

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**(DOKTORA TEZİ)**

**BİYOKONTROL AJANI OLARAK *TRICHODERMA*  
MİKROPROPAGÜLLERİNİN KATI KÜLTÜR VE  
STATİK KÜLTÜR KOŞULLARINDA BİYOREAKTÖR  
ÜRETİMLERİNİN İNCELENMESİ**

**Işık ÇOBAN**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Sayit SARGIN**

**Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu : 612.01.00**

**Sunuş Tarihi : 10.02.2015**

**Bornova-İZMİR**

**2015**



Işık ÇOBAN tarafından Doktora tezi olarak sunulan “**Biyokontrol Ajanı Olarak *Trichoderma* Mikropropagüllerinin Katı Kültür ve Statik Kültür Koşullarında Biyoreaktör Üretimlerinin İncelenmesi**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’ nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 10/02/2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**İmza**

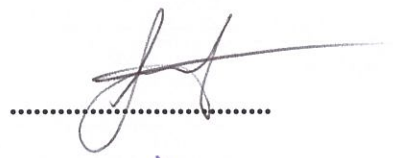
**Jüri Başkanı : Doç. Dr. Sayıt SARGIN**



**Raportör Üye : Prof. Dr. Murat ELİBOL**



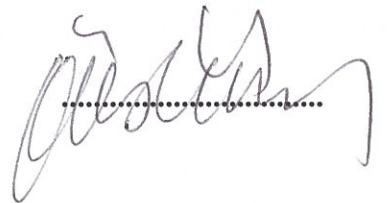
**Üye : Prof. Dr. İhsan YAŞA**



**Üye : Yrd. Doç. Dr. Seval DAĞBAĞLI**



**Üye : Yrd. Doç. Dr. Özlem AYTEKİN**





## EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**Biyokontrol Ajanı Olarak *Trichoderma* Mikropropagüllerinin Katı Kültür ve Statik Kültür Koşullarında Biyoreaktör Üretimlerinin İncelenmesi**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

10/02/2015

İmzası



Adı-Soyadı

Işık ÇOBAN



**ÖZET****BİYOKONTROL AJANI OLARAK *TRICHODERMA*  
MİKROPROPAGÜLLERİNİN KATI KÜLTÜR VE STATİK KÜLTÜR  
KOŞULLARINDA BİYOREAKTÖR ÜRETİMLERİNİN İNCELENMESİ****ÇOBAN, Işık**

Doktora Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Sayıt SARGIN

Şubat 2015, 138 sayfa

Bu çalışmada, Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Endüstriyel Mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilip geliştirilen *Trichoderma harzianum* EGE-K38 suşu kullanılarak katı kültür fermentasyonu ile ağırlıkça 3:2 oranında buğday kepeği - malt çimi karışımından oluşan besi ortamında, tasarımı tarafımızdan yapılmış olan ve ülkemiz koşullarında imal edilen yatay karıştırmalı biyoreaktörde ve yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde mikropropagül üretimi için ortam koşulları optimize edilmiştir. Ayrıca yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde, 8 g/L glukoz içeren Modifiye Czapek Ortamı (MCM)' nda statik sıvı kültürde de mikropropagül üretimi için ortam koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmalarında katı kültür fermentasyonu için besi ortamı nem içeriği, üretim ortamının sıcaklığı, havalandırma debisi, inokulumdaki spor konsantrasyonu, inokulum hacmi, substrat yatak kalınlığı, aşı olarak spor ya da misel kullanımının etkileri, basınç uygulamanın etkileri ve sterilizasyonun üretime etkileri, statik sıvı kültürde ise sıcaklık, hava debisi aşı olarak spor ya da misel kullanımının etkileri, inokulum spor konsantrasyonu, inokulum hacmi, besi ortamı hacmi, basınç uygulamanın etkileri ve de sterilizasyonun üretime etkileri ayrı ayrı incelenmiştir. En yüksek mikropropagül sayıları katı kültür fermentasyonu ile yatay karıştırmalı biyoreaktörde  $1.1 \pm 0.1 \times 10^9$  kob/mL, yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde ise  $3.0 \pm 0.6 \times 10^9$  kob/mL

bulunmuştur. Statik sıvı kültürde ise  $5.2 \pm 0.2 \times 10^9$  kob/mL olarak elde edilmiştir. Çalışmada daha sonra, üretilen mikropropagüllerin yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde farklı sıcaklıklarda kurutulması işlemi gerçekleştirilmiştir ve kurutma sonunda katı kültür fermentasyonunda % 40 verimle, statik sıvı kültürde ise % 23.3 verimle toz formülasyon elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyokontrol, *Trichoderma*, optimizasyon, katı ve statik sıvı kültür fermentasyonu, tepsili ve yatay karıştırmalı biyoreaktör



**ABSTRACT****INVESTIGATION OF *TRICHODERMA* MICROPROPAGULE PRODUCTION AS A BIOCONTROL AGENT IN SOLID STATE AND STATIC CULTURE BIOREACTOR CONDITIONS****ÇOBAN, Işık**

Ph.D. in Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sayıt SARGIN

February 2015, 138 pages

In this study, optimization of micropropagule production conditions was studied for solid state fermentation in both horizontal drum bioreactor and tray bioreactor with wheat bran - malt lawn mixture (3:2 (w/w)) as substrate for *Trichoderma harzianum* EGE-K38 strain that was isolated and developed in Industrial Microbiology Laboratory at Ege University, Department of Bioengineering. Moreover, optimization of micropropagule production conditions for static culture was achieved by Modified Czapek Medium(MCM) containing 8 g/L glucose in tray bioreactor. During optimization studies for solid state fermentation, moisture content of solid substrate, fermentation temperature, air flow rate, inoculum spore concentration, inoculation volume, substrate bed thickness, the effect of using spores or mycelia containing agar pieces as inoculum, pressure pulsation and the effect of bioreactor sterilization before fermentation, for static culture, fermentation temperature, air flow rate, the effect of using spores or mycelia containing agar pieces as inoculum, inoculum spore concentration, inoculation volume, volume of liquid medium, pressure pulsation and the effect of bioreactor sterilization before fermentation were determined individually. In solid state fermentation the highest micropropagule number was achieved by horizontal drum bioreactor and tray bioreactor as  $1.1\pm 0.1\times 10^9$  cfu/mL and  $3.0\pm 0.6\times 10^9$

cfu/mL respectively. However, in static culture fermentation it was found as  $5.2 \pm 0.2 \times 10^9$  cfu/mL by tray bioreactor. In the study, consecutive drying processes at different temperature values were carried out by tray bioreactor at the end of fermentations and the highest drying yield achieved after drying of solid state fermentation media was 40.0 % and after drying of micropropagules produced by static culture was 23.3 % respectively.

**Keywords:** Biocontrol, *Trichoderma*, optimization, solid state and static culture fermentation, tray and horizontal drum bioreactor

## TEŞEKKÜR

Bu tezin meydana geliş sürecinde tez konusunun belirlenmesinden yazımına kadar her konuda yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. Sayıt SARGIN' a, yine desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen Prof. Dr. Rengin ELTEM'e ve ekibine, tez çalışmam sırasında her zaman değerli vakitlerini ayırarak beni dinleyen ve çalışmanın yürütülmesinde beni yönlendiren tez izleme komitesi üyelerim Prof. Dr. Murat ELİBOL ve Prof. Dr. İhsan YAŞA' ya, çalışmalarım sırasında her zaman yardımına koşan ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim Araş. Gör. Dr. Emek ASLAN'a, Araş. Gör. Mehmet Özgün ÖZEN' e, Yrd. Doç. Dr. Özlem AYTEKİN' e, Araş. Gör. Dr. Müge İŞLETEN HOŞOĞLU' na, Öğr. Gör. Cem YALAZA'ya ve başta biyoproses laboratuvarı ekibi olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma, çalışmalarım sırasında deneyimlerinden faydalandığım Yüksek Biyomühendis Can Uraz KARA' ya ve ayrıca tez çalışması sırasında emekleri geçen tüm stajyer arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmasının yürütülmesini 2010/BİL/022 nolu projeye destekleyen Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Araştırma Fonu' na ve çalışmanın yürütülmesi için gerekli imkanı sağlayan E.Ü. Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'ne, çalışmalarımı ve beni maddi olarak destekleyen YÖK Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı' na ve İstanbul Medeniyet Üniversitesi' ne destekleri için teşekkür ederim. Ayrıca TÜBİTAK 2211 Yurtiçi Doktora Burs Programı'na, sağladıkları maddi destekten ötürü teşekkür ederim. Çalışmamızda kullanılan katı besi ortamı bileşenlerinin sağlanmasındaki katkıları nedeniyle Kadıoğlu Değirmencilik AŞ' ye ve Türk Tuborg Bira ve Malt Sanayii A.Ş. İzmir fabrikasına teşekkür ederim.

Son olarak ta her zaman yanımda olduklarını bildiğim aileme teşekkür ederim.

İyi ki varsınız...

**Işık ÇOBAN**

**İzmir – 2015**



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	ix
TEŞEKKÜR .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxix
<b>1 GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2 LİTERATÜR ÖZETİ .....</b>	<b>4</b>
2.1 Biyolojik Kontrol .....	4
2.2 Biyolojik Kontrol Ajanları .....	6
2.3 Fungal Biyolojik Kontrol Ajanları .....	7
2.4 Fungal Biyolojik Kontrol Ajanları Olarak <i>Trichoderma</i> Türleri ve Özellikleri.....	7
2.5 <i>Trichoderma</i> Türlerinin Biyolojik Kontrol Mekanizmaları .....	9
2.5.1 Rekabete dayalı mekanizma.....	10
2.5.2 Antibiosis .....	10
2.5.3 Mikoparazitizm .....	11
2.6 <i>Trichoderma</i> Türlerinin Üretimi ve Mikrobiyal Propagüller .....	11
2.7 <i>Trichoderma</i> Türlerinde Biyokütle Üretim Stratejileri .....	12
2.7.1 Katı kültür fermentasyonu ile biyokütle üretimi .....	14
2.7.2 Sıvı kültür ortamında biyokütle üretimi .....	21
2.8 Katı Kültür ve Statik Sıvı Kültür Fermentasyonunda Ölçek Büyütme .....	23
2.8.1 Reaktör tasarım parametreleri .....	23
2.8.2 Katı kültür fermentasyonu için biyoreaktörler .....	24
2.8.3 Statik sıvı kültür fermentasyonu için biyoreaktörler.....	27
2.8.4 Mikrobiyal biyokütle ölçüm yöntemleri .....	29
2.9 <i>Trichoderma</i> Türü Biyolojik Kontrol Ajanlarının Ticarileşmesindeki Kısıtlar .....	31
2.10 <i>Trichoderma</i> Türlerinin Pazar Potansiyeli ve Ticari <i>Trichoderma</i> Biyopreparatları.....	31
2.11 Formülasyon.....	32

## İÇİNDEKİLER(devam)

	<u>Sayfa</u>
2.11.1 Kurutma.....	34
2.11.2 Depolama .....	36
<b>3 MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>	<b>37</b>
3.1 Materyal.....	37
3.1.1 Mikroorganizma .....	37
3.1.2 Kullanılan besiyerleri, çözeltiler ve kimyasallar .....	37
3.1.3 Kullanılan cihazlar.....	39
3.2 Yöntem .....	42
3.2.1 <i>Trichoderma harzianum</i> EGE-K38 spor solüsyonunun hazırlanması.....	42
3.2.2 Katı kültürde mikropropagül üretim koşullarının optimizasyonu .....	43
3.2.3 Statik sıvı kültürde mikropropagül üretim koşullarının optimizasyonu .....	51
3.2.4 Üretim koşulları ve örnek alma .....	54
3.2.5 Üretim sonrası işlemler.....	55
3.2.6 <i>Trichoderma harzianum</i> mikropropagüllerinin kurutulması.....	56
3.2.7 Kurutulan <i>Trichoderma harzianum</i> mikropropagüllerinin raf ömürlerinin belirlenmesi .....	57
3.2.8 Metabolik gaz dengesi metodu ile kinetik verilerin ölçümü .....	57
<b>4 BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>61</b>
4.1 Mikropropagül Üretim Koşullarının Optimizasyonu .....	61
4.1.1 Katı kültürde mikropropagül üretim koşullarının optimizasyonu .....	61
4.1.2 Statik Sıvı Kültürde Mikropropagül Üretim Koşullarının Optimizasyonu .	96
4.2 <i>Trichoderma harzianum</i> mikropropagüllerinin kurutulması.....	104
4.2.1 Katı kültür fermentasyonu ile üretilen mikropropagüllerin kurutulması... 104	104
4.2.2 Statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretilen mikropropagüllerin kurutulması.....	110
4.3 <i>Trichoderma harzianum</i> mikropropagüllerinin kurutma sonrası raf ömürlerinin belirlenmesi.....	116
4.4 Metabolik gaz dengesi metodu ile kinetik verilerin ölçümü .....	117
<b>5 SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>123</b>
<b>TEŞEKKÜR .....</b>	<b>127</b>

**İÇİNDEKİLER(devam)**

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>KAYNAKLAR DİZİNİ .....</b>	<b>128</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>138</b>





## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. <i>Trichoderma</i> miselerindeki hifler ve bu hiflerin farklılaşmasıyla oluşan sporlar (Cann, 2010).....	12
2.4. Tepsili biyoreaktörlerde kütle ve ısı transferi olayları (Mitchell et al.,2000).....	26
2.5. Katı kültür fermentasyonu için kolon tipi biyoreaktörün şematik gösterimi (Pandey et al., 2001).....	27
2.6. Statik sıvı kültürde kullanılan cam şişe üretim sistemi (Ainsworth et al.,1947).....	28
2.7. Çok tabakalı statik biyoreaktörün şematik diagramı: (1) Küp şekilli kap; (2) arayüzey paravanı; (3) yan ayırıcılar; (4) inokulasyon ve örnek hattı (Tang and Zhong, 2003).....	28
3.1. Hava kurutucu. ....	56
3.2. Biyoreaktör giriş ve çıkışında havanın hacimsel kompozisyonu (Pandey et al.,2001).....	58
4.1. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde besi ortamı nem içeriği denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği. ....	61
4.2. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde ortam sıcaklığı denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği. ....	64
4.3. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde havalandırma debisi denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği. ....	66
4.4. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulumdaki spor konsantrasyonu denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.....	68

## ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.5. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulum hacmi denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği. ....	70
4.6. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde yatak kalınlığı denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği. ....	72
4.7. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde aşı olarak spor ya da misel kullanımı denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği. ....	74
4.8. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde periyodik basınç uygulama denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği. ....	76
4.9. Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde besi ortamı nem içeriği denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği. ....	79
4.10. Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde besi ortamı nem içeriği denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği. ....	81
4.11. Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde hava debisi denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği. ....	84
4.12. Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulumdaki spor konsantrasyonu denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği. ....	86
4.13. Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulum hacmi denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği. ....	88

## ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.14. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde substrat yatak kalınlığı denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği. ....	90
4.15. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde aşı olarak spor ya da misel kullanımı denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği. ....	92
4.16. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde periyodik basınç uygulama denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği. ....	94
4.17. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde ortam sıcaklığı denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği. ....	96
4.18. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde havalandırma debisi denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.....	98
4.19. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde aşı olarak spor ya da misel kullanımı denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği. ....	99
4.20. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulumdaki spor konsantrasyonu denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği. ....	100
4.21. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulum hacmi denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.....	102
4.22. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde besi ortamı hacmi denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.....	103

**ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)**

<b><u>Sekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
4.23. Katı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde sıcaklık ve havalandırma hızının kurutma % verimine etkileri.....	107
4.24. Katı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde sıcaklık ve kurutma süresinin kurutma % verimine etkileri. ....	108
4.25. Katı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde sıcaklık ve havalandırma hızının kurutma % verimine etkileri.....	108
4.26. Statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde sıcaklık ve havalandırma hızının kurutma % verimine etkileri.....	113
4.27. Statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde sıcaklık ve kurutma süresinin kurutma % verimine etkileri.....	114
4.28. Statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde havalandırma hızı ve kurutma süresinin kurutma % verimine etkileri.....	114
4.29. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde zamana karşı mikropropagül sayısı, hesaplanan O <sub>2</sub> tüketimi ve CO <sub>2</sub> oluşumu değerleri.....	121
4.30. Tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde zamana karşı mikropropagül sayısı, hesaplanan O <sub>2</sub> tüketimi ve CO <sub>2</sub> oluşumu değerleri.....	121
4.31. Tepsili biyoreaktörde statik kültür fermentasyonu ile üretimde zamana karşı mikropropagül sayısı, hesaplanan O <sub>2</sub> tüketimi ve CO <sub>2</sub> oluşumu değerleri.....	122

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Katı kültür fermentasyonu ile <i>Trichoderma</i> türlerinin üretiminde kullanılan substratlar (Ramanujam et al., 2010).....	16
2.2. Sıvı ortamda <i>Trichoderma</i> türlerinin üretiminde kullanılan substratlar (Ramanujam et al., 2010).....	23
4.1. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde besi ortamı nem içeriği denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları.....	62
4.2. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde farklı besi ortamı nem içeriklerinin denemesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır, ** Hava şartlandırıcının sıcaklığı artırılarak taşıdığı nem miktarı yükseltilmiştir).....	63
4.3. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde ortam sıcaklığı denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları.....	64
4.4. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde farklı üretim sıcaklıklarının denemesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır, ** Hava şartlandırıcının sıcaklığı artırılarak taşıdığı nem miktarı yükseltilmiştir).....	65
4.5. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde havalandırma debisi denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları.....	66
4.6. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde farklı havalandırma debilerinin denemesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır, ** Hava şartlandırıcının sıcaklığı artırılarak taşıdığı nem miktarı yükseltilmiştir).....	67

## ÇİZELGELER DİZİNİ(devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.7. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulumdaki spor konsantrasyonu denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları. ....	68
4.8. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulumdaki farklı spor konsantrasyonları denenmesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır, ** Hava şartlandırıcının sıcaklığı artırılarak taşıdığı nem miktarı yükseltilmiştir). ....	69
4.9. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulum hacmi denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları. ....	70
4.10 Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde farklı besi ortamı nem içeriklerinin denenmesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır, ** Hava şartlandırıcının sıcaklığı artırılarak taşıdığı nem miktarı yükseltilmiştir). ....	71
4.11. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde substrat yatak kalınlığı denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları. ....	72
4.12. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde substrat yatağı kalınlığının denenmesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır, ** Hava şartlandırıcının sıcaklığı artırılarak taşıdığı nem miktarı yükseltilmiştir). ....	73
4.13. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde aşı olarak spor ya da misel kullanımı denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları. ....	74

## ÇİZELGELER DİZİNİ(devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.14. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde spor ya da miselli agar parçaları aşılamanın etkileri denenmesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır, ** Hava şartlandırıcının sıcaklığı artırılarak taşıdığı nem miktarı yükseltilmiştir). .....	75
4.15. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde periyodik basınç uygulama denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları. ....	77
4.16. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde substrat yatağı kalınlığının denenmesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır, ** Hava şartlandırıcının sıcaklığı artırılarak taşıdığı nem miktarı yükseltilmiştir).....	78
4.17. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde besi ortamı nem içeriği denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları.....	79
4.18. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde farklı besi ortamı nem içeriklerinin denenmesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır).....	80
4.19. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde ortam sıcaklığı denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları. ....	82
4.20. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde farklı üretim sıcaklıklarının denenmesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır, ** Hava şartlandırıcının sıcaklığı artırılarak taşıdığı nem miktarı yükseltilmiştir). ....	83

## ÇİZELGELER DİZİNİ(devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.21. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde havalandırma debisi denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları. ....	84
4.22. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde farklı havalandırma debilerinin denenmesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır). ....	85
4.23. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulumdaki spor konsantrasyonu denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları. ....	86
4.24. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulumdaki farklı spor konsantrasyonları denemesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi. ....	87
4.25. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulum hacmi denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları. ....	88
4.26. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulum hacmi denemesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır). ....	89
4.27. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde substrat yatağı kalınlığı denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları. ....	90



## ÇİZELGELER DİZİNİ(devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.28. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde substrat yatağı kalınlığının denenmesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır).....	91
4.29. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde aşı olarak spor ya da misel kullanımı denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları.....	92
4.30. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde spor ya da miselli agar parçaları aşılamanın etkileri denenmesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi. ....	93
4.31. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde periyodik basınç uygulama denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları.....	94
4.32. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde periyodik basınç uygulama denemesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır). ....	95
4.33. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde ortam sıcaklığı denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları, kuru ağırlık değerleri ve üretim zamanları. ....	97
4.34. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde havalandırma debisi denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları, kuru ağırlık değerleri ve üretim zamanları.....	98

## ÇİZELGELER DİZİNİ(devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.35. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde aşı olarak spor ya da misel kullanımı denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları, kuru ağırlık değerleri ve üretim zamanları.....	99
4.36. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulumdaki spor konsantrasyonu denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları, kuru ağırlık değerleri ve üretim zamanları.....	101
4.37. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulum hacmi denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları, kuru ağırlık değerleri ve üretim zamanları.....	102
4.38. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde besi ortamı hacmi denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları, kuru ağırlık değerleri ve üretim zamanları.....	103
4.39. Katı kültür fermentasyonu ile üretim sonunda gerçekleştirilen kurutma denemesinde Box-Behnken faktöriyel tasarımda üç bağımsız değişken ve değişim aralıkları.....	104
4.40. Katı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde kurutma % veriminin belirlenmesi için Box-Behnken faktöriyel deney tasarımı ve elde edilen yanıtlar.....	105
4.41. Katı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde kurutma % veriminin belirlenmesinde çoklu regresyonla elde edilen model katsayıları.....	106
4.42. Katı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde Box Behnken faktöriyel tasarımı için ANOVA sonuçları.....	106

## ÇİZELGELER DİZİNİ(devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.43. Katı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde ANOVA model değerlendirme sonuçları. ....	107
4.44. Katı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde en yüksek % verim değerine ulaşılabilecek parametreler. ....	109
4.45. Katı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde % nem değerlerinin değişimi .....	110
4.46. Statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretim sonunda gerçekleştirilen kurutma denemesinde Box-Behnken faktöriyel tasarımıda üç bağımsız değişken ve değişim aralıkları. ....	110
4.47. Statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde kurutma % veriminin belirlenmesi için Box-Behnken faktöriyel deney tasarımı ve elde edilen yanıtlar. ....	111
4.48. Statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde kurutma % veriminin belirlenmesinde çoklu regresyonla elde edilen model katsayıları. ....	112
4.49. Statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde Box Behnken faktöriyel tasarımı için ANOVA sonuçları. ....	112
4.50. Statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde ANOVA model değerlendirme sonuçları. ....	113
4.51. Statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde en yüksek % verim değerine ulaşılabilecek parametreler. ....	115
4.52. Statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde % nem değerlerinin değişimi .....	116

**ÇİZELGELER DİZİNİ(devam)**

<b><u>Cizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
4.53. Hazırlanan <i>T. harzianum</i> mikropropagül formülasyonlarının raf ömrü % verim değerleri (Depolama sonu canlı hücre/Kurutma sonu canlı hücre).....	116
4.54. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde ölçülen ve hesaplanan O <sub>2</sub> tüketimi ve CO <sub>2</sub> oluşumu değerleri.....	118
4.55. Tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde ölçülen ve hesaplanan O <sub>2</sub> tüketimi ve CO <sub>2</sub> oluşumu değerleri. ....	119
4.56. Tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde ölçülen ve hesaplanan O <sub>2</sub> tüketimi ve CO <sub>2</sub> oluşumu değerleri. ....	119
5.1. KKF ve statik kültür fermentasyonu ile <i>Trichoderma</i> mikropropagüllerinin optimum üretim koşullarının belirlenmesi denmelerinde elde edilen en yüksek mikropropagül sayıları ve elde edildikleri parametre değerleri. ....	123

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<b><u>Simgeler</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
O <sub>2</sub>	Oksijen
N <sub>2</sub>	Nitrojen
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
KKF	Katı kültür fermentasyonu
VO <sub>2i</sub>	Biyoreaktör girişindeki hacimsel O <sub>2</sub> hızı
VN <sub>2i</sub>	Biyoreaktör girişindeki hacimsel N <sub>2</sub> hızı
Fi	Biyoreaktör girişindeki hava hızı
VO <sub>2o</sub>	Biyoreaktör çıkışındaki hacimsel O <sub>2</sub> hızı
VN <sub>2o</sub>	Biyoreaktör çıkışındaki hacimsel N <sub>2</sub> hızı
VO <sub>2tük</sub>	Hacimsel O <sub>2</sub> tüketim hızı
VCO <sub>2o</sub>	Biyoreaktör çıkışındaki hacimsel CO <sub>2</sub> hızı
% O <sub>2o</sub>	Biyoreaktör çıkışındaki O <sub>2</sub> yüzdesi
%CO <sub>2o</sub>	Biyoreaktör çıkışındaki CO <sub>2</sub> yüzdesi
Fo	Biyoreaktör çıkışındaki hava hızı
K	Kelvin
Atm	Atmosfer
L	Litre
h	Saat
a <sub>w</sub>	Su aktivitesi
RQ	Solunum katsayısı



## 1 GİRİŞ

Topraktaki hastalık yapıcı mikroorganizmalarla mücadele oldukça zordur. Bu tip patojenlerin mücadelesinde ekim nöbeti, hastalığa dayanıklı bitki türlerin kullanımı ve kimyasal kullanımı gibi farklı yöntemler denense de bunlar yeterli gelmemektedir. Özellikle kimyasal kullanımında, ürünlerde ve toprakta kalıntı bırakması, ve bu kalıntıların hem insanlara hem de diğer canlılara kötü etkileri, patojenlerin uygulanan ilaçlara direnç geliştirmesi, bazı funguslara ait misel ve sporların kimyasal uygulanmasına rağmen toprakta uzun yıllar canlılıklarını devam ettirmeleri vb. olumsuz faktörler mevcuttur. Bu nedenle gelişmiş ülkelerde kimyasal kullanımı yerine biyokontrol uygulanmasına yönelik çalışmalar ön plana çıkmaktadır (Cook and Baker, 1983).

Bitki patojenleri ve bitki zararlıları ile mücadele eden spesifik mikroorganizmaların kullanımı olarak tanımlanan biyolojik kontrol, bitkileri korumak için kullanılan standart kimyasal metodların yol açtığı problemlerin üstesinden gelen çevre dostu ekolojik bir yaklaşımdır. Bitki hastalıklarının biyolojik kontrolü için kullanılan ticari preparasyonların hepsi, rizosferde çoğalma yeteneğine sahip birkaç bakteri türünün ve ondan daha fazla fungus türünün pratikteki uygulamasına dayanmaktadır (Viterbo et al., 2002).

Biyolojik kontrolün avantajlarından en önemlisi, patojenlerden kaynaklanan hastalıkları kontrol altına alırken aynı zamanda çevreye zarar verecek bir etkinin bulunmamasıdır. Biyolojik kontrolde kullanılan yararlı mikroorganizmalar, bitki kökünde bulunan patojenlere karşı bitkiyi savunur ve hastalanmasının önüne geçerler (Aksoy, 2006).

Fungal temelli biyolojik kontrol ajanları, hastalık kontrolünde geniş bir spektruma sahip olmaları ve üretim verimlerinden dolayı bakterilerle birlikte (çoğunlukla *Bacillus thuringiensis*) geniş bir kullanım alanı bulmuştur (Verma et al., 2007). Biyolojik mücadele kapsamında fungal bitki hastalıkları ile mücadelede antagonist fungusların kullanımı büyük öneme sahiptir. *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Chaetomium* spp., *Ampelomyces* spp., *Coniothyrium* spp., *Sporidosmium* spp. ve *Teretosperma* spp. gibi bazı fungus türleri önemli antagonist etkiye sahiptir. Özellikle *Trichoderma* türleri birçok fungal patojene karşı yaygın olarak

kullanılmaktadır (Demirci vd., 2002). Ayrıca, *Trichoderma* türleri daha çok toprak/büyüme geliştiricisi olarak, fungal biyolojik kontrol ajanı pazarının yaklaşık % 50'sini oluşturmaktadır ve bu durum *Trichoderma* türlerinin daha fazla araştırılmasına neden olmuştur (Verma et al., 2007).

Biyofungusitler, çevresel kaliteyi azaltma potansiyeli olan kimyasal fungusitlerin yerine geçebilecek önemli bir alternatiftir. Birçok bildiriye, biyokontrol ajanı *Trichoderma harzianum*' un propagül biyokütlesinin topraktaki fungal patojenlerin sebep olduğu hastalıkları azaltmada etkili bir biyofungusit olduğu belirtilmektedir. Toprağa ya da bitkilere misel ya da konidyum biyokütlesi formunda uygulanmaktadırlar ve konidyum, sıvı ortamda yüksek miktarda üretilebildiğinden ve kurumaya toleransı olduğundan daha çok tercih edilmektedirler (Said, 2007).

*Trichoderma harzianum* topraktaki patojen fungusların gelişimini engelleyen ticari olarak üretilen etkili bir biyokontrol ajanıdır. Toprak kaynaklı, yaygın, anamorfik bir fungustur. Fakültatif parazittir, aynı zamanda saprofit olarak yaşayabilir (Mulligan and Decon, 1992).

Katı kültür fermentasyonu, serbest halde suyun ortamda bulunmadığı ve mikrobiyal büyümenin substrat olarak iş gören katı materyal üzerinde gerçekleştirildiği bir biyolojik ürün üretim yöntemi olarak tanımlanmaktadır (Pandey, 1992). Biyolojik bir gübre oluşturmak için, tarımsal atıkların *Trichoderma* türleri ile katı kültür fermentasyonu umut vaad edici bir tarımsal sanayi atık yönetim stratejisidir.

Sıvı yüzey kültürü fermentasyonu olarak da adlandırılan statik sıvı kültür fermentasyonunda filamentli fungus besi ortamının yüzeyinde üremektedir (Abbasi and Fazaelpoor, 2010) ve fungusların doğada filamentli oluşları ve karıştırmanın misellere zarar vermesi nedeniyle güçlü bir çalkalama veya fiziksel karıştırmaya uygulanmadan üretim gerçekleştirilmektedir (Noh et al., 2012). Statik sıvı kültür, derin kültürle gerçekleştirilen üretimlerin maliyetini azaltmak için denenen potansiyel alternatif bir üretim yöntemidir ve günümüzde özellikle sitrik asit üretiminde endüstriyel ölçekte kullanılmaktadır (Darouneh et al., 2009).

Kurutma, genel olarak katı bir ürün oluşturmak için uçucu bileşenlerin (nem) ısı olarak uzaklaştırılması prosesi şeklinde açıklanır ve kimya, ziraat,



biyoteknoloji, gıda, polimer, seramik, ilaç, kağıt mineral işleme ve odun işleme endüstrilerinde kullanılan temel bir işlemdir (Mujumdar, 2007). Biyokontrol ajanlarının kurutulmuş halde saklanmaları kolaydır ve bu sayede formüle edilmeleri ve sıvı çözeltiler şeklinde uygulanmaları daha uygun hale gelmektedir ancak bu ticari *Trichoderma* türlerinin alt akım işlemlerinde kurutma ve depolama sırasında hücre canlılığının korunması önemli bir sorundur (Sargın et al., 2013).

Bu çalışmada, *Trichoderma harzianum* fungusu kullanılarak katı kültür ve statik sıvı kültür fermentasyon koşullarında, tasarımı tarafımızdan yapılan ve ülkemiz koşullarında imal edilen pilot ölçekteki iki biyoreaktörde yüksek verimle mikropropagül üretilmesi ve yine üretimin gerçekleştiği tepsili biyoreaktörde üretim sonrasında, üretilen mikropropagüllerin kurutularak formülasyon haline getirilmesi amaçlanmıştır. Bununla beraber bölgesel olarak ulaşılması mümkün ve ucuz tarımsal artıklar ve de yan ürünlerinden olan buğday kepeği ve malt çimi de besi ortamında kullanılarak, ekonomik açıdan önemli bir ürünün eldesinde değerlendirilmişlerdir.

## 2 LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1 Biyolojik Kontrol

Günümüzde, mevcut bitki türlerinin yaklaşık % 30'u bitki patojenleri tarafından zarar görmektedir. Birçok ülkede, pestisitler ve organik bileşikler bitki patojenlerinin kontrolünde geniş kullanım alanı bulmaktadır (Küçük et al., 2009).

Modern tarım, büyük ölçüde bu tür kimyasal pestisitlere dayanmaktadır. Bununla birlikte, bu tür kimyasalların tekrar tekrar kullanımı çevreyi kirletmekte ve hedef organizmaların direnç kazanmalarına neden olmaktadır (Goldman et al., 1994). Ayrıca bu bileşenlerin parçalanması çok zordur ve gıdalardaki konsantrasyonları ve birikimleri hayvanlarda yüksek toksik değerlere ulaşmaktadır (Küçük et al., 2009). Kimyasal insektisidler hedeflendikleri zararlı dışında, çevreye dağılarak çiçeklerde tozlaşmayı sağlayan faydalı böceklerin ve arıların da zarar görmelerine neden olabilmektedirler. Doğrudan ya da dolaylı olarak besinlerden insanlara ulaşarak zehirlenmelere neden olmakta ve bu nedenle de gelecek nesilleri tehdit etmektedir. Tarım alanlarında kullanılan kimyasallar, yağmur sularıyla derelere, göllere ve denizlere taşınarak su ekosistemini de olumsuz etkilemektedir. Kullandıkları alandaki bitkilerin çimlenmesi ve üremesi üzerinde de olumsuz etkilere neden olmaktadır. Ayrıca bu kimyasal ilaçların uygulandıkları bölgelerde zararlı böcekler, kimyasallara karşı direnç geliştirmektedirler (Yaman, 1998). Sonuç olarak, pestisitlerin gittikçe artan miktarlarda kullanımı bu tip birçok olumsuzlukla sonuçlanmıştır. İnsan popülasyonunun ve doğal habitatların gittikçe artan miktardaki pestisitlere maruz kalması kabul edilemez bir hal almıştır ve bu sebeple gereken pestisit dozunu azaltıcı ya da yok edici bir pestisit kontrol stratejisinin araştırılması için harekete geçilmiştir (Goldman et al., 1994).

Bu amacı gerçekleştirmenin en umut verici yolu, hastalık kontrolü için biyolojik kontrol ajanlarına (BCAs) dayalı yeni tekniklerin tek başına kullanımı ya da bunların bitki patojenlerinin kontrolünde düşük dozda kimyasallarla birlikte kullanımınıdır. Böylelikle kimyasalların çevreye zararlı etkileri minimum düzeye indirilmektedir (Vinale et al., 2008). Biyolojik kontrol, bitki patojenlerinin kontrolü için alternatif bir yol olarak dikkat çekici bir girişim olarak uzun yıllardır çalışılmaktadır (Goldman et al., 1994).

Biyolojik kontrol için birçok farklı tanımlama bulunmaktadır. Biyolojik kontrol, insanlar aracılığıyla olmayan ve bir ya da daha fazla organizma yoluyla bir patojenin hastalık yapıcı etkisinin azaltılmasıdır (Cook and Baker, 1983). Biyolojik kontrolün bu geniş tanımından yola çıkarak, ilgili organizmaların ve prosedürlerin; (i) patojenik türler içerisindeki avirulan ya da hipovirulan birey ya da populasyonları, (ii) antagonistik mikroorganizmaları ve (iii) patojene daha etkin bir şekilde direnç gösteren konukçu bitkilerin manipulasyonunu içerdiği söylenebilir (Alabouvette et al., 2006). Bitki patojenleri ve bitki zararlıları ile mücadele eden spesifik mikroorganizmaların kullanımı olarak tanımlanan biyolojik kontrol, bitkileri korumak için kullanılan standart kimyasal metodların yol açtığı problemlerin üstesinden gelen çevre dostu ekolojik bir yaklaşımdır. Bitki hastalıklarının biyolojik kontrolü için kullanılan ticari preparasyonların hepsi, rizosferde çoğalma yeteneğine sahip birkaç bakteri türünün ve ondan daha fazla fungus türünün pratikteki uygulamasına dayanmaktadır (Viterbo et al., 2002).

Biyolojik kontrol, doğrudan ya da dolaylı yöntemler ile gerçekleştirilebilir. Dolaylı yöntemler, belirli bir patojene karşı ortamda varolan mikrobiyal antagonistlerin aktivitesini arttıran organik toprak iyileştiricilerinin kullanımını içerir. Bir başka dolaylı yaklaşım ise çapraz korumadır ve bitki rizosferinin virulan olmayan bir suşla ya da diğer patojen olmayan ve rizosferde çoğalma yeteneğine sahip bakterilerle ya da funguslarla aşılması yolu ile, belirli bir patojene karşı bitkinin kendini koruma mekanizmasının uyarılmasını içerir. Doğrudan yaklaşım ise, belirli mikrobiyal antagonistlerin toprağa ya da bitki materyaline yerleştirilmesini içerir. Bu antagonistlerin patojene karşı aktif olabilmeleri için uygun ekolojik ortam içerisinde hızla çoğalmaları ve ortama yerleşmeleri gerekmektedir. Antagonistler, bitki patojenlerinin çoğalmalarına ve/veya hayatlarını sürdürmelerine engel olma potansiyeline sahip mikroorganizmalardır ve böylelikle biyolojik kontrole katkıda bulunmaktadırlar. Doğada mikroorganizmalar arasındaki antagonistik etkileşimler parazitizm ya da lizisi, antibiyozisi ve rekabeti içermektedir. Biyolojik kontrol aktivitesinde yer alan mekanizmaların açıklanabilmesi, yararlı biyolojik kontrol ajanlarının geliştirilmesindeki anahtar faktörlerden biri olarak düşünülmektedir (Viterbo et al., 2007).

## 2.2 Biyolojik Kontrol Ajanları

Doğada bakteri ile bitki arasında üç çeşit etkileşim bulunmaktadır, bunlar; simbiyotik, patojenik ve mutualist etkileşimlerdir. Simbiyotik etkileşim, bitkilerde kök nodüllerinin oluşumuna yol açmaktadır. Oluşan bu nodüllerin fizyolojik ve biyokimyasal durumları ve simbiyotik ilişki, çevresel koşullara bağlı olarak değişmektedir. Fitopatojenler çeşitli etkileşimler meydana getirmektedirler. Bitki hücrelerine saldırmak ve çoğalmaları için gereken bitki maddelerini kullanmak için spesifik yöntemler kullanırlar. Mutualist etkileşimde hem bakteri hem de bitki birbirinden yararlanmaktadır. Bu mutualist bakterilerin çoğu biyolojik kontrol ajanları olarak görev almaktadır. Ayrıca funguslar, virüsler ve diğer mikroorganizmalar bitkilerle, bitki büyümesi için zararlı ya da yararlı olabilecek farklı türde ilişkiler de kurabilirler. Doğal çevrede bulunan çeşitli mikroplar ve böcekler, potansiyel biyolojik kontrol ajanları olarak görev almaktadırlar. Bu biyolojik kontrol ajanları patojenik değildir, çevreye dosttur, üretim maliyetleri düşüktür, elde edilmeleri kolaydır ve uzun süreli etkiler yaratabilmektedirler (Chinnasamy, 2005).

Bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) gibi biyolojik kontrol ajanları, pestisitlere ilgi çekici bir alternatif olarak görev almaktadırlar (Chinnasamy, 2005). Bugüne kadar, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* ve *Bacillus* gibi bakteri suşları ve *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Ampelomyces*, *Candida* ve *Coniothyrium* gibi fungal suşları içeren birkaç biyolojik kontrol ajanı kaydedilmiştir ve bunlar ticari ürünler olarak bulunmaktadır (Vinale et al., 2008). Bununla beraber *Bacillus subtilis* GB03, MBI205, MBI600, *B. amyloliquefaciens* GB99 (IN037a), *B. cereus* UW85, *B. pumilis* GB34 (INR-7), BacJ, *Burkholderia ambifaria* AMMDR1, *Methylobacter extorquens*, *Pantoea agglomerans* C9-1, *Pasteuria penetrans*, *Pseudomonas fluorescens* A506, Pf0-1, Pf-5, Q8r-1, SBW-25, *P. aureofaciens* 30-84, *Streptomyces griseoviridis* K61, *S. lyticus*, *Aspergillus flavus* ve *T. hamatum* T382 gibi suşlar da biyolojik kontrol ajanları olarak kullanılmaktadır (Chinnasamy, 2005).

Biyolojik kontrol kimyasal kontrolden daha güvenilir olmasına rağmen, daha az etkilidir. Biyolojik ajanlardan çok fazla hastalık veya böcek kontrolü beklenmemelidir. Biyolojik kontrol ajanları kendi doğaları yüzünden kimyasal olanlara göre daha sınırlıdır. Dikkatli olarak hedeflenmeleri gerekir. Uygun

karakterli kontrol ajanları ile başlanmalı ve daha sonra verilen patojen için antagonisti seçilmelidir. Bu faktörler bitki patolojistlerini ve mikrobiyologları; daha iyi biyokontrol ajanları elde etmek, onların kontrol mekanizmalarını daha iyi anlamak ve yeni biyoteknolojik araştırma konularında cesaretlendirmektedir (Monte, 2001).

### 2.3 Fungal Biyolojik Kontrol Ajanları

Fungal temelli biyolojik kontrol ajanları, hastalık kontrolünde geniş bir spektruma sahip olmaları ve üretim verimlerinden dolayı bakterilerle birlikte (çoğunlukla *Bacillus thuringiensis*) geniş bir kullanım alanı bulmuştur (Verma et al., 2007).

Biyolojik mücadele kapsamında fungal bitki hastalıkları ile mücadelede antagonist fungusların kullanımı büyük öneme sahiptir (Demirci vd., 2002). Fungal sporlar yabancı ot veya böceklerle penetre olabilir ve taşıyıcının savunma sisteminin zayıf düşmesine gerek duymadan çalışabilirler. Ayrıca fungusların propagül stabiliteleri yüksektir. Fungal sporlar ve propagüller bakteriyel hücrelerle karşılaştırıldığında genellikle daha kararlıdır. Yabancı otların ve böceklerin kontrolü için sayısız fungal patojenin bulunabilirliği, bu organizmaların ticari boyutta biyokontrol ajanı olarak kullanılabilmesi için diğer bir önemli özellikleridir (Jackson, 1997).

*Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Chaetomium* spp., *Ampelomyces* spp., *Coniothyrium* spp., *Sporidosmium* spp. ve *Teretosperma* spp. gibi bazı fungus türleri önemli antagonist etkiye sahiptir. Özellikle *Trichoderma* türleri birçok fungal patojene karşı yaygın olarak kullanılmaktadır (Demirci vd., 2002). Ayrıca, *Trichoderma* türleri daha çok toprak/büyüme geliştiricisi olarak, fungal biyolojik kontrol ajanı pazarının yaklaşık % 50'sini oluşturmaktadır ve bu durum *Trichoderma* türlerinin daha fazla araştırılmasına neden olmuştur (Verma et al., 2007).

### 2.4 Fungal Biyolojik Kontrol Ajanları Olarak *Trichoderma* Türleri ve Özellikleri

*Trichoderma* türlerinin biyolojik kontrol ajanı olarak kullanımı ilk kez yaklaşık 80 yıl önce Weindling (1932) tarafından öne sürülmüştür. Sonrasında,

farklı *Trichoderma* türleri biyolojik kontrol ajanı olarak denenmiş ve ekonomik olarak önemli olan birçok havada ve karada yaşayan bitki patojenine karşı etkili olduğu gösterilmiştir (Arora, 2004).

*Trichoderma* türleri en sık izole edilen toprak funguslarıdır ve bitki kök ekosistemlerinde bulunmaktadır. Bu funguslar fırsatçı, avirulan bitki simbiyontlarıdır ve birçok fitopatogenik fungusun antogonist ve parazitleri olarak görev alırlar ve böylelikle bitkileri hastalıklardan korurlar. *Trichoderma* türleri şimdiye kadar en çok çalışılan biyolojik kontrol ajanları arasındadır ve ticari olarak biyopestisitler, biyogübreler ve toprak iyileştiricileri olarak satılmaktadırlar (Vinale et al., 2008). Biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılan *Trichoderma* suşları; (i) toprakta ve/ya da bitkinin bazı kısımlarında koloniler kurarak, fiziksel bir çevreyi ele geçirerek ve patojenlerin çoğalmasını engelleyerek; (ii) patojenlere karşı hücre duvarı parçalayıcı enzimler üreterek; (iii) patojenleri öldürebilen antibiyotikler üreterek; (iv) bitki gelişimini teşvik ederek ve (v) bitkinin savunma mekanizmalarını indükleyerek etki göstermektedir (Monte and Llobell, 2003).

*Trichoderma* bazlı biyolojik kontrol ajanları benzerleriyle (virüs, bakteri, nematod ve protozoa) karşılaştırıldığında, bitki büyümesini teşvik etmesi ve toprak remediasyonu konusunda daha yüksek aktivite göstermesi gibi nedenlerle daha ön plandadır. Antagonistik bileşikler (proteiner, enzimler ve antibiyotikler) ve mikrobelerin (vitaminler, hormonlar) sentezleyebilmeleri, biyolojik kontrol aktivitelerinde üstünlük sağlamaktadır (Cavalcante et al., 2008; Al-Taweil et al., 2009). *Trichoderma* türleri  $\beta$ -1,3-glukanazlar, kitinazlar ve proteazlar gibi fungal hücre duvarını parçalayan enzimleri ve biyolojik olarak aktif (uçucu ve uçucu olmayan antibiyotikler gibi) bileşikleri üreterek fitopatogenik fungusların kontrolünü gerçekleştirebilmektedirler (Witkowska and Maj, 2002).

*Trichoderma* türleri selülozik maddelerin çok sık rastlanan tüketicilerindedir ve bu nedenle çoğunlukla çürümekte olan bitki materyalinin bulunduğu ortamların yanı sıra, patojenlere karşı sistemik direnci indükleyebildikleri bitki rizosferinde bulunurlar. Genusun türleri renk olarak parlak yeşilimsi-sarıdan kırmızıya kadar değişen çok farklı pigmentler üretirken, bazıları da renksiz pigmentler üretmektedirler. Benzer şekilde, konidyum pigmentasyonu renksizden, çeşitli yeşil renk tonlarına ve bazen de gri ya da kahverengiye kadar değişmektedir. Pigmentasyonun dışında genus içerisindeki

türlerin tanılanması, *Trichoderma* morfolojisindeki çeşitliliğin çok dar aralıkta değişmesinden dolayı zordur. *Trichoderma* türleri hızlı çoğalma, genellikle parlak yeşil konidyumlara sahip olma ve tekrarlanan dallanmış konidyofor yapısı ile karakterize edilmektedir (Schuster and Schmoll, 2010).

## 2.5 *Trichoderma* Türlerinin Biyolojik Kontrol Mekanizmaları

*Trichoderma* spp. bitkide hastalık yapan patojenlere karşı etki göstermektedirler. Bitkinin kök yüzeyine kolonize olarak bitki metabolizmasında da birtakım farklılaşmalara neden oldukları, literatürdeki çalışmalarda belirtilmiştir (Howell, 2003). Bitki köküne yerleşip patojenlerinin bitkide gelişimlerini engelleyerek hastalık oluşumunu engellemeleri, ayrıca hormon benzeri birtakım metabolitler üretmeleri ve de topraktan ve organik maddelerden gelen besinleri bitki için kullanılabilir hale getirmeleri yoluyla bitki gelişimine katkıda bulunmaktadır (Kleifeld and Chet, 1992).

*Trichoderma* türleri biyokontrol alanında en yaygın çalışılan funguslardandır ve mikoparazitizm, antibiosis, rekabetlilik gibi mekanizmalarla biyokontrolde etkili olmaktadır. Ayrıca bazı *Trichoderma* türleri, bitki gelişimini de teşvik edici etkide bulunarak, ürün verimini artırmaya yardımcı olurlar. Uygulanan *Trichoderma* türlerinin, bitkilerin hastalıklara dayanıklılığını artırıcı etki gösterdikleri de bildirilmiştir. Literatürdeki bazı çalışmalarda *T. harzianum* T22, *T. atroviride* P1 izotlarının serada, marul gelişimi üzerine; tarla koşullarında ise domates ve biber üzerine etkileri incelenmiştir. *T. harzianum*' un uygulandığı alanlarda, kontrol grubuna göre biber ve domatesteki ürün verimini artırıcı etki gösterdiği, bitki boyunu, bitkinin yaprak sayısını ve bitkiden elde edilen meyve sayısını % 300 artırdığı rapor edilmiştir (Küçük ve Güler, 2009).

*Trichoderma*' nın metabolitlerinin, bitkideki gelişimi olumlu yönde etkilediği bilinmektedir. *Trichoderma*' nın ürettiği sekonder metabolitlerin, bitkide oksin benzeri bileşikler olarak etki gösterdikleri ve çok düşük derişimlerde optimum aktivitelerini gösterebildikleri bildirilmiştir (Kleifeld and Chet, 1992). Bununla beraber *Trichoderma* türlerinin ürettikleri glukonik asit vb. organik asitlerin toprağın pH'ını düşürdüğü ve bitkilerin metabolizmasında yer alan mangan, vb. mineral ve mikroelementlerin, katyonlarla fosfatın çözünmesinde etki gösterdikleri bilinmektedir. Kullanılan organik substratların, *Trichoderma*'



nın aktivitesini artırdığı rapor edilmiştir (Küçük ve Güler, 2009).

Ganesan and Sekar, (2004) tarafından yapılan bir çalışmada *Trichoderma harzianum* (ITCC-457) ile *Rhizobium* bakterisinin beraber uygulanmasıyla yer fıstığının gelişiminin arttığı, bu uygulamanın *Sclerotium rolfsii*'nin neden olduğu kök çürüklüğünü azalttığı saptanmıştır.

Küçük vd., (2009) tarafından yapılan bir çalışmada da, İç Anadolu Bölgesi topraklarından izole edilen *Trichoderma harzianum* T1'in  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  ve  $\text{Ca}^{+2}$  un farklı konsantrasyonlarına olan dirençlilikleri incelenmiş, izolatın  $\text{Fe}^{+2}$  'e toleranslı,  $\text{Ca}^{+2}$  içeren ortamda ise düşük toleranslı olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar T1 izolatın  $\text{MnO}_2$  ve metalik çinkoyu sıvı ortamda çözebildiğini belirlemişlerdir.

*Trichoderma* gibi antagonist mikroorganizmalar patojenlere karşı rekabetlilik, antibiosis, mikoparazitizm, hipal etkileşimler ve enzim salgılama gibi farklı mekanizmalar kullanırlar (Ranasingh et al., 2006).

### 2.5.1 Rekabete dayalı mekanizma

Antagonist biyolojik kontrol ajanı ile patojen arasında yer ve besin eldesi için meydana gelen rekabettir. Bu proses boyunca, antagonist patojen popülasyonunun büyümesini baskılayabilir ve bundan dolayı hastalık gelişimini azaltır (Ranasingh et al., 2006).

Mikroorganizmaların, özellikle de bitki yüzeyinde ve toprakta yaşayanlar için kolayca ulaşılabilir olan nutrientlerin eksikliği, mikroorganizmalar arasında belirgin bir yarışmaya neden olmaktadır. *Trichoderma* türleri toprakta ve bitki yüzeyinde patojenlerle yarışabilir ve siderofor denen bileşenleri salgılayarak demiri iyonlarına ayırabilir. *Trichoderma* ve patojenik funguslar arasında nutrientler için yapılan rekabetin önemi oldukça fazladır (Verma et al., 2007).

### 2.5.2 Antibiosis

Antibiosis, antagonist fungusun yaşadığı çevredeki patojen fungusu öldürmek için antimikrobiyal bileşenlerini salgılanması olayıdır. *Trichoderma* türlerinin doğada uçucu ya da uçucu olmayan antibiyotik ve toksin (trichotecin, sesuiterpine, trichodermin) salgılayarak diğer organizmaları direk etkilediği bilinmektedir. Trichodermin'in bakteri ve funguslar üzerinde antimikrobiyal etkisi



vardır (Ranasingh et al.,2006).

Menendez and Godeas (1998) soya fasulyesi gibi ekonomik olarak önemli pek çok ticari tahıla saldıran topraktan çıkan bitki patojeni *Sclerotinia sclerotiorum*'a karşı olan *Trichoderma harzianum* ile ilgili antibiyotik etkisini bildiren birtakım biyokontrol çalışmaları yapmışlardır (Verma et al., 2007).

### 2.5.3 Mikoparazitizm

Antagonist fungusun diğer fungus için bir parazit gibi davranmasıdır. Bu mekanizma birkaç etkileşim basamağını içerir;

İlk aşama: Patojen fungusun kimyasal uyarıcısı antagonist fungusu çeker ve antagonistin kemotropik cevabına neden olur.

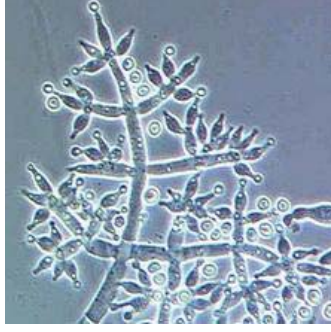
İkinci aşama: Lektinlerin aracılığıyla patojen ve antagonist arasında farkındalık oluşur.

Üçüncü aşama: İkinci aşamayı patojen ve antagonist fungusun filamentlerinin etkileşmesi takip eder. Antagonist (*Trichoderma*) filamentleri patojenini bitki boyunca çoğalarak sarar ve mikoparazitizm sürecinde yer alan kitinaz, glukanaz, pektinaz gibi farklı litik enzimleri salgılar (Ranasingh et al., 2006).

*Trichoderma* sp.'nin gösterdiği mikoparazitizm konağa özeldir. Fungusun saldıladığı kompleks ekstrasellüler enzimler mikoparazitizm boyunca patojen hücrenin hücre duvarını yıkmada anahtar faktördür (Verma et al.,2007).

## 2.6 *Trichoderma* Türlerinin Üretimi ve Mikrobiyal Propagüller

Herhangi bir biyolojik kontrol ajanının üretimindeki asıl hedef, en ekonomik kütle üretiminin gerçekleştirilmesidir. *Trichoderma* türlerine ait hemen hemen tüm biyokontrol ajanı ürünleri, aktif içerik olarak sporları bulundurmaktadır. Bu da, *Trichoderma* türlerinin üç mikrobiyal propagülünün (miseller, konidyumlar ve klamidosporeler) fizyolojik durumlarına bağlanmaktadır. Bu üç propagül, üretim, stabilite ve biyokontrol ajanı aktivitesi açısından farklı fizyolojik karakterlere sahiptirler. Bu nedenle, *Trichoderma* türlerinin etkin bir şekilde biyokontrol ajanı etkilerini gerçekleştirebilmeleri için en uygun yapıdaki propagüllerinin seçilmesi zorunludur (Şekil 2.1) (Verma et al., 2007).



**Şekil 2.1. *Trichoderma* miselerindeki hifler ve bu hiflerin farklılaşmasıyla oluşan sporlar (Cann, 2010).**

Miseller, mükemmel biyokontrol ajanı aktivitesine sahip olmasına rağmen, ne yazık ki kurutma gibi alt akım işlem basamakları boyunca hayatta kalamazlar ve dolayısıyla kullanışlı değildirler. Buna karşılık, klamidosporeler kültür için 2-3 haftalık bir periyoda ihtiyaç duyarlar ve misellerden daha dayanıklı olsalar bile, aynı şekilde miseller gibi kurutma prosesi boyunca hayatta kalamazlar. Yukarıda bahsedildiği gibi, konidyumlar aktif biyokontrol ajanlarıdır, çeşitli çevresel koşullardan daha az etkilenmektedirler ve 3-4 gün gibi daha kısa bir sürede daha bol miktarda üretilebilmektedirler. Bu nedenle, *Trichoderma* türlerinin konidyumlar şeklinde üretimi en iyi seçenek olacaktır. Ancak, misellerin konidyumlar ile birlikte üretim ortamında bulunmaları kaçınılmazdır. Buna ek olarak, eş zamanlı olarak misellerin üretimi, biyokontrol ajanı aktivitesi için çeşitli temel metabolitlerin (örneğin, antibiyotikler) bulunmasını sağlamaktadır. Bu sebeple, miseller ile birlikte ana propagüller olarak konidyumları içeren *Trichoderma* türlerinin üretimi en iyi üretim stratejisi olacaktır (Verma et al., 2007).

## **2.7 *Trichoderma* Türlerinde Biyokütle Üretim Stratejileri**

*Trichoderma* türlerine ait biyokontrol ajanlarının ticari başarısı, ek olarak ekonomik olarak uygun kütle üretim proseslerini (üretim maliyetinin % 35-40'ı ham maddeye bağlıdır) gerektirmektedir (Verma et al., 2007). Avantajlarına rağmen, *Trichoderma*'ya dayalı biyolojik kontrol ajanlarının kütle üretimi çok yaygın değildir çünkü üretimde Mendel ortamı, melas, mısır ıslatma sıvısı gibi yüksek maliyetli hammaddeler kullanılmaktadır. Bununla birlikte, biyolojik kontrol ajanlarının ticari üretiminde kullanılan bu hammaddelerin maliyeti başlıca kısıtlayıcı faktörlerdir. Maliyet sınırlamasının üstesinden gelmek için birçok araştırmacı, mısır lifi kuru kütlelerini, kanalizasyon çamuru kompostunu ve yaban

mersini posasını başarılı bir şekilde kullanmıştır. Alternatif kaynakların kullanımına rağmen üretim maliyeti hala yüksektir çünkü bu hammaddelerin de diğer besin maddeleri ile desteklenmesi gerekmektedir (Al-Taweil et al., 2009).

Çoğalma ve üretim; kültür ortamı, aşı, pH, sıcaklık, oksijen ve kütle transferi gibi pek çok parametreden etkilenmektedir. *Trichoderma* gibi filamentli funguslar çok çeşitli morfolojik yapılaraya sahip olduklarından, fermentasyon proseslerinin optimizasyon ve ölçeklendirilmesinin zor olduğu belirtilmektedir (Wang et al., 2005). Konidyumların ticari üretimi genellikle konidyum oluşumunu destekleyen besin maddelerinin ve substratların manipulasyonuna dayanmaktadır. Birçok *Trichoderma* türünde, *in vitro* konidyum oluşumunun elde edilmesi için optimum çoğalma koşulları üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bununla birlikte bu çalışmalar, ortam pH'sına ek olarak karbon ve azot durumunun ve C:N oranının *Trichoderma*'da konidyum oluşumunu etkileyen başlıca çevresel faktörler olduğunu öne sürmüştür (Steyaert et al., 2010). Havasal sporlar (konidyumlar) katı ortamda üretilebilmekle beraber, prosesin ilerleyen aşamalarında, sıcaklık ve havalandırma koşulları için optimum değerler sağlanamadığından, konidyumların büyük ölçekte üretilmeleri zorlaşmaktadır. *Trichoderma* türlerinde klamidospore üretimi için sıvı fermentasyonunun kullanıldığı bilinmektedir (Watanabe et al., 2006). Fakat her fungus derin kültürlerde spor üretme kapasitesinde değildir. Bu nedenle maksimum propagül verimi için seçilen türe özel üretim koşulları optimize edilmelidir (Jakubikova et al., 2006).

Biyokontrol etkinliğindeki varyasyonlar, hücre fizyolojisindeki spesifik değişimlerden ve muhtemelen birbirini etkileyen birçok faktörden kaynaklanabilir. Kültür ortamı da ayrıca konidyum oluşumunun niteliği ve niceliği açısından önemli bir parametredir. Bu fungusların etkin biyokontrolü, arazi uygulamasından sonra konidyumların canlılığını ve virülansını koruyabilmelerini gerektirir ve çok sayıda çevresel faktör biyokontrol funguslarının çoğalmasını ve ekosistemlerde yerleşmelerini azaltabilir. Üremeyi etkileyen çevresel faktörlerin çalışılması, bu ajanların hayatta kalma yeteneklerinin geliştirilmesi ve daha iyi bir biyokontrol etkinliğinin sağlanması için gereklidir (Gao and Liu, 2010).

### 2.7.1 Katı kültür fermentasyonu ile biyokütle üretimi

Biyolojik yolla üretim aşamaları genel itibarıyla derin kültür (sıvı kültür) ve katı kültür fermentasyonları (KKF) olmak üzere iki tiptir. Bu iki üretim aşamasının arasındaki temel farklılık substrat içerisindeki serbest haldeki su miktarıdır. Derin kültür fermentasyonu ile gerçekleştirilen üretimlerde substrat içerisindeki katı madde miktarı 50 g/l katı ortamın üzerine çıkmamaktadır ve ayrıca katı substratta %12 ve daha düşük nem oranı bulunmamaktadır (Robinson et al., 2001). Katı kültür fermentasyonu ile üretimlerde ise serbest halde su bulunmayan besi ortamında, fiziksel destek ve besin kaynağı olarak iş gören çözünür olmayan bir katı materyal üzerinde üretim gerçekleştirilmektedir (Pandey, 1992). Substrat partikülleri arası ve ayrıca katı partiküllerin yüzeylerinde serbest su damlacıkları bulunuyor olsa da bu bölgelerde daha baskın olarak gaz faz bulunmaktadır ve ortamdaki suyun çoğunluğu, katı partiküllerin içerisine nem olarak absorbe olmuştur (Mitchell et al., 2006). KKF ile üretim süresince mikroorganizma, gelişimi için gereken suyu substratın içine absorbe olan bu nemden karşılamaktadır (Cannel and Young, 1980; Mitchell et al., 2000; Gessesse and Mamo, 1999).

Tarımsal organik atıklar ve ayrıca sanayi atıkları hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde önemli çevresel sorunlara yol açmaktadır. Hayvansal üretimden kaynaklanan organik atıklar nehir ve göl sularını kirletmektedir (Chen et al., 2011). KKF doğada, serbest durumdaki suyun neredeyse hiç bulunmadığı çöp kompostlarında, meyvelerde ve de ekmelerde gerçekleşmektedir. Bu nedenle KKF yoluyla organik maddeler doğada kendiliğinden geri dönüşüme uğramaktadırlar (Campbell-Platt, 1994).

Biyo-organik bir gübre oluşturmak için, tarımsal atıklar ve sanayi atıklarının *Trichoderma* türleri ile KKF' de değerlendirilmesi, umut vaat edici bir tarımsal atık ve sanayi atığı yönetim stratejisidir. Biyo-organik gübrenin, antibiyotik metabolitlerin birikimini teşvik ettiği, *Trichoderma* türlerinin rizosferde yaşama gücünü koruduğu ve biyokontrol etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir. Bu gözlemlere dayanarak yapılan bir çalışmada, *Fusarium*'un salatalığa zarar vermesini önlemek için yüksek biyokontrol etkinliğine sahip biyo-organik bir gübre üretme amacıyla, büyükbaş hayvan gübresi, sirke-üretim atıkları ve pirinç kepeğinin *Trichoderma harzianum* SQR-T037 suşu ile katı kültür fermentasyon

prosesinin optimize edilmesi planlanmıştır. Oluşturulan biyo-organik gübre, sürekli olarak ekilip biçilen toprakta salatalığı *Fusarium* solgunluğuna karşı yüksek etkinlikle koruyabilmiştir. Bu nedenle biyo-organik gübrelerin uygulanması, hem ekonomik ekin üretim endüstrisinde hem de çevresel korumada önemlidir (Chen et al., 2011).

Biyolojik ajanın katı kültür fermentasyon teknolojisi yoluyla kütle üretimi için, çok yüksek derişimde spor biyokütlesine ihtiyaç duyulmaktadır. Tahıl taneleri, elenmemiş kaba un, kepekler, saman, bitki kalıntıları ve organik gübreler gibi çeşitli substratlar, *T. harzianum*'un kütle üretimi için kullanılmaktadır (Tewari and Bhanu, 2004).

Cibre, katı kültür fermentasyonunda kullanılan uygun bir destek substratıdır. Şarap posası, mikrobiyal çoğalma için gerekli karbon kaynağı, azot kaynağı ve iz elementler gibi çeşitli besin maddelerini bulundurmaktadır. Bu şarap atıklarının karışımı, katı kültür fermentasyonu için oldukça ucuz substratlardır ve bulunurlukları yüksektir (Zhihui et al., 2008). Bununla birlikte, büyük miktarda katı kağıt atıkları ve selülozik bitki artıkları gibi diğer tarımsal-sanayi atıkları sürekli olarak çevreye salınmakta ve kirliliği artırmakta ve de atık bertarafı problemlerine neden olmaktadır. Bu nedenle, çevreye dost biyo-pestisitlerin büyük ölçekte uygun maliyetli üretimine olan ihtiyaç doğrultusunda, *T. harzianum*'un kütle üretimi için bölgesel olarak mevcut olan daha ucuz substratların araştırıldığı çalışmalar yürütülmektedir (Tewari and Bhanu, 2004).

Çizelge 2.1' de katı kültür fermentasyonu ile *Trichoderma* türlerinin üretiminde kullanılan birtakım substratlar gösterilmiştir.

**Çizelge 2.1. Katı kültür fermentasyonu ile Trichoderma türlerinin üretiminde kullanılan substratlar (Ramanujam et al., 2010).**

Substrat	Kaynak
Sorghum tanesi	Upadhyay and Mukhopadhyay, (1986)
Buğday kepeği-talaş karışımı modifiye ortam	Mukhopadhyay et al., (1986)
Tapioca kabuğu, tapioca artığı, çiftlik gübresi (FYM),preslenmiş çamur	Kousalya and Jeyarajan, (1990)
FYM, buğday kepeği, pirinç kepeği, turba toprağı, pirinç samanı	Sangeetha et al., (1993)
Yerfıstığı kabuğu ortamı	Raguchander et al., (1993)
Kullanılmış çay yaprağı atığı ve kahve kabuğu	Bhai et al., (1994)
Buğday kepeği ve gübre	Jagadeesh and Geetha, (1994)
Güvercin bezelye kabuğu, tapioca atığı(nişasta ekstraksiyonundan) ve preslenmiş çamur	Jayaraj and Ramabadran, (1996)
Kahve meyve kabuğu, kanatlı gübresi ve tezekle kompostlanmış kahve meyve kabuğu	Sawant and Sawant, (1996)
Çürütölmüş hindistancevizi lifi	Kumar and Marimuthu, (1997)
Malt atığı	Gopalakrishnan et al.,(2003)

### **2.7.1.1 Katı kültür fermentasyonunda üretim koşulları**

#### **Substratlar**

KKF' de kullanılan hammaddeler genellikle tarımsal kökenlidir. Kullanılan bu substratları içeriklerine göre genel olarak 3 grupta incelemek mümkündür:

- Nişastalı substratlar (pirinç, cassava, buğday kepeği, pirinç kepeği, mısır, patates artıkları, muz artıkları)
- Lignoselülozik substratlar (saman, ağaç parçaları talaş v.b)
- Yapılarında çözünür şekerleri içeren substratlar (şeker pancarı, üzüm küspesi, meyve artıkları) (Durand et al., 1993).

Çoğu durumda substratların bir boyut küçöltme ön işleminde geçirilmesi gerekebilmektedir. Mekanik ya da kimyasal ön işlemler uygulanabilmektedir. Bu işlemlerin amacı daha küçük moleküller elde ederek mikroorganizmanın penetrasyonunu artırmaktır. Bu işlemler arasında buhar uygulama, kırma,

taneleme, su ile tavlama, parçalama, eleme, öğütme, alkaliyle veya NaCl ile muamele etme bulunmaktadır (Mitchell and Berovic, 1998).

KKF' de en önemli fiziksel özellik partiküllerin boyutudur. Partikül büyüklüğü, yüzey alanının hacme oranını belirlemektedir ve aynı zamanda partiküller arasındaki boşluk hacmini de etkilemektedir. Küçük boşlukları fungal miseller kolaylıkla doldurmaktadır ve difüzyonu büyük oranda kısıtlayarak havalandırılmalı sistemlerde yüksek basınç değişimlerine neden olmaktadır (Raimbault, 1998). Ortamda farklı boyutlarda partiküller bulunmakta ise büyük partiküllerin arasındaki boşluklar, küçük partiküller tarafından doldurularak toplam boşluk hacmi azalmaktadır (Pandey, 1991).

### **Nem**

Mikrobiyal üremeyi etkileyen en önemli faktör su aktivitesi ( $a_w$ )'dir. Ancak ortamdaki mevcut su miktarının ölçümü daha kolaydır. Su miktarı, bir materyalin ağırlığı içerisindeki su kütesinin yüzdesidir. Su aktivitesi ise materyalin buhar basıncının aynı sıcaklıktaki suyun basıncına oranıdır ve mikroorganizma için kullanılabilir olan su miktarını ifade eder. Farklı substratlar değişik su tutma kapasitesine sahip olduklarından serbest suyun görünür hale geldiği düzeyler değişmektedir. Bu nedenle KKF' de su miktarları, kullanılan substrata göre %30 ile %80 arasında değişmektedir. Bununla beraber su miktarı ile  $a_w$  arasındaki ilişki de geniş bir aralıkta lineer olarak değişmemektedir. Su miktarındaki büyük artışlar  $a_w$  de küçük değişimlere sebep olabilmektedir (Pandey et al., 2001).

Nemin mikroorganizma fizyolojisi üzerine olan direkt etkisinin yanısıra substrat karakteristiklerini değiştiren etkileri de vardır. Yüksek nem oranı partiküller arasında gazların yer değiştirmesine ve substrat partiküllerinin kümeleşmelerine neden olmaktadır. Her iki durum da gaz difüzyon kısıtlamalarının oluşumunu hızlandırır. Ayrıca yüksek nem oranı, substrattaki çözünebilir besin maddelerinin substrat dışına çıkmasına yol açmaktadır (Cannel and Young, 1980).

### **pH**

Mikrobiyal büyüme, substratın pH değerinde önemli değişikliklere neden olmaktadır. Substratın tamamıyla okside edilememesi ya da amonyum iyonlarının bünyeye alınması sonucunda pH düşerken ürenin ya da diğer aminlerin



deaminasyonu sayesinde amonyum iyonlarının açığa çıkması ile pH yükselir. pH değişimlerinin şiddeti, mikroorganizmanın metabolik aktivitesi ve substratın tamponlama kapasitesi ile ilişkilidir. Üretim sırasında pH değeri mikroorganizmanın gelişimini engelleyecek düzeye gelebilir. Ancak KKF' da pH kontrolü oldukça zordur. Bu nedenle geniş bir pH aralığında üreyebilen mikroorganizmalar daha çok tercih edilirler (Mitchell and Berovic, 1998).

### **Sıcaklık**

Metabolik aktivite sonucunda oluşan ısı, fermentasyon işlemlerinde önemli sorunlar yaratmaktadır. KKF' de sıcaklığın kontrol edilmesi, derin kültür fermentasyonuna göre oldukça zordur. Substrat heterojenitesi nedeniyle sıcaklık gradyanları oluşmaktadır. Bu durum sistemde ısı transferini güçleştirerek bölgesel sıcaklık yükselmelerine neden olmaktadır. Bunun sonucunda mikrobiyal büyüme yavaşlar ve hatta bazı durumlarda mikroorganizmalar ölmektedirler (Mitchell et al., 2000). Bu durum katı kültür fermentasyonunun en zayıf noktasıdır ve büyük ölçekte üretimlerin kolaylıkla gerçekleştirilebilmesinin önündeki en büyük engeldir (Liu et al., 2007). Bu nedenle oluşan ısının sistemden uzaklaştırılması gereklidir. KKF biyoreaktörlerinin tasarımında değerlendirilmesi gereken en önemli kriterlerden biri de oluşan metabolik ısının uzaklaştırılmasıdır (Mitchell et al., 2000). Özellikle sabit yataklı, karıştırılmayan ve yalnızca yüzeyden havalandırılabilen sistemlerde; yatak içinden zayıf ısı transferi ve büyük ölçekte ısı transferi sağlayacak olan yüzeyin yetersiz kalması nedeniyle ısı uzaklaştırma oldukça zor hale gelmektedir. Evaporasyonla ısı uzaklaştırma, ısı iletimi ve taşınımı ile soğumadan daha etkili olduğu için birçok çalışma evaporasyonu etkin hale getirmek üzerine gerçekleştirilmektedir. Sistemde pozitif basınç etkisi yapmak, buharlaşmayı artırıcı etki göstererek ısı uzaklaştırmaya yardımcı olmaktadır (Liu et al., 2007). Oluşan metabolik ısıyı uzaklaştırmak için substrat yatağı içerisine teflon hortum parçaları karıştırmak da, besi ortamında üretim süresince oluşabilecek yapışma ve topaklanma sorunlarının önüne geçilmesini ve ortamda hava kanalları yaratarak havanın yatak içerisine difüzyonunu kolaylaştıracaktır. Bu sayede etkin bir ısı ve gaz transferi sağlanabilmektedir (Berovic, M., 2010, sözlü görüşme).

KKF' de kullanılan birçok mikroorganizma mezofiliktir. Optimum üreme sıcaklığı 20°C ile 40°C arasında değişmektedir. Maksimum üreme sıcaklığı ise



50°C'nin altındadır (Pandey et al., 2001).

### **Havalandırma ve Karıştırma**

KKF ile üretimlerin büyük çoğunluğu aerobik koşullarda gerçekleştirilmektedir. Gaz fazı katı partiküller ile temas halindedir ve katı partikül üzerindeki sıvı tabakasına oksijen transferi için oldukça geniş bir yüzey alanı mevcuttur. KKF' de ana hedef, partiküller arasında yüksek oksijen bulunmasını sağlarken aynı zamanda karbondioksit miktarının da düşük seviyede tutulmasıdır (Desgranges and Durand, 1990). Partiküller arası boşluktan oksijen alımı 4 ana basamakta gerçekleşir:

- Oksijenin partiküller arasındaki yoğun fazdan partikül yüzeyindeki durgun gaz film tabakasına transferi,
- Oksijenin durgun gaz tabakasından substrat yüzeyindeki sıvı tabakasına transferi,
- Misellerin konumuna bağlı olarak mikroorganizmanın oksijeni substrat yüzeyindeki durgun gaz tabakasından ya da sıvı tabakasından bünyesine alması,
- Oksijenin substrattaki sıvı tabakasından partikülün iç kısmına geçişi (Mitchell and Berovic, 1998).

Havalandırmada göz önünde bulundurulması gereken önemli bir nokta da biyoreaktöre giren havanın kalitesi ve nemidir. Doymuş hava kullanımı substratın kurummasını ve su aktivitesinin düşmesini önlemede yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Ancak bu uygulama her zaman tavsiye edilmemektedir. Havalandırmanın bir fonksiyonu da fermentasyon sırasında oluşan ısıyı uzaklaştırmaktır (Murthy et al., 1993). Suyun buharlaşması ve çevre ile yapılan ısı transferi işlemleri fermentasyon sıcaklığını istenilen düzeyde tutmayı sağlayan işlemlerdir. Dolayısıyla nemin korunması ve aynı zamanda ısının uzaklaştırılması gibi çelişkili iki durum söz konusudur (Mitchell et al., 1999).

KKF' de heterojen yapıyı değiştirmek ve iyileştirmek amacıyla yapılabilecek işlemlerden birisi de karıştırma işlemidir. Karıştırma, oluşan sıcaklık gradyanlarını ortadan kaldırarak homojen bir yapı meydana getirmeyi sağlar. Ancak özellikle fungal kültürlerin kullanıldığı sistemlere karıştırma uygulandığında misellerin zarar gördüğü belirtilmektedir (Purkarthofer et al.,

1993). Bu sorunun üstesinden gelmek için kesikli bir karıştırma işlemi uygulandığı durumlarda daha olumlu sonuçlar alındığı belirtilmektedir (Kalegoris et al., 2003).

### **Mikroorganizmalar**

Funguslar dışında nadiren de olsa maya ve bakterilerin kullanıldığı katı kültür ya da yarı katı kültür fermentasyonları yolu ile üretimler de yapılmaktadır.

Mayalar genel olarak katı substratlar üzerinde üreyebilen mikroorganizmalar içinde funguslardan sonra ikincil tercih edilen mikroorganizmalardır. Anaerobik koşullarda tarımsal ürünlerin % 60- 75 nem oranında fermente edildiği silaj işleminin erken aşamalarında mayaların etkisi söz konusudur. *Saccharomyces cerevisiae* ‘nın elma küspesi, şeker pancarı ve üzüm küspesi kullanılarak etil alkol üretiminde yarı katı kültürde kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca çeşitli nişastalı substratların proteince zenginleştirilmelerinde mayalar kullanılmaktadırlar (Mitchell and Berovic, 1998).

Bakteriler de KKF’ de birincil ya da ikincil mikroorganizmalar olarak önem taşımaktadırlar. Laktobasiller, silaj işleminde önemli rol oynamaktadırlar. *Bacillus subtilis*, “Natto” isimli fermente yiyecekte soya fasulyesi üzerinde yapışkan bir tabaka oluşturmaktadır (Raimbault, 1998). Bunun yanı sıra özellikle *Bacillus* sp. bakterilerin enzim üretiminde kullanıldığı KKF çalışmaları da bulunmaktadır (Babu and Satyanarayana, 1995; Archana and Satyanarayana, 1997). Bakterilerin KKF’ de neden olduğu problem ise, geleneksel fermente gıda maddelerinin üretiminde ve diğer fungal KKF üretimlerinde kontaminasyona neden olmalarıdır.

#### **2.7.1.2KKF’ nin sıvı ortamda üretimlerle karşılaştırılması**

KKF yönteminin kullanımının derin kültür üretim tekniğinin kullanıldığı sistemlere göre çeşitli avantajları vardır. Sistemin avantajları şu şekilde sıralanabilir:

- Kolay elde edilebilir ve ucuz substratların kullanımı,
- Düşük su tüketimi ve substratın daha konsantre olması,
- Doğrudan spor inokule edilmesi nedeniyle ön aşı hazırlama tankına ihtiyaç duyulmaması,

- Düşük nemli substrat üzerinde bakteri kontaminasyonu riskinin düşük olması,
- Substrat partikülleri arasında bulunan boşluklar nedeniyle havalandırmaya müsait olması,
- Ekstraksiyon işlemi için az miktarda ekstraksiyon sıvısının yeterli olması. Elde edilen ürünün derişik olması nedeniyle alt akım işlem maliyetinin düşük olması,
- Verimin derin kültür fermentasyonuna eşit ya da daha yüksek olması,
- Sıvı atık miktarının ya çok düşük olması ya da hiç olmaması,
- Üretimin ardından kalan katı kısmın hayvan yemi olarak değerlendirilebilmesi (Haltrich et al., 1993; Raimbault, 1998; Mitchell and Berovic, 1998; Pandey et al., 2001),
- Katı kültür fermentasyon tesisi, aynı kapasitede bir derin fermentasyon tesisine oranla önemli ekonomik avantajlar içermektedir. Üretilen ürünün tipine göre:
  - ✓ Toplam yatırım %50-80 oranında daha düşüktür.
  - ✓ Enerji giderleri %30-60 arası daha azdır
  - ✓ Ana hammadde % 50-70 oranında daha ucuzdur (Pandey et al., 2001).

### 2.7.2 Sıvı kültür ortamında biyokütle üretimi

Yaygın iki yöntemden biri olan sıvı ortamda üretim daha az sporlanma oluşumu sağlamasına rağmen, birçok araştırmacı tarafından daha yaygın uygulanmaktadır. İş gücü, ölçek büyütme, proses kontrolü, verimlilik, malzeme bakımı (pompalar, basınçlı hatlar, vb.), önceden var olan büyük ölçek olanakları ile uyumluluk gibi sıvıda üretimin bazı olumlu özellikleri, birçok araştırmacıyı katı kültür fermentasyonu yerine sıvı ortamda üretimi sürdürmeye teşvik etmektedir (Verma et al., 2007).

*Trichoderma* türleri çeşitli propagül üretmektedir. Bunlar; hifler (miseller), klamidosporeler (batık sporlar), havasal sporlardır (konidyumlar). Ancak, katı ortam üzerinde üretilen havasal sporlar büyük ölçekli üretimler için uygun değildir çünkü, kültürleri optimum sıcaklık ve hava akımı koşullarında sürdürmek zordur. Sıvı fermentasyonu genellikle bu funguslardan batık sporları elde etmek

için kullanılmaktadır. Biyolojik kontrol ajanlarının pratik uygulamaları üzerine yapılan en güncel çalışmalar, dayanıklılığın ve ekonomikliğin garantisini verebilecek sporların üretimi üzerinedir (Watanabe et al., 2006).

Devam eden araştırmalar, sıvı fermentasyonu boyunca çeşitli tekniklerin sporlanmayı arttırmaya yardımcı olabildiğini göstermektedir. Örneğin, fungal morfoloji ve fermentasyonun genel gidişatı, öncelikli olarak aşı derişimi, tipi (spor ya da vejetatif) ve yaşı tarafından etkilenmektedir. *Trichoderma* türlerinin sporlanması, substratlar olarak kullanılan karbon ve azot kaynaklarının yapısından geniş ölçüde etkilenmektedir. Ayrıca sporlanmada ve konidyum oluşumunda, ortamdaki karbon:azot (C:N) oranı değerlerindeki değişiklik de yararlı olabilmektedir. Bazı tetikleyici ajanların incelenmesi de sporlanma prosesine yardımcı olmaktadır. Bu ajanlar metal iyonları (örneğin, manganez iyonları), ya da kompleks organik bileşikler olabilir. Yenilenebilir atıklardaki çeşitli metaller ve bazı kompleks bileşikler, yüksek spor derişimlerine ulaşılmasında yardımcı olabilmektedirler. Sıcaklık gibi çevresel parametreler, sporulasyon için daha az kritik parametrelerdir. Aynı zamanda ortamın pH'sı sporlanmada önemli bir rol oynamaktadır. Çözünmüş oksijen ve çözünmüş karbondioksit de ayrıca kültürdeki kütle transferi ile ilişkili stres koşullarını etkileme yoluyla sporlanmanın indüklenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Verma et al., 2007).

Yüzey kültürü fermentasyonu olarak ta adlandırılan statik sıvı kültür fermentasyonunda filamentli fungus besi ortamının yüzeyinde üremektedir (Abbasi and Fazaelpoor, 2010) ve fungusların doğada filamentli oluşları ve karıştırmanın misellere zarar vermesi nedeniyle güçlü bir çalkalama veya fiziksel karıştırmaya gerek duyulmamaktadır (Noh et al., 2012). Mikroorganizma, gerekli besinleri ortamdan alır ve ürünlerini ve artıklarını sıvıya bırakır. Bu fermentasyon metodu, besi ortamı içinden havalandırmaya ve karıştırmaya gerek duymama ve biyokütlenin sıvı ortamdan kolayca ayrılabilmesi gibi özelliklere sahiptir ancak aynı zamanda biyoreaksiyon hızı derin kültür fermentasyona göre düşüktür ve bu dezavantaj nedeniyle sıvı kültür üretimlerde öncelikle derin kültür fermentasyon tercih edilmektedir. Yine de statik sıvı kültürün, verimliliği arttırmaya yönelik modifiye edilmesi oldukça fazla düşünülmektedir. Statik sıvı kültür çalışmaları sadece kesikli sistemle gerçekleştirilebilmektedir (Abbasi and Fazaelpoor, 2010). Ekipman, elektrik tüketimi ve yüksek verim ve verimlilik değerleri gibi önemli

parametreler, özellikle maliyet açısından değerlendirildiğinde yüzey fermentasyonunu derin kültür fermentasyona göre ön plana çıkarabilmektedir (Darouneh et al., 2009).

Çizelge 2.2' de sıvı besi ortamlarında *Trichoderma* türlerinin üretiminde kullanılan birtakım substratlar gösterilmiştir.

**Çizelge 2.2. Sıvı ortamda *Trichoderma* türlerinin üretiminde kullanılan substratlar (Ramanujam et al., 2010).**

Substrat	Kaynak
Melas ve bira mayası	Sankar and Jeyarajan, (1996)
Patates dekstroz broth, V-8 suyu ve melas-maya ortamı	Prasad and Rangeswaran, (1998)
Melas-soya ortamı	Prasad and Rangeswaran, (2000)
Palmiye şekeri-soya ortamı	Prasad et al., (2002)

## 2.8 Katı Kültür ve Statik Sıvı Kültür Fermentasyonunda Ölçek Büyütme

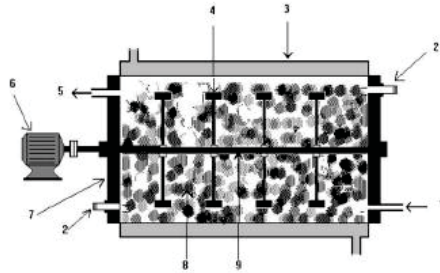
### 2.8.1 Reaktör tasarım parametreleri

- Reaktör yapımında kullanılacak materyal korozyona karşı dayanıklı ve sağlam olmalı, üretim mikroorganizmasına toksik etki göstermemelidir.
- Kontaminasyona neden olabilecek mikroorganizmaların sisteme girişine izin vermemeli, aynı zamanda üretimde kullanılan mikroorganizmanın çevreye yayılmasına engel olacak ekipmanları içermelidir.
- Üretim parametrelerinin (sıcaklık, su aktivitesi, gaz fazı oksijen konsantrasyonu) kontrolü için efektif havalandırma, karıştırma ve ısı uzaklaştırma sağlamalıdır.
- Fermentasyon ortamında homojenite sağlanmalıdır.
- Substratın hazırlanması, sterilizasyon, inokulasyon, ürünün kazanılması, yükleme ve boşaltma işlemlerine uygun olmalıdır.
- Ekonomik olmalıdır (Durand, 2003).

## 2.8.2 Katı kültür fermentasyonu için biyoreaktörler

### 2.8.2.1 Yatay tamburlu biyoreaktörler

Katı ortamın karıştırıldığı sistemdir ve döner tamburlu, gözenekli tamburlu ve yatay karıştırıcılı tipleri bulunmaktadır (Şekil 2.2). Hem biyoreaktör duvarı ile besi ortamı arası teması artırarak ısının uzaklaştırılmasını kolaylaştırmak hem de mikroorganizmalara oksijen sağlanmasının artırılması amacıyla karıştırma yapılmaktadır (Durand, 2003).

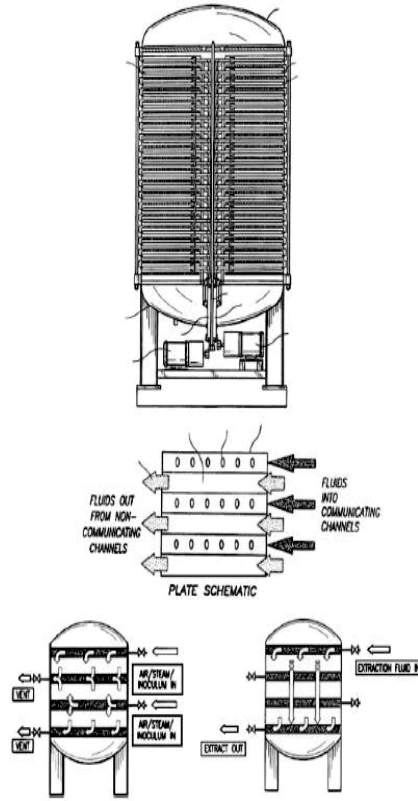


Şekil 2.2. Yatay Karıştırıcılı Biyoreaktörün Şematik gösterimi. (1) Hava girişi, (2) sıcaklık problemleri, (3) Ceket, (4) Pedallar, (5) Hava çıkışı, (6) Karıştırıcı motoru, (7) Biyoreaktör, (8) katı ortam, (9) shaft (Durand, 2003).

Bu tip biyoreaktörler sıcaklık ve nem içeriğinin eşzamanlı kontrol edilebilmesi için kullanılmaktadır. Her ne kadar biyoreaktörün ısı uzaklaşması artsa da büyük ölçeklerde sadece duvardan ısı uzaklaştırılması yeterli gelmeyecektir ve ilave yöntemlerin eklenmesi gerekecektir. Ayrıca sistemin en önemli dezavantajı ise tambur kapasitesinin %30'undan fazlasının doldurulamamasıdır. Aksi takdirde karıştırma efektif olarak yapılamamaktadır (Durand, 2003).

### 2.8.2.2 Tepsili biyoreaktörler

Ağaç, bambu ve tel ağ gibi malzemelerden imal edilmiş statik düz tepsilerden meydana gelmektedir. Tepsilerin alt kısımları veya yan tarafları düzenli hava akımının sağlanması amacıyla delikli olarak yapılabilmektedir. Şekil 2.3' te tepsili biyoreaktörlerin şematik gösterimi verilmiştir (Mitchell et al., 2000).



Şekil 2.3. Tepsili biyoreaktörlerin şematik gösterimi (Durand, 2003).

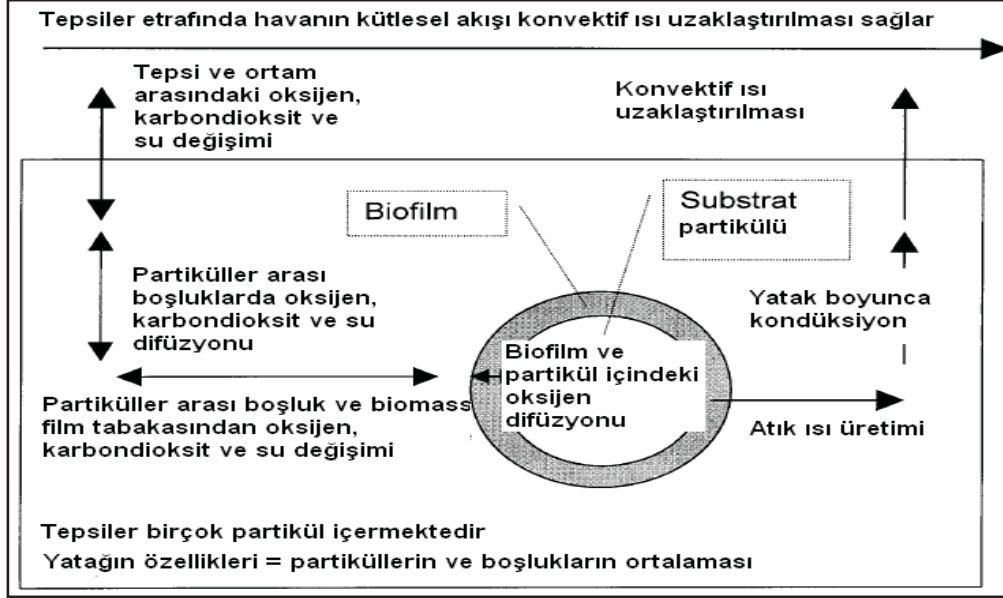
Sıcaklığı ve bağıl nemi kontrol altında bulunan hava, tepsilerin etrafında sürekli olarak sirküle edilmektedir. Su soğutmalı ısı değiştirici sistemleri de sisteme uygulanabilmektedir. Substratlar ince bir tabaka (birkaç cm) halinde düz tepsilere yayılmaktadır. Hava sirkülasyonu güçlü bir şekilde uygulanmamaktadır. Karıştırma işlemi kesikli olarak elle yapılabilmektedir. Genellikle substrat günde birkaç kez karıştırılmaktadır (Mitchell et al., 2000).

Biyoreaktörün tasarımında bazı sınırlamalar vardır:

- Tepsilerdeki kütle ve ısı transferi kısıtlamaları sistem verimini etkilemektedir. Şekil 2.4'te tepsili biyoreaktörlerde ısı ve kütle transferi şematik olarak anlatılmıştır.
- Proses sırasında sistemde sıcaklık ve oksijen gradientleri oluşabilmektedir.
- Tepsi yüksekliğinin artırılması ile verim arttırılamamaktadır. Tepsi yüksekliği birkaç santimetreyi (5 cm) aşmamalıdır.

Tepsi alanının veya sayısının artırılması ile ölçek büyütme sorunları aşılabilir. Fakat çok sayıda tepsiye ihtiyaç duyulması ve çok yer kaplaması

nedeniyle büyük ölçekli proseslerde fazla tercih edilmemektedir (Mitchell et al., 2000).



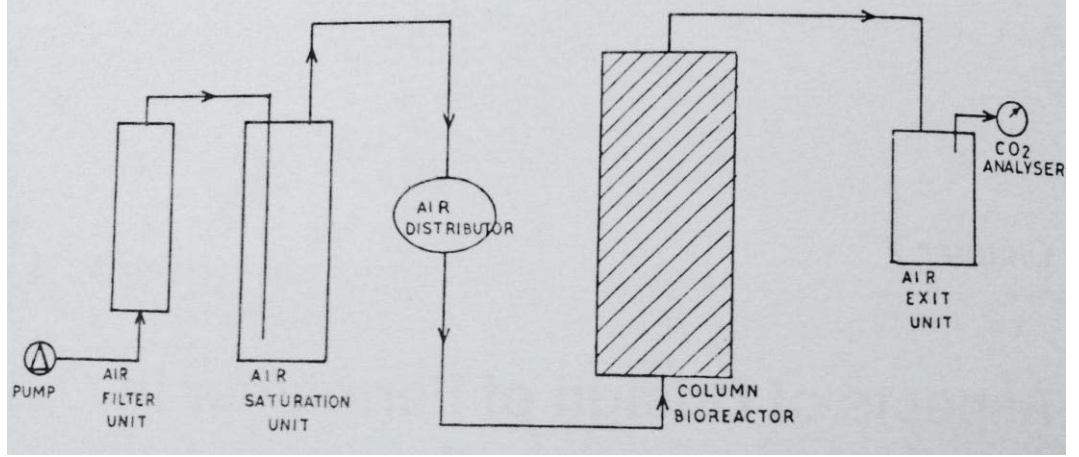
Şekil 2.4 Tepsili biyoreaktörlerde kütle ve ısı transferi olayları (Mitchell et al.,2000).

Tepsili biyoreaktörler genellikle katı kültür fermentasyonu için kullanılmaktadır (Mitchell et al., 2000). Bu çalışmada hem katı kültür hem de statik kültür fermentasyonunda ölçek büyütme amaçlı kullanılmıştır.

### **2.8.2.3Kolon biyoreaktörler**

Her iki ucunda kapağı olan plastik ya da camdan yapılmış biyoreaktörlerdir. Üretim için gerekli hava, biyoreaktör sistemine alttan beslenir ve oluşan gaz, biyoreaktörün üst kısmından dışarı salınır (Şekil 2.5). Sisteme ilave edilecek bir gaz ölçüm sistemiyle çıkış gazı analiz edilerek üretimle ilgili tahminler ve hesaplamalar yapılabilir. Düzeneğe eklenebilecek bir ceket sistemiyle üretim süresince yatak içerisindeki sıcaklık sabit tutulabilir. Ceket sistemi yerine biyoreaktörün boyutlarına göre su banyosu içerisine biyoreaktörün yerleştirilmesi ile de sıcaklık kontrollü çalışma imkanı sağlanabilir. Kolon tipi biyoreaktörler çoğunlukla laboratuvar ölçeğinde birtakım enzimlerin, organik asitlerin, sekonder metabolitlerin, sporların, vb. üretimlerinde kullanılmaktadır (Pandey et al., 2001).





Şekil 2.5. Katı kültür fermentasyonu için kolon tipi biyoreaktörün şematik gösterimi (Pandey et al., 2001).

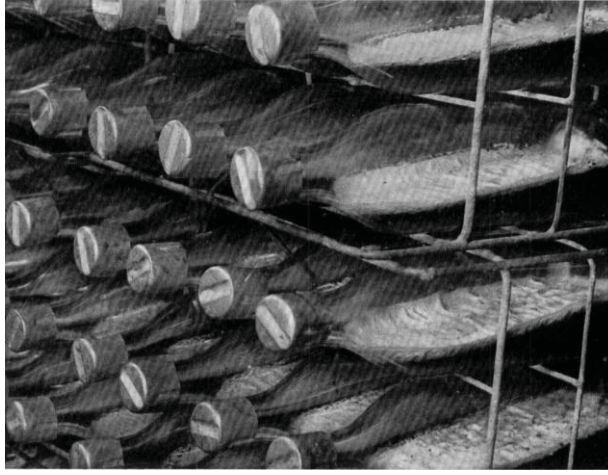
#### 2.8.2.4 Diğer biyoreaktörler

Birçok araştırmacı tarafından birçok farklı tipte ürünün üretimi için tasarlanmış, ancak temeli tepsili ya da tamburlu tipteki biyoreaktörlere dayanan birtakım biyoreaktörler bulunmaktadır. Biyoreaktörlerin tasarımlarında mikron gözenekli polipropilen gibi farklı malzemelerin kullanılmasıyla kontaminasyona imkan tanımadan etkin havalandırma ve nem geçişi sağlanabilmektedir (Pandey et al., 2001).

#### 2.8.3 Statik sıvı kültür fermentasyonu için biyoreaktörler

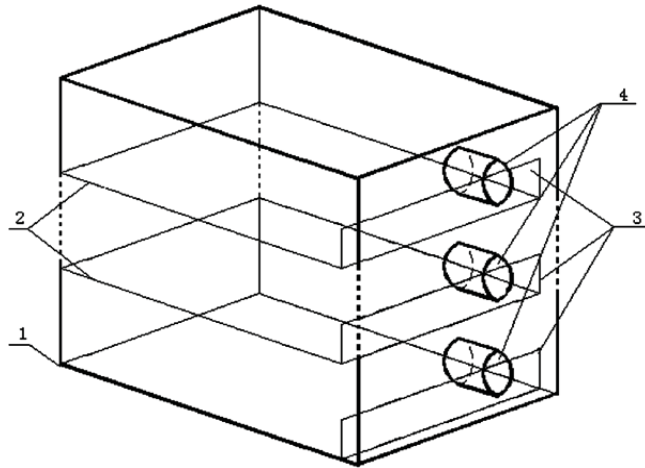
Statik sıvı kültür, derin kültürle gerçekleştirilen üretimlerin maliyetini azaltmak için denenen potansiyel alternatif bir üretim yöntemidir ve günümüzde özellikle sitrik asit üretiminde endüstriyel ölçekte kullanılmaktadır (Darouneh et al., 2009).

Büyük ölçekli üretimler için, çok sayıda cam şişe içinde yatay olarak üretim (Şekil 2.6) ya da katı kültür fermentasyonu için kullanılabileceği gibi (Darouneh et al., 2009), döner disk reaktör düzeneğinin şaftı çıkarılarak elde edilen tepsi benzeri düzenek de kullanılabilir (Pa'e et al., 2011).



Şekil 2.6 Statik sıvı kültürde kullanılan cam şişe üretim sistemi (Ainsworth et al.,1947).

Tang and Zhong, 2003, statik sıvı kültürde *Ganoderma lucidum*' dan ganoderik asit üretiminde ölçek büyütme çalışması için 7,5 L hacimli çok tabakalı statik biyoreaktör tasarlamışlardır (Şekil 2.7). Statik sıvı kültürdeki kısıtlı kütle transferi ve hücrelerin  $O_2$ ' e ulaşmadaki zorlukları, derin kültür üretimlerde ise karıştırma ve havalandırmaya bağlı oluşan kayma gerilimi vb. olumsuz etkiler nedeniyle Yasuhara et al.,(1994) membran yüzey sıvı kültürü isimli yeni bir yöntemden bahsetmişlerdir. Bu üretim sisteminde funguslar havayla temas halindeki mikrogözenekli membran üzerinde çoğalırlarken ters taraftan da sıvı ortamla temas halindedirler. Membran yüzey sıvı kültürü hem derin kültürün hem de sıvı yüzey kültürünün avantajlarını içermektedir (Mohamad et al., 2010).



Şekil 2.7. Çok tabakalı statik biyoreaktörün şematik diagramı: (1) Küp şekilli kap; (2) arayüzey paravanı; (3) yan ayırıcılar; (4) inokulasyon ve örnek hattı (Tang and Zhong, 2003).

#### 2.8.4 Mikrobiyal biyokütle ölçüm yöntemleri

Derin kültür, katı kültür ve yüzey kültürü gibi birçok fermentasyon tekniği ve kesikli, kesikli beslemeli ve sürekli gibi biyoreaktör çalışma modları, birçok fermentasyon prosesinin gerçekleştirilmesi için geliştirilmiş ve kullanılmaktadırlar (Mohamad et al., 2010). Ancak fermentasyon prosesini karakterize etmek için parametrelerin etkilerini göz önünde bulunduran tasarımlar, genellikle proses tipini dikkate almamaktadırlar. Halbuki farklı parametreleri belirlemek, yardımcı matematiksel çıkarımları yapabilmek ve istatistiksel açıdan değerlendirebilmek amacıyla orijinal verileri elde etmek için gerekli yol, bu tip proseslerin tipleriyle oldukça alakalıdır (Pandey et al.,2001).

Bir biyokimyasal proseste gözlenen en önemli kinetik model, zamana karşı biyokütle sentezini takip etmektir. Bu, sıvı kültür üretimlerde, direkt yöntemlerle belirli zamanlarda biyokütlenin ölçümü yoluyla kolayca yapılabilir. Bu yöntemler; doğrudan hücre sayımı, kuru ağırlığın belirlenmesi veya optik yoğunluk ölçümüdür (Pandey et al.,2001).

Fakat maalesef bu yöntemlerle proses parametrelerinin belirlenmesi katı kültür fermentasyonunda, biyokütlenin kısmen ya da tamamen besi ortamına yapışık halde üremesi nedeniyle imkansızdır. Bu durum biyokütlenin ölçülmesinde oldukça önemli zorluklar çıkarmaktadır (Pandey et al.,2001).

Statik kültür de katı kültüre üretim yöntemi olarak benzeyen bir yüzey kültürü metodu olup sıvı ortama bir karıştırma ve çalkalama uygulanmaz ve bu tip üretimlerde de pH, sıcaklık ve çözülmüş oksijen gibi proses parametrelerinin görüntülenmesi (Pa'e et al., 2011) ve kontrolü oldukça zordur (Mohamad et al., 2010). Bu nedenle statik kültür fermentasyonunun ticari boyutta ölçek büyütmesi oldukça zahmetli, yorucu ve masraflı olabilmektedir ve statik kültürdeki birçok kısıt, derin kültürde karıştırmalı tank tipi biyoreaktör kullanımı ile giderilmeye çalışılmaktadır (Pa'e et al., 2011).

Heterojen yapıdaki sistemlerde çok daha özenli örnek alımı gerekmektedir ki bu durumla derin kültür ya da benzeri homojen karakterli üretimlerde karşılaşılmamaktadır.

Belirtilen bu nedenlerle, biyokütle ölçümü için birtakım metodlar geliştirilmiştir ki bunlar direkt ve indirekt metodlar olarak ikiye ayrılmaktadırlar.

Direkt ölçümler, biyokütlenin doğrudan ortamdan ayrılmasına dayanır ve derin kültürdeki normal standart hücre sayım prosedürleriyle (canlı hücre sayımı, vd) sonuç elde edilir. Bu yöntemdeki ana problem, biyokütlenin kalan substrattan tam olarak ayrılmasıdır. Bunun için zararsız birtakım kimyasallar (Tween 80 gibi) kullanılabilir, ancak misel üretiminin gerçekleştirildiği durumlarda biyokütleyi tam olarak ayırmada yetersiz kalabilmesi nedeniyle metod yeterince uygulanabilir olmamaktadır.

Bu nedenle ortaya çıkan indirekt ölçüm yönteminde ise substrat içerisinde bulunmayan, hücre ya da misel özü bir bileşenin, alınan örnekte belirlenmesine dayanmaktadır. Bu ölçüm yöntemleri arasında;

- a. Glukozamin içeriğinin belirlenmesi
- b. Ergosterol metodu
- c. DNA belirleme
- d. Protein belirleme

bulunmaktadır. Ancak tüm bu yöntemler, uygun şekilde örnek alınmasına dayanmaktadır. Bununla birlikte bazı özel proseslerde örnek alımı sırasında biyokütle ya da miseller zarar görebilmektedir. Bu durum, prosesi modifiye etmek ya da kontrol etmek için değerlendirilmesi gereken bir yanıt elde edilmesine engel olmaktadır.

Metabolik Gaz Dengesi Metodu ise örneğin yeterliliği ve biyokütle ya da misellerin zarar görmesi sorununun üstesinden gelmektedir ve aynı zamanda eş zamanlı ve hızlı veri sağlayan bir yöntemdir. Aslında bu yöntem, proses kinetiklerinin doğrudan ölçümü olarak değerlendirilebilmektedir. Aerobik bir sistemde  $O_2$  tüketimi ve  $CO_2$  oluşumu biyokütle sentezi ile doğrudan ilişkilidir. Ayrıca biyokütlenin belirlenebilmesi için de indirekt bir metoddur. Anaerobik bir sistemde açığa çıkan  $CO_2$ , alkol fermentasyonunda olduğu gibi biyokütle sentezinin ve bağlı ürün oluşumunun doğrudan belirteçidir (Pandey et al.,2001). En güvenilir ve kesin sonuçları veren bir tekniktir ancak gaz analizörü ve problemleri gibi oldukça hassas ekipmana ihtiyaç duyulmaktadır, o nedenle küçük çaplı üretimler dışında en ideal seçenek olarak görülmemektedir, çünkü gazların giriş ve çıkış gaz akımlarındaki konsantrasyon farkları, oldukça kısa temas süresi nedeniyle her zaman ölçülebilecek kadar farklı çıkmamaktadır (Garcia-Ochoa et al., 2010).

## 2.9 *Trichoderma* Türü Biyolojik Kontrol Ajanlarının Ticarileşmesindeki Kısıtlar

*Trichoderma* türleri, peroksidaz ve lakkaz enzimleri bakımından zengin olan metabolitleri üretmelerine bağlı olarak biyoremediasyon amaçlı kullanılmaktadırlar. *Trichoderma* türlerinin antagonistik etkileri ve çoğalmayı teşvik etmesi gibi olumlu özellikleri olmasına rağmen, yaygın olarak kullanılabilmesinde bazı engeller de bulunmaktadır;

- (i) Çoğu *Trichoderma* türüne dayalı biyolojik kontrol ajanı henüz tescil edilmemiştir ve bu fungusların iyi tanımlanmamış etki biçimi ve az gelişmiş biyolojik tayin yöntemlerine bağlı olarak, *Trichoderma* türlerine dayalı biyolojik kontrol ajanları yalnızca toprak destekleyicisi olarak pazarlanmaktadır. Ayrıca, *Trichoderma* türlerine dayalı biyolojik kontrol ajanlarının tescil edilmesi zaman alıcı ve pahalı bir işlemdir.
- (ii) Bu fungusların üretimi için kültür ortamında kullanılan glukoz, sakaroz, mısır islatma suyu, buğday kepeği, soya unu, balık unu gibi ham maddelerin çok pahalı olmaları
- (iii) düşük etkinlik
- (iv) düşük spor verimi
- (v) biyolojik kontrol ajanı aktivitesinin ölçülmesindeki zorluklar.

Tüm bu zorluklar araştırmacıları, *Trichoderma* türlerinin üretimi için uygun olabilecek tarımsal atıklar, endüstriyel atıklar ve kentsel atıklar gibi olası substratları araştırma konusunda cesaretlendirmiştir (Verma et al., 2007).

## 2.10 *Trichoderma* Türlerinin Pazar Potansiyeli ve Ticari *Trichoderma* Biyopreparatları

*Trichoderma* bazlı ürünlerin biyopestisit olarak markete sunulması için belli özelliklere sahip olması gerekmektedir;

- (i) Büyük ölçekte, düşük maliyetli propagül üretimine uygun olmalı,
- (ii) Yüksek propagül/vejetatif biyomas oranı vermeli,
- (iii) Biyokoruyucu, bozunma ve kontaminasyonu önlemek için yapılan kurutma gibi alt akım işlemlerine dayanıklı olup canlılığını koruyabilmeli,

(iv) Son ürün dondurmadan saklamaya uygun olarak uzun raf ömrüne ve stabiliteye sahip olmalı,

(v) Canlılığını her koşulda sürdürebilmesi için sıcaklık, nem, radyasyon ve nispi nem gibi beklenmedik çevresel şartlara uyum sağlama yeteneğinde olmalı,

(vi) Ticari olarak üretilebilmesi için farklı tarla koşullarında sürekli olarak etkinliğini korumalı (fermentasyon, biyoseperasyon ve formülasyon birbirine entegre olmuş tek bir proses şeması şeklinde düşünülmelidir) (Agosin and Aguilera, 2005).

Günümüzde *Trichoderma* türlerine dayanan ürünler, biyolojik kontrol ajanlarının yeni türleri olarak düşünülmektedir. *B. thuringiensis* (Bt) (tüm biyopestisitlerin yaklaşık % 97' sini oluştururlar) biyopestisitleriyle karşılaştırıldığında, *Trichoderma* türlerine dayalı biyolojik kontrol ajanlarının pazar payları oldukça azdır. Viral ve nematodlara dayanan biyopestisitleri de kapsayan kalan % 3'lük pazar payında yer almaktadırlar. Ayrıca, gerçek pazar payları belirsizdir ve kayda geçmemiş biyofungisitlerin yanı sıra kayıtlı olanlara dayanan dağılık bilgilere de ulaşılabilir. Bununla birlikte, *Trichoderma* türlerine dayanan biyolojik kontrol ajanları, fungal temelli tüm biyolojik kontrol ajanlarının içinde % 60 pazar payına sahiptir ve artan sayıda *Trichoderma* türlerine dayalı biyolojik kontrol ajanı ürünleri düzenli bir şekilde kayıtlanmaktadır. Ayrıca, dünyanın her tarafında arazi uygulamaları kabul edilmektedir ve biyopestisit şirketlerinin çoğu ise bu ürünleri düzenli olarak ve sürekli onaylamaktadırlar. *Trichoderma* türlerine dayanan biyolojik kontrol ajanlarının doğal özellikleri (eşzamanlı biyokontrol ve çoğalma teşviki) başarılarının devamlı olarak artmasını sağlayan etmenlerdir (Verma et al., 2007).

## 2.11 Formülasyon

Genellikle katı ya da sıvı ortamda üretilen ürün, kullanımdan önce karmaşık formülasyon prosedürlerine ihtiyaç duymadan hazırlanır. Örneğin, *Trichoderma*'nın büyüebildiği tahıllar ya da diğer organik maddeler basitçe kurutulur, öğütülür ve istenen alana uygulanır (Ramanujam et al. 2010). Sıvı ortamda üretilen biyokütle ise fermentasyonun ardından, çeşitli filtrasyon yöntemleri (basıncılı filtrasyon, döner vakum filtre), santrifugasyon ya da bazen flokulasyon ile ortamdan ayrılır. Ayrılan biyokütle konsantre edilebilir ya da ortamla beraber

biyokütlenin tümü çöpler, granüller, pelletler, ıslanabilir tozlar ve emülsifiye edilebilir sıvılarla karıştırılabilir (Whipps and Lumsden, 1994; Ramanujam et al. 2010). Bu taşıyıcı materyal inert ya da gıda temelli ya da ikisinin kombinasyonu şeklinde olabilir. *Trichoderma* spp. pelletler, çöpler ve tozlar şeklinde formüle edilebilir. Bitki hastalıklarına karşı biyolojik kontrolde kullanılan birtakım *Trichoderma* formülasyonları şu şekildedir;

- Talk bazlı formülasyon
- Vermikülit-buğday kepeği bazlı formülasyon
- Pesta granülleri
- Buğday unu-kaolin
- Aljinat-buğday unu
- Preslenmiş şekerli çamur
- Kahve kavuzu
- Yağ temelli formülasyonlar (Ramanujam et al. 2010).

Kurutma prosesi biyokütlerdeki propagüllerin canlılığını etkileyebilir. Örneğin, havayla kurutma, püskürtmeli kurutma ve liyofilizasyon ile kurutulmuş *Trichoderma* biyokütlerinin canlı kalan propagül sayıları farklıdır. Genelde, en yüksek canlılık, bu üç yöntem arasından en kullanışsız ve en etkisiz olanı, havayla kurutmadan sonra elde edilmiştir. Ne var ki, diğer birçok uygulamada başarıyla kullanılan liyofilizasyon sonrasında en düşük canlılık gözlenmiştir. Benzer sonuçlar diğer biyokontrol fungusları için de belirtilmiştir (Whipps and Lumsden, 1994).

Zirai potansiyeli olan bir biyokontrol formülasyonu, hazırlama ve uygulama kolaylığı, stabilite, yeterli raf ömrü, bol miktarda üreyebilir propagül ve düşük fiyat gibi istenen özelliklere sahip olmalıdır. Preparat, 6 ay ile 2 yıl arasında stabil olmalı, mümkünse taşıma sırasında birkaç saat için yüksek sıcaklıklara (50°C kadar) dayanmalıdır. Formülasyondan son kullanıma kadar hazırlığın fiziksel, kimyasal ve biyolojik bütünlüğü sağlanmalıdır (Whipps and Lumsden, 1994).

Biyokontrol ajanının üretimi, formülasyonu ve uygulanmasının her aşamasında kontrol hastalıklarına karşı antagonist etkinliğini belirlemek için biyolojik deney sistemleri ile dikkatli gözlemler yapılmalıdır (Whipps and Lumsden, 1994).



### 2.11.1 Kurutma

Kurutma kimya, ziraat, biyoteknoloji, gıda, polimer, seramik, ilaç, kağıt mineral işleme ve odun işleme endüstrilerinde kullanılan temel bir işlemdir. Belki de en yaygın, en eski ve en çok çeşitliliğe sahip kimya mühendisliği birim işlemlerinden biridir (Mujumdar, 2007).

Kurutma, genel olarak katı bir ürün oluşturmak için uçucu bileşenlerin (nem) ısıl olarak uzaklaştırılması prosesi şeklinde açıklanır. Zayıf kimyasal bileşimlerde tutulan nem, katıda sıvı bir çözelti yada katının mikroyapısında saklı olarak bulunur. Katının mikroyapısında bulunan nem **bağlı nem** olarak adlandırılır ve saf sıvılardan daha düşük buhar basıncı gösterir. Bağlı nem haricindeki nem içeriği **serbest nem** olarak adlandırılır (Mujumdar, 2007).

Islak bir katı ısıyla kurutulduğunda, iki eş zamanlı proses gerçekleşir:

1. Yüzey nemini buharlaştırmak için çevreden enerji transferi (çoğunlukla ısı olarak)
2. Dahili nemin katı yüzeyine taşınması ve proses 1'e göre buharlaşması (Mujumdar, 2007).

Kurutma hızı, bu iki prosesin ilerleme hızına bağlıdır. Çevreden ıslak katıya enerji transferi kondüksiyon, konveksiyon, radyasyon ya da bu üçünün kombinasyonu şeklinde olabilir. Endüstriyel kurutucular, kullanılan ısı transferi yöntemine göre ayrılır. Birçoğunda ısı, ıslak katının yüzeyine ardından içine taşınır. Fakat, dielektrik radyo frekansı (RF) ya da mikrodalga dondurarak kurutmada enerji, önce katının içinde bunu takiben dış yüzeyinde ısı oluşturmak için uygulanır (Mujumdar, 2007).

Proses 1, suyun buhar olarak materyal yüzeyinden uzaklaştırılması, sıcaklık, havanın nemi ve akışı, uygulama yüzeyi ve basınca bağlıdır. Proses 2, nemin katı içinde hareketi, sıcaklığın, katının fiziksel yapısının ve nem içeriğinin bir fonksiyonudur. Bir kurutma işleminde, iki proses de eş zamanlı gerçekleştiği için bu proseslerden herhangi biri kısıtlayıcı faktör olarak kuruma hızını etkileyebilir (Mujumdar, 2007).

Kurutma için harcanan enerji, kimyasal proses endüstrileri için %5'in altında iken kağıt yapım işlemlerinde %35'tir (Mujumdar, 2007).



Kurutma, ısı uygulamasıyla sıvıyı buharlaştırarak katı, yarı katı yada sıvı hammaddeyi katı ürüne dönüştürür. Yalnız dondurarak kurutmada süblimleşme görülür (Mujumdar, 2007).

ARGE çalışmaları için kurutmayı çekici hale getiren özellikler aşağıda verilmiştir:

- Ürün büyüklüğü mikron ile desimetre arasında değişebilir
- Ürün gözenekliliği % 0-99.9 arasında değişebilir.
- Kurutma süresi 0,25s ile 5 ay arasında değişebilir.
- Üretim kapasitesi 0,10 kg/h ile 100ton/h arasında değişebilir.
- Ürün hızı 0 – 2000 m/min arasında değişebilir.
- Kurutma sıcaklığı sıvının üçlü noktasının altında yada kritik noktasının üstünde olabilir.
- İşlem basıncı milibardan 25 atm'e kadar değişebilir.
- Isı transferi sürekli yada aralıklı olarak konveksiyon, kondüksiyon, radyasyon yada elektromanyetik alanlarla olabilir (Mujumdar, 2007).

Kuruma, sıvının yüzeyden buharlaşmasıyla gerçekleşir. Katının içindeki sıvı, yüzeyden buharlaşmadan evvel yüzeye taşınmalıdır. Bunu için aşağıdaki mekanizmalardan herhangi birini kullanabilir:

- Eğer ıslak katı sıvının kaynama noktasının altındaki bir sıcaklıkta ise sıvı difüzyonu
- Eğer sıvı materyalin içinde buharlaşıyorsa gaz difüzyonu
- Eğer kurutma çok düşük sıcaklı ve basınçta gerçekleştiriliyorsa Knudsen difüzyonu
- Yüzey difüzyonu ( ispatlanmış olmasa da mümkündür)
- İçerideki buharlaşma hızı yüzeydeki buharlaşma hızını aştığında hidrostatik basınç farkı
- Yukarıdaki mekanizmaların kombinasyonları

Kurutma sırasında katının fiziksel yapısı değiştiğinde nem transferinin mekanizması da değişebileceği dikkate alınmalıdır (Mujumdar, 2007).

Biyokontrol ajanlarının kurutulmuş halde saklamaları kolaydır ve bu sayede formüle edilmeleri ve sıvı çözeltiler şeklinde uygulanmaları daha uygun hale gelmektedir ancak bu ticari *Trichoderma* türlerinin alt akım işlemlerinde kurutma

ve depolama sırasında hücre canlılığının korunması önemli bir sorundur (Sargın et al., 2013).

### 2.11.2 Depolama

Bir biyokontrol ajan biyofarmülasyonunun raf ömrü ve alandaki denemelerdeki başarısı, onun istenen şekilde pazarlanabilmesi için oldukça önemlidir (Sargın et al., 2013). Bununla beraber biyolojik kontrol ajanlarının ticari başarıları sadece biyoyararlılık veya raf ömürlerine değil aynı zamanda kolay elde edilebilirliklerine ve nispeten ucuz oluşlarına da bağlıdır (Kumar et al., 2013).

Genellikle organik gıda katkılarıyla karıştırılan antagonistler, inert ya da inorganik gıda katkılarıyla hazırlanan karışımlardan daha uzun raf ömürlerine sahiptirler. *Trichoderma*'nın kahve kavuzunda raf ömrü 18 aydan daha uzundur. Talk, torf, linyit ve kaolin temelli *Trichoderma* formülasyonları 3-4 aylık raf ömürlerine sahiptirler. Sankar and Jeyarajan and Ramabadran'ın (1996) çalışmalarında, talk formülasyonundaki canlı *Trichoderma* propagüllerinin sayısının, 120 günlük depolamanın ardından %50 azaldığı tespit edilmiştir. *T. viride* formülasyonlarının farklı renkteki polipropilen poşetlerde depolanması ile ilgili çalışmalarda en yüksek *T. viride* popülasyonuna, 100 mikron kalınlıkta, süt beyaz renkteki poşetlerde ulaşılmıştır. Üretim ortamına kitin ve gliserol gibi birçok yardımcı bileşenin eklendiği ve fermentasyonda logaritmik faz sonunda ısı şokunun uygulanarak *Trichoderma*'nın talk formülasyonlarının raf ömürlerinin 1 yılın üzerine uzatılmaya çalışıldığı birtakım çalışmalar sürdürülmektedir (Ramanujam et al., 2010).

### 3 MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Mikroorganizma

Bu çalışmada Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Küf Koleksiyonu'ndan temin edilmiş olan *Trichoderma harzianum* EGE-K38 suşu kullanılmıştır. Kültür tüp içerisinde patates dekstroz agarda (PDA) +4°C'de saklanmaktadır.

##### 3.1.2 Kullanılan besiyerleri, çözeltiler ve kimyasallar

*Trichoderma* izolatlarının geliştirilmesi ve spor oluşturulması, geliştirilen hücre ve sporların inokulum olarak hazırlanmasında, biyoreaktörlerde üretimlerin gerçekleştirilmesinden sonra canlı hücre sayısının belirlenmesinde kullanılan tüm besiyerleri, çözelti ve kimyasallar, 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Katı kültür ve sıvı kültür üretim ortamları ise buhar jeneratöründen kızgın buhar beslenerek biyoreaktör içerisinde 121 °C'de 30 dakika steril edilmişlerdir.

##### 3.1.2.1 Patates dekstroz agar (PDA)

*Trichoderma harzianum* EGE-K38 suşunun saklanması, geliştirilmesi ve sporlanma oluşumu için, ticari olarak hazır halde satılan Patates Dekstroz Agar (*Oxoid*, CMO 139) ortamı kullanılmıştır.

Bileşenin Adı	Miktarı
Patates Dekstroz Agar	39,0 g
Distile Su	1000 ml

##### 3.1.2.2 Dikloran gliserol (DG-18) agar

Mikropropagül sayısının belirlenmesi amacıyla yapılan dökme plaka işleminde *Trichoderma harzianum* EGE-K38 kolonilerinin sayılamayacak şekilde yaygın çoğalmasını kısıtlamak amacıyla ticari olarak hazır halde satılan DG-18 Agar (*Oxoid*, CM0729) ortamı kullanılmıştır. Ticari besiyeri, saf suda çözülüp kaynatılarak iyice homojenize edildikten sonra gliserol ilave edilerek (150 g) 121

°C’de 15 dak otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

### **3.1.2.3Katı kültür üretim ortamı buğday kepeği**

Buğday kepeği, diğer besi ortamı bileşenleriyle karıştırıldıktan sonra biyorektöre doldurulmuş ve biyorektörde kızgın buharla sterilize edilirken aynı zamanda nemlendirilmiştir. İstenen nem değerine getirmek için sterilizasyon sonrasında kuru hava beslemesi gerçekleştirilmiştir. Buğday kepeği İzmir’in Bornova ilçesinde bulunan Kadioğlu Değirmencilik AŞ’ den temin edilmiştir.

### **3.1.2.4Katı kültür üretim ortamı malt çimi**

Buğday kepeğine azot kaynağı olarak, Sargın et al’ in (2013) çalışmalarında optimize ettikleri şekilde, ağırlıkça 3:2 oranında (buğday kepeği: malt çimi) Türk Tuborg Bira ve Malt Sanayii A.Ş. İzmir fabrikasından temin edilen malt çimi eklenerek besi ortamı hazırlanmış ve teflon hortum parçalarıyla karıştırılarak biyorektöre doldurulmuş, ardından besi ortamı karışımı kızgın buhar beslemesi ile sterilize edildikten sonra nem içeriği istenilen oranda olacak şekilde kuru hava beslenerek ayarlanmıştır.

### **3.1.2.5Statik sıvı kültür üretim ortamı: Modifiye Czapek-Dox Medium**

#### **(MCM)**

<b>Bileşenin Adı</b>	<b>Miktarı</b>
Glukoz	8,0 g
Maya Ekstresi	7,0 g
NaNO <sub>3</sub>	2,0 g
KCl	0,5 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
FeSO <sub>4</sub>	0,01 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
Distile su	1000 ml (Harman and Jin, 1991).

Besiyeri içerikleri distile suda çözülüp manyetik karıştırıcıda homojenize edildikten sonra tepsilere aktarılmıştır ve biyoreaktör içerisinde kızgın buharla

121 °C de 30 dk sterilize edilmiştir.

### **3.1.2.6 Tween 80 çözeltisi (% 0,1' lik)**

Biyoreaktörlere spor inokulasyonu yapmak için agarlı besi ortamında çoğaltılan sporları ortamdaki toplamak ve biyoreaktörde gerçekleştirilen üretimler sırasında biyoreaktörden alınan örneklerde canlı sayım yapabilmek için gerçekleştirilen seri seyreltmelerde kullanılmak üzere 1 mL Tween 80, 1L saf suda çözündürülmüştür ve kullanım alanına göre Erlenmayer flaklara ya da tüplere ölçülerek paylaştırılmıştır.

### **3.1.2.7 Katı ve sıvı kültür üretim ortamının başlangıç pH değerinin düzenlenmesinde kullanılan çözeltiler**

#### ***5 N Hidroklorik Asit (HCl) Çözeltisi***

Katı kültür üretim optimizasyonu çalışmalarında başlangıç ortam pH'sının ayarlanmasında kullanılmak üzere 100 ml 5 N HCl çözeltisi hazırlamak için 58,6 ml saf su içerisine 41,4 ml % 37'lik HCl eklenerek 100 ml' ye tamamlanmıştır.

#### ***5 N Sodyum Hidroksit (NaOH) Çözeltisi***

Katı kültür üretim optimizasyonu çalışmalarında başlangıç ortam pH'sının ayarlanmasında kullanılmak üzere 100 ml 5 N NaOH çözeltisi hazırlamak için 20 g NaOH tartılarak saf suyla 100 ml tamamlanmıştır.

#### ***1 N Sodyum Hidroksit (NaOH) Çözeltisi***

Sıvı kültür üretim optimizasyonu çalışmalarında başlangıç ortam pH'sının ayarlanmasında kullanılmak üzere 100 ml 1 N NaOH çözeltisi hazırlamak için 4 g NaOH tartılarak distile su ile 100 ml' ye tamamlanmıştır.

### **3.1.3 Kullanılan cihazlar**

#### **3.1.3.1 Hassas terazi**

Precisa XB22A hassas terazi, kullanılan besiyeri ve karışımların hazırlanmasında kullanılmıştır.

### **3.1.3.2Kaba terazi**

KERN FCB 12K1N kaba terazi, biyoreaktörde kullanılan besiyeri ve karışımların hazırlanmasında kullanılmıştır.

### **3.1.3.3pH metre**

Mettler Toledo Seven Easy pH metre, hazırlanan besiyeri ve diğer karışımların pH değerlerinin kontrol edilerek ayarlanması amacı ile kullanılmıştır.

### **3.1.3.4Isıtmalı manyetik karıştırıcı**

Heidolph MR Hei-Standard ısıtmalı manyetik karıştırıcı, kullanılan besiyeri ve diğer karışımların istenilen koşullarda ve istenilen özelliklerde olması için homojenizasyonun sağlanmasında kullanılmıştır.

### **3.1.3.5Otoklav**

Hirayama Hiclave HV-110L marka ve model numaralı otoklav, gerekli ortamların hazırlanmasında sterilizasyonun sağlanması amacı ile ayrıca işlemler sonucunda ortaya çıkan mikrobiyolojik olarak bulaşık haldeki materyalin tekrar kullanılabilir hale getirilmesi, tüm mikroorganizmaların öldürülmesi amacı ile kullanılmıştır.

### **3.1.3.6İnkübatör**

Sanyo MIR-153 marka ve model numaralı soğutmalı inkübatör *Trichoderma harzianum* EGE-K38 suşlarının kültürasyonu ve mikropropagül üretimi sırasında biyoreaktörden alınan örneklerden canlı hücre sayımı için hazırlanan petri kaplarındaki mikropropagüllerin inkübasyonu amacıyla farklı sıcaklık derecelerinde kullanılmıştır.

### **3.1.3.7Mikroskop**

Olympus marka CX31RTSF model numaralı, dijital fotoğraf makinası takılabilen tri-oküler mikroskop, mikroskopik incelemelerde ve aşı kültüründe *Trichoderma* sporlarının sayımı amacıyla kullanılmıştır.

### **3.1.3.8Su banyosu**

Memmert marka su banyosu, DG-18 agarlı besi ortamlarının uygun

sıcaklıklarda tutulmasında kullanılmıştır.

### **3.1.3.9Nem tayin cihazı**

Mettler-Toledo Halogen marka HR83 model numaralı nem tayin cihazı, katı kültür fermentasyonu ile biyokütle üretim optimizasyonu denemelerinde kullanılan üretim ortamının başlangıç nemi ve biyoreaktörlerden alınan katı kültür fermentasyonu örneklerinin nem içeriğinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

### **3.1.3.10Parçalayıcı**

Waring commercial marka parçalayıcı, katı kültür ve sıvı kültür fermentasyonu ile üretilen *Trichoderma* biyokütlesinin canlılığını kaybetmediği en küçük boyuta getirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

### **3.1.3.11Homojenizatör**

Yellow line marka DI 25 basic model doku homojenizatörü, sıvı kültür fermentasyonu ile üretilen *Trichoderma* biyokütlesinin canlılığını kaybetmediği en küçük boyuta getirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

### **3.1.3.12Biyoreaktörler**

Tasarımı tarafımızdan gerçekleştirilmiş olup Alge Metal San. Tic. Ltd. Şti. (İZMİR) firmasında imalatı gerçekleştirilen 22 litrelik toplam hacime sahip yatay karıştırıcılı katı kültür biyoreaktörü ile katı kültür fermentasyon üretimleri; Bakon Makina & Mühendislik Ltd. Şti. (İZMİR) firması tarafından imal edilen tepsili biyoreaktörde ise katı kültür fermentasyonu ve statik kültür üretimlerinin yanı sıra üretilen mikropropagüllerin kurutma işlemi de gerçekleştirilmiştir.

### **3.1.3.13Hava şartlandırıcı**

Katı kültür fermentasyonu ile üretimde, zamanla üretim ortamının nem içeriğinin azaldığı durumlarda Alge Metal San. Tic. Ltd. Şti. (İZMİR) firmasında imalatı gerçekleştirilen hava şartlandırıcı, kızgın buharla 121°C'de 30 dk yerinde sterilizasyonla sterilize edilerek sisteme bağlanmıştır ve üretime bu şekilde devam edilmiştir.

### **3.1.3.14 Hava Kurutucu**

Katı kültür fermentasyonu ile üretimde, üretim için istenen nem değerinin ayarlanmasında ve ayrıca hem katı kültür hem de statik sıvı kültürle üretilen mikropropagüllerin kurutulması işleminde DRYTEC s.a marka basınçlı hava kurutucu kullanılmıştır.

### **3.1.3.15 Oksijen ölçer**

Biyoreaktöre beslenen hava ve biyoreaktörden çıkış gazının içerisindeki oksijen miktarını ölçmek için Lutron marka DO-5510HA model oksijen metre kullanılmıştır.

### **3.1.3.16 Karbondioksit ölçer**

Biyoreaktördeki çıkış gazının içerisindeki CO<sub>2</sub> miktarını ölçmek için TES marka 1370 model karbondioksit ölçer kullanılmıştır.

### **3.1.3.17 Nem ölçer**

Katı kültür fermentasyonu ile gerçekleştirilen üretimlerde besi ortamı nem içeriğinin sürekli olarak gözlemlenebilmesi amacıyla TL marka nem ölçer kullanılmıştır.

### **3.1.3.18 pH ölçer**

Katı kültür fermentasyonu ile gerçekleştirilen üretimlerde besi ortamı pH değerinin sürekli olarak gözlemlenebilmesi amacıyla TL marka pH ölçer kullanılmıştır.

## **3.2 Yöntem**

### **3.2.1 *Trichoderma harzianum* EGE-K38 spor solüsyonunun hazırlanması**

*Trichoderma harzianum* EGE-K38 suşu 250 mL' lik Erlenmayer flakslarda 150 mL PDA ortamında yatık agarda 28 °C'de 4-5 gün inkübe edilerek çoğaltılmıştır. Çoğaltılan kültüre 99 ml steril Tween-80 çözeltisi eklenmiştir ve homojen spor solüsyonu elde edilmiştir. Gerekli seyreltmeler yapılarak inokulasyona hazır hale getirilmiştir.



### 3.2.2 Katı kültürde mikropropagül üretim koşullarının optimizasyonu

#### 3.2.2.1 Yatay karıştırılmalı biyoreaktörle üretimde bazı parametrelerin optimizasyonu

Yatay karıştırılmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile yapılan üretimlerde optimize edilen parametreler besi ortamı nem içeriği, ortam sıcaklığı, beslenen havanın debisi, inokulumdaki spor konsantrasyonu, inokulum hacmi, substrat yatak kalınlığıdır. Ayrıca spor inokulasyonu ile miselli agar parçalarının aşı olarak kullanılmasının ve de periyodik olarak basınç uygulamanın elde edilen mikropropagül sayısına etkisi de değerlendirilmiştir. Bununla birlikte steril olmayan koşullarda üretimin gerçekleştirilebilirliği de incelenmiştir.

#### **Optimum besi ortamı nem içeriğinin belirlenmesi**

*Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin katı kültür fermentasyonu ile yatay karıştırılmalı biyoreaktörde üretiminde, besi ortamı nem içeriğinin farklı değerleri (% 60 - 65 – 70 - 75) denenmiştir.

Bu amaçla her bir nem içeriği denemesi için 1 kg katı besi ortamı karışımı (buğday kepeği:malt çimi(ağırlıkça 3:2)) hazırlandıktan sonra, üretim sırasında katı besi ortamının topaklanmasını önlemek ve besi ortamının daha etkin şekilde havalanmasını sağlamak amacıyla 1 cm uzunluğunda kesilerek hazırlanmış teflon hortum parçalarıyla karıştırılmıştır ve biyoreaktöre doldurulmuştur. Kızgın buhar beslenerek 121°C'de 30 dk yerinde sterilizasyonla besi ortamı sterilize edildikten sonra biyoreaktör, ceketten su geçirilerek üretim sıcaklığına (28±2°C) getirilmiştir. Biyoreaktörden örnek alınarak, örneğin bir kısmıyla nem tayin cihazında besi ortamı nemi belirlenmiştir, örneğin kalan kısmı ise saf su ile karıştırılarak elde edilen karışımın cendere beziyle süzülmesi ile elde edilen ekstraktan pH metre ile pH değeri belirlenmiş ve elde edilen sonuca göre biyoreaktördeki besi ortamının pH değeri (pH 5,5) ve deneme için istenen başlangıç nem içeriği değeri ayarlandıktan sonra biyoreaktördeki katı ortamlar  $1 \times 10^8$  kob/ml ve %10(v/w) spor inokulasyonu ile aşılandıktan sonra 5 L/dak havalandırma hızı ve aydınlık koşullarda (ort. 640 lüks) inkübasyona bırakılmıştır. Bu çalışma sonucunda maksimum mikropropagül sayısına ulaşılan nem değeri bundan sonraki çalışmalarda da kullanılmak üzere seçilmiştir.

### **Optimum ortam sıcaklığının belirlenmesi**

*Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin katı kültür fermentasyonu ile yatay karıştırmalı biyoreaktörde üretiminde, farklı üretim sıcaklıkları da ( $24\pm 2^\circ\text{C}$ ,  $28\pm 2^\circ\text{C}$ ,  $32\pm 2^\circ\text{C}$ ,  $35\pm 2^\circ\text{C}$ ) denenmiştir.

Bu amaçla her bir üretim sıcaklığı denemesi için 1 kg katı besi ortamı karışımı, teflon hortum parçalarıyla karıştırılarak biyoreaktöre doldurulmuştur ve biyoreaktör kızgın buhar beslenerek yerinde sterilize edilmiştir ve hemen ardından deneme için istenen üretim sıcaklığına ve %70 nem değerine getirilmiştir ve  $1\times 10^8$  kob/ml ve %10(hacim/ağırlık) spor inokulasyonu ile aşılandıktan sonra 5 L/dak havalandırma hızı ve aydınlık koşullarda (ort. 640 lüx) denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda maksimum mikropropagül sayısına ulaşılan sıcaklık değeri, bundan sonraki çalışmalarda da kullanılmak üzere seçilmiştir.

### **Optimum hava debisinin belirlenmesi**

*Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin katı kültür fermentasyonu ile yatay karıştırmalı biyoreaktörde üretiminde, biyoreaktöre beslenen havanın farklı debileri de (1, 2, 5, 8, 10, 12 L/dak) denenmiştir.

Bu amaçla her bir deneme için 1 kg katı besi ortamı karışımı, teflon hortum parçalarıyla karıştırılarak biyoreaktöre doldurulmuştur ve biyoreaktör kızgın buhar beslenerek yerinde sterilize edilmiştir ve hemen ardından  $28\pm 2^\circ\text{C}$  sıcaklığa ve %70 nem değerine getirilmiştir ve  $1\times 10^8$  kob/ml ve %10(hacim/ağırlık) spor inokulasyonu ile aşılandıktan sonra farklı havalandırma debileri denenerek üretimler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda maksimum mikropropagül sayısına ulaşılan havalandırma debisi, bundan sonraki çalışmalarda da kullanılmak üzere seçilmiştir.

### **İnokulumdaki sporların optimum konsantrasyonlarının belirlenmesi**

*Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin katı kültür fermentasyonu ile yatay karıştırmalı biyoreaktörde üretiminde, besi ortamına aşılana sporların farklı konsantrasyonlarının ( $1\times 10^5$ ,  $1\times 10^6$ ,  $1\times 10^7$ ,  $1\times 10^8$  kob/mL) mikropropagül üretimine etkileri de incelenmiştir.

Bu amaçla her bir deneme için 1 kg katı besi ortamı karışımı, teflon hortum

parçalarıyla karıştırılarak biyoreaktöre doldurulmuştur ve biyoreaktör kızgın buhar beslenerek yerinde sterilize edilmiştir ve hemen ardından  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklığa ve %70 nem değerine getirilmiştir ve farklı konsantrasyondaki spor solüsyonlarından %10 (hacim/ağırlık) aşılandıktan sonra 5 L/dak havalandırma debisinde üretimler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda maksimum mikropropagül sayısına ulaşılan spor konsantrasyonu değeri, bundan sonraki çalışmalarda da kullanılmak üzere seçilmiştir.

### **Optimum inokulum hacminin belirlenmesi**

*Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin katı kültür fermentasyonu ile yatay karıştırmalı biyoreaktörde üretiminde, besi ortamına yapılan aşı hacminin (% 2, 5, 10, 20 (hacim/ağırlık)) mikropropagül üretimine etkileri de incelenmiştir.

Bu amaçla her bir deneme için 1 kg katı besi ortamı karışımı, teflon hortum parçalarıyla karıştırılarak biyoreaktöre doldurulmuştur ve biyoreaktör kızgın buhar beslenerek yerinde sterilize edilmiştir ve hemen ardından  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklığa ve %70 nem değerine getirilmiştir ve  $1\times 10^6$  kob/mL konsantrasyondaki spor solüsyonundan farklı hacimlerde aşılandıktan sonra 5 L/dak havalandırma debisinde üretimler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda maksimum mikropropagül sayısına ulaşılan inokulum hacmi değeri, bundan sonraki çalışmalarda da kullanılmak üzere seçilmiştir.

### **Substrat yatağının optimum kalınlığının belirlenmesi**

*Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin katı kültür fermentasyonu ile yatay karıştırmalı biyoreaktörde üretiminde, substrat yatağının farklı kalınlıklarının (3(0.75 kg), 5(1.0 kg) ve 8(1.5kg) cm) mikropropagül üretimine etkileri de incelenmiştir.

Bu amaçla her bir deneme için farklı miktarlarda besi ortamı karışımı, teflon hortum parçalarıyla karıştırılarak biyoreaktöre doldurulmuştur ve biyoreaktör kızgın buhar beslenerek yerinde sterilize edilmiştir ve hemen ardından  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklığa ve %70 nem değerine getirilmiştir.  $1\times 10^6$  kob/mL konsantrasyondaki spor solüsyonundan % 10(hacim/ağırlık) aşılandıktan sonra 5 L/dak havalandırma debisinde üretimler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda maksimum mikropropagül sayısına ulaşılan yatak kalınlığı değeri, bundan sonraki çalışmalarda da kullanılmak üzere seçilmiştir.

### **Aşı olarak spor ya da misel kullanımının etkilerinin belirlenmesi**

*Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin katı kültür fermentasyonu ile yatay karıştırmalı biyoreaktörde üretiminde, aşı olarak spor çözeltisi ya da miselli agar parçalarının kullanılmasının mikropropagül üretimine etkileri de incelenmiştir.

Bu amaçla her bir deneme için 1 kg katı besi ortamı karışımı, teflon hortum parçalarıyla karıştırılarak biyoreaktöre doldurulmuştur ve biyoreaktör kızgın buhar beslenerek yerinde sterilize edilmiştir ve hemen ardından  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklığa ve %70 nem değerine getirilmiştir.  $1\times 10^6$  kob/mL konsantrasyondaki spor solüsyonundan % 10(hacim/ağırlık) ya da eşdeğer miktarda miselli agar parçaları aşılandıktan sonra 5 L/dak havalandırma debisinde üretimler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda maksimum mikropropagül sayısına ulaşılan aşılama yöntemi, bundan sonraki çalışmalarda da kullanılmak üzere seçilmiştir.

### **Steril ve steril olmayan koşulların etkilerinin belirlenmesi**

Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile *Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin üretiminde sterilizasyonun üretim için gerekli olup olmadığının belirlenmesi amacıyla, besi ortamının steril edildiği ve steril edilmediği koşullarda üretimler gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla her bir deneme için 1 kg katı besi ortamı karışımı, teflon hortum parçalarıyla karıştırılarak biyoreaktöre doldurulmuştur ve biyoreaktör sterilize edilerek ya da edilmeden  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklığa ve %70 nem değerine getirilmiştir.  $1\times 10^6$  kob/mL konsantrasyondaki spor solüsyonundan % 10(hacim/ağırlık) aşılandıktan sonra 5 L/dak havalandırma debisinde üretimler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda maksimum mikropropagül sayısına ulaşılan yöntem, bundan sonraki çalışmada kullanılmak üzere seçilmiştir.

### **Periyodik basınç uygulamanın etkilerinin belirlenmesi**

Katı kültür fermentasyonu ile üretimlerde, üretim boyunca oluşan metabolik ısıyı evaporasyon yoluyla uzaklaştırmak, iletim ve taşınım ile ısı uzaklaştırmaktan daha etkili olduğu için birçok çalışma evaporasyonu etkin hale getirmek üzerine gerçekleştirilmektedir. Biyoreaktörde pozitif basınç etkisi yapmak, evaporasyonu artırıcı etki göstererek metabolik ısının uzaklaştırılmasına yardımcı olmaktadır (Liu et al., 2007).

Yatay karıştırılmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile *Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin üretiminde periyodik basınç uygulamasının üretim için gerekli olup olmadığının belirlenmesi amacıyla, biyoreaktörün gaz çıkış vanasının üretim süresince sürekli olarak kısık tutularak biyoreaktörün 0,2 bar gösterge basıncında çalıştırılması ve ayrıca 4'er saat aralıklarla vananın kısılıp biyoreaktörün 4 saat boyunca 0,2 bar gösterge basıncında çalıştırılması ve sonra vananın açılarak atmosferik basınca dönülmesi yoluyla üretimler gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla her bir deneme için 1 kg katı besi ortamı karışımı, teflon hortum parçalarıyla karıştırılarak biyoreaktöre doldurulmuştur ve biyoreaktör sterilize edildikten sonra  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklığa ve %70 nem değerine getirilmiştir.  $1\times 10^6$  kob/mL konsantrasyondaki spor solüsyonundan % 10(hacim/ağırlık) aşılandıktan sonra 5 L/dak havalandırma debisinde, farklı basınç uygulamalarıyla üretimler gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.2.2 Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörle üretimde bazı parametrelerin optimizasyonu**

Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile yapılan üretimlerde optimize edilen parametreler, yatay karıştırılmalı biyoreaktördeki parametrelere benzer olarak besi ortamı nem içeriği, ortam sıcaklığı, beslenen havanın debisi, inokulumdaki spor konsantrasyonu, inokulum hacmi, substrat yatak kalınlığıdır. Ayrıca spor inokulasyonu ile miselli agar parçalarının aşı olarak kullanılmasının ve de periyodik olarak basınç uygulamanın elde edilen mikropropagül sayısına etkisi de değerlendirilmiştir. Bununla birlikte steril olmayan koşullarda üretimin gerçekleştirilebilirliği de incelenmiştir.

#### **Optimum besi ortamı nem içeriğinin belirlenmesi**

*Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin katı kültür fermentasyonu ile yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde üretiminde, besi ortamı nem içeriğinin farklı değerleri (% 60 - 65 – 70 - 75) denenmiştir.

Bu amaçla her bir nem içeriği denemesi için tepsi başına 150 g katı besi ortamı karışımı (buğday kepeği : malt çimi(3:2)) ile doldurulan 5 tepsi hazırlandıktan sonra biyoreaktöre yerleştirilmiştir. Kızgın buhar beslenerek

121°C'de 30 dk yerinde sterilizasyonla besi ortamı sterilize edildikten sonra biyoreaktör, ceketten su geçirilerek üretim sıcaklığına (28±2°C) getirilmiştir. Biyoreaktörden örnek alınarak, örneğin bir kısmıyla nem tayin cihazında besi ortamı nemi belirlenmiştir, örneğin kalan kısmı ise saf su ile karıştırılarak elde edilen karışımın cendere beziyle süzülmesi ile elde edilen ekstraktan pH metre ile pH değeri belirlenmiş ve elde edilen sonuca göre biyoreaktördeki besi ortamının pH değeri (pH 5,5) ve deneme için istenen başlangıç nem içeriği değeri ayarlandıktan sonra biyoreaktördeki katı ortamlar  $1 \times 10^8$  kob/ml ve %10(v/w) spor inokulasyonu ile aşılandıktan sonra 5 L/dak havalandırma hızı ve aydınlık koşullarda (ort. 250 lüks) inkübasyona bırakılmıştır. Bu çalışma sonucunda maksimum mikropropagül sayısına ulaşılan nem değeri bundan sonraki çalışmalarda da kullanılmak üzere seçilmiştir.

### **Optimum ortam sıcaklığının belirlenmesi**

*Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin katı kültür fermentasyonu ile yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde üretiminde, farklı üretim sıcaklıkları da (24±2°C, 28±2°C, 32±2°C, 35±2°C) denenmiştir.

Bu amaçla her bir üretim sıcaklığı denemesi için tepsi başına 150 g katı besi ortamı karışımı olacak şekilde doldurulan 5 tepsi biyoreaktöre yerleştirildikten sonra biyoreaktör kızgın buhar beslenerek yerinde sterilize edilmiştir ve hemen ardından deneme için istenen üretim sıcaklığına ve %70 nem değerine getirilmiştir ve  $1 \times 10^8$  kob/ml ve %10(hacim/ağırlık) spor inokulasyonu ile aşılandıktan sonra 5 L/dak havalandırma hızı ve aydınlık koşulda denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda maksimum mikropropagül sayısına ulaşılan sıcaklık değeri, bundan sonraki çalışmalarda da kullanılmak üzere seçilmiştir.

### **Optimum hava debisinin belirlenmesi**

*Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin katı kültür fermentasyonu ile yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde üretiminde, biyoreaktöre beslenen havanın farklı debileri de (1, 2, 5, 8, 10, 12 L/dak) denenmiştir.

Bu amaçla her bir deneme için tepsi başına 150 g katı besi ortamı karışımı olacak şekilde doldurulan 5 tepsi biyoreaktöre yerleştirildikten sonra biyoreaktör kızgın buhar beslenerek yerinde sterilize edilmiştir ve hemen ardından 28±2°C sıcaklığa ve %70 nem değerine getirilmiştir ve  $1 \times 10^8$  kob/ml ve

%10(hacim/ağırlık) spor inokulasyonu ile aşılandıktan sonra farklı havalandırma debileri denenerek üretimler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda maksimum mikropropagül sayısına ulaşılan havalandırma debisi, bundan sonraki çalışmalarda da kullanılmak üzere seçilmiştir.

### **İnokulumdaki sporların optimum konsantrasyonlarının belirlenmesi**

*Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin katı kültür fermentasyonu ile yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde üretiminde, besi ortamına yapılan aşındaki sporların farklı konsantrasyonlarının ( $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  kob/mL) mikropropagül üretimine etkileri de incelenmiştir.

Bu amaçla her bir deneme için tepsi başına 150 g katı besi ortamı karışımı olacak şekilde doldurulan 5 tepsi biyoreaktöre yerleştirildikten sonra biyoreaktör kızgın buhar beslenerek yerinde sterilize edilmiştir ve hemen ardından  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  sıcaklığa ve %70 nem değerine getirilmiştir ve farklı konsantrasyondaki spor solüsyonlarından %10(hacim/ağırlık) aşılandıktan sonra 5 L/dak havalandırma debisinde üretimler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda maksimum mikropropagül sayısına ulaşılan spor konsantrasyonu değeri, bundan sonraki çalışmalarda da kullanılmak üzere seçilmiştir.

### **Optimum inokulum hacminin belirlenmesi**

*Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin katı kültür fermentasyonu ile yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde üretiminde, besi ortamına yapılan aşı hacminin (% 2, 5, 10, 20 (hacim/ağırlık)) mikropropagül üretimine etkileri de incelenmiştir.

Bu amaçla her bir deneme için tepsi başına 150 g katı besi ortamı karışımı olacak şekilde doldurulan 5 tepsi biyoreaktöre yerleştirildikten sonra biyoreaktör kızgın buhar beslenerek yerinde sterilize edilmiştir ve hemen ardından  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  sıcaklığa ve %70 nem değerine getirilmiştir ve  $1 \times 10^6$  kob/mL konsantrasyondaki spor solüsyonundan farklı hacimlerde aşılandıktan sonra 5 L/dak havalandırma debisinde üretimler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda maksimum mikropropagül sayısına ulaşılan inokulum hacmi değeri, bundan sonraki çalışmalarda da kullanılmak üzere seçilmiştir.



### **Substrat yatağının optimum kalınlığının belirlenmesi**

*Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin katı kültür fermentasyonu ile yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde üretiminde, substrat yatağının farklı kalınlıklarının (2 (75 g), 4 (150 g) ve 6 (225 g) cm) mikropropagül üretimine etkileri de incelenmiştir.

Bu amaçla her bir deneme için farklı miktarlarda besi ortamı karışımı doldurulan 5 tepsili biyoreaktöre yerleştirildikten sonra biyoreaktör kızgın buhar beslenerek yerinde sterilize edilmiştir ve hemen ardından  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklığa ve %70 nem değerine getirilmiştir.  $1\times 10^6$  kob/mL konsantrasyondaki spor solüsyonundan % 10(hacim/ağırlık) aşılandıktan sonra 5 L/dak havalandırma debisinde üretimler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda maksimum mikropropagül sayısına ulaşılan yatak kalınlığı değeri, bundan sonraki çalışmalarda da kullanılmak üzere seçilmiştir.

### **Aşı olarak spor ya da misel kullanımının etkilerinin belirlenmesi**

*Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin katı kültür fermentasyonu ile yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde üretiminde, aşı olarak spor çözeltilisi ya da miselli agar parçalarının kullanılmasının mikropropagül üretimine etkileri de incelenmiştir.

Bu amaçla her bir deneme için tepsi başına 150 g katı besi ortamı karışımı olacak şekilde doldurulan 5 tepsili biyoreaktöre yerleştirildikten sonra biyoreaktör kızgın buhar beslenerek yerinde sterilize edilmiştir ve hemen ardından  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklığa ve %70 nem değerine getirilmiştir.  $1\times 10^6$  kob/mL konsantrasyondaki spor solüsyonundan % 10 (hacim/ağırlık) ya da eşdeğer miktarda miselli agar parçaları aşılandıktan sonra 5 L/dak havalandırma debisinde üretimler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda maksimum mikropropagül sayısına ulaşılan aşılama yöntemi, bundan sonraki çalışmalarda da kullanılmak üzere seçilmiştir.

### **Steril ve steril olmayan koşulların etkilerinin belirlenmesi**

Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile *Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin üretiminde sterilizasyonun üretim için gerekli olup olmadığının belirlenmesi amacıyla, besi ortamının steril edildiği ve steril edilmediği koşullarda üretimler gerçekleştirilmiştir.



Bu amaçla her bir deneme için tepsi başına 150 g katı besi ortamı karışımı olacak şekilde doldurulan 5 tepsi biyoreaktöre yerleştirildikten sonra biyoreaktör sterilize edilerek ya da edilmeden  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklığa ve %70 nem değerine getirilmiştir.  $1\times 10^6$  kob/mL konsantrasyondaki spor solüsyonundan % 10(hacim/ağırlık) aşılandıktan sonra 5 L/dak havalandırma debisinde üretimler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda maksimum mikropropagül sayısına ulaşılan yöntem, bundan sonraki çalışmada kullanılmak üzere seçilmiştir.

### **Periyodik basınç uygulamanın etkilerinin belirlenmesi**

Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile *Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin üretiminde periyodik basınç uygulamasının üretim için gerekli olup olmadığının belirlenmesi amacıyla, biyoreaktörün gaz çıkış vanasının üretim süresince sürekli olarak kısık tutularak biyoreaktörün 0,2 bar gösterge basıncında çalıştırılması ve ayrıca 4' er saat aralıklarla vananın kısılıp biyoreaktörün 4 saat boyunca 0,2 bar gösterge basıncında çalıştırılması ve sonra vananın açılarak atmosferik basınca dönülmesi yoluyla üretimler gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla her bir deneme için tepsi başına 150 g katı besi ortamı karışımı olacak şekilde doldurulan 5 tepsi biyoreaktöre yerleştirildikten sonra biyoreaktör sterilize edilmiştir ve ardından  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklığa ve %70 nem değerine getirilmiştir.  $1\times 10^6$  kob/mL konsantrasyondaki spor solüsyonundan % 10 (hacim/ağırlık) aşılandıktan sonra 5 L/dak havalandırma debisinde, farklı basınç uygulamalarıyla üretimler gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.3 Statik sıvı kültürde mikropropagül üretim koşullarının optimizasyonu**

#### **3.2.3.1 Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörle üretimde bazı parametrelerin optimizasyonu**

Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonunda, 8 g/L glukoz içeren Modifiye Czapek Ortamı (MCM) kullanılarak yapılan üretimlerde optimize edilen parametreler, ortam sıcaklığı, beslenen havanın debisi, inokulumdaki spor konsantrasyonu, inokulum hacmi ve besi ortamı hacmidir. Ayrıca spor inokulasyonu ile miselli agar parçalarının aşı

olarak kullanılmasının elde edilen mikropropagül sayısına etkisi de değerlendirilmiştir. Bununla birlikte steril olmayan koşullarda üretimin gerçekleştirilebilirliği de incelenmiştir.

### **Optimum ortam sıcaklığının belirlenmesi**

*Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin statik kültür fermentasyonu ile yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde üretiminde, farklı üretim sıcaklığı değerleri ( $24\pm 2^\circ\text{C}$ ,  $28\pm 2^\circ\text{C}$ ,  $32\pm 2^\circ\text{C}$ ,  $35\pm 2^\circ\text{C}$ ) denenmiştir.

Bu amaçla her bir ortam sıcaklığı denemesi için tepsi başına 1L olacak şekilde hazırlanan ve pH değeri ayarlanan (pH 4.0) sıvı besi ortamı ile doldurulan 5 tepsi hazırlandıktan sonra biyoreaktöre yerleştirilmiştir. Kızgın buhar beslenerek  $121^\circ\text{C}$ 'de 30 dk yerinde sterilizasyonla besi ortamı sterilize edildikten sonra biyoreaktör, ceketten su geçirilerek istenen üretim sıcaklığına getirilmiştir. Biyoreaktördeki ortamlar,  $1*10^8$  kob/ml ve %10(hacim/hacim) spor inokulasyonu ile aşılandıktan sonra 5 L/dak havalandırma hızı ve aydınlık koşullarda (ort. 250 lüx) inkübasyona bırakılmıştır Bu çalışma sonucunda maksimum mikropropagül sayısına ulaşılan ortam sıcaklığı değeri bundan sonraki çalışmalarda da kullanılmak üzere seçilmiştir.

### **Optimum hava debisinin belirlenmesi**

*Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin statik sıvı kültür fermentasyonu ile yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde üretiminde, biyoreaktöre beslenen havanın farklı debileri de (5, 8, 10, 12 L/dak) denenmiştir.

Bu amaçla her bir deneme için tepsi başına 1 L olacak şekilde doldurulan 5 tepsi biyoreaktöre yerleştirildikten sonra biyoreaktör kızgın buhar beslenerek yerinde sterilize edildikten sonra  $28\pm 2^\circ\text{C}$  sıcaklığa getirilmiştir ve  $1*10^8$  kob/ml ve %10(hacim/hacim) spor inokulasyonu ile aşılandıktan sonra farklı havalandırma debileri denenerek üretimler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda maksimum mikropropagül sayısına ulaşılan havalandırma debisi, bundan sonraki çalışmalarda da kullanılmak üzere seçilmiştir.

### **Aşı olarak spor ya da misel kullanımının etkilerinin belirlenmesi**

*Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin statik sıvı kültür fermentasyonu ile yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde üretiminde, aşı

olarak spor çözültisi ya da miselli agar parçalarının kullanılmasının mikropropagül üretimine etkileri de incelenmiştir.

Bu amaçla her bir deneme için tepsi başına 1 L olacak şekilde doldurulan 5 tepsi biyoreaktöre yerleştirildikten sonra biyoreaktör kızgın buhar beslenerek yerinde sterilize edilmiştir ve  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklığa getirilmiştir.  $1\times 10^8$  kob/mL konsantrasyondaki spor solüsyonundan % 10(hacim/hacim) ya da eşdeğer miktarda miselli agar parçaları aşılandıktan sonra 5 L/dak havalandırma debisinde üretimler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda maksimum mikropropagül sayısına ulaşılan aşılama yöntemi, bundan sonraki çalışmalarda da kullanılmak üzere seçilmiştir.

### **İnokulumdaki sporların optimum konsantrasyonlarının belirlenmesi**

*Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin statik sıvı kültür fermentasyonu ile yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde üretiminde, besi ortamına yapılan aşındaki sporların farklı konsantrasyonlarının ( $1\times 10^5$ ,  $1\times 10^6$ ,  $1\times 10^7$ ,  $1\times 10^8$  kob/mL) mikropropagül üretimine etkileri de incelenmiştir.

Bu amaçla her bir deneme için tepsi başına 1 L olacak şekilde doldurulan 5 tepsi biyoreaktöre yerleştirildikten sonra biyoreaktör kızgın buhar beslenerek yerinde sterilize edilmiştir ve  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklığa getirilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki spor solüsyonlarından % 10(hacim/hacim) aşılandıktan sonra 5 L/dak havalandırma debisinde üretimler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda maksimum mikropropagül sayısına ulaşılan spor konsantrasyonu değeri, bundan sonraki çalışmalarda da kullanılmak üzere seçilmiştir.

### **Optimum inokulum hacminin belirlenmesi**

*Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin statik sıvı kültür fermentasyonu ile yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde üretiminde, besi ortamına yapılan aşı hacminin (% 2, 5, 10, 20 (hacim/hacim)) mikropropagül üretimine etkileri de incelenmiştir.

Bu amaçla her bir deneme için tepsi başına 1 L olacak şekilde doldurulan 5 tepsi biyoreaktöre yerleştirildikten sonra biyoreaktör kızgın buhar beslenerek yerinde sterilize edilmiştir ve  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklığa getirilmiştir.  $1\times 10^5$  kob/mL konsantrasyondaki spor solüsyonundan farklı oranlarda(hacim/hacim) aşılandıktan sonra 5 L/dak havalandırma debisinde üretimler gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma sonucunda maksimum mikropropagül sayısına ulaşılan inokulum hacmi değeri, bundan sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

### **Besi ortamının optimum hacminin belirlenmesi**

*Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin statik sıvı kültür fermentasyonu ile yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde üretiminde, besi ortamı hacminin (0.75, 1.00, 1.25L) mikropropagül üretimine etkileri de incelenmiştir.

Bu amaçla her bir deneme için farklı hacimlerde doldurulan 5 tepsili biyoreaktöre yerleştirildikten sonra biyoreaktör kızgın buhar beslenerek yerinde sterilize edilmiştir ve  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklığa getirilmiştir.  $1\times 10^5$  kob/mL konsantrasyondaki spor solüsyonundan %5(hacim/hacim) aşılandıktan sonra 5 L/dak havalandırma debisinde üretimler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda maksimum mikropropagül sayısına ulaşılan üretim hacmi değeri, bundan sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

### **Steril ve steril olmayan koşulların etkilerinin belirlenmesi**

*Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin statik sıvı kültür fermentasyonu ile yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde üretiminde, sterilizasyonun üretim için gerekli olup olmadığının belirlenmesi amacıyla, besi ortamının steril edildiği ve steril edilmediği koşullarda üretimler gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla her bir deneme için tepsili başına 1 L olacak şekilde doldurulan 5 tepsili, biyoreaktöre yerleştirildikten sonra biyoreaktör sterilize edilmeden  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklığa getirilmiştir ve  $1\times 10^5$  kob/mL konsantrasyondaki spor solüsyonundan %5(hacim/hacim) aşılandıktan sonra 5 L/dak havalandırma debisinde üretimler gerçekleştirilmiştir.

## **3.2.4 Üretim koşulları ve örnek alma**

### **3.2.4.1KKF üretimleri için**

Katı kültür fermentasyonu ile üretimlerde, Başlık 3.2.2' de açıklanan koşullarda hazırlanan ortamlar yatay karıştırmalı biyoreaktör ve yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde üretime alınmışlardır. Mikropropagüllerin

gelişimi için en az 4 günlük süre gerekli olduğundan üretimin 4. gününden itibaren biyoreaktörlerin örnek alma hatlarından aseptik koşullarda spatülle bir miktar örnek, önceden sterilize edilmiş örnek kaplarına alınarak hem mikropropagül sayımında hem de nem tayininde kullanılmıştır.

### **3.2.4.2 Statik sıvı kültür üretimleri için**

Statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimlerde, Başlık 3.2.3' te açıklanan koşullarda hazırlanan ortamlar yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde üretime alınmışlardır. Örnek alma işlemi, üretimin 4. gününden itibaren biyoreaktörden her gün bir tepsinin aseptik koşullarda alınması şeklinde gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.5 Üretim sonrası işlemler**

#### **3.2.5.1 Mikropropagül sayımı**

Katı kültür fermentasyonu ile gerçekleştirilen üretimlerin 4. günden itibaren alınan örneklerdeki biyokütle, aseptik koşullarda parçalayıcı içerisine aktararak üzerine, katı örnek ağırlığının 5 katı kadar hacimde Tween-80 çözeltisi eklenmiştir ve 3 dakika süreyle parçalamaya maruz bırakılmıştır. Daha sonra parçalayıcıdan örnek alınarak yapılan ardışık seyreltmeler sonucunda, g katı substrat başına mikropropagül sayısının (kob/g katı substrat) belirlenebilmesi için dökme plaka yapılmıştır. Önceden hazırlanmış ve uygun sıcaklığa getirilmiş DG-18 agarlı besiyeri uygun seyreltme yapılmış petrilere dökülmüş ve 28 °C'de 4 günlük inkübasyon sonrasında petrilere sayımlar gerçekleştirilmiştir.

Statik sıvı kültürde gerçekleştirilen üretimlerde ise, üretimlerin 4. günden itibaren biyoreaktörden alınan tepsilerdeki biyokütle, homojenizatörde 9000 devir/dakika 180 sn homojenize edildikten sonra %0,1 Tween 80 çözeltisinde 30°C 150rpm' de 30 dakika çalkalanmıştır ve ardışık seyreltmelerin ardından dökme plaka yöntemi uygulanan mikropropagüller, DG 18 agar ortamında 28°C' de 4 gün süresince inkübe edildikten sonra sayılmışlardır. Çıkan sonucun seyreltme sayısı ile çarpılmasıyla elde edilen mikropropagül sayısı, (kob) / mL cinsinden hesaplanmıştır.

### **3.2.5.2Biyokütle tayini**

Statik kültür üretimlerde elde edilen biyokütle miktarının belirlenmesi için kuru ağırlık tayin metodu kullanılmıştır. üretimlerin 4. günden itibaren biyoreaktörden alınan tepsilerdeki biyokütle, homojenizatörde 9000 devir/dakika 180 sn homojenize edildikten sonra darası alınmış kuru filtre kağıtlarında vakum filtrasyon uygulanmıştır. Biyokütlenin tutulduğu filtre kağıtları pastör fırınında 65°C sıcaklıkta 72 saat süreyle kurutulurak hassas terazide tartılmışlardır. Elde edilen değerden filtre kağıtlarının darası çıkarıldıktan sonra litre başına biyokütle miktarına ulaşılmıştır.

### **3.2.5.3Nem tayini**

Üretim sırasında günlük örnekler alınarak nem tayin cihazında nem içeriği takip edilmiş ve nem içeriğinin azaldığı durumlarda hava şartlandırıcı düzenek, kızgın buharla 121°C’de 30 dakika yerinde sterilizasyonla sterilize edilerek sisteme bağlanmıştır ve üretime bu şekilde devam edilmiştir.

### **3.2.6 *Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin kurutulması**

Katı kültür fermentasyonu ile gerçekleştirilen üretimlerin bitiminde, yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde kurutma denemeleri yapmak için, ortama beslenen hava, hava kurutucudan (Şekil 3.1) geçirilerek sisteme bağlanmıştır ve bu sayede kurutma denemeleri gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 3.1. Hava kurutucu.**

Statik sıvı kültürde ise üretim bitiminde, iç içe geçmiş delikli ve düz tepsilerden oluşan sistemden iç kısımda bulunan delikli tepsiler, içerisindeki

mikropropagüllerle beraber yerinden kaldırılarak, içerisinde besi ortamı bulunan düz tepsilerden ayrıldıktan sonra tekrar biyoreaktöre yerleştirilmiş ve biyoreaktöre kuru hava beslenerek kurutma denemeleri de gerçekleştirilmiştir.

Kurutma denemelerinde Box-Behnken deney tasarımı (Box and Behnken, 1960; Awad et al., 2014' ten), bağımsız değişkenlerin yanıt üzerindeki etkilerini ve farklı değişken kombinasyonları ile faktör etkileşimlerini belirlemek için kullanılmıştır. Kurutma % verimini ((kurutulan mikropropagüllerde canlı sayısı/ kurutma işlemi öncesi mikropropagül sayısı) x 100) etkileyen proses parametrelerini araştırmak ve doğruluğunu belirlemek için 3 seviyeli tasarım gerçekleştirilmiştir. Kullanılan 3 değişken olan kurutma sıcaklık değeri (35±2, 40±2 ve 45±2 °C ), havalandırma hızı (10, 15 ve 20 L/dak) ve kurutma süresi (katı kültür fermentasyonu için 3,4 ve 5 gün, statik sıvı kültür için 4, 5 ve 6 gün) 3' er seviyede denenmiştir ve seviyeler düşük(-1), orta(0) ve yüksek(+1) değere karşılık gelmektedir. Yanıt değeri kurutma verimidir ve sonuçlar Design Expert 7.0 programı ile bağımsız değişkenlerin olası etkileşimlerini de göz önünde bulundurarak p<0.05 olacak şekilde değerlendirilmiştir.

### **3.2.7 Kurutulan *Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin raf ömürlerinin belirlenmesi**

Gerçekleştirilen kurutma denemeleri sonrasında hem katı kültür hem de statik sıvı kültürden elde edilen toz haldeki ürün, raf ömürlerinin belirlenmesi amacıyla önceden otoklavlanarak steril edilmiş liyofilize kültür şişeleri içerisine 1' er gramlık porsiyonlar halinde paylaştırılmış ve oda sıcaklığında depolanmıştır. Kurutmadan 1, 3 ve 6 ay sonra şişelerden birer tanesi açılarak Tween 80 çözeltisi içerisinde çözdürüldükten sonra örnek alma yöntemine benzer şekilde uygun seyreltmeler yapılarak dökme plaka yöntemiyle canlı sayım uygulanmıştır.

### **3.2.8 Metabolik gaz dengesi metodu ile kinetik verilerin ölçümü**

Hem katı kültür fermentasyonu, hem de statik sıvı kültür fermentasyonu gerçekleştirilen üretimlerde, biyoreaktör giriş ve çıkışındaki gaz akımları içerisindeki O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> miktarını ölçmek için, biyoreaktör gaz giriş ve çıkış hatlarına taşınabilir O<sub>2</sub> ölçer ve taşınabilir CO<sub>2</sub> ölçer düzenekleri yerleştirilmiştir ve elde edilen verilerle, üretim süresince üremeye bağlı ortamdaki

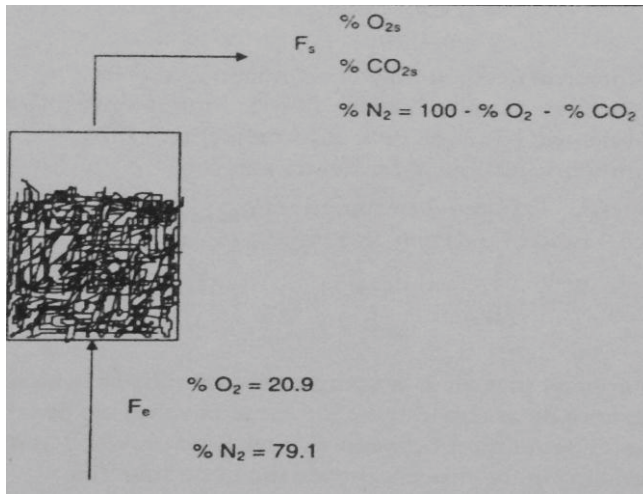


gaz miktarındaki değişimler ölçülerek mikrobiyal üreme ile ilişkilendirilmeye çalışılmıştır.

Metod, fermentasyon boyunca biyoreaktör çıkış gazının içeriğindeki değişimi göz önünde bulundurarak çalışmaktadır. Biyoreaktörden geçen hava akımındaki O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> dengesini göstermektedir. Biyoreaktöre giriş ve çıkıştaki havanın hacimsel kompozisyonunu gösteren bir şema, Şekil 3.1' de gösterilmektedir. Sistem için O<sub>2</sub> tüketiminin dengesi;

$$O_2 \text{ tüketilen} = O_2 \text{ giriş} - O_2 \text{ çıkış}$$

şeklindedir (Pandey et al.,2001).



Şekil 3.2. Biyoreaktör giriş ve çıkışında havanın hacimsel kompozisyonu (Pandey et al.,2001).

Biyoreaktöre saf havanın girdiği kabul edilirse % 20.9' u O<sub>2</sub>, %79.1' i de N<sub>2</sub>' dir. Bu durumda girişteki hacimsel akış hızı;

$$VO_{2i} = \left( \frac{20.9}{100} \right) \times Fi$$

$$VN_{2i} = \left( \frac{79.1}{100} \right) \times Fi$$

şeklindedir (Pandey et al.,2001).

Havanın çıkıştaki her bileşeni için hacimsel hız, çıkış havasının hacimsel kompozisyonu temel alınarak belirlenir ve bu çıkıştaki hava sadece O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ve N<sub>2</sub> içeriyor kabul edilir. Böylece;



$$VO_{2o} = \left( \frac{\%O_{2o}}{100} \right) \times Fo$$

$$VCO_{2o} = \left( \frac{\%CO_{2o}}{100} \right) \times Fo$$

$$VN_{2o} = ((100 - \%O_{2o} - \%CO_{2o})/100)Fo$$

şeklinde kabul yapılmaktadır. Buradan da hacimsel O<sub>2</sub> tüketim hızı (VO<sub>2</sub> tük) elde edilmektedir;

$$V_{O_2tük} = \left( \frac{20.9}{100} \right) \times Fi - \left( \frac{\%O_{2o}}{100} \right) \times Fo$$

Havanın sıkıştırılabilen akışkan olması da göz önünde bulundurulmalıdır. Biyoreaktör giriş ve çıkışındaki havanın içeriğinin değişmesine bağlı olarak yoğunluğunun farklılaşması nedeniyle akış hızları aynı kabul edilemez. Fi ve Fo arasındaki ilişki, N<sub>2</sub>' nin proses boyunca tüketilmemesi göz önünde bulundurularak belirlenmektedir;

$$VN_{2i} = VN_{2o}$$

Bu sayede biyoreaktörün giriş ve çıkışındaki hava akış hızları arasındaki ilişki belirlenebilir;

$$Fo = \frac{79.1 \times Fi}{(100 - \%O_2 - \%CO_2)}$$

Biyoreaktör girişindeki hava akış hızını dikkate alarak bu denklemlerle hacimsel oksijen tüketim hızı belirlenebilir;

$$V_{O_2tük} = \left( 0.209 - \frac{0.791 \times \%O_2}{100 - \%O_2 - \%CO_2} \right) \times Fi$$

Yine bu denkleme benzer şekilde hacimsel CO<sub>2</sub> oluşum hızı da belirlenebilmektedir. Biyoreaktöre giren havada CO<sub>2</sub> bulunmadığı kabulüyle hacimsel CO<sub>2</sub> oluşum hızı, hava giriş hızının foksionu olarak elde edilebilmektedir;

$$V_{CO_2oluşan} = \left( \frac{0.791 \times \%CO_2}{100 - \%O_2 - \%CO_2} \right) \times Fi$$

Her bir gaz için molar veya gravimetrik akış, gazlara ait hacimsel hız değerlerinden hesaplanmaktadır. Tüketilen hacimsel O<sub>2</sub> ve oluşan hacimsel CO<sub>2</sub>' yi göz önünde bulundurularak ve havanın fermentasyon koşullarında ideal gaz

olduğu kabulüyle molar ve hacimsel akış hızları elde edilebilmektedir. İdeal gaz yasasından herhangi bir bileşenin 1 molünün normal sıcaklık(273 K) ve basınç(1 atm) koşullarında 22.4L hacme sahip olduğu bilinmektedir. Bu yaklaşımda gerçek sıcaklık için düzeltmeler kullanılmalıdır ancak basınç için ihmal edilebilir (Pandey et al.,2001).

$$F_{düz} = F_{hava} \times \left( \frac{T_{üretim}}{273} \right) = 1.1 \times F_{hava}$$

$$V_{O_2tük} = \left( 0.209 - \frac{0.791 \times \%O_2}{100 - \%O_2 - \%CO_2} \right) \times F_{düz} \quad l O_2/h$$

$$V_{CO_2oluşan} = \left( \frac{0.791 \times \%CO_2}{100 - \%O_2 - \%CO_2} \right) \times F_{düz} \quad l CO_2/h$$

$$\frac{molO_2}{h} = \frac{V_{O_2tük}}{0.082} (T_{üretim})$$

$$\frac{molCO_2}{h} = \frac{V_{CO_2oluşan}}{0.082} (T_{üretim})$$

$$\frac{g O_2}{h} = 32 \times \frac{V_{O_2tük}}{0.082} (T_{üretim})$$

$$\frac{g CO_2}{h} = 44 \times \frac{V_{CO_2oluşan}}{0.082} (T_{üretim})$$

## 4 BULGULAR ve TARTIŞMA

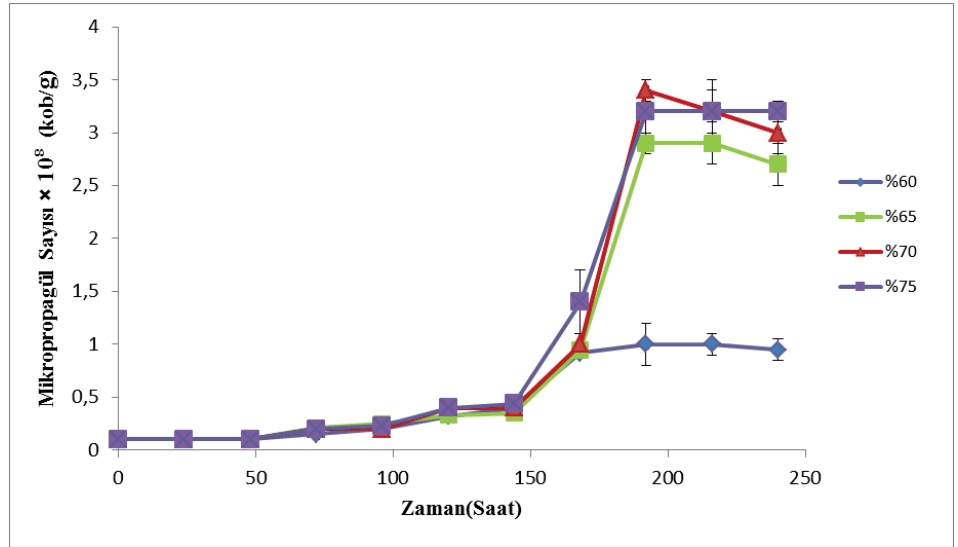
### 4.1 Mikropropagül Üretim Koşullarının Optimizasyonu

#### 4.1.1 Katı kültürde mikropropagül üretim koşullarının optimizasyonu

##### 4.1.1.1 Trichoderma harzianum EGE-K38 suşunun yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretiminde bazı parametrelerin optimizasyonu

###### Besi ortamının optimum nem içeriğinin belirlenmesi

Besi ortamının farklı nem içeriklerinin denenerek optimum nem değerinin belirlendiği denemelerde elde edilen sonuçlar Şekil 4.1' de, denemelerde elde edilen en yüksek değerler ve elde edildiği zamanlar ise Çizelge 4.1' de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde besi ortamı nem içeriği denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.

**Çizelge 4.1: Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde besi ortamı nem içeriği denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları.**

	%60	%65	%70	%75
<b>Mikropropagül Sayısı (kob/g)</b>	$1.0 \pm 0.2 \times 10^8$	$2.9 \pm 0.1 \times 10^8$	$3.4 \pm 0.1 \times 10^8$	$3.2 \pm 0.2 \times 10^8$
<b>Zaman (Saat)</b>	192	192	192	192

Şekil 4.1 ve Çizelge 4.1’deki sonuçlar değerlendirildiğinde en yüksek mikropropagül sayısı değerine % 70 nem içeriğinde ulaşıldığı gözlenmektedir. Bununla beraber % 65 ve %75 nem değerlerinde de elde edilen mikropropagül sayıları %70 nemle elde edilen değere yakındır. Sargın et al., (2013) buğday kepeği ve malt çimi karışımıyla gerçekleştirdikleri çalışmalarında optimum nem değerini % 70 olarak elde etmişlerdir. Nampoothiri et al.,(2004), buğday kepeğinde nem aralığını % 60 - 75 olarak belirleyip optimum nem miktarını % 68 olarak bulmuşlardır. Cavalcante et al., (2008), yaptıkları denemelerde buğday kepeğinin optimum nem içeriğini % 68.41 olarak elde etmişlerdir. Bu nedenle optimum nem değeri olarak % 70 nem değeri seçilmiştir.

Çizelge 4.2’de ise üretimler sırasında besi ortamı nem değerlerinin değişimi görülmektedir. Nem değerleri, başlangıç değerinin  $\pm$  %5’i değerler içerisindeyken sisteme herhangi bir müdahalede bulunmadan nem değeri gözlenmiştir. Nem değerinde % 5 ve daha fazla azalma meydana geldiğinde, depo hacminin yarısına kadar saf su içeren hava şartlandırıcı düzenek kızgın buhar beslenerek 121°C’de 30 dakika sterilize edilmiş ve sisteme bağlanmıştır, böylece biyoreaktöre steril nemli hava beslenerek besi ortamı nem içeriği başlangıç değerinde getirilmiştir. Hava şartlandırıcı düzenek biyoreaktöre bağlıyken besi ortamı nem içeriği değerinde % 5 azalma meydana geldiğinde hava şartlandırıcının sıcaklığı artırılarak taşıdığı nem miktarının artması sağlanmış ve böylece besi ortamının nem miktarı başlangıç değerine getirilmiştir. Besi ortamı nem içeriğinde zamanla artış meydana gelmemiştir.

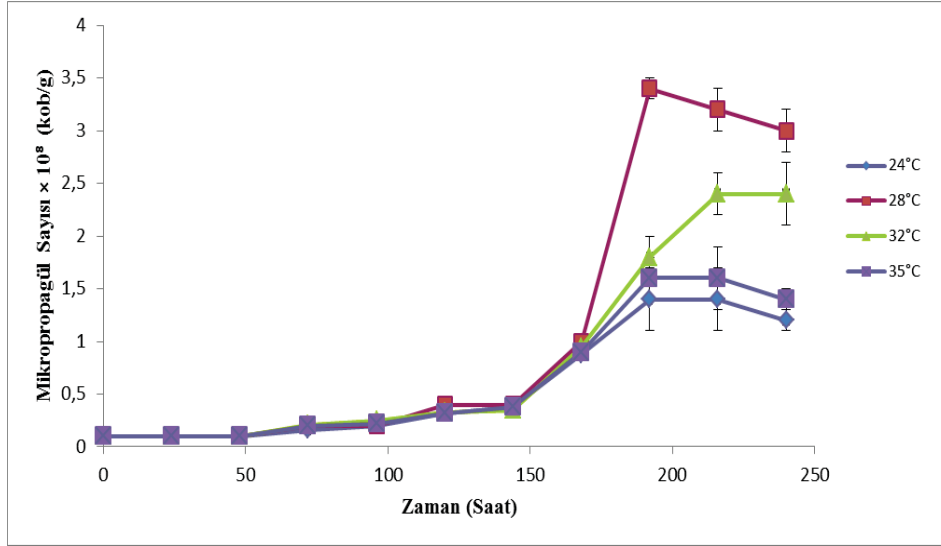
**Çizelge 4.2. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde farklı besi ortamı nem içeriklerinin denenmesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (\* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır, \*\* Hava şartlandırıcının sıcaklığı artırılarak taşıdığı nem miktarı yükseltilmiştir).**

Zaman	% Nem Değerleri			
	%60	%65	%70	%75
0	60	65	70	75
24	60	-	71	75
48	-	65	-	-
72	58	63	68	73
96	55*	61*	65*	71*
120	61	64	71	75
144	60	64	70	74
168	58	63	68**	71**
192	55**	63	68	73
216	56	62	67	73
240	56	62	67	71

Çizelge 4.2' deki değerlere bakıldığında besi ortamı nem içeriği değerlerindeki azalmanın, 96. saatte daha fazla olduğu görülmektedir. Bunun nedeni, besi ortamı nem içeriğindeki değişimin metabolik ısıya bağlı olmasıdır ve üremenin 168 ve 192. saatleri arasında nem içeriğinin daha fazla düştüğü gözlenmiştir. Ayrıca % 70 ve % 75 nem oranlarında gerçekleştirilen denemelerde hava şartlandırıcı sisteme bağlandıktan sonra da zamanla nem değerlerinde azalma meydana gelmiştir. Bunun nedeni, metabolik ısının yanında beslenen havanın nem içeriğinin de besi ortamı nem içeriğinin değişiminde önemli etkisinin olmasıdır. Aynı sıcaklıktaki hava şartlandırıcıyla beslenen havanın nem yükü % 60 ve % 65 nem oranındaki besi ortamı için yeterli gelmekteyken, % 70 ve % 75 gibi daha yüksek nem oranlarını koruyabilmek için metabolik ısıya da bağlı olarak zamanla yetersiz kalmaktadır.

### **Optimum ortam sıcaklığının belirlenmesi**

Optimum ortam sıcaklığının belirlenmeye çalışıldığı denemelerde  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  olacak şekilde 4 farklı sıcaklık değeri denenmiştir ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.2' de, denemelerde elde edilen en yüksek değerler ve elde edildiği zamanlar ise Çizelge 4.3' te gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Yatay karıştırılmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde ortam sıcaklığı denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.

Çizelge 4.3. Yatay karıştırılmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde ortam sıcaklığı denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları.

	24±2°C	28±2°C	32±2°C	35±2°C
<b>Mikropropagül Sayısı (kob/g)</b>	1.4±0.3×10 <sup>8</sup>	3.4±0.1×10 <sup>8</sup>	2.4±0.2×10 <sup>8</sup>	1.6±0.2×10 <sup>8</sup>
<b>Zaman (Saat)</b>	192	192	216	192

Bu sonuçlara göre, en yüksek mikropropagül sayısına 28±2°C sıcaklık değerinde 3.4±0.1×10<sup>8</sup> kob/g olarak ulaşıldığı gözlenmektedir. Yapılan çalışmalar da 28±2 °C' nin optimum sıcaklık olduğunu desteklemektedir (Sargın et al., 2013; Cavalcante et al., 2008; Nampoothiri et al., 2004). Bu nedenle optimum sıcaklık değeri olarak 28±2 °C belirlenmiş ve sonraki üretimler bu sıcaklık değerinde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.4' te ise farklı sıcaklıklardaki üretimler sırasında besi ortamı nem değerlerinin değişimi görünmektedir. Üretim boyunca günlük alınan örneklere nem tayini uygulanmıştır ve nem değerlerinde % 5' lik bir değişim meydana geldiğinde hava şartlandırıcı düzenek sisteme bağlanmış ve üretime o şekilde devam edilmiştir.

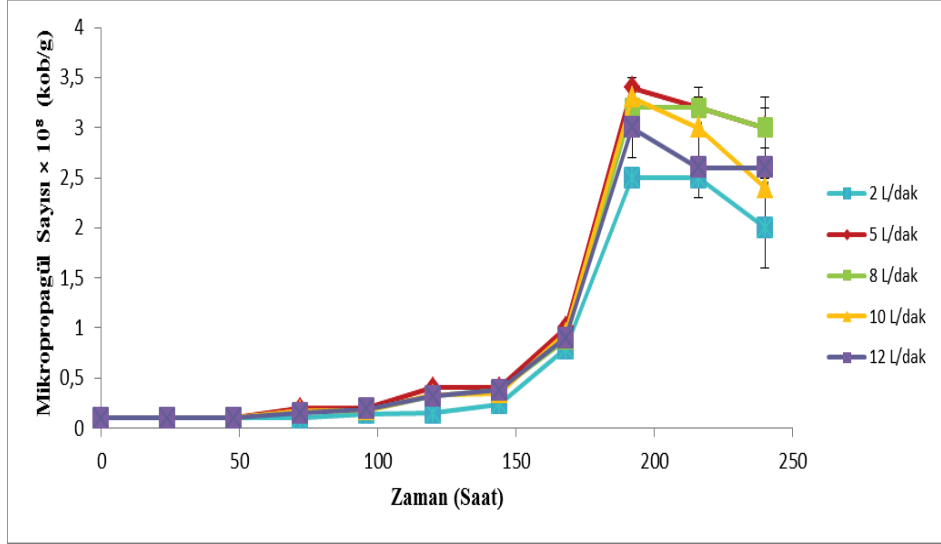
**Çizelge 4.4. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde farklı üretim sıcaklıklarının denenmesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (\* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır, \*\* Hava şartlandırıcının sıcaklığı artırılarak taşıdığı nem miktarı yükseltilmiştir).**

Zaman	% Nem Değerleri			
	24±2°C	28±2°C	32±2°C	35±2°C
0	70	70	70	70
24	-	71	-	66*
48	69	-	66*	70
72	69	68	70	-
96	68	65*	69	67
120	68	71	67	65**
144	66*	70	64**	71
168	72	68**	69	69
192	72	68	69	65**
216	71	67	68	69
240	70	67	67	68

Çizelge 4.4' teki değerlere bakıldığında besi ortamı nem içeriği değerlerindeki azalma, ortam sıcaklığına bağlı olarak değişim göstermektedir. 35±2°C üretim sıcaklığı değerlerinde üretimin ilk gününde nem değerinde hızlı bir azalma meydana gelirken, 24±2°C üretim sıcaklığında ise 144. saate kadar istenen nem değeri korunabilmiştir. Yine sisteme bağlanan hava şartlandırıcının taşıdığı nem yükünü artırmaya 24±2°C' deki üretimlerde ihtiyaç duyulmazken, 35±2°C' deki üretimlerde ise 120. saatte hava şartlandırıcının sıcaklığı artırılmıştır. Üretimler sırasında nem oranlarında meydana gelen değişimler arasındaki bu farkların nedeni, metabolik ısının yanında üretim ortamının sıcaklık değerinin, besi ortamının var olan nem içeriğinin değişimindeki önemli etkisidir.

#### **Optimum hava debisinin belirlenmesi**

Optimum havalandırma debisinin belirlenmeye çalışıldığı denemelerde 1,2,5,8,10,12 L/dak olacak şekilde 6 farklı havalandırma debisi değeri denenmiştir ve sonuçlara ait grafik Şekil 4.3' te, denemelerde elde edilen en yüksek değerler ve elde edildiği zamanlar ise Çizelge 4.5' te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde havalandırma debisi denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.

Çizelge 4.5. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde havalandırma debisi denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları.

	1 L/dak	2 L/dak	5 L/dak	8 L/dak	10 L/dak	12 L/dak
<b>Mikropropagül Sayısı (kob/g)</b>	-	$2.5 \pm 0.1 \times 10^8$	$3.4 \pm 0.1 \times 10^8$	$3.2 \pm 0.2 \times 10^8$	$3.3 \pm 0.3 \times 10^8$	$3.0 \pm 0.3 \times 10^8$
<b>Zaman (Saat)</b>	-	192	192	192	192	192

Bu sonuçlara göre, en yüksek mikropropagül sayısına 5 L/ dak değerinde  $3.4 \pm 0.1 \times 10^8$  kob/g olarak ulaşıldığı görülmektedir. Bununla beraber bu değerden daha yüksek ya da daha düşük hava debilerinin mikropropagül sayıları üzerinde artırıcı bir etkinliği gözlenmemiştir. Sadece yüksek hava debileri, oluşan metabolik ısının daha etkin şekilde uzaklaştırılmasını sağlasa da, bu etki aynı zamanda besi ortamı nem içeriğinin çok hızlı azalışına neden olmaktadır (Çizelge 4.6). 2 L/dak hava debisinde ise mikropropagül sayısı azalmıştır ( $2.5 \pm 0.1 \times 10^8$ ). Bunun nedeni, düşük debilerde beslenen havanın hem üretim için hem de substrat yatağının havalandırılması ve oluşan metabolik ısının uzaklaştırılmasında yetersiz kalmasıdır. 1 L/dak hava debisinde gerçekleştirilen üretimlerde kontaminasyona rastlandığı için herhangi bir sonuç elde edilememiştir ve bu havalandırma debisi



üretim için yetersiz görülmüştür. Bu nedenle optimum hava debisi olarak 5 L/ dak değeri belirlenmiş ve sonraki üretimler bu havalandırma debisinde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.6' da ise üretimler boyunca besi ortamı nem değerlerinin değişimi görünmektedir. Üretim boyunca günlük alınan örneklere nem tayini uygulanmıştır ve nem değerlerinde % 5' lik bir değişim meydana geldiğinde hava şartlandırıcı düzenek sisteme bağlanmış ve üretime o şekilde devam edilmiştir.

**Çizelge 4.6. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde farklı havalandırma debilerinin denenmesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (\* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır, \*\* Hava şartlandırıcının sıcaklığı artırılarak taşıdığı nem miktarı yükseltilmiştir).**

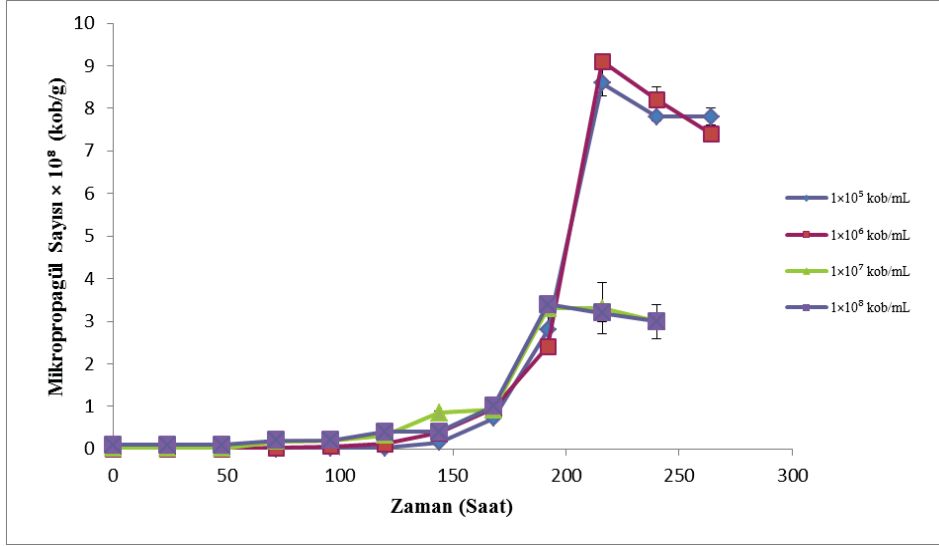
Zaman	% Nem Değerleri					
	1 L/dak	2 L/dak	5 L/dak	8 L/dak	10 L/dak	12 L/dak
0	70	71	70	70	70	70
24	71	-	71	66*	66*	64*
48	71	72	-	70	-	71
72	72	70	68	67	70	-
96	72	70	65*	64**	69	68
120	-	69	71	71	68	65**
144	-	70	70	70	66**	71
168	-	69	68**	69	69	70
192	-	69	68	69	69	69
216	-	71	67	68	69	69
240	-	72	67	67	67	67

Çizelge 4.6' daki değerlere bakıldığında besi ortamı nem içeriği havalandırma debisine bağlı olarak değişim göstermektedir. 8, 10 ve 12 L/ dak havalandırma debileriyle gerçekleştirilen üretimlerin ilk gününde nem değerinde hızlı bir azalma meydana gelirken, 2 L/dak debide ise üretim boyunca % 70 nem değeri korunabilmiştir. Üretimler sırasında nem oranlarında meydana gelen değişimler arasındaki bu farkların nedeni, yüksek havalandırma debisinin zorlamalı konveksiyonu etkin hale getirerek besi ortamının var olan nem içeriğinin hızla azalmasını sağlaması, düşük debilerde ise bu etkinin azalmasıdır.

#### **İnokulumdaki sporların optimum konsantrasyonlarının belirlenmesi**

İnokulumdaki sporların optimum konsantrasyonlarının belirlenmeye

çalışıldığı denemelerde  $1.0 \times 10^5$  kob/mL,  $1.0 \times 10^6$  kob/mL,  $1.0 \times 10^7$  kob/mL,  $1.0 \times 10^8$  kob/mL olacak şekilde 4 farklı inokulum spor konsantrasyonu denenmiştir ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.4’ te, denemelerde elde edilen en yüksek değerler ve elde edildiği zamanlar ise Çizelge 4.7’ de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulumdaki spor konsantrasyonu denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.

Çizelge 4.7. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulumdaki spor konsantrasyonu denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları.

	$1.0 \times 10^5$ kob/mL	$1.0 \times 10^6$ kob/mL	$1.0 \times 10^7$ kob/mL	$1.0 \times 10^8$ kob/mL
<b>Mikropropagül Sayısı (kob/g)</b>	$8.6 \pm 0.2 \times 10^8$	$9.1 \pm 0.1 \times 10^8$	$3.3 \pm 0.2 \times 10^8$	$3.4 \pm 0.1 \times 10^8$
<b>Zaman (Saat)</b>	216	216	192	192

Bu sonuçlara göre, en yüksek mikropropagül sayısına  $1.0 \times 10^6$  kob/mL spor konsantrasyonu değerinde ulaşılmaktadır ( $9.1 \pm 0.1 \times 10^8$  kob/g). Ayrıca  $1.0 \times 10^5$  kob/mL konsantrasyonda elde edilen mikropropagül sayısı da bu değere yakındır ( $8.6 \pm 0.2 \times 10^8$  kob/g) ancak yine de  $\pm$  sınırları içerisinde bir değere ulaşamamıştır. Aşı miktarındaki artış, biyokütlenin artışını ve hızlı proliferasyonu sağlamaktadır.

Buna karşın, belirli bir sınırdan sonra nutrientler için bir yarış söz konusu olduğundan, organizmaların metabolik aktivitesinde bir düşüş gözlenmektedir (Nampoothiri et al., 2004). Aşındaki sporların sayısının, mikropropagül sayılarına etkisini incelemek amacıyla yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar Nampoothiri et al.,' ın (2004) yaptıkları çalışmayla tutarlılık göstermektedir. Bu nedenle optimum inokulum spor konsantrasyonu değeri olarak  $1.0 \times 10^6$  kob/mL seçilmiş ve sonraki üretimlerde bu inokulum spor konsantrasyonu değeri kullanılmıştır.

Çizelge 4.8' de ise inokulumdaki spor konsantrasyonunun farklı değerleri denemesinde besi ortamı nem değerlerinin değişimi görünmektedir. Üretim boyunca günlük alınan örneklere nem tayini uygulanmıştır ve nem değerlerinde % 5' lik bir değişim meydana geldiğinde hava şartlandırıcı düzenek sisteme bağlanmış ve üretime o şekilde devam edilmiştir.

**Çizelge 4.8. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulumdaki farklı spor konsantrasyonları denemesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (\* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır, \*\* Hava şartlandırıcının sıcaklığı artırılarak taşıdığı nem miktarı yükseltilmiştir).**

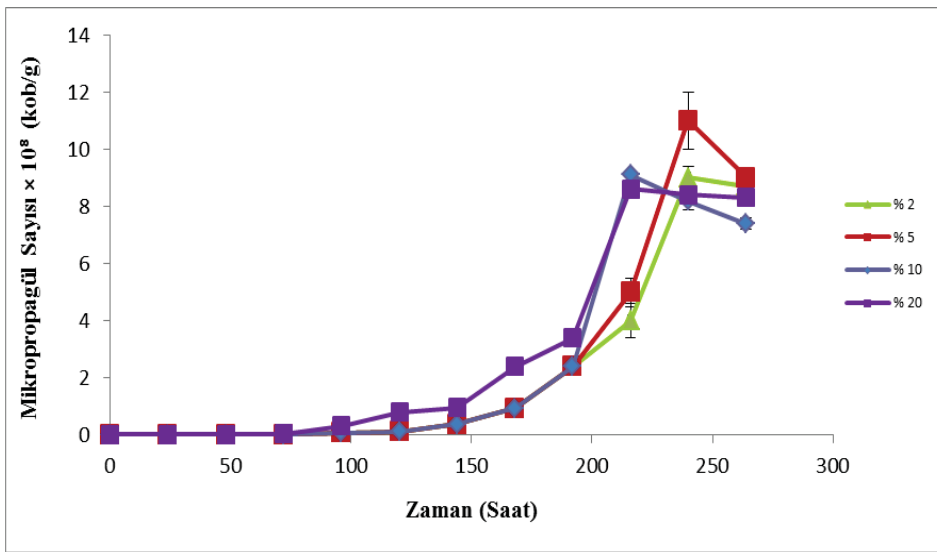
Zaman	% Nem Değerleri			
	$1.0 \times 10^5$ kob/mL	$1.0 \times 10^6$ kob/mL	$1.0 \times 10^7$ kob/mL	$1.0 \times 10^8$ kob/mL
0	70	70	70	70
24	-	-	-	71
48	69	69	69	-
72	68	69	68	68
96	68	67	66	65*
120	67	64*	64*	71
144	66*	70	70	70
168	70	66**	69	68**
192	68	71	69	68
216	64**	70	68	67
240	68	70	67	67

Çizelge 4.8' deki değerlere bakıldığında besi ortamı nem içeriği değerlerindeki azalma, inokulum spor konsantrasyonu ile doğrudan ilişkili değişim göstermemektedir. Bununla beraber  $1.0 \times 10^8$  kob/mL spor konsantrasyonu ile gerçekleştirilen üretimlerde nem değerlerindeki azalış, diğer spor konsantrasyonundaki üretimlere göre daha erken gerçekleşmiştir. Bunun

nedeni, yoğun aşılamanın yapıldığı üretimlerde hücrelerin gelişiminin daha erken gerçekleşmesi ve dolayısı ile metabolik ısının daha erken artması, daha düşük konsantrasyonlu aşılama ise hücrelerin ortama alışmalarının daha uzun sürmesi ve bu nedenle daha yavaş büyümeleri ve metabolik ısı üretmeleridir.

### Optimum inokulum hacminin belirlenmesi

İnokulasyondaki spor konsantrasyonunu değiştirmeden % 2, 5, 10 ve 20 (hacim/ağırlık) aşılamanın denenerek optimum inokulum hacmi değerinin belirlendiği denemelerde elde edilen sonuçlar Şekil 4.5’ te, en yüksek değerler ve elde edildiği zamanlar ise Çizelge 4.9’ da gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Yatay karıştırılmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulum hacmi denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.

Çizelge 4.9. Yatay karıştırılmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulum hacmi denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları.

	% 2	% 5	% 10	% 20
Mikropropagül Sayısı (kob/g)	$9.0 \pm 0.4 \times 10^8$	$1.1 \pm 0.1 \times 10^9$	$9.1 \pm 0.1 \times 10^8$	$8.6 \pm 0.2 \times 10^8$
Zaman (Saat)	240	240	216	216

Şekil 4.5 ve Çizelge 4.9’ daki sonuçlar değerlendirildiğinde en yüksek

mikropropagül sayısına % 5 inokulum hacminde  $1.1 \pm 0.1 \times 10^9$  kob/g olarak ulaşılmıştır. Bununla beraber % 5 inokulum hacmi dışındaki hacimlerde elde edilen mikropropagül sayıları birbirine çok yakındır ve tümü % 5 inokulum hacmi ile elde edilen değerden daha düşük bulunmuştur. Bu nedenle optimum inokulum hacmi olarak % 5 değeri seçilmiş ve üretimlerde aşılama % 5 oranında yapılmıştır.

Çizelge 4.10' da ise farklı inokulum hacimleriyle gerçekleştirilen üretimlerde besi ortamı nem değerlerinin değişimi görülmektedir. Üretim boyunca günlük alınan örneklerle nem tayini uygulanmıştır ve nem değerlerinde % 5' lik bir değişim meydana geldiğinde hava şartlandırıcı düzenek sisteme bağlanmış ve üretime o şekilde devam edilmiştir.

**Çizelge 4.10 Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde farklı besi ortamı nem içeriklerinin denenmesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (\* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır, \*\* Hava şartlandırıcının sıcaklığı artırılarak taşıdığı nem miktarı yükseltilmiştir).**

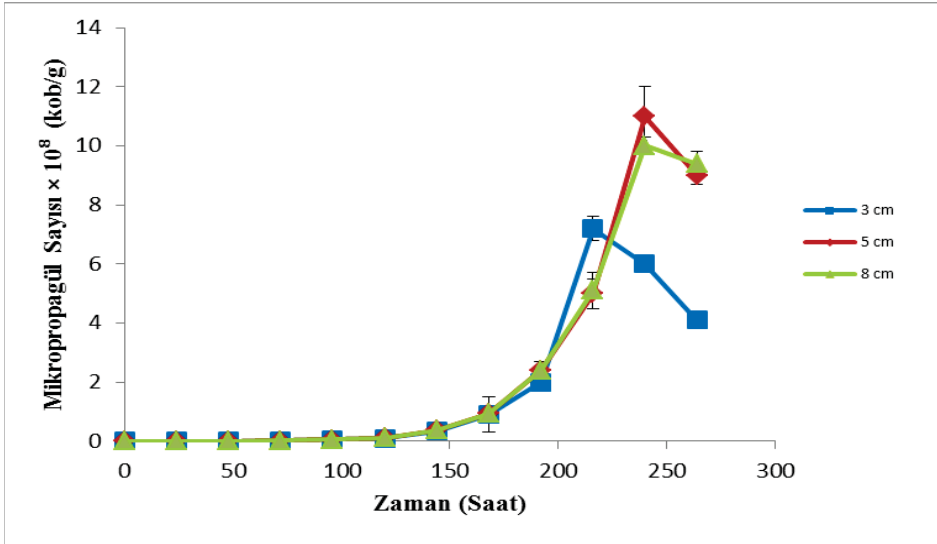
Zaman	% Nem Değerleri			
	% 2	% 5	% 10	% 20
0	70	70	70	70
24	70	71	70	65*
48	-	70	-	70
72	68	69	69	67
96	64*	62*	64*	63**
120	70	71	70	71
144	70	69	70	71
168	69	65**	67**	70
192	66**	67	68	68
216	69	67	68	68
240	69	68	67	69

Çizelge 4.10' daki değerlere bakıldığında besi ortamı nem içeriği değerlerindeki azalmanın, % 2, 5 ve 10 aşılama 96. saatte daha fazla olduğu görülmektedir. Bununla beraber % 20 inokulum hacminde daha hızlı bir nem azalışı gözlenmektedir. Bunun nedeni, besi ortamı nem içeriğindeki değişimin metabolik ısıya bağlı olması ve yüksek inokulum hacimleriyle gerçekleştirilen üretimlerde üremenin daha hızlı gerçekleşmesi nedeniyle nemin daha hızlı

azalmasıdır.

### Substrat yatağının optimum kalınlığının belirlenmesi

Optimum besi ortamı miktarının (substrat yatağı kalınlığının) belirlenmeye çalışıldığı denemelerde 3, 5 ve 8 cm yatak kalınlığı değerleri denenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.6' da, en yüksek değerler ve elde edildiği zamanlar ise Çizelge 4.11' de gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde yatak kalınlığı denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.

Çizelge 4.11. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde substrat yatak kalınlığı denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları.

	3 cm	5 cm	8 cm
Mikropropagül Sayısı (kob/g)	$7.2 \pm 0.4 \times 10^8$	$1.1 \pm 0.1 \times 10^9$	$1.0 \pm 0.3 \times 10^9$
Zaman (Saat)	216	240	240

Şekil 4.6 ve Çizelge 4.11' deki sonuçlar değerlendirildiğinde bu üç seviye arasında en yüksek mikropropagül sayısına 5 cm yatak kalınlığında  $1.1 \pm 0.1 \times 10^9$  kob/g olarak ulaşıldığı gözlenmektedir. 3 cm yatak kalınlığı denemesinde,

denemenin en yüksek değerine 216. saatte ulaşılsa da elde edilen mikropropagül sayısı, diğer kalınlıklarla gerçekleştirilen üretimlerden elde edilen mikropropagül sayılarından daha düşüktür ( $7.2 \pm 0.4 \times 10^8$ ). 8 cm yatak kalınlığında ise  $1.0 \pm 0.3 \times 10^9$  kob/g mikropropagül sayısına ulaşılmıştır ve bu değer,  $\pm$  değerler de göz önünde bulundurulduğunda 5 cm' de elde edilen mikropropagül sayısına eşittir. Ancak 5 cm yatak kalınlığıyla gerçekleştirilen üretimlerde aynı sonuca daha az substrat harcanarak ulaşıldığı için optimum substrat yatağı kalınlığı değeri 5 cm' dir.

Çizelge 4.12' de ise farklı besi ortamı kalınlıklarıyla gerçekleştirilen üretimlerde besi ortamı nem değerlerinin değişimi görülmektedir. Üretim boyunca günlük alınan örneklere nem tayini uygulanmıştır ve nem değerlerinde % 5' lik bir değişim meydana geldiğinde hava şartlandırıcı düzenek sisteme bağlanmış ve üretime o şekilde devam edilmiştir.

**Çizelge 4.12. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde substrat yatağı kalınlığının denemesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (\* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır, \*\* Hava şartlandırıcının sıcaklığı artırılarak taşıdığı nem miktarı yükseltilmiştir).**

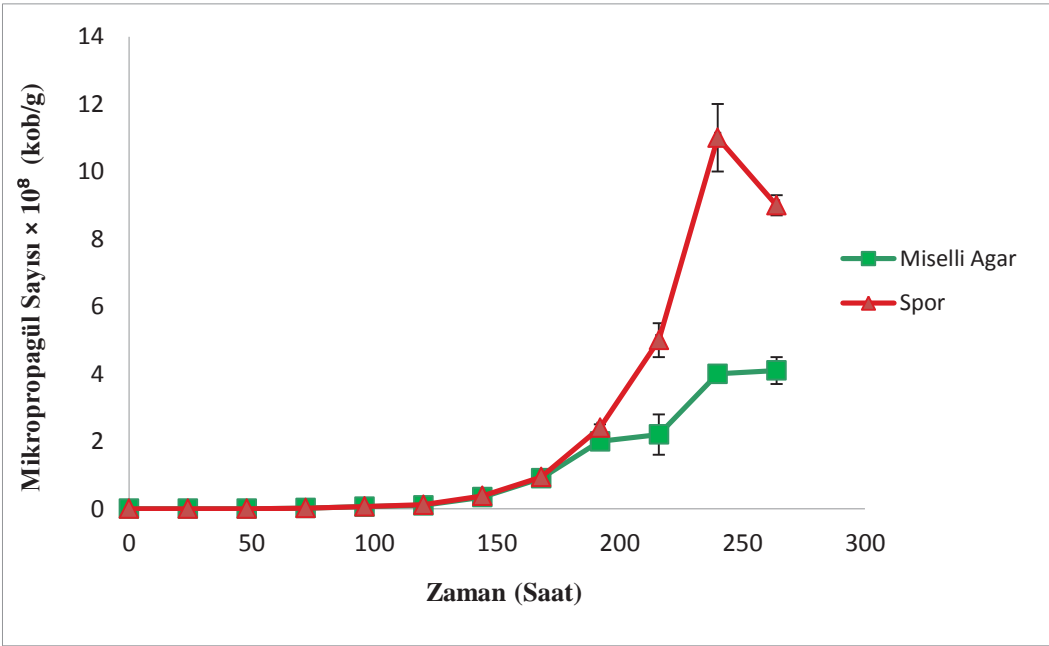
Zaman	% Nem Değerleri		
	3 cm	5 cm	8 cm
0	70	70	71
24	70	71	71
48	67	70	70
72	63*	69	70
96	69	62*	64*
120	68	71	70
144	65**	69	70
168	71	65**	65**
192	72	67	69
216	72	67	69
240	73	68	68

Çizelge 4.12' deki değerlere bakıldığında besi ortamı nem içeriğindeki azalmanın, 72-96. saat arası daha fazla olduğu görülmektedir. 3 cm ortam kalınlığında daha hızlı nem azalışı gözlenirken 5 ve 8 cm ortam kalınlıklarında bu azalış daha geç gerçekleşmiştir. Bunun nedeni, düşük kalınlıklardaki katı substrat

yataklarının, metabolik ısıya ve havalandırmaya bağlı olarak daha hızlı kurumasıdır. Substrat miktarı arttıkça nem değerindeki azalış daha yavaş gerçekleşmiştir.

### Aşı olarak spor ya da misel kullanımının etkilerinin belirlenmesi

Spor ya da misel aşılamanın mikropropagül sayılarına etkilerinin belirlenmeye çalışıldığı denemelerden elde edilen sonuçlar Şekil 4.7’ de, en yüksek mikropropagül değerleri ve elde edildiği zamanlar ise Çizelge 4.13’ te gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde aşı olarak spor ya da misel kullanımı denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.

Çizelge 4.13. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde aşı olarak spor ya da misel kullanımı denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları.

	Misel	Spor
Mikropropagül Sayısı (kob/g)	$4.1 \pm 0.4 \times 10^8$	$1.1 \pm 0.1 \times 10^9$
Zaman (Saat)	264	240



Şekil 4.7 ve Çizelge 4.13 incelendiğinde, bu iki denemeden spor inokulasyonunda daha yüksek mikropropagül sayısına ulaşıldığı gözlenmiştir. Miselli agar parçalarıyla aşılana ortamda gerçekleştirilen üretimlerde ise spor inokulasyonuna göre 2.5-3 kat arası daha az mikropropagül sayısına ulaşılabilmektedir. Bunun nedeni, spor inokulasyonunda aşılana sporların ortama daha düzgün dağılıp birçok noktadan üremeye başlamaları ve besine daha kolay ulaşarak daha hızlı üreyip çevreye yayılmaları, buna karşın miselli agar ekiminde ise misellerin daha az bölgeye saçılmaları, bu nedenle de besine ulaşmakta daha fazla zorlanmalarıdır. Bu nedenle bu koşullardaki üretimler için spor aşılama optimum aşılama yöntemidir.

Çizelge 4.14' te ise bu iki farklı inokulasyon tipi ile gerçekleştirilen üretimlerde besi ortamı nem değerlerinin değişimi görünmektedir. Üretim boyunca günlük alınan örneklere nem tayini uygulanmıştır ve nem değerlerinde % 5' lik bir değişim meydana geldiğinde hava şartlandırıcı düzenek sisteme bağlanmış ve üretime o şekilde devam edilmiştir.

**Çizelge 4.14. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde spor ya da miselli agar parçaları aşılamanın etkileri denenmesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (\* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır, \*\* Hava şartlandırıcının sıcaklığı artırılarak taşıdığı nem miktarı yükseltilmiştir).**

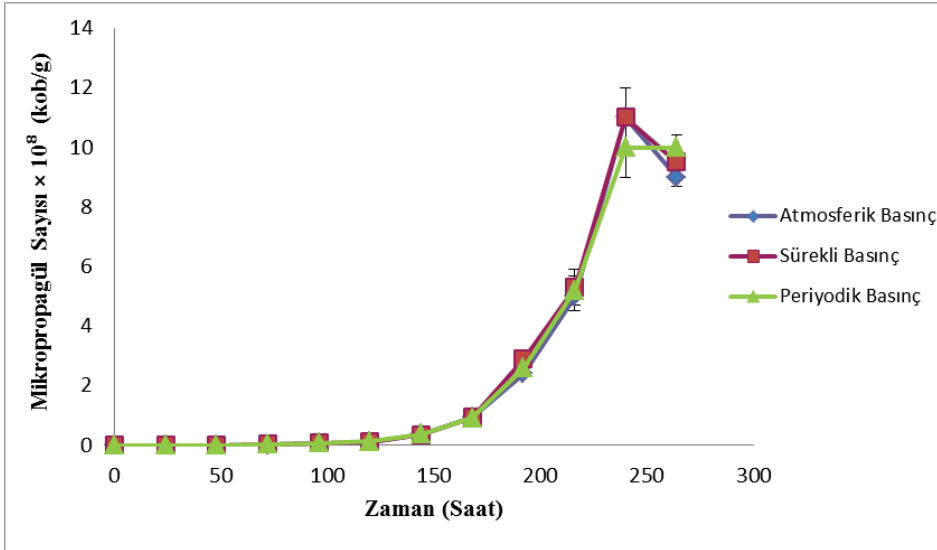
Zaman	% Nem Değerleri	
	Misel	Spor
0	70	70
24	70	71
48	67	70
72	67	69
96	66	62*
120	66	71
144	63*	69
168	71	65**
192	72	67
216	70	67
240	69	68

Çizelge 4.14' teki değerlere bakıldığında besi ortamı nem içeriğindeki

azalmanın, spor aşılandığı üretimlerde daha hızlı gerçekleştiği görülmektedir. Misel aşılandığı durumda ise bu azalış daha geç gerçekleşmiştir ve hava şartlandırıcının sıcaklığının artırılması gerekmemiştir. Bunun nedeni, spor aşılanan üretimlerde, üremenin daha erken gerçekleşmesi ve buna bağlı olarak ısı üretiminin erken artışı gösterilmektedir. Misel aşılandığı üretimlerde ise daha yavaş bir üreme ve buna bağlı olarak daha yavaş bir nem kaybı söz konusudur.

### Periyodik basınç uygulamanın etkilerinin belirlenmesi

Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile *Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin üretiminde periyodik basınç uygulamasının mikropropagül üretimine etkilerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen denemelerden elde edilen sonuçlar Şekil 4.8’ de, en yüksek mikropropagül değerleri ve elde edildiği zamanlar ise Çizelge 4.15’ te gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde periyodik basınç uygulama denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.

**Çizelge 4.15. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde periyodik basınç uygulama denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları.**

	Atmosferik Basınç	Sürekli Uygulama	Periyodik Uygulama
<b>Mikropropagül Sayısı (kob/g)</b>	$1.1 \pm 0.1 \times 10^9$	$1.1 \pm 0.1 \times 10^9$	$1.0 \pm 0.1 \times 10^9$
<b>Zaman (Saat)</b>	240	240	240

Bu üç farklı uygulama içinde en yüksek mikropropagül sayısına hem atmosferik basınçta hem de sürekli basınç uygulamasında  $1.1 \pm 0.1 \times 10^9$  kob/g olarak ulaşıldığı gözlenmektedir. Periyodik basınç uygulandığı üretimlerden de elde edilen değer, diğer üretimlerle elde edilen değerlere,  $\pm$  sınırları göz önünde bulundurulduğunda eşittir. Elde edilen bu sonuçlara göre basınç uygulamasının sürekli ya da periyodik oluşuna bakılmaksızın mikropropagül sayısını önemli ölçüde değiştirmedığı gözlenmektedir.

Çizelge 4.16' de ise farklı basınç uygulama yöntemleriyle gerçekleştirilen üretimlerde besi ortamı nem değerlerinin değişimi görülmektedir. Üretim boyunca günlük alınan örneklere nem tayini uygulanmıştır ve nem değerlerinde % 5' lik bir değişim meydana geldiğinde hava şartlandırıcı düzenek sisteme bağlanmış ve üretime o şekilde devam edilmiştir.

**Çizelge 4.16. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde substrat yatağı kalınlığının denenmesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (\* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır, \*\* Hava şartlandırıcının sıcaklığı artırılarak taşıdığı nem miktarı yükseltilmiştir).**

Zaman	% Nem Değerleri		
	Atmosferik Basınç	Sürekli Uygulama	Periyodik Uygulama
0	70	72	71
24	71	71	70
48	70	69	69
72	69	68	67
96	62*	61*	61*
120	71	70	72
144	69	67	70
168	65**	62**	64**
192	67	69	72
216	67	66	69
240	68	65	67

Çizelge 4.16' daki değerlere bakıldığında besi ortamı nem içeriğindeki azalmanın, her üç yöntemde de 96. saatte daha fazla olduğu görülmektedir. Basınç uygulanan denemelerde nem değerleri, uygulanmayan denemelere göre yaklaşık % 1 daha düşüktür ancak yine de hem nem azalış zamanları ve nem değerleri birbirine yakındır. Bunun nedeni, basınç uygulamanın beklendiği gibi metabolik ısıyı uzaklaştırmada etkili olduğu, ancak uygulanan basınç değerinin atmosferik basınca yakın olması nedeniyle daha etkin bir ısı transferi sağlanamaması ve buna bağlı olarak ta daha erken saatlerde, daha yüksek nem azalışlarının meydana gelememesidir.

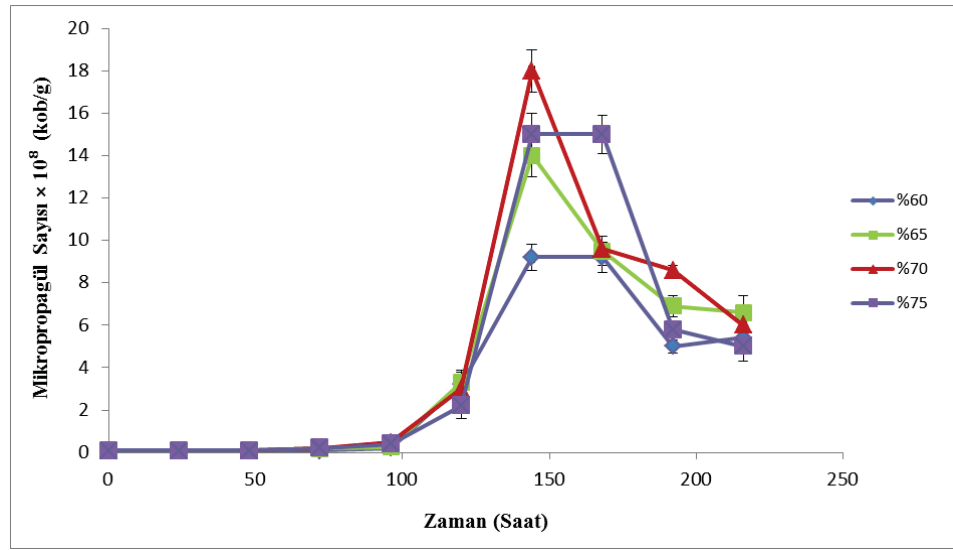
#### **Steril ve steril olmayan koşulların etkilerinin belirlenmesi**

Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde sterilizasyonun mikropropagül üretimine etkilerinin incelendiği denemelerde, sterilizasyonun uygulanmadığı üretimlerde kontaminasyon meydana geldiği için herhangi bir değer elde edilememiştir. O nedenle sterilizasyonun *Trichoderma harzianum* mikropropagül üretimi için önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

#### 4.1.1.2 Trichoderma harzianum EGE-K38 suşunun yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretiminde bazı parametrelerin optimizasyonu

##### Besi ortamının optimum nem içeriğinin belirlenmesi

Besi ortamının optimum nem içeriği değeri belirlenmeye çalışıldığı denemelerde % 60, 65, 70 ve 75 değerleri denenmiştir ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.9’ da, en yüksek mikropropagül değerleri ve elde edildiği zamanlar ise Çizelge 4.17’ de gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde besi ortamı nem içeriği denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.

Çizelge 4.17. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde besi ortamı nem içeriği denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları.

	%60	%65	%70	%75
<b>Mikropropagül Sayısı (kob/g)</b>	$9.2 \pm 0.6 \times 10^8$	$1.4 \pm 0.1 \times 10^9$	$1.8 \pm 0.1 \times 10^9$	$1.5 \pm 0.1 \times 10^9$
<b>Zaman (Saat)</b>	144	144	144	144

Şekil 4.9 ve Çizelge 4.17’ deki sonuçlar değerlendirildiğinde en yüksek mikropropagül sayısı değerine % 70 nem içeriğinde ulaşılmıştır ( $1.8 \pm 0.1 \times 10^9$

kob/g). Bununla beraber % 65 ve % 75 nem değerlerinde elde edilen mikropropagül sayıları sırasıyla  $1.4 \pm 0.1 \times 10^9$  ve  $1.5 \pm 0.1 \times 10^9$  dur ve en yüksek mikropropagül sayısına  $\pm$  değerler göz önünde bulundurulduğunda yakındır. Sargın et al., (2013), Nampoothiri et al.,(2004) ve Cavalcante et al.,' in (2008) çalışma sonuçları da göz önünde bulundurulurak optimum nem değeri olarak % 70 nem değeri seçilmiş ve üretimlerde besi ortamı nem içeriği değeri yatay karıştırmalı biyoreaktördeki denemelere benzer şekilde üretim boyunca % 70' te tutulmuştur. Bununla beraber nem değerinin % 65'e düşmesi veya % 75' e çıkması durumlarının da mikropropagül sayılarına belirgin derecede etkisi olmayacağı sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 4.18' de ise üretimler sırasında besi ortamı nem değerlerinin değişimi görünmektedir. Nem değerlerinde % 5' lik bir değişim meydana geldiğinde hava şartlandırıcı düzenek steril edilerek sisteme bağlanmıştır ve üretimlere bu şekilde devam edilmiştir. Üretimler sırasında besi ortamı nem içeriğinde, hava şartlandırıcı düzenek bağlandıktan sonra tekrar % 5' lik bir azalma meydana gelmediği için, hava şartlandırıcı düzeneğin sıcaklığının yükseltilerek taşıdığı nem miktarının artırılmasına gerek görülmemiştir.

**Çizelge 4.18. Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde farklı besi ortamı nem içeriklerinin denenmesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (\* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır).**

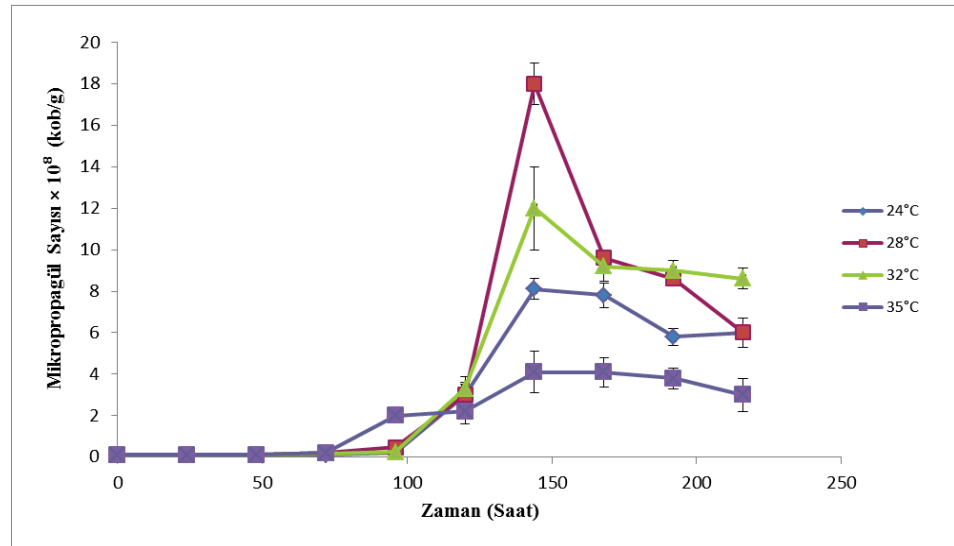
Zaman	% Nem Değerleri			
	%60	%65	%70	%75
0	60	65	70	75
24	-	65	71	75
48	61	-	70	73
72	59	64	-	73
96	59	64	69	73
120	58	64	69	-
144	58	63	68	72
168	-	63	67	71
192	57	62	67	71
216	56	61	68	70*
240	56	60	67	76

Çizelge 4.18' deki değerlere bakıldığında besi ortamı nem içeriği

değerlerindeki azalmanın, yatay karıştırmalı biyoreaktöre göre daha yavaş gerçekleştiği görülmektedir. Bunun nedeni, yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde, besi ortamı nem içeriğindeki değişimde metabolik ısının daha etkin olması, zorlamalı konveksiyonun ise çok etkin olmamasıdır. Bu nedenle 144. saatten sonra nem içeriğinin daha fazla düştüğü gözlenmektedir. Sadece % 75 nem oranında gerçekleştirilen denemelerde hava şartlandırıcının sisteme bağlanmasına gerek duyulmuştur, bunun nedeni de her ne kadar besi ortamına doğrudan hava beslenmesinde de biyoreaktör içersine beslenen havanın nem içeriğinin besi ortamından daha düşük olması nedeniyle her koşulda yüksek nem içeriğini korumanın daha zor olmasıdır. Aynı sıcaklıkta sisteme beslenen havanın nem yükü daha düşük nem oranındaki besi ortamı için yeterli gelmekteyken, daha yüksek nem oranları için metabolik ısıya da bağlı olarak zamanla yeterli gelmemektedir.

### Optimum ortam sıcaklığının belirlenmesi

Optimum ortam sıcaklığının belirlenmeye çalışıldığı denemelerde  $24\pm 2^\circ\text{C}$ ,  $28\pm 2^\circ\text{C}$ ,  $32\pm 2^\circ\text{C}$ ,  $35\pm 2^\circ\text{C}$  olacak şekilde 4 farklı sıcaklık değeri denenmiştir ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.10' da, en yüksek mikropropagül değerleri ve elde edildiği zamanlar ise Çizelge 4.19' da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde besi ortamı nem içeriği denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.

**Çizelge 4.19. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde ortam sıcaklığı denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları.**

	24±2°C	28±2°C	32±2°C	35±2°C
<b>Mikropropagül Sayısı (kob/g)</b>	8.1±0.5×10 <sup>8</sup>	1.8±0.1×10 <sup>9</sup>	1.2±0.2×10 <sup>9</sup>	9.0±0.1×10 <sup>8</sup>
<b>Zaman (Saat)</b>	144	144	144	144

Bu sonuçlara göre, en yüksek mikropropagül sayısının 28±2°C sıcaklık değerinde elde edildiği gözlenmektedir (1.8±0.1×10<sup>9</sup> kob/g). Sargın et al., (2013) da çalışmalarında optimum ortam sıcaklığını 28°C olarak elde etmişlerdir. Ortam sıcaklığında meydana gelebilecek artış ya da azalışlarda ise mikropropagül sayılarının azalacağı sonucuna ulaşılmıştır. Nampoothiri et al.,(2004) ve Cavalcante et al.,' in (2008) çalışmalarından da, elde edilen sonuçları destekleyici verilere ulaşılmıştır. Bu nedenle optimum sıcaklık değeri olarak 28±2°C seçilmiş ve sonraki üretimlerde bu sıcaklık değerinde üretimler gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.20' de ise farklı sıcaklıklardaki üretimler sırasında besi ortamı nem değerlerinin değişimi görünmektedir. Üretim boyunca günlük alınan örneklerle nem tayini uygulanmıştır ve nem değerlerinde % 5' lik bir değişim meydana geldiğinde hava şartlandırıcı düzenek steril edilerek sisteme bağlanmıştır ve üretimlere bu şekilde devam edilmiştir.



**Çizelge 4.20. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde farklı üretim sıcaklıklarının denenmesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (\* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır, \*\* Hava şartlandırıcının sıcaklığı artırılarak taşıdığı nem miktarı yükseltilmiştir).**

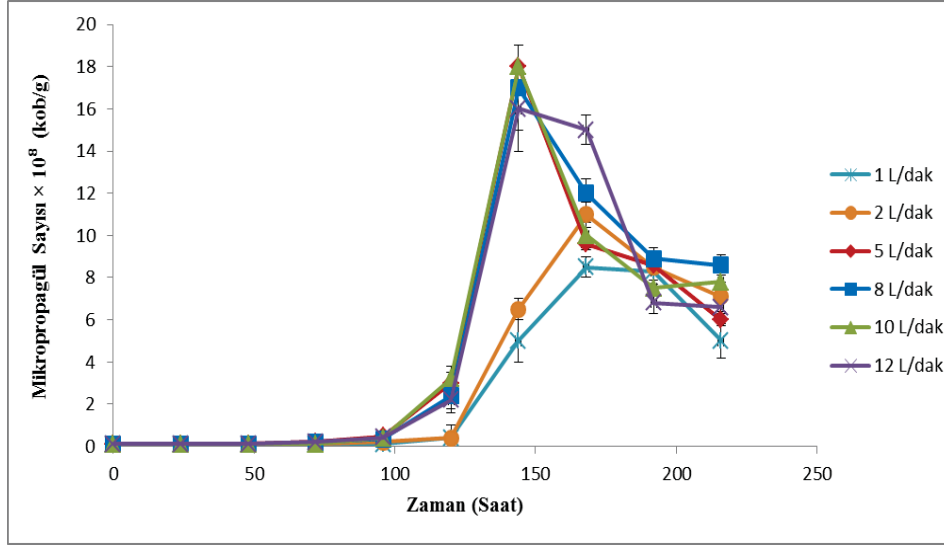
Zaman	% Nem Değerleri			
	24±2°C	28±2°C	32±2°C	35±2°C
0	70	70	70	70
24	70	71	-	69
48	-	70	69	
72	69	-	68	68
96	69	69	67	67
120	68	69	67	66
144	68	68	66	64*
168	67	67	66	69
192	67	67	65*	67
216	68	68	72	66**
240	68	67	72	71

Çizelge 4.20' deki değerlere bakıldığında besi ortamı nem içeriği değerlerindeki azalma, ortam sıcaklığına bağlı olarak değişim göstermektedir. 35±2°C üretim sıcaklığı değerinde, diğer sıcaklıklara göre nem değerinde daha erken bir azalma meydana gelirken, 24±2°C ve 28±2°C' deki üretimlerde ise istenen nem değeri üretim boyunca korunmuştur. Bu nedenle 24±2°C ve 28±2°C' deki üretimlerde hava şartlandırıcının bağlanmasına gerek duyulmazken 35±2°C' deki üretimlerde 144. saatten itibaren hava şartlandırıcı sisteme bağlanarak üretime devam edilmiştir. Ayrıca 35±2°C' deki üretimlerde üretimin sonuna doğru hava şartlandırıcının sağladığı nem yeterli gelmediği için hava şartlandırıcının sıcaklığı yükseltilerek, havanın taşıdığı nem miktarı artırılmış ve üretim ortamı için istenen nem değerinin sağlanmıştır. Üretimler sırasında nem oranlarında meydana gelen değişimler arasındaki bu farkların nedeni, metabolik ısının yanında üretim ortamının sıcaklık değerinin, besi ortamının var olan nem içeriğinin değişimindeki önemli etkisidir.

### **Optimum hava debisinin belirlenmesi**

Optimum havalandırma debisinin belirlenmeye çalışıldığı denemelerde 1,2,5,8,10,12 L/dak gibi 6 farklı havalandırma debisi değeri denenmiştir ve elde

edilen sonuçlar Şekil 4.11’ de, en yüksek mikropropagül değerleri ve elde edildiği zamanlar ise Çizelge 4.21’ de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde hava debisi denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.

Çizelge 4.21. Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde havalandırma debisi denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları.

	1 L/dak	2 L/dak	5 L/dak	8 L/dak	10 L/dak	12 L/dak
<b>Mikropropagül Sayısı (kob/g)</b>	$8.5 \pm 0.5 \times 10^8$	$1.1 \pm 0.6 \times 10^9$	$1.8 \pm 0.1 \times 10^9$	$1.7 \pm 0.2 \times 10^9$	$1.8 \pm 0.1 \times 10^9$	$1.6 \pm 0.2 \times 10^9$
<b>Zaman (Saatt)</b>	168	168	144	144	144	144

Bu sonuçlara göre, en yüksek mikropropagül sayısına 5 ve 10 L/ dak değerlerinde  $1.8 \pm 0.1 \times 10^9$  kob/g olarak ulaşıldığı gözlenmektedir. Bununla beraber 8 ve 12 L/ dak havalandırma debilerinin de mikropropagül sayıları  $\pm$  değerleri de göz önünde bulundurulduğunda en yüksek değere eşit ve yaklaşıktır. Hava debisindeki artış, oluşan metabolik ısının daha etkin uzaklaştırılmasını sağlasa da bu etki çok yüksek havalandırma hızlarında aynı zamanda besi ortamı nem içeriğinde de hızlı azalışına neden olmaktadır (Çizelge 4.22). 1 ve 2 L/dak hava debilerinde ise mikropropagül sayısı, diğer debilerde elde edilene göre 1.5- 2 kat azalmıştır. Bunun nedeni, düşük debilerde beslenen havanın hem üretim için hem de substrat yatağının havalandırılması ve oluşan metabolik ısının

uzaklaştırılmasında yetersiz kalmasıdır. Bu nedenle optimum hava debisi olarak 5 L/dak değeri seçilmiş ve sonraki üretimler bu havalandırma debisinde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.22’ de ise üretimler boyunca besi ortamı nem değerlerinin değişimi görünmektedir. Üretim boyunca günlük alınan örnekler nem tayini uygulanmıştır ve nem değerlerinde % 5’ lik bir değişim meydana geldiğinde hava şartlandırıcı düzenek steril edilerek sisteme bağlanmıştır ve üretimlere bu şekilde devam edilmiştir. Hava şartlandırıcının sisteme bağlandığı üretimler sırasında besi ortamı nem içeriğinde, hava şartlandırıcı düzenek bağlandıktan sonra % 5’ lik bir azalma tekrar meydana gelmediği için, hava şartlandırıcı düzeneğin sıcaklığının yükseltilecek taşıdığı nem miktarının artırılmasına gerek görülmemiştir.

**Çizelge 4.22. Yüzeysel havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde farklı havalandırma debilerinin denenmesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (\* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır).**

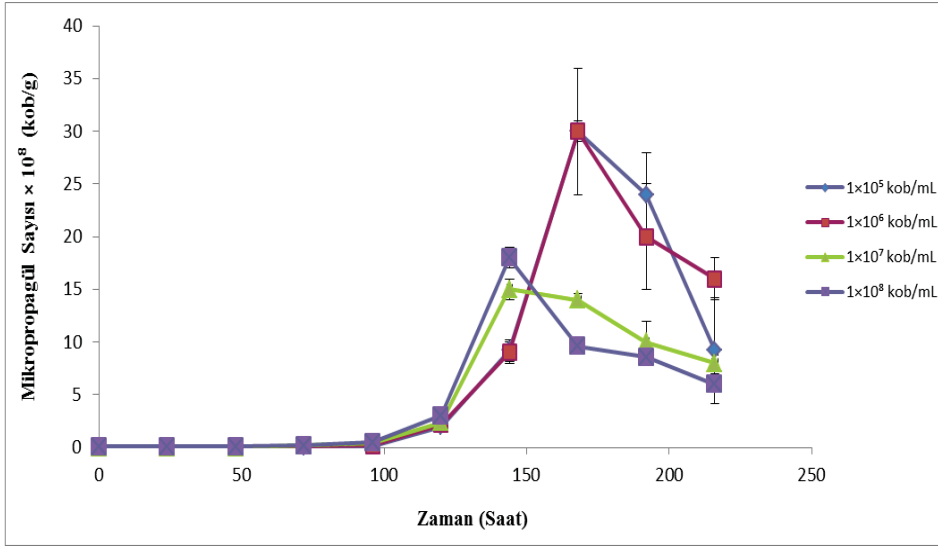
Zaman	% Nem Değerleri					
	1 L/dak	2 L/dak	5 L/dak	8 L/dak	10 L/dak	12 L/dak
0	70	70	70	70	70	70
24	71	71	71	70	69	70
48	71	-	70	70	-	70
72	72	69	-	-	-	68
96	73	69	69	68	67	67
120	72	68	69	68	67	66
144	70	68	68	68	66	66
168	69	69	67	69	66	65*
192	69	68	67	68	67	69
216	68	69	68	68	67	69
240	70	70	67	70	70	70

Çizelge 4.22’ deki değerlere bakıldığında besi ortamı nem içeriği havalandırma debisine bağlı olarak değişim göstermekle beraber bu etki yatay karıştırmalı biyoreaktördeki kadar yüksek değildir. Sadece 12 L/dak debideki üretimlerde nem değerinde % 5’ lik bir azalma meydana gelirken, diğer debilerde ise üretim boyunca istenen nem değeri korunabilmiştir. Üretimler sırasında nem oranlarının çok hızlı şekilde azalmamasının nedeni, havalandırma debisinin zorlamalı konveksiyonu, yatay karıştırmalı biyoreaktördeki kadar etkin hale getirememesi, ancak çok 12 L/ dak gibi yüksek debide etkili bir zorlamalı

konveksiyon meydana gelmesi ve üretimin sonlarına doğru metabolik ısıyla beraber nem değerini düşürebilmesidir.

### İnokulumdaki sporların optimum konsantrasyonlarının belirlenmesi

İnokulumdaki sporların optimum konsantrasyonlarının belirlenmeye çalışıldığı denemelerde  $1.0 \times 10^5$  kob/mL,  $1.0 \times 10^6$  kob/mL,  $1.0 \times 10^7$  kob/mL ve  $1.0 \times 10^8$  kob/mL olacak şekilde 4 farklı inokulum spor konsantrasyonu denenmiştir ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.12’ de, en yüksek mikropropagül değerleri ve elde edildiği zamanlar ise Çizelge 4.23’ te gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulumdaki spor konsantrasyonu denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.

Çizelge 4.23. Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulumdaki spor konsantrasyonu denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları.

	$1.0 \times 10^5$ kob/mL	$1.0 \times 10^6$ kob/mL	$1.0 \times 10^7$ kob/mL	$1.0 \times 10^8$ kob/mL
Mikropropagül Sayısı (kob/g)	$3.0 \pm 0.6 \times 10^9$	$3.0 \pm 0.1 \times 10^9$	$1.5 \pm 0.1 \times 10^9$	$1.8 \pm 0.1 \times 10^9$
Zaman (Saat)	168	168	144	144

Bu sonuçlara göre, en yüksek mikropropagül sayısına  $1.0 \times 10^5$  kob/mL ve

spor konsantrasyonu değerinde ulaşılmaktadır ( $3.0 \pm 0.6 \times 10^9$  kob/g),  $1.0 \times 10^6$  kob/mL inokulasyonda da ortalama olarak aynı değere ulaşılmıştır ancak sapma değerlerine bakıldığında  $1.0 \times 10^5$  kob/mL ile gerçekleştirilen üretimlerde daha yüksek mikropropagül sayılarına ulaşılabildiği görülmektedir. Bununla beraber  $1.0 \times 10^5$  kob/mL inokulasyonda  $1.0 \times 10^6$  a göre daha düşük inokulum spor konsantrasyonu değeriyle bu sonuç elde edilebilmektedir. Elde edilen sonuçlar Nampoothiri et al.' ın 2004 çalışmalarıyla da örtüşmektedir. Bu nedenle optimum inokulum spor konsantrasyonu değeri olarak  $1.0 \times 10^5$  kob/mL seçilmiş ve sonraki üretimlerde bu inokulum spor konsantrasyonu değeri kullanılmıştır.

Çizelge 4.24' te ise inokulumdaki spor konsantrasyonunun farklı değerlerine ait denemede besi ortamı nem değerlerinin değişimi görülmektedir. Üretim boyunca günlük alınan örneklere nem tayini uygulanmıştır ve çizelgede de görüldüğü üzere üretim süresince nem değerlerinde belirgin bir azalma meydana gelmediği için hava şartlandırıcı düzenek sisteme bağlanmadan üretime devam edilmiştir.

**Çizelge 4.24. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulumdaki farklı spor konsantrasyonları denemesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi.**

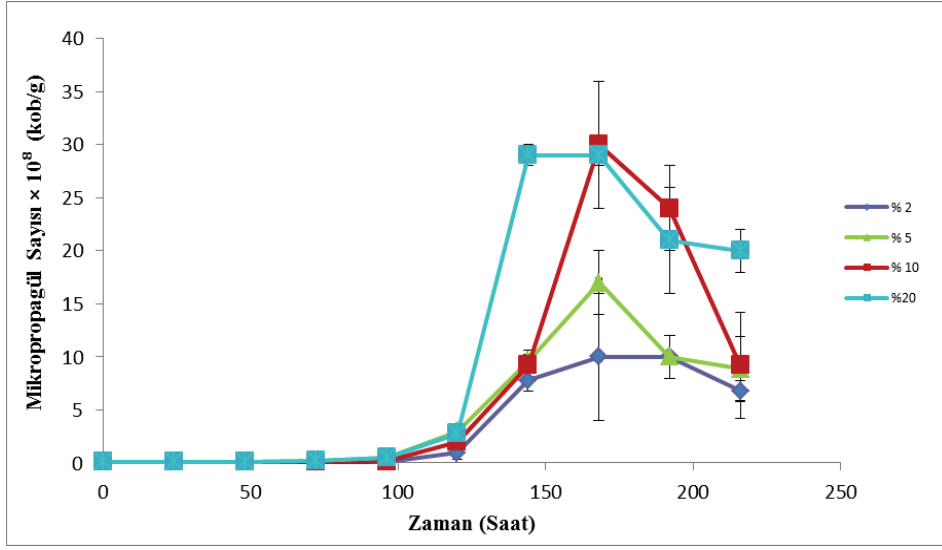
Zaman	% Nem Değerleri			
	$1.0 \times 10^5$ kob/mL	$1.0 \times 10^6$ kob/mL	$1.0 \times 10^7$ kob/mL	$1.0 \times 10^8$ kob/mL
0	70	70	70	70
24	70	-	-	71
48	69	69	69	70
72	68	69	68	-
96	68	67	68	69
120	69	67	68	69
144	68	68	69	68
168	67	67	68	67
192	68	67	67	67
216	68	68	68	68
240	70	67	68	67

Çizelge 4.24' teki değerlere bakıldığında besi ortamı nem içeriği değerlerindeki azalma, inokulum spor konsantrasyonuyla doğrudan ilişkili bir değişim göstermemektedir. Hem ortamlardaki remeye bağlı oluşan metabolik ısının etkileri hem de biyoreaktöre beslenen havanın nem değeri üzerindeki

etkileri, besi ortamlarının nemini % 5 ve daha fazla değiştirmek kadar büyük değildir.

### Optimum inokulum hacminin belirlenmesi

İnokulasyondaki spor konsantrasyonunu değiştirmeden farklı hacimlerde aşılamanın denenerak optimum inokulum hacmi değerinin belirlenmeye çalışıldığı denemelerde % 2, 5, 10 ve 20 (hacim/ağırlık) aşılama denenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.13' te, en yüksek değerler ve elde edildiği zamanlar ise izelge 4.25' te gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Yüzeyden havalandırılan teşsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulum hacmi denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.

Çizelge 4.25. Yüzeyden havalandırılan teşsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulum hacmi denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları.

	% 2	% 5	% 10	% 20
<b>Mikropropagül Sayısı (kob/g)</b>	$1.0 \pm 0.6 \times 10^9$	$1.7 \pm 0.3 \times 10^9$	$3.0 \pm 0.6 \times 10^9$	$2.9 \pm 0.1 \times 10^9$
<b>Zaman (Saat)</b>	168	168	168	144

Şekil 4.13 ve izelge 4.25' teki sonuçlar değerlendirildiğinde en yüksek mikropropagül sayısına % 10 inokulum hacminde  $3.0 \pm 0.6 \times 10^9$  kob/g olarak

ulaşıldığı gözlenmektedir. Bununla beraber % 2 ve % 5 hacimlerde elde edilen mikropropagül sayıları arasında önemli bir fark bulunmamaktadır ve her ikisi de % 10 inokulum hacmi ile elde edilen değerden daha düşük bulunmuştur. % 20 inokulum hacmiyle gerçekleştirilen üretimlerde ise mikropropagül sayısı %10 inokulumla elde edilene çok yakın çıksa da sapma değerleri ve harcanan inokulum miktarı değerlendirildiğinde % 10 inokulum hacmi optimum bulunmuştur ve üretimlerde aşılama % 10 oranında yapılmıştır.

Çizelge 4.26' da ise farklı inokulum hacimleriyle gerçekleştirilen üretimlerde besi ortamı nem değerlerinin değişimi görülmektedir. Üretim boyunca günlük alınan örneklere nem tayini uygulanmıştır ve nem değerlerinde % 5' lik bir değişim meydana geldiğinde hava şartlandırıcı düzenek steril edilerek sisteme bağlanmıştır ve üretime bu şekilde devam edilmiştir.

**Çizelge 4.26. Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulum hacmi denemesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (\* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır).**

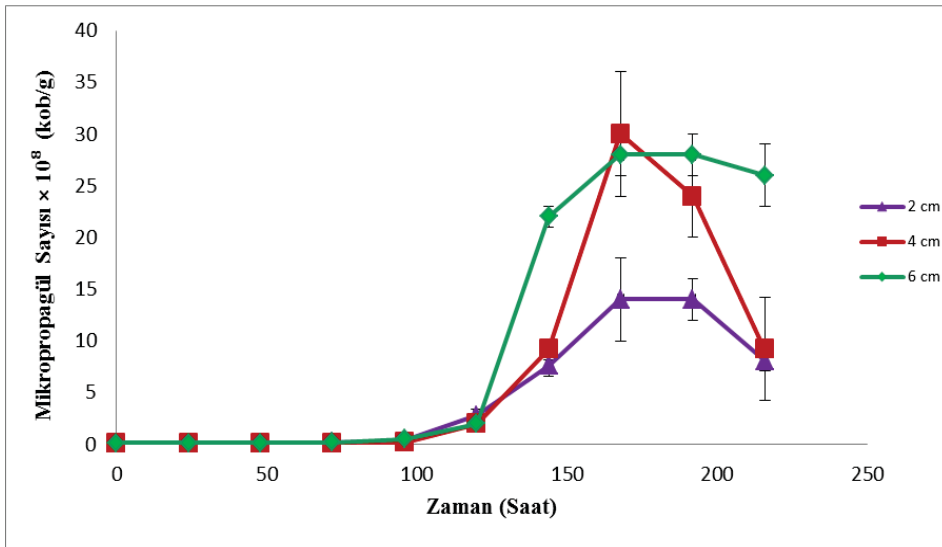
Zaman	% Nem Değerleri			
	% 2	% 5	% 10	% 20
0	70	70	70	70
24	70	70	70	69
48	-	-	69	67
72	69	69	68	66*
96	70	69	68	69
120	70	68	69	68
144	71	68	68	66
168	70	67	67	67
192	69	67	68	67
216	69	67	68	67
240	68	70	70	70

Çizelge 4.26' teki değerlere bakıldığında besi ortamı nem içeriği değerlerindeki azalmanın, % 20 inokulasyon hacmi dışında % 5 ve daha fazla olmadığı görülmektedir. Bu da inokulum hacminin besi ortamı nem içeriğini etkilemediğini göstermektedir. % 20 inokulum hacminde daha fazla düşüş görülmesinin nedeni ise daha fazla hacimle gerçekleştirilen inokulasyonda mikroorganizmaların ortama daha kolay alışıp daha hızlı üremeleri ve ısı açığa

çıkarmalarıdır. Bu nedenle yalnızca % 20 inokulum hacmiyle gerçekleştirilen denemelerde hava şartlandırıcı düzenek sisteme bağlanmıştır.

### Substrat yatağının optimum kalınlığının belirlenmesi

Substrat yatağının optimum kalınlığının belirlenmeye çalışıldığı denemelerde 2, 4 ve 6 cm yatak kalınlıkları ile denemeler gerçekleştirilmiştir ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.14' te, en yüksek değerler ve elde edildiği zamanlar ise Çizelge 4.27' de gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Yüzyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde substrat yatak kalınlığı denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.

Çizelge 4.27. Yüzyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde substrat yatağı kalınlığı denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları.

	2 cm	4 cm	6 cm
Mikropropagül Sayısı (kob/g)	$1.4 \pm 0.4 \times 10^9$	$3.0 \pm 0.6 \times 10^9$	$2.8 \pm 0.2 \times 10^9$
Zaman (Saat)	168	168	168

Bu sonuçlara göre, üç seviye arasında en yüksek mikropropagül sayısına 4 cm yatak kalınlığında  $3.0 \pm 0.6 \times 10^9$  kob/g olarak ulaşılmıştır. 2 cm yatak kalınlığı denemesinde, diğer üretimlerden elde edilen mikropropagül sayılarından daha



düşük bir değer elde edilebilmiştir ( $1.4 \pm 0.4 \times 10^9$  kob/g). 6 cm yatak kalınlığında ise sapma değerleri göz önünde bulundurulduğunda 4 cm' de elde edilen mikropropagül sayısına eşit bir değer elde edilmiştir ( $2.8 \pm 0.2 \times 10^9$  kob/g). Ancak harcanan substrat miktarının fazla olması nedeniyle substrat başına verim değeri 4 cm' de elde edilenden daha düşük kaldığı için optimum substrat yatağı kalınlığı olarak 4 cm değeri seçilmiştir.

Çizelge 4.28' de ise farklı besi ortamı kalınlıklarıyla gerçekleştirilen üretimlerde besi ortamı nem değerlerinin değişimi görülmektedir. Üretim boyunca günlük alınan örneklere nem tayini uygulanmıştır ve nem değerlerinde % 5' lik bir değişim meydana geldiğinde hava şartlandırıcı düzenek steril edilerek sisteme bağlanmıştır ve üretimlere bu şekilde devam edilmiştir.

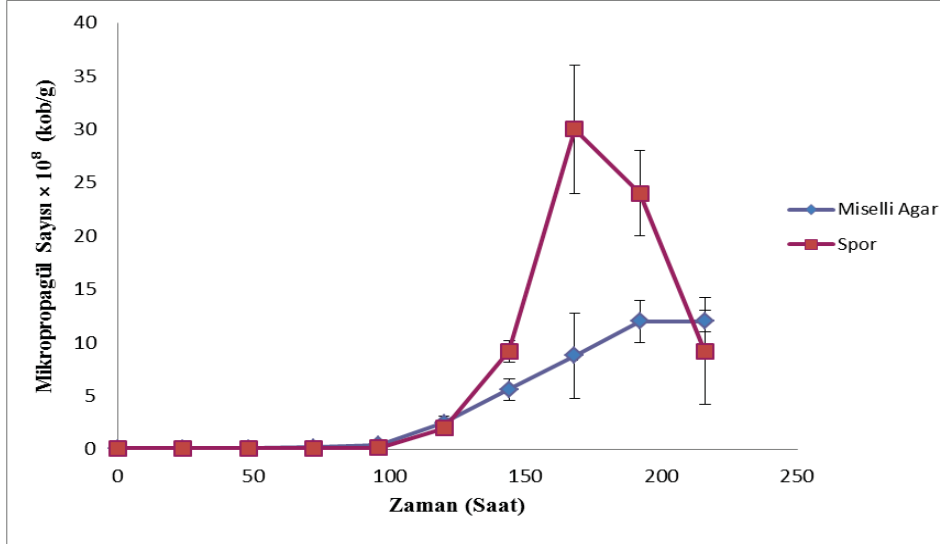
**Çizelge 4.28. Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde substrat yatağı kalınlığının denemesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (\* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır).**

Zaman	% Nem Değerleri		
	2 cm	4 cm	6 cm
0	70	70	70
24	70	70	71
48	69	69	70
72	68	68	70
96	66*	68	69
120	70	69	69
144	70	68	68
168	69	67	67
192	69	68	67
216	69	68	66
240	70	70	66

Çizelge 4.28' deki değerlere bakıldığında 2 cm ortam kalınlığında daha çabuk nem azalışı gözlenirken 4 ve 6 cm kalınlıklarında bu azalış daha geç gerçekleşmiştir ve % 5 nem azalışı meydana gelmemiştir. Bunun nedeni, miktarca daha az ortam kullanılmasının metabolik ısıya ve havalandırmaya bağlı hızlı kurumaya yol açmasıdır. Substrat miktarı arttıkça nem değerindeki azalış daha yavaş gerçekleşmiştir. Bu nedenle sadece 2 cm yatak kalınlığında gerçekleştirilen üretimlerde 96. saatte hava şartlandırıcı steril edilerek sisteme bağlanmıştır.

### Aşı olarak spor ya da misel kullanımının etkilerinin belirlenmesi

Spor ya da misel aşılamanın etkilerinin belirlenmeye çalışıldığı denemelerden elde edilen sonuçlar Şekil 4.14' te, en yüksek değerler ve elde edildiği zamanlar ise Çizelge 4.29' da gösterilmiştir.



Şekil 4.15. Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde aşı olarak spor ya da misel kullanımı denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.

Çizelge 4.29. Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde aşı olarak spor ya da misel kullanımı denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları.

	Misel	Spor
Mikropropagül Sayısı (kob/g)	$1.2 \pm 0.2 \times 10^9$	$3.0 \pm 0.6 \times 10^9$
Zaman (Saat)	192	168

Bu iki denemeden spor inokulasyonunda daha yüksek mikropropagül sayısına ulaşıldığı gözlenmiştir. Miselli agar parçalarıyla aşılaman ortamda gerçekleştirilen üretimlerde ise yatay karıştırmalı biyoreaktördeki sonuçlara benzer şekilde spor inokulasyonuna göre 2 – 3.5 kat arası daha az mikropropagül sayısına ulaşılabilmiştir. Bunun nedeni, spor inokulasyonunda aşılaman sporların ortama daha düzgün dağılıp birçok noktadan üremeye başlamaları ve besine daha

kolay ulaşarak daha hızlı üreyip çevreye yayılmaları, buna karşın miselli agar ekiminde ise misellerin daha az bölgeye saçılmaları ve besine ulaşmakta daha fazla zorlanmalarıdır. Bu nedenle bu koşullardaki üretimler için spor aşılamanın daha uygun bir aşılama yöntemi olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.30' da ise bu iki farklı inokulasyon tipi ile gerçekleştirilen üretimlerde besi ortamı nem değerlerinin zamanla değişimi görülmektedir.

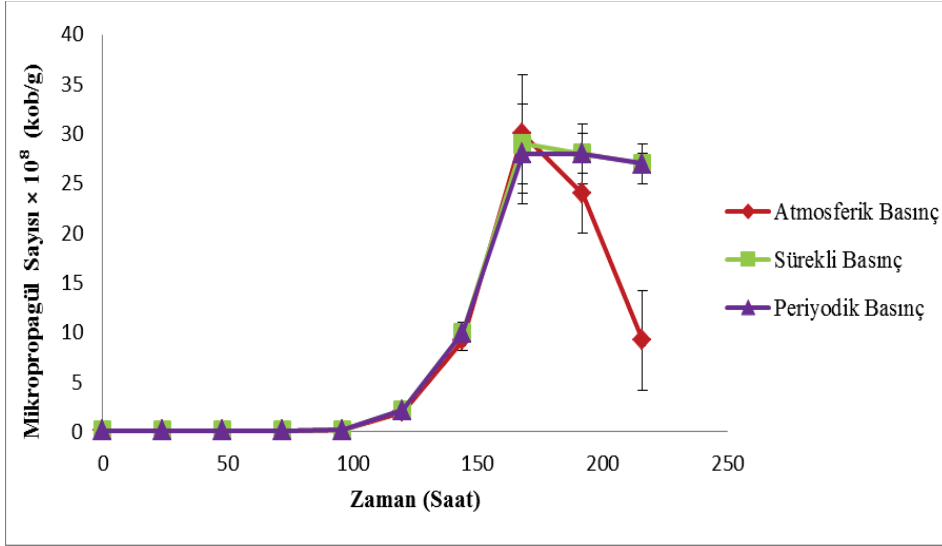
**Çizelge 4.30. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde spor ya da miselli agar parçaları aşılamanın etkileri denenmesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi.**

Zaman	% Nem Değerleri	
	Misel	Spor
0	70	70
24	71	70
48	71	69
72	70	68
96	69	68
120	69	69
144	68	68
168	69	67
192	69	68
216	68	68
240	69	70

Çizelge 4.30' daki değerlere bakıldığında spor aşılandığı üretimlerde, miselli üretimlere göre daha düşük nem değerleri elde edilse de her iki üretim yönteminde de besi ortamı nem içeriği % 5 ve daha fazla azalmamıştır. Bu sonuçlara göre spor ya da misel inokulasyonunun, besi ortamı nem değerleri üzerinde etkisinin olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

#### **Periyodik basınç uygulamanın etkilerinin belirlenmesi**

Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile mikropropagül üretiminde periyodik basınç uygulamasının üretime etkilerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen denemelerden elde edilen sonuçlar Şekil 4.16' da, en yüksek mikropropagül değerleri ve elde edildiği zamanlar ise Çizelge 4.31' de gösterilmiştir.



Şekil 4.16. Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde periyodik basınç uygulama denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.

Çizelge 4.31. Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde periyodik basınç uygulama denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları ve üretim zamanları.

	Atmosferik Basınç	Sürekli Uygulama	Periyodik Uygulama
Mikropropagül Sayısı (kob/g)	$3.0 \pm 0.6 \times 10^9$	$2.9 \pm 0.4 \times 10^9$	$2.8 \pm 0.5 \times 10^9$
Zaman (Saat)	168	168	168

Bu üç farklı uygulama içinde en yüksek mikropropagül sayısına, atmosferik basınçta  $3.0 \pm 0.6 \times 10^9$  kob/g olarak ulaşıldığı gözlenmektedir. Sürekli basınç ve periyodik basınç uygulandığı üretimlerde de elde edilen değerler, sapma değerleri de göz önünde bulundurulduğunda atmosferik basınçla elde edilen değerlere oldukça yakındır. Elde edilen bu sonuçlara göre basınç uygulamasının yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde, yatay karıştırımlı biyoreaktöre benzer şekilde mikropropagül sayısını değiştirmedeği görülmektedir.

Çizelge 4.32' de ise farklı basınç uygulama yöntemleriyle gerçekleştirilen üretimlerde besi ortamı nem değerlerinin değişimi görülmektedir. Üretim boyunca günlük alınan örneklere nem tayini uygulanmıştır ve nem değerlerinde % 5' lik

bir değişim meydana geldiğinde hava şartlandırıcı düzenek steril edilerek sisteme bağlanmıştır ve üretime bu şekilde devam edilmiştir.

**Çizelge 4.32. Yatay karıştırmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde periyodik basınç uygulama denenmesinde besi ortamı nem içeriklerinin zamanla değişimi (\* Hava şartlandırıcı sisteme bağlanmıştır).**

Zaman	% Nem Değerleri		
	Atmosferik Basınç	Sürekli Uygulama	Periyodik Uygulama
0	70	71	71
24	70	71	70
48	69	69	69
72	68	68	67
96	68	66*	65*
120	69	72	73
144	68	69	70
168	67	70	70
192	68	69	69
216	68	67	69
240	70	65	67

Çizelge 4.32' deki değerlere bakıldığında besi ortamı nem içeriğindeki azalmanın, her üç yöntemde de 96. saatte % 5 ve civarında olduğu görülmektedir. Basınç uygulanan denemelerde nem azalışı, uygulanmayan denemelere göre % 5' e daha yakındır ve bu nedenle hava şartlandırıcı düzenek biyoreaktöre bağlanarak üretime devam edilmiştir. Ancak yine de basınç uygulamasının nem değerlerini, atmosferik basınçtaki denemeye göre % 2-3' ten fazla değiştirmediği gözlenmektedir. Bunun nedeni, basınç uygulamanın beklendiği gibi metabolik ısıyı uzaklaştırmada etkili olması, ancak uygulanan basınç değerinin biraz daha yüksek olmasının, daha etkin bir ısı transferi sağlayabilecek oluşu ve buna bağlı olarak ta daha erken saatlerde, % 5' e yakın nem azalışlarına neden olabileceği gösterilmektedir. Liu et al., (2007) katı kültür fermentasyonu ile *Trichoderma koningii* üretiminde basıncın etkisini inceledikleri çalışmalarında yüksek basınç uzun süreli uygulama, yüksek basınç kısa süreli uygulama, düşük basınç uzun süreli uygulama, düşük basınç kısa süreli uygulama yöntemlerini denemişler ve 4 atm basınç uzun süreli uygulamanın yatak sıcaklığını düşürmede düşük basınç değerlerine göre daha etkili olduğu sonucuna varmışlardır.

### Steril ve steril olmayan koşulların etkilerinin belirlenmesi

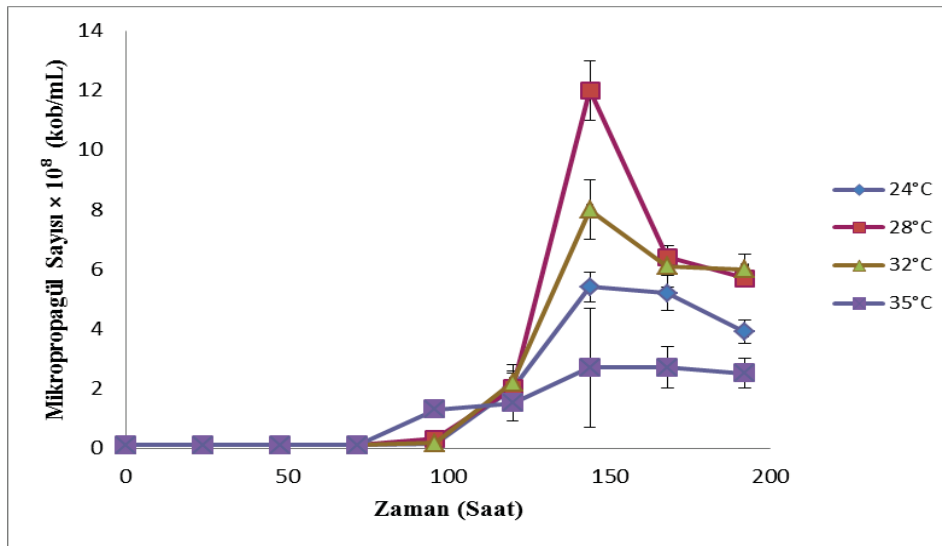
Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile mikropropagül üretiminde, sterilizasyonun mikropropagül sayısı üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada, sterilizasyonun uygulanmadığı üretimlerde kontaminasyon meydana geldiği için herhangi bir değer elde edilememiştir. O nedenle yatay karıştırmalı biyoreaktörde olduğu gibi, sterilizasyonun mikropropagül üretimi için önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

### 4.1.2 Statik Sıvı Kültürde Mikropropagül Üretim Koşullarının Optimizasyonu

#### 4.1.2.1 Trichoderma harzianum EGE-K38 suşunun yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretiminde bazı parametrelerin optimizasyonu

##### Optimum ortam sıcaklığının belirlenmesi

Optimum ortam sıcaklığının belirlenmeye çalışıldığı denemelerde  $24\pm 2^\circ\text{C}$ ,  $28\pm 2^\circ\text{C}$ ,  $32\pm 2^\circ\text{C}$ ,  $35\pm 2^\circ\text{C}$  olacak şekilde 4 farklı sıcaklık değeri denenmiştir ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.17' de, en yüksek mikropropagül değerleri ve elde edildiği zamanlar ise Çizelge 4.33' te gösterilmiştir.



Şekil 4.17. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde ortam sıcaklığı denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.

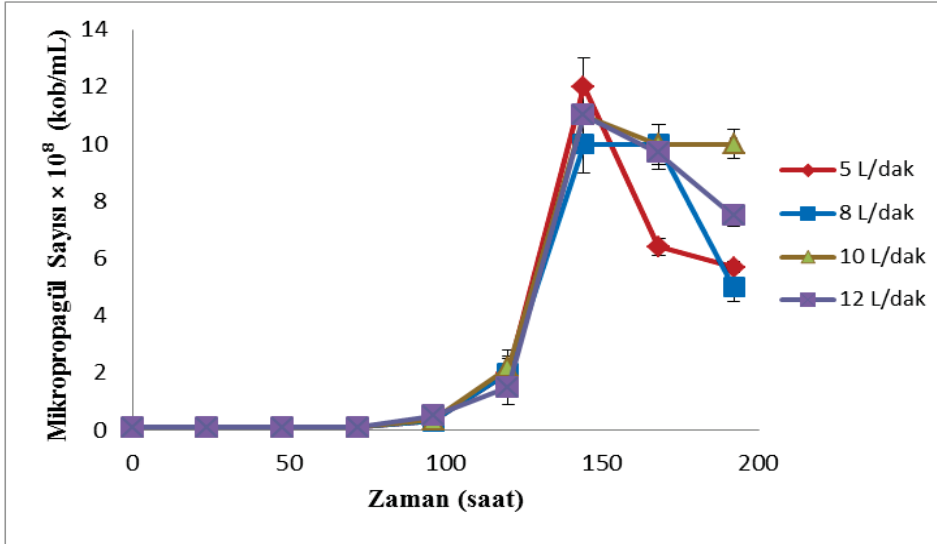
**Çizelge 4.33. Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde ortam sıcaklığı denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları, kuru ağırlık değerleri ve üretim zamanları.**

	24±2°C	28±2°C	32±2°C	35±2°C
<b>Mikropropagül Sayısı (kob/mL)</b>	5.4±0.5×10 <sup>8</sup>	1.2±0.1×10 <sup>9</sup>	8.0±1.0×10 <sup>8</sup>	2.7±2.0×10 <sup>8</sup>
<b>Kuru Ağırlık (g/L)</b>	10±1	12±2	11±2	10±2
<b>Zaman (Saat)</b>	144	144	144	144

Bu sonuçlara göre, en yüksek mikropropagül sayısı ve kuru ağırlık değerinin 28±2°C sıcaklık değerinde elde edildiği gözlenmiştir (1.2±0.1×10<sup>9</sup> kob/mL ve 12±1 g/L). Sıcaklık bu değerden daha yüksek ve daha düşük değerlerde denendiğinde elde edilen mikropropagül sayılarında azalma meydana gelmektedir. Bu nedenle optimum sıcaklık değeri olarak 28±2°C seçilmiş ve sonraki üretimlerde bu sıcaklık değerinde üretimler gerçekleştirilmiştir.

#### **Optimum hava debisinin belirlenmesi**

Optimum havalandırma debisinin belirlendiği denemelerde 5, 8, 10, 12 L/dak olacak şekilde 4 farklı havalandırma debisi denenmiştir ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.18' de, en yüksek mikropropagül değerleri ve elde edildiği zamanlar ise Çizelge 4.34' te gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde havalandırma debisi denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.

Çizelge 4.34. Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde havalandırma debisi denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları, kuru ağırlık değerleri ve üretim zamanları.

	5 L/dak	8 L/dak	10 L/dak	12 L/dak
<b>Mikropropagül Sayısı (kob/mL)</b>	$1.2 \pm 0.1 \times 10^9$	$1.0 \pm 0.1 \times 10^9$	$1.1 \pm 0.1 \times 10^9$	$1.1 \pm 0.1 \times 10^9$
<b>Kuru Ağırlık (g/L)</b>	12±2	11±3	12±1	12±2
<b>Zaman (Saat)</b>	144	144	144	144

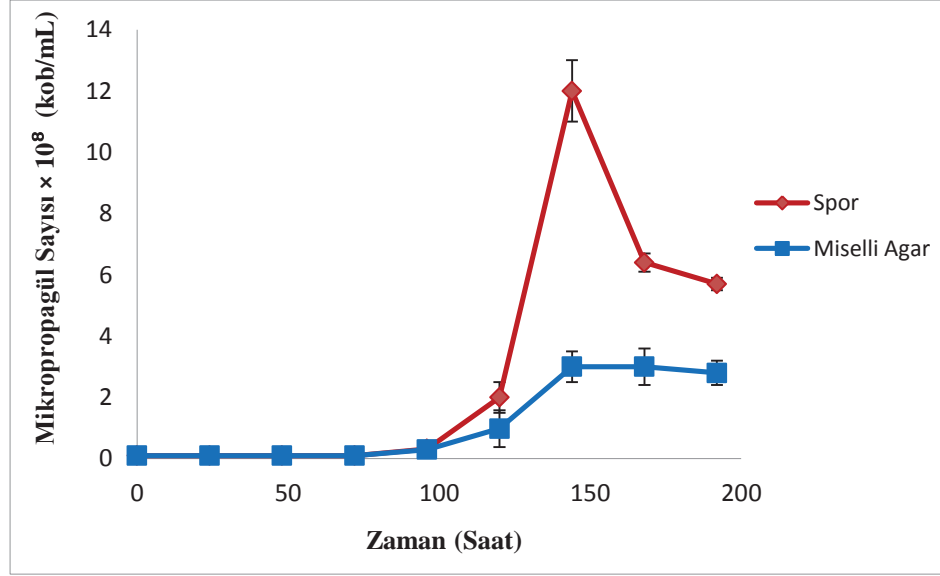
Bu sonuçlara göre, en yüksek mikropropagül sayısına 5 L/ dak değerinde  $1.2 \pm 0.1 \times 10^9$  kob/mL olarak ulaşıldığı gözlenmektedir. Bununla beraber daha yüksek havalandırma debilerinin, mikropropagül sayılarını artırıcı etkisi gözlenmemiştir ve sapma değerleri de göz önünde bulundurulduğunda 5 L/dak ile aynı mikropropagül sayısına ulaşılmıştır. Bu sonuçlara göre 5 L/ dak hava debisinin üretim için optimum olduğu, daha yüksek debilerde hava beslemenin ise proses için ilave maliyet getirmesi nedeniyle optimum hava debisi olarak 5 L/ dak değeri seçilmiş ve sonraki üretimler bu havalandırma debisinde



gerçekleştirilmiştir.

### Aşı olarak spor ya da misel kullanımının etkilerinin belirlenmesi

Spor ya da misel aşılamanın etkilerinin belirlenmeye çalışıldığı denemelerden elde edilen sonuçlar Şekil 4.19' da, en yüksek mikropropagül değerleri ve elde edildiği zamanlar ise Çizelge 4.35' te gösterilmiştir.



Şekil 4.19. Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde aşı olarak spor ya da misel kullanımı denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.

Çizelge 4.35. Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde aşı olarak spor ya da misel kullanımı denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları, kuru ağırlık değerleri ve üretim zamanları.

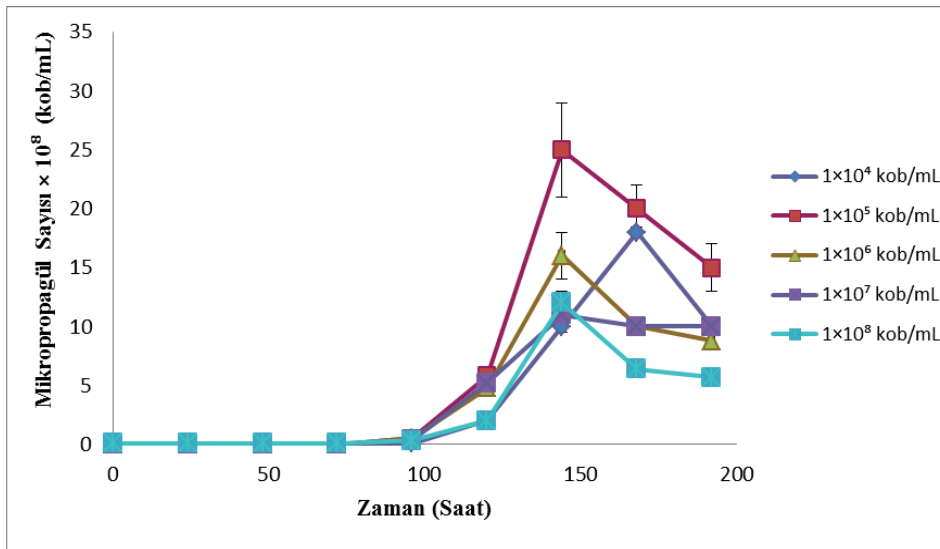
	Misel	Spor
Mikropropagül Sayısı (kob/mL)	$3.0 \pm 0.5 \times 10^8$	$1.2 \pm 0.1 \times 10^9$
Kuru Ağırlık (g/L)	$5 \pm 1$	$12 \pm 2$
Zaman (Saat)	144	144

Bu iki denemeden spor inokulasyonunda daha yüksek mikropropagül

sayısına ulaşıldığı gözlenmiştir. Miselli agar parçalarıyla aşılana ortamda gerçekleştirilen üretimlerde ise spor inokulasyonuna göre 4 kat daha az mikropropagül sayısına ulaşılabilmektedir. Bunun nedeni, katı kültürdeki üretimler için de belirtilen, spor inokulasyonunda aşılana sporların ortama daha homojen dağılıp birçok noktadan üremeye başlamaları ve besine daha kolay ulaşarak daha hızlı üreyip çevreye yayılmaları, buna karşın miselli agar ekiminde ise misellerin daha az bölgeye heterojen şekilde saçılmaları ve besine ulaşmakta daha fazla zorlanmaları gösterilmektedir. Bu nedenle bu koşullardaki üretimler için spor aşılamanın daha uygun bir aşılama yöntemi olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

### İnokulumdaki sporların optimum konsantrasyonlarının belirlenmesi

İnokulumdaki sporların optimum konsantrasyonlarının belirlenmeye çalışıldığı denemelerde  $1.0 \times 10^4$  kob/mL,  $1.0 \times 10^5$  kob/mL,  $1.0 \times 10^6$  kob/mL,  $1.0 \times 10^7$  kob/mL ve  $1.0 \times 10^8$  kob/mL olacak şekilde 5 farklı inokulum spor konsantrasyonu denenmiştir ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.20’ de, en yüksek mikropropagül değerleri ve elde edildiği zamanlar ise Çizelge 4.36’ da gösterilmiştir.



Şekil 4.20. Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulumdaki spor konsantrasyonu denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.

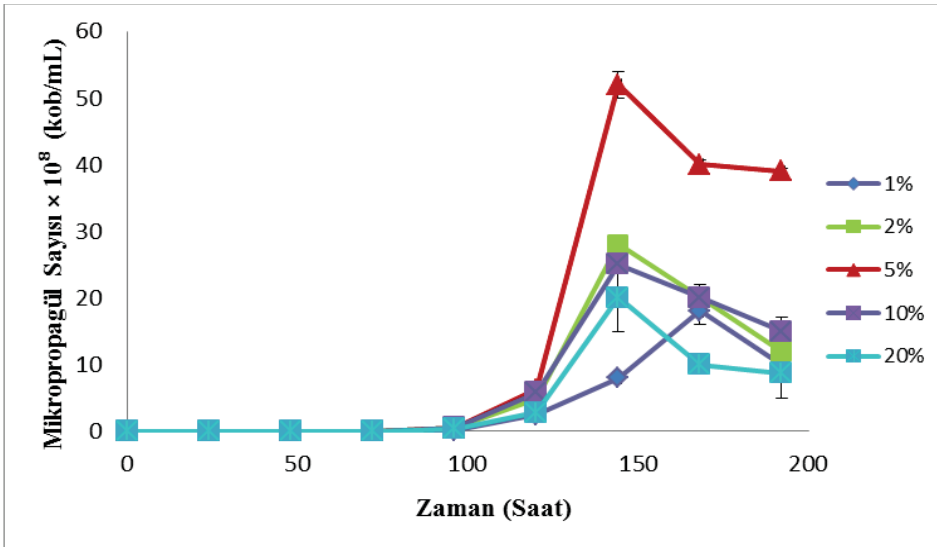
**Çizelge 4.36. Yüzeiden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulumdaki spor konsantrasyonu denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları, kuru ağırlık değerleri ve üretim zamanları.**

	$1.0 \times 10^4$ kob/mL	$1.0 \times 10^5$ kob/mL	$1.0 \times 10^6$ kob/mL	$1.0 \times 10^7$ kob/mL	$1.0 \times 10^8$ kob/mL
<b>Mikropropagül Sayısı (kob/mL)</b>	$1.8 \pm 0.4 \times 10^9$	$2.5 \pm 0.4 \times 10^9$	$1.6 \pm 0.2 \times 10^9$	$1.1 \pm 0.5 \times 10^9$	$1.2 \pm 0.1 \times 10^9$
<b>Kuru Ağırlık (g/L)</b>	13±3	15±2	13±3	12±2	12±2
<b>Zaman (Saat)</b>	168	144	144	144	144

Bu sonuçlara göre, en yüksek mikropropagül sayısına  $1.0 \times 10^5$  kob/mL spor konsantrasyonu değerinde ulaşılmaktadır ( $2.5 \pm 0.4 \times 10^9$  kob/mL). Bununla birlikte bu spor konsantrasyonu dışında denenen konsantrasyonlarda en yüksek değer yaklaşık %60-70'i mikropropagül sayılarına ulaşılabilmiştir. Ayrıca  $1.0 \times 10^4$  kob/mL spor inokulasyonu ile gerçekleştirilen üretimlerde daha uzun üretim sürelerinde bu sonuç elde edilebilmektedir. Bu nedenle optimum inokulum spor konsantrasyonu değeri olarak  $1.0 \times 10^5$  kob/mL belirlenmiş ve sonraki üretimlerde bu inokulum spor konsantrasyonu değeri kullanılmıştır.

#### **Optimum inokulum hacminin belirlenmesi**

İnokulasyondaki spor konsantrasyonu sabit olacak şekilde farklı hacimlerde aşılamanın mikropropagül sayılarına etkisinin belirlendiği denemelerde % 1, 2, 5, 10 ve 20 (hacim/hacim) aşılama denenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.21' de, en yüksek değerler ve elde edildiği zamanlar ise elde edilen sonuçlar Çizelge 4.37' de gösterilmiştir.



Şekil 4.21. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulum hacmi denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.

Çizelge 4.37. Yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde inokulum hacmi denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları, kuru ağırlık değerleri ve üretim zamanları.

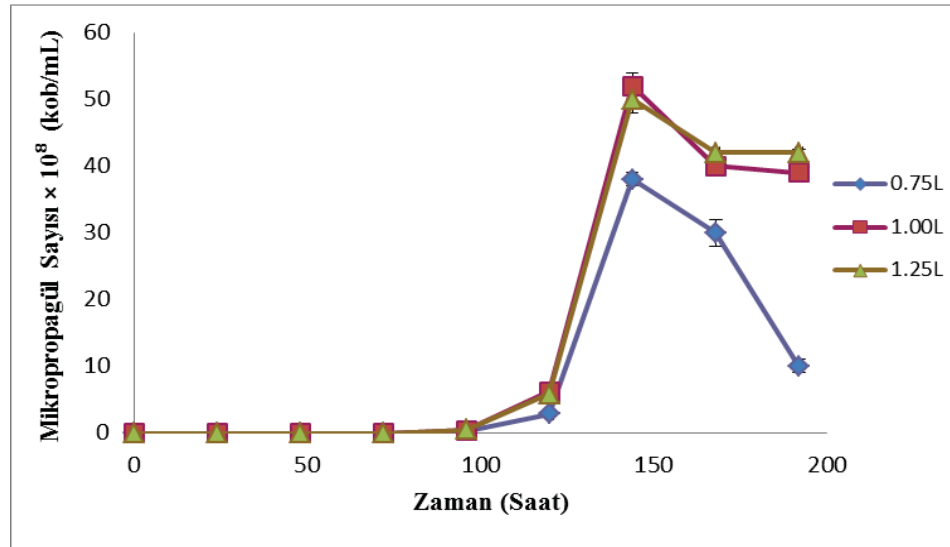
	% 1	% 2	% 5	% 10	% 20
<b>Mikropropagül Sayısı (kob/mL)</b>	$1.8 \pm 0.2 \times 10^9$	$2.8 \pm 0.1 \times 10^9$	$5.2 \pm 0.2 \times 10^9$	$2.5 \pm 0.4 \times 10^9$	$2.0 \pm 0.5 \times 10^9$
<b>Kuru Ağırlık (g/L)</b>	13±2	15±1	17±2	15±2	13±4
<b>Zaman (Saat)</b>	168	144	144	144	144

Şekil 4. 21 ve Çizelge 4.37' deki sonuçlarda, en yüksek mikropropagül sayısına % 5 inokulum hacminde  $5.2 \pm 0.2 \times 10^9$  kob/mL olarak ulaşıldığı gözlenmektedir. Bununla beraber % 1 ve % 2 hacimlerde inokulasyonla elde edilen mikropropagül sayıları, en yüksek mikropropagül sayısının %60' ına ulaşabilmektedir. Ayrıca elde edilen sonuçlara göre, aşılama hacmi çok düşük tutulduğunda, mikropropagüllerin gelişimleri daha yavaş gerçekleşmektedir. %10 ve % 20 inokulum hacmiyle gerçekleştirilen üretimlerde ise hem mikropropagül

sayısı %5 inokulumla elde edilene göre yarıya yakın oranda daha düşük çıkmıştır hem de harcanan inokulum miktarı iki katı olduğu için %5 inokulum hacmi optimum olarak seçilmiştir.

### Besi ortamının optimum hacminin belirlenmesi

Besi ortamının optimum hacminin belirlenmeye çalışıldığı denemelerde, 0.75, 1.00 ve 1.25 L besi ortamı hacimleri denenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.22’ de, en yüksek değerler ve elde edildiği zamanlar ise Çizelge 4.38’ de gösterilmiştir.



Şekil 4.22. Yüzeyle havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde besi ortamı hacmi denemesinde zamana karşı mikropropagül sayısı grafiği.

Çizelge 4.38. Yüzeyle havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde besi ortamı hacmi denemesinde en yüksek mikropropagül sayıları, kuru ağırlık değerleri ve üretim zamanları.

	0.75 L	1.00 L	1.25 L
Mikropropagül Sayısı (kob/g)	$3.8 \pm 0.1 \times 10^9$	$5.2 \pm 0.2 \times 10^9$	$5.0 \pm 0.2 \times 10^9$
Kuru Ağırlık (g/L)	17±1	17±2	16±2
Zaman (Saat)	144	144	144

Bu üç seviye arasında en yüksek mikropropagül sayısına 1.00 L besi ortamı hacminde  $5.2 \pm 0.2 \times 10^9$  kob/ml olarak ulaşıldığı gözlenmektedir. 1.25 L besi ortamı ile gerçekleştirilen denemelerden elde edilen mikropropagül sayıları ve kuru ağırlık değerleri de, sapma değerleri de göz önünde bulundurulduğunda, 1.00 L ile elde edilen değerlere denktir, ancak harcanan substrat miktarının fazla olması nedeniyle substrat başına mikropropagül sayısı ve kuru ağırlık değerleri, 1.00 L ile elde edilen değerlerden daha düşük bulunmuştur. 0.75 L besi ortamı denemesinde, diğer üretimlerden elde edilen mikropropagül sayılarından daha düşük bir değer elde edilmiştir ( $3.8 \pm 0.1 \times 10^9$  kob/ml), bu nedenle optimum substrat hacmi olarak 1L değeri belirlenmiştir.

## 4.2 *Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin kurutulması

### 4.2.1 Katı kültür fermentasyonu ile üretilen mikropropagüllerin kurutulması

Katı kültür fermentasyonu ile üretilen mikropropagüllerin kurutulması işlemi deney tasarımı ile Çizelge 4.39' daki değişkenlere göre gerçekleştirilmiştir ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.40' ta gösterilmiştir.

**Çizelge 4.39. Katı kültür fermentasyonu ile üretim sonunda gerçekleştirilen kurutma denemesinde Box-Behnken faktöriyel tasarımda üç bağımsız değişken ve değişim aralıkları.**

Name	Units	Type	Std. Dev.	Low	High
Sıcaklık	C	Factor	0	35	45
Havalandırma	L/dak	Factor	0	10	20
Süre	Gün	Factor	0	3	5
Verim	%	Response	1.30972	23.3	40

**Çizelge 4.40. Katı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde kurutma % veriminin belirlenmesi için Box-Behnken faktöriyel deney tasarımı ve elde edilen yanıtlar.**

Std	Run	Block	Factor 1 A: Sıcaklık C	Factor 2 B: Havalandırma L/dak	Factor 3 C: Süre Gün	Response 1 Verim %
1	1	Block 1	35.00	10.00	4.00	36.7
5	2	Block 1	35.00	15.00	3.00	40
6	3	Block 1	45.00	15.00	3.00	30
15	4	Block 1	40.00	15.00	4.00	36.7
9	5	Block 1	40.00	10.00	3.00	40
16	6	Block 1	40.00	15.00	4.00	36.7
4	7	Block 1	45.00	20.00	4.00	23.3
3	8	Block 1	35.00	20.00	4.00	36.7
2	9	Block 1	45.00	10.00	4.00	28
14	10	Block 1	40.00	15.00	4.00	36.7
13	11	Block 1	40.00	15.00	4.00	36.7
10	12	Block 1	40.00	20.00	3.00	36.7
12	13	Block 1	40.00	20.00	5.00	30
7	14	Block 1	35.00	15.00	5.00	40
8	15	Block 1	45.00	15.00	5.00	28
17	16	Block 1	40.00	15.00	4.00	36.7
11	17	Block 1	40.00	10.00	5.00	40

Elde edilen sonuçlara göre en yüksek kurutma % verimi değerine 2, 5, 14 ve 17. denemelerde ulaşılmıştır (% 40) ve elde edilen % verim değerleri % 23.3 ile % 40.0 arasında değişmektedir.

Yanıt fonksiyonunun deneysel verilerle ilişkisini belirlemek için regresyon analizi yapılmıştır (Çizelge 4.41). 3 değişken için yapılan ANOVA, kurutma % veriminin ikinci dereceden modelle açıklanabileceğini göstermektedir ve model;

$$\% \text{ verim} = 36.7 - 5.51 A - 2.25 B - 1.68 B \times C - 3.85 A^2 - 1.68 B^2 + 1.65 C^2$$

şeklindedir.

**Çizelge 4.41. Katı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde kurutma % veriminin belirlenmesinde çoklu regresyonla elde edilen model katsayıları.**

Factor	Coefficient		Standard Error	95% CI		VIF
	Estimate	df		Low	High	
Intercept	36.70	1	0.59	35.31	38.09	
A-Sıcaklık	-5.51	1	0.46	-6.61	-4.42	1.00
B-Havalandırma	-2.25	1	0.46	-3.34	-1.16	1.00
C-Süre	-1.09	1	0.46	-2.18	7.450E-003	1.00
AB	-1.18	1	0.65	-2.72	0.37	1.00
AC	-0.50	1	0.65	-2.05	1.05	1.00
BC	-1.68	1	0.65	-3.22	-0.13	1.00
A <sup>2</sup>	-3.85	1	0.64	-5.36	-2.34	1.01
B <sup>2</sup>	-1.68	1	0.64	-3.18	-0.17	1.01
C <sup>2</sup>	1.65	1	0.64	0.14	3.16	1.01

**Çizelge 4.42. Katı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde Box Behnken faktöriyel tasarımı için ANOVA sonuçları.**

Source	Sum of		Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
	Squares	df				
Model	395.74	9	43.97	25.63	0.0002	significant
A-Sıcaklık	243.10	1	243.10	141.72	< 0.0001	
B-Havalandırma	40.50	1	40.50	23.61	0.0018	
C-Süre	9.46	1	9.46	5.52	0.0512	
AB	5.52	1	5.52	3.22	0.1158	
AC	1.00	1	1.00	0.58	0.4701	
BC	11.22	1	11.22	6.54	0.0377	
A <sup>2</sup>	62.41	1	62.41	36.38	0.0005	
B <sup>2</sup>	11.81	1	11.81	6.89	0.0342	
C <sup>2</sup>	11.46	1	11.46	6.68	0.0362	
Residual	12.01	7	1.72			
Lack of Fit	12.01	3	4.00			
Pure Error	0.000	4	0.000			
Cor Total	407.75	16				

Çizelge 4.42, kurutma % verimi için ANOVA' yı göstermektedir ve model, istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Değişkenlerden kurutma sıcaklığı ve havalandırma hızının kurutma % verimine etkileri istatistiksel açıdan anlamlı bulunurken kurutma süresinin etkisi anlamlı bulunmamıştır ( $p < 0.05$ ). Ayrıca faktörler arası etkileşimlerden, sıcaklık ve havalandırma hızı arasındaki etkileşim ve sıcaklıkla kurutma süresi arasındaki etkileşimin kurutma % verimine etkisi istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır, ancak havalandırma hızı ile kurutma süresi arasındaki etkileşim istatistiksel açıdan anlamlıdır ( $p < 0.05$ ).

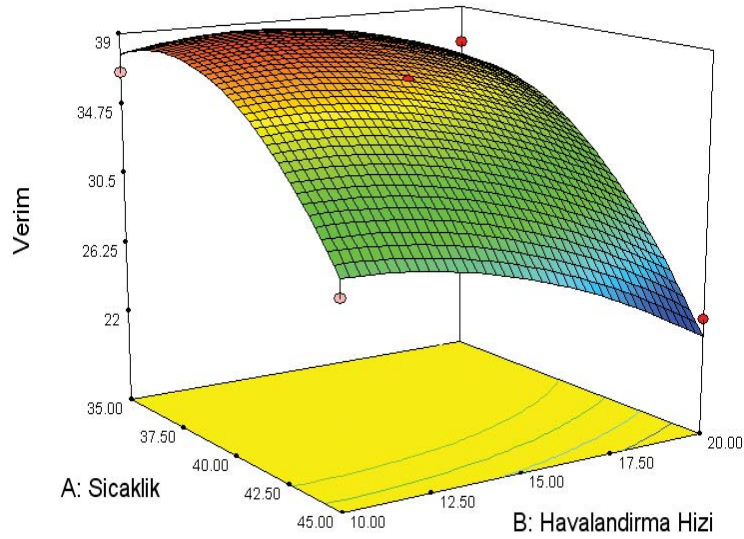


**Çizelge 4.43. Katı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde ANOVA model değerlendirme sonuçları.**

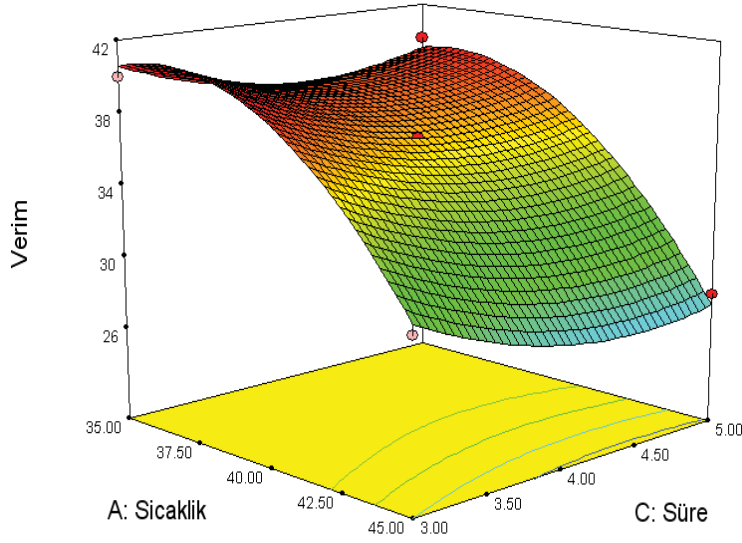
Std. Dev.	1.31	R-Squared	0.9706
Mean	34.88	Adj R-Squared	0.9327
C.V. %	3.76	Pred R-Squared	0.5288
PRESS	192.12	Adeq Precision	18.280

Çizelge 4. 43 ' deki  $R^2$  değerine göre veri değişkenlerinin %97 sinin mevcut modelle ifade edilebildiği görülmektedir. Adj.  $R^2$  değeri ise kurulan modelin girdi değişkenleri ile çıktı değişkenleri arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermektedir ( % 93.27).

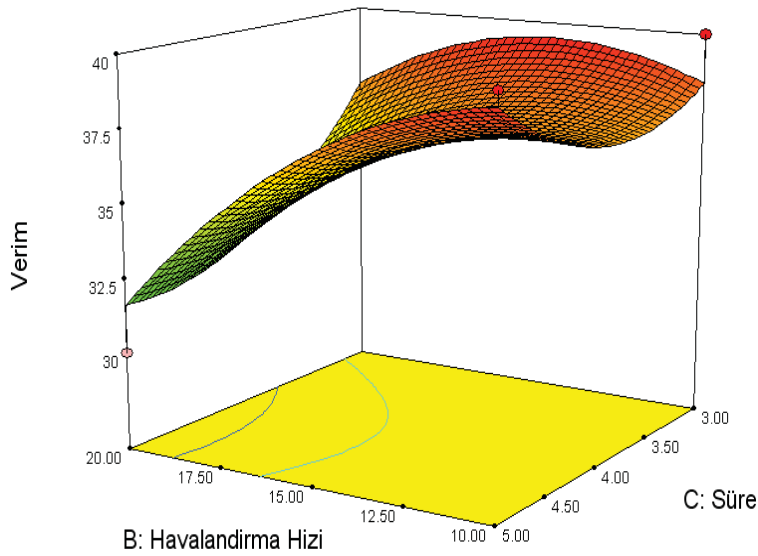
Şekil 4.23, 4.24 ve 4.25' te kurutma verim yüzdeleri için farklı değişkenlere ait üç boyutlu yüzey yanıt grafikleri bulunmaktadır.



**Şekil 4.23. Katı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde sıcaklık ve havalandırma hızının kurutma % verimine etkileri.**



**Şekil 4.24. Katı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde sıcaklık ve kurutma süresinin kurutma % verimine etkileri.**



**Şekil 4.25. Katı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde sıcaklık ve havalandırma hızının kurutma % verimine etkileri.**

Grafiklere ve analiz sonuçlarındaki değerlere göre kurutma % verimi, kurutma sıcaklığı ve havalandırma hızındaki değişimlerle anlamlı oranda değişim göstermektedir. Kurutma süresi ise istatistiksel açıdan diğer iki değişken kadar kurutma % verimindeki değişimi etkilememiştir. Ayrıca havalandırma hızı ve kurutma süresi beraber incelendiğinde kurutma % verimi üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı etki oluşturmuşlardır. Bununla beraber diğer değişken etkileşimleri kurutma % verimi üzerinde anlamlı etkide bulunmamışlardır.

Çizelge 4.44' te ise yüzey yanıt yönteminde göre verilen optimum sonuçlar

görülmektedir. Bu sonuçlara göre birden fazla optimum nokta ile maksimum % verim yanıtına ulaşılabilmektedir.

**Çizelge 4.44. Katı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde en yüksek % verim değerine ulaşılabilecek parametreler.**

<b>Number</b>	<b>Sıcaklık<sup>a</sup></b>	<b>Havalandırma Hızı<sup>a</sup></b>	<b>Süre<sup>a</sup></b>	<b>Desirability</b>	
1	<u>41.12</u>	<u>12.74</u>	<u>4.48</u>	<u>1.000</u>	<u>Selected</u>
2	37.40	18.35	4.80	1.000	
3	36.81	13.32	3.26	1.000	
4	42.60	19.78	4.94	1.000	
5	41.26	15.20	3.94	1.000	
6	41.23	19.41	4.59	1.000	
7	44.00	17.91	3.78	1.000	
8	41.56	15.40	4.45	1.000	
9	39.97	11.89	4.20	1.000	
10	43.42	13.61	4.14	1.000	
11	41.76	15.27	4.73	1.000	
12	40.18	19.93	3.93	1.000	
13	38.19	15.33	3.58	1.000	
14	36.71	14.92	4.74	1.000	
15	40.76	18.45	4.30	1.000	
16	41.04	15.23	3.51	1.000	
17	40.61	17.09	4.72	1.000	
18	42.66	10.36	4.16	1.000	
19	39.49	11.71	3.04	1.000	
20	43.57	13.96	4.04	1.000	
21	42.81	10.25	4.89	1.000	
22	40.52	12.02	4.22	1.000	
23	39.35	19.23	4.49	1.000	
24	39.67	11.42	4.73	1.000	
25	35.69	19.84	3.42	1.000	

Kurutma % verimi kadar önemli bir diğer yanıt ta kurutma süresince ortamın % nem değerindeki değişimdir (Çizelge 4.45). Formülasyonun ticari ürün olarak değerlendirilebilmesi için en yüksek % 8 neme sahip olması gerekmektedir (Ramanujam et al., 2010). O nedenle % nem değeri, kurutma verimi değerleri ile beraber incelenmelidir.

**Çizelge 4.45. Katı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde % nem değerlerinin değişimi**

Hava Debisi	Gün/Sıcaklık	35 °C	40°C	45°C
10 L/dak	3	32	20	11
	4	23	11	5
	5	10	7	3
15 L/dak	3	30	20	10
	4	20	9	5
	5	8	5	3
20L/dak	3	25	15	8
	4	12	7	5
	5	5	3	3

Formülasyonun % nem değerleri incelendiğinde en hızlı kurumanın 45°C’ de elde edildiği görülmektedir. 35°C ve 40°C’ de havalandırma hızına da bağlı olarak ürünün % nem değeri daha yavaş azalmaktadır.

#### 4.2.2 Statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretilen mikropropagüllerin kurutulması

Statik sıvı kültürde üretilen mikropropagüllerin kurutulması işlemi deney tasarımı ile Çizelge 4.46’ daki değişkenlere göre gerçekleştirilmiştir ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4. 47’ de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.46. Statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretim sonunda gerçekleştirilen kurutma denemesinde Box-Behnken faktöriyel tasarımda üç bağımsız değişken ve değişim aralıkları.**

Name	Units	Type	Std. Dev.	Low	High
Sıcaklık	C	Factor	0	35	45
Havalandırma	L/dak	Factor	0	10	20
Süre	Gün	Factor	0	4	6
Verim	%	Response	1.16711	16.7	23.3

**Çizelge 4.47. Statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde kurutma % veriminin belirlenmesi için Box-Behnken faktöriyel deney tasarımı ve elde edilen yanıtlar.**

Std	Run	Block	Factor 1 A:Sıcaklık C	Factor 2 B:Havalandırma L/dak	Factor 3 C:Süre Gün	Response 1 Verim %
2	1	Block 1	45.00	10.00	5.00	18.3
16	2	Block 1	40.00	15.00	5.00	20.8
6	3	Block 1	45.00	15.00	4.00	16.7
10	4	Block 1	40.00	20.00	4.00	20.8
5	5	Block 1	35.00	15.00	4.00	23.3
7	6	Block 1	35.00	15.00	6.00	22.5
4	7	Block 1	45.00	20.00	5.00	16.7
1	8	Block 1	35.00	10.00	5.00	21.6
12	9	Block 1	40.00	20.00	6.00	16.7
11	10	Block 1	40.00	10.00	6.00	20.8
13	11	Block 1	40.00	15.00	5.00	20.8
17	12	Block 1	40.00	15.00	5.00	20.8
14	13	Block 1	40.00	15.00	5.00	20.8
9	14	Block 1	40.00	10.00	4.00	23.3
15	15	Block 1	40.00	15.00	5.00	20.8
3	16	Block 1	35.00	20.00	5.00	21.6
8	17	Block 1	45.00	15.00	6.00	16.7

Elde edilen sonuçlara göre en yüksek kurutma % verim değerine 5 ve 14. denemelerde ulaşılmıştır (% 23.3) ve elde edilen verim değerleri % 16.7 ile % 23.3 arasında değişmektedir.

Yanıt fonksiyonunun deneysel verilerle ilişkisini belirlemek için regresyon analizi yapılmıştır (Çizelge 4.48). 3 değişken için yapılan ANOVA, kurutma % veriminin ancak birinci dereceden modelle açıklanabileceğini göstermektedir ve model;

$$\% \text{ verim} = 20.8 - 2.58 A - 1.02 B$$

**Çizelge 4.48. Statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde kurutma % veriminin belirlenmesinde çoklu regresyonla elde edilen model katsayıları.**

Factor	Coefficient	df	Standard	95% CI	95% CI	VIF
	Estimate		Error	Low	High	
Intercept	20.80	1	0.52	19.57	22.03	
A-Sıcaklık	-2.58	1	0.41	-3.55	-1.60	1.00
B-Havalandırma	-1.02	1	0.41	-2.00	-0.049	1.00
C-Süre	-0.93	1	0.41	-1.90	0.051	1.00
AB	-0.40	1	0.58	-1.78	0.98	1.00
AC	0.20	1	0.58	-1.18	1.58	1.00
BC	-0.40	1	0.58	-1.78	0.98	1.00
A <sup>2</sup>	-0.93	1	0.57	-2.27	0.42	1.01
B <sup>2</sup>	-0.33	1	0.57	-1.67	1.02	1.01
C <sup>2</sup>	-0.075	1	0.57	-1.42	1.27	1.01

**Çizelge 4.49. Statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde Box Behnken faktöriyel tasarımı için ANOVA sonuçları.**

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	74.02	9	8.22	6.04	0.0135	significant
A-Sıcaklık	53.04	1	53.04	38.94	0.0004	
B-Havalandırma	8.40	1	8.40	6.17	0.0420	
C-Süre	6.84	1	6.84	5.03	0.0599	
AB	0.64	1	0.64	0.47	0.5151	
AC	0.16	1	0.16	0.12	0.7419	
BC	0.64	1	0.64	0.47	0.5151	
A <sup>2</sup>	3.60	1	3.60	2.64	0.1479	
B <sup>2</sup>	0.44	1	0.44	0.33	0.5856	
C <sup>2</sup>	0.024	1	0.024	0.017	0.8988	
Residual	9.54	7	1.36			
Lack of Fit	9.54	3	3.18			
Pure Error	0.000	4	0.000			
Cor Total	83.55	16				

Çizelge 4.49, statik sıvı kültürde üretilen mikropropagüllerin kurutma verimi için ANOVA' yı göstermektedir ve model, istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Değişkenlerden kurutma sıcaklığı ve havalandırma hızı da katı kültür fermentasyonu sonunda yapılan kurutma denemesine ait verilere benzer şekilde istatistiksel açıdan anlamlı bulunurken kurutma süresi anlamlı bulunmamıştır ( $p < 0.05$ ).

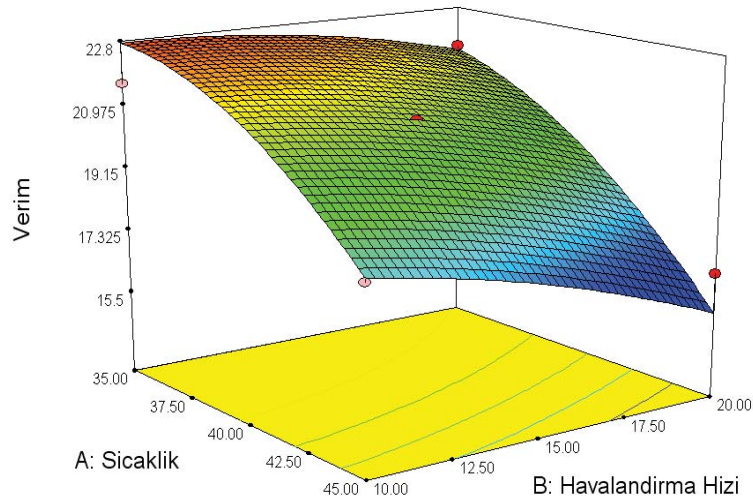
Ayrıca her üç faktörün de birbirleriyle aralarındaki etkileşimleri istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ( $p < 0.05$ ).

**Çizelge 4.50. Statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde ANOVA model değerlendirme sonuçları.**

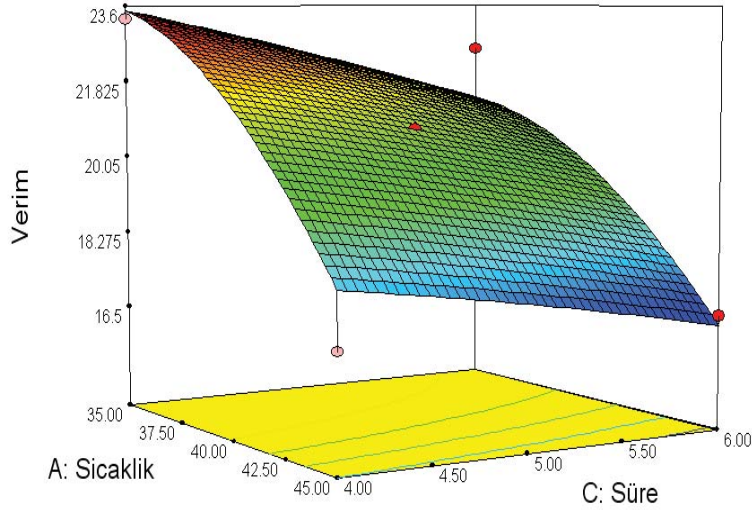
Std. Dev.	1.17	R-Squared	0.8859
Mean	20.18	Adj R-Squared	0.7391
C.V. %	5.78	Pred R-Squared	-0.8260
PRESS	152.56	Adeq Precision	8.881

$R^2$  değerine göre veri değişkenlerinin % 88.6' sını mevcut modelle ifade edilebilmektedir (Çizelge 4.50). Adj  $R^2$  değerininse 1' den uzak oluşu (0.74), denenen parametrelerin elde edilen yanıtlarla ilişkisinin katı kültür sonrası gerçekleştirilen denemeden elde edilen yanıtlara göre düşük olduğunu göstermektedir.

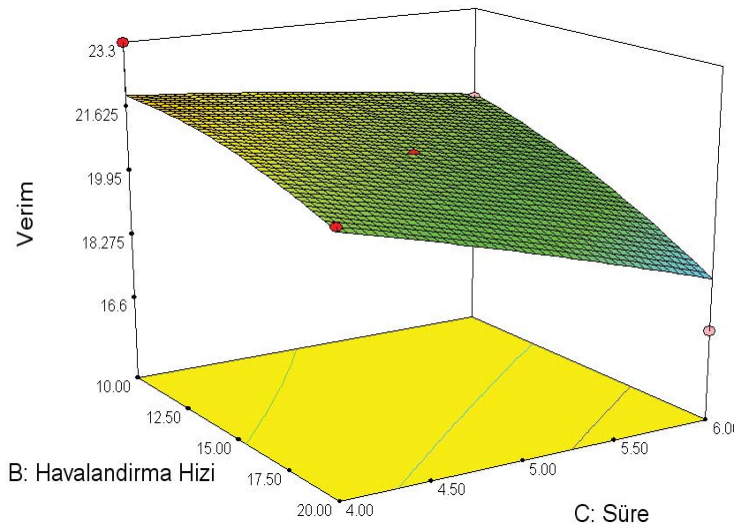
Şekil 4.26, 4.27 ve 4.28' de statik sıvı kültürde üretilen mikropropagüller için kurutma % verim yüzdelerine ait üç boyutlu yüzey yanıt grafikleri gösterilmektedir.



**Şekil 4.26. Statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde sıcaklık ve havalandırma hızının kurutma % verimine etkileri.**



**Şekil 4.27.** Statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde sıcaklık ve kurutma süresinin kurutma % verimine etkileri.



**Şekil 4.28.** Statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde havalandırma hızı ve kurutma süresinin kurutma % verimine etkileri.

Grafiklere ve analiz sonuçlarındaki değerlere göre kurutma % verimi, kurutma sıcaklığı ve havalandırma hızındaki değişimlerle istatistiksel açıdan anlamlı oranda değişim göstermektedir. Kurutma süresi ise istatistiksel açıdan diğer iki değişken kadar kurutma % verimindeki değişimi etkilememiştir. Ayrıca değişkenlerin ikili etkileşimleri kurutma % verimi üzerinde anlamlı etkide bulunmamışlardır.

Çizelge 4.51' de ise yüzey yanıt yönteminde göre verilen optimum sonuçlar görülmektedir. Bu sonuçlara göre birden fazla optimum nokta ile maksimum %



verim yanıtına ulaşılabilir.

**Çizelge 4.51. Statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde en yüksek % verim değerine ulaşılacak parametreler.**

<b>Number</b>	<b>Sicaklık*</b>	<b>Havalandırma Hizi*</b>	<b>Süre*</b>	<b>Desirability</b>	
1	<u>37.17</u>	<u>16.47</u>	<u>5.51</u>	<u>1.000</u>	<u>Selected</u>
2	42.03	11.57	4.11	1.000	
3	40.87	17.65	4.11	1.000	
4	43.09	19.02	4.75	1.000	
5	42.38	17.04	5.89	1.000	
6	38.57	15.15	5.91	1.000	
7	36.65	16.20	4.92	1.000	
8	39.48	10.64	5.33	1.000	
9	40.07	16.12	4.41	1.000	
10	42.37	15.85	4.17	1.000	
11	43.49	10.47	5.29	1.000	
12	43.20	12.63	5.84	1.000	
13	42.88	17.69	4.55	1.000	
14	38.17	13.38	5.69	1.000	
15	35.28	16.30	4.17	1.000	
16	37.71	15.62	4.29	1.000	
17	40.26	10.07	4.30	1.000	
18	35.80	13.57	4.77	1.000	
19	35.08	16.23	4.03	1.000	
20	41.42	13.64	5.69	1.000	
21	40.17	14.50	4.83	1.000	
22	44.37	14.50	4.36	1.000	
23	37.47	16.13	4.58	1.000	
24	44.74	11.69	4.34	1.000	
25	44.27	13.48	5.19	1.000	

Kurutma % verimi kadar önemli bir diğer yanıt ta kurutma süresince ortamın % nem değerindeki değişimdir (Çizelge 4.52). Formülasyonun ticari ürün olarak değerlendirilebilmesi için en yüksek % 8 neme sahip olması gerekmektedir (Ramanujam et al., 2010). O nedenle % nem değeri, kurutma verimi değerleri ile beraber incelenmelidir.

**Çizelge 4.52. Statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretim sonucu gerçekleştirilen kurutma işleminde % nem değerlerinin değişimi**

Hava Debisi	Gün/Sıcaklık	35 °C	40°C	45°C
10 L/dak	4	44	38	21
	5	24	19	8
	6	10	6.5	3
15 L/dak	4	44	33	26
	5	23	18	9
	6	8	5	4
20L/dak	4	40	30	19
	5	14	10	7
	6	5	4	3

Mikropropagüllere ait % nem değerleri incelendiğinde en hızlı kurumanın katı kültürde üretimden sonra gerçekleştirilen kurutmadakine benzer şekilde 45°C’ de elde edildiği görülmektedir. 35°C ve 40°C’ de havalandırma hızına da bağlı olarak ürünün % nem değeri daha yavaş azalmaktadır.

### 4.3 *Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin kurutma sonrası raf ömürlerinin belirlenmesi

Hem katı kültür hem de statik sıvı kültür fermentasyonu ile gerçekleştirilen üretimler sonrasında, biyoreaktör içerisinde tepsilerde kurutulan *Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinden elde edilen formülasyonların raf ömrünü belirlemek için gerçekleştirilen denemelerden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.53’ te gösterilmektedir.

**Çizelge 4.53. Hazırlanan *T. harzianum* mikropropagül formülasyonlarının raf ömrü % verim değerleri (Depolama sonu canlı hücre/Kurutma sonu canlı hücre).**

	Depolama Süresi (Ay)		
	1	3	6
<b>KKF</b>	% 40	% 11	% 3.2
<b>Statik Sıvı</b>	% 48	% 14	% 5

Elde edilen sonuçlara göre katı kültür fermentasyonu ve statik kültür fermentasyonu ile üretilen mikropropagüllerin kurutmadan sonra raf ömürleri benzerlikler göstermektedir. Her iki yöntemle elde edilen ürün de 1 aylık sürede

% 50-60 arası canlı mikropropagül kaybetmiştir. Bu değer 6 aylık sürede % 95 ve daha üstüne çıkmaktadır. Ramanujam et al.,(2010) çalışmalarında kurutmaya yardımcı materyaller (talk, torf, linyit ve kaolin) kullanarak *Trichoderma* formülasyonu hazırlamışlardır ve kurutmadan sonra raf ömrünü incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre en dayanıklı formülasyonun talkla hazırlanan olduğu bulunmuştur ve 120 gün oda sıcaklığında depolama sonucunda % 50 mikropropagül kaybı yaşanmıştır. Diğer formülasyonlarla da 3-4 ay süresince canlılık aynı değerde tutulabilmiştir.

#### **4.4 Metabolik gaz dengesi metodu ile kinetik verilerin ölçümü**

Hem katı kültür hem de statik sıvı kültür fermentasyonu ile gerçekleştirilen üretimlerde, üretim süresince ortama verilen havanın biyoreaktör giriş ve çıkışında O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> miktarları ölçülmüş ve elde edilen sonuçlardan, molar olarak ve ağırlıkça birim zamanda tüketilen O<sub>2</sub> ve üretilen CO<sub>2</sub> miktarları hesaplanmıştır. Ölçülen veriler ve bunlardan hesaplanan değerler, katı kültür fermentasyonu için yatay karıştırmalı biyoreaktör ve yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktör için sırasıyla Çizelge 4.54 ve Çizelge 4.55' te, statik sıvı kültür fermentasyonu içinse Çizelge 4.56' da gösterilmiştir.

**Çizelge 4.54: Yatay karıştırılmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde ölçülen ve hesaplanan O<sub>2</sub> tüketimi ve CO<sub>2</sub> oluşumu değerleri.**

Zaman	O <sub>2</sub> ölçülen (mg/L)	CO <sub>2</sub> ölçülen (ppm)	O <sub>2</sub> tüketilen (mol/saat)	CO <sub>2</sub> oluşan (mol/saat)	O <sub>2</sub> tüketilen (g/saat)	CO <sub>2</sub> oluşan (g/saat)	RQ
0	8,90	381,00	0	0	0	0	-
24	8,80	406,00	0.0009	0.000476	0.0288	0.0209	0,53
48	8,90	404,00	0	0.000475	0	0.0209	-
72	8,80	815,00	0.0009	0.007180	0.0288	0.3159	7,98
96	8,40	865,00	0.0045	0.008	0.144	0.352	1,78
120	8,20	844,00	0.0063	0.00766	0.2016	0.3370	1,22
144	8,40	872,00	0.0045	0.00812	0.144	0.3573	1,80
168	8,20	1076,00	0.0065	0.0115	0.208	0.506	1,77
192	7,70	1257,00	0.0112	0.0145	0.3584	0.638	1,29
216	6,60	2128,00	0.0210	0.0289	0.672	1.2716	1,38
240	4,60	3458,00	0.0402	0.0509	1.2864	2.2396	1,27
264	4,60	3470,00	0.0399	0.0511	1.2768	2.2484	1,28

**Çizelge 4.55: Tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde ölçülen ve hesaplanan O<sub>2</sub> tüketimi ve CO<sub>2</sub> oluşumu değerleri.**

Zaman	O <sub>2</sub> ölçülen (mg/L)	CO <sub>2</sub> ölçülen (ppm)	O <sub>2</sub> tüketilen (mol/saat)	CO <sub>2</sub> oluşan (mol/saat)	O <sub>2</sub> tüketilen (g/saat)	CO <sub>2</sub> oluşan (g/saat)	RQ
0	8,4	372	0	0	0	0	-
24	8,2	467	0,0018	0,0018	0,0432	0,0594	1,00
48	7,9	566	0,0045	0,00369	0,108	0,12177	0,82
72	7,5	684	0,0081	0,00594	0,1944	0,19602	0,73
96	6,7	1701	0,015	0,0253	0,36	0,8349	1,69
120	6,4	1580	0,018	0,023	0,432	0,759	1,28
144	4,5	2735	0,035	0,045	0,84	1,485	1,29
168	0,6	4679	0,07	0,082	1,68	2,706	1,17
192	1,5	3891	0,062	0,067	1,488	2,211	1,08
216	1,8	2683	0,059	0,044	1,416	1,452	0,75

**Çizelge 4.56: Tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültür fermentasyonu ile üretimde ölçülen ve hesaplanan O<sub>2</sub> tüketimi ve CO<sub>2</sub> oluşumu değerleri.**

Zaman	O <sub>2</sub> ölçülen (mg/L)	CO <sub>2</sub> ölçülen (ppm)	O <sub>2</sub> tüketilen (mol/saat)	CO <sub>2</sub> oluşan (mol/saat)	O <sub>2</sub> tüketilen (g/saat)	CO <sub>2</sub> oluşan (g/saat)	RQ
0	8.70	409	0	0	0	0	-
24	8.60	417	0,0009	0,0002	0,1440	0,0433	0,22
48	8.70	576	0,0000	0,0028	0,0000	0,6171	-
72	8.40	493	0,0027	0,0014	0,4320	0,3176	0,53
96	8.20	597	0,0045	0,0031	0,7200	0,6929	0,70
120	7.30	1899	0,0126	0,0245	2,0160	5,3914	1,94
144	6.90	3608	0,0162	0,0525	2,5920	11,5587	2,92
168	7.10	3200	0,0144	0,0458	2,3040	10,0863	3,18
192	7.20	2511	0,0135	0,0345	2,1600	7,5999	2,56

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, zamanla O<sub>2</sub> tüketiminin sürekli bir artış

gösterdiği, buna bağlı olarak ta CO<sub>2</sub> üretiminin arttığı, hücre sayısının azalmaya başladığı andan itibaren ise O<sub>2</sub> tüketimin ve CO<sub>2</sub> oluşumunun azaldığı gözlenmektedir. Aerobik proseslerde, fermentasyon boyunca ortamdaki oksijen tüketimi, hücrelerin üremeleri ve zarar gören hücrelerin bakımları için olan ihtiyaçtır (Pandey, et al.,2001). Bu nedenle O<sub>2</sub> tüketiminin üretim boyunca artış göstermesi beklenen bir durumdur. Buna bağlı olarak ölçülen CO<sub>2</sub> değerindeki artış ta hücresel metabolizmanın stokiometrik denklemine göre metabolizma faaliyetleri sonucu açığa çıkması gereken CO<sub>2</sub>' e karşılık gelmektedir ve elde edilen değerler birbirleriyle ve literatürde yer alan çalışmalarla tutarlıdır.

Oostra et al., (2000) çalışmalarında 300 g çalışma hacminde katı ortamda biyokontrol ajanı fungus ürettikleri denemede gaz analizörü kullanarak O<sub>2</sub> tüketimi ölçmüşler ve en yükseği 0,1 mol/h olacak şekilde O<sub>2</sub> tüketimi değerlerine ulaşmışlardır.

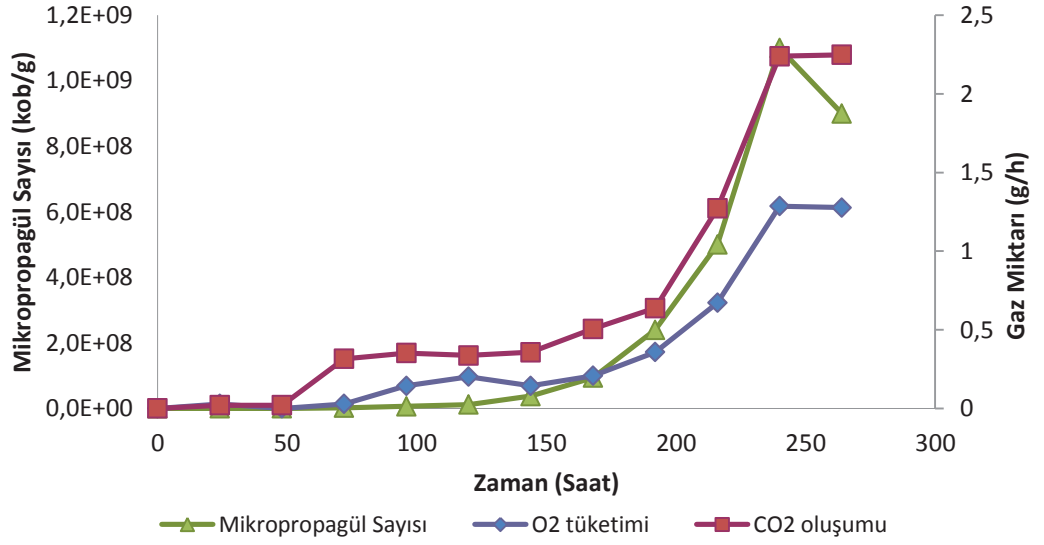
Bir başka çalışmada ise Nava et al.,(2011), küçük ölçekli katı kültür fermentasyonu çalışmasında *Aspergillus tamarii* fungusunun farklı karışma hızlarında O<sub>2</sub> tüketimi ve CO<sub>2</sub> oluşumlarını takip etmişler ve yaklaşık 0,04g/h O<sub>2</sub> tüketim hızı ve 0,06 g/h CO<sub>2</sub> oluşum hızına ulaşmışlardır.

Solunum katsayısı (Respiratory quotient = RQ) değerlerine bakıldığında ise tüm çalışma tiplerinde üretim boyunca çoğunlukla 1'e yakın değerlerde değiştiği görülmektedir. RQ değeri bir biyoproseste tüketilen O<sub>2</sub> başına açığa çıkan CO<sub>2</sub> değerini verir ve biyokütle üretimlerinde bu değer 1'e yakın olması istenir (Pandey et al. 2001).

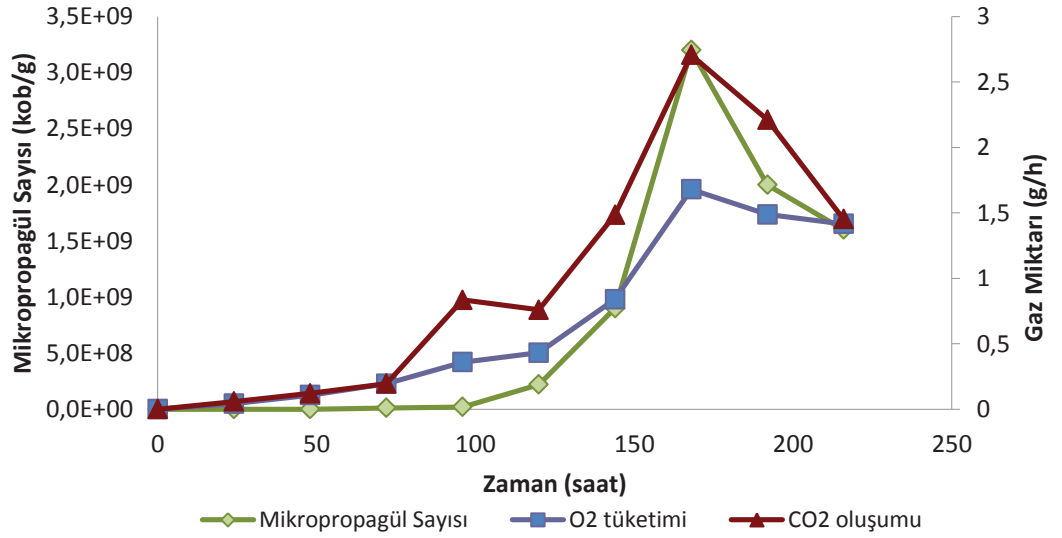
Nava et al., (2011), laboratuvar ölçeğinde yatay tamburlu biyoreaktörde katı kültürde *Aspergillus tamarii* fungusunu ürettikleri çalışmalarında karıştırmanın üretime etkilerini incelemişlerdir. Çalışmalarında farklı karıştırma hızlarındaki denemelerde RQ değeri 1.21 ile 1.32 arasında değişmiştir.

O<sub>2</sub> tüketimi ve CO<sub>2</sub> oluşumu ile ilgili hesaplanan bu değerleri, mikropropagül üretimiyle ilişkilendirmek için her üç üretim yönteme ait zamana karşı mikropropagül sayılarını ve O<sub>2</sub> tüketimi ile CO<sub>2</sub> oluşumunu gösteren grafikler çizilerek (Şekil 4.29, Şekil 4.30 ve Şekil 4.31) mikropropagül sayılarındaki değişime bağlı olarak O<sub>2</sub> tüketimi ve CO<sub>2</sub> oluşumunun değişimi

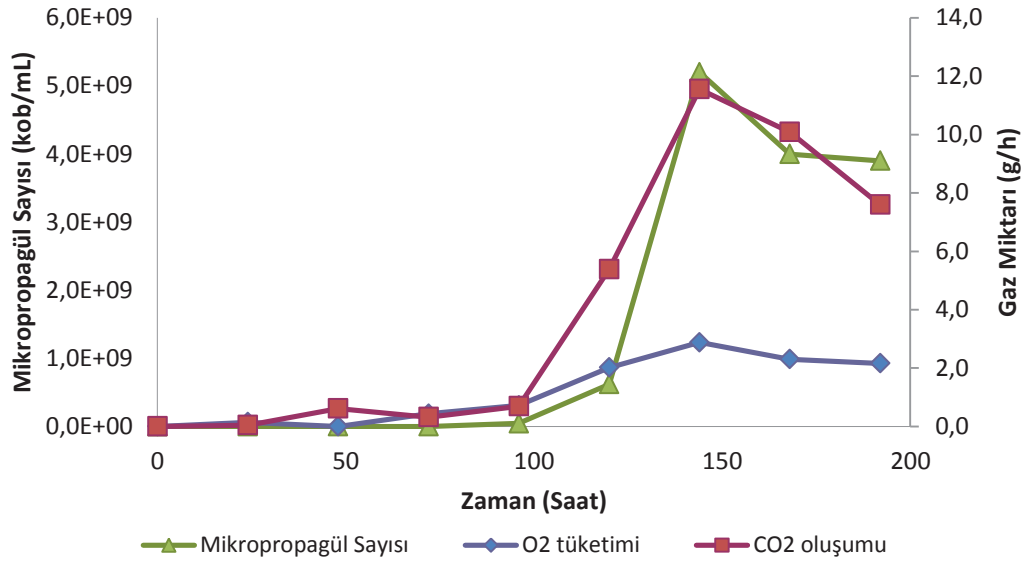
incelenmiştir.



Şekil 4.29: Yatay karıştırılmalı biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde zamana karşı mikropropagül sayısı, hesaplanan O<sub>2</sub> tüketimi ve CO<sub>2</sub> oluşumu değerleri.



Şekil 4.30: Tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu ile üretimde zamana karşı mikropropagül sayısı, hesaplanan O<sub>2</sub> tüketimi ve CO<sub>2</sub> oluşumu değerleri.



**Şekil 4.31:** Tepsili biyoreaktörde statik kültür fermentasyonu ile üretimde zamana karşı mikropropagül sayısı, hesaplanan O<sub>2</sub> tüketimi ve CO<sub>2</sub> oluşumu değerleri.

Çizilen grafiklere göre, her üç yöntem için de zamana karşı O<sub>2</sub> tüketimi ve CO<sub>2</sub> oluşumu değerleri, mikropropagül sayılarındaki değişimlere benzer değişim göstermişlerdir.



## 5 SONUÇ ve ÖNERİLER

Biofungusitler, çevresel kaliteyi azaltma potansiyeli olan kimyasal fungusitlerin yerine geçebilecek bir alternatiftir. Bu nedenle biyolojik kontrol ajanı olan *Trichoderma* mikropropagüllerinin (konidya, klamidospore) üretimi önem taşımaktadır.

Çalışmada öncelikle *Trichoderma harzianum* EGE-K38 mikropropagüllerinin katı kültürde yatay karıştırmalı biyoreaktörde ve yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde, statik sıvı kültür fermentasyonu ile de yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktör koşullarında çoğalmaları incelenmiş ve optimum üretim parametrelerinin belirlenmesi sağlanmaya çalışılmıştır ( Çizelge 5.1).

**Çizelge 5.1. KKF ve statik kültür fermentasyonu ile *Trichoderma* mikropropagüllerinin optimum üretim koşullarının belirlenmesi denemelerinde elde edilen en yüksek mikropropagül sayıları ve elde edildikleri parametre değerleri.**

Parametreler	Optimum Parametre Değerleri ve En Yüksek Mikropropagül Sayıları		
	Katı Kültür Fermentasyonu		Statik Sıvı Kültür Fermentasyonu
	Yatay Karıştırmalı Biyoreaktör	Yüzeyden Havalandırılan Tepsili Biyoreaktör	Yüzeyden Havalandırılan Tepsili Biyoreaktör
Nem Oranı (%60,65,70,75)	%70	%70	-
Sıcaklık (24±2, 28±2, 32±2, 35±2°C)	28±2°C	28±2°C	28±2°C
Hava Debisi (1, 2, 5, 8, 10, 12 L/dak)	5	5	5
İnokulum Spor Konsantrasyonu (1.0×10 <sup>4</sup> , 1.0×10 <sup>5</sup> , 1.0×10 <sup>6</sup> , 1.0×10 <sup>7</sup> , 1.0×10 <sup>8</sup> kob/mL)	1.0×10 <sup>6</sup>	1.0×10 <sup>5</sup>	1.0×10 <sup>5</sup>
İnokulum Miktarı (%1, 2, 5, 10, 20)	5	10	5
Substrat Miktarı	5cm (1.00kg)	4 cm (150g)	1.00L
Misel-Spor Aşılama	Spor	Spor	Spor
En Yüksek Mikropropagül Sayısı	1.1±0.1×10 <sup>9</sup> kob/g	3.0±0.6×10 <sup>9</sup> kob/g	5.2±0.2×10 <sup>9</sup> kob/ml
En yüksek Mikropropagül Sayısına Ulaşılan Süre (Saat)	240	168	144

Optimum nem miktarından yüksek nem miktarı porozitenin azalmasına, buğday kepeğinin partikül yapısının değişmesine, oksijen transferinin azalmasına

ve havasal misel oluşumunun engellenmesine neden olmaktadır. Funguslar, metabolik yol izlerini engellemeden hayatta kalabilmek için serbest nemi tercih ederler (Nampoothiri ve ark., 2004). Bütün bu bilgiler göz önünde bulundurularak buğday kepeğinin su tutma kapasitesi hesaba katıldığında optimum nem miktarı %70 olarak bulunmuştur.

Basınç uygulamasında atmosferik basınçla elde edilenden farklı değerlerin elde edilememesinin nedeni, uygulanan basınç değerinin çok yüksek tutulmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. İleriki çalışmalarda daha yüksek basınç değerleri ve periyodları denenerek bir optimizasyon çalışmasının yapılması, mevcut literatür bilgisine cevap vermek açısından önemli veriler sağlayacaktır.

*Trichoderma* sporlarının katı kültür fermentasyonu ile üretimindeki önemli sorunlardan bir tanesi de verimliliklerdir. Mevcut literatürle elde ettiğimiz sonuçlar karşılaştırıldığında, daha kısa inkübasyon sürelerinde daha yüksek mikropropagül sayıları elde edilmiştir.

Literatürde *Trichoderma* mikropropagüllerinin katı kültür ve statik kültür fermentasyonu ile üretimi için çok sınırlı bilgi bulunmaktadır ve konunun ticari önemi nedeni ile bilimsel yayınlarda büyük ölçek üretimlere yönelik ayrıntıya değinilmemektedir. Mevcut bilgilerin birçoğu da türlere özgü geliştirilmiştir. Ülkemizde de endüstriyel suş geliştirme ve pilot ölçekte üretim çalışmaları oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada yerel patojenlere karşı etki spektrumu geniş, özgün bir suş kullanılarak, yüksek verimli ticari *Trichoderma* mikropropagüllerinin üretilmesi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda katı kültür fermentasyon yöntemi ile yüksek mikropropagül değerleri elde edilmiştir.

*Trichoderma* türlerinin üretimi için statik kültür fermentasyon yönteminin kullanıldığı sınırlı sayıdaki mevcut çalışmanın arasına kapsamlı bir çalışma eklenmiştir.

Yapılan bu çalışma sonucunda, ülkemize özgü bir suşla ticari *Trichoderma* mikropropagüllerinin üretimi konusunda önemli sonuçlar elde edilmiştir.

Çalışmamızda *Trichoderma harzianum* EGE-K38'in verimli bir biçimde kurutulabilmesi için optimum kurutma koşulları da belirlenmeye çalışılmıştır. Buna göre katı kültür fermentasyonu ile yüzeyden havalandırılan tepsili

biyoreaktörde üretilen mikropropagüller üretimin hemen ardından kuru hava beslenerek, yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde statik sıvı kültürde üretilen mikropropagüllerse, üretimin ardından dışta yer alan düz tepsilerin, içerisindeki besi ortamıyla beraber uzaklaştırılmasının ardından, içteki gözenekli tepsilerin biyoreaktöre tekrar yerleştirilmesi sonrası katı kültürdeki gibi kuru hava beslenerek farklı sıcaklıklarda kurutma denemeleri gerçekleştirilmiştir ve kurutma için bir optimizasyon çalışması da gerçekleştirilmiştir. Çalışmada değişken olarak literatürden elde edilen kurutma sıcaklıkları (Sargın et al., 2013) ve üretimde kullanılan değerin üzerindeki havalandırma hızları denenmiştir.

Kurutma süresi değeri ön denemelerle elde edilmiş ve deney tasarımında kullanılmıştır. Kurutma süreleri, katı kültür üretimden elde edilen mikropropagüller için 3-5 gün, statik sıvı kültürden elde edilenler için ise 4-6 gündür ve literatürde kuru hava beslenerek gerçekleştirilen denemelerle (Toet and Somers, 1994) kıyaslanabilir sürelerde kurutma gerçekleştirilmiştir.

Formülasyonun ticari ürün olarak değerlendirilebilmesi için en yüksek % 8 neme sahip olması gerekmektedir (Ramanujam et al., 2010). O nedenle optimum koşulların belirlenmesinde bu değerin altındaki nem değerinin sağlandığı kurutma sürelerinde optimum kurutma verimi değerini sağlayan koşullar seçilmelidir.

Birbirine yakın verim değerlerinin elde edildiği kurutma işlemleri için kurutma süresinin kısa oluşu da verimliliği etkilediği için önemli bir parametredir ve kısa olan kurutma sürelerine sahip işlemler tercih edilmelidir.

Bu konuda ilerleyen zamanda yapılacak çalışmalarda sıcaklığın yanında, protektanların kullanımı (Sargın et al., 2013) gibi kurutmada etkili olabilecek başka parametrelerin de beraber çalışılması daha uygun olacaktır. Bununla birlikte ticari bir biyokontrol ürünü elde edilebilmesi için uygun bir formülasyonda kullanılacak katkı maddelerinin ve raf ömrünün de belirlenmesi gerekmektedir.

Çalışmada, *Trichoderma harzianum* mikropropagüllerinin üretimi sırasında tüketilen O<sub>2</sub> ve açığa çıkan CO<sub>2</sub> değerleri de ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar üretilen mikropropagül sayılarıyla karşılaştırılarak, gazların zamanla değişimlerine bağlı olarak üretimin ilerleyişinin hesaplanabileceği veriler elde edilmiştir. Elde edilen değerler her ne kadar literatürdeki değerlere benzer elde edilmiş olsa da ölçüm ekipmanından kaynaklanan birtakım sorunlar da meydana

gelmiştir. Bu sorunların önlenmesi için hassasiyeti daha yüksek ekipmanlarla, daha kontrollü koşullarda çalışılması daha uygun olacaktır.

## TEŞEKKÜR

Bu tezin meydana geliş sürecinde tez konusunun belirlenmesinden yazımına kadar her konuda yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. Sayıt SARGIN' a, yine desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen Prof. Dr. Rengin ELTEM'e ve ekibine, tez çalışmam sırasında her zaman değerli vakitlerini ayırarak beni dinleyen ve çalışmanın yürütülmesinde beni yönlendiren tez izleme komitesi üyelerim Prof. Dr. Murat ELİBOL ve Prof. Dr. İhsan YAŞA' ya, çalışmalarım sırasında her zaman yardımına koşan ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim Araş. Gör. Dr. Emek ASLAN'a, Araş. Gör. Mehmet Özgün ÖZEN' e, Yrd. Doç. Dr. Özlem AYTEKİN' e, Araş. Gör. Dr. Müge İŞLETEN HOŞOĞLU' na, Öğr. Gör. Cem YALAZA'ya ve başta biyoproses laboratuvarı ekibi olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma, çalışmalarım sırasında deneyimlerinden faydalandığım Yüksek Biyomühendis Can Uraz KARA' ya ve ayrıca tez çalışması sırasında emekleri geçen tüm stajyer arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmasının yürütülmesini 2010/BİL/022 nolu projeye destekleyen Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Araştırma Fonu' na ve çalışmanın yürütülmesi için gerekli imkanı sağlayan E.Ü. Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'ne, çalışmalarımı ve beni maddi olarak destekleyen YÖK Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı' na ve İstanbul Medeniyet Üniversitesi' ne destekleri için teşekkür ederim. Ayrıca TÜBİTAK 2211 Yurtiçi Doktora Burs Programı'na, sağladıkları maddi destekten ötürü teşekkür ederim. Çalışmamızda kullanılan katı besi ortamı bileşenlerinin sağlanmasındaki katkıları nedeniyle Kadıoğlu Değirmencilik AŞ' ye ve Türk Tuborg Bira ve Malt Sanayii A.Ş. İzmir fabrikasına teşekkür ederim.

Son olarak ta her zaman yanımda olduklarını bildiğim aileme teşekkür ederim.

İyi ki varsınız...

**Işık ÇOBAN**

**İzmir - 2015**

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abbasi, H. and Fazaelpoor, M.H.**, 2010, Pectinase Production in a Defined Medium Using Surface Culture Fermentation, *International Journal of Industrial Chemistry*, Vol.1, No.1, pp 5-10.
- Agosin, E. and Aguilera, J.M.**, 2005, Industrial Production of Active Propagules of *Trichoderma* For Agricultural Uses, *Trichoderma&Gliocladium Enzymes, Biological Control and Commercial Applications*, ed: Harman, G.E., Kubicek, C.P., Vol:2, *Taylor and Francis Ltd*, pp: 182-194.
- Ainsworth, G.C., Brown, A.M., Marsden, P.S.S.F., Smith, P.A. and Spilsbury, J.F.**, 1947, A Method for the Large Scale Production of Streptomycin by Surface Culture, *Journal of General Microbiology*, Vol 1 , No. 3.
- Aksoy, H.M.**, 2006, Toprak Kökenli Fungal Patojenlerin Fluoresan Pseudomonadlarla Biyolojik Mücadelesi, *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*, 21(3): 364-369s.
- Alabouvette, C., Olivain, C. and Steinberg, C.**, (2006), Biological Control of Plant Diseases: The European Situation, *European Journal of Plant Pathology*, 114, 329-341pp.
- Al-Taweil, H.I., Osman, M.B., Aidil, A.H. and Wan Yussof, W.M.**, 2009, Optimizing of *Trichoderma viride* Cultivation In Submerged State Fermentation, *American Journal of Applied Sciences*, 6(7), 1277-1281pp.
- Archana, A. and Satyanarayana, T.**, 1997, Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid state-fermentation, *Enzyme and Microbial Technology*, 21: 12-17pp.
- Arora, D. K.**, 2004, Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, And Environmental Applications; *CRC Press*; p147-149.
- Awad, G.E.A., Helal, M.M.I., Danial, E.N. and Esawy, M.A.**, (2014), Optimization of phytase production by *Penicillium purpurogenum* GE1 under solid state fermentation by using Box–Behnken design, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21, 81-88pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Babu, K.R. and Satyanarayana, T.,** 1995,  $\alpha$ -amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation, *Process Biochemistry* 30 (4) : 305-309pp.
- Bhai, R.S., Thomas, J. and Naidu, R.,** 1994, Evaluation of carrier media for field application of *Trichoderma* spp. in cardamom growing soils, *Journal of Plantation Crops*, 22 (1): 50-52pp.
- Box, G.E.P. and Behnken, D.W.,** (1960), Some new three level designs for the study of quantitative variables, *Technometrics*, 2, 455–475pp.
- Campbell-Platt, G.,** 1994, Fermented foods– a world perspective, *Food Research International*, 27, 253–257pp.
- Cann, A.J.** “Reproduction without sex”, <https://microbiologybytes.wordpress.com/2010/10/04/reproduction-without-sex/> (2010), (Erişim tarihi: 11.02.2015).
- Cannel, E. and Young, M.,** 1980, Solid-state fermentation systems, *Process Biochemistry*, 2-28pp.
- Cavalcante, R.S., Lima, H.L.S., Pinto, G.A.S., Gava, C.A.T. and Rodrigues S.,** 2008, Effect of Moisture On *Trichoderma* Conidia Production On Corn and Wheat Bran By Solid State Fermentation, *Food Bioprocess Technol.*, 1, 100-104pp.
- Chen, L., Yang, X., Raza, W., Luo, J., Zhang, F. and Shen, Q.,** 2011, Solid-State Fermentation of Agro-Industrial Wastes To Produce Bioorganic Fertilizer for The Biocontrol of *Fusarium* Wilt of Cucumber In Continuously Cropped Soil, *Bioresource Technology*, 102, 3900-3910pp.
- Chinnasamy, G.,** 2005, A Proteomics Perspective On Biocontrol and Plant Defense Mechanism. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, Springer, Netherlands, Pp: 233-235.
- Cook, R. and Baker, K.F.,** 1983, The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens, *American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota*,. Pp: 539.

### KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Darouneh, E., Alavi, A., Vosoughi, M., Arjmand, M., Seifkordi, A. and Rajabi, R.,** 2009, Citric acid production: Surface culture versus submerged culture, *African Journal of Microbiology Research* Vol. 3(9) pp. 541-545.
- Demirci, A., Katırcıoğlu, Y.Z. ve Demirci, F.,** 2002, Triazole Grubu Fungisitlerin Bazı Önemli Antagonist Funguslar ve Non-patojen *Fusarium oxysporum*'un İn Vitroda Gelişmelerine Etkileri Üzerine Araştırmalar, *Bitki Koruma Bülteni*, 42: 53-65pp, ISSN:0406-35957.
- Desgranges, C. and Durand, A.,** 1990, Effect of pCO<sub>2</sub> on growth, conidiation and enzyme production in solid state culture on *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* TS, *Enzyme and Microbial Technology*, 12: 546-551pp.
- Durand, A., Renaud, R., Almanza, S., Maratray, J., Diez, M. and Desgranges, C.,** 1993, Solid state fermentation reactors: from lab scale to pilot plant, *Biotechnological Advances*, 11: 591-597pp.
- Durand, A.,** 2003, Bioreactor designs for solid state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 13:113-125pp.
- Ganesan, S. and Sekar, R.,** 2004, Biocontrol mechanism of *Trichoderma harzianum* (ITCC-4572) on groundnut web blight disease caused by *Rhizoctonia solani*, *J. Theor. Expl. Biol.* 1: 43-47pp.
- Gao, L. and Liu, X.,** 2010, Nutritional Requirements of Mycelial Growth and Sporulation of Several Biocontrol Fungi In Submerged and On Solid Culture, *Microbiology*, 79(5), 612-619pp.
- Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., Santos, V.E. and Merchuk, J.C.,** 2010, Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview, *Biochemical Engineering Journal*, 49: 289-307pp.
- Gessesse, A. and Mamo, G.,** 1999, High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. by using solid state fermentation, *Enzyme and Microbial Technology*, 25: 68-72pp.
- Goldman, G.H., Hayes, C. and Harman, G.E.,** 1994, Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp., *Tibtech* vol 12.



**KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)**

- Gopalakrishnan, C., Ramanujam, B., Prasad, R.D., Rao, N.S. and Rabindra, R.J.**, 2003, Use of brewer's yeast amended spent malt as substrate for mass production of *Trichoderma*, *Journal of Biological Control*, 17: 167-70pp.
- Haltrich, D., Preiß, M. and Steiner, W.**, 1993, Optimization of a culture medium for increased xylanase production by a wild strain of *Schizophyllum commune*, *Enzyme and Microbial Technology*, 15: 854-860pp.
- Harman, G. and Jin, X.**, 1991, Production of Conidial Biomass of *Trichoderma harzianum* for Biological Control, *Biological Control*, 1, 23-28.
- Howell, C.**, 2003, Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolutions of current concepts, *Plant Disease*, January vol. 87, no. 1, pp. 4-10.
- Jackson, M.**, 1997, Optimizing Nutritional Conditions for the Liquid Culture Production of Effective Fungal Biological Control Agents, *Journal of Industrial & Biotechnonology*, 19: 180-187pp.
- Jagadeesh, K.S. and Geeta, G.S.**, 1994, Effect of *Trichoderma harzianum* grown on different food bases on the biological control of *Sclerotium rolfsii* Sacc. in groundnut, *Environmental Ecology*, 12: 471-73pp.
- Jakubikova, L., Farkas, V., Kolarova, N. and Nemcovic, M.**, 2006, Conidiation of *Trichoderma atroviride* Isolate During Submerged Cultivation In A Laboratory Stirred-tank Fermenter, *Folia Microbiol.*, 51(3), 209-213pp.
- Jayarajan, J. and Ramabadran, R.**, 1996, Evaluation of certain organic substrates and adjuvants for the mass multiplication of *Trichoderma harzianum* Rifai, *Journal of Biological Control*, 10: 129-31pp.
- Kalogeris, E., Iniotaki, F., Topakas, E., Christakopoulos, P., Kekos, D. and Macris, B.J.**, 2003, Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw, *Bioresource Technology*, 86 : 207-213pp.
- Kleifeld, O., and Chet, I.**, 1992, *Trichoderma harzianum* interaction with plants and effect on growth response. *Plant and soil* 144:267-272pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)**

- Kousalya, G. and Jeyarajan, R.**, 1990, Mass multiplication of *Trichoderma* spp., *Journal of Biological Control*, 4: 70-71pp.
- Kumar, A. and Marimuthu, T.**, 1997, Decomposed Coconut Coirpith - a conducive medium for colonization of *Trichoderma viride*, *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 32: 51-58pp.
- Kumar, S., Kumar, R. And Om, H.**, 2013, Shelf-life of *Trichoderma viride* in talc and charcoal based formulations, *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 83 (5): 566–9pp.
- Küçük, Ç. ve Güler, İ.**, 2009, Bitki Gelişimini Teşvik Eden Bazı Biyokontrol Mikroorganizmalar, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi* 1:30-42.
- Küçük, Ç., Kıvanç M., Kınacı E. ve Kınacı, G.**, 2009, *Trichoderma harzianum* İzolatlarının Şeker Pancarında Kullanılan Bazı Fungisitlere Duyarlılıklarının in vitro'da Araştırılması, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 7:2; 8-12pp.
- Liu, J., Li, D.B. and Yang, J.C.**, 2007, Operating Characteristics of Solid-State Fermentation Bioreactor with Air Pressure Pulsation, *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 43, No. 2, 211–216 pp.
- Menendez, A.B. and Godeas, A.**, 1998, Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* attacking soybean plants. Degradation of the cell walls of this pathogen by *Trichoderma harzianum* (BAFC 742), *Mycopathologia*, Volume 142, Issue 3, pp 153-160.
- Mitchell, D. and Berovič, M.**, 1998, Solid state fermentations, *Bioprocess Engineering Course, Edt M Berovic, National Institute of Chemistry, Slovenia*, 128-167pp.
- Mitchell, D., Pandey, A., Sangsurasak, P. and Krieger, N.**, 1999, Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid state fermentation, *Process Biochem*, 35: 167-178pp.
- Mitchell, D.A., Krieger, N., Stuart, D.M. and Pandey, A.**, 2000, New Developments in Solid State Fermentation II. Rational Approaches to the design, operation and scale up of bioreactors, *Process Biochemistry* 35: 1211-1225pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)**

- Mitchell, D.A., Krieger, N. and Berovič, M.(Eds.),** 2006, Solid-state fermentation bioreactors: Fundamentals of design and operation, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, P 1-2pp.
- Mohamad, R., Mohamed, M.S., Suhaili, N., Salleh, M.M., Ariff, A.B.,** 2010, Kojic Acid: Applications and development of fermentation process for production, *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* Vol. 5(2), pp 24-37.
- Monte, E.,** 2001, Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology, *Int. Microbiol* 4: 1-4pp.
- Monte, E. and Llobell, A.,** 2003, *Trichoderma* In Organic Agriculture, *Proceedings V World Avacado Congress*, pp: 725-733.
- Mujumdar, A. S.,** 2007, Handbook of Industrial Drying, *CRC Press*, pp 4-5.
- Mukhopadhyay, A.N., Brahm Bhat, A., and Patel, G.J.,** 1986, *Trichoderma harzianum* - a potential biocontrol agent for tobacco damping off, *Tobacco Research*, 12: 26-35pp.
- Mulligan D.F.C. and Decon J.W. ,** 1992, Detection of presumptive mycoparasites in soil placed on hostcolonized agar plates, *Mycol. Res.*, 96: 605–608pp.
- Murthy, M.V., Karanth , N.G. and Raghava, K.S.,** 1993, Biochemical engineering aspects of solid state fermentation, *Advanced and Applied Microbiology*, 38: 99-147pp.
- Nampoothiri, K.M., Baiju, T.V., Sandhya, C., Sabu, A., Szakacs, G. and Pandey, A.,** 2004, Process Optimization for Antifungal Chitinase Production by *Trichoderma harzianum*, *Process Biochemistry*, 39:1583-1590pp.
- Nava, I., Favela-Torres, E. and Saucedo-Castaneda, G.,** (2011), Effect of Mixing on SSF of Coffee Pulp by *A. tamarii*, *Food Technol. Biotechnol.*, 49 (3) 391–395pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)**

- Noh, A.M., Jahim, J.M., Abdul Murad, A.M. and Abu Bakar, F.D.,** 2012, Effect of Various Cultivation Methods on Cellobiohydrolase Production from *Aspergillus niger*, *International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology* Vol.2 No.4.
- Oostra, J., Tramper, J and Rinzema, A.,** 2000, Model-based bioreactor selection for large-scale solid-state cultivation of *Coniothyrium minitans* spores on oats, *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 652–663pp.
- Pa'e, N., Zahan, K.A. and Muhamad, II.,** 2011, Production of Biopolymer from *Acetobacter xylinum* Using Different Fermentation Methods, *International Journal of Engineering & Technology IJET-IJENS* Vol: 11 No: 05 pp:90-98.
- Pandey, A.,** 1991, Effect of particle size of substrate on enzyme production in solid state fermentation, *Bioresorce Technology*, 37: 169-172pp.
- Pandey, A.,** 1992, Recent process developments in solid-state fermentation, *Process Biochemistry*, 27, 109–117pp.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A. and Nigam,P.,** 2001, Solid-State Fermentation in Biotechnology Fundamentals and Applications, *Asiatech Publishers Inc, New Delhi*, pp:39-55.
- Purkarthofer, H., Siner, M. and Steiner, W.,** 1993, Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* : optimization of production in submerged and solid state culture, *Enzyme and Microbial Technology*, 17: 114-118pp.
- Raghuchander, T., Samiappan, R. and Arjunan, G.,** 1993, Biocontrol of Macrophomina root rot of mung bean, *Indian Phytopathology*, 46: 379-382pp.
- Raimbault, M.,** 1998, General and microbiological aspects of solid substrate fermentation, *Electronic Journal of Biotechnology*, 1 (3) : 1-16pp.
- Ramanujam, B., Prasad, R.D., Sriram, S. and Rangeswaran, R.,** 2010, Mass production, formulation, quality control and delivery of *Trichoderma* for plant disease management, *The Journal of Plant Protection Sciences*, 2(2) : 1-8pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Ranasingh, N., Saurabh, A. and Nedunchezhiyan, M.,** 2006, Use of *Trichoderma* in Disease Management, *Orissa Review*, pp.68-70.
- Robinson, T., Singh, D. and Nigam, P.,** 2001, Solid state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55: 284-289pp.
- Said, S.D.,** 2007, Spore Production by Biocontrol Agent *Trichoderma Harzianum* in Submerged Fermentation: Effect of Agitation and Aeration, *Jurnal Rekayasa Kimia dn Lingkungan*, 6:71-76.
- Sangeetha, P., Jeyarajan, R. and Panicker, S.,** 1993, Mass multiplication of biocontrol agent *Trichoderma* spp., *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, 23: 328-30pp.
- Sankar, P. and Jeyarajan, R.,** 1996, Biological control of sesamum root rot by seed treatment with *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis*, *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, 26:147-53pp.
- Sargin, S., Gezgin, Y., Eltem, R. and Vardar, F.,** 2013, Micropropagule production from *Trichoderma harzianum* EGE-K38 using solid-state fermentation and a comparative study for drying methods, *Turk J Biol.*, 37: 139-146pp.
- Sawant, I.S. and Sawant, S.D.,** 1996, A simple method for achieving high cfu of *Trichoderma harzianum* on organic wastes for field applications, *Indian Phytopathology*, 49: 185-87pp.
- Schuster, A. and Schmoll, M.,** 2010, Biology and Biotechnology of *Trichoderma*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87, 787-799.
- Steyaert, J.M., Weld, R.J., Mendoza, A. and Stewart, A.,** 2010, Reproduction Without Sex: Conidiation In The Filamentous Fungus *Trichoderma*, *Microbiology*, 156, 2887-2900pp.
- Tang, Y.J. and Zhong, J.J.,** 2003, Scale-Up of a Liquid Static Culture Process for Hyperproduction of Ganoderic Acid by the Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum*, *Biotechnol. Prog.*, 19: 1842-1846pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)**

- Tewari, L. and Bhanu, C.,** 2004, Evaluation of Agro-Industrial Wastes for Conidia Based Inoculum Production of Bio-control Agent: *Trichoderma harzianum*, *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63, 807-812pp.
- Toet, M.J. and Somers, A.,** (1994), PRODUCTION of *TRICHODERMA HARZIANUM* RIFA CMI CC NO. 333646 United States Patent, *Agricura (Private) Limited, Zimbabwe*.
- Upadhyay, J.P. and Mukhopadhyay, A.N.,** 1986, Biological control of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum* in Sugarbeet, *Tropical Pest Management*, 32: 215-20pp.
- Verma, M., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y. and Valero, J.R.,** 2007, Antagonistic Fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of Biological Control, *Biochemical Engineering Journal*, 37, 1-20pp.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L. and Lorito, M.,** 2008, *Trichoderma*-Plant-Pathogen Interactions, *Soil Biology & Biochemistry*, 40, 1-10pp.
- Viterbo, A., Inbar, J., Hadar, Y. and Chet, I.,** 2007, Plant Disease Biocontrol and Induced Resistance Via Fungal Mycoparasites, *Environmental and Microbial Relationships, 2nd Edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, pp: 127-146.
- Viterbo, A., Ramot, O., Chernin, L. and Chet, I.,** 2002, Significance of Lytic Enzymes from *Trichoderma* spp. in The Biocontrol of Fungal Plant Pathogens, *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 549-556pp.
- Wang, L., Ridgway, D., Gu, T. and Moo-Young, M.,** 2005, Bioprocessing Strategies To Improve Heterologues Protein Production In Filamentous Fungal Fermentations, *Biotechnology Advances*, 23, 115-129pp.
- Watanabe, S., Kato, H., Kumakura, K., Ishibashi, E. and Nagayama, K.,** 2006, Properties and Biological Control Activities of Aerial and Submerged Spores In *Trichoderma asperellum* SKT-1, *J. Pestic Sci.*, 31(4), 375-379pp.
- Weindling, R.,** 1932, *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi, *Phytopathology* 22, 837-845pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)**

- Whipps, J. M. and Lumsden, R.D.,** 1994, Biotechnology of Fungi For Improving Plant Growth, *Press Syndicate of the University of Cambridge*, p178-18.
- Witkowska, D. and Maj., A.,** 2002, Production of Lytic Enzymes By *Trichoderma* spp. and Their Effect On The Growth of Phytopathogenic Fungi, *Folia Microbiol.*, 47(3), 279-282pp.
- Yaman, M.,** 1998, Biyolojik Mücadele, *Çevre ve İnsan Dergisi*, Sayı 40.
- Yasuhara, A., Ogawa, A., Tanaka, T., Sakiyama, T. and Nakanishi, K.,** 1994, Production of neutral protease from *Aspergillus oryzae* by a novel cultivation method on a microporous membrane, *Biotechnol. Tech.*, 8: 249-254pp.
- Zhihui, B., Bo, J., Yuejie, L., Jian, C. and Zuming, L.,** 2008, Utilization of Winery Wastes for *Trichoderma viride* Biocontrol Agent Production By Solid State Fermentation, *Journal of Environmental Sciences*, 20, 353-358pp.

## ÖZGEÇMİŞ

Işık ÇOBAN 1981 yılında Bornova İZMİR’ de doğmuştur. Orta öğrenimini Uşak Anadolu Lisesi (Uşak Orhan Dengiz Anadolu Lisesi)’ nde tamamlamıştır. Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü’ nden 2005 yılında mezun olmuştur. Yüksek lisansını Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı’ nda “ *Serbest ve İmmobilize Rhizopus oryzae Fungusu İle Laktik Asit Üretiminin Optimum Koşullarının Belirlenmesi*” konulu tezi ile 2008 yılında tamamlamıştır. 2011 yılında Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı’ nı kazanarak İstanbul Medeniyet Üniversitesi Mühendislik - Mimarlık Fakültesi Biyomühendislik Bölümü’ ne Araştırma Görevlisi olarak atandıktan sonra aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı’ na doktora eğitimi süresince görevlendirilmiştir.