu, K. 2009. Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant thermostable, and alkali-stable α -amylases from *Chromohalobacter sp.* TVSP 101. *Process Biochemistry*, 44: 210–215.
47. Rakaz, M. A., Hussien, M. O., & Ibrahim, H. M. (2021). I solation, Extraction, Purification, and Molecular Characterization for Thermostable α -Amylase from Locally Isolated *Bacillus* Species in Sudan. *Biochemistry Research International*. 1-8
48. Ray, R. C., Kar, S., Nayak, S., & Swain, M. R. (2008). Extracellular α -amylase production by *Bacillus brevis* MTCC 7521. *Food Biotechnology*, 22(3), 234-246.
49. Rezzukoğlu, İ. Ağuloğlu Fincan, S. & Enez B. Production and characterization of α -amylase from lactic acid bacteria isolated with whey. *Biological Diversity and Conservation (Biodicon)* 11(2), 115-122, 2018
50. Saini, R. H.S. Saini & Dahiya, A. (2017). Amylases: Characteristics and industrial applications. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, Vol. 6, Issue 4, 1865-1871
51. Sarıkaya, E. and V., Gürgün. 2000. Increase of the α -amylase yield by some *Bacillus* strains *Turkish Journal of Biology*, 24:299-308.
52. Savaner S. & Sohani S. (2020) Review on microbial α -amylase, types & their industrial application. *UGC Care Group-1 Journal*, Vol-23 No.04, 105
53. Simair, A.A. Qureshi, A. S. Khushk, I. Ali, C. H. Lashari, S.. Bhutto, M. A., Mangrio, G. S. & Lu C. (2017) Production and Partial Characterization of α -Amylase Enzyme from *Bacillus sp.* BCC 01-50 and Potential Applications. *BioMed Research International*, Pages 9
54. Souza PM. & Magalhães P. O. (2010) Application of microbial α -amylase in industry: A review. *Brazilian Journal of Biology*, 41:850–861
55. Sundarram, A. & Murthy, T.P.K. (2014) α -Amylase Production and Applications: A Review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2, 166-175.

- 56.Şimşek T., Türkiye'nin değişik bölgelerinden termostabil α -amilaz üreten *Bacillus sp.* türlerinin izolasyonu, karakterizasyonu ve α -amilaz geninin klonlanması. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, 8, 2006.
- 57.Tateno T, Fukuda H. & Kondo A (2007) Production of L-Lysine from starch by *Corynebacterium glutamicum* displaying α -amylase on its cell surface. *Applied Microbiology Biotechnology*, 74:1213–1220
- 58.Wiseman, A. (1987). The Application of Enzyme in Industry. Handbook of Enzyme Biotechnology, 3: 275-373
- 59.Wolfgang, A. (2007). Enzyme in industry: Productions and applications. Thirdh Completely Revised Edition. Wiley –VCH Pres., pp.489

12. Bölüm

Kaynak Sularında FMS-SPE (Otomatik Katı Faz Ekstraksiyon) Sistemi Kullanılarak Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların (PAH) Kromatografik Tayini

Serpil Kılıç¹

Murat Kılıç²

¹ Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Isparta Türkiye

² Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Isparta Türkiye

GİRİŞ

Son yıllarda endüstrileşmenin hızla büyümesi ile çeşitli kimyasal maddeler çevreye atılmaktadır. Bu kimyasal maddelerin yüksek miktarları çevresel sorunları da beraberinde getirmektedir. Bu maddelerin içerisinde pestisitler, ağır metaller, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) bulunmaktadır. Bu kirleticilerin insan sağlığını tehdit eden çeşitli kanserlere, sindirim sistemi hastalıklarına yol açan maddeler olduğu bildirilmektedir (Lusher vd., 2017).

Bunlardan biri olan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), karbonlu malzemelerin yüksek sıcaklıkta yanma işleminde oluşan bir grup çevresel kirleticilerdir (Gutierrez-Valencia vd., 2017; Molle vd., 2017; Pogorzelec ve Piekarska, 2018). İki veya daha fazla aromatik (benzen) halkaya sahip bir organik bileşik sınıfındandır. Suda çözünürlüğü çok düşük olan lipofilik bileşiklerdir (Cavaliere vd., 2018; Ncube vd., 2018). Genellikle PAH'lar hava, su ve çevre gibi ortamlarda, kömür, katran gibi maddelerde bulunur (Kabzinski vd., 2002).

PAH'ların çevredeki riski, kalıcı, toksik, mutajenik ve kanserojen özelliklerinden dolayı ele alınması oldukça önemlidir. Bazı PAH'lar öncelikli kirleticiler olarak sınıflandırılmıştır. PAH'ların kanser ile ilişkisi ilk olarak 1775'de Londra'da St. Bartholomew's Hospital'da cerrah, baca temizleme işçilerinin derilerindeki isten kaynaklı testis kanserine yakalandıklarını gözlemlemesi sonucu ortaya çıkmıştır (Alver vd., 2012).

PAH'lar yağışla gelen yüksek konsantrasyonlarda denizlere ve karasal alanlara ulaşarak çevre sorunlarına sebep olmaktadır. Bundan dolayı PAH'ların izlenmesi çevreye etkisi hakkında bilgi sahibi olmak son derece önemlidir (Yan vd., 2012).

Yaygın olarak tayin edilen PAH'lar, Benzo(a)piren, Benzo(b)floranten, Benzo(k)floranten, Benzo(g,h,i)perilen, Indeno (1,2,3-cd)piren, Floranten'dir. Bunlar canlı ekosistemine zarar vermektedir (Mastral vd., 2003).

PAH'ları belirlemek için kullanılan en yaygın teknikler; kütle dedektörlü gaz kromatografi (GC/MS) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)'dir (Lombardi ve Bortolato, 2018; Benedetti vd., 2019; Jillani vd., 2019; Qing vd., 2019; Shang vd., 2019; Yang vd., 2019; Yuan vd., 2019).

Yüksek konsantrasyonda PAH'ların, farklı matrislerde organik girişim yapan türlerin düşük konsantrasyonunun belirlenmesi oldukça zordur (Amigo vd., 2010). Son yıllarda, sıvı matrislerde PAH miktar tayini farklı kemometrik tekniklerle yapılmıştır. Uyarma-emisyon matrisi (EEM) (Driskill vd., 2018; Gu vd., 2018) floresan spektroskopisi ve paralel faktör analizi (PARAFAC) (Cafias vd., 2014; Liu vd., 2018; Ferrotto vd., 2014) ve kısmi en küçük kareler (PLS) tabanlı teknikler (Brssan vd., 2017; Goicoechea vd., 2012) son çalışmalarda en sık kullanılan yöntemlerdir.

Yapılan araştırmalara göre, PAH'ların belirlenmesi için kullanılan ekstraksiyon yöntemlerinde çalışma süresinin uzun ve daha fazla solvent tüketime neden olduğu görülmektedir. Bu yöntemlerde kullanılan solventlerin çoğu Amerika Birleşik Devletleri evre Koruma Ajansı (US EPA) tarafından özellikle sular için öncelikli kirleticiler olarak kategorize edilmiştir. Bu yüzden literatürdeki tespit edilen bazı boşlukları doldurmak amaçlanmıştır. Bunlar; a) kaynak sularında PAH'ların tayini için ekstraksiyon yönteminin (Otomatik Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE)-FMS) kullanılması b) metot validasyonu d) kullanılan yöntem için nicel yeşil kimya değerlendirmesi yapmaktır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Kullanılan Kimyasallar ve Standartlar

Benzo(a)piren, Benzo(b)floranten, Benzo(k)floranten, Benzo(g,h,i)perilen, Indeno (1,2,3-cd)piren, Floranten içeren PAH mix sertifikalı standardı (Dr Ehrenstorfer, LGC, Almanya) kullanıldı. HPLC dereceli saflıktaki metanol, asetonitril ve diklorometan Sigma-Merck'den sağlandı. C18 FMS Inc. PAH Kartuş ve Sodyum sülfat SS05G-109 Kartuş kullanıldı. 14 adet kaynak suları en çok tüketilen farklı bölgelere ait markalar tercih edilmiştir.

2.2. Turbo Sistem SPE (Otomatik Katı Faz Ekstraksiyonu) Cihazı ile Numune Hazırlama

Kaynak sularında PAH ekstraksiyonu için FMS-SPE cihazı kullanılmıştır (şekil 2.1.). Kullanılan ekstraksiyon cihazı önce 10 mL metanol ile tüm hatları yıkandı, C18 PAH kartuşu 10 mL metanol kullanılarak şartlandırıldı. Sistemde kalan metanol uzaklaştırmak için azot gazı yardımıyla purge edilerek azot gaz valfleri kapatıldı. Orijinal ambalajlı 500 mL kaynak suyu rneği metanol ile şartlandırılan C18 kartuştan vakum altında yaklaşık 20-30 dakika süre ile geçirildi. rnek geçişinden sonra kartuşlarda ve sistemde kalan numune azot gazı ile purge edildi. C18 kartuşları hariç tutularak ön hazırlık cihazı sırasıyla 10 mL diklorometan ve 10 mL metanol ile yıkandı daha sonra C18 PAH kartuşlarından 20 mL diklorometan 2.5 mL dk⁻¹'da geçirildi ve sonrasında azot gazı ile sistem ve kartuşlar purge edildi. FMS cihazına bağlı olan SuperVap rnekleyici sistemi üzerinde takılı olan sodyum sülfat kartuşlarından geçen numuneler cam numune kaplarına toplandı. Azot altında 40°C sıcaklıkta yaklaşık 50 dk sürede tam kuruluğa kadar uçuruldu (US EPA 550.1, 1990). 1 mL asetonitrilde çözülerek viyallere alınan numuneler, HPLC-FLD cihazında analiz edilmek üzere -8 °C saklandı.



Şekil 2.1. Numune ekstraksiyonu için kullanılan FMS-SPE cihazı

2.3. Metot Validasyon Çalışmaları

Metot validasyonu, kullanılacak analiz metodunun doğru olarak uygulanabilirliğini ortaya koymak amacıyla yapılmaktadır. Uygulanan yöntemin kalibrasyon grafikleri, tespit ve tayin sınırları, tekrarlanabilirlikleri ve geri kazanım çalışmaları yapıldı. Lineer ölçüm aralığını belirlemek için 2, 5, 10, 15, 20, 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ 'lik 6 farklı konsantrasyonda kalibrasyon grafikleri oluşturuldu. 3 farklı marka kaynak suyu numunelerinden 5'er L alınarak, karıştırıldı ve böylece 15 L matriks elde edildi. Elde edilen matrikten numune ön hazırlık çalışması ile paralellik sağlanabilmesi için 500 mL matriks üzerine 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ PAH mix standartından sırasıyla 0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$, 0,010 $\mu\text{g L}^{-1}$ ve 0,020 $\mu\text{g L}^{-1}$ olacak şekilde spike yöntemi ile her bir konsantrasyon için 7 paralel geri kazanım örnekleri hazırlandı. Elde edilen verilerden tespit sınırı olan LOD, standart sapmanın 3 katı, tayin sınırı LOQ ise standart sapmanın 10 katı olarak hesaplandı. Geri kazanım çalışmasından elde edilen sonuçların bağlı standart sapma değeri olan %RSD değeri hesaplandı (Taverniers ve ark. 2004).

2.4. Kromatografik Koşullar

HPLC-FLD cihazında C18 (250*2.1 mm) 5 μm Vydac C18 kolonu kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 25 $^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlandı. Kolon akış 0.2 mL dk^{-1} , enjeksiyon hacmi 20 μL , mobil faz olarak asetonitril ve su kullanıldı. Cihaz koşulları Çizelge 2.1.'de verildi.

Çizelge 2.1. Cihaz koşulları

Zaman (dk)	A(Asetonitril (%))	B(Su(%))
0	80	20
25	100	0
30	80	20
35	80	20
Dedektör:FLD		
Zaman (dk)	Excitation(nm)	Emission(nm)
0	285	425
31	298	501

3. BULGULAR

3.1.Metot Validasyon Sonuçları

Numune çalışmalarından önce yöntemin doğruluğu için tespit ve tayin sınırı, tekrarlanabilirlik ve geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Kalibrasyon denkleminin R² değerini 0,9799-0,9998 aralığında bulunmuştur. LOD, LOQ, geri kazanım ve %RSD sonuçları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1.Metot validasyon sonuçları

Poli aromatik hidrokarbonlar	Gerçek değer	Ortalama bulunan değer	% Geri kazanım	LOD	LOQ	% RSD
Benzo(a) piren	0,005	0,0046	92,00	0,0004	0,0014	3,07
Benzo(a) piren	0,010	0,0086	85,85	0,0004	0,0013	1,56
Benzo(a) piren	0,020	0,0183	91,28	0,001	0,0033	1,81
Benzo(b) floranten	0,005	0,0046	91,71	0,0004	0,0013	2,93
Benzo(b) floranten	0,010	0,0085	85,14	0,0007	0,0024	2,83
Benzo(b) floranten	0,020	0,0176	88,14	0,0019	0,0062	3,50
Benzo(k) floranten	0,005	0,0045	89,71	0,0004	0,0013	2,99
Benzo(k) floranten	0,010	0,0085	84,71	0,0003	0,0011	1,31
Benzo(k) floranten	0,020	0,018	89,85	0,0009	0,0031	1,75
Benzo(g,h,i) perilen	0,005	0,0047	93,71	0,0004	0,0013	2,87
Benzo(g,h,i) perilen	0,010	0,0087	87,42	0,0012	0,004	4,61
Benzo(g,h,i) perilen	0,020	0,0191	95,35	0,0007	0,0024	1,27
Floranten	0,005	0,0047	94,28	0,0003	0,0009	1,90
Floranten	0,010	0,0091	90,85	0,0008	0,0025	2,80
Floranten	0,020	0,0193	96,64	0,0004	0,0014	0,71

3.2. Numune Sonuçları

Numune ön hazırlık için Otomatik Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE)-FMS tekniği, solvent kullanımı, ekstraksiyon süresi, uygun maliyetli, kolay ve gerekli numune miktarı açısından geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine göre daha çevre dostu olduğu için ve örneklerde düşük konsantrasyonlarda bulunma ihtimaline göre daha başarılı sonuçlara ulaşılabildiği için tercih edilmiştir. 14 farklı marka ve bölgelere ait olan numunelerde benzo(a)piren, benzo(b)floranten, benzo(k)floranten, benzo(g,h,i)perilen ve floranten tespit sınırının altında bulunmuştur (<LOD).

4.TARTIŞMA SONUÇ

Hızlı ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi-floresan dedektörü (HPLC-FLD) tekniği ile 14 adet farklı marka kaynak suyu numunelerinde polisiklik aromatik hidrokarbonun (PAH) tespiti için ekstraksiyon yöntemi olarak Otomatik Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE)-FMS yöntemi kullanıldı. SPE-FMS prosedürünün optimum koşulları literatüre göre geliştirildi (US EPA 550.1, 1990). En çok kullanılan 5 adet PAH'ların, numunelerdeki bölge bazlı ve tüm kromatografik veri analizleri yapıldı ve sonuçlar değerlendirildi.

Tüm PAH'lar için en düşük, orta ve en yüksek konsantrasyondaki % 84,71 ile % 96,64 arasında değişen geri kazanımlar ve % 4,61'den az bağlı standart sapmalar (RSD'ler), ile kullanılan yöntemin uygunluğu doğrulandı. Bu sonuçlar, HPLC verilerinde ikinci dereceden kalibrasyon algoritmalarının kullanılmasının, numunelerde PAH'ların hızlı, uygun maliyetli ve kolay tespiti için güçlü bir yöntem olduğunu doğrulandı. Uygulanan metoda göre numune sonuçları <LOD olarak tespit edildi. Bu metodun yapılacak çalışmalara öncü olarak literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

1. Alver, E., Demirci, A., Özçimder, M., 2012. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar ve Sağlığa Etkileri. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 3 (1): 45-52.
2. Amigo, J.M., Skov, T., Bro, R., 2010. ChromATHography: solving chromatographic issues with mathematical models and intuitive graphics. *Chem. Rev.* 110: 4582-4605.
3. Benedetti, B., Di Carro, M., Magi, E. 2019. Multivariate optimization of an extraction procedure based on magnetic molecular imprinted polymer for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sea water, *Microchem. J.* 145: 1199-1206.
4. Bressan, L.P., do Nascimento, P.C., Schmidt, M.E.P., Faccin, H., de Machado, L.C., Bohrer, D., 2017. Salting-out assisted liquid-liquid extraction and partial least squares regression to assay low molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons leached from soils and sediments, *Spectrochim. Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 173 :749-756.
5. Canas, A., Richter, P., Escandar, G.M., 2014. Chemometrics-assisted excitation–emission fluorescence spectroscopy on nylon-attached rotating disks. Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of interferences. *Anal. Chim. Acta* 852: 105-111.
6. Cavaliere, C., Montone, C.M., Capriotti, A.L., Barbera, G.L., Piovesana, S., Rotatori, M., Valentino, F., Lagana, A., 2018. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from polyhydroxyalkanoates before gas chromatography/mass spectrometry analysis. *Talanta* 188: 671-675.
7. Driskill, A.K., Alvey, J., Dotson, A.D., Tomco, P.L., 2018. Monitoring polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) attenuation in Arctic waters using fluorescence spectroscopy. *Cold Reg. Sci. Technol.* 145: 76-85.
8. US EPA 550.1 Draft Method, 1990. Determination of polyaromatic Hydrocarbons in drinking water by liquid-Solid extraction and HPLC with coupled ultraviolet and fluorescence detection.
9. Ferretto, N., Tedetti, M., Guigue, C., Mounier, S., Redon, R., Goutx, M., 2014. Identification and quantification of known polycyclic aromatic hydrocarbons and pesticides in complex mixtures using fluorescence excitation–emission matrices and parallel factor analysis. *Chemosphere.* 107: 344-353.
10. Goicoechea, H.C., Calimag-Williams, K., Campiglia, A.D., 2012. Multi-way partial leastsquares and residual bi-linearization for the direct determination of monohydroxypolycyclic aromatic hydrocarbons on

- octadecyl membranes via room-temperature fluorescence excitation emission matrices, *Anal. Chim. Acta* 717: 100-109.
11. Gu, H.W., Zhang, S.H., Wu, B.C., Chen, W., Wang, J.B., Liu, Y., 2018. A green chemometrics-assisted fluorimetric detection method for the direct and simultaneous determination of six polycyclic aromatic hydrocarbons in oil-field wastewaters. *Spectrochim. Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 200: 93-101.
 12. Gutierrez-Valencia, T.M. Garcia de Llasera, M.P., 2017. On-line MSPD-SPE-HPLC/FLD analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in bovine tissues, *Food Chem.* 223 :82-88.
 13. Jilani, S.M.S., Sajid, M., Alhooshani, K., 2019. Evaluation of carbon foam as an adsorbent in stir-bar supported micro-solid-phase extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polyaromatic hydrocarbons in wastewater samples, *Microchem. J.* 144:361-368.
 14. Liu, T., Zhang, L., Wang, S., Cui, Y., Wang, Y., Liu, L., Yang, Z., 2018. Four-dimensional data coupled to alternating weighted residue constraint quadrilinear decomposition model applied to environmental analysis: determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Spectrochim. Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 193: 507-517.
 15. Lombardi, J.M., Bortolato, S.A., 2018. Functional data analysis, a new approach to aligning three-way liquid chromatographic with fluorescence detection data. *Microchem. J.* 142: 219-228.
 16. Lusher, A., Hollman, P., Mendoza-Hill, J., 2017. Microplastics in fisheries and aquaculture: Status of knowledge on their occurrence and implications for aquatic organisms and food safety. Roma.
 17. Mastral, A. M., Callen, M. S. Lopez, J. M., Garcia, T., Navarro, M.V., 2003. Critical Review on Atmospheric PAH. Assesment of Reported Data in The Mediterranean Basin. *Fuel Processing Technology.* 80(2): 183- 193.
 18. Molle, D.R.D., Abballe, C., Gomes, F.M.L., Furlani, R.P.Z., Tfouni, S.A.V., 2017. Polycyclic aromatic hydrocarbons in canola, sunflower and corn oils and estimated daily intake. *Food Control* 81: 96-100.
 19. Ncube, S. Madikizela, L., Cukrowska, E., Chimuka, L., 2018. Recent advances in the adsorbents for isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from environmental sample solutions. *TrAC Trends in Anal. Chem* 99:101-116.
 20. Pogorzelec, M., Piekarska, K. 2018. Application of semipermeable membrane devices for long-term monitoring of polycyclic aromatic

- hydrocarbons at various stages of drinking water treatment. *Sci. Total Environ.* 631-632:1431-1439.
21. Shang, F., Wang, Y., Wang, J., Zhang, L., Cheng, P., Wang, S., 2019. Determination of three polycyclic aromatic hydrocarbons in tea using four-way fluorescence data coupled with third-order calibration method. *Microchem. J.* 146: 957-964.
 22. Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele, E., 2004. Trends in Quality in The Analytical Laboratory II. Analytical method validation and quality assurance. *Trac-Trend Anal Chem* 23(8): 535-552.
 23. Yan, L., Li, X., Chen, J., Wang, X., Du, J., Ma, L., 2012. Source and deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons to Shanghai, China. *J. Environ. Sci.* 24(1): 116-123.
 24. Yang, X., Yin, Y., Zong, Y., Wan, T., Liao, X., 2019. Magnetic nanocomposite as sorbent for magnetic solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Microchem. J.* 145: 26–34.
 25. Yuan, X., You, F., Yong, L., Yang, C., Zhu, L., Hu, B., Liu, T., 2019. Rapid determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in PM_{2.5} by microwave assisted extraction-high performance liquid chromatography, *Microchem. J.* 144: 391-396.
 26. Qing, X.D., Zhou, H.B., Zhang, X.H., Wu, H.L., Chen, C.Y., Xu, S.W., Li, S.S., 2019. Alternating trilinear decomposition of highly overlapped chromatograms for simultaneously targeted quantification of 15 PAHs in samples of pollution source. *Microchem. J.* 146: 742-752.

13. Bölüm

Fotovoltaik Hücrelerde Kullanılmak Üzere ZnO Nanorod Yapıların Üretimi

Sinan TEMEL¹

Enes Arslan²

¹ Doç. Dr., Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Fakültesi, Fizik Bölümü.

² Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Enerji Sistemleri Mühendisliği ABD

1. Giriş

Ülkemizde teknolojik gelişmelere bağlı olarak sürekli artmakta olan enerji talebi, fosil yakıtlar olarak adlandırılan doğalgaz, petrol ürünleri, kömür vb. yakıtlarla karşılanmaktadır [1]. Fakat halihazırda kullanılmakta olan bu fosil yakıtların; sağlık ve çevre sorunlarına neden olmaları, rezervlerinin sınırlı olmaları, ilerleyen yıllardaki fiyat belirsizliği ve ürün haline dönüştüklerinde termal açıdan verimsiz olmaları gibi dezavantajları bulunmaktadır [2]. Bu dezavantajlar doğrultusunda hidroelektrik, biokütle, rüzgâr ve güneş enerjisi olarak sınıflandırılan yenilenebilir ve çevre dostu enerji kaynaklarına olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Özellikle fotovoltaik (PV) olarak bilinen güneş enerjisi sistemleri yoğun talep görmektedir. PV sistemlerde verimlilik iyileştirmeleri, üretim maliyetlerinin düşürülmesi gibi alanlarda yapılan çalışmalar da artış göstermektedir [3].

Günümüzde teknolojinin getirmiş olduğu imkanların artması ve elektronik aygıtların küçük boyutlara indirgenmesiyle teknolojik cihazlara olan ilgiyi çok daha fazla arttırmış durumdadır. Bu aygıtların boyutlarındaki küçülme cihazın daha az yer kaplamasıyla beraber, cihazların daha küçük boyutta malzemeler kullanılarak hazırlanmasıyla çalışma hızlarının artırılmasını ve bu sayede malzemelerin kazanmış olduğu yeni özelliklerin kullanılmasıyla yüksek kaliteli fonksiyonel cihazlar üretilebilmesi sağlanmaktadır. Aynı zamanda üretilen bu cihazlar atomik düzeyde malzemeler kullanılarak hazırlanmasından dolayı nanoteknolojinin de gelişmesine yol açmaktadır.

İlerleyen teknoloji ile beraber modern cihazlar yardımıyla PV sistemlerde kullanılmak üzere ince filmler üretilmekte ve bunların kristal yapıları, elektriksel özellikleri, optiksel özellikleri gibi alanlarda yapılan çalışmalar artmaktadır [4]. Tüm bu gelişmeler sayesinde ince filmlerin yarı iletken ve piezoelektrik cihaz üretimi, yansıtıcı ve yansıtıcı olmayan kaplamalar, sert kaplamalar ve mikro mekanik cihaz üretimi, sensör teknolojisi gibi farklı alanlarda kullanım olanağı doğmuştur [5].

İnce film teknolojilerinin en büyük uygulama alanı ise yarı iletken sanayileridir. Birçok yerde kullanılan LED olarak bilinen ışık yayan diyotlar, IC olarak adlandırılan entegre devreleri, lazerler, transistörler, ekranlar, gece görüş dürbünleri, güneş pilleri, optik ve manyetik kayıt cihazları bu teknoloji kullanılarak üretilmektedir. Özellikle ince film teknolojisinin en yaygın olan kullanım alanları kimyasal ve fiziksel aşınmalara karşı dirençli dekoratif ve sert kaplamalar, optik ve manyetik kayıt cihazları ve güneş pilleridir [6]. Geçmişte teorik olarak incelenen ince film teknolojileri, son yıllarda gelişme göstererek geniş kullanım alanlarına sahip olan malzemelerin daha kolay elde edilmesine imkân sağlamakta ve günlük yaşamda daha fazla kullanılmaktadır [7].

İnce film teknolojilerinde nanoteknolojik aygıtların geliştirilmesi üzerine yapılan çalışmalarda en yaygın olarak kullanılan malzeme çinko oksit (ZnO) yarıiletkenidir. Geniş bant aralığına sahip olmasından dolayı, LED ve özellikle UV bölgelerde çalışabilen lazer diyot gibi aygıtların üretilmesinde kullanım olanağı sağlamaktadır [8-17]. Bu kullanım alanları sayesinde iletken ve saydam yapıda olan ince filmlerin hem endüstride kullanımını hem de yapılacak olan yeni araştırmalara zemin hazırlamaktadır. Literatüre ve endüstriye yeni bir malzeme eklemek adına yapılan çalışmalarda çinko oksit (ZnO) ve çinko oksit (ZnO) esaslı filmlerin farklı kaplamalar ile birçok alanda kullanılması artış göstermiştir.

Boyutları 1 ile 100 nm arasında değişiklik gösteren, kuantum etkileriyle beraber malzemelerin hacimsel halleriyle kıyaslandığında yeni ve önemli kimyasal ve fiziksel özellikler gösteren yapılar nanopartikül (nanorod) olarak adlandırılmaktadır. Nano boyutlara sahip partiküller göstermiş oldukları üstün ve benzersiz özelliklerinden dolayı malzeme bilimine ve aynı zamanda disiplinler arası birçok çalışmaya ortam hazırlamaktadır.

Nanorodların kimyasal tepkime sırasında harcanıp ürüne dönüşmeleri; şekillerine, yüzey atomik dizilimlerine, yüzey bileşimlerine ve boyutlarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Üretilen nanorodların yüzey/hacim oranlarının yüksek olması, yapılarına üstün manyetik, optik, termal, mekanik ve elektriksel özellikler kazandırmaktadır [18]. Örneğin; kuantum etkisi sayesinde malzemede mikro seviyelerde gözlemlenemeyen kataliz özelliği nano seviyelerde gözlemlenebilmektedir. Kuantum etkisiyle malzeme parçacıklarının boyutları azalmakta elektronik özellikleri değişmektedir. Bazı metaller, yarıiletkenler ve yalıtkanlar bu özelliklerinde meydana gelene optik, manyetik ve kimyasal değişimlerle önem kazanmaktadır [19]. Kısacası nanoteknoloji sayesinde, malzemelerin farklı ve üstün özellikleri kullanılarak yeni malzemeler, cihazlar ve sistemler geliştirilebilmektedir.

Nanorodların üretilmesinde iki temel hedef yer almaktadır. Birincisi; özel üretim yöntemlerinin kullanılmasıyla yeni malzemeler geliştirilerek farklı özelliklerinden faydalanmak, ikincisi ise, büyük boyutlara sahip malzemelerinin içyapılarında bulunan özelliklerini atomik düzeyde kontrollü bir şekilde değiştirilerek üstün özellikler kazandırabilmektir [20].

Nanoteknolojinin hızla gelişmesi ile beraber yeni ve kullanım kolaylığı sağlayan ürünlere olan ilgi gün geçtikçe artış göstermektedir. Burada amaç günümüz teknolojisini kullanarak daha dayanıklı, hafif, hızlı, küçük ve yüksek kapasiteye sahip ürünler elde ederek ilgili alanlarda kullanmaktır. Bu sayede insan hayatı kolaylaşmakta ve ülkelerin gelişmişlikleri de artmaktadır [21]. Nanoteknolojik yöntemlerle üretilen nanorodların başlıca kullanım alanları şu şekildedir:

- Elektronik
- Opto elektronik (ışıkla etkileşim gösteren elektronik cihazlar)
- Nano elektromekanik cihazlar
- İleri kompozit malzemeler
- Nano ölçekli cihazlar
- Biyo-moleküler nano algılayıcılar [22].

Yapılan bu çalışmada PV hücrelerde kullanılmak üzere çinko oksit (ZnO) nanorodların üretilmiş ve üretilen nanorodların bazı fiziksel özellikleri incelenmiştir.

2. Deneysel Yöntem

ZnO nanorod üretmek için önce sol-gel manyetik döndürerek kaplama tekniği ile ZnO çekirdek tabakalar üretilmiş daha sonra kimyasal banyo depolama tekniği ile çekirdek katmanlar üzerine ZnO kaplama yapılmıştır.

2.1. Sol-gel Yöntemi

2.1.1. Manyetik Döndürerek Kaplama Tekniği

Manyetik döndürerek kaplama tekniği; alttaş malzemenin üzerine ince film biriktirmek için kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte kullanılan ekipmanlar; Yüksek hızlara sahip manyetik karıştırıcı, özel yapışkanlı PTFE yuvarlak teflon manyetik döndürücü ve manyetik döndürücü üzerine konulan alttaşa damlatılan çözeltinin etrafa yayılmasını önleyen bir kapak kullanılmıştır. Manyetik karıştırıcı olarak kullanılan cihaz IKA marka, Big Squid White modelidir. Bu cihaz yüksek hızlarda dönebilen, ısıtmasız bir manyetik karıştırıcıdır.



Şekil 1. Sol-gel manyetik döndürerek kaplama cihazının gösterimi.

Manyetik döndürerek kaplama tekniğinde, hızı ayarlanabilen manyetik döndürücü üzerindeki teflon manyetik döndürücü üzerine yerleştirilen alttaş

malzeme ve alttaş üzerine hazırlanan sol-gel çözeltisinin damlatılmasıyla işleme başlarız. Dönme hızından oluşan kuvvet ile alttaşın üzerine damlatılan çözelti alttaş üzerine yayılır ve fazla olan çözelti alttaşın üzerinden akar. Döndürme işlemi tamamlandıktan sonra alttaş üzerinde oluşan filmin kristalleşmesi için belirli sıcaklıklarda tavlama işlemi yapılır. Tavlama işleminden sonra alttaş üzerinde kristalleşmiş, yoğunlaşmış ve homojen ince film elde edilir.

Alttaş üzerinde oluşturulacak olan ince filmin yapısal özelliklerini; manyetik döndürme hızı, manyetik döndürme süresi, çözelti konsantrasyonu, damlatılan çözelti miktarı, tavlama sıcaklığı ve tavlama süresi etkilemektedir.

Manyetik döndürerek kaplama yöntemi; film oluşturacak olan alttaşın üzerine çözeltinin damlatılarak farklı hız ve sürelerde manyetik olarak döndürülerek çözeltinin taban üzerinde yayılması ile film oluşturmasıdır. Alttaş üzerine kaplanan filmin kalınlığı döndürme hızına bağlıdır.

Manyetik döndürerek kaplama işlemi beş aşamada oluşmaktadır. Bunlar;

- > Hazırlanan çözeltinin alttaş üzerine damlatılması
- > Alttaşın farklı sürelerde ve hızlarda döndürülmesi
- > Elde edilen ince filmin kurutulması
- > Çok katlı yapı hazırlamak için sürecin tekrarlanması
- > Oluşan çok katlı film tabakasında kristalleşme olması için farklı sıcaklıklarda tavlama işleminin yapılması.

2.1.2. Filmlerin Kaplanacağı Alttaşların Temizlenmesi

İnce film üretiminde kullanılacak olan alttaş malzeme olan ISOLAB marka 10 mm * 10 mm boyutlarında kesilmiş mikroskop lamı kullanılmıştır. Boyutlandırılmış olan alttaş malzemenin temizliği sırasıyla aşağıdaki prosedürler uygulanarak yapılmıştır.

- >5 dk Ultrasonik banyoda aseton ile karıştırma
- > 5 dk Ultrasonik banyoda metanol ile karıştırma
- >Ultra saf su ile durulama
- > Etüvde kurutma

Bu aşamalarda sonra alttaşların temizlenme işlemi gerçekleşmiş olur.

2.1.3. Sol-gel Çözeltisinin Hazırlanması

İnce film üretmek için kullanılacak olan çözeltinin 0,5 M hazırlanması için $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ (çinko asetat dihidrat), çözücü olarak 2-metoksietanol ve stabilazör olarak monoetanolamin (MEA) kullanılmıştır.

Sol-gel çözeltisi hazırlanırken çözeltinin hazırlanacağı beher 30 ml 2-metoksietanol konulmuştur. Üzerine 3,3005 gr çinko asetat dihidrat eklenir. Isıtımlı manyetik karıştırıcı 70 °C de 10 dk karıştırılır. Karışımdan sonra çözeltiye 0,3 ml

monoetanolamin (MEA) damla damla eklenir. Hazırlanan karışımın 70 °C de 150 dk boyunca karıştırıldı. Hazırlanan çözelti 2 gün boyunca bekletildi.

2.1.4. Dene Parametrelerinin Belirlenmesi

Üretilen ince filmlerde en iyi sonuca ulaşmak için alttaşa uygulanan damlatma çözeltisi, döndürme hızı, dönme süresi, kaplanan katman sayısı ve tavlama sıcaklıkları gibi parametreleri değiştirerek sonuçlar incelenmiştir.

ZnO film oluşturmak için yapılan denemeler sonucunda; damlatılan çözelti miktarı 15 µl, döndürme süresinin ise 30 sn olması kararlaştırılmıştır. İnce film kaplama katman sayısı olarak da 3,6 ve 9 kat olarak yapılmıştır. Yapılan ince filmler içerisinde en iyi yüzey üzerinde boşluksuz ve homojen bir şekilde dağıldığı kaplama katman sayısı 9 katlı olan kaplamada gözlemlenmiştir.

İnce film üretim parametreleri olarak;

- Çözelti miktarı: 15 µl
- Alttaş döndürme süresi: 30 sn
- Alttaş kaplama katman sayısı: 9 kat
- Alttaş döndürme hızı: 1000, 2000 ve 3000 rpm
- Tavlama sıcaklığı: 300, 400 ve 500 °C olarak kararlaştırılmıştır.

Tablo 1. ZnO serisi filmlerin manyetik döndürerek kaplama yöntemi parametreleri

Alttaş döndürme hızı (rpm)	Alttaş katman sayısı	Tavlama sıcaklığı (°C)	Seri adı	
1000	9	300	A1	A
		400	A2	
		500	A3	
2000	9	300	B1	B
		400	B2	
		500	B3	
3000	9	300	C1	C
		400	C2	
		500	C3	

2.1.5. ZnO Çekirdek Yapının Oluşturulması

Çözeltinin hazırlanması ve alttaş malzemenin temizlenmesinden sonra manyetik döndürerek kaplama işlemine başlanmıştır. İnce film üretmek için belirlenen parametreler doğrultusunda alttaşın yüksek hızlarda dönebilen manyetik platform

üzerine uygun bir şekilde yerleştirildi. Manyetik döndürücü üzerine kapak kapatıldı. Hazırlanan çözeltiden 15 µl çözelti mikro pipet yardımıyla alttaşın tam merkezine gelecek şekilde damlatıldı. Damlatma işleminden sonra manyetik olarak döndürme işlemi belirlenen parametre doğrultusunda başlatıldı. Dönme süresi olarak belirlenen 30 sn bittikten sonra manyetik döndürme cihazı durduruldu. Alttaş manyetik döndürme cihazından alınarak kurutma işlemi için Etüve 100 °C de 10 dk boyunca kurutma işlemi yapıldı. Alttaşın kurutulması yüzeyde tutulan çözeltiyi buharlaştırmak ve içerisinde bulunan organik bileşikleri yüzeyden uzaklaşmasını sağlamak için yapılır. Bu yapılmış olan işlemle alttaşın hazırlanmış olan çözelti ile bir katmanlı ince film oluşturulmuş olur. Bu işlemi tekrarlayarak 9 katlı ince filmler elde edildi. Üretilmiş olan filmler tavlama için belirlenmiş olan parametre sıcaklıklarında 2 saat süreyle tavlandı. Tavlama işleminden sonra filmler oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Filmlerin soğutulma işleminden sonra karakterizasyon yapılabilmesi için hazır hale gelmiş oldu.

2.2. Kimyasal Banyo Depolama Tekniği

Kimyasal banyo depolama yöntemi; ince film oluşumunda kullanılacak olan kimyasal maddelerin belirli oranlarda karışım hazırlanan çözeltinin, uygun sıcaklıklarda alttaş malzeme üzerinde film olarak birikmesidir. Kimyasal banyolamada kullanılacak olan ekipmanlar; termal manyetik karıştırıcı, su banyosu, hazırlanan çözelti banyosu, kaplama yapılacak olan alttaş malzeme, alttaşın sabitlenmesi için maşa, termometre ve turnusol kağıdından oluşmaktadır.

2.2.1. Kimyasal Banyo Çözeltisinin Hazırlanması

Manyetik döndürerek kaplama yöntemi ile üretilen çekirdek yapılar üzerine, kimyasal banyo depolama yöntemi ile ZnO nanorodların üretilmesi için 100 ml saf su ve içerisine 2,98 gr $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (çinko nitrat heksahidrat) eklendi. Hazırlanan çözelti tamamen ve hızlı çözünmesi için manyetik karıştırıcı ile 10 dakika boyunca karıştırıldı. Karışım sağlandıktan sonra çözeltinin pH değerinin 10 olması için turnusol kağıdı yardımı ile kontrollü bir şekilde damla damla sulu amonyak (NH_3OH) eklenerek kimyasal banyo çözeltisi hazırlanmış oldu.

2.2.2. Deney Parametrelerinin Belirlenmesi

Üretilen ince filmin kalınlığına ve kalitesine; çözeltinin konsantrasyonu, katalizörün yapısı, reaksiyon süresi, çözeltinin pH ve sıcaklığı, çözeltinin karıştırma hızı gibi parametreler belirlenmektedir. Film banyolama sürecinde çözeltinin pH'i, sıcaklığı ve karıştırma hızı sabit tutulması kararlaştırılmıştır.

Manyetik döndürerek kaplama sonrasında üretilen çekirdek yapıların içinde alttaş üzerinde en iyi kristalleşme gösteren; 3000 rpm döndürme hızında, 9 katmanlı olarak üretilen, 500 °C de tavlanan alttaşların üzerine kimyasal banyo depolama yöntemi ile kaplama yapıldı.

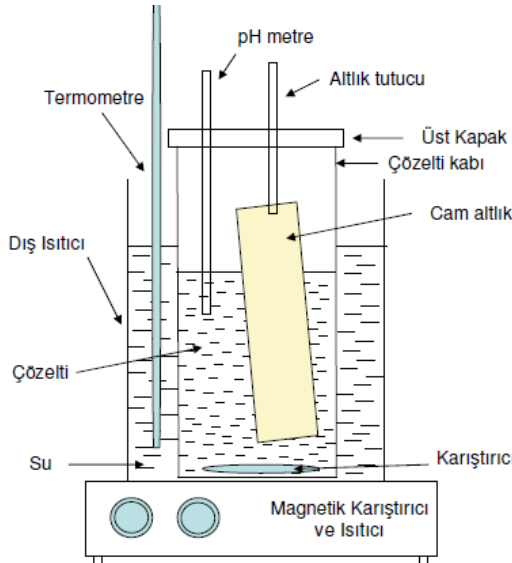
Kimyasal banyo depolama yönteminde çözeltinin; pH 10, sıcaklığının 85 °C ve karıştırma hızının ise 250 rpm olarak sabit tutulmasına karar verilmiştir. Kimyasal banyo reaksiyon süresi ise 15, 30 ve 45 dk olarak belirlenmiştir.

Tablo 2. ZnO nanorodların kimyasal banyo depolama yöntemi ile üretim parametreleri

Çözelti pH	Çözeltinin karıştırma hızı (rpm)	Çözelti sıcaklığı (°C)	Reaksiyon süresi (dk)	Seri adı	
10	250	85	15	Z1	Z
			30	Z2	
			45	Z3	

2.2.3. Kimyasal Banyo Depolama Yöntemi ile ZnO Nanorodların Üretilmesi

Kimyasal banyo depolama yöntemi ile ZnO nanorod ince film üretim düzeneği Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2. Kimyasal banyo yöntemi ile kaplama cihazının gösterimi.

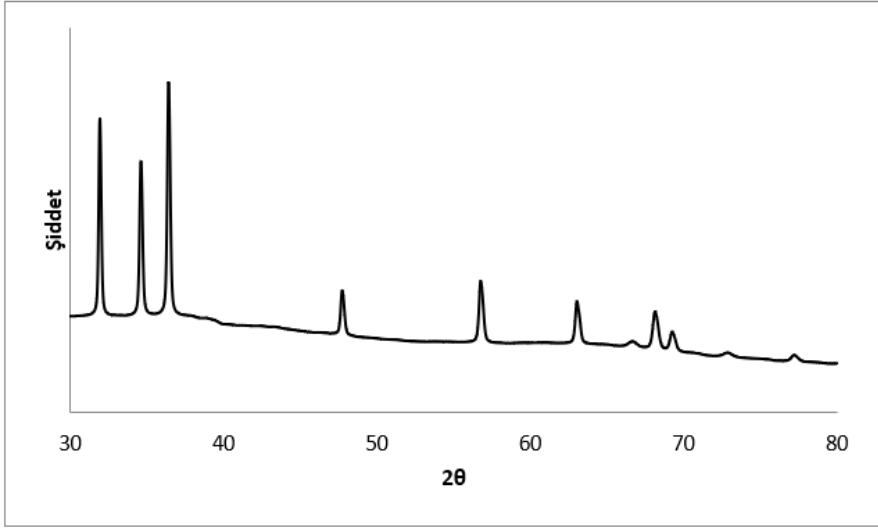
Kimyasal banyo yönteminde düzenekte de görüldüğü gibi ısıtıcılı ve sıcaklık kontrollü manyetik karıştırıcı üzerine saf su ile yapılmış olan bir su banyosu hazırlanır. Hazırlanmış olan su banyosu içerisine girebilecek şekilde bir beher konulur. Bu beher içerisine hazırlanmış olan çözelti doldurularak çözelti banyosu hazırlanmış olur. Çözelti banyosu içerisine bir adet manyetik balık konulur. Su banyosu içerisine ise bir adet termometre konularak sıcaklık takibi yapılır.

Çözelti banyosu içerisinde kimyasal banyo yaptırılacak olan alttaşlar belirlenen parametreler doğrultusunda seçilerek maşa yardımı ile tutturularak çözelti içerisine daldırılır. Manyetik karıştırıcı karıştırma hızı 250 rpm olacak şekilde çalıştırılır. Sıcak kontrolü ile çözelti sıcaklığı 85 °C olana kadar ısıtıcı sıcaklığı ayarlanır. Çözelti banyo sıcaklığı 85 °C de sabit tutulur. Çözelti banyo sıcaklığı 85 °C de sabitlendikten sonra süre tutulmaya başlanır. 15 dakika boyunca çözelti banyosu içerisinde duran bir alttaş çıkarılır. Banyo içerisinden çıkarılan alttaş saf su ile yıkanarak açık havada kurutulmaya bırakılır. Böylelikle ZnO nanorod ince film üretimi başarıyla üretilmiş olur. Banyo işlemi bu şekilde 15, 30 ve 45 dakika olarak belirlenen parametreler çerçevesinde yapıldı.

Belirlenen parametrelerde yapılan kimyasal banyolama işleminden sonra üretilen ZnO nanorod ince filmler karakterizasyon işlemi yapılmaya hazır hale gelmiştir.

3. Deneysel Sonuçlar

İnce filmlerin X-Işını Kırınımı (XRD) cihazında incelenmesi için cihazın çalışma şartları olarak; 45 kV voltaj ve 40 mA akım uygulanmıştır. Dalgaboyu 1,5406 Å olan $CuK\alpha$ ışını kullanılarak, tarama hızı 2 derece/dakika olarak seçilmiş ve $30^{\circ} \leq 2\theta \leq 60^{\circ}$ sınır değerleri belirlenerek incelemeler yapılmıştır. X-Işını Kırınımı (XRD) cihazı ile bulunan yapılar; hegzagonal yapıda olan ZnO ince film için ICDD (International Centre for Diffraction Data) 98-003-1052 ile karşılaştırıldı. Sol-gel manyetik döndürerek kaplama yöntemi ile üretilen ZnO çekirdek yapılar (A, B ve C serisi) XRD spektrumları incelendiğinde en iyi kristalleşmeyi gösteren serinin C3 serisi olduğu görülmüştür. C3 serisi ZnO çekirdek yapısına ait XRD analiz spektrumu Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3. C3 serisi ZnO çekirdek yapısının XRD analiz spektrumu.

XRD spektrumu incelendiğinde; ZnO çekirdek tabakanın polikristal yapıda olduğu ve hekzagonal ZnO yapısına ait sırasıyla (010), (002), (011), (012), (110), (013), (020), (112), (021), (004) ve (022) piklerinin varlığı görülmektedir.

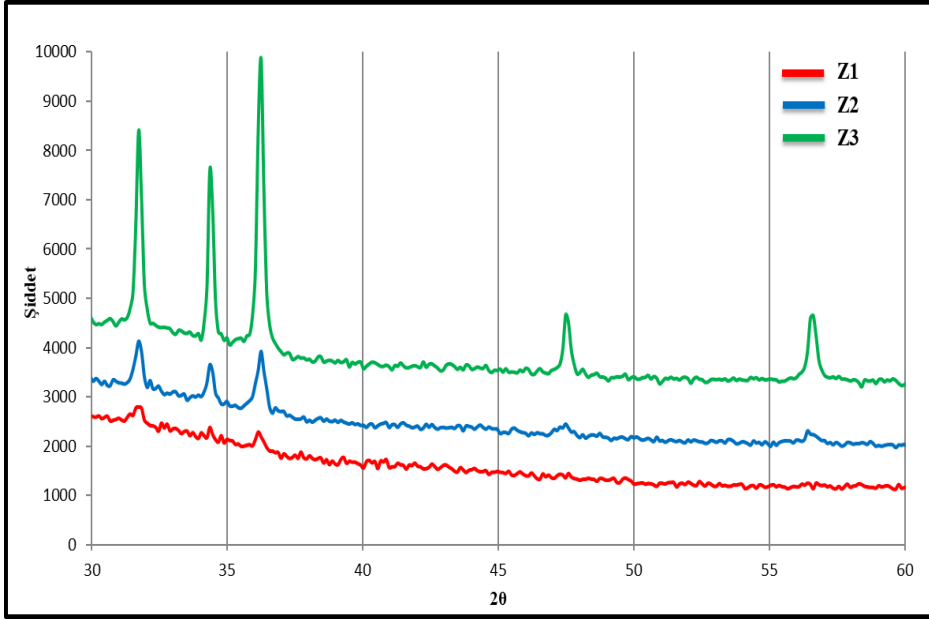
Üretilen C3 serisinin XRD spektrumundan elde edilen yarı pik genişlikleriyle (FWHM) VE Scherrer Formülü ile hesaplanan tane boyutu değerleri Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Manyetik döndürerek kaplama yöntemi ile elde edilen filmlerin C3 serisi için pik değerleri

Seri	FWHM	D (nm)
C3	0,18	107

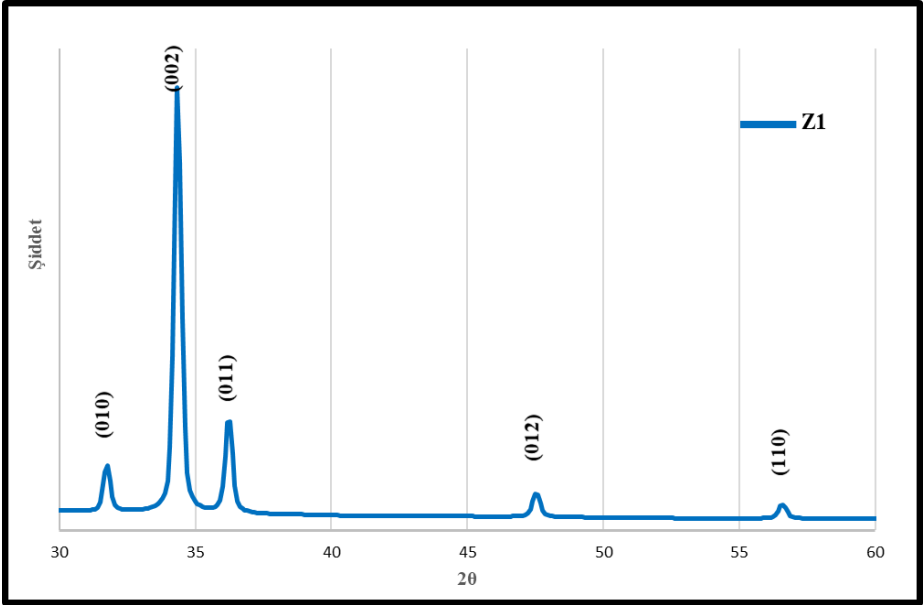
Kimyasal Banyo Depolama Yöntemi ile üretilen ince filmlerin X-Işını Kırınımı (XRD) cihazında incelenmesi için cihazın çalışma şartları olarak; 45 kV voltaj ve 40 mA akım uygulanmıştır. Dalgaboyu 1,5406 Å olan CuKα ışını kullanılarak, tarama hızı 2 derece/dakika olarak seçilmiş ve $30^{\circ} \leq 2\theta \leq 60^{\circ}$ sınır değerleri belirlenerek incelemeler yapılmıştır.

ZnO ince filmler kimyasal banyo depolama tekniği ile sol-gel manyetik döndürerek kaplama yöntemi ile üretilen ZnO çekirdek yapılar üzerine değil de kaplamasız cam altlıklar üzerine kaplandığında üretilen ZnO yapılarının XRD spektrumları Şekil 4’de karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

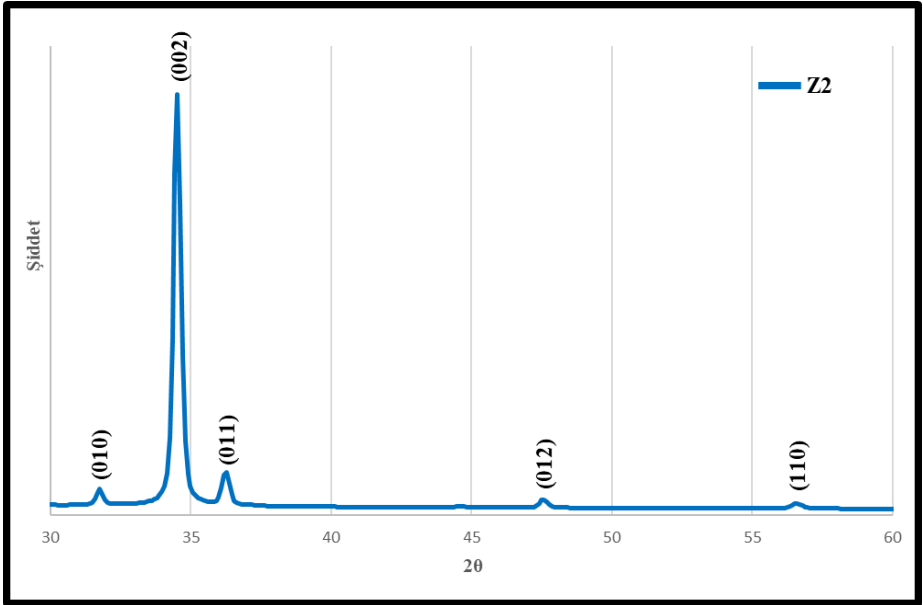


Şekil 4. Cam altlık üzerine üretilen Z serisi ince filmlerin XRD analiz spektrumu.

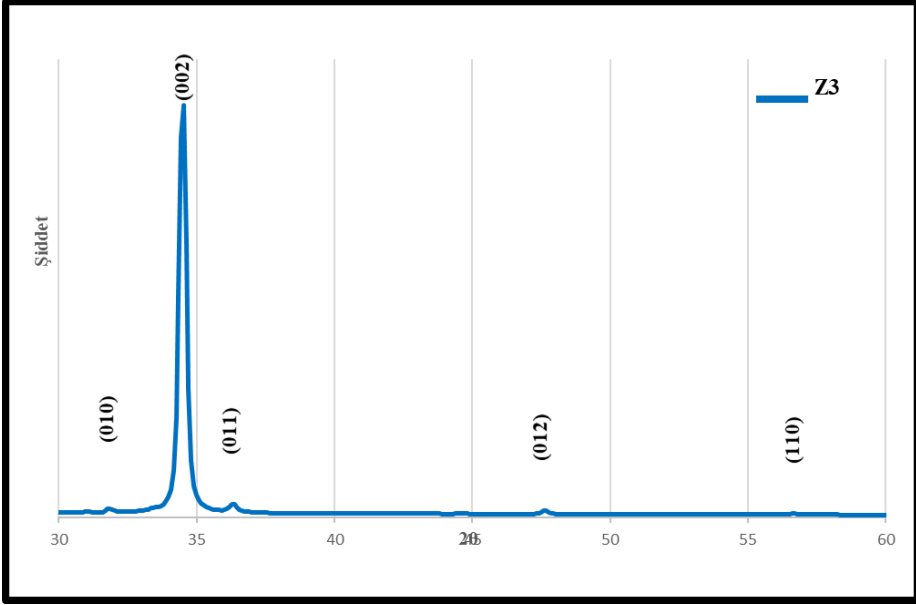
Karşılaştırmalı verilen XRD spektrumundan görüldüğü gibi çekirdek katman olmadan kaplamasız cam altlık üzerine kimyasal banyo depolama yöntemi ile ZnO ince filmler üretildiğinde, Z1, Z2 ve Z3 serilerinde hekzagonal ZnO yapısına ait pikler gözlenmiştir fakat ZnO nanorod oluşumu gerçekleşmemektedir. ZnO yapısının nanorod olarak oluşması için hibrit üretim yöntemi kullanılması gerekmektedir. Öncelikle sol-gel manyetik döndürerek kaplama yöntemi ile ZnO çekirdek yapı oluşturulmalı, bu ZnO çekirdek yapının üzerine kimyasal banyo depolama yöntemi ile ZnO kaplanarak nanorod yapı elde edilmelidir. ZnO çekirdek yapılar üzerine kimyasal banyo depolama yöntemi ile ZnO kaplanarak elde edilen Z serisi ZnO nanorodlara ait XRD analiz spektrumları Şekil 5, Şekil 6 ve Şekil 7’de ayrı ayrı gösterilmiştir.



Şekil 5. Z1 serisi nanorodların XRD analiz spektrumu.



Şekil 6. Z2 serisi nanorodların XRD analiz spektrumu.



Şekil 7. Z3 serisi nanorodların XRD analiz spektrumu.

ZnO nanorodların XRD spektrumları incelendiğinde, Z1 ve Z2 serilerinde baskın ve tercihli yönelim olmaya başlayan hegzagonal ZnO yapısına ait (002) piki Z3 serisinde tek pik olarak gözlenmektedir. Z3 serisi neredeyse tek kristal yapıda oluşmuştur. Bu (002) yönelimi, oluşturulan ZnO nanorodların yönelimini göstermektedir.

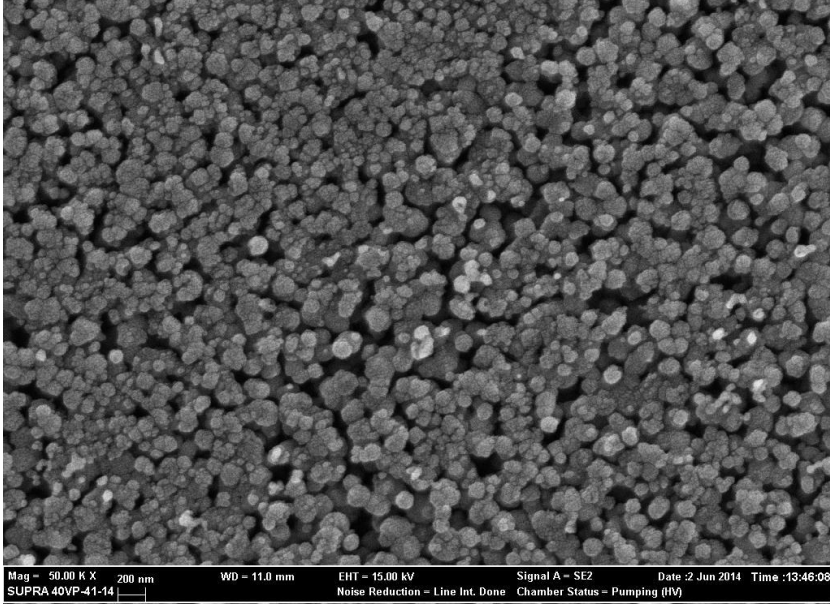
Üretilen ZnO nanorodlardan Z serisinin XRD spektrumundan elde edilen yarı pik genişlikleriyle (FWHM) ve Scherrer Formülü ile hesaplanan tane boyutu değerleri Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. Manyetik döndürerek kaplama yöntemi ile elde edilen filmlerin C serisi için pik değerleri

Seri	FWHM	D (nm)
Z1	0,27	35
Z2	0,26	33
Z3	0,23	29

Tablo 4’deki veriler ve XRD spektrumları göz önünde bulundurulduğunda, üretilen ZnO nanorodlarda Z serisindeki en iyi kristalleşmeyi Z3 serisi göstermiştir.

Üretilen ince filmlerde en iyi XRD sonuçlarına göre kristalleşme gösteren C3 serisinin ZnO ince filmlerin SEM görüntüleri 50 kx büyütülerek Şekil 10'da verilmektedir.

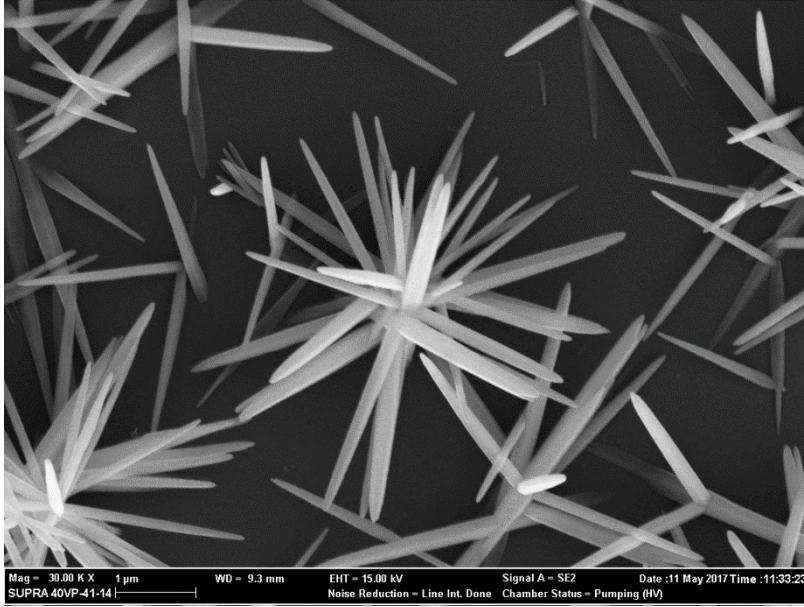


Şekil 10. C3 serisi ZnO ince filmlerin 50kx büyütme SEM görüntüsü.

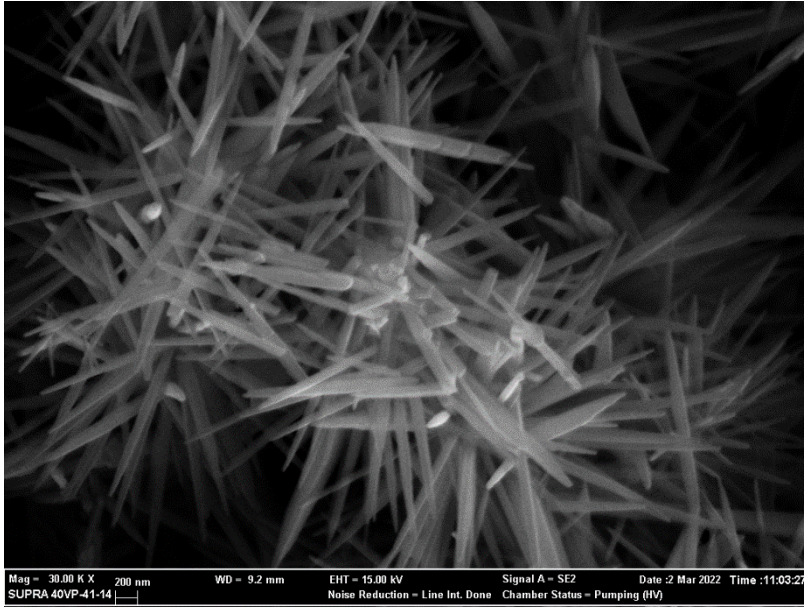
C3 serisi ZnO ince filmin SEM görüntüleri incelendiğinde, alttaş üzerinde oluşmuş olan filmin tüm yüzeyine homojen bir şekilde dağılmış nanoboyutta taneciklerden meydana geldiği görülür. Taneciklerin yığılma şekline ve yüzeyde boşluklar olmadığı ve böylelikle taneciklerin birbirine daha iyi tutunduğu gözlemlenmiştir.

SEM görüntülerinden ortalama tane boyutunun değeri ölçüldüğünde yaklaşık 120 nm olarak bulunmuştur. Tane boyutu XRD spektrumunda hesaplanan tane boyutu değeri ile SEM görüntülerinde belirlenen tane boyutu değeri birbirine çok yakındır ve birbirini desteklemektedir.

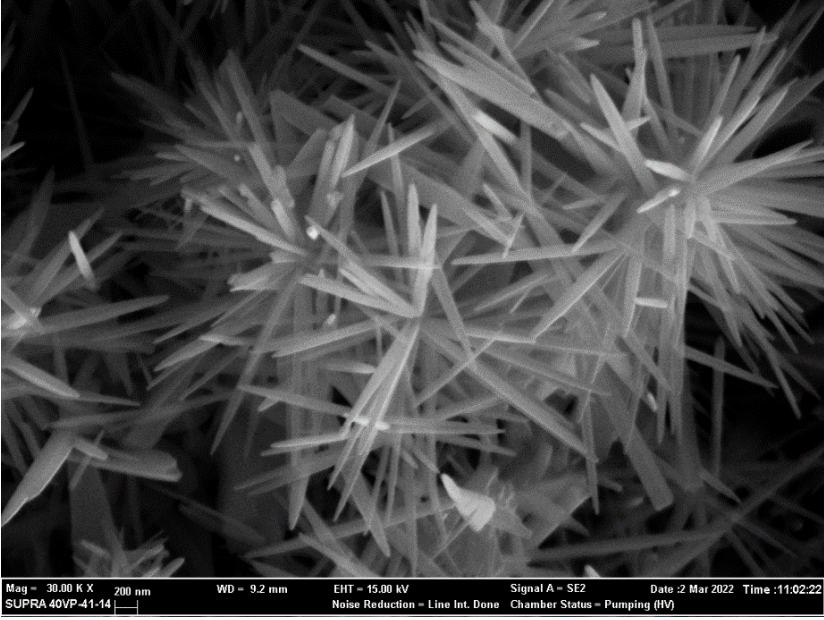
ZnO ince filmler kimyasal banyo depolama tekniği ile sol-gel manyetik döndürerek kaplama yöntemi ile üretilen ZnO çekirdek yapılar üzerine değil de kaplamasız cam altlıklar üzerine kaplandığında üretilen ZnO yapılarının SEM görüntüleri Şekil 11, Şekil 12 ve Şekil 13'de sırasıyla verilmiştir.



Şekil 11. Z1 serisi ZnO ince filmlerin 30kx büyütmeli SEM görüntüsü.



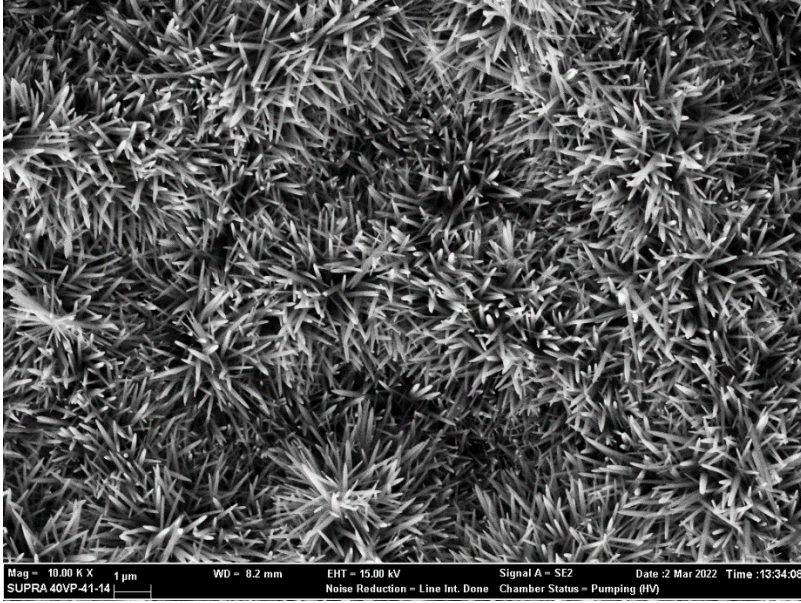
Şekil 12. Z2 serisi ZnO ince filmlerin 30kx büyütmeli SEM görüntüsü.



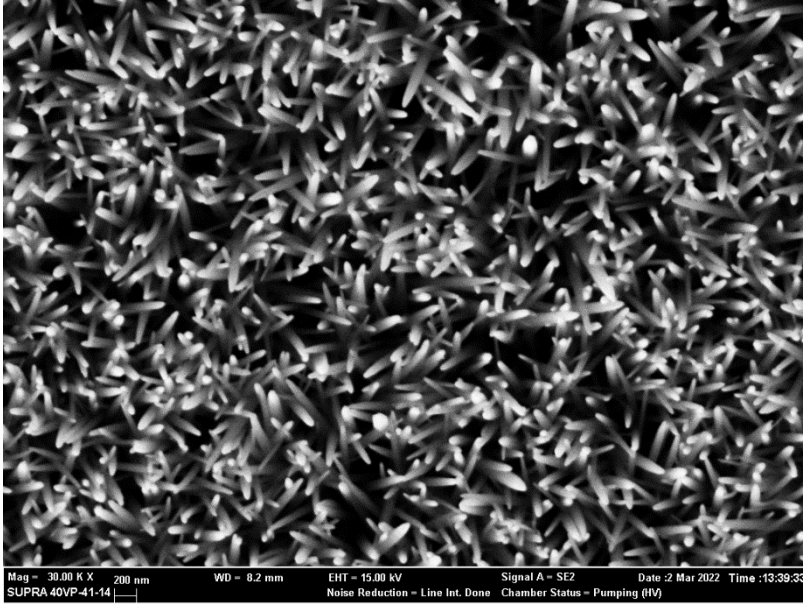
Şekil 13. Z3 serisi ZnO ince filmlerin 30kx büyütme SEM görüntüsü.

Sırasıyla verilen Z1, Z2 ve Z3 serilerine ait 30 kx büyütme SEM görüntülerinden görüldüğü gibi çekirdek katman olmadan kaplamasız cam altlık üzerine kimyasal banyo depolama yöntemi ile ZnO ince filmler üretildiğinde, Z1, Z2 ve Z3 serilerinde hekzagonal ZnO yapısına ait nanoçiçek yapısı gözlenmiştir fakat ZnO nanorod oluşumu gerçekleşmemektedir.

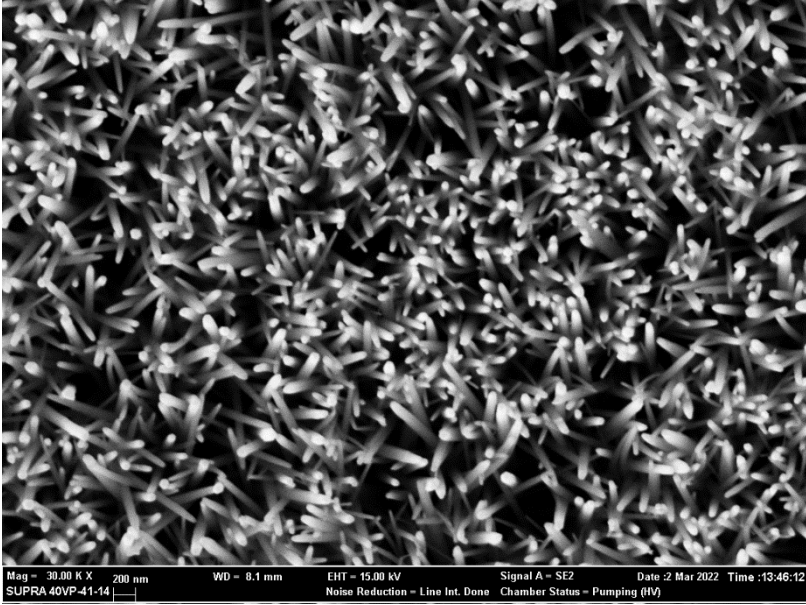
ZnO çekirdek yapılar üzerine kimyasal banyo depolama yöntemi ile ZnO kaplanarak elde edilen Z serisi ZnO nanorodlara ait 30 kx büyütme SEM görüntüleri Şekil 13 - 15'de ayrı ayrı gösterilmiştir.



Şekil 13. Z1 serisi ZnO nanorodun 30kx büyütmeli SEM görüntüsü.



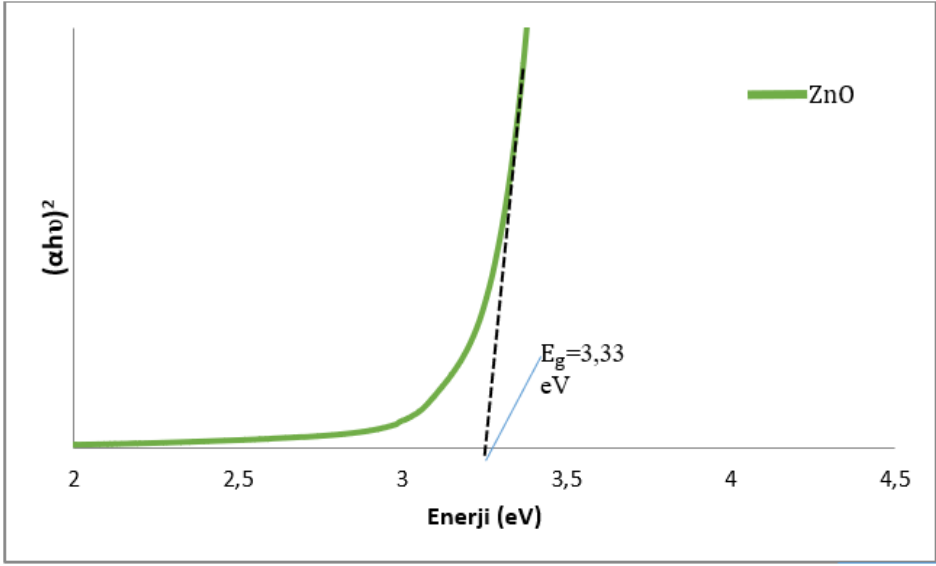
Şekil 14. Z2 serisi ZnO nanorodun 30kx büyütmeli SEM görüntüsü



Şekil 15. Z3 serisi ZnO nanorodun 30kx büyütmeli SEM görüntüsü

Z serisi ZnO nanorodların SEM görüntüleri incelendiğinde, alltaş üzerinde oluşmuş olan filmin tüm yüzeyinde nanorodların oluştuğu gözlemlenmektedir. Z serisinde oluşan nanorodlar incelendiğinde Z1 ve Z2 serilerinde oluşan rodler daha rastgele düzende yerleşerek nanoçiçek yapıda gözlemlenirken, Z3 yapısında rodler aynı yönde yönelmiş bir şekilde nanorod yapısını oluşturmuşlardır.

Elde edilen filmlerin yasak enerji aralıklarının belirlenebilmesi için UV-Vis Spektroskopisi ölçümleri yapılmıştır. Her bir filmin ayrı ayrı $(ahv)^2$ 'nin $h\nu$ 'ye göre değişim grafikleri çizilir. Bu grafiklerin lineer kısımlarının doğrultusunun $h\nu$ eksenini, $(ahv)^2 = 0$ 'da kestiği noktanın enerji değerleri, filmlerin yasak enerji aralıkları olarak belirlenir. Bu metot Tauc Metodu olarak bilinir. Z serisi ZnO nanorodların temel absorpsiyon spektrumu verilerinden yararlanarak yasak enerji aralığının belirlenebilmesi için Şekil 17'de $(ahv)^2$ 'nin $h\nu$ 'ye göre değişim grafiği çizilmiştir.



Şekil 17. Z3 serisi ZnO nanorod UV-Vis. Spektrofotometresi

Buna göre Z serilerinde en iyi nanorod, yasak enerji aralığı değeri 3,33 eV ile Z3 serisi olarak belirlenir.

4. Sonuç ve Tartışma

Bu tez çalışması kapsamında ZnO nanorodlar, hibrit ince film üretim tekniğiyle üretilmiştir. Üretim tekniği, kompleks ve pahalı teknoloji ile üretim tekniklerine alternatif olarak “Sol-Gel Manyetik Döndürerek Kaplama Yöntemi” ve “Kimyasal Banyo Depolama Yöntemi” kullanılarak elde edilmiştir. ZnO nanorod üretim yöntemlerinde ilk olarak Sol-gel manyetik döndürerek kaplama yöntemi ile ZnO çekirdek tabaka üretimi yapılmıştır. Bu yöntemde en iyi filmin oluşacağı şartı belirlemek için parametreleri değiştirerek ZnO ince filmler üretilmiştir. Belirlenmiş parametreler ile üretilen ZnO serilerinin yapısal özelliklerini belirlemek için XRD spektrumları incelenerek karşılaştırılmıştır. İncelemeler sonucunda oluşan filmlerin tamamı polikristal yapıdadır. C3 serisi ince filmin pik şiddetleri diğer ince film pik şiddetlerinden daha büyük olduğu görülmüştür. C3 serisi ince filmin XRD cihazı ile ölçülen hekzagonal yapıdaki ZnO ince filmin (ICDD. 98-003-1052) ile birbiriyle örtüşmektedir. C3 serisi ince filmin XRD spektrumu ile gözlemlenen yarı pik genişliklerine göre Scherrer formülüyle yardımıyla tane boyutu değerinin 107 nm olduğu hesaplanmıştır. Üretilen ZnO ince film serilerinde karşılaştırılması sonucunda döndürme hızının artırılması alttaş üzerinde oluşan kristalleşmenin iyileştiği görülmüştür.

Seriler içerisinde en iyi kristalleşme gösteren C3 serisi ZnO ince filmin SEM görüntüleri incelenmiştir. İncelemeler sonucunda alttaş üzerinde oluşan filmin, yığılma şeklinde oluşumların bulunmadığı, tabana homojen bir şekilde kaplandığı, yüzeyde boşluklar oluşmadığı ve tanelerin birbirlerine daha iyi tutunduğu görülmektedir. SEM görüntüsünde ve XRD spektrumu ile belirlenen tane boyutu değerleri birbirine benzer ve destekler olduğu görülmüştür.

C3 serisi ince filmin UV-Vis. Spektroskopisi ile temel absorpsiyon spektrumu verilerinden ve Tauc metodu ile yasak enerji aralığı grafiği çizilmiş ve yasak enerji aralığı ise 3,31 eV olarak bulunmuştur.

ZnO nanorod üretimi için Sol-gel manyetik döndürme yöntemi ile üretilen en iyi ince film serisi olan C3 serisi ince film üzerine belirlenen parametreler dahilinde Kimyasal Banyo Depolama Yöntemi ile üretim yapılmıştır. Elde edilen 3 seriden en iyi ZnO nanorod yapıyı bulmak için yapısal, yüzeyel ve optik özellikleri incelenmiştir.

Belirlenmiş parametreler ile üretilen ZnO nanorod serilerinin yapısal özelliklerini belirlemek için XRD spektrumları incelenerek karşılaştırılmıştır. İncelemeler sonucunda oluşan nanorodların tamamı kristal yapıdadır. Z3 serisi nanorodun pik şiddetleri diğer nanorodların pik şiddetlerinden daha büyük olduğu görülmüştür. Z3 serisi nanorodun XRD cihazı ile ölçülen hekzagonal yapıdaki ZnO nanorodun (ICDD. 98-003-1052) ile birbiriyle örtüşmektedir. Z3 serisi nanorodun XRD spektrumu ile gözlemlenen yarı pik genişliklerine göre Scherrer formülüyle yardımıyla tane boyutu değerinin 39 nm olduğu hesaplanmıştır. Üretilen ZnO nanorod serilerinde karşılaştırılması sonucunda reaksiyon süresinin artırılması alttaş üzerinde oluşan nanorodların kristalleşme ve yönelimlerinin iyileştiği ve tek kristal şeklinde üretilebildiği görülmüştür.

Seriler içerisinde en iyi kristalleşme gösteren Z3 serisi ZnO nanorodunun SEM görüntüleri incelenmiştir. İncelemeler sonucunda alttaş üzerinde oluşan nanorodların, yığılma şeklinde oluşumların bulunmadığı, kristal yapının neredeyse tek kristal olarak oluştuğu ve yönelimlerin aynı yönde olduğu görülmektedir. SEM görüntüsünde ve XRD spektrumu ile belirlenen tane boyutu değerleri birbirine benzer ve destekler olduğu görülmüştür. Z3 serisi nanorodun UV-Vis. Spektroskopisi ile temel absorpsiyon spektrumu verilerinden ve Tauc metodu ile yasak enerji aralığı grafiği çizilmiş ve yasak enerji aralığı 3,33 eV bulunmuştur.

Yapılan bu çalışmalar sonucunda, üretilmiş olan ZnO nanorodların yapısal, yüzeyel ve elektriksel özelliklerinin Manyetik döndürme hızına ve banyolanma reaksiyon süresine bağlı olarak değiştiği gözlemlenmiştir. Sol-gel manyetik döndürerek kaplama yönteminde döndürme hızı artırıldığında alttaş üzerinde oluşan filmin üzerindeki kristalleşmenin iyileştiği ve film tabakanın iyileştiği

gözlemlenmiştir. Kimyasal bonyo depolama yönteminde ise reaksiyon süresinin arttırılması ile nanorod oluşumunun tek kristal yapıda ve tek bir yönde yönelimlerin olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre yapılacak ileriki çalışmalarda ZnO üretilen nanorodların; Elektronik, opto elektronik, nano elektromekanik cihazlar, ileri nano kompozit malzemeler, sensörler gibi uygulamalarda kullanılabileceği düşünülmektedir.

5. Kaynaklar

- [1] Quoilin, S. and Orosz, M., Rural Electrification Through Decentralized Concentrating Solar Power: Technological and Socio-economic Aspects, J. Sustain. Dev. Energy Water Environ. Syst., Vol. 1, No. 3, pp 199-212, 2013.
- [2] Moser, M., Trieb, F. and Fichter, T., Potential of Concentrating Solar Power Plants for the Combined Production of Water and Electricity in MENA Countries, J. Sustain. Dev. Energy Water Environ. Syst., Vol. 1, No. 2, pp 122-140, 2013.
- [3] J. Zhao , A. Wang , MA Green , F. Ferrazza % 19,8 Verimli "bal peteği" dokulu çok kristalli ve% 24,4 tek kristalli silikon güneş pilleri J. Appl. Phys. , 73 (1998) , s. 1991 – 1993.
- [4] Akkoyunlu, O., 2000. Çinko Oksit Yarıiletken Bileşiğın Elektriksel ve Optik Özellikleri, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üni., Fen Bilimleri Enst., Eskişehir.
- [5] Smith, D.L. 1995. “ Thin-Film Deposition Principles and Practice”, s.1-8. Snyder, R.L., 1992. Characterisation of Materials, VCH Publishers, New York, A.B.D.,251-356.
- [6] Aksoy, S., 2006. Kalay Katkılı ZnO İnce Filmlerinin Bazı Fiziksel Özellikleri, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üni., Fen Bilimleri Enst., Eskişehir.
- [7] Rossnagel, S.M., Cuomo, J.J. ve Westwood, W. D., (1990), Handbook of Plasma Processing Technology, Noyes publications.
- [8] Comba, B., 2009. Sol-Gel Yöntemi İle ZnO Kuantum Noktalarının Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu. (Yüksek Lisans Tezi), İstanbul Üniversitesi. Fizik Bölümü, İstanbul.
- [9] Deligöz, M., Fakıoğlu E., “Güneş enerjisi ne zaman ucuzlayacak”, Enerji ve Ekoloji Paneli, Diyarbakır Büyükşehir Belediyesi, Diyarbakır, 27 Kasım (2007).
- [10] Karamanav, M., “Güneş enerjisi ve güneş pilleri”, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Sakarya, 6,7,28, (2007)
- [11] Goetzberger, A., Hoffmann, V. U., “Photovoltaic Solar Energy Generation”, Rhodes, W. T., Asakura, T., Brenner, K. H., Hansch, T.W., Kamiya, T., Krausz, F., Monemar, B., Venghaus, H., Weber, H., Weinfurter, H., Almanya, 23,43,70,95-97,101, (2005).
- [12] Temiz Dünya Ekoloji Derneği, Temiz Dünya Rehberi- Güneş Enerjisi, Hatice Şen, İstanbul, 34,39-44,47,48.
- [13] Ünal, O., “Güneş pilleri”, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 51,53, (2006).

- [14] Kıyak, İ., Koçyiğit, G., “Şebekeye bağlı güneş pili sistemleri”, 3e Electrotech, Sayı: 177, 214-222, (2009).
- [15] Oktik, Ş., “Güneş-elektrik dönüşümleri, Fotovoltaik güneş gözeleri ve güç sistemleri”, Ankara Temiz Enerji Vakfı Yayınları, 15,17, Ankara, (2001).
- [16] Ga b I e r H. Autonomous power supply with photovoltaics: photovoltaics for rural electrification reality and vision, Renewable Energy 1998;1 5:512- 518.
- [17] Yeşiltaş, S., Hizmark Group, Güneş Enerjisi 2009, Güneş Enerjisi Teknolojileri Fuarı, 26 Şubat (2009).
- [18] Yao, T. and Hong, S., 2009. Oxide and Nitride Semiconductors, Springer, Berlin.
- [19] Callister WD, Rethwisch DG, Materials Science and Engineering. Eight Editions, 2013.
- [20] Kumar, V. Nanosilicon, ISBN: 978-0-08-044528- 1, First Edition, 2007.
- [21] National Nanotechnology Initiative: The Initiative and its Implementation Plan, pp. 19–20. Washington, D.C., National Science and Technology Council, Committee on Technology, Subcommittee on Nanoscale Science, Engineering and technology 2000.
- [22] Elnathan R., Kwiat M., Pevzner A., Engel Y., Burstein L., Khatchourints A. Lichtenstein A., Kantaev R., Patolsky F., "Biorecognition Layer Engineering: Overcoming Screening Limitations of Nanowire-Based FET Devices". Nano Letters 12 (10): 5245–5254.

14. Bölüm

Diospyros kaki L (Trabzon hurması) Meyvesi Kabuklarından Gümüş Nanopartikül (AgNP) Sentezi ve Katalitik Etkisi Üzerine Bir Araştırma

Tuğba ÖZBUCAK¹

Sinem Dağ²

Görkem GÜRKAN³

1 Prof. Dr, Ordu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

2 Ordu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

3 Ordu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Giriş

Nanobilim çevre, tıp, kimya, eczacılık, fizik, biyoloji ve malzeme bilimi gibi farklı disiplinler arasında hızla büyümektedir (Mohammadzadeh ve ark., 2019; Ghoreishi ve ark., 2017; Mohammadi-Aghdam ve ark., 2018; Ardestani ve ark., 2020). Morfolojileri ve boyutları nedeniyle metal nano parçacıkların özellikleri birbirlerinden farklıdır. Au (altın), Ag (gümüş), Pd (palladyum), ZnO (çinko oksit), TiO₂ (titanium dioksit) ve Cu (bakır) gibi çeşitli nanopartiküllerin sentezi ve uygulaması ile ilgili önemli miktarda çalışma rapor edilmiştir (Kumari ve Meena, 2020; Yarahmadi ve ark., 2021; (Pushpamalini ve ark., 2021). Bunlar arasında gümüş nanopartikülü tıp, biyoloji, kimya gibi farklı alanlarda oldukça fazla ilgi çekmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalar AgNP (gümüş nanopartikül)'lerin çeşitli bakterilere karşı yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Mortazavi-Derazkola ve ark., 2020; Yousaf ve ark., 2020; Ebrahimzadeh ve ark., 2020).

Nanoteknoloji, maddeler üzerinde nanometre boyutlarında gerçekleştirilen düzenleme, işleme, tasarım, ölçüm, modelleme gibi çalışmalara imkân veren yeni bir bilim dalıdır. Teknolojik olarak maddeye yeni fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler kazandırmayı hedefleyen, atom ve molekül seviyesinde çalışmalarla ilerleyen, yeni ve hızla gelişen bir teknoloji alanıdır (Beykaya ve Çağlar, 2016). Nanoteknolojik araştırmalar, yenilikler sunması, endüstriyel modellemenin ticari boyut kazanmasıyla elde edilen yüksek kâr payı nedeniyle ilaç, gıda, fizik, enerji üretimi, elektronik, iletişim, tekstil, gibi neredeyse tüm bilim dallarında en popüler araştırma alanı olarak dikkat çekmektedir (Roco, 2007; Rai, 2009). 100 nanometrenin (nm) altında boyuta sahip olan Nanopartiküller ise nanoboyutlu malzemelerin dolayısıyla nanoteknolojinin temelini oluşturmaktadır. Bugüne kadar nanopartikül üretiminde pek çok fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntem kullanılmıştır. Ancak bu yöntemler hızlı ve istenilen boyutta nanopartikül üretebilse de pahalı olması ve toksik ve kimyasal maddeler içermesinden dolayı çevreye büyük ölçüde zarar vermektedirler. Bu nedenle nanopartikül üretiminde toksik olmayan, çevre dostu, sürdürülebilir ve daha ucuz olan Yeşil Sentez yöntemi ortaya çıkmıştır. *Azolla caroliniana*, *Garcinia indica*, *Camellia sinensis* gibi bitki özütleri kullanılarak nanopartikül sentezlendiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Anjana ve ark. 2020; Sangaonkar ve Pawar, 2018; Rolim ve ark., 2019).

Yaprak dökken, çok yıllık, fanerofit hayat formuna sahip bir ağaç olan *D. kaki* Ebenaceae familyasının Diospyros cinsine ait bir taksondur (Onur 1990; Anonymous 2012a). Eylül-aralık ayları arasında hasat edilen meyveleri renk, şekil ve boyut bakımından farklılık göstermektedir. Sarıdan kırmızıya veya

turuncuya dönen renklere sahiptir (Yıldız Akbulut, 2021). Meyve kabuğu ince parlak ve pürüzsüzdür (Karasova ve ark., 2013).

Nüfus artışına paralel bir şekilde ortaya çıkan atık problemi dünyanın en önemli güncel sorunlarından birisidir. Özellikle bitkisel ürünlerin kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan yaprak, çiçek, kabuk, sap gibi farklı kısımları önemli bir miktardadır. Bundan dolayı bitkisel atıkların ham madde olarak farklı şekillerde değerlendirilmesi ve yeniden kullanılabilmesi katma değeri yüksek olan ürünlere dönüştürülmesi oldukça önemlidir (Heşen, 2010; Yaman, 2012).

Fenolik kirleticiler ilaç, petrokimya, tekstil, matbaa gibi farklı sektörlerde yaygın olarak bulunan organik kirleticilerdir (Gutes ve ark., 2005). On binden çeşitte boya ve pigmentin kullanıldığı boya endüstrisinde yaklaşık %15'lik endüstriyel atık ortaya çıkmaktadır (Kayranlı 2011; Arslan ve ark., 2021). Biyolojik olarak parçalanamayan boyalar ışığa, ısıya ve oksitleyici maddelere karşı dayanıklıdır (Wang ve ark. 2018). Bu özelliklerinden dolayı sularda kirliliğe ve oksijen kapasitesinin azalmasına neden olmakta ve hidrosfere verdiği zararlar ciddi çevre sorunları yaratmaktadır (Piccin ve ark. 2012). Suda bulunan boyaların uzaklaştırılmasında aktif karbonlar, killer, bitkisel atıklar gibi malzemeler kullanılmaktadır. Ancak bunlar sınırlı yüzey alanı ve aktif bölgelere sahip oldukları için adsorbe etme yetenekleri de düşüktür. O nedenle organik kökenli kirleticilerin bozunması için fazla sayıda aktif bölgeye ve geniş yüzey alanına sahip nanopartiküllerin kullanılması son zamanlarda oldukça fazla ilgi çekmektedir (Arslan ve ark., 2021). Bu nedenle daha yeşil daha sürdürülebilir çözümler üretmek amacıyla çeşitli bitkilerin yaprak, meyve, tohum, kabuk gibi kısımlarının kullanıldığı farklı özelliklere sahip nanomalzemelerin üretildiği uygulamalar yapılmıştır (Alsubki ve ark., 2021; Kaplan ve ark., 2021; Gomathi ve ark., 2021).

Bu çalışmada *Diospyros kaki* L (Trabzon hurması) meyvesinin kabukları ile hazırlanan metanol, etanol ve su ekstraktları kullanılmıştır. Bu ekstraktlar 1 ve 2 mM'lık gümüş nitrat ile reaksiyona sokularak gümüş nanopartikülleri (AgNP) sentezlenmeye çalışılmıştır. Sentezlenen nanopatiküller optimize edilerek UV-Vis ve elektron mikroskopu ile karakterize edilmiştir. Hazırlanan bütün ekstraksiyonların metilen mavisi boyasını indirgeme gücü incelenmiştir.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Bu çalışmada materyal olarak *Diospyros kaki* L. meyvesinin kabukları kullanılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. *Diospyros kaki* meyvesinin genel görünüşü ve toplanan meyveler

Trabzon hurması, cennet hurması, Japon hurması ve Akdeniz hurması gibi yöresel isimleri ile bilinen Ebenaceae familyasının *Diospyros* cinsine ait çok yıllık ağaç formunda bir bitkidir.

Taksonun sistematigi aşağıda verilmiştir.

Kingdom (Alem): Plantae

Subkingdom (Alt Alem): Tracheobionta

Division (Bölüm): Magnoliophyta

Class (Sınıf): Magnoliopsida

Subclass (Alt sınıf): Dilleniidae

Order (Takım): Ebenales

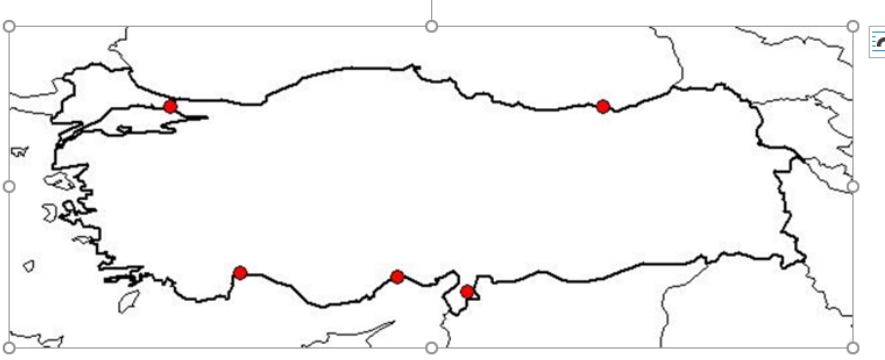
Family (Aile): Ebenaceae

Genus (Cins): *Diospyros*

Species (Tür): *Diospyros kaki* L.

Anavatanı Çin olan meyve önce Japonya'ya, sonrasında ise diğer ülkelere yayılmıştır (Özcan, 2005). Son yıllarda ABD'de özellikle Kaliforniya'da, İtalya,

Brezilya, Yeni Zelanda, Avustralya ve İsrail'de modern Trabzon hurması bahçeleri kurulmuştur (Kuzucu ve Kaynaş, 2004). Ülkemize hangi tarihte getirildiği tam olarak bilinmemekle birlikte ülkemize Karadeniz bölgesinden giren meyvenin yetiştiriciliği çok eski tarihlere dayanmaktadır. Bir subtropik iklim meyvesi olan Trabzon hurması ülkemizde en çok Akdeniz Bölgesi'nde yetiştirilmektedir. Bu meyve türü kışın yapraklarını döktüğü için, daha serin bölgelerde de özellikle Karadeniz, Ege ve Marmara Bölgeleri'nde yetiştiriciliğine rastlanmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. Taksonun Türkiye' deki dağılımı

Trabzon hurması meyvesinin iriliği, rengi ve şekli bakımından çeşitleri arasında büyük farklılıklar bulunmaktadır. 50-300 gr arasında değişen ağırlıkta, konik, uzun konik, yuvarlak ve basık arasında değişim gösteren şekilde yeşilimsi-sarı, turuncu-sarı, turuncu, turuncu-kırmızı renkte olan çeşitleri bulunmaktadır. Meyveleri askorbik asit ve fenolik bileşikler, karbonhidrat ve tanen açısından çok zengindir (Parseker ve ark., 2008). Püre, kek, reçel, kurabiye, içecek, salata ve meyve gibi farklı tüketim şekilleri bulunan Trabzon hurmasının kabuğunun soyulması ile ortaya çıkan bitkisel atık çalışma materyalimizi oluşturmaktadır.

Metot

1-Örneklerin toplanması

Ordu İli Kayadibi köyünden (500m) aralık ayında aynı ağaçtaki meyveler toplanarak tüketim sırasında soyulan kabukları biriktirilerek oda sıcaklığında kuru ağırlığı sabitleninceye kadar kurutulmuş (Şekil 3) ve daha sonra bitki değirmeni ile öğütülmüştür (Şekil 4). Elde edilen bu numunelerin metanol, etanol ve su ekstraktları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu ekstraktlar kullanılarak gümüş nanopartikülü üretilmeye çalışılmıştır. Elde edilen nano gümüşler UV-Visible ve elektron mikroskobu ile tespit edilmiştir.



Şekil 3. Oda sıcaklığında kurutulmuş meyve kabukları

2- Bitki Ekstraktlarının Hazırlanışı

Su, metanol ve etanol ekstraktları hazırlamak için kurutulmuş bitki örnekleri (5 gr) üzerine uygun hacimde (50 ml) su/metanol/etanol ilave edilerek 12-16 saat oda sıcaklığında çalkalamalı su banyosunda ekstre edilmesi sağlanmıştır. Süzgeç kâğıdı ile süzülerek birleştirilen süzüntüler metanol/etanol durumunda evaporatör, su durumunda ise liyofilizatör kullanılarak çözücüsünden uzaklaştırılmıştır. Bu işlem sonunda kalan katı madde hassas bir şekilde tartılarak bilinen miktarda çözücü ilavesi ile konsantrasyonu bilinen stok numuneler hazırlanmış ve analiz edilinceye kadar renkli şişelerde +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

3- Bitkisel Atık kullanılarak Nanopartikül Sentezlenme Çalışmaları

Örneklerin metanol, etanol ve su ekstraksiyonlarından elde edilen saf maddeler 100'er ml saf su ile çözülerek gümüş nanopartikülü oluşturma reaksiyonları için stok çözeltiler elde edilmiştir. Gümüş nanopartikülü oluşturma reaksiyonuna katılmak üzere 1 mM (milimolarlık) ve 2 mM (milimolarlık) $AgNO_3$ stok çözeltileri hazırlanmıştır (Sinha ve Paul, 2014) (Şekil 8). Stok çözelti olarak hazırlanan Trabzon hurması kabuğunun 1 ve 2 mM’lık metanol, etanol ve su ekstraktı çözeltilerinden 4'er ml alınarak üzerlerinde 1 ve 2 mM’lık $AgNO_3$ çözeltisinden 4'er ml eklenmiştir. Üzerine 1-2 damla NaOH tampon çözeltisinden damlatılarak pH indikatör kâğıdı kullanılarak pH 7-8 arasında sabitlenmeye çalışılmıştır. Hazırlanan karışımlar çalkalamalı su banyosunda 38°C’de beklemeye bırakılarak renk değişimi gözlemi için takibe alınmıştır. Renk değişimi gerçekleşen çözeltilerden alınan örnekler Ordu Üniversitesi merkezi araştırma laboratuvarında bulunan UV-Visible Spektrofotometre (Shimadzu marka) cihazında 200-800 nm aralığında saf suya karşı okunmuş ve grafikler elde edilmiştir. Daha sonra bu çözeltiler SEM (Taramalı Elektron Mikroskopu-Hitachi marka) cihazına gönderilmeden önce de liyofilizatör cihazına konularak

saflaştırılmıştır (Khalil ve ark., 2013). Bu saf maddeler içerisinde gümüş nanopartikülün varlığını gözlemleyebilmek için SEM elektron mikroskopunda farklı büyütme oranlarında incelenerek mikroskop görüntüleri elde edilmiştir.

4-Boya İndirgeme Reaksiyonları

Çalışmada bazik özellikte, yükseltgenmiş rengi mavi, indirgenmiş rengi beyaz olan metilen mavisi boyası kullanılmıştır. Uygulamalar için meyve kabuklarından hazırlanan bütün ekstraktlar kullanılarak NaBH_4 (Sodyum Bor Hidrür) ile metilen mavisi boyası indirgenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla 1ml 10^{-4} M metilen mavisi boyasına 1ml H_2O ilave edilerek UV-Vis ölçümü alınmış, okuma işleminden sonra aynı örneğin üzerine 1.5 ml NaBH_4 ve hazırlanan ekstraktlardan 0.5 ml eklenerek 2'şer dk. aralıklarla, reaksiyon dengeye ulaşıncaya kadar UV-Vis ölçümleri alınmıştır (Şahin ve Gübbük, 2019).

BULGULAR

Nanopartikül Sentezlenme Çalışmaları Sonuçları

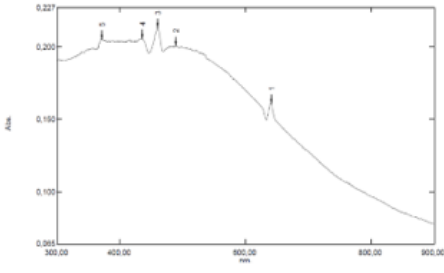
Trabzon hurması meyve kabuklarının 1 ve 2 mM 'lık metanol, etanol ve su ekstraktlarından hazırlanan numunelerin nano sentez reaksiyonlarının gerçekleştiğini (Şekil 4) gösteren renk değişim süreleri aşağıda verilmiştir;

2mM'lık AgNO_3 ilave edilen Metanol ekstraktı 60. dakikada, 1 mM 'lık AgNO_3 ilave edilen Metanol ekstraktı 30. Dakikada, 2mM'lık AgNO_3 ilave edilen Su ekstraktı 3. dakikada, 1mM'lık AgNO_3 ilave edilen Su ekstraktı 15. dakikada, 2mM'lık AgNO_3 ilave edilen Etanol ekstraktı 20. dakikada, 1mM'lık AgNO_3 ilave edilen Etanol ekstraktı 20. dakikada

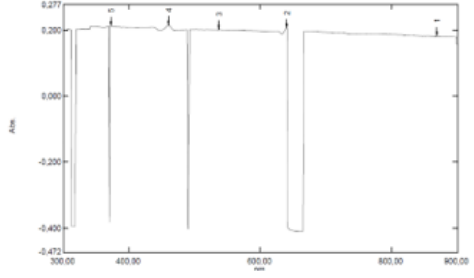


Şekil 4. 1 ve 2 mM lık AgNO_3 ile yeşil sentez reaksiyonuna giren çözeltilerde gözlenen renk değişimleri.

Gümüş nanopartikülü (AgNP) sentez reaksiyonları gerçekleşen numunelerin UV-Visible görüntüleri Şekil 5-7'de verilmiştir.

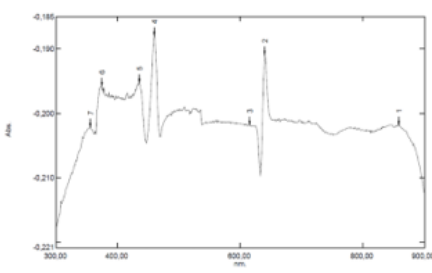


a

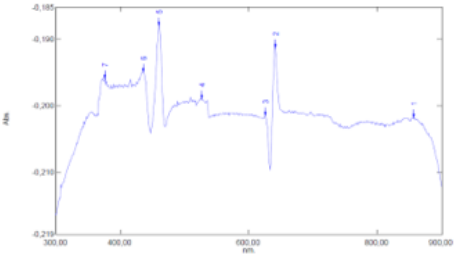


b

Şekil 5. Su ekstraktı ile sentezlenen AgNP lerin UV-Vis analiz grafiği,
a; 1mM'lık AgNO₃ ilave edilen,
b; 2 mM'lık AgNO₃ ilave edilen su ekstraktı örnekleri

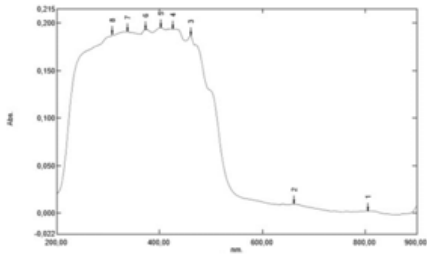


a

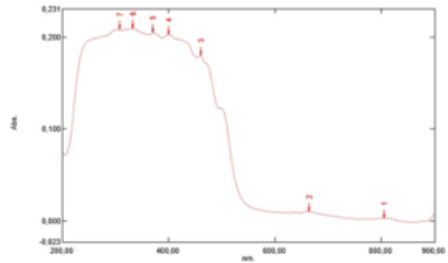


b

Şekil 6. Metanol ekstraktı ile sentezlenen AgNP lerin UV-Vis analiz grafiği,
a; 1mM'lık AgNO₃ ilave edilen,
b; 2 mM'lık AgNO₃ ilave edilen metanol ekstraktı örnekleri



a

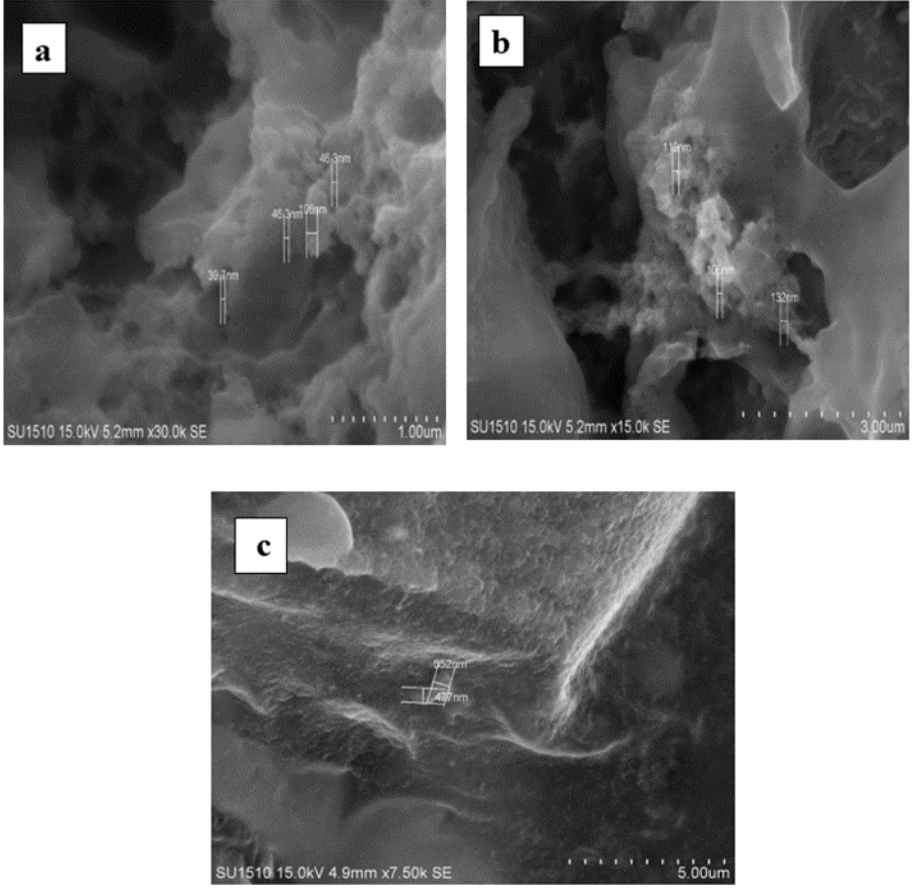


b

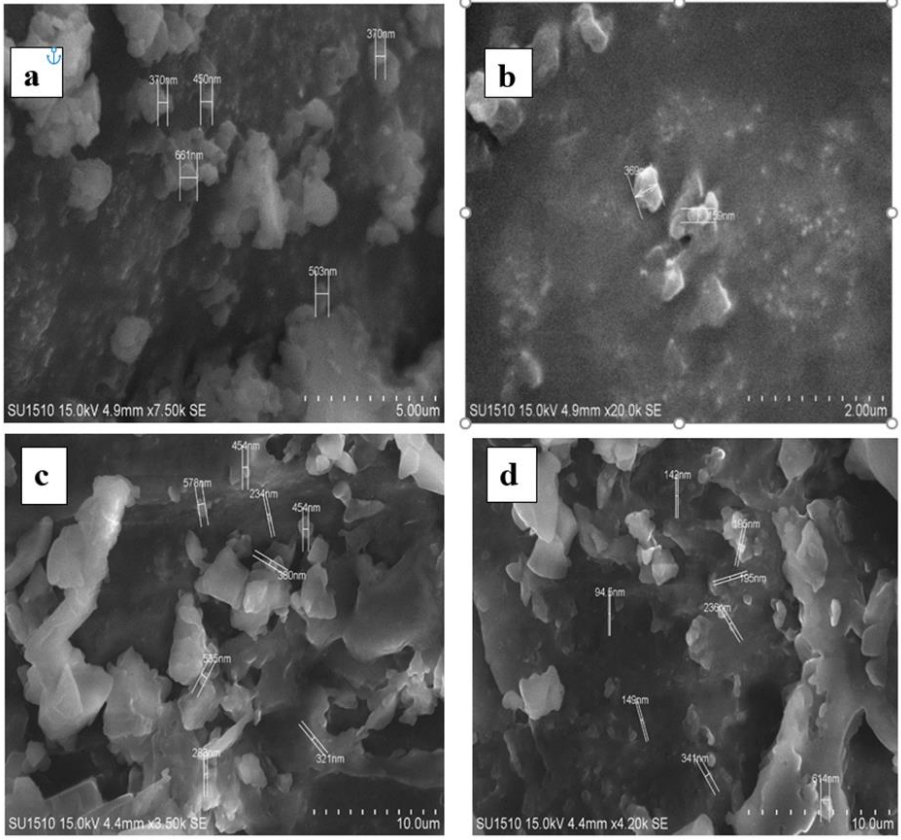
Şekil 7. Etanol ekstraktı ile sentezlenen AgNP lerin UV-Vis analiz grafiği,
a; 1mM'lık AgNO₃ ilave edilen,
b; 2 mM'lık AgNO₃ ilave edilen etanol ekstraktı örnekleri

UV-Vis görüntülerine bakıldığında 2 mM'lık AgNO_3 ilave edilen su ekstraktı örnekleri dışındaki numunelerdeki pikler anlamlı ve önemlidir. Şekil 8-10'da gümüş nanopartikülü sentez reaksiyonları gerçekleşen numunelerin SEM elektron mikroskobu görüntüleri verilmiştir. Su ekstraktındaki gümüş nanopartikül sentezini gösteren elektron mikroskobu görüntülerine bakıldığında 1 mM'lık örneklerde 106-132 nm, 2mM 'lık örneklerde ise 447-552 nm aralığında gümüş nanopartiküllerinin oluştuğu görülmektedir (Şekil 8). 2 mM'lık su ekstraktı örneklerinde görülen nanopartiküllerin boyutlarının büyük olduğu görülmektedir. Bu durum UV-Visible grafiklerinde görülen pikleri ile uyumluluk göstermektedir.

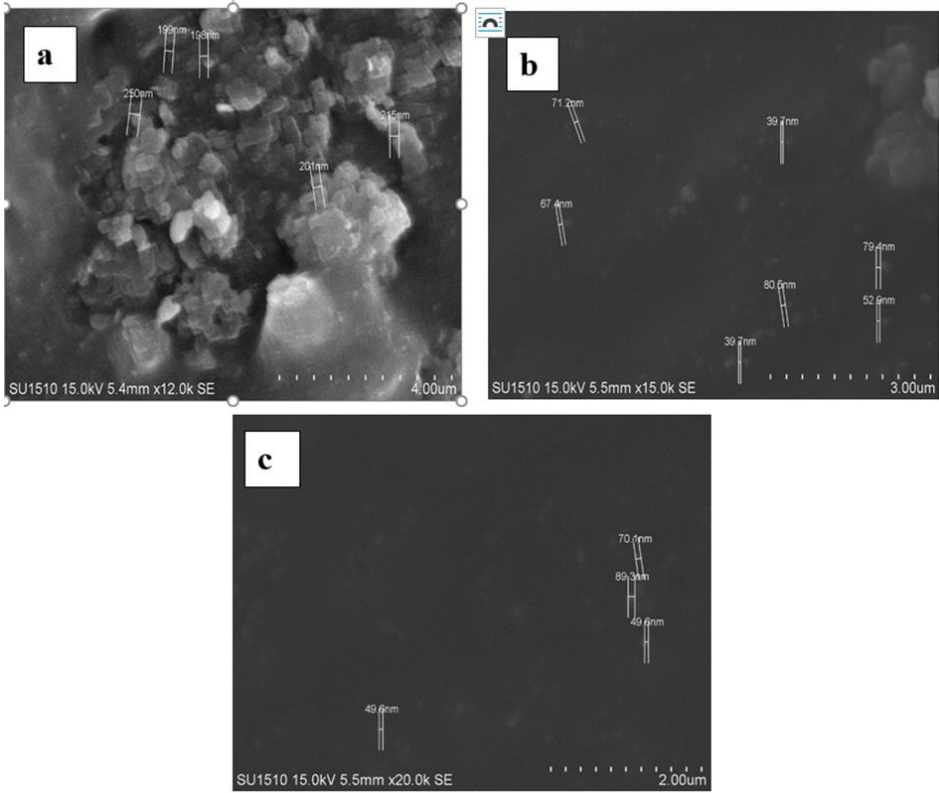
Şekil 9' da metanol ekstraktı ile sentezlenen gümüş nanopartiküllerinin elektron mikroskobu görüntüleri görülmektedir. 1 Mm'lık örneklerde 159-661 nm aralığında partiküller görünürken 2 mM'lık örneklerde 94.5-149 nm aralığında nanopartiküller tespit edilmiştir. Etanol ekstraktındaki gümüş nanopartiküllerinin elektron mikroskobu görüntülerine bakıldığında ise 1mM'lık örneklerde 198-250 nm, 2mM'lık örneklerde ise 39,7-89 nm büyüklüğünde gümüş nanopartikülleri belirlenmiştir (Şekil 10).



Şekil 8. Su ekstraktı örneklerindeki AgNP lerin görüntüsü, **a-b**: 1mM'lık AgNO₃ ilave edilen AgNP lerin görüntüsü, **c**: 2mM'lık AgNO₃ ilave edilen AgNP lerin görüntüsü



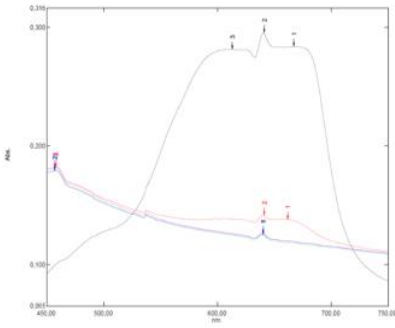
Şekil 9. Metanol ekstraktı örneklerindeki AgNP lerin görüntüsü,
a-b: 1mM'lık AgNO₃ ilave edilen AgNP lerin görüntüsü,
c, d, e: 2mM'lık AgNO₃ ilave edilen AgNP lerin görüntüsü



Şekil 10. Etanol ekstraktı örneklerindeki AgNP lerin görüntüsü,
a: 1mM'lık AgNO₃ ilave edilen AgNP lerin görüntüsü,
b, c: 2mM'lık AgNO₃ ilave edilen AgNP lerin görüntüsü

Metilen mavisi indirgenme reaksiyonları sonuçları

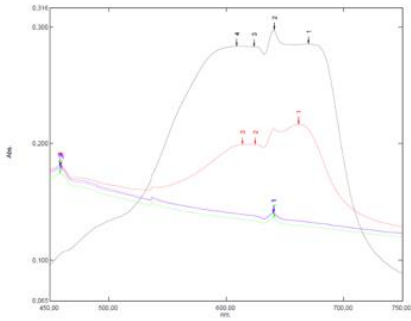
Trabzon hurması meyve kabuklarından hazırlanan ekstraktlardan metilen mavisi boyasının bozunma reaksiyonları 1 ve 2 mM'lık AgNO₃ ilave edilen su ekstraktlarında 4. dakikada gerçekleşmiştir. 1 ve 2 mM 'lık AgNO₃ ilave edilmiş metanol ekstraktı ile 2 mM 'lık AgNO₃ ilave edilmiş etanol ekstraktlarında ise bozunma 6. dakikada olmuştur. 8. dakikada bozunmanın gerçekleştiği örnek 1 mM 'lık AgNO₃ ilave edilmiş etanol ekstraktıdır. Şekil 11-17'de ekstraktları kullanılarak metilen mavisinin indirgenme reaksiyonlarını gösteren UV-Vis grafikleri ve renk değişikliği fotoğrafları görülmektedir.



1 mm su 2 dk.
1 mm su 4 dk.
1 mm su 6 dk.
1 mm su 8 dk.
1 mm su 10 dk.



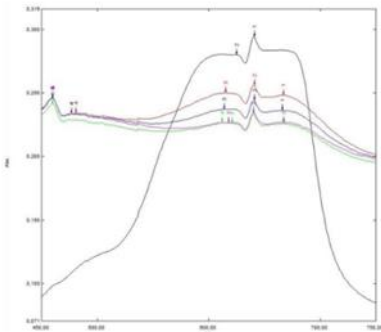
Şekil 11. 1 mM AgNO_3 ilave edilmiş su ekstraktı örneklerinin metilen mavisi indirgenme reaksiyonlarının UV-Vis grafikleri (4. dakikada bozunma) ve metilen mavisi boyasındaki renk değişikliği



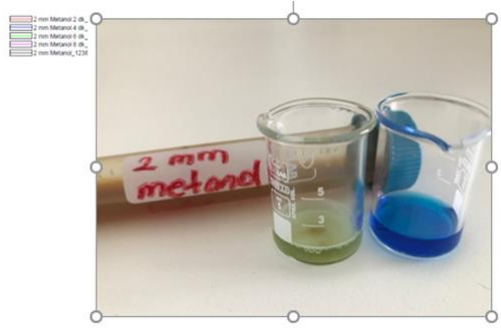
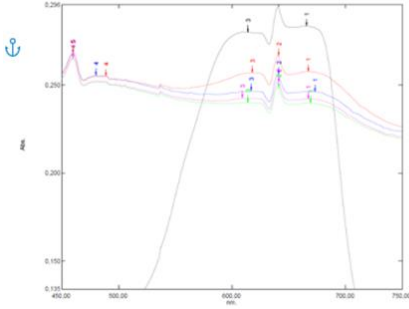
2 mm su 2 dk.
2 mm su 4 dk.
2 mm su 6 dk.
2 mm su 8 dk.
2 mm su 10 dk.



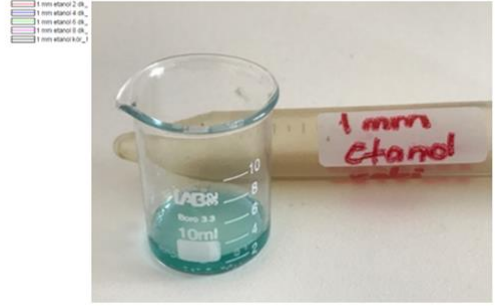
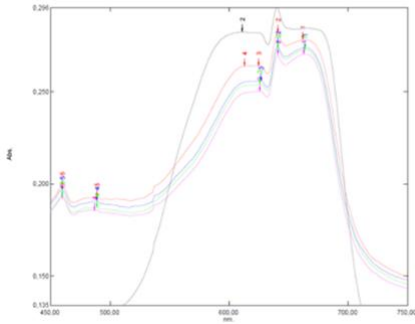
Şekil 12. 2 mM AgNO_3 ilave edilmiş su ekstraktı örneklerinin metilen mavisi indirgenme reaksiyonlarının UV-Vis grafikleri (4. dakikada bozunma) ve metilen mavisi boyasındaki renk değişikliği



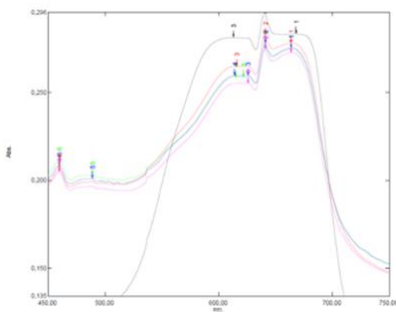
Şekil 13. 1 mM AgNO_3 ilave edilmiş metanol ekstraktı örneklerinin metilen mavisi indirgenme reaksiyonlarının UV-Vis grafikleri (6. dakikada bozunma) ve metilen mavisi boyasındaki renk değişikliği



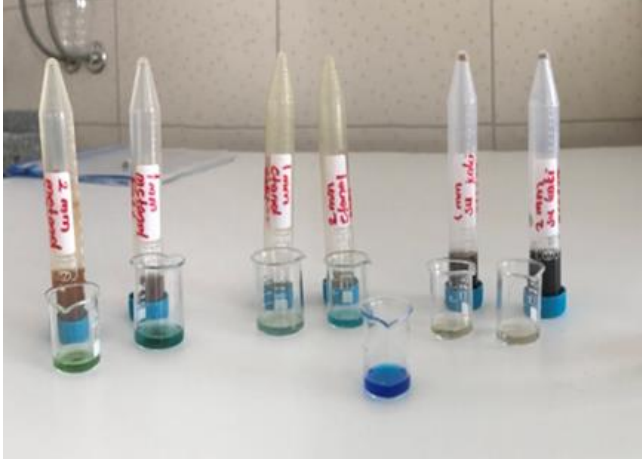
Şekil 14. 2 mM AgNO_3 ilave edilmiş metanol ekstraktı örneklerinin metilen mavisi indirgenme reaksiyonlarının UV-Vis grafikleri (6. dakikada bozunma) ve metilen mavisi boyasındaki renk değişikliği



Şekil 15. 1 mM AgNO_3 ilave edilmiş etanol ekstraktı örneklerinin metilen mavisi indirgenme reaksiyonlarının UV-Vis grafikleri (8. dakikada bozunma) ve metilen mavisi boyasındaki renk değişikliği



Şekil 16. 2 mM AgNO_3 ilave edilmiş etanol ekstraktı örneklerinin metilen mavisi indirgenme reaksiyonlarının UV-Vis grafikleri (6. dakikada bozunma) ve metilen mavisi boyasındaki renk değişikliği



Şekil 17. Çalışılan bütün numunelerdeki renk değişimlerinin toplu halde gösterilmesi

Tartışma

Çevre açısından bakıldığında tarım-gıda endüstrisi tarafından üretilen bitkisel atıkların yeniden kullanılabilmesi hayati önem taşır. O nedenle bitkisel atıkların doğru ve yeniden kullanımı ile hem doğaya hem de katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesi ile ekonomiye kazanç sağlanacaktır. Yapılan bu çalışmada daha önce çalışılmamış olan bir bitkisel bir atık olan Trabzon hurması meyve kabuklarının metanol, etanol ve su gibi farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan ekstraktlarından yeşil biyolojik bir yol ile gümüş nanopartikülleri (AgNP) sentezlenmiştir. Ayrıca hazırlanan bütün ekstraktların metilen mavisi boyasını indirgeme gücü incelenmiştir.

Bitkiler sahip oldukları kimyasal maddelerin indirgeme, kararlaştırma ve kapsülleme gibi özellikleri ile nanopartikül sentezinde kullanılmaktadırlar (Sathishkumar 2009). Son yıllarda bitkilerden gümüş nanopartiküllerinin üretilmesi üzerine yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır (González-Montelongo ve ark., 2010; Ahmed ve ark., 2015; Bagherzade ve ark., 2017). Çalışmamızda gümüş nanopartiküller (AgNP) sentez reaksiyonlarında gözlenen renk değişimleri, UV-VIS ve SEM görüntüleri ile desteklenmiştir. Metanol ve etanol ekstraktlarının 2mM'lık $AgNO_3$ ilave edilmiş örnekleri ile 1 mM'lık $AgNO_3$ ilave edilmiş su örneklerinden sentezlenen AgNP boyutlarının küçük olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber, özellikle metanol ve etanol örneklerinin SEM görüntülerinde 100 nm'nin altında oldukça küçük boyutta AgNP'lere rastlanmıştır. Bu da aynı materyalin farklı organik çözücülerde ve farklı konsantrasyonlarda görülen nanopartikül boyutlarının değişebildiğini göstermektedir. Yapılan çalışmalar ile bitki türü, ekstraksiyonda kullanılan çözücü, pH, sıcaklık, konsantrasyon gibi parametrelerin değişmesinin sentezlenen nanopartiküllerin çapını ve boyutunu değiştirdiği bildirilmiştir (Akpolat,

2018). Bizim çalışmamızda 39,7 ile 550 nm dalga boyu arasında değişen AgNP 'ler sentezlenmiştir. Literatürde farklı bitkilerin farklı kısımlarından bizim sonuçlarımıza benzer boyutlarda AgNP 'ler sentezlendiği belirtilmektedir (Aref ve Salem, 2020; Rashmi ve ark., 2021).

Bitkilerden nanopartikül sentezinden sorumlu flavonoidler, kateşinler, askorbik asitler gibi farklı bileşenlerin de olduğu bildirilmiştir. *Elettaria cardamom* L. bitkisinde biyosentezden sorumlu bileşenin esterler olduğu belirtilmektedir (Rajeshkumar ve Bharath 2017). Bizim çalışmamızda da Trabzon hurması meyve kabuklarının GC-MS analiz sonuçlarına göre yaklaşık %50 kadar bir oranda ester ve türevi bileşenlere sahip olduğu görülmektedir.

Çalışma kapsamında hazırladığımız bütün bitki ekstraktları katalizör olarak kullanılarak metilen mavisi boyasının indirgenme reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Tekstil, boya endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılan metilen mavisi boyası sucul ortamlara karışarak hem karıştığı ortama hem de orada yaşayan canlılara zarar vermektedir. Atık sulardan kirleticilerin özellikle boyaların uzaklaştırılmasında nano materyallerin katalitik performansı dikkat çekmektedir (Hashemi ve ark., 2022). Şahin (2019) tarafından boyaların kataliz işlemlerinin çok uzun sürebileceği belirtilmiştir. Oysa bizim çalışmamızda ilk kez çalışılan örneğe göre 4-8 dk. gibi çok kısa bir zamanda metilen mavisi boyasının bozunduğu görülmüştür. Çalışılan örnekler içerisinde gerek gösterdiği UV-VIS pikleri gerekse boya renginin açılması ile en iyi sonuç verenler su ile AgNP sentezlenmiş su ekstraktlarıdır.

Sonuç ve Öneriler

Sonuç olarak, yapılan bu çalışmada ilk defa Trabzon hurması meyve kabuğundan yeşil bir biyolojik yol ile gümüş nanopartikülleri oluşturulmuştur. Özellikle metanol ve etanol ekstraktlarından 100 nm'nin altında gümüş nanopartikülleri sentezlenmiştir. Nanokatalizör olarak kullandığımız su ekstraktı ile hazırlanan AgNP'ler ile metilen mavisi boyasının bozunması ve boyanın renginin berraklaşması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, Trabzon hurması meyve kabuklarının metanol ve etanol ekstraktları kullanılarak sentezlenen AgNP'leri çevre, tıp, kimya, eczacılık, fizik, biyoloji ve malzeme bilimi gibi farklı disiplinlerde yaygın olarak kullanılan nanoteknolojik ürünlere alternatif olabilir. Metilen mavisi boyası indirgenmesinde en iyi sonuçları veren AgNP'li su örnekleri özellikle bu tür boyaları kullanan endüstri kuruluşlarında boyaların sulara karışmadan önce ortamdan uzaklaştırılmasını sağlayacak nanofiltrelerin yapımında ham madde olarak kullanılabilir.

Teşekkür

Bu çalışmada yer alan nanopartikül deneylerindeki katkılarından dolayı Ordu Üniversitesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Yeşim DAĞLIOĞLU'na teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Ahmed, S., Mudasir, S., Swami, B.l., Ikram, S. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(1): 1-7.
2. Akpolat, L. B. (2018). Ag nanopartiküllerin bitki ekstraktlarından sentezi, karakterizasyonu ve polilaktik asit polimerine katılarak elektro lif çekim yöntemiyle elde edilen liflerin özelliklerinin belirlenmesi.
3. Alsubki, R., Tabassum, H., Abudawood, M., Rabaan, A.A., Alsobaie, S.F., Ansar, S. (2021). Green synthesis, characterization, enhanced functionality and biological evaluation of silver nanoparticles based on *Coriander sativum*. *Saudi J. Biol. Sci.* 28, 2102–2108.
4. Anjana, V.N., Koshy, E.P., Mathew, B. (2020). Facile synthesis of silver nanoparticles using *Azolla caroliniana*, their cytotoxicity, catalytic, optical and antibacterial activity. *Mater. Today: Proc.* 25, 163–168.
5. Anonymous, (2012a). <http://www.botanical-dermatology-database.info/BotDermdr/EBEN.Html>
6. Ardestani, M.S., Bitarafan-Rajabi, A., Mohammadzadeh, P., Mortazavi-Derazkola, S., Sabzevari, O., Azar, A.D., Kazemi, S., Hosseini, S.R., Ghoreishi, S.M. (2020). Synthesis and characterization of novel ^{99m}Tc-DGC nano-complexes for improvement of heart diagnostic. *Bioorg. Chem.* 96.
7. Aref, M.S., Salem, S.S. (2020). Bio-callus synthesis of silver nanoparticles, characterization, and antibacterial activities via *Cinnamomum camphora* callus culture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 27, 101689.
8. Arslan, R., Tozluoğlu, A., Sertkaya, S., Fidan, H., & Küçük, S. (2021). Atık sularda boya giderimi için fonksiyonellenmiş nanoselüloz esaslı adsorbanlar. *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 22(1), 148-160.
9. Bagharzade, G., Tavakoli, M.M., Namacı, M.H. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of saffron (*Crocus sativus* L.) wastages and its antibacterial activity against six bacteria. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine*.
10. Beykaya, M., Çağlar, A. (2016). Bitkisel Özütlere Kullanılarak Gümüş-Nanopartikül (AgNP) Sentezlenmesi ve Antimikrobiyal Etkinlikleri Üzerine Bir Araştırma *AKU J. Sci. Eng.* 16 (2016) 035403 (631-641).
11. Ebrahimzadeh, M.A., Naghizadeh, A., Amiri, O., Shirzadi-Ahodashti, M., Mortazavi-Derazkola, S. (2020). Green and facile synthesis of Ag nanoparticles using *Crataegus pentagyna* fruit extract (CPAgNPs) for organic pollution dyes degradation and antibacterial application. *Bioorg. Chem.* 94, 103425.

12. Ghoreishi, S.M., Khalaj, A., Bitarafan-Rajabi, A., Azar, A.D., Ardestani, M.S., Assadi, A., (2017). Novel ^{99m}Tc -Radiolabeled Anionic Linear Globular PEG-Based Dendrimer-Chlorambucil: Non-Invasive Method for In-Vivo Biodistribution. *Drug Res.* 67, 149–155.
13. Gomathi, E., Jayapriya, M., Arulmozhi, M. (2021). Environmental benign synthesis of tin oxide (SnO_2) nanoparticles using *Actinidia deliciosa* (Kiwi) peel extract with enhanced catalytic properties. *Inorg. Chem. Commun.* 130, 108670.
14. González-Montelongo, R., Lobo, M. G., & González, M. (2010). Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chemistry*, 119(3), 1030-1039.
15. Gutés, A., Céspedes, F., Alegret, S., & Del Valle, M. (2005). Determination of phenolic compounds by a polyphenol oxidase amperometric biosensor and artificial neural network analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(8), 1668-1673.
16. Hashemi, Z., Mizwari, Z. M., Mohammadi-Aghdam, S., Mortazavi-Derazkola, S., & Ebrahimzadeh, M. A. (2022). Sustainable green synthesis of silver nanoparticles using *Sambucus ebulus* phenolic extract (AgNPs@ SEE): Optimization and assessment of photocatalytic degradation of methyl orange and their in vitro antibacterial and anticancer activity. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(1), 103525.
17. Hepşen Türkay, F.Ş. (2010). Fındık Zurufu ve Arıtma Çamurunun Solucanlar İle Kompostlanması Ve Elde Edilen Vermikompostun Sera Ve Tarla Koşullarında Toprakların Biyolojik Özelliklerinde Meydana Getirdiği Etkilerin Belirlenmesi. OMÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 166s.
18. Kaplan, Ö., Tosun, N. G., Özgür, A., Tayhan, S. E., Bilgin, S., Türkekel, İ., & Gökce, İ. (2021). Microwave-assisted green synthesis of silver nanoparticles using crude extracts of *Boletus edulis* and *Coriolus versicolor*: Characterization, anticancer, antimicrobial and wound healing activities. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 64, 102641.
19. Karakasova L, Babanouska- Milenkouska F, Lazou M, Karakasov B, Stojanova M. (2013). Quality Properties Of Solar Dried Persimmon (*Diospyros kaki*), *J Hygienic Eng Des.* 4: 54-59.
20. Kayranli B (2011) Adsorption of textile dyes onto iron based waterworks sludge from aqueous solution: isotherm, kinetic and thermodynamic study. *Chemical Engineering Journal* 173:782–791.
21. Khalil, M.M.H., Ismail, E.H., Khaled, Z., Baghdad, E., Mohamed, D. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. *Arabian Journal of Chemistry*.

22. Kumari, P., Meena, A. (2020). Green synthesis of gold nanoparticles from *Lawsoniainermis* and its catalytic activities following the Langmuir-Hinshelwood mechanism. *Colloids Surf., A* 606, 12544.
23. Kuzucu FC, Kaynaş K. (2004). “Farklı Zamanlarda Hasat Edilen Trabzon Hurması (*Diospyros kaki* L.) Meyvelerinin Fizyolojik ve Kimyasal Yapılarında Meydana Gelen Değişmeler” Bahçe, 33 (1).
24. Mohammadi-Aghdam, S., Valinezhad-Saghezi, B., Mortazavi, Y., Qhoreishi, S.M. (2018). Modified Fe₃O₄/HAP magnetically nanoparticles as the carrier for ibuprofen: Adsorption and release study. *Drug Res.* 69, 93–99.
25. Mohammadzadeh, P., Shafiee Ardestani, M., Mortazavi-Derazkola, S., Bitarafan-Rajabi, A., Ghoreishi, S.M. (2019). PEG-Citrate dendrimer second generation: is this a good carrier for imaging agents In Vitro and In Vivo? *IET Nanobiotechnol.* 13, 560–564.
26. Mortazavi-Derazkola, S., Ebrahimzadeh, M.A., Amiri, O., Goli, H.R., Rafiei, A., Kardan, M., Salavati-Niasari, M. (2020). Facile green synthesis and characterization of *Crataegus microphylla* extractcapped silver nanoparticles (CME@Ag-NPs) and its potential antibacterial and anticancer activities against AGS and MCF-7 human cancer cells. *J. Alloy. Compd.* 820, 153186.
27. Onur, C. (1990). Trabzon Hurması. *Derim (Özel Sayısı)*, 7(1): 4-47.
28. Özcan, M. (2005). Trabzon Hurması Yetiştiriciliği. Hasad Yayınları, ISBN 9758377. 42, 6.
29. Parseker, Y., Uylaser, S.V., Yonak, S. (2008). Trabzon Hurmasının Bileşimi ve Besleyici Değeri. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, 21-23 Mayıs, Erzurum.
30. Piccin JS, Gomes CS, Feris LA, Gutierrez M (2012) Kinetics and isotherms of leather dye adsorption by tannery solid waste. *Chemical Engineering Journal* 183:30–38.
- Pushpamalini, T., Keerthana, M., Sangavi, R., Nagaraj, A., Kamaraj, P. (2021). Comparative analysis of green synthesis of TiO₂ nanoparticles using four different leaf extract. *Mater. Today: Proc.* 40, S180–S184.
31. Rajeshkumar, S., & Bharath, L. V. (2017). Mechanism of plant-mediated synthesis of silver nanoparticles—a review on biomolecules involved, characterisation and antibacterial activity. *Chemico-biological interactions*, 273, 219-227.
32. Rashmi, V., Prabhushankar, H.B., & Sanjay, K.R. (2021). *Centella asiatica* L. callus mediated biosynthesis of silver nanoparticles, optimization using central composite design, and study on their antioxidant activity. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 146, 515-529.

33. Roco, M. C. (2007). National Nanotechnology Initiative- Past, Present, Future. In: Handbook of Nanoscience, Engineering and Technology, Goddard III WA, Brenner DW, Lyshevski SE, Iafate GJ. Taylor & Francis, USA, pp. 3.1-3.21.
34. Rolim, W.R., Pelegrino, M.T., de Araujo Lima, B., Ferraz, L.S., Costa, F.N., Bernardes, J.S., Rodrigues, T., Brocchi, M., Seabra, A. B. (2019). Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: Characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity. *Appl. Surf. Sci.* 463, 66–74.
35. Sangaonkar, G.M., Pawar, K.D. (2018). *Garcinia indica* mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles with antibacterial and antioxidant activities. *Colloids Surf., B* 164, 210–217.
36. Sathishkumar, M., Sneha, K., Won, S.W., Cho, C.W., Kim, S. Yun, Y.S. (2009). Cinnamon zeylanicum bark extract and powder mediated green synthesis of nanocrystalline silver particles and its bactericidal activity. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 73, 2, 332-338.
37. Sinha, S.N., Paul, D. (2014). Eco-friendly Green Synthesis and Spectrophotometric Characterization of Silver Nanoparticles Synthesized using Some Common Indian Spices. *International Journal of Green and Herbal Chemistry* Vol.3, No.2, 401-408.
38. Şahin, M., & Gübbük, İ. H. (2019). Green synthesis of antioxidant silver and platinum nanoparticles using ginger and turmeric extracts and investigation of their catalytic activity. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, 6(3), 403-410.
39. Şahin, M. (2019). Antioksidan Gümüş Nanoparçacıkların Sentezlenmesi, Karakterizasyonu ve Kataliz Uygulamaları. *International Journal of Advances in Engineering and Pure Sciences*, 31, 75-83.
40. Yaman, K. (2012). Bitkisel Atıkların Değerlendirilmesi ve Ekonomik Önemi. *Kastamonu Üni., Orman Fakültesi Dergisi*, 12 (2): 339-348.
41. Yarahmadi, M., Maleki-Ghaleh, H., Mehr, M.E., Dargahi, Z., Rasouli, F., Siadati, M.H. (2021). Synthesis and characterization of Sr-doped ZnO nanoparticles for photocatalytic applications. *J. Alloy. Compd.* 853, 157000.
42. Yousaf, H., Mehmood, A., Ahmad, K.S., Raffi, M. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles and their applications as an alternative antibacterial and antioxidant agents. *Mater. Sci. Eng., C* 112, 110901.

15. Bölüm

Hastalıklarla İlişkili SNV'lerin Etki Mekanizmalarının Belirlenmesinde RiboSNitch Yaklaşımı

Sertaç ATALAY¹

¹ Öğr.Gör.Dr. Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı (NABİLTEM Tekirdağ, Türkiye. satalay@nku.edu.tr, ORCID: 0000-0003-4942-7729

Giriş

Bir organizmanın tüm DNA içeriği genom olarak adlandırılır. İnsanlar birbirlerinden farklı fenotipik özelliklere sahip olsalar da rastlantısal olarak seçilen iki insanın genom benzerliği %99'dan fazladır. Genomlar arasındaki farklılıklar, genetik varyasyonlardan kaynaklanır. Bu varyasyonlar, çeşitli fenotipik özellikler ve hastalıklar ile ilişkili olabileceği gibi işlevsizde olabilir (Alzu'bi vd., 2019). Genetik varyasyonlar, sekans varyasyonları ve yapısal varyasyonlar olarak iki gruba ayrılabilir. Yapısal varyasyonlar, kopya sayısı varyasyonu, inversiyon ve translokasyon olarak sınıflandırılır. Sekans varyasyonları ise insersiyon, delesyon, tek nükleotid varyasyonudur (SNV) (Brody, 2016). SNV'ler, genomun herhangi bir yerinde oluşabilir. Genin, 5' UTR, ekson, intron veya 3' UTR bölgesinde olabileceği gibi genler arasında da bulunabilir. Ekson bölgesindekiler, kodlanan SNV (cSNV) diğer bölgelerdekiler ise kodlanmayan SNV (ncSNV) olarak adlandırılır. Amino asit değişikliğine neden olan cSNV'ler yanlış anlamlı (nsSNV), amino asit değişikliğine neden olmayanlar ise eş anlamlı (sSNV)'dir. Hastalıklarla ilişkili nsSNV'lerin işlevsel etkileri, protein seviyesinde oldukça gelişmiş şekilde açıklanmaktadır (Waldern vd., 2021). Ancak, tüm genom ilişkilendirme çalışmaları insanlarda farklı hastalıklar ilgili binlerce ncSNV tanımladı. Bu varyantların, moleküler mekanizmaları nasıl etkilediklerinin belirlenmesi büyük zorluk teşkil etmektedir (L. Li vd., 2021; Steri vd., 2018). Araştırmacılar, genellikle bu etkileri DNA düzeyinde (transkripsiyon regülasyonu) açıklanma eğiliminde olsa da (Gamazon vd., 2018) günümüzde, hastalıklarla ilişkili ncSNV'lerin büyük bölümünün RNA seviyesinde etkili olduğu düşünülmektedir (Matt Halvorsen, 2014; K. M. Kutchko vd., 2015; Ritz vd., 2012). Memeli genomunun yaklaşık %1'i proteine kodlanırken, %85'inin RNA'ya kodlanması bu görüşü desteklemektedir (Rühle ve Stoll, 2016).

RNA, moleküler mekanizmaların düzenlenmesinde çok yönlü role sahiptir. Bu rol RNA'nın sekansına ve konformasyonuna bağlıdır (Hamada vd., 2016; Hu vd., 2016). RNA'nın tek sarmallı doğası, fonksiyonel rollerini yöneten çeşitli sekonder ve tersiyer yapılara katlanması için gereken plastisiteyi sağlar (Kwok vd., 2015). RNA sekonder yapısını oluşturan bilginin büyük kısmı, RNA sekansı içerisinde (Ganser vd., 2019; Wan vd., 2014). Sekans spesifik katlandıkları için SNV'lerin bu yapıyı bozarak hastalıklara neden olma potansiyeli vardır (Waldern vd., 2021; Chanin Tolson Woods ve Laederach, 2017). Halvorsen ve ark. (2010), mRNA'nın yanlış katlanmasına neden olan SNV'leri, riboSNitch olarak tanımladılar. Araştırmacılar, riboSNitch terimini oluştururken, bakterilerdeki riboswitch'lere gönderme yapmışlardır. Bakterilerde riboswitch'ler, ligandın varlığına veya yokluğuna göre farklı konformasyonlar

arasında geçiş yaparak gen ekspresyonu regüle ederler (Strobel vd., 2016). Halvorsen ve ark. (2010), riboSNitch'lerin mRNA'nın sekonder yapısında değişikliğe neden olarak benzer şekilde translasyonu etkilediklerini öne sürmüşlerdir (Matthew Halvorsen vd., 2010). Araştırmalarında, riboSNitch'leri tahmin eden SNPfold algoritmasını kullanarak, hiperferritinemi katarakt sendromu, β -talasemi, kıkırdak saç hipoplazisi, retinoblastom, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve hipertansiyon ile ilişkili riboSNitch'leri tanımladılar.

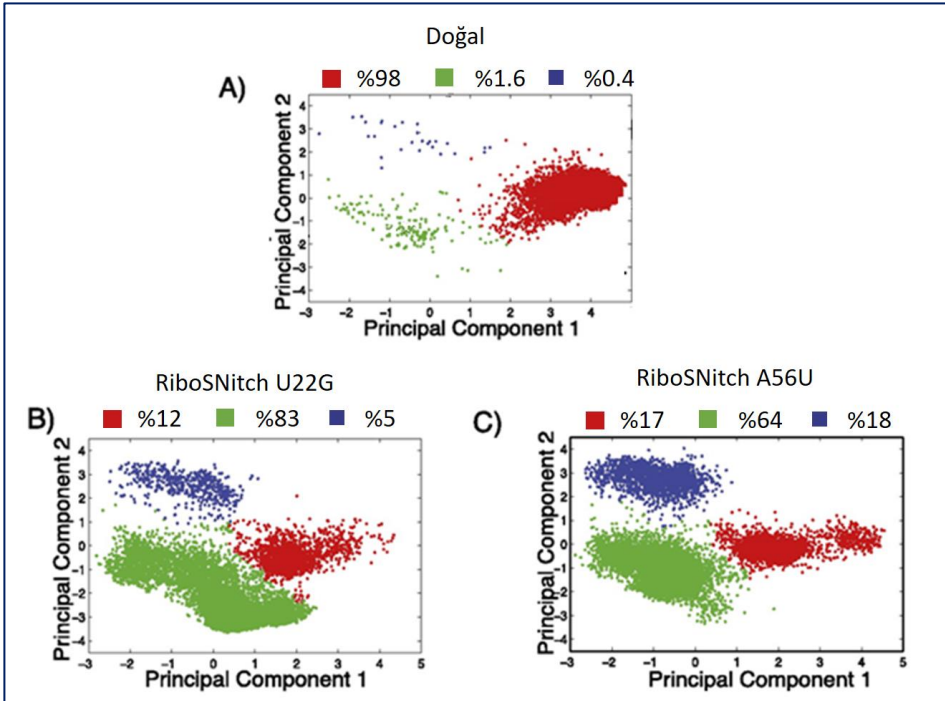
RiboSNitch'ler, uç birleştirme (splicing) (Andrews ve Moss, 2019; Ramya vd., 2022), RNA bağlayıcı protein (RBP) (Teng vd., 2020) ve miRNA bağlanması (Haas vd., 2012; Linnstaedt vd., 2018) gibi farklı moleküler mekanizmaları etkileyerek hastalıklara neden olabilir. Posttranskripsiyonel regülasyonda, RNA bağlayıcı proteinlerin (RBP) önemli rolü vardır (Sun vd., 2020). İnsan hücrelerinde, farklı işlevleri gerçekleştirmek için 3-7 nükleotid uzunluğunda motiflere bağlanarak, RNA ile etkileşime giren 1500'den fazla RBP tanımlanmıştır (Gerstberger vd., 2014). RBP'lerin RNA ile etkileşimleri, hem sekansa hem de sekonder yapıya bağlıdır. RiboSNitch'ler neden oldukları yapısal değişiklikler ile RBP bağlanmasını engelleyerek çeşitli kanser tiplerine neden olabilir (Teng vd., 2020). Splicing mekanizması da benzer şekilde sadece spesifik motiflere değil aynı zamanda RNA sekonder yapısına bağlıdır. RiboSNitch'ler, splicing mekanizmasını etkileyerek ekson bölgelerinin hatalı birleştirilmesine ve sonuç olarak fonksiyonel olmayan protein sentezine neden olabilir (Ramya vd., 2022). Bununla beraber, 3' UTR bölgesinde bulunan riboSNitch'ler, miRNA bağlanmasını etkileyerek gen regülasyonunu bozabilir (Linnstaedt vd., 2018). Son yıllarda yapılan araştırmalar riboSNitch'lerin uzun kodlanmayan RNA'ların (lncRNA) yapısını bozarak gen regülasyonuna etki edebileceği ve hastalıklara neden olabileceğini göstermiştir (Martens vd., 2021; Singh ve Kumar, 2022).

RNA sekonder yapısı ve riboSNitch'lerin Belirlenmesi

Tek iplikçikli hücrese RNA'nın katlanması, nükleotid dizisi belirler. RNA, AU, GC ve GU standart baz eşleşmeleri dışında, 25'ten fazla standart olmayan baz eşleşmesi gerçekleştirerek sekonder yapılar oluşturur (Zhang vd., 2020). RNA'nın işlevini uygun şekilde yerine getirmesinde sekonder yapısı, nükleotid dizisinden daha önemlidir. Homolog RNA'lar karşılaştırıldığında, sekansları birbirlerinden farklı olsa da aynı sekonder yapıyı gösterdikleri belirlenmiştir. Bu, sekonder yapının önemini gösteren değerli bir kanıttır (Mathews vd., 2010).

RNA sekonder yapıları, *in vivo* veya *in vitro* çözeltili ortamına, RBP'lerin veya ligandların varlığına, sıcaklık, pH ve iyon konsantrasyonu gibi parametrelere bağlı olarak değişebilir (Kwok vd., 2015; Sun vd., 2020; Wu ve D'Souza, 2020). Bu dinamik süreçte, aynı sekansa sahip her RNA, aynı şekilde katlanarak

homojen bir yapı birliği oluşturmaz. Aksine, RNA'ların büyük bölümü, farklı konformasyonlara sahip gruplar halinde bulunurlar (Georgakopoulos-Soares vd., 2022; Martin vd., 2012; Ritz vd., 2012, 2013). Bu nedenle, riboSNitch'leri araştırırken konformasyon grupları arasındaki oransal değişim dikkate alınmalıdır (H. Li ve Aviran, 2018; Ritz vd., 2012; Chanin T Woods vd., 2017) (Şekil 1). Bir riboSNitch varlığından bahsetmek için, en az iki farklı RNA konformasyonunun bulunması gerekmektedir. Dolayısıyla, RNA sekonder yapılarının doğru şekilde belirlenmesi, riboSNitch'lerin tanımlanması için temel gereksinimdir (Andrews ve Moss, 2019). Tüm riboSNitch'ler fonksiyonel değildir, moleküler mekanizmalara herhangi bir etkilerinin olup olmadığı belirlenmesi gerekir. Bunun için, konformasyon gruplarının yapısal benzerlik ve farklılıklar karşılaştırılmalı ve hangi grubun daha yaygın olduğu tespit edilmelidir (Chanin T Woods vd., 2017). RNA molekülleri, DNA, ncRNA veya proteinlere bağlanma yeteneğine sahip erişilebilir yapısal alanlara sahiptir (Martens vd., 2017). Bu moleküllerin, hedef RNA'ya bağlanma affinitesinin, hedef bölgenin erişilebilirliğine ve sekansına bağlı olduğu bilinmektedir (Solem vd., 2015). Hedef bölgelerin erişilebilirliğinin doğru şekilde tahmin edilmesi, bu mekanizmaların anlaşılmasında önemli rol oynar (Corley vd., 2015; K. M. Kutchko vd., 2015; Wan vd., 2014).



Şekil 1. Martin ve ark (2012), ferritin hafif zinciri (FLT) geninin (Gen ID:2512) mRNA 5' UTR yapılarını, temel bileşen analizi ile gruplandırdı. A' da görüldüğü üzere, doğal FLT mRNA'sı üç konformasyon grubu oluşturmaktadır ve kırmızı grup baskındır. B ve C'de riboSNitch U22G ve A56U'nun, yanlış katlanmış bölgelere sahip yeşil grubun baskınlığını arttırdığı görülmektedir. Bu iki riboSNitch, hiperferritinemi katarakt sendromu ile ilişkili bulunmuştur (Matthew Halvorsen vd., 2010). Bu şekil, Martin ve ark. (2012) ve Solem ve ark. (2015) makalelerinden uyarlanmıştır.

Günümüzde, RNA sekonder yapıları, deneysel veya hesaplamalı (*in silico*) olarak belirlenebilmektedir. X ışını kristalografisi (Reyes vd., 2009) ve nükleer manyetik rezonans (Scott ve Hennig, 2008), RNA yapısının belirlenmesinde kullanılan geleneksel metotlardır. Her ikisi de, bir baz çifti çözünürlüğünde bilgi verebilecek yüksek kapasiteye sahiptir. Ancak bu yöntemler, çok yüksek maliyetlidir ve başarı yüzdesi düşüktür (Hu vd., 2016; Ledda ve Aviran, 2018; Chanin T Woods vd., 2017). *In silico* ve deneysel yöntemlerde son yıllarda yaşanan gelişmeler, bu geleneksel kristalizasyon yöntemlerinden çok daha verimli sonuçlar elde etmemizi sağladı (H. Li ve Aviran, 2018; Martens vd., 2017). Uzun yıllardır jel elektroforezi kullanılarak yapılan enzimatik ve kimyasal prob yöntemlerinin yeni nesil dizilemeye (NGS) entegre edilmesiyle, RNA yapısının belirlenmesi önemli derecede hızlanmıştır (Wan vd., 2014; Zubradt vd., 2017). Bu metotlarda, RNA'nın bir nükleotidinin lokal stereokimyasına duyarlı, kimyasal reaktifler veya enzimler kullanılır. Amaç, hedeflenen nükleotidlerin kesilmesi veya kimyasal olarak modifiye edilmesi yolu ile reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonunun sonlandırılması veya mutasyon meydana gelmesidir. Sonuç olarak, ortaya çıkan cDNA'ların dizilenmesi ve karşılaştırılması ile çift oluşturmuş veya oluşturmamış nükleotidler belirlenir (Kwok, 2016). RNA yapısının paralel analizi (PARS) (Wan vd., 2013) gibi enzimatik yaklaşımlar veya dimetil sülfat (DMS) (Tijerina vd., 2007) ve primer uzatma ile analiz edilen 2'-hidroksil asilasyonu (SHAPE) (Loughrey vd., 2014) gibi kimyasal prob yöntemleri çift oluşturmuş veya oluşturmamış nükleotidler üzerinden, RNA yapısını belirleyen metotlardır. Bu metotların NGS ile kombinasyonu, transkriptom çapında RNA yapılarının karşılaştırılmasını mümkün kılmıştır (Martens vd., 2017).

PARS yöntemi (Wan vd., 2013), bir numunenin RNAaz V1 ve RNAaz S1 ile ayrı ayrı muamele edilmesine dayanır. Ayrı ayrı her iki enzimin uygulandığı örneklerden elde edilen cDNA sekanslanır ve her nükleodit için bir skor hesaplanır. Bu skorlar, özel algoritmalarda işlendikten sonra RNA sekonder yapısı tahmin edilir. Fragmentasyon sekanslama (Frag-Seq) metodunda (Underwood vd., 2010) ise genellikle eşleşmemiş bazları kesen nükleaz P1

enzimi kullanılır. Enzim uygulanmış ve uygulanmamış örnek sekansları karşılaştırılarak RNA yapısı tahmin edilir. Kimyasal prob yöntemleri, enzimatik yöntemlere göre daha yenidir ve daha iyi çözünürlük sunar. Ayrıca *in vivo* araştırmalar için uygundur. DMS metodu (Tijerina vd., 2007), DMS reaktifinin RNA'nın eşleşmemiş adenin ve sitozin bazlarının metilasyonunu değiştirmesine dayanır. Bu değişiklik reverse transkriptaz reaksiyonunun kesilmesine neden olur. Prob uygulanmış ve uygulanmamış örneklerinden elde edilen cDNA dizileri karşılaştırılarak baz başına eşleşme olasılıkları hesaplanır. Bu yöntemin yarattığı önemli fark, canlı hücrelerde de kullanılabilmesidir. DMS hücreye kolayca sızarak RNA yapısını değiştirebilmektedir. SHAPE metodu (Loughrey vd., 2014) temelde DMS'ye benzemektedir. RNA'yı modifiye ederek reverse transkripsiyon reaksiyonunu kesintiye uğratma temeline dayanır. Bu yöntemde, genellikle 1-metil-7-nitroizatoik anhidrit proplar kullanılır. DMS ile karşılaştırıldığında, dört bazdan herhangi birine bağlanma yeteneğinden dolayı daha yüksek çözünürlük sunmaktadır (Martens vd., 2017).

RNA sekonder yapısını *in silico* tahmin eden algoritmalar, genellikle karşılaştırmalı analizlere ve minimum serbest enerjilerin (MSE) hesaplanmasına dayanırlar. Karşılaştırılmalı analizlerde, çok sayıda homolog dizi hizalanarak evrimsel olarak korunan baz çiftleri (AU, CG, GU) belirlenir (Loughrey vd., 2014; Reuter ve Mathews, 2010) ve bu bilgiye dayanarak sekonder yapı tahmin edilir. MSE hesaplamaları kullanarak yapısal tahminlerini üreten algoritmalar ise en düşük MSE'ye sahip yapıyı en kararlı ve olası olarak kabul ederler (Andrews ve Moss, 2019; Mathews, 2006). Her RNA molekülü, stabilitesini korumak için çevre koşullarına göre yapısını ayarlamaya çalışır. Bunun için yapının, Gibbs serbest enerjisini (G) azaltılması gerekir. G'nin maksimum düzeyde indirgenmesi, stabil durum olarak tanımlanır ve MSE konformasyonu olarak adlandırılır (Loughrey vd., 2014). Ancak tek bir nükleotid değişiminin, RNA yapısı üzerine etkisinin belirlenmesinde MSE tabanlı yaklaşımlar yeterli değildir (Andrews ve Moss, 2019). Mutant ve doğal RNA sekonder yapılarının karşılaştırılmasında, RNA yapı topluluklarının belirlenmesinin daha iyi sonuç verir (Sabarinathan vd., 2013). Kısaca, en düşük MSE'ye sahip bir model öneren algoritmalar yerine, olası tüm yapıları gruplandırarak sunan algoritmalar riboSNitch belirlemek için daha uygundur (Miladi vd., 2020). riboSNitch'leri belirlemek için özel yazılmış algoritmalar (Churkin vd., 2011; Corley vd., 2015; Matthew Halvorsen vd., 2010; Lam vd., 2011; Shu vd., 2006; Waldispühl vd., 2009), genel olarak RNA sekonder yapısını tahmin eden algoritmalarından daha iyi performans gösterir. Bu algoritmalar, tek bir SNV'nin veya çoklu SNV'lerin yapı üzerine etkilerini tahmin edebilir.

Son yıllarda, RNA sekonder yapısını tahmin eden algoritmalara, derin öğrenme tekniklerine (Fu vd., 2022) dayanan yaklaşımlarda eklenmiştir. Biyolojik yapıların *in silico* tahmin edilmesi, her geçen gün daha yüksek doğruluğa ulaşsa da (Bugnon vd., 2022) hala deneysel yöntemler ile RNA yapısının belirlenmesinde daha güvenilirdir. Enerji modellemelerinin fizyolojik koşullar altında yapılamaması gibi kısıtlamalar ve yapıyı tahmin etmek için yazılan algoritmalarda kullanılan çeşitli varsayımlar nedeniyle, *in silico* yöntemlerin tahmin doğruluğu sınırlıdır (Andrews ve Moss, 2019).

Hastalıklar ile İlişkili RiboSNitch'ler

Hastalıkla ilişkili bir SNV, RNA yapı topluluklarında büyük bir değişikliğe neden olduğunda, hastalığın potansiyel bir nedeni olarak gösterilebilir. riboSNitch'ler her zaman hastalığa neden olmaz, aksine çoğu zaman etkisizdir. Bunu önemli bir kanıtı olarak, Wan ve ark. (2014) yaptığı çalışma gösterilebilir. Aynı aileden üç sağlıklı bireyde (anne, baba ve çocuk) transkriptomun sekonder yapısının belirlenmesi ile yaklaşık 2000 riboSNitch tanımlandı ve bunlardan 22 tanesinin hastalıklar ile ilişkili olduğu rapor edildi (Wan vd., 2014). Bir başka deyişle, incelenen tüm SNV'lerin yaklaşık %15'inin RNA yapısını değiştirdiğini belirlendi, ancak bunlarda %1.1'i hastalıklar ile ilişkiliydi. Bu durum, riboSNitch'lerin yaygın olduğunu ve çoğu zaman iyi huylu olduğunu düşündürmektedir (K. M. Kutchko vd., 2015). Halversen ve ark. (2010) ise daha önce hastalıklar ile ilişkili olduğu rapor edilmiş SNV'lerin riboSNitch olma potansiyelini değerlendirdikleri çalışmada, altı farklı hastalıkla (Hiperferritinemi Katarakt Sendromu, β -Talasemi, Kıkırdak-Saç Hipoplazisi, Retinoblastom, Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı ve Hipertansiyon) ile ilişkili olabilecek riboSNitch'leri rapor ettiler (Matthew Halvorsen vd., 2010). Benzer bir yaklaşımla yapılan bir başka çalışmada, meme kanseri taramasında patojen olduğu rapor edilen TP53 genindeki rs587782272 (Lang vd., 2020) ve beta talasemiye neden olduğu bilinen HBB genindeki rs34690599'un (Russo vd., 2019), splicing mekanizmasını etkileyen riboSNitch'ler olduğu, 3 farklı algoritma (SNPfold, rumuRNA, RNAsnp) kullanılarak tahmin edilmiştir (Ramya vd., 2022). Ramya ve ark. (2022) bu araştırmalarında, riboSNitch'lerin splisozom kompleksi ile doğrudan etkileşime girerek splicing işlemini regüle edebileceklerini varsayımlardır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, riboSNitch'lerin uzun kodlanmayan RNA'ların (lncRNA) yapısını değiştirerek hastalıklara neden olabileceğini göstermiştir (Martens vd., 2021). lncRNA'lar en az 200 nükleotid uzunluğundadır ve çeşitli insan hastalıkları ile ilişkili düzenleyici süreçlerin merkezinde yer alırlar (Martens vd., 2021; Singh ve Kumar, 2022). RNA

polimeraz II tarafından sentezlenmeleri, poliadenile olmaları ve splicing mekanizmaları bakımından mRNA'ya benzerler. Bazı lncRNA'lar RBP'ler ile kompleks oluşturarak komşu genlerin ekspresyonunun kontrol eder (Engreitz vd., 2016). lncRNA'nın sekonder yapısı RBP ile kompleks oluşturmasında önemlidir. RNA yapısında değişikliğe neden olacak SNV'ler, RBP ile kompleks oluşturmasını engelleyebilir. Bu durum gen ekspresyon seviyesini değiştirebileceği gibi lncRNA'nın rol oynadığı farklı moleküler mekanizmalarda da (çoğalma, farklılaşma, apoptoz gibi) aksaklığa neden olarak hastalılara neden olabilir (Singh ve Kumar, 2022). lncRNA'larda bulunan riboSNitch'lerin, rahim ağzı kanseri (Sharma Saha vd., 2016), kolorektal kanser (S. Li vd., 2016), aort anevrizması (Wang vd., 2017) ve dilate kardiyomiyopati (Martens vd., 2021) gelişimi ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür.

mRNA ve lncRNA gibi miRNA yapısını değiştiren SNV'lerin de hastalıklar ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir. SORL1 geninin alzheimer hastalığının gelişimi ile ilişkili olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Campion vd., 2019; Yin vd., 2015). SORL1 geninin posttranskripsiyonel regülasyonunda rol alan miRNA-1229 öncüsü üzerinde bulunan bir riboSNitch'in (rs2291418) alzheimer ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir (Ghanbari vd., 2016; Imperatore vd., 2020). miRNA'ların hedef motiflerini veya bu motiflerin sekonder yapılarını değiştiren SNV'ler de hastalıklara neden olabilir. Miller ve ark. (2014), TCF21 geninin 3' UTR'sindeki bir SNV'nin (rs12190287), miRNA-224'ün bağlanmasını etkilediğini ve koroner kalp hastalığı ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada, rs12190287 hem miRNA-224'ün hedef motifini değiştirmesi yönünden hem de mRNA'ya bağlanması için uygun olan sekonder yapıyı bozması yönünden etkili bulunmuştur.

RBP'ler RNA'ların transkripsiyonunu, metabolizmasını ve translasyonunu düzenlenmede önemli rol oynar. RBP'lerin RNA ile etkileşimi spesifik nükleotid dizileri ve sekonder yapısına bağlı olarak değişebilir (Glisovic vd., 2008; Wan vd., 2014; Zeng ve Bromberg, 2022). Popülasyon düzeyinde SNV verilerine dayanılarak araştırmalar, RBP bağlanma bölgelerinin nükleotid dizileri ve sekonder yapılarının genellikle korunduğunu göstermiştir (Zhang vd., 2020). SNV'lerin bu korunmuş yapıları bozarak hastalıklara neden olabileceği öne sürülmüştür (Sun vd., 2021; Wan vd., 2014).

Sonuç

Genetik araştırmaların en temel amacı, genotipik değişikliklerin fenotipi üzerindeki etkilerini belirlemektir. İnsan genomu, milyonlarca sekans varyantı içermektedir. Bunlardan hangilerinin fenotip veya hastalıklar üzerine etkili olduğunun bulunması uzun süredir araştırmacıların dikkatini çekmektedir.

Moleküler genetik alanındaki ilerlemeler, bir bireyin genomunu dizileme maliyetlerini azaltmış ve daha kolay hale getirmiştir. Böylece günümüzde, her bir genomda var olan varyantlar tanımlanabilmektedir. Tüm bu ilerlemelere rağmen hastalıklar ile ilişkili genetik varyasyonların tanımlanmasında önemli eksiklikler bulunmaktadır. Yoğun olarak, iyi tanımlanmış genlerin ekson veya promotör bölgelerinin araştırılması, hastalıkların ardında yatan genetik mekanizmaların aydınlatılmasında kısıtlayıcı bir yaklaşımdır (Bhartiya ve Scaria, 2016; Marian, 2020) ve tek başına karmaşık hastalıkları haritalamak için yetersiz olduğu açıktır (Steri vd., 2018). Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları, hastalıklar ile ilişkili SNV'lerin büyük çoğunluğu genomun kodlama yapmayan bölgelerinde bulunduğunu açığa çıkarmıştır (Bhartiya ve Scaria, 2016; Martin vd., 2012). İnsan hastalıklarının oluşumunda RNA yanlış katlanmalarının rolünü açığa çıkaran çalışmalar, genotip fenotip ilişkisinin belirlenmesinde önemli bir bakış açısı kazandırmıştır (Strobel vd., 2016). Fonksiyonel riboSNitch'lerin belirlenmesi, hastalıklar ile ilişkili moleküler mekanizmaların aydınlatılmasında önemli ilerlemeler sağlayabilir (Bhartiya ve Scaria, 2016).

RNA, genetik bilginin transferini gerçekleştiren basit işlevinin ötesinde birçok hücresel süreçte önemli roller alır (Quan vd., 2020; Wu ve D'Souza, 2020). Nükleotidleri arasındaki moleküler etkileşimler sonucu karmaşık yapılara katlanır (Miladi vd., 2020). Proteinlerden farklı olarak, aynı sekansa sahip RNA'lar farklı konformasyonlar oluşturabilirler (Wu ve D'Souza, 2020). Kodlanmayan birçok RNA ve mRNA'nın işlevi büyük ölçüde doğru katlanmalarına bağlıdır. RiboSNitch'ler, RNA'nın yanlış katlanmasına neden olarak onu işlevsiz hale getirebilir (Miladi vd., 2020; Mustoe vd., 2018). SNV'lerin, hastalıklara ve çeşitli çevresel faktörlere verilen yanıtlar gibi kritik süreçlerde rol oynadığı uzun yıllardır kabul görmüştür. Ancak SNV'lerin hangi moleküler mekanizmalar ile biyolojik süreçlere etki ettiği genellikle belirlenememiştir. RiboSNitch yaklaşımı, hastalıklar ile ilişkili moleküler mekanizmaların RNA seviyesinde aydınlatılmasına yardımcı olabilir (K. Kutchko, 2017; Marian, 2020).

KAYNAKLAR

1. Alzu'bi, A. A., Zhou, L., & Watzlaf, V. J. 2019. "Genetic variations and precision medicine". *Perspectives in health information management*, 16(Spring).
2. Andrews, R. J., & Moss, W. N. 2019. "Computational approaches for the discovery of splicing regulatory RNA structures". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1862(11-12), 194380.
3. Bhartiya, D., & Scaria, V. 2016. "Genomic variations in non-coding RNAs: structure, function and regulation". *Genomics*, 107(2-3), 59-68.
4. Brody, T. 2016. "Chapter 19—Biomarkers". *Clinical Trials (Second Edition)*; Brody, T., Ed.; Academic Press: Boston, MA, USA, 377-419.
5. Bugnon, L., Edera, A. A., Prochetto, S., Gerard, M., Raad, J., Fenoy, E., Rubiolo, M., Chorostecki, U., Gabaldón, T., & Ariel, F. 2022. "Secondary structure prediction of long noncoding RNA: review and experimental comparison of existing approaches". *Briefings in Bioinformatics*, 23(4), bbac205.
6. Champion, D., Charbonnier, C., & Nicolas, G. 2019. "SORL1 genetic variants and Alzheimer disease risk: a literature review and meta-analysis of sequencing data". *Acta neuropathologica*, 138(2), 173-186.
7. Churkin, A., Gabdank, I., & Barash, D. 2011. "The RNAmute web server for the mutational analysis of RNA secondary structures". *Nucleic acids research*, 39(suppl_2), W92-W99.
8. Corley, M., Solem, A., Qu, K., Chang, H. Y., & Laederach, A. 2015. "Detecting riboSNitches with RNA folding algorithms: a genome-wide benchmark". *Nucleic acids research*, 43(3), 1859-1868.
9. Engreitz, J. M., Haines, J. E., Perez, E. M., Munson, G., Chen, J., Kane, M., McDonel, P. E., Guttman, M., & Lander, E. S. 2016. "Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing". *Nature*, 539(7629), 452-455.
10. Fu, L., Cao, Y., Wu, J., Peng, Q., Nie, Q., & Xie, X. 2022. "UFold: fast and accurate RNA secondary structure prediction with deep learning". *Nucleic acids research*, 50(3), e14-e14.
11. Gamazon, E. R., Segrè, A. V., Van De Bunt, M., Wen, X., Xi, H. S., Hormozdiari, F., Ongen, H., Konkashbaev, A., Derks, E. M., & Aguet, F. 2018. "Using an atlas of gene regulation across 44 human tissues to inform complex disease-and trait-associated variation". *Nature genetics*, 50(7), 956-967.

12. Ganser, L. R., Kelly, M. L., Herschlag, D., & Al-Hashimi, H. M. 2019. "The roles of structural dynamics in the cellular functions of RNAs". *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(8), 474-489.
13. Georgakopoulos-Soares, I., Parada, G. E., & Hemberg, M. 2022. "Secondary structures in RNA synthesis, splicing and translation". *Computational and Structural Biotechnology Journal*.
14. Gerstberger, S., Hafner, M., & Tuschl, T. 2014. "A census of human RNA-binding proteins". *Nature Reviews Genetics*, 15(12), 829-845.
15. Ghanbari, M., Ikram, M. A., De Looper, H. W., Hofman, A., Erkeland, S. J., Franco, O. H., & Dehghan, A. 2016. "Genome-wide identification of microRNA-related variants associated with risk of Alzheimer's disease". *Scientific reports*, 6(1), 1-9.
16. Glisovic, T., Bachorik, J. L., Yong, J., & Dreyfuss, G. 2008. "RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation". *FEBS letters*, 582(14), 1977-1986.
17. Haas, U., Sczakiel, G., & Laufer, S. 2012. "MicroRNA-mediated regulation of gene expression is affected by disease-associated SNPs within the 3'-UTR via altered RNA structure". *RNA biology*, 9(6), 924-937.
18. Halvorsen, M. (2014). *Disease associated mutations and functional variants that significantly disrupt RNA structure*. The University of North Carolina at Chapel Hill,
19. Halvorsen, M., Martin, J. S., Broadaway, S., & Laederach, A. 2010. "Disease-associated mutations that alter the RNA structural ensemble". *PLoS genetics*, 6(8), e1001074.
20. Hamada, M., Ono, Y., Kiryu, H., Sato, K., Kato, Y., Fukunaga, T., Mori, R., & Asai, K. 2016. "Rtools: a web server for various secondary structural analyses on single RNA sequences". *Nucleic acids research*, 44(W1), W302-W307.
21. Hu, X., Wu, Y., Lu, Z. J., & Yip, K. Y. 2016. "Analysis of sequencing data for probing RNA secondary structures and protein-RNA binding in studying posttranscriptional regulations". *Briefings in Bioinformatics*, 17(6), 1032-1043.
22. Imperatore, J. A., Then, M. L., McDougal, K. B., & Mihailescu, M. R. 2020. "Characterization of a G-quadruplex structure in pre-miRNA-1229 and in its Alzheimer's disease-associated variant rs2291418: implications for miRNA-1229 maturation". *International journal of molecular sciences*, 21(3), 767.

23. Kutchko, K. 2017. "From Neurons to Nucleic Acids: Spatio-temporal Emergent Behaviors of Complex Biological Systems".
24. Kutchko, K. M., Sanders, W., Ziehr, B., Phillips, G., Solem, A., Halvorsen, M., Weeks, K. M., Moorman, N., & Laederach, A. 2015. "Multiple conformations are a conserved and regulatory feature of the RB1 5' UTR". *Rna*, 21(7), 1274-1285.
25. Kwok, C. K. 2016. "Dawn of the in vivo RNA structure and interactome". *Biochemical Society Transactions*, 44(5), 1395-1410.
26. Kwok, C. K., Tang, Y., Assmann, S. M., & Bevilacqua, P. C. 2015. "The RNA structure: transcriptome-wide structure probing with next-generation sequencing". *Trends in biochemical sciences*, 40(4), 221-232.
27. Lam, E., Kam, A., & Waldispühl, J. 2011. "corRna: a web server for predicting multiple-point deleterious mutations in structural RNAs". *Nucleic acids research*, 39(suppl_2), W160-W166.
28. Lang, G.-T., Shi, J.-X., Huang, L., Cao, A.-Y., Zhang, C.-H., Song, C.-G., Zhuang, Z.-G., Hu, X., Huang, W., & Shao, Z.-M. 2020. "Multiple cancer susceptible genes sequencing in BRCA-negative breast cancer with high hereditary risk". *Annals of Translational Medicine*, 8(21).
29. Ledda, M., & Aviran, S. 2018. "PATTERN: transcriptome-wide search for functional RNA elements via structural data signatures". *Genome biology*, 19(1), 1-18.
30. Li, H., & Aviran, S. 2018. "Statistical modeling of RNA structure profiling experiments enables parsimonious reconstruction of structure landscapes". *Nature communications*, 9(1), 1-13.
31. Li, L., Huang, K.-L., Gao, Y., Cui, Y., Wang, G., Elrod, N. D., Li, Y., Chen, Y. E., Ji, P., & Peng, F. 2021. "An atlas of alternative polyadenylation quantitative trait loci contributing to complex trait and disease heritability". *Nature genetics*, 53(7), 994-1005.
32. Li, S., Hua, Y., Jin, J., Wang, H., Du, M., Zhu, L., Chu, H., Zhang, Z., & Wang, M. 2016. "Association of genetic variants in lncRNA H19 with risk of colorectal cancer in a Chinese population". *Oncotarget*, 7(18), 25470.
33. Linnstaedt, S. D., Riker, K. D., Rueckeis, C. A., Kutchko, K. M., Lackey, L., McCarthy, K. R., Tsai, Y.-H., Parker, J. S., Kurz, M. C., & Hendry, P. L. 2018. "A functional riboSNitch in the 3' untranslated region of FKBP5 alters microRNA-320a binding efficiency and mediates vulnerability to chronic post-traumatic pain". *Journal of neuroscience*, 38(39), 8407-8420.
34. Loughrey, D., Watters, K. E., Settle, A. H., & Lucks, J. B. 2014. "SHAPE-Seq 2.0: systematic optimization and extension of high-throughput

- chemical probing of RNA secondary structure with next generation sequencing". *Nucleic acids research*, 42(21), e165-e165.
35. Marian, A. J. 2020. "Clinical interpretation and management of genetic variants". *Basic to Translational Science*, 5(10), 1029-1042.
 36. Martens, L., Rühle, F., & Stoll, M. 2017. "LncRNA secondary structure in the cardiovascular system". *Non-coding RNA research*, 2(3-4), 137-142.
 37. Martens, L., Rühle, F., Witten, A., Meder, B., Katus, H. A., Arbustini, E., Hasenfuß, G., Sinner, M. F., Kääh, S., & Pankuweit, S. 2021. "A genetic variant alters the secondary structure of the lncRNA H19 and is associated with dilated cardiomyopathy". *RNA biology*, 18(sup1), 409-415.
 38. Martin, J. S., Halvorsen, M., Davis-Neulander, L., Ritz, J., Gopinath, C., Beauregard, A., & Laederach, A. 2012. "Structural effects of linkage disequilibrium on the transcriptome". *Rna*, 18(1), 77-87.
 39. Mathews, D. H. 2006. "Revolutions in RNA secondary structure prediction". *Journal of molecular biology*, 359(3), 526-532.
 40. Mathews, D. H., Moss, W. N., & Turner, D. H. 2010. "Folding and finding RNA secondary structure". *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(12), a003665.
 41. Miladi, M., Raden, M., Diederichs, S., & Backofen, R. 2020. "MutaRNA: analysis and visualization of mutation-induced changes in RNA structure". *Nucleic acids research*, 48(W1), W287-W291.
 42. Miller, C. L., Haas, U., Diaz, R., Leeper, N. J., Kundu, R. K., Patlolla, B., Assimes, T. L., Kaiser, F. J., Perisic, L., & Hedin, U. 2014. "Coronary heart disease-associated variation in TCF21 disrupts a miR-224 binding site and miRNA-mediated regulation". *PLoS genetics*, 10(3), e1004263.
 43. Mustoe, A. M., Corley, M., Laederach, A., & Weeks, K. M. (2018). Messenger RNA structure regulates translation initiation: a mechanism exploited from bacteria to humans. In (Vol. 57, pp. 3537-3539): ACS Publications.
 44. Quan, L., Cai, L., Chen, Y., Mei, J., Sun, X., & Lyu, Q. 2020. "Developing parallel ant colonies filtered by deep learned constrains for predicting RNA secondary structure with pseudo-knots". *Neurocomputing*, 384, 104-114.
 45. Ramya, G., Mitra, A., & Vinod, P. 2022. "Predicting functional riboSNitches in the context of alternative splicing". *Gene*, 837, 146694.
 46. Reuter, J. S., & Mathews, D. H. 2010. "RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis". *BMC bioinformatics*, 11(1), 1-9.
 47. Reyes, F. E., Garst, A. D., & Batey, R. T. 2009. "Strategies in RNA crystallography". *Methods in enzymology*, 469, 119-139.

48. Ritz, J., Martin, J. S., & Laederach, A. (2012). *Evaluating our ability to predict the structural disruption of RNA by SNPs*. Paper presented at the BMC genomics.
49. Ritz, J., Martin, J. S., & Laederach, A. 2013. "Evolutionary evidence for alternative structure in RNA sequence co-variation". *PLoS computational biology*, 9(7), e1003152.
50. Russo, C. D., Cesta, A., Longo, S., Barone, M. A., Cima, A., Mesoraca, A., Sparacino, D., Viola, A., & Giorlandino, C. 2019. "Validation of extensive next-generation sequencing method for monogenic disorder analysis on cell-free fetal DNA: noninvasive prenatal diagnosis". *The Journal of Molecular Diagnostics*, 21(4), 572-579.
51. Rühle, F., & Stoll, M. 2016. "Long non-coding RNA databases in cardiovascular research". *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 14(4), 191-199.
52. Scott, L. G., & Hennig, M. 2008. "RNA structure determination by NMR". *Bioinformatics*, 29-61.
53. Sharma Saha, S., Roy Chowdhury, R., Mondal, N. R., Chakravarty, B., Chatterjee, T., Roy, S., & Sengupta, S. 2016. "Identification of genetic variation in the lncRNA HOTAIR associated with HPV16-related cervical cancer pathogenesis". *Cellular oncology*, 39(6), 559-572.
54. Shu, W., Bo, X., Liu, R., Zhao, D., Zheng, Z., & Wang, S. 2006. "RDMAS: a web server for RNA deleterious mutation analysis". *BMC bioinformatics*, 7(1), 1-7.
55. Singh, M., & Kumar, S. 2022. "Effect of Single Nucleotide Polymorphisms on the structure of long noncoding RNAs and their interaction with RNA Binding Proteins". *bioRxiv*.
56. Solem, A. C., Halvorsen, M., Ramos, S. B., & Laederach, A. 2015. "The potential of the riboSNitch in personalized medicine". *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 6(5), 517-532.
57. Steri, M., Idda, M. L., Whalen, M. B., & Orrù, V. 2018. "Genetic variants in mRNA untranslated regions". *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 9(4), e1474.
58. Strobel, E. J., Watters, K. E., Loughrey, D., & Lucks, J. B. 2016. "RNA systems biology: uniting functional discoveries and structural tools to understand global roles of RNAs". *Current opinion in biotechnology*, 39, 182-191.
59. Sun, L., Xu, K., Huang, W., Yang, Y. T., Li, P., Tang, L., Xiong, T., & Zhang, Q. C. 2021. "Predicting dynamic cellular protein–RNA interactions

- by deep learning using in vivo RNA structures". *Cell research*, 31(5), 495-516.
60. Sun, L., Xu, K., Huang, W., Yang, Y. T., Tang, L., Xiong, T., & Zhang, Q. C. 2020. "Predicting dynamic cellular protein-RNA interactions using deep learning and in vivo RNA structure". *bioRxiv*.
61. Teng, H., Wei, W., Li, Q., Xue, M., Shi, X., Li, X., Mao, F., & Sun, Z. 2020. "Prevalence and architecture of posttranscriptionally impaired synonymous mutations in 8,320 genomes across 22 cancer types". *Nucleic acids research*, 48(3), 1192-1205.
62. Tijerina, P., Mohr, S., & Russell, R. 2007. "DMS footprinting of structured RNAs and RNA-protein complexes". *Nature protocols*, 2(10), 2608-2623.
63. Underwood, J. G., Uzilov, A. V., Katzman, S., Onodera, C. S., Mainzer, J. E., Mathews, D. H., Lowe, T. M., Salama, S. R., & Haussler, D. 2010. "FragSeq: transcriptome-wide RNA structure probing using high-throughput sequencing". *Nature methods*, 7(12), 995-1001.
64. Waldern, J. M., Kumar, J., & Laederach, A. 2021. "Disease-associated human genetic variation through the lens of precursor and mature RNA structure". *Human Genetics*, 1-14.
65. Waldspühl, J., Devadas, S., Berger, B., & Clote, P. 2009. "RNAmutants: a web server to explore the mutational landscape of RNA secondary structures". *Nucleic acids research*, 37(suppl_2), W281-W286.
66. Wan, Y., Qu, K., Ouyang, Z., & Chang, H. Y. 2013. "Genome-wide mapping of RNA structure using nuclease digestion and high-throughput sequencing". *Nature protocols*, 8(5), 849-869.
67. Wan, Y., Qu, K., Zhang, Q. C., Flynn, R. A., Manor, O., Ouyang, Z., Zhang, J., Spitale, R. C., Snyder, M. P., & Segal, E. 2014. "Landscape and variation of RNA secondary structure across the human transcriptome". *Nature*, 505(7485), 706-709.
68. Wang, Y., Huang, H.-Y., Bian, G.-L., Yu, Y.-S., Ye, W.-X., Hua, F., Chen, Y.-H., & Shen, Z.-Y. 2017. "A functional variant of SMAD4 enhances thoracic aortic aneurysm and dissection risk through promoting smooth muscle cell apoptosis and proteoglycan degradation". *EBioMedicine*, 21, 197-205.
69. Woods, C. T., Lackey, L., Williams, B., Dokholyan, N. V., Gotz, D., & Laederach, A. 2017. "Comparative visualization of the RNA suboptimal conformational ensemble in vivo". *Biophysical journal*, 113(2), 290-301.
70. Woods, C. T., & Laederach, A. 2017. "Classification of RNA structure change by 'gazing' at experimental data". *Bioinformatics*, 33(11), 1647-1655.

71. Wu, M. T.-P., & D'Souza, V. 2020. "Alternate RNA structures". *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 12(1), a032425.
72. Yin, R.-H., Yu, J.-T., & Tan, L. 2015. "The role of SORL1 in Alzheimer's disease". *Molecular neurobiology*, 51(3), 909-918.
73. Zeng, Z., & Bromberg, Y. 2022. "Inferring Potential Cancer Driving Synonymous Variants". *Genes*, 13(5), 778.
74. Zhang, Z., Xiong, P., Zhang, T., Wang, J., Zhan, J., & Zhou, Y. 2020. "Accurate inference of the full base-pairing structure of RNA by deep mutational scanning and covariation-induced deviation of activity". *Nucleic acids research*, 48(3), 1451-1465.
75. Zubradt, M., Gupta, P., Persad, S., Lambowitz, A. M., Weissman, J. S., & Rouskin, S. 2017. "DMS-MaPseq for genome-wide or targeted RNA structure probing in vivo". *Nature methods*, 14(1), 75-82.

