

Basidiomycetes Türlerinin Gibberellik Asit, Absisik Asit ve İndol Asetik Asit Üretimi
Açısından Taranması, Üretim Koşullarının Optimizasyonu ve Reaktör Çapında Üretimi

Bilal DOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ekim 2013

The Screening, Optimization, and Reactor Scale Production of Gibberellic Acid,
Abscisic Acid, and Indole Acetic Acid by Basidiomycetes

Bilal DOĞAN

MASTER OF SCIENCE THESIS

Biology Mainbranch

October 2013

Basidiomycetes Türlerinin Gibberellik Asit, Absisik Asit ve İndol Asetik Asit Üretimi
Açısından Taranması, Üretim Koşullarının Optimizasyonu ve Reaktör Çapında Üretimi

Bilal DOĞAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

Ekim 2013

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Bilal Doğan'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Basidiomycetes Türlerinin Gibberellik Asit, Absisik Asit ve İndol Asetik Asit Üretimi Açısından Taranması, Üretim Koşullarının Optimizasyonu ve Reaktör Çapında Üretimi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

Üye : Prof. Dr. Zeki YILDIZ

Üye : Doç. Dr. Güler ÇOLAK

Üye : Doç. Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Günümüzde tarımsal üretim veriminin düşmesinin yanı sıra hızla artan nüfus dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de besin ve beslenme sorununu beraberinde getirmektedir. Bu sebeple bitkisel kaynaklardan mümkün olduğu kadar fazla verim elde edilmesi zorunluluğu doğmaktadır. Bitki gelişim düzenleyicileri (BGD) bu sorun için alternatif bir çözüm olarak düşünülmektedir.

Çalışmada Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Fungikültür Laboratuvarı'nda dikaryotik misel formunda saklanan Basidiomycetes kültür koleksiyonunun BGD üretim potansiyellerinin belirlenmesi, üretim koşullarının optimizasyonu ve pilot çapta üretimi amaçlanmıştır.

Bu amaçla 103 adet Basidiomycetes izolatu, BGD üretim kapasiteleri açısından taranmış, başarılı bulunan *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu sonraki aşamalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

Pleurotus eryngii (Hakkari) izolatının 3 farklı kültür sisteminde (derin kültür, statik kültür ve katı faz kültür sisemi), BGD üretimi incelenmiştir. En iyi BGD üretimi inkübasyonun 18. gününde derin kültür yönteminde GA için 4438.67, ABA için 436.95 ve IAA için 54.32 mg/l olarak belirlenmiştir.

BGD üretim koşullarının optimizasyonu için Plackett-Burman deney tasarımı (PB) ve cevap yüzey yöntemi kullanılmıştır. İstatistiksel deney tasarımı ile BGD üretiminin optimizasyonu aşamasında belirlenen en uygun üretim koşulları, ölçek büyütme uygulanarak reaktör boyutunda araştırılmıştır. Reaktör koşullarında BGD üretim değerleri GA, ABA ve IAA için sırasıyla 10545, 872,32 ve 60,48 mg/l olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, GA, ABA ve IAA üretim değerleri, başlangıç değerlerine göre sırası ile 4,1, 3,4 ve 2,3 kat arttırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Pleurotus eryngii*, Gibberellik Asit, Absisik Asit, İndol Asetik Asit, Optimizasyon, Reaktör

SUMMARY

Nowadays, decline in the efficiency of agricultural production as well as the rapidly growing population in our country as it is throughout the world brings about the problem of food and nutrition. These situation causes reveal the necessity of obtaining as possible as greater efficiency from plant sources. Plant growth hormones (PGH) could be accepted as an alternative solution for this problem.

In this context, aims of the suggested study are to determine of their potential to produce plant growth hormones of fungal cultures stored as dicaryotic mycelium form in Basidiomycetes culture collection of Eskisehir Osmangazi University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Fungiculture Laboratory, to optimize of production conditions, and to produce in pilot scale.

Therefore 103 Basidiomycetes isolates were investigated the ability of producing plant growth hormones capacity. Isolate *Pleurotus eryngii* (Hakkari) was found successful and chosen for next experiments.

Plant growth hormones producing capacity of *Pleurotus eryngii* (Hakkari) isolate measured while mushroom growing on different culture type (static, submerged and solid state). Maximum plant growth hormones production noted respectively GA; 4438.67, ABA; 436.95 and IAA; 54.32 mg/l with submerged fermentation on day 18th.

Plackett-Burman experimental design and response surface method were used for optimization of plant growth hormones production conditions. The determined optimum conditions was investigated in stirred tank reactor scale to produce PGH in higher volume and reached the results, GA; 10545, ABA; 872.32 and IAA; 60.48 mg/l. Finally, production amounts of GA, ABA and IAA were increased respectively 4.1, 3,4 and 2.3 fold.

Keywords: *Pleurotus eryngii*, Gibberellic Acid, Abscisic Acid, Indole Acetic Acid, Optimization, Reactor

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçiminden başlayarak tüm çalışma boyunca bilgisini, sabrını ve tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ' a;

Çalışmanın çeşitli aşamalarında zamanını ayırarak bilgi ve tecrübeleriyle çalışmayı boyutlandıran değerli hocam Prof. Dr. Zeki YILDIZ' a;

Tez süresince yaptığım çalışmalarda bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Cem ÖZKAN ve Ayşe Betül KARADUMAN başta olmak üzere tüm Fungikültür Laboratuvar' ı çalışanlarına;

Sevgi ve desteğiyle her zaman yanımda olan, Aykut KARAYER, Bilge BORAN ve Hilal Seval ABANOZ 'a ;

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi yüksek lisans eğitimim sırasında da beni destekleyen, hayatta kazandığım ve kazanacağım tüm başarıların mimarı olan annem Aysel DOĞAN, babam Kasım DOĞAN ve ablam Ayşegül DOĞAN' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilal DOĞAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Bitki Gelişim Düzenleyicileri	1
1.1.1. Gibberellinler.....	2
1.1.1.1. Gibberellinlerin Biyosentezi	3
1.1.1.2. Gibberellinlerin Fizyolojik Etkileri	4
1.1.1.3. Gibberellinlerin Ticari Kullanımı	5
1.1.2. Oksinler	5
1.1.2.1. Indol Asetik Asit Biyosentezi.....	6
1.1.2.2. IAA'nın Fizyolojik Etkileri.....	7
1.1.3. Absisik Asit.....	8
1.1.3.1. ABA Biyosentezi.....	8
1.1.3.2. ABA'nın Fizyolojik Etkileri	9
1.1.4. Mikroorganizmalar ile BGD Üretimi.....	10
1.1.4.1. Üretici Organizmalar.....	10
1.1.4.2. Üretim Optimizasyonu.....	11
2. MATERYAL ve METODLAR	15
2.1. Materyal	15
2.1.1. Makrofungus İzolatları.....	15

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa No</u>
2.1.2. Besiyerleri.....	18
2.1.3. Çözeltiler ve Diğer Kimyasal Maddeler	19
2.2. Metodlar	21
2.2.1. Makrofungus Kültürlerinin GA, ABA ve IAA Üretim Potansiyelleri Açısından Taranmaları.....	21
2.2.1.1. Makrofungus İzolatlarının Aktiflenmesi.....	21
2.2.1.2. Makrofungus İzolatlarından İnokülant Eldesi.....	21
2.2.1.3. Makrofungus İzolatlarının BGD Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	21
2.2.1.4. Makrofungus İzolatının BGD Üretimini Doğrulanması.....	24
2.2.2. Bitki Gelişim Düzenleyicisi (BGD) Üretimini Arttıran Kültür Yönteminin Belirlenmesi.....	24
2.2.2.1. İnokülant eldesi.....	25
2.2.2.2. Derin Kültür Yöntemi ile BGD Üretimini İzlenmesi.....	25
2.2.2.3. Statik Kültür Yöntemi ile BGD Üretimini İzlenmesi.....	25
2.2.2.4. Katı Faz Kültür Yöntemi ile BGD Üretimini İzlenmesi.....	26
2.2.2.5. Analitik Yöntemler.....	26
2.2.3. İstatistiksel Deney Tasarımı ile BGD Üretimini Optimizasyonu.....	26
2.2.3.1. Plackett-Burman Deney Tasarımı.....	27
2.2.3.2. Cevap Yüzey Deney Tasarımı.....	28
2.2.4. Elde Edilen Optimize Koşulların Derin Kültür Koşullarına Uygulanması.....	30
2.2.5. BGD Üretiminde Kinetik Parametrelerin Tayini.....	31
3. BULGULAR.....	32
3.1.1. Makrofungus Kültürlerinin GA, ABA ve IAA Üretim Potansiyelleri Açısından Taranmaları.....	32

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa No</u>
3.1.1.1. Makrofungus İzolatlarının BGD Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	32
3.1.1.2. Makrofungus İzolatının BGD Üretimini Doğrulanması.....	37
3.1.2. Bitki Gelişim Düzenleyicisi (BGD) Üretimini Arttıran Kültür Yönteminin Belirlenmesi.....	38
3.1.2.1. Derin Kültür Yöntemi ile BGD Üretimini İzlenmesi.....	39
3.1.2.2. Statik Kültür Yöntemi ile BGD Üretimini İzlenmesi.....	39
3.1.2.3. Katı Faz Kültür Yöntemi ile BGD Üretimini İzlenmesi.....	40
3.1.3. İstatistiksel Deney Tasarımı ile BGD Üretimini Optimizasyonu.....	42
3.1.3.1. Plackett-Burman Deney Tasarımı.....	42
3.1.3.2. Cevap Yüzey Deney Tasarımı	47
3.1.4. Elde Edilen Optimize Koşulların Derin Kültür Koşullarına Uygulanması.....	55
3.1.5. BGD Üretiminde Kinetik Parametrelerin Tayini.....	58
4. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	59
4.1.1. Makrofungus Kültürlerinin GA, ABA ve IAA Üretim Potansiyelleri Açısından Taranmaları.....	59
4.1.2. Bitki Gelişim Düzenleyicisi (BGD) Üretimini Arttıran Kültür Yönteminin Belirlenmesi.....	61
4.1.3. İstatistiksel Deney Tasarımı ile BGD Üretimini Optimizasyonu.....	62
4.1.4. Elde Edilen Optimize Koşulların Derin Kültür Koşullarına Uygulanması.....	66
4.1.5. BGD Üretiminde Kinetik Parametrelerin Tayini.....	68
5. KAYNAKLAR.....	70

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. Gibberellik asitin yapısı	3
Şekil 1.2. Gibberellik asitin biyosentezi	4
Şekil 1.3. Indol Asetik Asit' in yapısı	6
Şekil 1.4. Triptofandan IAA' nın biyosentezinde izlenen yollar.	7
Şekil 1.5. ABA' nın yapısı	8
Şekil 1.6. ABA' nın biyosentetik yol izi şeması.....	9
Şekil 2.1. Makrofungus suşları tarafından GA3 üretiminin miktar tayini için kullanılan standart cevap doğrusu.....	22
Şekil 2.2. Makrofungus suşları tarafından ABA üretiminin miktar tayini için kullanılan standart cevap doğrusu.....	23
Şekil 2.3. Makrofungus suşları tarafından IAA üretiminin miktar tayini için kullanılan standart cevap doğrusu.....	23
Şekil 3.1. Bazı makrofungus izolatlarının gibberellik asit (GA), absisik asit (ABA) ve indol asetik asit (IAA) üretim miktarları.....	37
Şekil 3.2. <i>Pleurotus eryngii</i> izolatının GA ₃ , ABA ve IAA üretiminin ITK ile belirlenmesi A: Standart, B: Ekstrakt	38
Şekil 3.3. <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatu ile derin kültür tipinde BGD üretimi	39
Şekil 3.4. <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatu ile statik kültür tipinde BGD üretimi	39
Şekil 3.5. <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatı ile katı faz kültür tipinde BGD üretimi...	40

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.6. <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatu ile farklı kültür tiplerinde GA üretiminin karşılaştırılması.....	40
Şekil 3.7. <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) ile farklı kültür tiplerinde ABA üretiminin karşılaştırılması.....	41
Şekil 3.8. <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatu ile farklı kültür tiplerinde IAA üretiminin karşılaştırılması.....	41
Şekil 3.9. <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatu ile çalkalamalı kültür tipinde BGD üretimi sırasında büyüme özellikleri.....	42
Şekil 3.10 <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatının Plackett-Burman Deney Tasarımında (PB) ürettiği BGD miktarları	43
Şekil 3.11 Plackett – Burman Deney Tasarımında kullanılan değişkenlerin <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatu tarafından GA üretimi üzerine etkisi.. ..	46
Şekil 3.12 Plackett – Burman Deney Tasarımında kullanılan değişkenlerin <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatu tarafından ABA üretimi üzerine etkisi.	46
Şekil 3.13 Plackett – Burman Deney Tasarımında kullanılan değişkenlerin <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatu tarafından IAA üretimi üzerine etkisi.	47
Şekil 3.14. Cevap yüzey yöntemi ile GA üretiminde, gözlenen ve öngörülen sonuçlar arasındaki ilişki.....	49
Şekil 3.15. Cevap yüzey yöntemi ile ABA üretiminde, gözlenen ve öngörülen sonuçlar arasındaki ilişki.....	49
Şekil 3.16. Cevap yüzey yöntemi ile IAA üretiminde, gözlenen ve öngörülen sonuçlar arasındaki ilişki.....	50

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.17. Cevap yüzey yönteminde kullanılan değişkenlerin <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatu tarafından GA üretimi üzerine etkisi.....	51
Şekil 3.18. Cevap yüzey yönteminde kullanılan değişkenlerin <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatu tarafından ABA üretimi üzerine etkisi.	51
Şekil 3.19. Cevap yüzey yönteminde kullanılan değişkenlerin <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatu tarafından IAA üretimi üzerine etkisi.....	52
Şekil 3.20. Cevap yüzey yönteminde <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatu tarafından GA üretiminde kullanılan değişkenlerin etki analizi	54
Şekil 3.21. Cevap yüzey yönteminde <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatu tarafından ABA üretiminde kullanılan değişkenlerin etki analizi	54
Şekil 3.22. Cevap yüzey yönteminde <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatu tarafından IAA üretiminde kullanılan değişkenlerin etki analizi	55
Şekil 3.23.. <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatu ile optimize olmayan koşullarda erlen ölçeğinde BGD üretimi sırasında büyüme özellikleri.....	56
Şekil 3.24. <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatu ile optimize olan koşullarda erlen ölçeğinde BGD üretimi sırasında büyüme özellikleri.....	56
Şekil 3.25. <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatu ile optimize olan koşullarda reaktör ölçeğinde BGD üretimi sırasında büyüme özellikleri.....	57
Şekil 3.26. <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatu ile optimize olan koşullarda reaktör ölçeğinde BGD üretimi.....	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 1.1. Mikrobiyal yolla bitki gelişim düzenleyicileri üretiminde üzerinde çalışılan mikroorganizmalar.....	10
Çizelge 2.1. Tarama çalışmasında kullanılan makrofunguslar.....	16
Çizelge 2.2. Kullanılan kimyasallar ve kullanım alanları.....	20
Çizelge 2.3. Plackett – Burman Deney Tasarımı ile seçilen suş tarafından BGD üretimi üzerine etkisi araştırılan değişkenler ve seviyeleri.....	27
Çizelge 2.4. Seçilen suş tarafından BGD üretimi için kullanılan Plackett – Burman deney tasarımı	28
Çizelge 2.5. Seçilen suş tarafından BGD üretimi için kullanılan Box-Behnken deney modeli.....	29
Çizelge 2.6. Cevap yüzey yöntemi deney tasarımı ile seçilen suş tarafından BGD üretimi üzerine etkisi araştırılan değişkenler ve seviyeleri	30
Çizelge 3.1. Makrofungus suşlarının inkübasyonun 10. gününde ürettikleri gibberellik asit (GA), absisik asit (ABA) ve indol asetik asit (IAA) miktarları	33
Çizelge 3.2. <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatının Plackett-Burman deney tasarımı (PB) ürettiği BGD miktarları.....	42
Çizelge 3.3. <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatının GA üretimi açısından PB deney tasarımı analiz sonuçları.....	44
Çizelge 3.4. <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatının ABA üretimi açısından PB deney tasarımı analiz sonuçları.....	44
Çizelge 3.5. <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatının IAA üretimi açısından PB deney tasarımı analiz sonuçları.....	45

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 3.6 <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatının Box-Behnken deney tasarımı, deneysel ve tahmin edilen değerler.....	48
Çizelge 3.7. <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatı ile GA üretiminin varyans ve regresyon analizi sonuçları.....	52
Çizelge 3.8. <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatı ile ABA üretiminin varyans ve regresyon analizi sonuçları.....	53
Çizelge 3.9. <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatı ile GA üretiminin varyans ve regresyon analizi sonuçları.....	53
Çizelge 3.10. <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatının optimize olan ve olmayan koşullarda farklı ölçeklerde büyüme kinetiği ve verim katsayısı verileri.....	58
Çizelge 4.1. Plackett – Burman deney tasarımı yardımıyla seçilen değişkenler.....	64
Çizelge 4.2. Optimum besinsel ve çevresel koşullar.....	64
Çizelge 4.3. <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatı tarafından optimizasyondan önce ve sonra BGD üretim değerlerinin karşılaştırılması.....	65
Çizelge 4.4. <i>Pleurotus eryngii</i> (Hakkari) izolatının optimize olan ve olmayan koşullarda farklı ölçeklerde BGD üretim verileri.....	66

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simge</u>	<u>Açıklama</u>
BGD	Bitki gelişim düzenleyicileri
GA	Gibberellik asit
IAA	İndol asetik asit
ABA	Absisik asit
PB	Plackett – Burman
PDA	Potato Dekstroz Agar
rpm	Dakikadaki dönüş hızı
nm	Nanometre
mg	Miligram
µg	Mikrogram
ml	Mililitre
HCl	Hidroklorik asit
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
HClO ₄	Perklorik asit
H ₂ SO ₄	Sülfirik asit
NaOH	Sodyum hidroksit

1. GİRİŞ

Dünyamızda hızla artan nüfus, bilinçsiz tüketim ve doğal kaynakların yanlış kullanımının doğurduğu sorunların başında açlık sorunu gelmektedir. Bu durum insanların geleneksel bitkisel ve hayvansal kaynakları yüksek verimle kullanmasını zorunlu hale getirmektedir. Günümüzde tarım alanlarının yanlış politikalar ile çoraklaştırılması, kuraklık, sulamada yapılan yanlışlıklar ve erozyon gibi nedenlerle tarımsal alanların ve tarımsal üretim veriminin azalması gibi nedenlerle birim alandan alınan verimin artırılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Bu sorunun çözümünde; sonuçların bilinmesi ve doğal olarak bitkilerde sentezlenmesi nedeniyle bitki gelişim düzenleyicileri (BGD) güçlü bir aday olarak ortaya çıkmaktadır.

1.1. Bitki Gelişim Düzenleyicileri

BGD; bitkiler, funguslar, bakteriler, algler ve likenler tarafından endojen olarak sentezlenen ve çok düşük konsantrasyonları büyüme, farklılaşma başta olmak üzere birçok fizyolojik olayı kontrol eden ve çevresel sinyalleri ileten maddelerdir (Battal vd., 2004). BGD, bitkiler üzerindeki fizyolojik etkilerinden dolayı birçok tarımsal uygulamada kullanılmaktadır. BGD tarımda çelikle çoğaltma sağlama, tohumların çimlenme gücünü artırma, çiçeklenmeyi teşvik etme veya geciktirme, soğuğa dayanıklılığı artırma, meyvelerde tohum oluşumunu artırma, meyve iriliğini artırma, meyve muhafaza süresini uzatma, bitkilerin hastalık ve zararlılara dayanıklılığını artırma, yabancı ot kontrolünü sağlama, hasat öncesi meyve dökülmesine engel olma, makinalı hasadı kolaylaştırmak için tüm bitkilerin aynı zamanda olgunlaşmasını sağlama ve hasatta iş gücünü azaltma, olgunlaşmayı hızlandırarak yatmayı engelleme, patatesten dormansiyi kırma, özellikle doku kültürü çalışmalarında kök-sürgün ve yumru oluşumunu teşvik etme gibi amaçlarla kullanılmaktadır (Kumlay ve Eryiğit, 2011).

BGD'nin öneminin anlaşılması beraberinde sentetik olarak üretimi ve ticari uygulamaları getirmiştir. En çok kullanılan BGD olan GA₃'ün dünya çapında üretimi 1999 yılında 25 tonu aşarak 100 milyon ABD doları gibi bir piyasa değerine ulaşmıştır.

Ayrıca saflık ve etki gücüne bağlı olarak uluslararası piyasada 27-36 ABD doları / g gibi yüksek bir değerle satılmaktadır (Avinash et al., 2011).

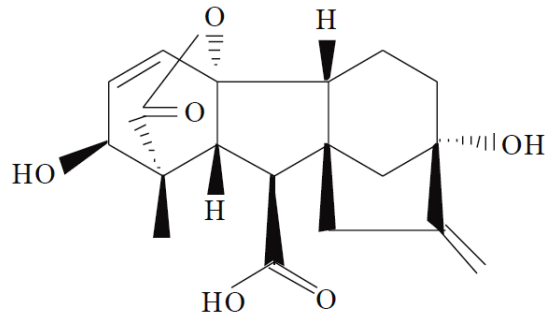
Bitkisel üretimde verim ve kalite artışını sağlamak için en sık kullanılan BGD arasında gibberellik asit, indol asetik asit ve absisik asit göze çarpmaktadır.

1.1.1. Gibberellinler

Gibberellinler tetrasiklik diterpenoid hidrokarbonlardan biyolojik olarak üretilmiş diterpenoid asitlerdir (Avinash et al., 2011). Gibberellinler diterpen iskeletindeki karbon sayılarına göre C₂₀ gibberellinleri ve C₁₉ gibberellinleri olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar. C₂₀ gibberellinler, C₁₉ gibberellinlerin öncülleridir ve C₁₉ gibberellinleri, C₂₀ gibberellinlerde meydana gelen CO₂ eliminasyonu sonucu oluşurlar. C₁₉ grubu gibberellinlerin hepsi biyolojik olarak aktif değildir. Ancak tüm aktif gibberellinler bu grupta yer almaktadır (Bömke ve Tudzynski, 2009).

Gibberellinler ilk kez pirinç paraziti olan *Gibberella fujikuroi*'nin (Anamorf: *Fusarium moniliforme*) neden olduğu bakanea hastalığını (konak bitkide devleşme) araştıran bilim adamları tarafından keşfedilmiştir. Yabuta ve Sumiki (1938) de elde ettikleri kristal madde karışımına fungusun adı dolayısıyla "gibberellin" ismini vermişlerdir (Aksöz vd., 1989).

Bitki ve funguslardan bugüne kadar 100' den fazla gibberellin izole edilmiştir. Bu maddelerin adlandırılması keşfedilme sıralarına göredir. Gibberellinler arasında en önemlisi "Gibberellin A₃" ya da "Gibberellin GA₃" olarak bilinen gibberellik asittir (GA) (Şekil 1.1.). *Gibberella fujikuroi* de ilk belirlenen gibberellin tipi GA₄'tür ve GA₄, GA₁ veya GA₇'ye dönüşebilir. GA₁ ve GA₇ ise GA₃'ün öncül maddesidir. Mikrobiyal fermentasyonda yüksek verimde üretilen GA₃ bitkilerde yüksek biyolojik aktiviteye sahiptir.



Şekil 1.1. Gibberellik asitin yapısı (Kelen vd., 2004)

1.1.1.1. Gibberellinlerin Biyosentezi

Gibberellin biyosentezinin başlangıç maddesi Asetil-Coa' dır. Fungal gibberellik asit; mevalonik asit yol izinde temel izoprenoid birimi olan izopentenil difosfat üzerinden sentezlenmektedir. GA biyosentezinde genel terpenoid yol izi, farnasil difosfatın dallanması aşamasıyla başlar (Şekil 1.2). Sonraki ara ürün, geranilgeranil difosfatın (GGDP) iki farklı GGDP sentetaz olan GGS1 ve GGS2 ile katalizlenmesi sonucu oluşur. GGDP özellikle GA yol izi spesifik GGDP sentatazı, GGS2 tarafından sentezlenir. Ancak çoğu bitkide temel izoprenoid birimi IPP sadece MVA yol izi ile elde edilmez, aynı zamanda piruvat ve gliseraldehid 3-fosfat ile başlayan metil erythritol fosfat (MEP) yol izi ile de elde edilebilmektedir. Yüksek bitkiler ve *G. fujikuroi* de GGDP yol izinin ilk basamakları GA₁₂-aldehitin oluşumuna kadar aynıdır. GGDP nin ilk ara ürünü olan ent-kaurene, ent-copalil aracılığıyla iki adımlı siklizasyonda sentezlenir, ayrıca ent-kaurenoic asite sıralı oksidasyonla dönüştürülür ve bunu ent-7a-hidroksikaurenoik asitin 7b-hidroksilasyonu takip eder (Şekil 1.2) (Bömke ve Tudzynski, 2009).

Tohum ve tomurcuk dormansisinin ortadan kaldırılmasını teşvik eder, çiçeklenmeyi uyarır, erkek çiçek oluşumunu teşvik eder, gövde ve yaprak uzamasını teşvik eder, partenokarpik meyva oluşumunu teşvik eder, tuberculizasyonun engellenmesini teşvik eder, absisyonu teşvik eder, kambiyal aktiviteyi artırır ve RNA ve protein sentezini hızlandırır (Topçuoğlu ve Ünyayar, 1995).

1.1.1.3. Gibberellinlerin Ticari Kullanımı

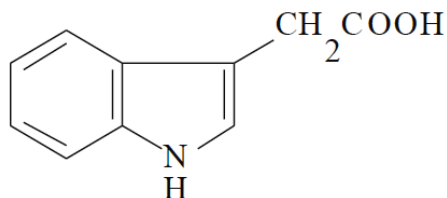
BGD içerisinde en fazla kullanılan ve ticari üretimi en fazla olan gibberellinlerdir. Gibberellinler içinde ticari-tarımsal açıdan kullanılanlar ise, GA₃, GA₄ ve GA₇'dir. Birçok kültürde çeşitli amaçlarla kullanılan gibberellinlerin rutin kullanım alanlarından bazıları; üzümde salkım gelişmesini ve tane iriliğini artırmak, limonda meyve olgunluğunu geciktirmek, marulda tohum hasadı için çiçeklenmeyi teşvik etmek, patatesten uyku dönemini kıırarak çiçeklenmeyi teşvik etmek, çeşitli süs bitkilerinde çiçek verimini ve kalitesini artırmak, portakalda kabuk lekesini ve yaşlanmasını önlemek, kerevizde gelişmeyi teşvik etmek, fasulye, bezelye, pamuk, çeltik, soya ve buğdayda çabuk çimlenmeyi teşvik etmek, ıspanak verimini artırmak ve kaliteyi yükseltmek biçiminde sıralanabilir (Gökdere, 2009).

Gibberellik asitin tarımsal alanda kullanımının yanı sıra bira endüstrisinde de α -amilaz enzimini uyararak malt oluşumunu hızlandırdığı da bildirilmiştir (Gökdere, 2009).

1.1.2. Oksinler

Yapılan fizyolojik çalışmalar sonucu, embriyogenezden senesense kadar bitki gelişim evrelerinin düzenlenmesinden oksinlerin sorumlu olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar indol asetik asit (IAA)' in doğal olarak oluşan tek oksin olduğunu belirtmişlerdir (Şekil 1.3). IAA dışında en yaygın bulunan oksinler; indol bütirik asit (IBA), naftalin asetik asit (NAA), naftoksi asetik asit (NOAA), fenoksi asetik asit (FOAA), 2,4-difenoksiasetik asit, fenil asetik asit (FAA), parakloro fenoksi asetik asit

(4-CPA) ve 2,4,5-triklorofenoksi asetik asit (2,4,5-T)' lerdir (Koşgan ve Ulusoy, 2009). IAA' nın kapalı formülü $C_{10}H_9NO_2$ olup molekül ağırlığı 175.2 gramdır.

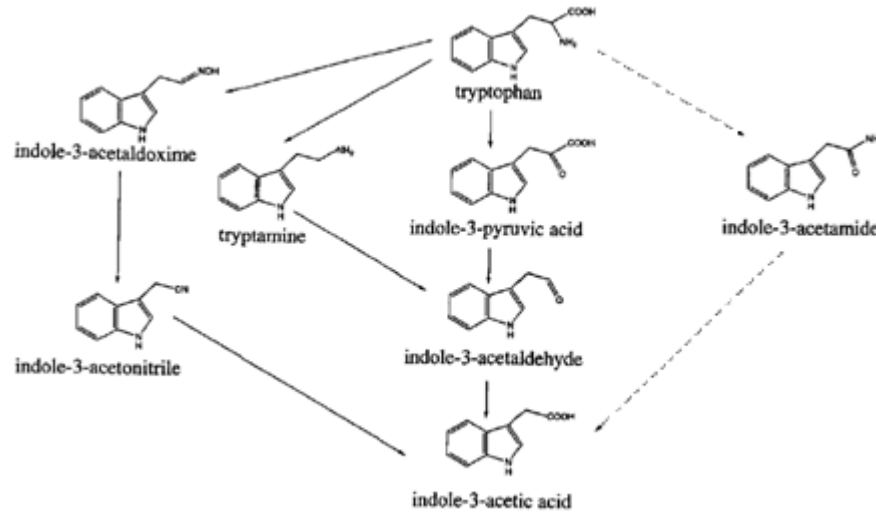


Şekil 1.3. Indol Asetik Asit' in yapısı (Kelen vd., 2004)

Oksinler üzerine yapılan araştırmalarda kristal haldeki oksin ilk olarak Kögl et al. (1934) tarafından insan idrarından izole edilmiş ve daha sonra 1935 yılında Thimann tarafından *Rhizopus suinus* kültürlerinden elde edilmiştir. Bu madde IAA şeklinde kısaltılan indol-3-asetik asit olarak adlandırılmıştır. Bugün sadece yüksek bitkilerin değil fungus ve bakterilerinde oksin ürettikleri bilinmektedir (Topçuoğlu ve Ünyayar, 1995).

1.1.2.1. Indol Asetik Asit Biyosentezi

IAA' nın içsel bir oksin olduğunun saptanmasından sonra, bir aminoasit olan triptofan' dan sentezlendiği kesinlik kazanmıştır (Şekil 1.4). IAA' nın, 4 esas yolla sentezlendiğine ek olarak, bakterilerle infekte olmuş bitkilerde indol-3-asetamid yoluyla da sentezlendiği belirtilmiştir (Normanly et al., 1995).



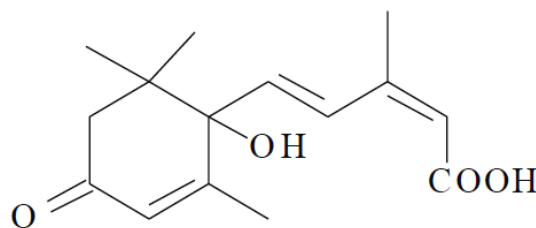
Şekil 1.4. Triptofandan IAA' nın biyosentezinde izlenen yollar. Mikroorganizmalar tarafından kullanılan yol kesikli oklarla gösterilen yoldur (Normanly et al., 1995).

1.1.2.2. IAA'nın Fizyolojik Etkileri

Oksinler çok çeşitli fizyolojik etkilere sahiptir. Bu etkileri, konsantrasyona, çevresel faktörlere, bitkilerin tür ve yaşlarına göre değişmektedir (Topçuoğlu ve Ünyayar, 1995). Indol asetik asit; hücrelerin uzunluğuna büyümesini artırır, hücre bölünmesinde mitozda düzenleyici rolü vardır, DNA, RNA ve protein sentezini artırır, enzim sentezi ve aktivitesini artırır, kökün yaşına ve türüne bağlı olarak genellikle düşük konsantrasyonlarda adventif kök ve esas kök oluşumunu arttırmaktadır, tomurcuk inhibisyonu ve apikal dominans üzerinde etkilidir, çiçeklenmeyi arttırmakta ve dişi çiçek oluşumunu teşvik etmektedir, tohum çimlenmesini teşvik etmektedir, kambiyal aktiviteyi ve odun borusunun oluşumunu arttırmaktadır, yaprak ve meyva dökümü üzerinde etkilidir ve partenokarpik meyva oluşumuna neden olmaktadır.

1.1.3. Absisik Asit

Sesquiterpen yapısındaki bir madde olan absisik asit (ABA) (Şekil 1.5); oksin, gibberellin, sitokinin gibi büyümeyi hızlandırıcıların doğal antagonistidir ve dorminler olarak adlandırılan grupta yer almaktadır. ABA' nın doğal olarak oluşan formu (S)-(+)-absisik asittir. ABA' nın cis ve trans olmak üzere iki geometrik izomeri olmasının yanında asimetrik karbon atomu nedeni ile L ve D optik izomerizasyonda göstermektedir (Özcan, 1997). ABA' nın kapalı formülü $C_{15}H_{20}O_4$ molekül ağırlığı ise 264 gramdır (Şekil 4.5).



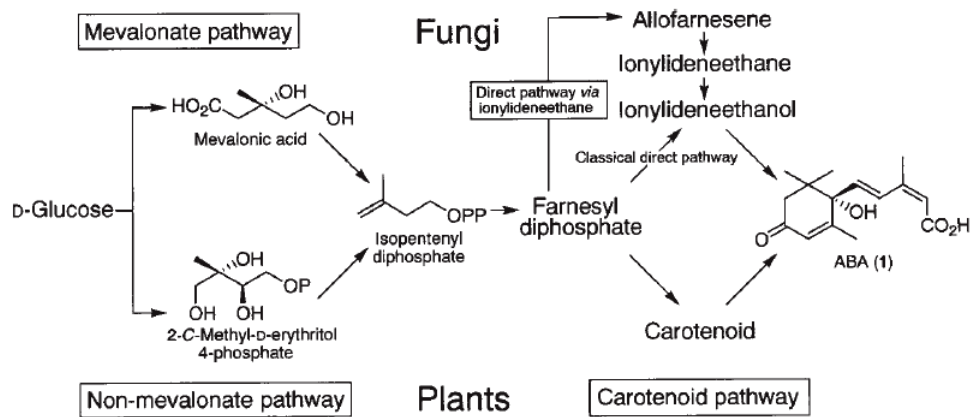
Şekil 1.5. ABA' nın yapısı (Kelen vd., 2004)

ABA izolasyonu ve karakterizasyonuna dair ilk raporlar Okhuma et al. (1963) ile Cornforth et al. (1965, 1966) tarafından ortaya konulmuştur (Loveys ve van Dijk, 1988).

1.1.3.1. ABA Biyosentezi

ABA' nın biyosentezi bitkilere ek olarak funguslarda da gerçekleşmesine karşın izopentenil difosfatın (IDP) biyosentezinin kökeni fungus ve bitkilerde farklıdır. ABA biyosentezinde IDP funguslarda mevalonat yol izinden ayrılırken bitkilerde mevalonatsız yol izinden ayrılır. Bitkisel ABA biyosentezi, ABA biyosentez yol izinde IDP den sonra karotenoid yol izinde 9Z-ksantofilinden ayrılması şeklinde

aydınlatılmıştır. ABA biyosentezi funguslarda, yüksek bitkilerin aksine IDP den sonra direk ve karotenoid yol izi olmak üzere iki şekildedir. Direk metabolik yol izi farnasil difosfatın (FDP) siklizasyonundan sonra ionylidene ethanolün oksidasyonu ile gerçekleşmektedir. Karotenoid metabolik yol izi ise bitkisel ABA sentezi ile benzerdir (Şekil 1.6; Inomata et al., 2004).



Şekil 1.6. ABA' nın biyosentetik yol izi şeması (Inomata et al., 2004)

1.1.3.2. ABA'nın Fizyolojik Etkileri

Dorminler grubunda yer alan ABA' nın bitki büyüme ve gelişmesindeki fizyolojik etkileri konsantrasyonlarına, çevresel faktörlere bitki türlerine ve bitkinin yaşına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Özcan, 1997). Absisik asit; tomurcuk ve tohum dormansisinin ortaya çıkmasında etkilidir, tepe hakimiyetinde çiçeklenme inhibitörü olarak rol oynamaktadır, klorofil kaybını ve yıkımını artırarak senesense neden olmaktadır, embriyo gelişimini ve büyümesini tohumda normal olgunlaşma ve çimlenmeyi engellemektedir ve RNA sentezini, çeşitli enzim sistemlerinin sentezini ve aktivitesini engellemektedir.

1.1.4. Mikroorganizmalar ile BGD Üretimi

Tarım ve dolayısıyla insanlık için BGD'nin her geçen gün daha da önemli hale gelmesi daha fazla elde edilebileceği çalışmaların gerçekleştirilmesini zorunlu hale getirmektedir. BGD'nin yüksek organizasyonlu bitkiler, funguslar, bakteriler, yosunlar ve likenler tarafından üretildiği bilinmektedir (Ünyayar, 2000).

1.1.4.1. Üretici Organizmalar

BGD nin endüstriyel çapta üretimde ekonomik, pratik ve hızlı olması nedeniyle mikroorganizmalar tercih edilmektedir (Çizelge 1.1.; Halloran, 2004). Bu düzenleyicilerden kullanımı en yaygın olan GA₃'ün ticari üretimi *Gibberella fujikuroi*'nin derin kültür fermantasyonu ile gerçekleştirilmektedir (Durán-Páramo et al., 2004).

Çizelge 1.1. Mikrobiyal yolla bitki gelişim düzenleyicileri üretiminde üzerinde çalışılan mikroorganizmalar (Özcan ve Topçuoğlu, 2001 ve Bilkay vd., 2010' dan modifiye)

GA	IAA	ABA
<i>Azospirillum brasilense</i> ²	<i>Acetobacter diazotrophicus</i> ²	<i>Botrytis cinerea</i> ¹
<i>Pseudomonas</i> sp. ²	<i>Azospirillum</i> sp. ²	<i>Ceratocystis coerulescens</i> ¹
<i>Rhizobium phaseoli</i> ²	<i>Bacillus</i> sp. ²	<i>Cercospora cruenta</i> ¹
<i>Aspergillus fumigates</i> ⁴	<i>Bacillus subtilis</i> CM5 ⁸	<i>Cercospora pini-densiflorae</i>
<i>Aspergillus niger</i> ^{1,2}	<i>Erwinia</i> sp. ²	<i>Cercospora rosicola</i> ¹
<i>Aspergillus ochraceus</i> ¹	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	<i>Penicillium italicum</i> ¹
<i>Fusarium oxysporum</i> ³	<i>Pseudomonas</i> sp. ²	<i>Funalia trogii</i> ¹⁰
<i>Fusarium pallidoroseum</i> ³	<i>Rhizobium</i> sp. ²	<i>Laetiporus sulphureus</i> ¹
<i>Fusarium semitectum</i> ⁵	<i>Aspergillus niger</i> ²	<i>Lentinus tigrinus</i> ¹
<i>Fusarium solani</i> ³	<i>Gibberella fujikuroi</i> ⁹	<i>P. chrysosporium</i> ME446 ¹
<i>Gibberella fujikuroi</i> ^{1,2}	<i>Rhizopus</i> sp. ²	<i>Pleurotus florida</i> ¹
<i>Penicillium funiculosum</i> ¹	<i>P. chrysosporium</i> ME446 ⁷	<i>Pleurotus ostreatus</i> ¹
<i>Phaeosphaeria</i> sp. ²		<i>Polyporus versicolor</i> ¹
<i>Sphaceloma bidentis</i> ¹		<i>Schizophyllum commune</i> ¹

Çizelge 1.1. Mikrobiyal yolla bitki gelişim düzenleyicileri üretiminde üzerinde çalışılan mikroorganizmalar (Devam)

<i>Sphaceloma manihoticola</i> ²		
<i>Sphaceloma menthae</i> ¹		
<i>Sphaceloma perseae</i> ¹		
<i>Sphaceloma rhois</i> ¹		
<i>Sphaceloma sp.</i> ²		
<i>Neurospora crassa</i> ^{1,2}		
<i>Agaricus bisporus</i> ¹		
<i>Laetiporus sulphureus</i> ¹		
<i>Lentinus subnudus</i> ⁶		
<i>Lentinus tigrinus</i> ¹		
<i>P. chrysosporium</i> ME446 ¹		
<i>Schizophyllum commune</i> ⁶		
<i>1 Özcan ve Topçuoğlu, 2001; 2 Bilkay ve ark., 2010; 3 Avinash ve ark., 2003; 4 Hamayun ve ark., 2009; 5 Bhalla ve ark., 2010; 6 Dobrev ve ark., 2005; 7 Ünyayar ve ark., 2000; 8 Swain ve Ray, 2008; 9 Çetin, 2004; 10 Yürekli ve ark., 2004</i>		

Çizelge 1.1. de belirtilen organizmaların dışında Battal vd., 2004 kurutulmuş makrofungus örneklerindeki GA₃, IAA, ABA ve zeatin miktarlarını belirlemek üzere *Macrolepiota procera*, *Russula delica*, *Agaricus macrosporus*, *Agaricus campestris*, *Agaricus essettei*, *Lactarius delicious*, *Pleurotus osteratus*, *Lycoperdon perlatum*, *Volvariella speciosa*, *Pholiota cerifera*, *Russula badia*, *Inocybe fastigiota*, *Amanita muscaria* ve *Coprinus atramentarius* türleri üzerinde BGD miktarı tayini yapmışlardır.

1.1.4.2. Üretim Optimizasyonu

Mikrobiyal yolla üretilen metabolitlerin üretim verimini artırmak ve maliyeti düşürmek amacıyla sıcaklık, pH, nem, karbon (C) ve azot (N) kaynağı tipi, C:N oranı, immobilizasyon, fermentasyon ve fermentör tipi gibi kültürel parametrelerin optimizasyonu ve atıkların BGD üretiminde substrat olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi gibi konular araştırılmaktadır.

Mikrobiyal yolla ürün elde edilmesinde mikroorganizmanın gelişebilmesi ve istenilen ürünü maksimum verimlilikte üretebilmesi için bazı kültürel parametrelerin optimize edilmesi gerekmektedir. Bitki gelişim düzenleyicileri üretiminde inkübasyon süresi, sıcaklık, pH, çalkalama, nem ve ışık gibi kültürel parametrelerin etkisi üzerine çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Bilkay vd., (2010) *Aspergillus niger*' den IAA üretiminde, 25 °C, pH 6 ve 6 gün inkübasyon süresi koşullarının, GA üretiminde ise 30 °C, pH 5 ve 12 gün inkübasyon süresinin optimum koşullar olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Karakoç ve Aksöz, (2005), *Aspergillus niger* ile GA üretiminde Bilkay vd., (2010)'na ek olarak çalkalamanın GA üretimini artırdığını bildirmişlerdir. Machado et al., (2002) ise *Gibberella fujikuroi* ile GA üretiminde 5,3 pH, %75 nem ve 29°C sıcaklık olarak belirledikleri optimum koşullar ile GA üretimini 13 kat arttırdıklarını bildirmişlerdir. Swain ve Ray, (2008) ise *Bacillus subtilis* ile IAA üretiminde 6 gün inkübasyon süresi, pH: 7 ve %70 nem ile 23,5 µg/gram substrat oranında IAA üretmişlerdir. Karakoç ve Aksöz, (2006) *Pseudomonas* sp. ile nutrient broth besiyerinde, 30 °C inkübasyon sıcaklığı, pH: 7, karanlık ve çalkalamalı inkübasyon koşullarında 72 saat inkübasyon ile 285,06 mg/L oranında GA üretimi rapor etmişlerdir.

Mikrobiyal yolla ürün elde edilmesinde karbon ve azot kaynağı tipi, substratın kullanılabilirliğinin ve kullanım hızının önemli olması nedeniyle önemli bir optimizasyon parametresidir. Bu kapsamda karbon ve azot kaynağının optimizasyonu üzerine yapılan çalışmalarda; Karakoç ve Aksöz, (2005), *Aspergillus niger* ile GA üretiminde en iyi karbon kaynağını sukroz ve en iyi azot kaynağını NaNO₃ olarak belirlemişlerdir. Darken et al., (1959) *Fusarium moniliforme* ile yaptıkları GA üretimi çalışmasında karbon kaynağı olarak nişasta, gliserol, glikoz ve laktozun çeşitli oranlarda karışımlarını kullanmış ve en iyi sonucun litrede 20 g gliserol, 10 g glikoz, 20 g laktoz kullanımıyla elde edildiğini belirlemişlerdir. Shukla et al., (2005) *Gibberella fujikuroi* ile yaptıkları GA üretimi çalışmasında azot kaynağı olarak kullandıkları inorganik azot (NH₄NO₃), sentetik organik azot (glisin), kompleks organik azot (mısır şurubu), organik ve inorganik azot karışımı (glisin / NH₄Cl) içerisinde en iyi azot kaynağı olarak inorganik azotu (NH₄NO₃) belirlemişlerdir. Lale ve Gadre, (2010)

Gibberella fujikuroi ile GA₄ üretiminde karbon kaynağı olarak glikozu, azot kaynağı olarak ise fıstık ununun üretimi en çok artırdığını bildirmişlerdir. Machado et al., (2002) ise *Gibberella fujikuroi* ile GA üretiminde mineral tuz solüsyonu optimizasyonu için KH₂PO₄, K₂SO₄, MgSO₄, ZnSO₄, CuSO₄, FeSO₄, (NH₄)₂SO₄ denemiş ve 0,03% FeSO₄ ve %0,01 (NH₄)₂SO₄ ile GA₃ üretiminin 1,7 kat arttırıldığını bildirmişlerdir.

Mikrobiyal yolla ürün elde edilmesinde istenilen ürünün primer ya da sekonder metabolit olmasına bağlı olarak sentezin gerçekleştiği yaşam fazının istenilen sürede tutulmasında C:N oranı en belirleyici parametredir. Bu nedenle BGD üretiminde de C:N oranını belirlemek için bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda ise Karakoç ve Aksöz, (2005) *Aspergillus niger* ile GA üretiminde optimum karbon kaynağı azot kaynağı oranının 100:10 olduğunu bildirmişlerdir. *Gibberella fujikuroi* ile GA üretiminde optimum karbon kaynağı azot kaynağı oranı araştırmacılar tarafından Rios-Irribé et al., (2011) C (glikoz):N (mısır yağı) 1:2, Kim et al., (2006) C (glikoz):N (Pamuk tohumu unu) 60:6, Machado et al., (2002) C (kahve kabuğu):N (cassava küspesi) 7:3, Escamilla-Silva et al., (2000) C (glikoz):N (NH₄Cl) 36,8, Shukla et al., (2005) 119,5 olarak bildirilmiştir. Karakoç ve Aksöz, (2006), *Pseudomonas* sp. ile GA üretiminde optimum karbon kaynağı azot kaynağı oranını 100:17 olarak bildirmişlerdir.

Mikrobiyal yolla ürün elde edilmesinde üretimin endüstriyel çapta ve yüksek verimlilikle gerçekleştirilebilmesi için uygun fermentasyon ve fermentör tipinin belirlenmesi önemli bir parametredir. Bu kapsamda BGD üretiminde fermentör ve fermentasyon tipleri üzerine yapılan çalışmalarda; Tomasini et al., (1997) *Gibberella fujikuroi* ile GA üretiminde derin kültür fermentasyonu (120 saatlik inkübasyon ile 23 mg /ml gibberellin) ile katı faz fermentasyonunu karşılaştırmışlardır (kuru besiyeri ağırlığına oranla 250 mg/kg gibberellin). Machado et al., (2002) *Gibberella fujikuroi* ile GA üretiminde katı faz fermentasyonu ile derin kültür fermentasyonunu karşılaştırmışlar ve katı faz fermentasyonu ile 6,1 kat daha yüksek GA₃ verimi elde etmişlerdir. Durán-Páramo et al., (2004) *Gibberella fujikuroi* ile GA üretiminde erlenlerde derin kültür fermentasyonu ile ve ayrıca karıştırmalı ve sabit yatak reaktörlerde serbest ve immobilize hücreleri karşılaştırmışlar ve serbest hücrelerde karıştırmalı reaktörde 0,206 g/L ve gram biyomass başına 0,078 g GA₃ elde edilmiştir.

Machado et al., (2004) *Gibberella fujikuroi* ile GA üretiminde kahve kabuğu ve cassava küspesinin substrat olarak kullanıldığı sıkıştırılmış yatak biyoreaktörde katı faz fermentasyonu ile fermentasyonun 6. gününde kg substrat başına 0,925 g GA₃ elde ettiklerini bildirmişlerdir. Silva et al., (1999) biyoreaktörde *Gibberella fujikuroi* ile 1100 mg/L GA ürettiklerini bildirmişlerdir. Escamilla-Silva et al., (2000) *Gibberella fujikuroi* ile GA üretiminin kesikli kültür ile akışkan yatak tipi biyoreaktörde 3,90 g/L ye ulaşabildiğini ve bu değerlerin daha önceki derin kültür ve katı fermentasyon değerlerinden 3 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmalara ek olarak *Gibberella fujikuroi* ile GA üretiminde Kim et al., (2006) karıştırmalı tank tipi biyoreaktör ve Rios-Iribe et al., (2011) sürekli karıştırmalı tank tipi biyoreaktörü kullanmışlardır.

Çalışmalarda atıkların değerlendirilmesi, çevreyi kirletici etkilerinin önlenmesi ve üretim maliyetinin düşürülmesi gibi nedenlerle bazı atıklar da BGD üretimi için alternatif hammadde kaynağı olarak denenmiştir. Bu kapsamda; Karakoç ve Aksöz, (2005) melas, peyniraltı suyu, zeytinyağı karasuları ve çeşitli meyve suları gibi atıkların arasından melasın ve zeytinyağı karasuyunun GA üretimi için kullanılabilir olduğunu belirtmişlerdir. Cihangir ve Aksöz, (1997) alternatif hammadde kaynağı olarak melas, şilempe, peynir altı suyu, şeker pancarı atıkları ve meyve prinasını kullanmışlardır. Rodrigues et al., (2009) cassava küspesi, kahve kabuğu, şeker kamışı küspesi, limon posası, soya kepeği ve soya kabuğu arasından limon posasının GA sentezi için daha kullanılabilir olduğunu bildirmişlerdir. Tomasini et al., (1997) cassava unu ve şeker kamışı küspesi arasından cassava ununun daha yüksek üretim sağladığını bildirmişlerdir. Ayrıca diğer araştırmacılar; Özcan ve Topçuoğlu, (2001) zeytinyağı fabrikası atığını, Machado et al. (2004 ve 2002) cassava küspesi ve kahve kabuğunu, Swain ve Ray (2008) manyok lifi kalıntısını, Rios-Iribe et al.(2011) mısır yağını, Kim et al. (2006) pamuk tohumu ununu, Escamilla-Silva et al. (2000) pirinç ununu ve Hamayun et al. (2009) soya fasulyesini alternatif substrat olarak kullanmışlardır.

Konunun önemi gereği günümüze dek dünyanın çeşitli ülkelerinde yüksek üretim kapasiteli küfler, bakteriler ve çok az miktarda da makrofunguslar üzerine araştırmalar gerçekleştirilmiş olup bazı potent mikroorganizmalar belirlenmiştir.

Özellikle beyaz çürükçül makrofunguslar tarafından, bitkide yayılımlarını kolaylaştırmak amacı ile BGD ürettiklerine ilişkin veriler vardır.

Ancak günümüze dek gerçekleştirilen BGD üretim denemeleri genellikle sınırlı sayıda ve aynı türler ile gerçekleştirilmiştir. BGD üretiminde en güçlü aday olarak görünen beyaz çürükçül makrofunguslar üzerinde kapsamlı bir tarama ve optimizasyon çalışması göze çarpmamaktadır.

Bu çalışmada, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fungikültür Laboratuvarı Basidiomycetes kültür koleksiyonunda stoklanan yerel ve standart makrofungus suşları tarafından gibberellik asit (GA), absisik asit (ABA) ve indol asetik asit (IAA) üretiminin taranması, istatistiksel optimizasyonu, reaktör çapında üretimi ve kinetik modellenmesi konu alınmıştır.

2. MATERYAL ve METODLAR

2.1. Materyal

2.1.1. Makrofungus İzolatları

Çalışmanın materyalini Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde oluşturulan “Basidiomycetes Kültür Koleksiyonu” (OBCC) bünyesinde dikaryotik misel formunda stoklanan çeşitli beyaz çürükçül ve saprofit makrofungus kültürleri oluşturmaktadır. BGD üretim potansiyeli yüksek olan izolatları belirlemek amacıyla çeşitli ekofizyolojik grupları temsil edecek biçimde seçilen makrofungus suşları Çizelge 2.1’ de sunulmuştur. Stok kültürlerin devamlılığı Potato Dekstroz Agar (PDA) ortamında + 4 °C’ de saklanarak sağlanmıştır.

Çizelge 2.1. Tarama çalışmasında kullanılan makrofunguslar

OBCC Kodu	Makrofungus adı	OBCC Kodu	Makrofungus adı
1002	<i>Leucoagaricus pudicus</i>	28	<i>Macrolepiota procera</i>
1004	<i>Ganoderma carnosum</i>	34	<i>Polyporus arcularius</i>
1005	<i>Suillus collitinus</i>	35	<i>Hypholoma fasciculare</i>
1008	<i>Antrodia serialis</i>	36	Tanımlanmamış izolat
1009	<i>Pleurotus eryngii</i>	37	Tanımlanmamış izolat
1010	<i>Ganoderma applanatum</i>	5001	<i>Ganoderma carnosum</i>
1014	<i>Coprinus comatus</i>	5004	<i>Lentinus strigosus</i>
1015	<i>Pleurotus ostreatus</i>	5005	<i>Cerrena unicolor</i>
1022	<i>Pleurotus ostreatus</i>	5006	<i>Trametes pubescens</i>
1023	<i>Schizophyllum commune</i>	5008	<i>Ganoderma lucidum</i>
1026	<i>Inonotus hispidus</i>	5009	<i>Inonotus hispidus</i>
1030	<i>Fomes fomentarius</i>	5010	<i>Schizophyllum commune</i>
1031	<i>Pleurotus ostreatus</i>	5011	Tanımlanmamış izolat
1032	Tanımlanmamış izolat	5014	<i>Trametes hirsuta</i>
1033	Tanımlanmamış izolat	5015	<i>Paxillus involutus</i>
1034	<i>Pleurotus ostreatus</i>	5016	Tanımlanmamış izolat
1035	<i>Fistulina hepatica</i>	5020	<i>Stereum hirsutum</i>
1038	Tanımlanmamış izolat	5023	<i>Trametes versicolor</i>
1039	<i>Leucoagaricus pudicus</i>	5024	<i>Hygrocybe pratensis</i>
1040	<i>Laetiporus sulphureus</i>	5028	Tanımlanmamış izolat
1041	<i>Agaricus campestris</i>	5029	Tanımlanmamış izolat
1043	Tanımlanmamış izolat	5056	<i>Suillus sp.</i>
1045	<i>Inonotus hispidus</i>	2503	<i>Omphalotus illudens</i>
1046	Tanımlanmamış izolat	2514	Tanımlanmamış izolat
1047	Tanımlanmamış izolat	2515	<i>Daedalea quercina</i>
1049	Tanımlanmamış izolat	3501	<i>Polyporus arcularius</i>
1050	Tanımlanmamış izolat	3002	<i>Tapinella panuoides</i>
1067	Tanımlanmamış izolat	3007	<i>Lentinus tigrinus</i>
1068	Tanımlanmamış izolat	2001	<i>Lenzites betulina</i>

Çizelge 2.1. Tarama çalışmasında kullanılan makrofunguslar (Devam)

1069	Tanımlanmamış izolat	2002	<i>Omphalatus olearius</i>
1070	Tanımlanmamış izolat	Ag 461	<i>Pleurotus calypratus</i> ^b
1074	Tanımlanmamış izolat	Ag 463	<i>Pleurotus cornucopiae</i> ^b
1075	Tanımlanmamış izolat	Ag 468	<i>Pleurotus dryinus</i> ^b
1983	Tanımlanmamış izolat	Ag 470	<i>Pleurotus dryinus</i> ^b
1084	Tanımlanmamış izolat	Ag 471	<i>Pleurotus eryngii</i> ^b
1988	Tanımlanmamış izolat	Ag 472	<i>Pleurotus ostreatus</i> ^b
1089	Tanımlanmamış izolat	Ag 475	<i>Pleurotus ostreatus</i> ^b
1092	Tanımlanmamış izolat	Ag 476	<i>Pleurotus ostreatus</i> ^b
1093	Tanımlanmamış izolat	Ag 477	<i>Pleurotus ostreatus cv. florida</i> ^b
1100	Tanımlanmamış izolat	Ag 479	<i>Pleurotus pulmonarius</i> ^b
1102	Tanımlanmamış izolat	Hakkari	<i>Pleurotus eryngii</i> ^c
02	Tanımlanmamış izolat	Tunceli	<i>Pleurotus eryngii</i> ^c
03	<i>Ganoderma sp.</i>	Elazığ	<i>Pleurotus eryngii</i> ^c
04	<i>Suillus bovinus</i>	Diyarbakır	<i>Pleurotus ostreatus</i> ^c
05	<i>Tricholoma equestre</i>	Hacettepe	<i>Pleurotus eryngii</i> ^c
06	<i>Clavariadelphus truncatus</i>	Kavak	<i>Pleurotus ostreatus</i> ^d
08	<i>Lepista nuda</i>	HK35	<i>Pleurotus ostreatus</i> ^d
09	<i>Polyporus arcularius</i>	Hafız	<i>Pleurotus ostreatus</i> ^d
11	<i>Trametes hirsuta</i>	(+) Kontrol	<i>Aspergillus niger</i>
18	<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	(+) Kontrol	<i>Gibberella fujikuroi</i>
23	<i>Pycnoporus cinnabarius</i>	(+) Kontrol	<i>Gibberella fujikuroi</i> H010W65 ^a
24	<i>Macrolepiota procera</i>	(+) Kontrol	<i>Gibberella fujikuroi</i> 011M1-A2 ^a
25	<i>Trametes versicolor</i>	(+) Kontrol	<i>Gibberella fujikuroi</i> 010Z2C ^a
26	Tanımlanmamış izolat	(+) Kontrol	<i>Gibberella fujikuroi</i> 010Z19B ^a
27	Tanımlanmamış izolat		

^a Prof.Dr. Berna Tunali' dan temin edilmiştir. ^b Dr. Varislav Homolka' dan temin edilmiştir.
^c Prof. Dr. Abdunnasır Yıldız' dan temin edilmiştir. ^d Prof. Dr. Aysun Pekşen' den temin edilmiştir.

2.1.2. Besiyerleri

Çalışma süresince kullanılan tüm besiyerleri, aksi belirtilmedikçe besiyeri içeriğinin distile suda çözülüp otoklavda 1,2 atm basınç ve 121 °C sıcaklıkta 15 dakika süre işlem görmesi ile steril edilerek kullanılmıştır.

Besiyeri 1: Patates Dekstroz Agar (PDA)

Ticari hazır besiyerinden (Merck) 39 g/l oranında tartılarak hazırlanmıştır. Makrofungus izolatlarının aktiflenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 2: Modifiye Czapek-Dox Medium

Sukroz	30,0	g
NaNO ₃	3,0	g
KH ₂ PO ₄	1,0	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	g
KCl	0,5	g
Trypton	5,0	g
Distile su	1000	ml

Makrofungus kültürlerinin GA, ABA ve IAA üretim potansiyelleri açısından taramaları, Bitki Gelişim Düzenleyicisi (BGD) üretimini arttıran kültür yönteminin belirlenmesi ve elde edilen optimize koşulların reaktör koşullarına uygulanması aşamalarında kullanılmıştır.

Besiyeri 3: Katı Faz Kültür Yöntemi Besi Ortamı

Beş gram kuru substrat (Şeker pancarı) 250 ml lik erlenlere aktarılarak üzerine 13 ml Czapek Dox medium ilave edilmiştir. Ortam homojen biçimde karıştırıldıktan sonra 121 °C de 45 dakika steril edilmiştir.

Bitki Gelişim Düzenleyicisi (BGD) üretimini arttıran kültür yönteminin belirlenmesi aşamasında kullanılmıştır.

2.1.3. Çözeltiler ve Diğer Kimyasal Maddeler

Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve kullanım alanları Çizelge 2.2' te belirtilmiştir.

Çözelti 1: GA Mobil Faz Çözeltisi

Kloroform, etil asetat ve asetik asit' in 40, 60 ve 5 (v:v:v) oranlarında karıştırılması amacı ile hazırlanmıştır. GA' in plaka üzerinde yürütülmesi amacıyla kullanılmıştır.

Çözelti 2: ABA Mobil Faz Çözeltisi

Etil asetat, kloroform ve asetik asit' in 15, 5 ve 1 (v:v:v) oranlarında karıştırılması amacı ile hazırlanmıştır. ABA' nın plaka üzerinde yürütülmesi amacıyla kullanılmıştır.

Çözelti 3: IAA Mobil Faz Çözeltisi

İzopropanol, amonyum hidroksit ve su' yun 10, 1 ve 1 (v:v:v) oranlarında karıştırılması amacı ile hazırlanmıştır. IAA'nın plaka üzerinde yürütülmesi amacıyla kullanılmıştır.

Çözelti 4: Etanol – Sülfürik Asit Çözeltisi

5 ml sülfürik asit, etanol ile 100 ml ye tamamlanarak hazırlanmıştır. GA beneklerinin görünür hale getirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

Çözelti 5: %10 Sülfürik Asit Çözeltisi

10 ml sülfürik asit, distile su ile 100 ml ye tamamlanarak hazırlanmıştır. ABA beneklerinin görünür hale getirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

Çözelti 6: Ehrich's Reaktifi Çözeltisi

10 g p-dimetil amino benzaldehit, %70 lik perklorik asit ile 100 ml ye tamamlanarak hazırlanmıştır. IAA beneklerinin görünür hale getirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

Çizelge 2.2. Kullanılan kimyasallar ve kullanım alanları

Kimyasal maddeler	Kullanım Amacı
Etil asetat HCl NaHCO ₃	BGD Ekstraksiyonu ve Tayini
GA3 (Sigma G-7645) ABA (Sigma A-1049) IAA (Sigma I-2886)	Standart
Etil asetat Asetik asit Kloroform İzopropanol Amonyum hidroksit Sülfürik asit Etanol p-dimethyl amino benzyaldehyde HClO ₄ Silica gel 60F 254 (Merck)	İTK ile Doğrulama
Fenol H ₂ SO ₄	FSA Yöntemi
Sodyumnitroprussid NaOH Hipoklorid	Berthelot Yöntemi

2.2. Metodlar

2.2.1. Makrofungus Kùltürlerinin GA, ABA ve IAA Üretim Potansiyelleri Açısından Taranmaları

Diğerlerinden daha yüksek miktarda GA, ABA ya da IAA üreten makrofungus suşlarının seçilmesi hedeflenen bu aşamada; suşların BGD üretim kapasiteleri Bilkay vd., (2010) tarafından önerilen yöntem ile spektrofotometrik olarak karşılaştırılmıştır.

2.2.1.1. Makrofungus İzolatlarının Aktiflenmesi

Makrofungus izolatlarının aktiflenmesi amacıyla, stok kültürde korunan izolatlar Potato Dekstoz Agar (PDA) besiyerlerinde 30 °C' de 7 gün büyütülerek aktif hale getirilmiştir.

2.2.1.2. Makrofungus İzolatlarından İnokülan Eldesi

Aktif olarak büyüyen fungal koloninin dış sınırlarında yer alan büyüme zonundan 6 mm çapında misel diskleri elde edilmiştir. Tarama çalışmasında kullanılan her erlen için inokülan olarak bahsedilen misel disklerinden 5 tanesi kullanılmıştır.

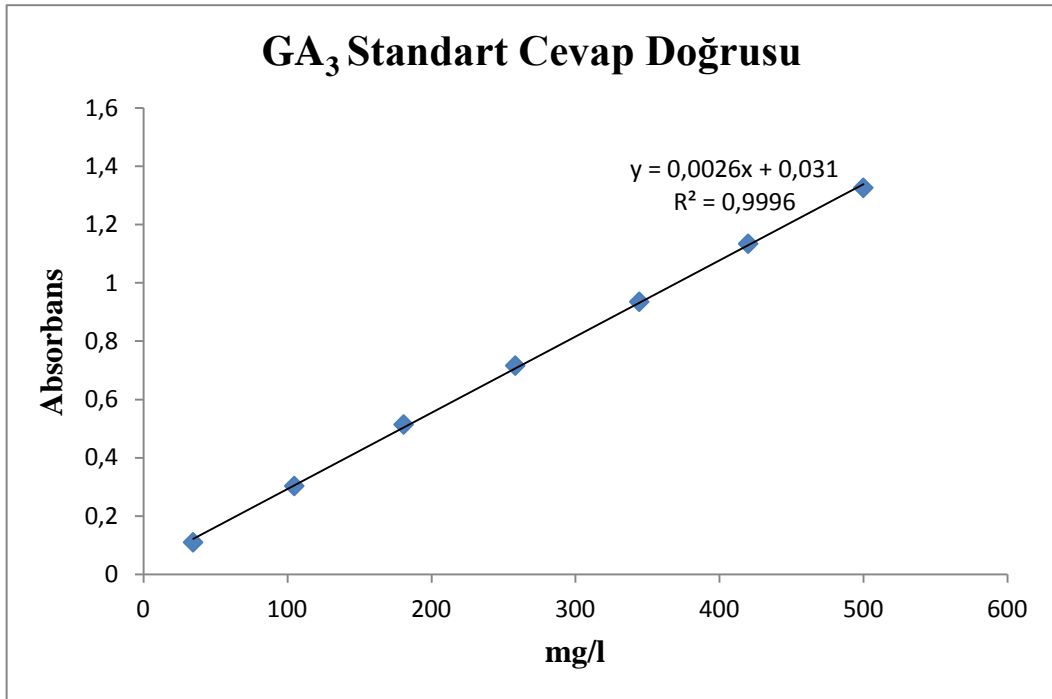
2.2.1.3. Makrofungus İzolatlarının BGD Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi

GA, ABA ve IAA üretiminin belirlenmesi için tarama ortamı olarak pH sı sterilizasyon öncesinde 5' e ayarlanmış olan Modifiye Czapek Dox Medium kullanılmıştır. İnokülasyon sonrasında makrofungus kültürleri 150 rpm de 30 °C de 10

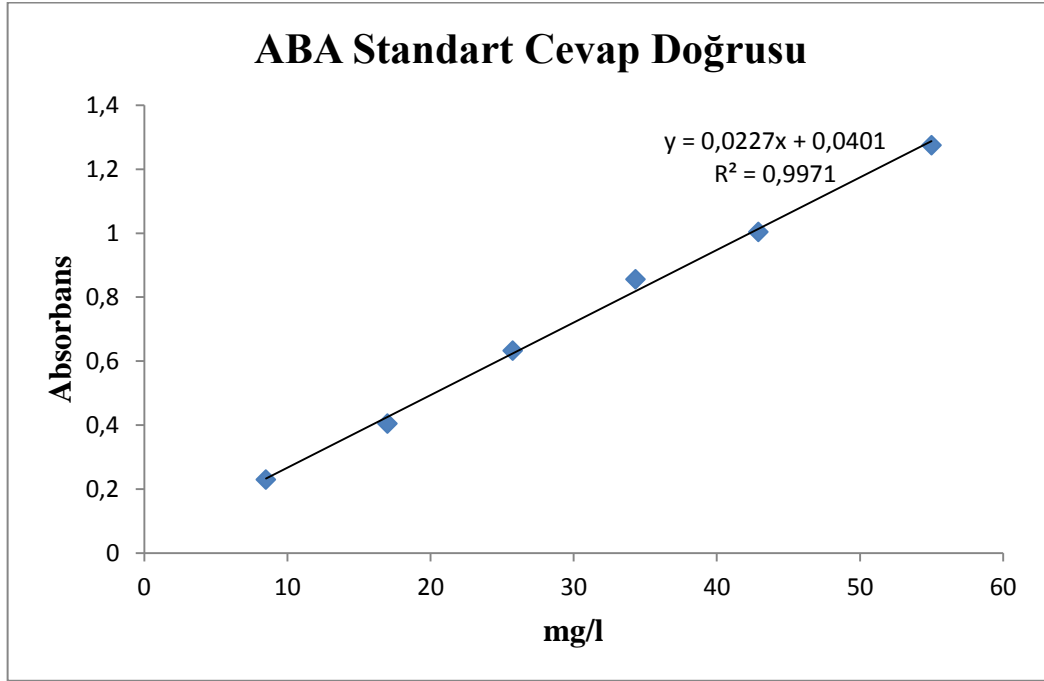
gün inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 10. gününde BGD üretiminin tayini için ekstraksiyon yapılarak üretim değerleri spektrofotometrik olarak karşılaştırılmıştır.

Kültürün hasatı ve BGD ekstraksiyonu için 10 günlük fungal kültür Whatman 1 filtre kağıdından geçirildikten sonra santrifüj edilerek kültür sıvısı elde edilmiştir. Süpernatantın pH sı 1N HCl kullanılarak 2,5 a ayarlandıktan sonra, etil asetat / NaHCO₃ (% 5) ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılmış ve ayırma hunisi ile etil asetat fazı alınmıştır. Bu işlem ardışık olarak 3 kez gerçekleştirilerek elde edilen etil asetat fazları ayrı bir kaptaki birleştirilmiştir.

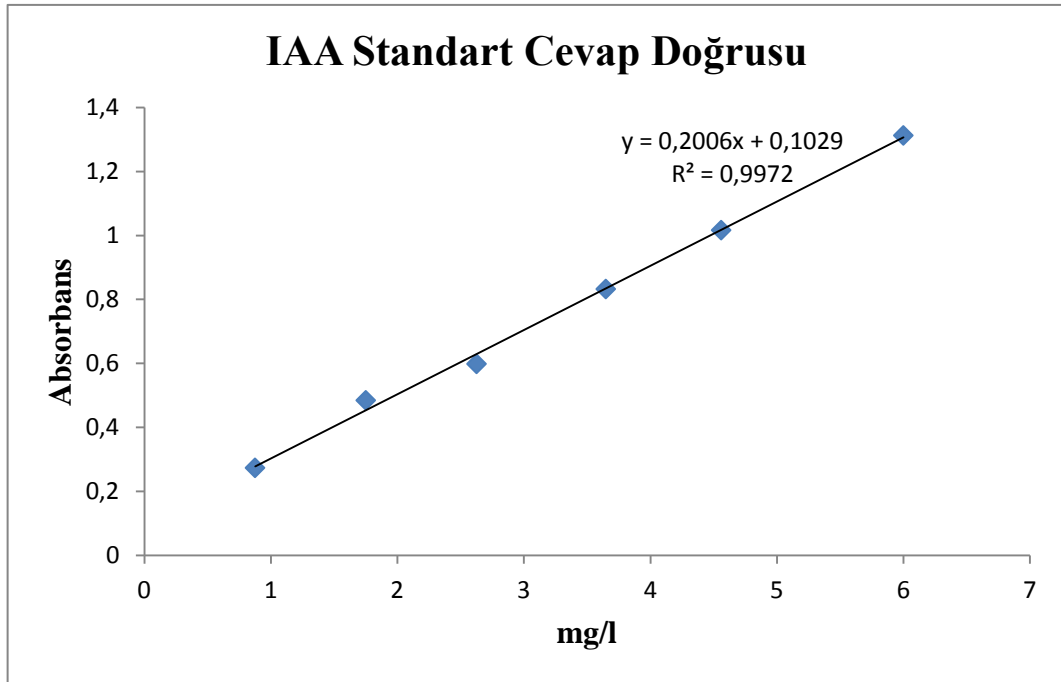
GA 254, ABA 263 ve IAA 280 nm de köre (etil asetat) karşı okunmuş, standart GA, ABA ve IAA (Sigma) ile oluşturulan standart cevap doğruları aracılığı ile makrofungus suşları tarafından üretilen BGD nin miktar tayini yapılmıştır (Özcan ve Topçuoğlu, 2001).



Şekil 2.1. Makrofungus suşları tarafından GA₃ üretiminin miktar tayini için kullanılan standart cevap doğrusu



Şekil 2.2. Makrofungus suşları tarafından ABA üretiminin miktar tayini için kullanılan standart cevap doğrusu



Şekil 2.3. Makrofungus suşları tarafından IAA üretiminin miktar tayini için kullanılan standart cevap doğrusu

2.2.1.4. Makrofungus İzolatının BGD Üretimini Doğrulanması

Seçilen makrofungus suşlarının GA, ABA ya da IAA üretimleri, ince tabaka kromatografisi (İTK) ile doğrulanmıştır. Bu amaçla hazır İTK tabakaları (Silikajel 60F 254) kullanılmıştır. GA, ABA ya da IAA içeren ekstrakt 0,5 ml etil asetat ile çözülerek 2 defa İTK tabakaları üzerine tatbik edilmiştir. Standartlar ise 10^{-2} M konsantrasyonda hazırlanarak kullanılmıştır .

GA için mobil faz olarak kloroform:etil asetat:asetik asit (40:60:5) kullanılmış, etanol:sülfirik asit (95:5) püskürtülerek benekler görünür hale getirilmiş ve UV (254 nm) de incelenerek RF değerleri belirlenmiştir (Machado et al., 2002).

IAA için mobil faz olarak izopropanol:amonyum hidroksit:su (10:1:1) kullanılmış, Ehrich's reaktifi püskürtülerek benekler görünür hale getirilmiş ve normal ışıkta oluşan pembe renk yardımıyla RF değerleri belirlenmiştir (Swain ve Ray, 2008).

ABA için ise mobil faz olarak etil asetat:kloroform:asetik asit (15:5:1) kullanılmış, %10 sülfirik asit püskürtülerek 130 °C de 10 dk aktive edilerek benekler görünür hale getirilmiş ve UV (254 nm) de incelenerek RF değerleri belirlenmiştir (Takayama et al.,1983).

2.2.2. Bitki Gelişim Düzenleyicisi (BGD) Üretimini Arttıran Kültür Yönteminin Belirlenmesi

Çalışmanın bu aşamasında, seçilen makrofungus suşunun BGD üretimi üç farklı kültür sisteminde büyümesi sırasında zamana bağlı olarak izlenmiştir. Seçilen makrofungus suşunun ürettiği BGD (GA, ABA ya da IAA) miktarının suşun büyütüldüğü kültür yöntemine bağlı olarak değişimi belirlenmiştir. Böylece seçilen makrofungus suşunun BGD üretimini en fazla destekleyen kültür yönteminin ve üretimin en yüksek seviyede gerçekleştiği inkübasyon süresinin belirlenmesi planlanmıştır.

2.2.2.1. İnokülant eldesi

İnokülant elde etmek için öncelikle aktif büyüyen makrofungus kolonisinden 6 mm çapında misel diskleri elde edilmiştir. Bu diskler Modifiye Czapek-Dox Medium ortamında 100 rpm de 30 °C de 4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda besiyeri dökülüp, fungus pelletler 2 kez steril distile su ile yıkanarak dökülen besiyeri miktarı kadar steril distile su eklenmiştir. Heidolph marka homojenizatör kullanılarak homojenize edilmesi ile inokülant hazırlanmıştır (Kızılcık vd., 2010). Farklı kültür yöntemleri için hazırlanan büyüme ortamları hazırlanan inokülant ile % 4 oranında inoküle edilmiştir.

2.2.2.2. Derin Kültür Yöntemi ile BGD Üretiminin İzlenmesi

Bu yöntemde, seçilen makrofungus suşu 100 ml Modifiye Czapek Dox Medium içeren 250 ml' lik erlenlerde, çalkamalı etüvde, derin kültür olarak inkübasyona bırakılmıştır. Erlenler 30 °C de ve 150 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilen toplam 24 günlük inkübasyon süresince her 3 günde bir hasat edilerek büyüme parametreleri açısından değerlendirilmiştir.

2.2.2.3. Statik Kültür Yöntemi ile BGD Üretiminin İzlenmesi

Bu yöntemde derin kültür ile aynı besiyeri ve inkübasyon koşulları kullanılmış, fakat inkübasyon çalkamalı koşullar yerine durgun şekilde yapılmıştır. Erlenler sadece film oluşumunu engellemek için günde bir kez ve hafifçe çalkalanmıştır. Erlenlerin hasatı ve inceleme parametreleri derin kültür yönteminde belirtilen biçimde gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.4. Katı Faz Kültür Yöntemi ile BGD Üretiminin İzlenmesi

Bu yöntemde, 13 ml Czapek Dox medium ile nemlendirilmiş beş gram kuru substrat (Şeker pancarı) içeren her erlen 4 ml inokulant ile aşılanmıştır. Erlenler statik koşullarda % 70 nem ve 30 °C de gerçekleştirilen toplam 24 günlük inkübasyon süresinde her 3 günde bir hasat edilerek inceleme parametreleri açısından değerlendirilmiştir.

Erlenlerin hasatı için 100 ml steril distile su eklenerek 100 rpm de 2 saat çalkalandıktan sonra derin kültür yöntemi için izlenen ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır.

2.2.2.5. Analitik Yöntemler

Analitik yöntemler kapsamında; hasat edilen örnekler çeşitli zaman aralıklarında biyomas, BGD üretimi, karbon kaynağı miktarı, azot kaynağı miktarı, pH gibi inceleme parametreleri açısından değerlendirilmiştir.

Biyomas miktarı kuru ağırlık tayini ile belirlenmiştir. Üretilen BGD miktarı 1.2.1.3 başlığında ifade edildiği gibi spektrofotometrik olarak saptanmıştır. Ortamda kalan karbon kaynağı miktarı fenol sülfirik asit yöntemi ile (Dubois et al., 1956); azot kaynağı miktarı ise Berthelot yöntemi ile belirlenmiştir.

2.2.3. İstatistiksel Deney Tasarımı ile BGD Üretiminin Optimizasyonu

Seçilen makrofungus suşunun BGD üretimi için en uygun üretim koşullarının belirlenmesi amacı ile Plackett-Burman deney tasarımı (PB) modeli ile cevap yüzey yöntemi (Response Surface Method; RSM) deney tasarımları kullanılmıştır (Plackett ve Burman, 1946). Özet olarak Plackett–Burman deney tasarımı ile BGD üretimini arttıran koşullar (karbon kaynağı tipi, azot kaynağı tipi, mineral madde tipi vb.) seçilmiş, cevap yüzey yöntemi ile de bu değişkenlerin etkin konsantrasyonları belirlenmiştir.

2.2.3.1. Plackett-Burman Deney Tasarımı

Plackett – Burman deney tasarımı, makrofungus suşları tarafından BGD üretimi üzerine etkiye sahip olması olası besinsel ve çevresel değişkenler arasından üretimi en fazla arttıran değişken(ler)i seçmek amacı ile uygulanmıştır. Plackett – Burman deney tasarımı her değişkenin 2 farklı seviyesinin kullanıldığı bir deney tasarım desenidir. Bu amaçla seçilen suş tarafından BGD üretimi üzerine etkisi araştırılan değişkenler ve seviyeleri Çizelge 2.3. te sunulmuştur.

Çizelge 2.3. Plackett – Burman deney tasarımı ile seçilen suş tarafından BGD üretimi üzerine etkisi araştırılan değişkenler ve seviyeleri

Değişken Kodu	Değişkenler	Düşük Değer (- 1)	Yüksek Değer (+ 1)	
X1	Karbon kaynağı (%)	Glikoz	0	3
X2		Laktoz	0	3
X3		Sukroz	0	3
X4		Fruktoz	0	3
X5	Azot kaynağı (%)	NaNO ₃	0	0,3
X6		NH ₄ NO ₃	0	0,3
X7		Yeast ekstrakt	0	0,3
X8		Tripton	0	0,3
X9	Mineral (%)	FeSO ₄	0	0,1
X10		MgSO ₄	0	0,1
X11		KH ₂ PO ₄	0	0,1
X12	Vitamin (µg/l)	Tiamin	0	1000
X13	İnkübasyon Sıcaklığı (°C)		25	35
X14	Besiyeri Başlangıç pH		4	7
X15	Karıştırma hızı (rpm)		100	200

Bu deney tasarım yönteminde (n) sayıda değişkenin etkisi (n+1) sayıda deneme ile araştırılmaktadır. Çalışmada seçilen suş tarafından BGD üretimi üzerine 15 değişkenin etkisinin araştırılması öngörülmüştür. Bu nedenle seçilen 15 değişkenin BGD üretimine etkisi Çizelge 2.4.te sunulan tasarım kullanılarak 16 denemede araştırılmıştır.

Çizelge 2.4. Seçilen suş tarafından BGD üretimi için kullanılan Plackett – Burman deney tasarımı

Değişken Deneme	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14	X15
1	+1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1
2	+1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	+1
3	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
4	+1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
5	-1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1
6	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	+1
8	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	+1	-1
9	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	+1
10	-1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	-1
12	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	-1
13	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1
14	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1
15	-1	+1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

2.2.3.2. Cevap Yüzey Yöntemi Deney Tasarımı

Cevap yüzey yöntemi, Plackett-Burman deney tasarımı ile BGD üretimini arttırdığı belirlenen değişkenlerin en etkin düzey-konsantrasyonunu belirlemek

amacıyla kullanılmıştır. Cevap yüzey yöntemi her değişkenin 3 (Box-Behnken) ya da 5 (Central Composite) farklı seviyesinin kullanıldığı bir deney tasarım desenidir. Çalışmada Plackett-Burman deney tasarımından elde edilen veriler doğrultusunda Box-Behnken Deney Tasarımının araştırılması öngörülmüştür. Bu amaçla Plackett-Burman deney tasarımından elde edilen veriler doğrultusunda etkisi araştırılan değişkenler ve seviyeleri Çizelge 2.5. de, uygulanan Box-Behnken deney tasarımı ise Çizelge 2.6. da sunulmuştur.

Çizelge 2.5. Seçilen suş tarafından BGD üretimi için kullanılan Box-Behnken deney modeli

Değişken	X1	X2	X3
Deneme	(Fruktoz; %)	(NaNO ₃ ; %)	(KH ₂ PO ₄ ; %)
1	0	0	0
2	0	1	-1
3	1	0	1
4	0	1	1
5	1	1	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	-1	1	0
9	0	-1	1
10	-1	0	1
11	-1	0	-1
12	1	0	-1
13	-1	-1	0
14	0	-1	-1
15	1	-1	0

Çizelge 2.6. Cevap yüzey yöntemi deney tasarımı ile seçilen suş tarafından BGD üretimi üzerine etkisi araştırılan değişkenler ve seviyeleri

Değişken kodu	Değişkenler		- 1	0	+ 1
X1	Karbon kaynağı (%)	Fruktoz	1	3	5
X2	Azot kaynağı (%)	NaNO ₃	0,1	0,3	0,5
X3	Mineral (%)	KH ₂ PO ₄	0,05	0,1	0,15
Vitamin (µg/l)		Tiamin	1000		
Sıcaklık (°C)			25		
pH			7		
Karıştırma (rpm)			150		

Cevap yüzey yöntemi analizlerinde aşağıdaki kuadratik eşitlik kullanılmıştır:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2$$

Burada Y tahmin edilen tepki (yanıt), β_0 sabit terim, β_{ii} kareli terimlerin katsayısı, β_{ij} ikili etkileşimlerin katsayısı ve x_i açıklayıcı (bağımsız) değişkenlerin kodlanmış değerleridir.

2.2.4. Elde Edilen Optimize Koşulların Derin Kültür Koşullarına Uygulanması

BGD üretim koşullarının optimizasyonu çalışmalarından elde edilen veriler, seçilen organizmanın derin kültür koşullarında büyütülmesi ile test edilmiştir. Bu amaçla, yüksek BGD üretim özelliği ile seçilen organizmanın optimize olmayan koşullarda erlen ölçeğinde, optimize olan koşullarda erlen ölçeğinde ve optimize olan koşullarda reaktör ölçeğinde büyütülmesi sırasında BGD üretimleri izlenmiş ve karşılaştırılmıştır. Böylece optimizasyonun başarılı olup olmadığı ve optimize koşulların ölçek büyütülerek tekrarlanıp tekrarlanamayacağı konuları sorgulanmıştır. Bu amaçla istatistiksel deney tasarımı ile BGD üretiminin optimizasyonu aşamasında belirlenen en uygun üretim koşulları, ölçek büyütme uygulanarak reaktör boyutunda araştırılmıştır.

Bu aşamada 3,5 litrelik Bioflo 110 (New Brunswick) marka karıştırılmalı tank tipi reaktör (KTR) kullanılmış ve en uygun üretim koşullarına ek olarak havalandırma hızı 1 vvm olarak uygulanmıştır. Reaktör koşullarının BGD üretimi üzerine etkisini daha net görebilmek için reaktör, erlende optimize olan ve olmayan besiyerinden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Fermentasyonun başarısı 20 günlük inkübasyon süresince günlük örnekleme yapılarak büyüme parametreleri açısından değerlendirilmiştir.

İnkübasyon süresince sıcaklık, pH ve çözülmüş oksijen değerlerinin izlenmesi ise reaktöre bağlı bilgisayar programı (BioCommand Plus) aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. Biyomas değerlerinin izlenmesinde hücre kuru ağırlığı, besiyerinde kalan karbon kaynağı miktarının izlenmesinde ise spektrofotometrik fenol sülfirik asit yöntemi kullanılmıştır.

2.2.5. BGD Üretiminde Kinetik Parametrelerin Tayini

Optimizasyon çalışması ile elde edilen verilerin doğruluğunun onaylanması amacı ile *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu optimize olan ve olmayan koşullarda erlen ölçeğinde büyütülmüştür. Ayrıca optimize koşulların erlen ölçeğinden reaktör ölçeğine taşınabilmesi için de ayrı bir çalışma tasarlanmıştır. Bu durumda *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu optimize olan ve olmayan koşullarda erlen ölçeğinde ve optimize koşullarda reaktör ölçeğinde büyütülmüştür. Organizmanın büyüme sırasında üretilen biyomas (X), tüketilen karbon kaynağı (S) ve üretilen BGD (P) miktarlarının izlenmesi ile;

$$\text{spesifik büyüme hızı, } \mu = \frac{d \ln X}{dt} \quad (1/d)$$

$$\text{volumetrik karbon kaynağı tüketim oranı, } r_s = \frac{dS}{dt} \quad (g/L/d)$$

$$\text{spesifik karbon kaynağı tüketim oranı, } Q_s = \left(\frac{dS}{dt} \right) \left(\frac{1}{X} \right) \quad (g/g/d)$$

volumetrik BGD üretim oranı, $r_p = \frac{dp}{dt}$ (mg/L/d)

spesifik BGD üretim oranı, $Q_p = \left(\frac{dp}{dt}\right) \left(\frac{1}{X}\right)$ (mg/g/d)

ile yaygın biçimde kullanılan verim katsayılarından

substrata bağlı olarak üretilen biyokütle, $Y_{x/s} = \frac{dX}{dS}$ (g/g)

substrata bağlı olarak üretilen BGD, $Y_{p/s} = \left(\frac{dP}{dt}\right) \left(\frac{dS}{dt}\right)$ (mg/g)

biyomasa bağlı olarak üretilen BGD, $Y_{p/x} = \left(\frac{dP}{dt}\right) \left(\frac{dX}{dt}\right)$ (mg/g)

değerleri hesaplanarak büyüme ve BGD üretim kinetiği incelenmiştir.

3. BULGULAR

3.1.1. Makrofungus Kültürlerinin GA, ABA ve IAA Üretim Potansiyelleri Açısından Taranmaları

3.1.1.1. Makrofungus İzolatlarının BGD Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi

Çalışma kapsamında toplam 103 adet Basidiomycetes izolatının 10 günlük inkübasyon süresi sonunda GA, ABA ve IAA üretim değerleri izlenmiş ve diğerlerinden daha yüksek miktarda BGD üreten makrofungus izolatı belirlenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler Çizelge 3.1' de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Makrofungus suşlarının inkübasyonun 10. gününde ürettikleri gibberellik asit (GA), absisik asit (ABA) ve indol asetik asit (IAA) miktarları

Sıra No	Organizma		BGD (mg/l)		
	Adı	OBCC Kodu	GA ₃	ABA	IAA
1	<i>Aspergillus niger</i>	(+) Kontrol	1114,17	81,06	5,53
2	<i>Gibberella fujikuroi</i>	(+) Kontrol	1558,83	152,94	12,52
3	<i>Gibberella fujikuroi</i> 011M1-A2	(+) Kontrol	1666,17	188,32	13,53
4	<i>Gibberella fujikuroi</i> H010W65	(+) Kontrol	930,00	115,32	5,33
5	<i>Gibberella fujikuroi</i> 010Z2C	(+) Kontrol	744,17	73,61	6,36
6	<i>Gibberella fujikuroi</i> 010Z19B	(+) Kontrol	1225,50	136,56	7,84
7	Negatif Kontrol	(-) Kontrol	18,42	6,59	0,49
8	<i>Leucoagaricus pudicus</i>	1002	1146,33	204,30	29,78
9	<i>Ganoderma carnosum</i>	1004	42,31	8,57	0,35
10	<i>Suillus collitinus</i>	1005	376,92	32,84	1,74
11	<i>Antrodia serialis</i>	1008	138,33	16,10	1,13
12	<i>Pleurotus eryngii</i>	1009	550,00	44,95	3,10
13	<i>Ganoderma applanatum</i>	1010	73,97	11,67	0,85
14	<i>Coprinus comatus</i>	1014	548,92	54,98	4,58
15	<i>Pleurotus ostreatus</i>	1015	109,62	12,96	0,86
16	<i>Pleurotus ostreatus</i>	1022	69,74	11,19	0,66
17	<i>Schizophyllum commune</i>	1023	101,67	12,88	0,79
18	<i>Inonotus hispidus</i>	1026	166,54	21,99	2,00
19	<i>Fomes fomentarius</i>	1030	173,46	22,46	1,67
20	<i>Pleurotus ostreatus</i>	1031	153,72	23,30	1,03
21	Tanımlanmamış izolat	1032	91,28	8,02	0,36
22	Tanımlanmamış izolat	1033	439,23	53,36	6,70
23	<i>Pleurotus ostreatus</i>	1034	69,36	7,71	0,35
24	<i>Fistulina hepatica</i>	1035	33,72	6,58	0,43
25	Tanımlanmamış izolat	1038	603,21	79,53	10,37
26	<i>Leucoagaricus pudicus</i>	1039	248,97	30,38	2,87
27	<i>Laetiporus sulphureus</i>	1040	209,00	11,64	0,33
28	<i>Agaricus campestris</i>	1041	43,08	7,83	0,52

Çizelge 3.1. Makrofungus suşlarının inkübasyonun 10. gününde ürettikleri gibberellik asit (GA), absisik asit (ABA) ve indol asetik asit (IAA) miktarları (Devam)

29	Tanımlanmamış izolat	1043	376,56	69,26	7,79
30	<i>Inonotus hispidus</i>	1045	127,33	18,17	1,67
31	Tanımlanmamış izolat	1046	362,56	43,45	4,30
32	Tanımlanmamış izolat	1047	122,67	17,83	1,28
33	Tanımlanmamış izolat	1049	82,69	11,33	0,79
34	Tanımlanmamış izolat	1050	162,56	24,08	2,03
35	Tanımlanmamış izolat	1067	85,51	11,64	0,92
36	Tanımlanmamış izolat	1068	135,07	16,05	1,25
37	Tanımlanmamış izolat	1069	265,26	34,87	4,43
38	Tanımlanmamış izolat	1070	207,69	30,14	3,41
39	Tanımlanmamış izolat	1074	87,15	18,06	1,83
40	Tanımlanmamış izolat	1075	24,87	4,32	0,17
41	Tanımlanmamış izolat	1983	9,62	3,81	0,27
42	Tanımlanmamış izolat	1084	0,83	2,17	0,00
43	Tanımlanmamış izolat	1988	218,72	23,77	5,65
44	Tanımlanmamış izolat	1089	62,05	8,58	2,59
45	Tanımlanmamış izolat	1092	377,31	34,83	1,64
46	Tanımlanmamış izolat	1093	78,31	10,60	0,85
47	Tanımlanmamış izolat	1100	103,85	4,27	0,07
48	Tanımlanmamış izolat	1102	350,38	64,78	7,64
49	Tanımlanmamış izolat	02	238,33	16,50	1,15
50	<i>Ganoderma sp.</i>	03	135,77	17,75	1,00
51	<i>Suillus bovinus</i>	04	213,97	34,20	2,74
52	<i>Tricholoma equestre</i>	05	877,56	82,32	4,32
53	<i>Clavariadelphus truncatus</i>	06	306,41	34,40	4,11
54	<i>Lepista nuda</i>	08	173,72	19,60	1,60
55	<i>Polyporus arcularius</i>	09	145,04	14,86	1,00
56	<i>Trametes hirsuta</i>	11	23,72	5,93	0,51
57	<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	18	595,00	73,27	5,70
58	<i>Pycnoporus cinnabarius</i>	23	65,00	10,91	0,72

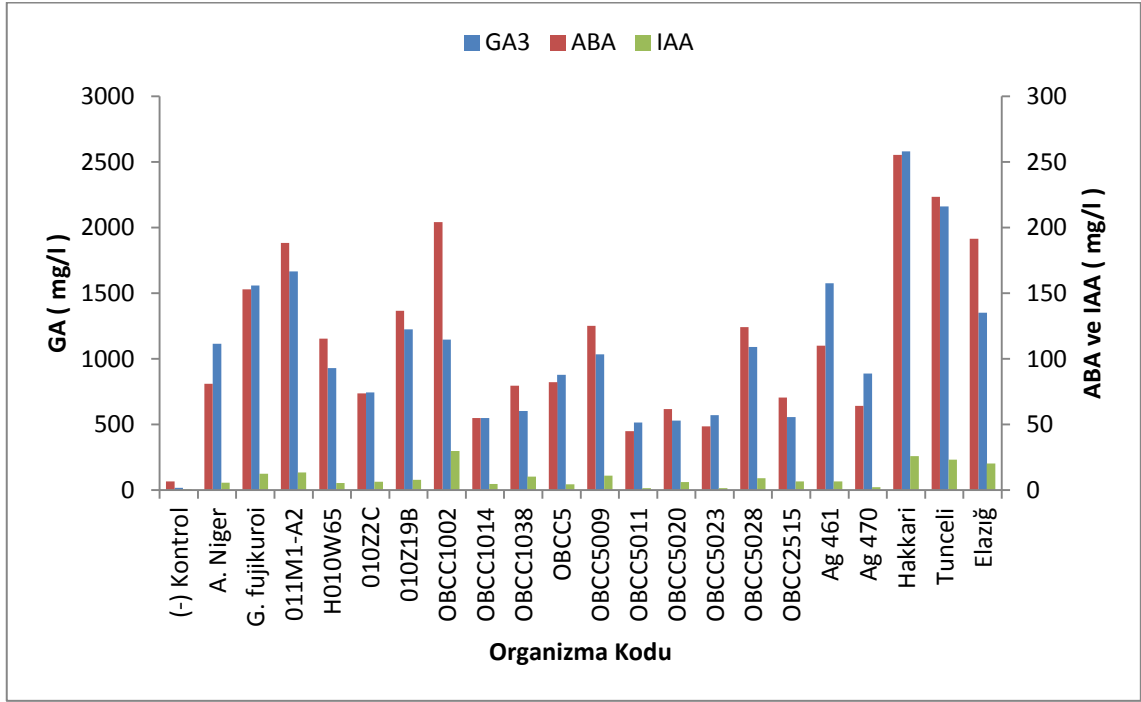
Çizelge 3.1. Makrofungus suşlarının inkübasyonun 10. gününde ürettikleri gibberellik asit (GA), absisik asit (ABA) ve indol asetik asit (IAA) miktarları (Devam)

59	<i>Macrolepiota procera</i>	24	44,49	7,76	0,39
60	<i>Trametes versicolor</i>	25	186,41	20,47	1,30
61	Tanımlanmamış izolat	26	207,38	22,48	2,04
62	Tanımlanmamış izolat	27	202,31	25,35	2,00
63	<i>Macrolepiota procera</i>	28	115,13	13,68	0,98
64	<i>Polyporus arcularius</i>	34	73,59	9,37	0,50
65	<i>Hypholoma fasciculare</i>	35	358,59	35,62	2,66
66	Tanımlanmamış izolat	36	11,83	4,62	0,17
67	Tanımlanmamış izolat	37	109,36	13,37	0,60
68	<i>Ganoderma carnosum</i>	5001	145,26	15,05	1,06
69	<i>Lentinus strigosus</i>	5004	44,87	8,91	0,54
70	<i>Cerrena unicolor</i>	5005	254,00	22,70	1,35
71	<i>Trametes pubescens</i>	5006	336,28	50,00	6,39
72	<i>Ganoderma lucidum</i>	5008	55,00	8,39	0,36
73	<i>Inonotus hispidus</i>	5009	1033,65	125,11	10,91
74	<i>Schizophyllum commune</i>	5010	231,54	21,64	1,40
75	Tanımlanmamış izolat	5011	515,26	44,84	1,60
76	<i>Trametes hirsuta</i>	5014	172,31	22,82	1,92
77	<i>Paxillus involutus</i>	5015	81,15	7,32	0,00
78	Tanımlanmamış izolat	5016	38,69	6,91	0,47
79	<i>Stereum hirsutum</i>	5020	529,36	61,76	6,09
80	<i>Trametes versicolor</i>	5023	570,26	48,57	1,55
81	<i>Hygrocybe pratensis</i>	5024	176,28	19,42	1,01
82	Tanımlanmamış izolat	5028	1090,64	124,10	8,96
83	Tanımlanmamış izolat	5029	274,17	20,87	1,29
84	<i>Suillus sp.</i>	5056	5,17	0,30	0,36
85	<i>Omphalatus illudens</i>	2503	4,21	2,36	0,14
86	Tanımlanmamış izolat	2514	184,10	18,06	0,77
87	<i>Daedalea quercina</i>	2515	555,77	70,57	6,55
88	<i>Polyporus arcularius</i>	3501	61,92	8,43	0,73

Çizelge 3.1. Makrofungus suşlarının inkübasyonun 10. gününde ürettikleri gibberellik asit (GA), absisik asit (ABA) ve indol asetik asit (IAA) miktarları (Devam)

89	<i>Tapinella panuoides</i>	3002	173,85	16,32	1,38
90	<i>Lentinus tigrinus</i>	3007	233,46	23,86	0,97
91	<i>Lenzites betulina</i>	2001	12,23	3,48	0,00
92	<i>Omphalatus olearius</i>	2002	237,95	32,79	3,03
93	<i>Pleurotus calypratus</i>	Ag 461	1576,67	109,97	6,67
94	<i>Pleurotus cornucopiae</i>	Ag 463	364,62	24,72	0,93
95	<i>Pleurotus dryinus</i>	Ag 468	85,13	11,47	0,64
96	<i>Pleurotus dryinus</i>	Ag 470	887,69	64,12	2,17
97	<i>Pleurotus eryngii</i>	Ag 471	67,31	9,47	0,56
98	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Ag 472	73,79	8,14	0,53
99	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Ag 475	81,54	11,02	0,75
100	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Ag 476	55,51	7,03	0,33
101	<i>Pleurotus ostreatus cv. florida</i>	Ag 477	151,79	15,50	0,96
102	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Ag 479	126,79	13,40	1,12
103	<i>Pleurotus eryngii</i>	Hakkari	2580,50	255,49	25,96
104	<i>Pleurotus eryngii</i>	Tunceli	2161,83	223,37	23,16
105	<i>Pleurotus eryngii</i>	Elazığ	1350,64	191,49	20,22
106	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Diyarbakır	48,08	7,00	0,33
107	<i>Pleurotus eryngii</i>	Hacettepe	9,50	2,42	0,08
108	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Kavak	181,79	20,36	1,82
109	<i>Pleurotus ostreatus</i>	HK35	151,54	15,93	1,36
110	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Hafız	144,10	15,39	1,13

Ticari potansiyeli ve kullanım oranı açısından ön plana çıkan GA üretimi açısından 500 mg/l üretim değerinin üzerine çıkan suşların, negatif ve pozitif kontrollerle karşılaştırılması ile ilgili veriler Şekil 3.1 de sunulmuştur.

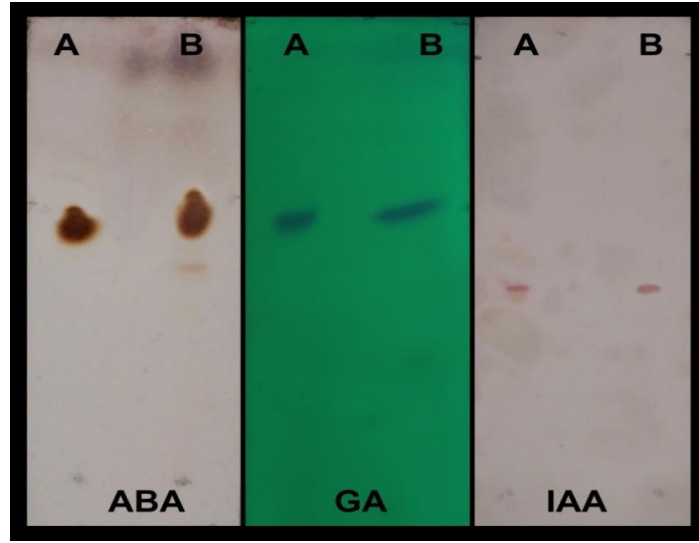


Şekil 3.1. Bazı makrofungus izolatlarının gibberellik asit (GA), absisik asit (ABA) ve indol asetik asit (IAA) üretim miktarları

Tarama çalışmasında kullanılan makrofungus izolatlarının, BGD üretim miktarları karşılaştırılmıştır. Bu yolla en iyi BGD üretici izolat bir sonraki aşamada değerlendirilmek üzere seçilmiştir. Elde edilen sonuçların değerlendirmesi sonucunda *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu sonraki aşamada çalışılmaya değer bulunmuştur (Çizelge 3.1).

3.1.1.2. Makrofungus İzolatının BGD Üretiminin Doğrulanması

Pleurotus eryngii (Hakkari)' nin kültür sıvısı ekstraktında her üç BGD' nin varlığı, ilgili standartlar ile karşılaştırılarak onaylanmıştır (Şekil 3.2.). Elde edilen verilere göre GA, ABA ve IAA nın çalışma koşullarındaki Rf değerleri, sırası ile 0,63, 0,60 ve 0,49 olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.2. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatının GA₃, ABA ve IAA üretiminin ITK ile belirlenmesi A: Standart, B: Ekstrakt

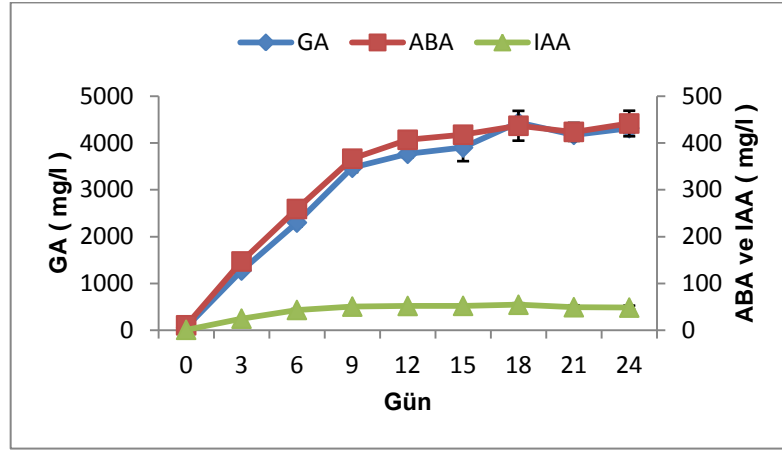
Böylece, çalışmanın sonraki aşamalarına GA, ABA ya da IAA üretimi açısından diğer makrofungus izolatlarına oranla yüksek seviyede üretim değeri sunan ve BGD üretimi İTK ile de doğrulanan *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatı ile devam edilmiştir.

3.1.2. Bitki Gelişim Düzenleyicisi (BGD) Üretimini Arttıran Kültür Yönteminin Belirlenmesi

Çalışmanın bu aşamasında, *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatının BGD (GA, ABA ya da IAA) üretimi, üç farklı kültür sisteminde büyümesi sırasında zamana bağlı olarak izlenmiştir. Böylece *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatının BGD üretimini en fazla destekleyen kültür yönteminin belirlenmesi planlanmıştır.

3.1.2.1. Derin Kültür Yöntemi ile BGD Üretiminin İzlenmesi

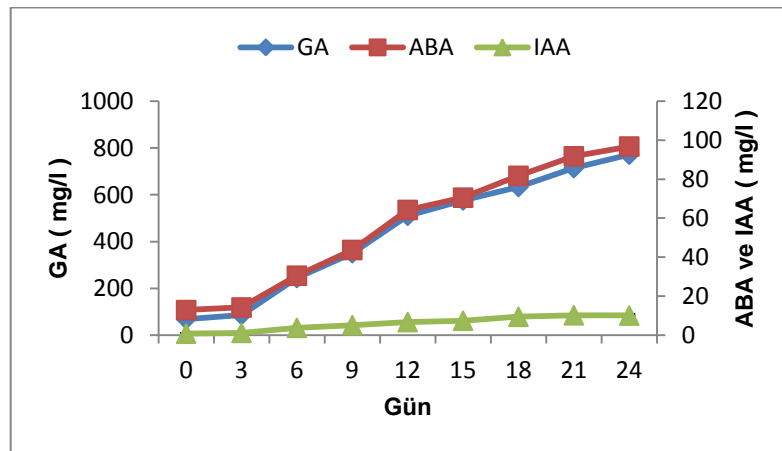
Çalışmanın bu aşamasında, *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatının BGD üretimi derin kültür sisteminde büyümesi sırasında zamana bağlı olarak izlenmiştir (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatı ile derin kültür tipinde BGD üretimi

3.1.2.2. Statik Kültür Yöntemi ile BGD Üretiminin İzlenmesi

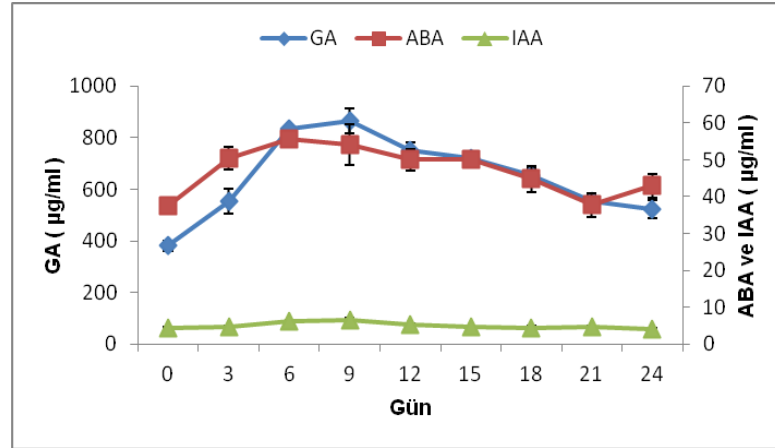
Çalışmanın bu aşamasında, *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatının BGD üretimi statik kültür sisteminde büyümesi sırasında zamana bağlı olarak izlenmiştir (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatı ile statik kültür tipinde BGD üretimi

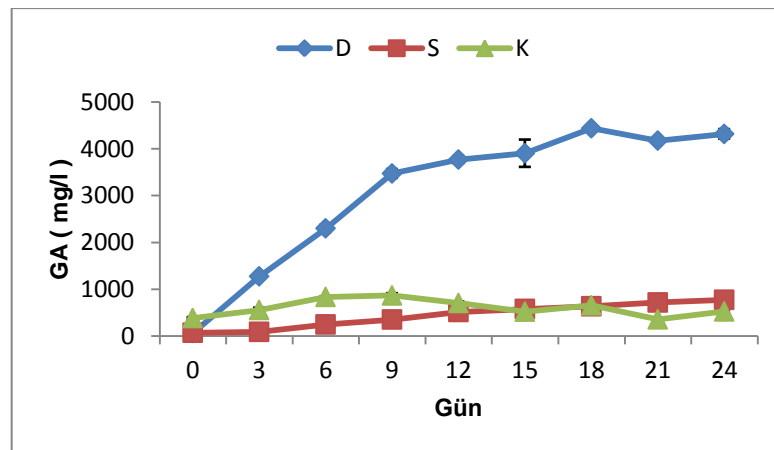
3.1.2.3. Katı Faz Kültür Yöntemi ile BGD Üretiminin İzlenmesi

Çalışmanın bu aşamasında, *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatının BGD üretimi katı faz kültür sisteminde büyümesi sırasında zamana bağlı olarak izlenmiştir (Şekil 3.5.).

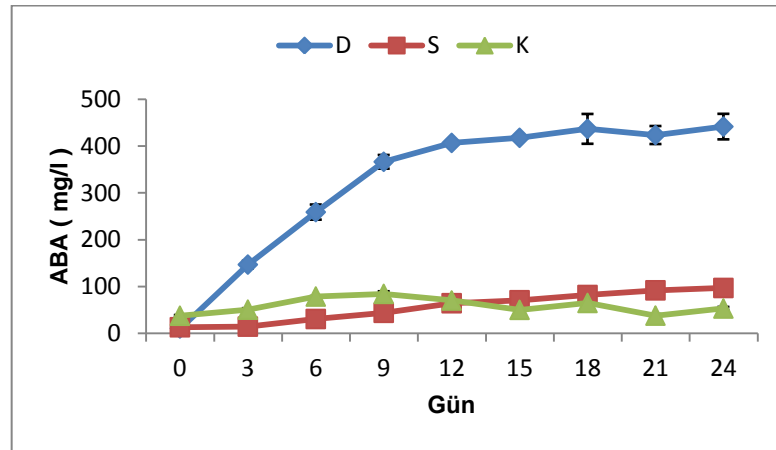


Şekil 3.5. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatı ile katı faz kültür tipinde BGD üretimi

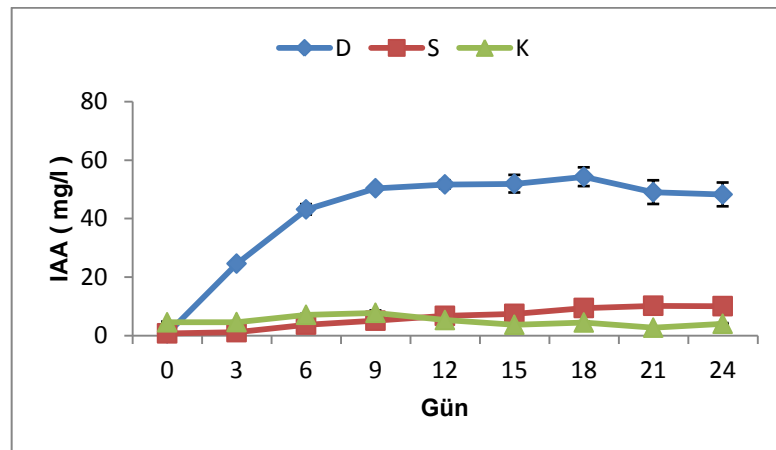
Pleurotus eryngii (Hakkari) izolatının BGD üretiminin farklı kültür sisteminde karşılaştırılması ise; GA için Şekil 3.6., ABA için Şekil 3.7. ve IAA için Şekil 3.8. de sunulmuştur.



Şekil 3.6. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatı ile farklı kültür tiplerinde GA üretiminin karşılaştırılması (D: Derin kültür sistemi, S: Statik kültür sistemi, K: Katı faz sistemi)

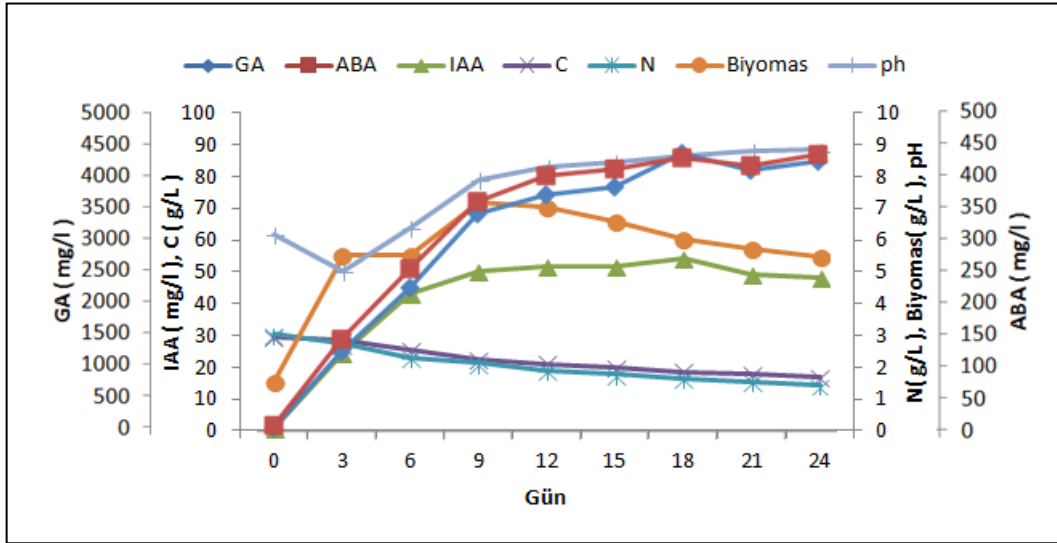


Şekil 3.7. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) ile farklı kültür tiplerinde ABA üretiminin karşılaştırılması (D: Derin kültür sistemi, S: Statik kültür sistemi, K: Katı faz sistemi)



Şekil 3.8. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu ile farklı kültür tiplerinde IAA üretiminin karşılaştırılması (D: Derin kültür sistemi, S: Statik kültür sistemi, K: Katı faz sistemi)

Pleurotus eryngii (Hakkari) izolatu ile BGD üretimine ilişkin verilerin birlikte değerlendirilmesi sonucunda en iyi kültür tipi olarak derin kültür ve en yüksek BGD üretim günü olarak inkübasyonun 18. günü belirlenmiştir. İzolatu bu ortamda diğer deneysel parametreleri de içeren büyüme özellikleri Şekil 3.9. de sunulmuştur.



Şekil 3.9. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu ile çalkalamalı kültür tipinde BGD üretimi sırasında büyüme özellikleri

3.1.3. İstatistiksel Deney Tasarımı ile BGD Üretimini Optimizasyonu

3.1.3.1. Plackett-Burman Deney Tasarımı

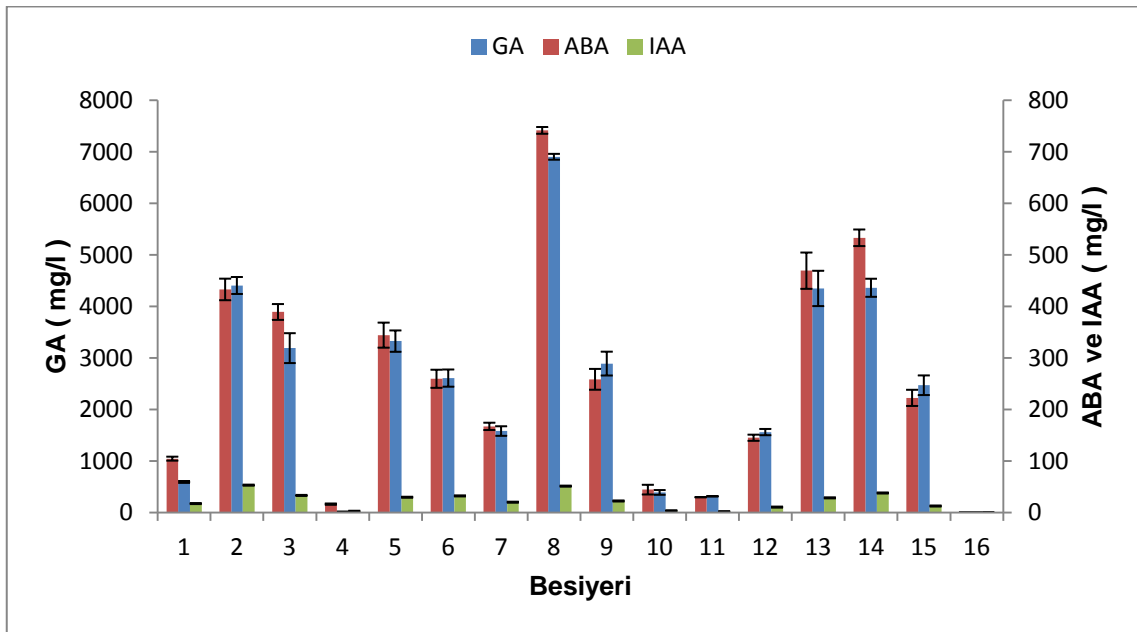
BGD üretimi için en uygun üretim koşullarının belirlenmesinin amaçlandığı Plackett-Burman deney tasarımı (PB) aşamada, *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatının inkübasyonun 18. gününde ürettiği BGD miktarları Çizelge 3.2. ve Şekil 3.10. da sunulmuştur.

Çizelge 3.2. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatının Plackett-Burman deney tasarımında (PB) ürettiği BGD miktarları

Deneme	BGD (mg/l)		
	GA	ABA	IAA
1	594,50	104,62	17,49
2	4406,83	433,00	53,21
3	3191,17	389,27	33,28
4	15,83	16,36	2,54
5	3327,00	344,32	29,74

Çizelge 3.2. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatının Plackett-Burman deney tasarımında (PB) ürettiği BGD miktarları (Devam)

6	2609,50	259,62	32,37
7	1582,00	167,27	20,16
8	6904,33	741,67	51,29
9	2891,17	258,56	22,52
10	391,17	44,55	3,56
11	316,17	29,85	1,82
12	1562,00	145,23	10,62
13	4349,50	469,39	28,57
14	4362,00	533,26	38,01
15	2471,17	222,58	12,74
16	0,00	0,00	0,00



Şekil 3.10. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatının Plackett-Burman deney tasarımında (PB) ürettiği BGD miktarları

Pleurotus eryngii (Hakkari) izolatının Plackett – Burmann deney tasarımı ile derin kültür koşullarında büyütülmesi sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi Çizelge 3.3., 3.4. ve 3.5.' te sunulmuştur.

Çizelge 3.3. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatının GA üretimi açısından PB deney tasarımı analiz sonuçları

Effect Estimates; Var.:GA; R-sqr=.99507; Adj.:.99276 (pb-15-16-3 YİNELEME.sta) 15 Factor Screening Design; MS Residual=27224,9 DV: GA						
Factor	Regression Coefficient	Std.Err. Coeff.	t(32)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	2439,021	23,81566	102,4125	0,000000	2390,510	2487,532
(1)Var1	339,146	23,81566	14,2405	0,000000	290,635	387,657
(2)Var2	416,375	23,81566	17,4832	0,000000	367,864	464,886
(3)Var3	-384,896	23,81566	-16,1615	0,000000	-433,407	-336,385
(4)Var4	535,479	23,81566	22,4843	0,000000	486,968	583,990
(5)Var5	992,063	23,81566	41,6559	0,000000	943,552	1040,573
(6)Var6	-442,375	23,81566	-18,5750	0,000000	-490,886	-393,864
(7)Var7	-26,833	23,81566	-1,1267	0,268244	-75,344	21,678
(8)Var8	-207,667	23,81566	-8,7198	0,000000	-256,178	-159,156
(9)Var9	-191,042	23,81566	-8,0217	0,000000	-239,553	-142,531
(10)Var10	486,604	23,81566	20,4321	0,000000	438,093	535,115
(11)Var11	994,917	23,81566	41,7757	0,000000	946,406	1043,428
(12)Var12	232,229	23,81566	9,7511	0,000000	183,718	280,740
(13)Var13	-592,167	23,81566	-24,8646	0,000000	-640,678	-543,656
(14)Var14	206,875	23,81566	8,6865	0,000000	158,364	255,386
(15)Var15	80,313	23,81566	3,3723	0,001963	31,802	128,823

Çizelge 3.4. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatının ABA üretimi açısından PB deney tasarımı analiz sonuçları

Effect Estimates; Var.:ABA; R-sqr=.99612; Adj.:.9943 (pb-15-16-3 YİNELEME.sta) 15 Factor Screening Design; MS Residual=247,5459 DV: ABA						
Factor	Regression Coefficient	Std.Err. Coeff.	t(32)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	259,9599	2,270948	114,4720	0,000000	255,3341	264,5857
(1)Var1	33,5584	2,270948	14,7773	0,000000	28,9326	38,1842
(2)Var2	44,0887	2,270948	19,4142	0,000000	39,4629	48,7145
(3)Var3	-37,3261	2,270948	-16,4363	0,000000	-41,9518	-32,7003
(4)Var4	62,7427	2,270948	27,6284	0,000000	58,1170	67,3685
(5)Var5	103,2421	2,270948	45,4621	0,000000	98,6163	107,8679
(6)Var6	-28,0527	2,270948	-12,3529	0,000000	-32,6785	-23,4269
(7)Var7	-10,7977	2,270948	-4,7547	0,000040	-15,4234	-6,1719
(8)Var8	-23,3109	2,270948	-10,2648	0,000000	-27,9367	-18,6852
(9)Var9	-24,0129	2,270948	-10,5740	0,000000	-28,6387	-19,3872
(10)Var10	52,8374	2,270948	23,2667	0,000000	48,2117	57,4632
(11)Var11	101,5944	2,270948	44,7365	0,000000	96,9686	106,2201
(12)Var12	24,6234	2,270948	10,8428	0,000000	19,9977	29,2492
(13)Var13	-79,4864	2,270948	-35,0014	0,000000	-84,1122	-74,8607
(14)Var14	34,9018	2,270948	15,3688	0,000000	30,2761	39,5276
(15)Var15	5,3576	2,270948	2,3592	0,024583	0,7319	9,9834

Çizelge 3.5. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatının IAA üretimi açısından PB deney tasarımı analiz sonuçları

Effect Estimates; Var.:IAA; R-sqr=.99267; Adj.:.98924 (pb-15-16-3 YİNELEME.sta) 15 Factor Screening Design; MS Residual=2,938486 DV: IAA						
Factor	Regression Coefficient	Std.Err. Coeff.	t(32)	p	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Mean/Interc.	22,34094	0,247424	90,2943	0,000000	21,83695	22,84492
(1)Var1	5,51844	0,247424	22,3036	0,000000	5,01445	6,02242
(2)Var2	5,06844	0,247424	20,4849	0,000000	4,56445	5,57242
(3)Var3	0,11115	0,247424	0,4492	0,656306	-0,39284	0,61513
(4)Var4	4,49802	0,247424	18,1794	0,000000	3,99404	5,00201
(5)Var5	5,94240	0,247424	24,0171	0,000000	5,43841	6,44638
(6)Var6	-3,28115	0,247424	-13,2612	0,000000	-3,78513	-2,77716
(7)Var7	-0,37740	0,247424	-1,5253	0,137007	-0,88138	0,12659
(8)Var8	-0,27635	0,247424	-1,1169	0,272342	-0,78034	0,22763
(9)Var9	-4,77594	0,247424	-19,3027	0,000000	-5,27992	-4,27195
(10)Var10	1,68135	0,247424	6,7954	0,000000	1,17737	2,18534
(11)Var11	8,59448	0,247424	34,7359	0,000000	8,09049	9,09846
(12)Var12	1,88240	0,247424	7,6080	0,000000	1,37841	2,38638
(13)Var13	-5,77802	0,247424	-23,3527	0,000000	-6,28201	-5,27404
(14)Var14	1,73344	0,247424	7,0059	0,000000	1,22945	2,23742
(15)Var15	1,79969	0,247424	7,2737	0,000000	1,29570	2,30367

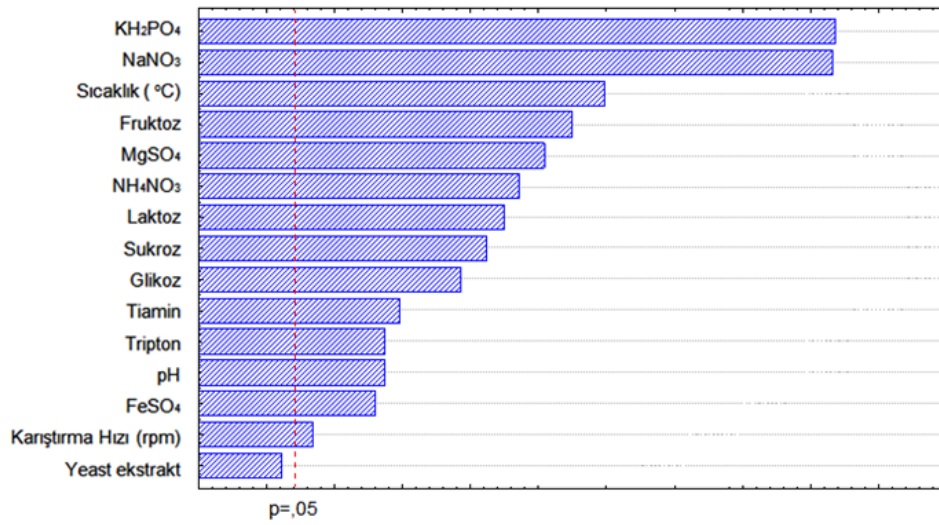
Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda değişkenlerin her bir BGD üretimi üzerine etkileri için aşağıdaki eşitlikler elde edilmiştir.

$$Y_{GA} (\mu\text{g/ml}): Y_{GA} = 2490,021 + 339,146_{\text{GLİKOZ}} + 416,375_{\text{LAKTOZ}} - 384,896_{\text{SUKROZ}} + 535,479_{\text{FRUKTOZ}} + 992,063_{\text{NaNO}_3} - 442,375_{\text{NH}_4\text{NO}_3} - 26,833_{\text{YEAST EKSTRAKT}} - 207,667_{\text{TRİPTON}} - 191,042_{\text{FeSO}_4} + 486,604_{\text{MgSO}_4} + 994,917_{\text{KH}_2\text{PO}_4} + 232,229_{\text{TİAMİN}} - 592,167_{\text{SICAKLIK}} + 206,875_{\text{pH}} + 80,313_{\text{KARIŞTIRMA HIZI}}$$

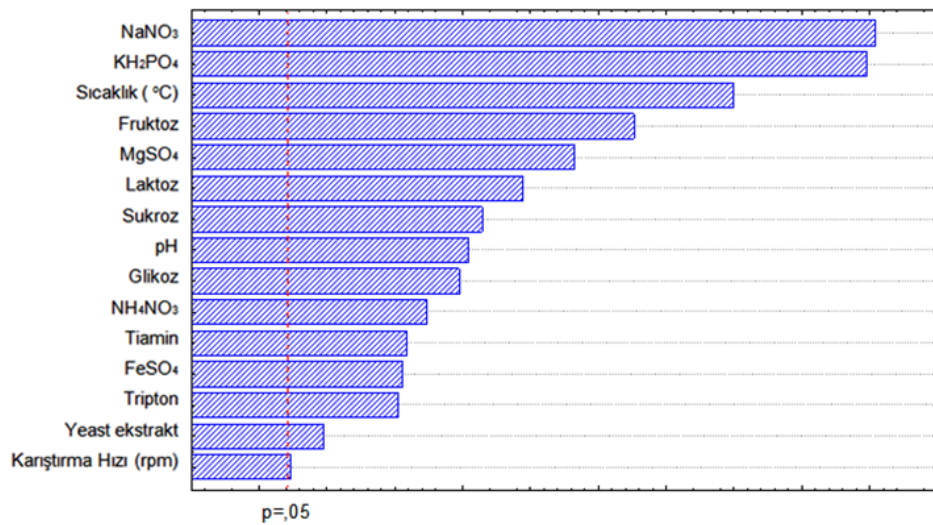
$$Y_{ABA} (\mu\text{g/ml}): Y_{ABA} = 259,960 + 33,558_{\text{GLİKOZ}} + 44,089_{\text{LAKTOZ}} - 37,326_{\text{SUKROZ}} + 62,743_{\text{FRUKTOZ}} + 103,242_{\text{NaNO}_3} - 28,053_{\text{NH}_4\text{NO}_3} - 10,798_{\text{YEAST EKSTRAKT}} - 23,311_{\text{TRİPTON}} - 24,013_{\text{FeSO}_4} + 52,837_{\text{MgSO}_4} + 101,594_{\text{KH}_2\text{PO}_4} + 24,623_{\text{TİAMİN}} - 79,486_{\text{SICAKLIK}} + 34,902_{\text{pH}} + 5,358_{\text{KARIŞTIRMA HIZI}}$$

$$Y_{IAA} (\mu\text{g/ml}): Y_{IAA} = 22,845 + 5,518_{\text{GLİKOZ}} + 5,068_{\text{LAKTOZ}} + 0,111_{\text{SUKROZ}} + 4,498_{\text{FRUKTOZ}} + 5,942_{\text{NaNO}_3} - 3,281_{\text{NH}_4\text{NO}_3} - 0,377_{\text{YEAST EKSTRAKT}} - 0,276_{\text{TRİPTON}} - 4,776_{\text{FeSO}_4} + 1,681_{\text{MgSO}_4} + 8,595_{\text{KH}_2\text{PO}_4} + 1,882_{\text{TİAMİN}} - 5,778_{\text{SICAKLIK}} + 1,733_{\text{pH}} + 1,800_{\text{KARIŞTIRMA HIZI}}$$

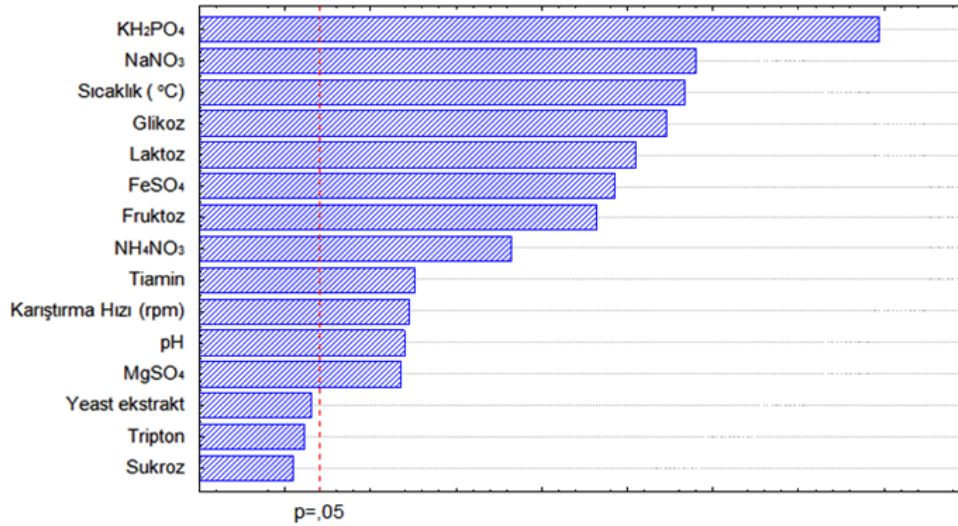
Plackett – Burman deney tasarımında kullanılan değişkenlerin *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu tarafından BGD üretimi üzerine etkisinin anlamlılık ve büyüklüğünü ifade eden Pareto grafikleri GA, ABA ve IAA için sırası ile Şekil 3.11., Şekil 3.12 ve Şekil 3.13. de sunulmuştur.



Şekil 3.11 Plackett – Burman deney tasarımında kullanılan değişkenlerin *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu tarafından GA üretimi üzerine etkisi.



Şekil 3.12 Plackett – Burman deney tasarımında kullanılan değişkenlerin *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu tarafından ABA üretimi üzerine etkisi.



Şekil 3.13 Plackett – Burman deney tasarımında kullanılan değişkenlerin *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatı tarafından IAA üretimi üzerine etkisi.

Plackett – Burman deney tasarımı sonucu BGD üretimine katkısı en fazla olan değişkenlerden karbon kaynağı olarak fruktoz, azot kaynağı olarak NaNO₃ mineral madde olarak ise KH₂PO₄; cevap yüzey yönteminde etkin düzey konsantrasyonları belirlenmek üzere seçilmiştir.

3.1.3.2. Cevap Yüzey Deney Tasarımı

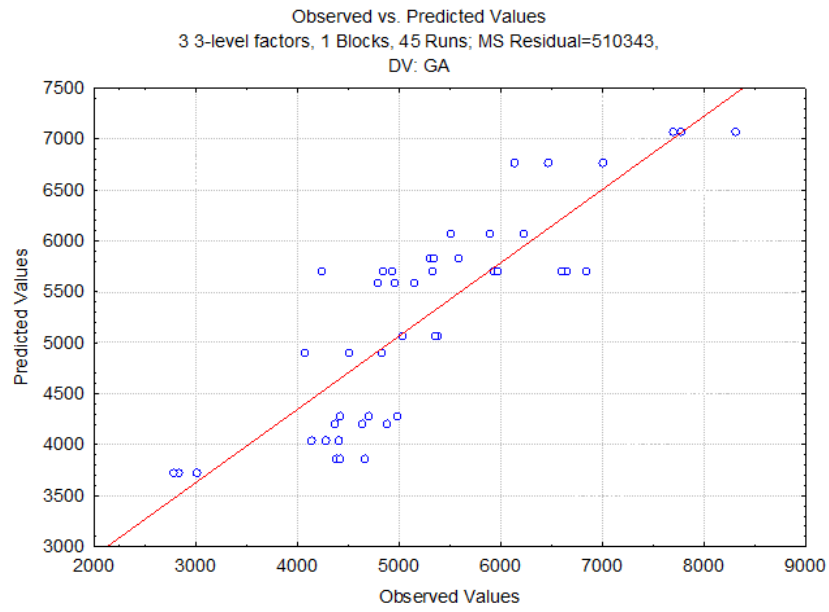
Plackett-Burman deney tasarımıyla BGD üretimi üzerine etkisi istatistiksel anlamda önemli bulunan fruktoz, NaNO₃ ve KH₂PO₄ değişkenlerinin etkin konsantrasyonlarının ve birbiri ile etkileşimlerinin belirlenmesi için cevap yüzey yöntemi kullanılmıştır.

Cevap yüzey yöntemi sonucu, BGD üretim miktarlarının elde edilen sonuçlar ve istatistiksel tahminleri Çizelge 3.6.' da sunulmuştur.

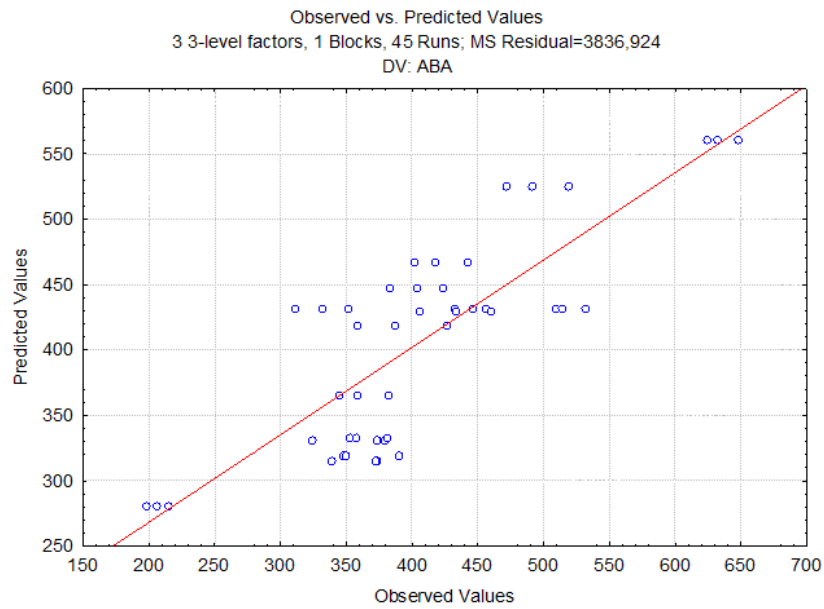
Çizelge 3.6 *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatının Box-Behnken deney tasarımı, deneysel ve tahmin edilen değerler

Deneme	GA Üretimi (mg/l)		ABA Üretimi (mg/l)		IAA Üretimi (mg/l)	
	Öngörülen	Gözlenen	Öngörülen	Gözlenen	Öngörülen	Gözlenen
1	5702,56	6692,83	431,77	518,64	34,87	39,41
2	4204,63	4630,33	314,94	361,44	23,04	23,07
3	7074,42	7926,17	560,55	634,92	51,76	55,41
4	6769,21	6538,67	525,07	494,02	40,14	37,12
5	5587,54	4966,33	446,82	403,50	39,97	40,24
6	5702,56	5742,83	431,77	444,77	34,87	35,32
7	5703,56	4672,00	431,77	331,89	34,87	29,87
8	4275,13	4701,17	331,22	359,09	23,43	27,03
9	5841,04	5405,33	467,03	420,53	43,61	43,57
10	6067,50	5872,00	429,85	433,03	31,78	31,20
11	3727,92	2876,17	280,89	206,52	17,09	13,45
12	5064,00	5259,50	365,00	361,82	31,99	32,57
13	3867,46	4488,67	319,25	362,58	25,87	26,49
14	4045,63	4276,17	332,66	363,71	26,26	29,28
15	4898,04	4472,00	418,48	390,61	44,22	40,62

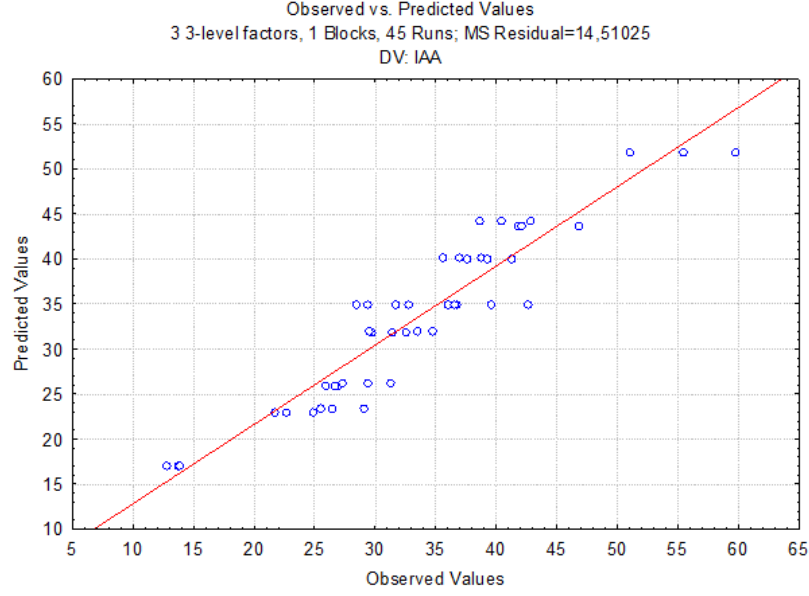
Cevap yüzey yöntemi ile BGD üretiminde gözlenen sonuçlar ve istatistiksel olarak öngörülen sonuçlar arasındaki ilişki GA, ABA ve IAA için sırasıyla Şekil 3.14., 3.15. ve 3.16.' da sunulmuştur.



Şekil 3.14. Cevap yüzey yöntemi ile GA üretiminde, gözlenen ve öngörülen sonuçlar arasındaki ilişki



Şekil 3.15. Cevap yüzey yöntemi ile ABA üretiminde, gözlenen ve öngörülen sonuçlar arasındaki ilişki



Şekil 3.16. Cevap yüzey yöntemi ile IAA üretiminde, gözlenen ve öngörülen sonuçlar arasındaki ilişki

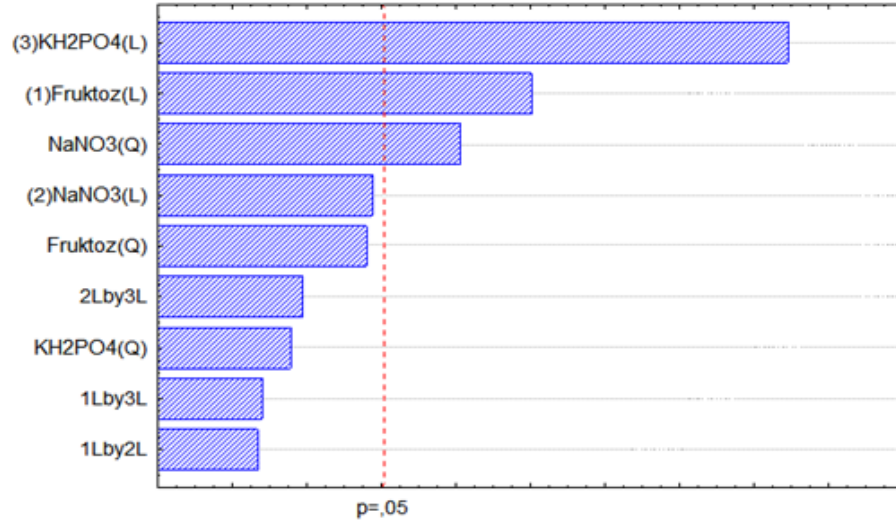
Pleurotus eryngii (Hakkari) izolatının Box-Behnken deney tasarımı ile derin kültür fermentasyonu sonucunda aşağıdaki eşitlik elde edilmiştir:

$$\text{GA ürünü (mg/l)} = 5117,708 + 585,750X_1 + 193,670X_1^2 + 274,292X_2 + 329,087X_2^2 + 1087,500X_3 - 84,122X_3^2 + 70,458X_1X_2 - 82,292X_1X_3 + 194,792X_2X_3$$

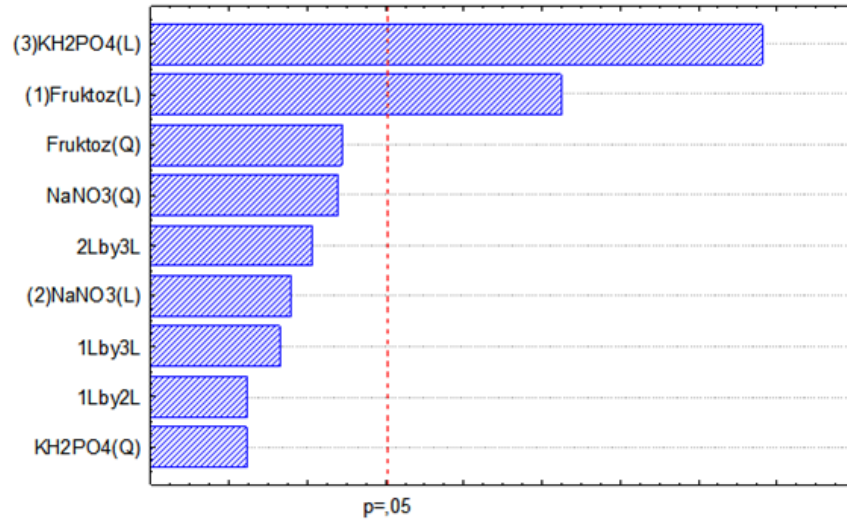
$$\text{ABA ürünü (mg/l)} = 399,3128 + 53,7040X_1 + 13,4195X_1^2 + 10,0771X_2 + 12,9933X_2^2 + 86,1269X_3 - 2,0716X_3^2 + 4,0936X_1X_2 + 11,6477X_1X_3 + 18,9394X_2X_3$$

$$\text{IAA ürünü (mg/l)} = 33,26306 + 8,72208X_1 + 0,39938X_1^2 - 1,67375X_2 + 0,34729X_2^2 + 8,61458X_3 + 0,45479X_3^2 - 0,45167X_1X_2 - 1,27083X_1X_3 - 0,06250X_2X_3$$

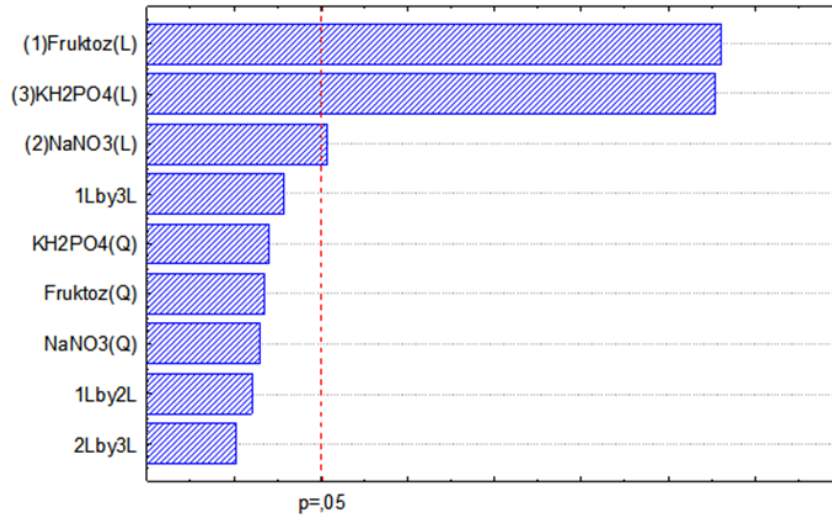
Cevap yüzey yönteminde kullanılan değişkenlerin *Pleurotus eryngii* (Hakkari) tarafından BGD üretimi üzerine etkisinin anlamlılık ve büyüklüğünü ifade eden Pareto grafikleri GA, ABA ve IAA için sırası ile Şekil 3.17., Şekil 3.18. ve Şekil 3.19.' da sunulmuştur.



Şekil 3.17. Cevap yüzey yönteminde kullanılan değişkenlerin *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu tarafından GA üretimi üzerine etkisi



Şekil 3.18. Cevap yüzey yönteminde kullanılan değişkenlerin *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu tarafından ABA üretimi üzerine etkisi



Şekil 3.19. Cevap yüzey yönteminde kullanılan değişkenlerin *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu tarafından IAA üretimi üzerine etkisi

Cevap yüzey yönteminde, *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu ile BGD üretiminin varyans ve regresyon analizi sonuçları GA, ABA ve IAA için sırasıyla Çizelge 3.7., Çizelge 3.8. ve Çizelge 3.9.' da sunulmuştur.

Çizelge 3.7. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu ile GA üretiminin varyans ve regresyon analizi sonuçları

Değişim kaynağı	Kareler toplamı (SS)	Serbestlik derecesi (SD)	Kareler ortalaması	F	p
Model	45742732	9	5082525,778	9,959	< 0,01
Kalan	17862006	35	510343,028		
Toplam	63604738	44			

Belirlilik katsayısı (R^2) = 0,7192, Korelasyon katsayısı (R) = 0,8481

Çizelge 3.8. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu ile ABA üretiminin varyans ve regresyon analizi sonuçları

Değişim kaynağı	Kareler toplamı (SS)	Serbestlik derecesi (SD)	Kareler ortalaması	F	p
Model	270875,5	9	30097,277	7,844	< 0,01
Kalan	134292,3	35	3836,922		
Toplam	405167,8	44			

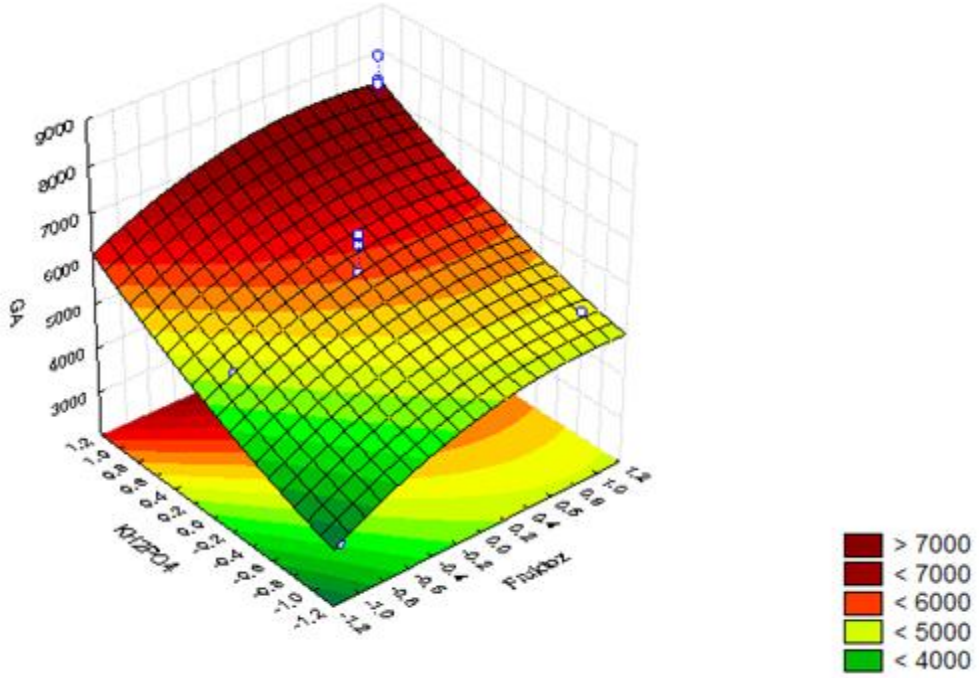
Belirlilik katsayısı (R^2) = 0,6685, Korelasyon katsayısı (R) = 0,8176

Çizelge 3.9. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu ile GA üretiminin varyans ve regresyon analizi sonuçları

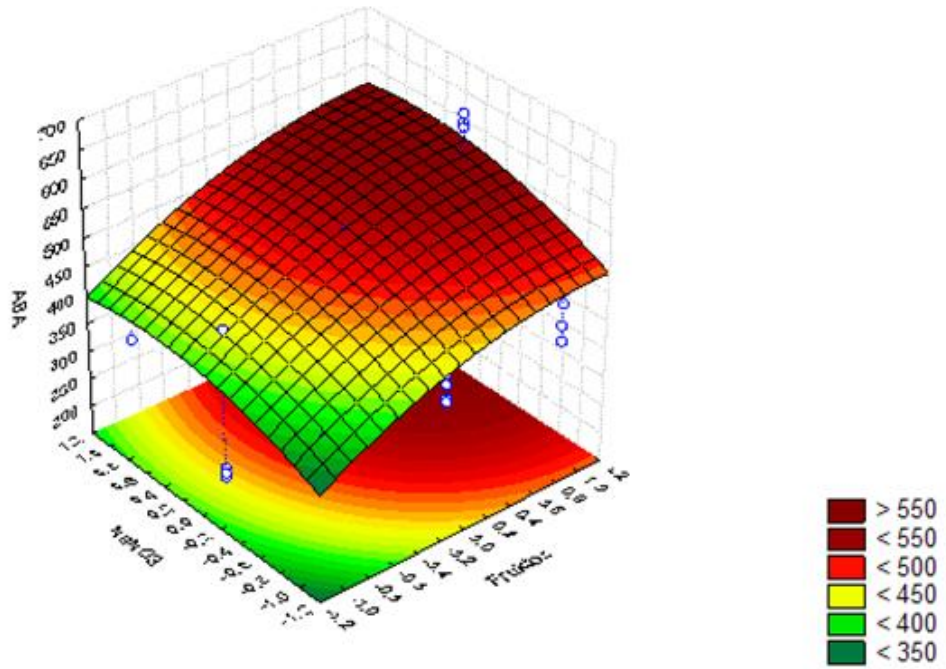
Değişim kaynağı	Kareler toplamı (SS)	Serbestlik derecesi (SD)	Kareler ortalaması	F	p
Model	3714,723	9	412,747	28,445	< 0,01
Kalan	507,859	35	14,51		
Toplam	4222,582	44			

Belirlilik katsayısı (R^2) = 0,8797, Korelasyon katsayısı (R) = 0,9375

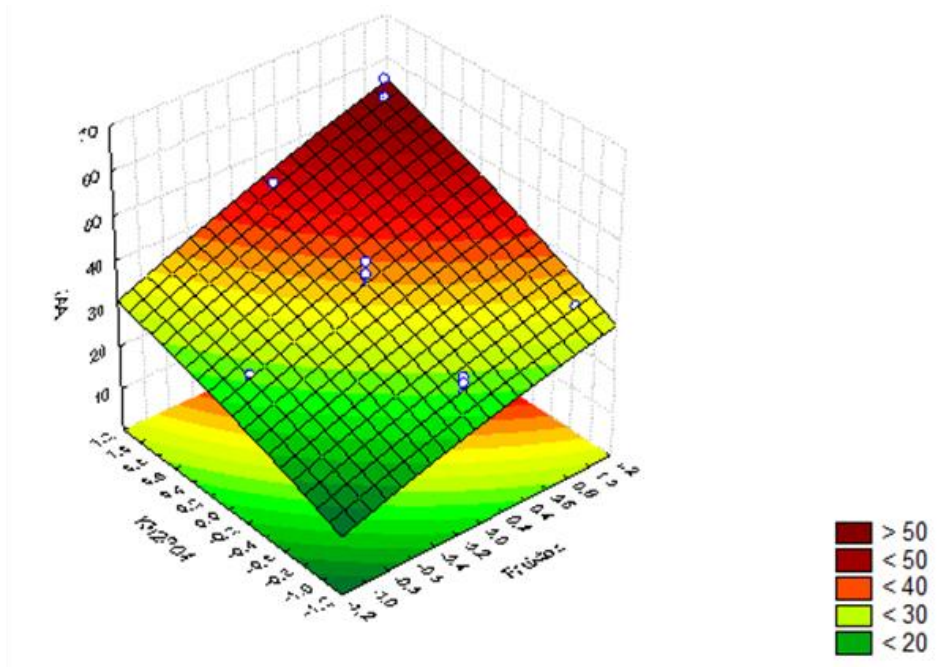
Cevap yüzey yönteminde kullanılan değişkenlerin *Pleurotus eryngii* (Hakkari) tarafından BGD üretimi üzerindeki etki analizlerini ifade eden grafikler GA, ABA ve IAA için sırası ile Şekil 3.20., Şekil 3.21 ve Şekil 3.22. de sunulmuştur.



Şekil 3.20. Cevap yüzey yönteminde *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu tarafından GA üretiminde kullanılan değişkenlerin etki analizi



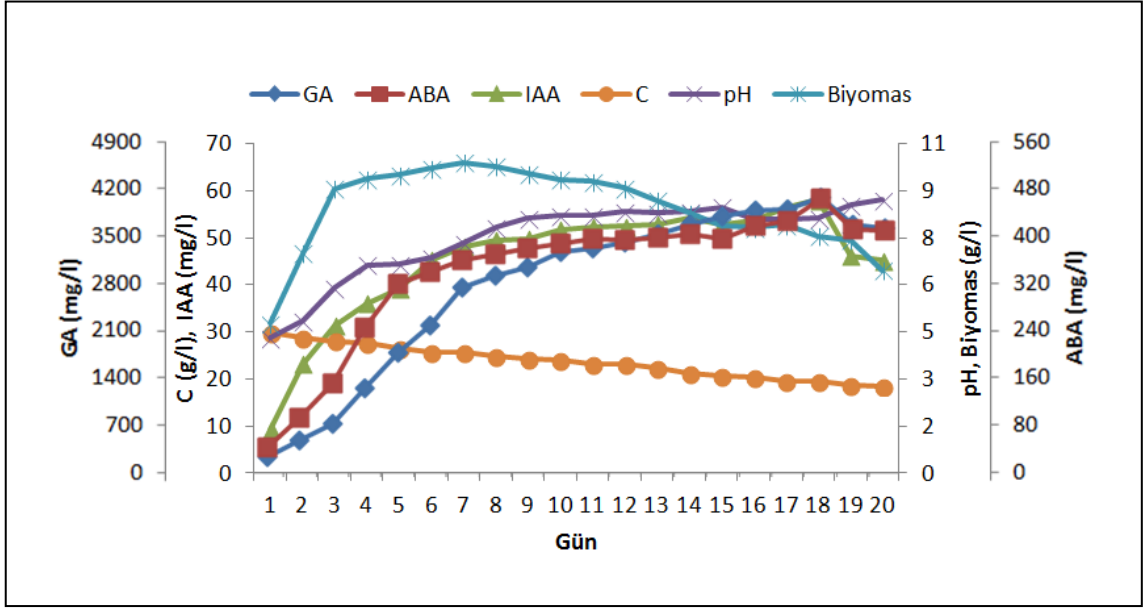
Şekil 3.21. Cevap yüzey yönteminde *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu tarafından ABA üretiminde kullanılan değişkenlerin etki analizi



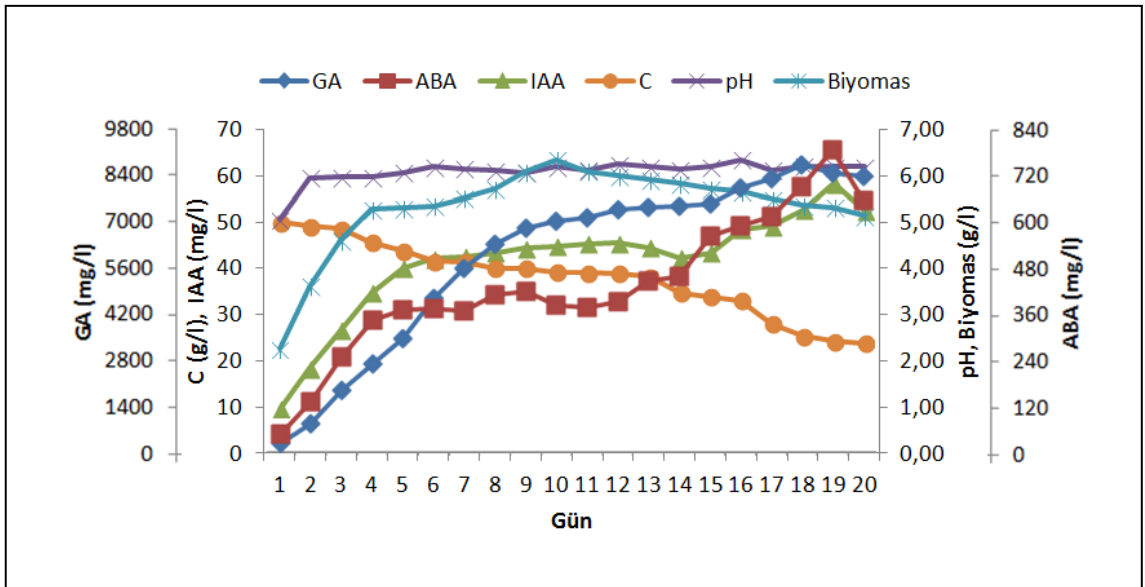
Şekil 3.22. Cevap yüzey yönteminde *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu tarafından IAA üretiminde kullanılan değişkenlerin etki analizi

3.1.4. Elde Edilen Optimize Koşulların Derin Kültür Koşullarına Uygulanması

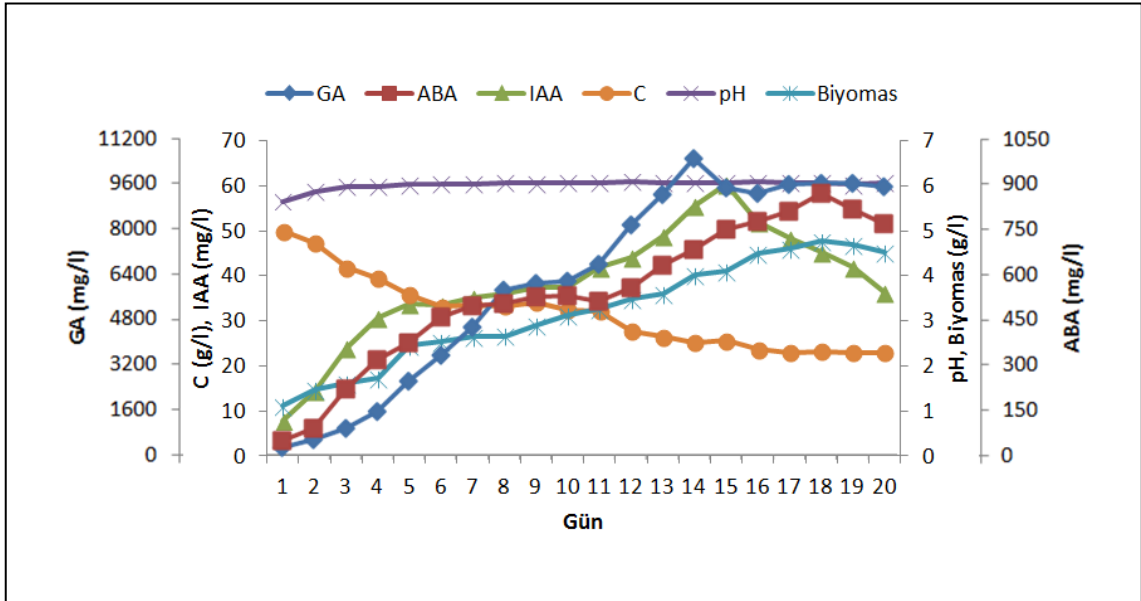
Çalışmanın bu aşamasında, *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatının optimize olmayan koşullarda erlen ölçeğinde, optimize olan koşullarda erlen ölçeğinde ve optimize olan koşullarda reaktör ölçeğinde büyütülmesi sırasında BGD üretimleri zamana bağlı olarak izlenmiş ve karşılaştırılmıştır. Diğer deneysel parametreleri de içeren büyüme özellikleri ile; optimize olmayan koşullarda erlen, optimize olan koşullarda erlen ve optimize olan koşullarda reaktör ölçeğinde üretim verileri sırası ile Şekil 3.23., Şekil 3.24. ve Şekil 3.25.' de sunulmuştur. Sonuç olarak *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu tarafından karıştırılmalı tank tipi reaktörde BGD üretimi başarı ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.26).



Şekil 3.23.. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu ile optimize olmayan koşullarda erlen ölçęinde BGD üretimi sırasında büyüme özellikleri



Şekil 3.24. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu ile optimize olan koşullarda erlen ölçęinde BGD üretimi sırasında büyüme özellikleri



Şekil 3.25. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu ile optimize olan koşullarda reaktör ölçüğünde BGD üretimi sırasında büyüme özellikleri



Şekil 3.26. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu ile optimize olan koşullarda reaktör ölçüğünde BGD üretimi

3.1.5. BGD Üretiminde Kinetik Parametrelerin Tayini

Pleurotus eryngii (Hakkari) izolatının optimize olan ve olmayan koşullarda erlen ölçeğinde ve optimize koşullarda reaktör ölçeğinde büyütülmesi sırasında üretilen biyomas (X), tüketilen karbon kaynağı (S) ve üretilen BGD (P) miktarlarının izlenmesi ile hesaplanan kinetik parametreler Çizelge 3.10. de sunulmuştur.

Çizelge 3.10. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatının optimize olan ve olmayan koşullarda farklı ölçeklerde büyüme kinetiği ve verim katsayısı verileri

Kinetik Parametreler		Deneme Grupları		
		Optimize Olmayan (Erlen)	Optimize (Erlen)	Optimize (Reaktör)
μ (1/d)		0,32	0,28	0,08
r_s (g/L/d)		- 0,61	- 1,38	- 1,42
Q_s (g/g/d)		- 0,09	- 0,27	- 0,31
GA	r_p (mg/L/d)	177,00	425,71	486,11
	Q_p (mg/g/d)	27,40	82,82	107,43
ABA	r_p (mg/L/d)	19,23	31,98	38,04
	Q_p (mg/g/d)	2,98	6,22	8,41
IAA	r_p (mg/L/d)	1,89	2,25	1,49
	Q_p (mg/g/d)	0,29	0,44	0,33
$Y_{x/s}$ (g/g)		0,56	0,20	0,17
GA	$Y_{p/s}$ (mg/g)	291,14	308,82	341,47
	$Y_{p/x}$ (mg/g)	520,59	1573,65	2041,14
ABA	$Y_{p/s}$ (mg/g)	31,64	23,20	26,72
	$Y_{p/x}$ (mg/g)	56,57	118,20	159,72
IAA	$Y_{p/s}$ (mg/g)	3,10	1,63	1,05
	$Y_{p/x}$ (mg/g)	5,54	8,33	6,27

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Endüstriyel mikrobiyolojinin en önemli ilgi alanlarından birisi mikrobiyal ürünlerin endüstriyel boyutta üretilebilmesinin koşullarını oluşturmak ve üretim verimini arttırmaktır. Bu amaca yönelik olarak en sık kullanılan stratejilerden ikisi yeni üretici mikroorganizmalar bulmak ve üretici mikroorganizmaların üretim koşullarını optimize ederek üretim verimini arttırmaktır. Bu çalışmada makrofunguslar tarafından BGD üretim verimini arttırmak için her iki strateji de kullanılmıştır. Öncelikle bir tarama çalışması gerçekleştirilerek yüksek miktarda BGD üreten izolat(lar) seçilmiş, daha sonra da üretim koşullarının optimize edilmesi ile üretim verimi arttırılmaya çalışılmıştır.

4.1.1. Makrofungus Kültürlerinin GA, ABA ve IAA Üretim Potansiyelleri Açısından Taranmaları

Çalışma materyalini oluşturan makrofungus suşları, kültür koleksiyonumuzun listesinden çeşitli ekofizyolojik grupları ve illeri temsil edecek biçimde seçilmiş olup çalışma kapsamında toplam 103 makrofungus izolatı kullanılmıştır. Koleksiyonumuzda yer alan bazı makrofungus izolatlarının GA, ABA ve IAA üretim değerleri izlenmiş ve diğerlerinden daha yüksek miktarda BGD üreten makrofungus izolatları belirlenmiştir (Çizelge 3.1.).

GA üretimi açısından, *Inonotus hispidus* (OBCC 5009), Tanımlanmamış izolat (OBCC 5028), *Leucoagaricus pudicus* (OBCC 1002), *Pleurotus eryngii* (Elazığ), , *Pleurotus calyptratus* (Ag 461), *Pleurotus eryngii* (Tunceli) ve *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatları diğerlerine göre daha önde görülmektedir. Bu izolatlar 1000 mg/l GA üretim sınırını aşmış izolatlar olup en yüksek üretim değeri 2580,50 mg/l ile *Pleurotus eryngii* (Hakkari) tarafından elde edilmiştir. Pozitif kontroller arasında *Gibberella fujikuroi* izolatının en yüksek üretim değeri olarak 1666,17 mg/l GA üretimi sunduğu dikkate alınırsa, *Pleurotus eryngii* (Hakkari) tarafından elde edilen değer oldukça yüksek bir değer olduğu görülebilir.

ABA üretimi açısından pozitif kontrol olarak kullanılan izolatlar 73,61 – 188,32 mg/l aralığında üretim değerleri ifade etmişlerdir. Bu değerler ile rekabet edebilecek seviyede ABA üretimi gerçekleştiren izolatlar, sırası ile, 255,49, 223,37, 204,30 ve 191,49 mg/l ABA üretim değerleri ile *Pleurotus eryngii* (Hakkari), *Pleurotus eryngii* (Tunceli), *Leucoagaricus pudicus* (OBCC 1002) ve *Pleurotus eryngii* (Elazığ) izolatları olmuştur. Bu izolatlar, tarama çalışmasında kullanılan diğer izolatlar arasından belirgin biçimde sıyrılmışlardır. GA üretiminde olduğu gibi ABA üretiminde de *Pleurotus eryngii* (Hakkari) tarafından elde edilen değerler oldukça yüksek bir değer olduğu görülebilir.

En yüksek IAA üretim değerleri, sırası ile *Leucoagaricus pudicus* (OBCC 1002), *Pleurotus eryngii* (Hakkari), *Pleurotus eryngii* (Tunceli) ve *Pleurotus eryngii* (Elazığ) izolatları ile 29,78 – 20,22 mg/l aralığında elde edilmiştir.

Her üç BGD ye ait üretim değerlerinin birlikte değerlendirilmesi ile *Pleurotus calyptratus* (Ag 461), *Pleurotus eryngii* (Elazığ), *Pleurotus eryngii* (Tunceli) ve *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatlarının BGD üretimi açısından en ümit verici izolatlar oldukları belirlenmiştir. (Şekil 3.1.). Diğer izolatlar içinde belirgin bir fark yaratması nedeni ile çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılmak üzere İTK ile BGD üretimi doğrulanan *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatı seçilmiştir. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatının, pozitif kontrol olarak kullanılan 6 organizmadan daha yüksek BGD üretim potansiyeline sahip olduğu görülmektedir.

Yüksek ticari önemine karşın BGD üretimi gerçekleştiren yeni mikroorganizma izolatları araştırmaya yönelik tarama çalışmaları bilim dünyasının yoğun ilgisini çekememiş bir araştırma konusudur. Bu amaçla sadece Srivastava ve ark. (2003) 19 *Fusarium* türüyle, Battal vd. (2004) ise 14 farklı kurutulmuş makrofungus türü ile tarama çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Literatürde bu iki çalışma dışında kapsamlı bir tarama çalışması görülememektedir. Bu nedenle Çizelge 1.1. ve Çizelge 2.1. de sunulan veriler göz önünde bulundurulduğunda birçok yeni makrofungus izolatının BDG üretim potansiyeli ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

Bu çalışmada zaman ve kaynak azlığı nedeni ile sadece *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatı üzerine yoğunlaşmış olsa da, gelecekte araştırılmaya aday çok sayıda

BGD üreticisi makrofungus izolatının varlığı bu çalışmanın yeni ve ardışık projeler ortaya çıkarmış olduğunu göstermektedir.

4.1.2. Bitki Gelişim Düzenleyicisi (BGD) Üretimini Arttıran Kültür Yönteminin Belirlenmesi

Çalışmanın bu aşamasında, *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatının BGD (GA, ABA ya da IAA) üretimi üç farklı kültür sisteminde büyümesi sırasında zamana bağlı olarak izlenmiştir. Derin kültür, statik kültür ve katı faz kültür tipleri karşılaştırılmış 3 gün örnekleme aralıklarıyla BGD ölçümleri yapılmıştır.

GA üretimi açısından en iyi üretim; derin kültürde 4438,67 mg/l ile inkübasyonun 18. gününde, statik kültürde 771,83 mg/l ile inkübasyonun 24. gününde ve katı faz kültür tipinde 653,67 mg/l ile inkübasyonun 24. gününde belirlenmiştir.

ABA üretimi açısından en iyi üretim; derin kültürde 441,82 mg/l ile 24. günde, statik kültürde 96,79 mg/l ile 24. günde ve katı faz kültür tipinde 64,80 mg/l ile 18. günde görülmüştür.

IAA üretimi açısından ise en iyi üretim; derin kültürde 54,32 mg/l ile 18. günde, statik kültürde 10,20 mg/l ile 21. günde ve katı faz kültür tipinde 7,79 mg/l ile 18. günde görülmüştür.

Her 3 BGD için de en iyi üretim derin kültür koşullarında elde edilmiştir. En iyi üretim günü olarak ise GA ve IAA için 18. gün ABA asit içinse 24. gün görülmektedir. Ancak ticari potansiyeli, kullanım oranı ve organizmanın üretim potansiyeli açısından GA' in ön plana çıkması, bununla beraber ABA üretiminde 18. ve 24. (sırasıyla 436,95 mg/l ve 441,82 mg/l) gün sonunda elde edilen değerlerin birbirine çok yakın olması sebebiyle çalışmanın sonraki aşamaları derin kültür yönteminde ve 18 günlük inkübasyon süresi üzerinden yürütülmüştür.

Fermentasyon ile mikrobiyal metabolit üretiminin optimizasyonu, çeşitli araştırma gruplarının ilgisini çekmiş bir konudur. Farklı kültür tiplerinin mikrobiyal

metabolit üretimine etkisi de farklı araştırmacılar tarafından sorgulanmıştır. Karakoç ve Aksöz, 2005 ve 2006 yıllarında yaptıkları çalışmalarda derin kültür ve statik kültür tipleriyle beraber aydınlık ve karanlık ortamın BGD üretimi üzerine etkisini incelemiş, karanlık ortamda ve derin kültür sisteminde artırdığını tespit etmişlerdir. Machado et al., (2002) *Gibberella fujikuroi* ile GA üretiminde katı faz fermentasyonu ile derin kültür fermentasyonunu karşılaştırmışlar ve katı faz fermantasyonu ile 6,1 kat daha yüksek GA₃ verimi elde etmişlerdir. Kültür tipinin mikrobiyal ürün verimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu, çalışılan suşa göre farklılık gösterdiği anlaşılmaktadır.

4.1.3. İstatistiksel Deneş Tasarımı ile BGD Üretimini Optimizasyonu

Endüstriyel mikrobiyolojide mikrobiyal ürün verimini arttırmak için mikroorganizmanın büyüme ortamındaki besinsel ve çevresel koşulların optimize edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla en sık kullanılan yöntem araştırmanın her aşamasında sadece bir faktörün değiştirilmesi ile uygulanan “bir zamanda bir faktör yöntemi” dir. Oysa çok sayıda faktörün aynı zamanda çalışılmasını mümkün kılan istatistiksel deney tasarımları, kısa zamanda ve daha güvenilir sonuç elde edebilme, ürün üzerine etki eden faktörlerin etkileşimini belirleyebilme, uygulanan deney sayısında azalma gibi önemli avantajlara sahiptir. Bu yaklaşımla, çalışmada zaman, enerji ve para yönünden ekonomik olan istatistiksel deney tasarım yöntemleri tercih edilmiş ve *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu tarafından BGD üretimini arttıran koşullar (karbon kaynağı tipi, azot kaynağı tipi, mineral madde tipi), cevap yüzey yöntemi ile de bu değişkenlerden etkili olanların etkin konsantrasyonları başarılı biçimde belirlenmiştir.

Plackett – Burman deney tasarımı ile *Pleurotus eeryngii* (Hakkari) tarafından BGD üretimi üzerine etkiye sahip olması olası 15 farklı besinsel ve çevresel değişken arasından üretimi en fazla arttıran değişken(ler)i seçmek amacıyla sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda her bir BGD için değişkenlerin etki boyutları katsayılarla ifade edilerek veriler formülüze edilmiş ve değerlendirmeler bu formüller üzerinden yapılmıştır.

GA için karbon kaynağı olarak denenen değişkenlerden glikoz (339,146) , laktoz (416,375) ve fruktozun (535,479) yüksek değerinin (%3), sukrozun (-384,896) ise düşük değerinin (%0) üretimi artırdığı belirlenmiştir. Bu durumda fruktoz en yüksek pozitif katsayı ile üretimi en çok artıran karbon kaynağı olarak belirlenmiştir. Azot kaynağı olarak denenen değişkenlerden NH_4NO_3 (-442,375), Yeast ekstrakt (-26,833) ve Triptonun (-207,667) düşük değerinin (% 0) NaNO_3 ' ün (992,063) ise yüksek değerinin (% 0,3) üretimi artırdığı belirlenmiştir. NaNO_3 en yüksek katsayı ile üretimi en çok artıran azot kaynağı olarak belirlenmiştir. Mineral olarak denenen değişkenlerden FeSO_4 'ın (-191,042) düşük değerinin (% 0), MgSO_4 (486,604) ve KH_2PO_4 ' ün (994,917) yüksek değerinin (% 0,1) üretimi artırdığı belirlenmiştir. KH_2PO_4 en yüksek katsayı ile üretimi en çok artıran mineral madde olarak belirlenmiştir. Ayrıca tiamin (232,229), pH (206,875) ve karıştırma hızının (80,313) yüksek değerleri, sıcaklığın (592,167) ise düşük değeri üretimi daha fazla artırmaktadır. Bu veriler Şekil 3.11 de ifade edilen Pareto grafiği ile de doğrulanmaktadır.

ABA için elde edilen veriler GA için elde edilen verilerle paralellik göstermektedir. Bu veriler Şekil 3.12 de ifade edilen Pareto grafiği ile de doğrulanmaktadır. IAA için ise karbon kaynağı olarak fruktoz yerine glikoz üretimi en fazla artıran karbon kaynağı olarak belirlenmiştir. Buna rağmen daha önce belirtildiği gibi ticari potansiyeli, kullanım oranı ve organizmanın üretim potansiyeli açısından GA' in ön plana çıkması nedeniyle IAA için elde edilen verilerdeki karbon kaynağı farklılığı göz ardı edilmiştir.

Bu veriler ışığında Plackett – Burman deney tasarımı yardımıyla seçilen değişkenler Çizelge 4.1. de belirtildiği şekliyle cevap yüzey yöntemine taşınmıştır.

Cevap yüzey yöntemi değişkenlerin etkin düzey konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla uygulanmaktadır. Bu kapsamda Plackett – Burman deney tasarımı yardımıyla belirlenen değişkenler için Box Behnken tasarımı doğrultusunda 3 farklı konsantrasyon denenmiştir.

Çizelge 4.1. Plackett – Burman deney tasarımı yardımıyla seçilen değişkenler

Değişkenler		Konsantrasyon
Karbon kaynağı (%)	Fruktoz	3
Azot kaynağı (%)	NaNO ₃	0,3
Mineral (%)	KH ₂ PO ₄	0,1
Vitamin	Tiamin(µg/l)	1000
İnkübasyon Sıcaklığı (°C)		25
Besiyeri Başlangıç pH		7
Karıştırma Hızı (rpm)		150

Şekil 3.17., Şekil 3.18 ve Şekil 3.19.’ un birlikte incelenmesi ile fruktoz ve KH₂PO₄’ ün BGD üretimi üzerine doğrusal etkilerinin yüksek olduğu görülmektedir. Diğer taraftan NaNO₃’ ün IAA üretimine doğrusal etkisinin, diğer iki BGD üretimi üzerine ise karesel etkisinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Her üç değişkenin etkileşimini ifade eden grafikler Şekil 3.20, Şekil 3.21. ve Şekil 3.22.’ de sunulmuştur. Her 3 BGD için de fruktoz ve KH₂PO₄’ ün yüksek düzeyi NaNO₃’ ün ise orta düzeyi optimum koşullar olarak belirlenmiştir. Bu veriler ışığında istatistiksel deney tasarımı ile BGD üretiminin optimizasyonu sonucunda belirlenen optimum besinsel ve çevresel koşullar Çizelge 4.2. de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Optimum besinsel ve çevresel koşullar

Besinsel ve Çevresel Koşullar		Konsantrasyon
Karbon kaynağı (%)	Fruktoz	5
Azot kaynağı (%)	NaNO ₃	0,3
Mineral (%)	KH ₂ PO ₄	0,15
Vitamin (µg/l)	Tiamin	1000
İnkübasyon Sıcaklığı (°C)		25
Besiyeri Başlangıç pH		7
Karıştırma Hızı (rpm)		150

Çalışmanın bu aşamasına kadar gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu tarafından BGD üretimine olumlu etki eden kültür tipi, besiyeri bileşimi ve besiyeri bileşen konsantrasyonları deneysel tasarım yöntemleri

ile belirlenmiştir. Bu aşamada *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu tarafından BGD üretiminin optimizasyonuna ilişkin üretim değerleri Çizelge 4.3. de özetlenmiştir.

Çizelge 4.3. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu tarafından optimizasyondan önce ve sonra BGD üretim değerlerinin karşılaştırılması

	BGD Üretimi		
	(mg/l)		
	GA	ABA	IAA
Optimize edilmeden önce (Tarama aşaması)	2580,50	255,49	25,96
Optimize edilmeden önce (Derin kültür aşaması)	4438,67	436,95	54,32
PB ile optimizasyondan sonra	6904,33	741,67	51,29
RSM ile optimizasyondan sonra	7926,17	634,92	55,41

Elde edilen verilere göre Plackett-Burmann deney tasarımı ile GA, ABA ve IAA üretim değerleri başlangıç değerlerine göre sırası ile 2,68, 2,90 ve 1,98 kat arttırılmıştır. Cevap yüzey yöntemi sonrasında ise üretim değerlerinin başlangıç değerlerine göre sırası ile 3,07, 2,49 ve 2,13 kat fazla BGD üretildiği görülmektedir.

Pleurotus eryngii (Hakkari) izolatu tarafından BGD üretiminin varyans ve regresyon analizi sonuçları öngörülen modellerin belirlilik katsayı (R^2) değerlerinin GA, ABA ve IAA için sırası ile 0,7192, 0,6685 ve 0,8797 olarak belirlenmiştir. Bu durum elde edilen üretim değerlerinin öngörülen modelleri sırası ile % 71,92, 66,85 ve 87,97 oranlarında tanımladığını göstermektedir. Elde edilen verilerin birlikte değerlendirilmesi sonucunda kullanılan deneysel tasarım yöntemlerinin BGD üretim optimizasyonu için başarılı modeller olduğu öngörülebilir.

4.1.4. Elde Edilen Optimize Koşulların Derin Kültür Koşullarına Uygulanması

Çalışmanın bu aşamasında, *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatının optimize olmayan koşullarda erlen ölçeğinde, optimize olan koşullarda erlen ölçeğinde ve optimize olan koşullarda reaktör ölçeğinde büyütülmesi sırasında BGD üretimleri zamana bağlı olarak izlenmiş ve karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.4. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatının optimize olan ve olmayan koşullarda farklı ölçeklerde BGD üretim verileri

BGD	İnceleme parametresi	Deneme Grupları		
		Optimize Olmayan (Erlen)	Optimize (Erlen)	Optimize (Reaktör)
GA	Makmimum üretim miktarı (mg/l)	4060,38	8743,08	10545,00
	Maksimum üretim zamanı (gün)	18	18	14
ABA	Makmimum üretim miktarı (mg/l)	463,50	787,23	872,32
	Maksimum üretim zamanı (gün)	18	19	18
IAA	Makmimum üretim miktarı (mg/l)	58,07	58,35	60,48
	Maksimum üretim zamanı (gün)	18	19	15

Pleurotus eryngii (Hakkari) izolatının optimize olmayan koşullarda erlen ölçeğinde ve optimize olan koşullarda erlen ölçeğinde BGD üretim verileri karşılaştırıldığında; GA miktarının optimize koşullarda yaklaşık olarak 2,1 katına çıktığı

bununla beraber her iki koşulda da maksimum üretim zamanının 18. gün olduğu belirlenmiştir. ABA miktarının optimize koşullarla 1,6 katına çıktığı maksimum üretim zamanının optimize olmayan koşullar için 18. gün optimize koşullar için ise 19. gün olduğu belirlenmiştir. IAA miktarında ise gözle görülür bir artış olmamıştır.

Optimize olan koşullarda erlen ölçüğünde ve optimize olan koşullarda reaktör ölçüğünde BGD üretim verileri karşılaştırıldığında reaktör koşullarında GA miktarının 1,2 katına çıktığı maksimum üretim zamanının erlen koşulları için 18. gün reaktör koşulları için ise 14. gün olduğu görülmektedir. ABA miktarının reaktör koşullarında 1,1 katına çıktığı maksimum üretim zamanının erlen koşulları için 19. gün reaktör koşulları için ise 18. gün olduğu görülmektedir. IAA miktarında ise gözle görülür bir artış olmamıştır.

Özet olarak optimizasyon sonucu GA ve ABA miktarları yaklaşık olarak 2 katına çıkmış IAA için ise önemli bir değişim gözlenmemiştir. Optimize erlen koşulları başarılı bir şekilde reaktör koşullarına taşınmış ve BGD üretim miktarı GA, ABA ve IAA için sırasıyla 10545, 872,32 ve 60,48 mg/l olarak belirlenmiştir.

Fermentasyon ile mikrobiyal metabolit üretiminin optimizasyonu, çeşitli araştırma gruplarının ilgisini çekmiş bir konudur. Reaktör ölçüğünün mikrobiyal metabolit üretimine etkisi de farklı araştırmacılar tarafından sorgulanmıştır. Durán-Páramo et al., (2004) *Gibberella fujikuroi* ile GA üretiminde erlenlerde derin kültür fermentasyonu ile ve ayrıca karıştırmalı ve sabit yatak reaktörlerde serbest ve immobilize hücreleri karşılaştırmışlar ve serbest hücrelerde karıştırmalı reaktörde 0,206 g/L ve gram biyomass başına 0,078 g GA₃ elde edilmiştir. Machado et al., (2004) *Gibberella fujikuroi* ile GA üretiminde kahve kabuğu ve cassava küspesinin substrat olarak kullanıldığı sıkıştırılmış yatak biyoreaktörde katı faz fermentasyonu ile fermentasyonun 6. gününde kg substrat başına 0,925 g GA₃ elde ettiklerini bildirmişlerdir. Silva et al., (1999) biyoreaktörde *Gibberella fujikuroi* ile 1100 mg/L GA ürettiklerini bildirmişlerdir. Escamilla-Silva et al., (2000) *Gibberella fujikuroi* ile GA üretiminin kesikli kültür ile akışkan yatak tipi biyoreaktörde 3,90 g/L ye

ulaşabildiğini ve bu değerin daha önceki derin kültür ve katı fermentasyon değerlerinden 3 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

4.1.5. BGD Üretiminde Kinetik Parametrelerin Tayini

Çizelge 3.10.' da sunulan kinetik parametreler *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatının optimize olan ve olmayan koşullarda erlen ölçüğünde ve optimize koşullarda reaktör ölçüğünde büyütülmesi sırasında BGD üretim kinetiği hakkında değerli bilgiler sunmaktadır. Elde edilen verilere göre organizmanın spesifik büyüme hızı (μ) giderek düşüyor gibi görünse de günde her besiyeri litresi başına (r_s) ve üretilen her gram biyomas başına (Q_s) tüketilen karbon kaynağı miktarının artmakta olduğu görülmektedir. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu optimize olmayan koşullarda erlen ölçüğünde inkübasyon sırasında her gün ortamın her litresinde bulunan karbon kaynağının sadece 0,61 g kadarını tüketmektedir. Oysa bu değer optimize ortamda reaktör ölçüğünde 1,42 grama çıkmaktadır. Bu durum reaktör ölçüğünde biyomas üretiminin azalma eğilimine karşın karbon kaynağının tüketiminin artması durumunu açıklama gereği doğurmaktadır. *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu tarafından reaktör ölçüğünde karbon kaynağı tüketiminin artmasının BGD üretimi ile ilişkili olduğunu düşünüyoruz. Nitekim optimize olmayan erlen koşullarından optimize reaktör koşullarına geçerken spesifik büyüme hızının (μ) nispeten düşmesine karşın her litre besiyeri başına (r_p) ve her gram biyomas başına (Q_p) üretilen BGD miktarlarının GA ve ABA için belirgin biçimde arttığı görülmektedir. IAA da çok hafif bir azalma görülse de üretim değerinin çok düşük olması nedeni ile bu durumun rahatlıkla ihmal edilebileceğini düşünüyoruz. Verim parametreleri açısından incelendiğinde de durum benzer görülmektedir. Optimize olmayan erlen koşullarından optimize reaktör koşullarına geçerken organizmanın tükettiği her gram substrat başına ürettiği biyomas miktarı ($Y_{x/s}$) azalmakta ise de gerek her gram substrat başına üretilen BGD ($Y_{p/s}$) değeri gerekse her gram biyomas başına üretilen BGD ($Y_{p/x}$) değerleri incelendiğinde şiddetli bir artış görülmektedir. Örnek olarak *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatu tarafından her litre besiyeri başına üretilen günlük GA miktarının (r_p) 486,11 mg ve her

gram biyomas tarafından inkübasyon süresince üretilen toplam GA miktarının ($Y_{p/x}$) 2041,14 mg olduğu dikkate alınırsa üretimin ekonomik potansiyeli de ortaya çıkacaktır. Bu veriler organizmanın sadece reaktör ölçeğinde BGD üretimini başardığını değil, aynı zamanda belirgin biçimde arttırdığını da göstermektedir. Bu nedenle *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatının endüstriyel boyutta BGD ve özellikle GA üretimi için çok önemli potansiyele sahip olduğu anlaşılmaktadır. Eldeki veriler bize organizmanın reaktör koşullarında büyüme hızını azalttığını, buna karşın BGD üretimini arttırdığını söylemektedir ki bu endüstriyel boyutta üretim açısından çok istenen bir durumdur. Bu çalışma ile ilk kez olarak *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatı ile karıştırmalı tank reaktör ölçeğinde BGD üretiminin gerçekleştirmiş olması eldeki verilere heyecan verici bir boyut katmaktadır. Bu veriler ışığında gelecekte daha büyük ölçekli reaktörler ile çalışmaların sürdürülmesi de çekici bir araştırma konusu haline gelmiştir.

Özet olarak bu çalışmada, 103 makrofungus izolatının BGD üretme potansiyelleri belirlenmiş ve seçilen izolatların BGD üretimleri onaylanmıştır. Seçilen *Pleurotus eryngii* (Hakkari) izolatının BGD üretimini en fazla derin kültür sistemi ile gerçekleştirdiği belirlenmiş ve istatistiksel deney tasarım yöntemlerinin kullanımı ile maksimum üretimin gerçekleştirildiği koşullar belirlenerek besiyeri tasarımı gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak GA, ABA ve IAA üretim değerleri başlangıç değerlerine göre sırası ile 4,1, 3,4 ve 2,3 kat arttırılmıştır. Ayrıca, optimize olmayan ve olan koşulların birlikte kullanıldığı üretim modelleri ile üretim ölçeği fermentör koşullarına büyütülmüştür. Sonraki çalışmalarda bu organizma ile üretilen BGD lerin farklı bitkilerde *in vivo* etkinliğinin belirlenmesi ve farklı üretici izolatlar ile benzer optimizasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi tasarlanmaktadır.

5. KAYNAKLAR

- AKSÖZ, N., Aksöz, E., Cihangir, N., Özeş, O. N., 1989, Bazı Gıda Endüstrisi Atık ve Artıklarını Kullanarak *Gibberella fujikuroi*'den Gibberellik Asit ve Tek Hücre Proteini Eldesi, (TUBİTAK projesi), Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü.
- BATTAL, P., Türker, M., Uzun, Y., Demirel, K., 2004, Tileklioğlu, B., Keleş, A., Kurutulmuş Bazı Makrofunguslardaki Bitki Hormonlarının Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi Yöntemi (Hplc) İle Tespiti, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir.
- BHALLA, K., Bala Singh, S., Agarwal, R., 2010, Quantitative determination of gibberellins by high performance liquid chromatography from various gibberellins producing *Fusarium* strains, *Environ Monit Assess*, 167, 515–520.
- BİLKAY, I.A., Karakoç, Ş., Aksöz, N., 2010, Indole-3-acetic acid and gibberellic acid production in *Aspergillus niger*, *Turk J Biol*, 34, 313-318.
- BÖMKE, C., Tudzynski, B., 2009, Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria, *Phytochemistry*, 70, 1876–1893.
- ÇİHANGİR, N., Aksöz N., 1997, Evaluation of Some Food Industry Wastes for Production of Gibberellic Acid by Fungal Source, *Environmental Technology*, 18, 5.
- ÇETİN, N., 2004, Mikrobiyal Yolla Üretilen İndol Asetik Asidin Zeytin Hasadında Kullanılma Olanakları, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- COUTO S.R., Moldes D. Liébanas A., Sanromán A., 2003, Investigation of several bioreactor configurations for laccase production by *Trametes versicolor* operating in solid-state conditions, *Biochemical Engineering Journal*, 15, 21-6.

KAYNAKLAR (Devam)

- COUTO, S.R., Sanroman, M.A., Hofer, D., Gübitz, G.M., 2004, Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes, *Bioresource Technology* 95, 67–72.
- DARKEN, A. A., Jensen, A. L., Shu, P., 1959, Production of Gibberellic Acid by Fermentation, *Appl Microbiol.*, 7(5), 301–303.
- DESGRANGES C., Vergoignan, C., Georges, D.A., 1991, Biomass estimation in solid fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35, 200-205.
- DUBOÏS M., Gillis K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., 1956, Colorimetric method for determination of sugar and related substance, *Anal Chem*, 28, 350-6,.
- DURÁN-PÁRAMO, E., Molina-Jiménez, H., Brito-Arias, M. A., Martínez, F. R., 2004, Gibberellic Acid Production by Free and Immobilized Cells in Different Culture Systems, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113–116.
- ESCAMILLA-SILVA, E. M., Dendooven, L., Magana, I. P., S, R. P., De la Torre, M., 2000, Optimization of gibberellic acid production by immobilized *Gibberella fujikuroi* mycelium in fluidized bioreactors, *Journal of Biotechnology*, 76, 147–155.
- GÖKDERE, M., 2009, Serbest Ve İmmobilize *Gibberella Fujikuroi* Fungusu Kullanılarak Ekstraktif Fermentasyonla Gibberellik Asit Üretimi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- HALLORAN, N., 2004, Gibberellik asit (GA₃) Üretimi, Karakterizasyonu ve Uygulanması, TARP, TÜBİTAK.
- HAMAYUN, M., Khan, S. A., Khan, M. A., Khan A. L., Kang, S., Kim, S., Joo, G., Lee, I., 2009, Gibberellin production by pure cultures of a new strain of *Aspergillus fumigatus*, *World J Microbiol Biotechnol*, 25, 1785-1792.

KAYNAKLAR (Devam)

- INOMATA, M., Hirai, N., Yoshida, R., Ohigashi, H., 2004, Biosynthesis of Abscisic Acid by the Direct Pathway via Ionylideneethane in a fungus, *Cercospora cruenta*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 68 (12), 2571-2580.
- KARAKOÇ, Ş. B., Aksöz, N., 2005, Bazı Matrikslere Tutuklanmış *Aspergillus niger* 'den Gibberellik Asit Üretimi, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 03, 01, 16.
- KARAKOÇ, Ş., Aksöz, N., 2006, Some Optimal Cultural Parameters for Gibberellic Acid Biosynthesis by *Pseudomonas* sp., Turk J Biol, 30, 81-85.
- KELEN M., DEMIRALAY E. C., ŞEN S., ÖZKAN G., 2004, Separation of Abscisic Acid, Indole-3-Acetic Acid, Gibberellic Acid in 99 R (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) and Rose Oil (*Rosa damascena* Mill.) by Reversed Phase Liquid Chromatography, Turk J Chem 28 , 603 - 610.
- KIZILCIK, M. Yamaç, M. Van Griensven, L.J.L.D., 2010, Medium selection for exopolysaccharide and biomass production in submerged cultures of culinary-medicinal mushrooms from Turkey, International Journal of Medicinal Mushroom, 12(1), 63-71.
- KİM, C. J., Lee, S. J., Chang, Y. K., Chun, G. T., Jeong, Y. H., Kim, S. B., 2006, Repeated-batch Culture of Immobilized *Gibberella fujikuroi* B9 for Gibberellic Acid Production: An Optimization Study, Biotechnology and Biproces Engineering, 11, 544-549.
- KOŞGAN, A. G., Ulusoy, M. R., 2009, Bitki gelişim düzenleyicilerinden Supertonik'in patlıcan bitkilerindebeslenen *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) üzerine etkileri, Türk. entomol. derg., 33 (2), 117-131.
- KUMLAY, A. M., Eryiğit, T., 2011, Bitkilerde Büyüme ve Gelişmeyi Düzenleyici Maddeler: Bitki Hormonları, Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech., 1(2), 47-56.

KAYNAKLAR (Devam)

- LALE, G., Gadre, R., 2010, Enhanced production of gibberellin A₄ (GA₄) by a mutant of *Gibberella fujikuroi* in wheat gluten medium, J Ind Microbiol Biotechnol, 37, 297–306.
- LOVEYS, B. R., van Dijk, H. M., 1988, Improved Extraction of Abscisic Acid from Plant Tissue, J. Plant Physiol., 15, 421-7.
- MACHADO, C. M. M., Soccol, C. R., De Oliveira, B. H., Pandey, A., 2002, Gibberellic Acid Production by Solid-State Fermentation in Coffee Husk, Applied Biochemistry and Biotechnology, 179, 102–103.
- MACHADO, C. M. M., Oishi, B. O., Pandey, A., Soccol, C. R., 2004, Kinetics of *Gibberella fujikuroi* Growth and Gibberellic Acid Production by Solid-State Fermentation in a Packed-Bed Column Bioreactor, Biotechnol. Prog., 20, 1449-1453.
- NORMANLY, J., Slovin, J. P., Cohen, J. D., 1995 Rethinking Auxin Biosynthesis and Metabolism, Plant Physiol., 107, 323-329.
- ÖZCAN, B., 1997, Zeytin Yağı Fabrikası Atığında Üretilen *Lentinus tigrinus* ve *Laetiporus sulphureus* Funguslarında Kültür Periyoduna Bağlı Olarak Gibberellik Asit (GA₃), Absisik asit (ABA) ve Stokinin (Zeatin) Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, M.K.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü.
- ÖZCAN, B., Topçuoğlu, S. F., 2001, GA₃, ABA and Cytokinin Production by *Lentinus tigrinus* and *Laetiporus sulphureus* Fungi Cultured in the Medium of Olive Oil Mill Waste, Turk J Biol, 25, 453-462.
- PLACKETT R.L., 1946, Burman J.P. The Design of Optimum Multifactorial Experiments, Biometrika 33 (4), 305-25.

KAYNAKLAR (Devam)

- RAMSAY J.A., Mok, W.H.W. Luu, Y.-S. Savage, M., 2005, Decoloration of textile dyes by alginate-immobilized *Trametes versicolor*, *Chemosphere* 61, 956-964.
- RÍOS-IRÍBE, E. Y., Flores-Cotera, L. B., Chavira, M. M. G., 2011, Gonzalez-Alatorre, G., Escamilla-Silva, E. M., Inductive effect produced by a mixture of carbon source in the production of gibberellic acid by *Gibberella fujikuroi*, *World J Microbiol Biotechnol*, 27, 1499–1505.
- RODRIGUES, C., Vandenberghe, L. P. S., Teodoro, J., Oss, J. F., Pandey, A., Soccol, C. R., 2009, A New, Alternative to Produce Gibberellic Acid by Solid State Fermentation, *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 52, 181-188.
- RODRIGUEZ-LEON, J.A., Soccol, C.R., Pandey, A., Rodriguez, D.E., 2008, Kinetics in Solid-state Fermentation, In: *Current Developments in Solid-state Fermentation*, Pandey, A., Soccol, C.R., Larroche, C. (Eds.), 48-74, Springer, New Delhi.
- SHUKLA, R., Chand, S., Srivastava, A. K., 2005, Batch kinetics and modeling of gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi*, *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 492–497.
- SILVA, E. M. E., Dendooven, L., Reynell, J. A. U., Ramirez, A. I. M., Gonzalez G., Martinez, M. T., 1999, Morphological development and gibberellin production by different strains of *Gibberella fujikuroi* in shake flasks and bioreactor, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 15, 753-755.
- SRÍVASTAVA, A. C., Ahamad, S., Agarwal, D. K., Sarbhoy, A. K., 2003, Screening of potential gibberellin producing *Fusarium* strains for the hybrid rice Production Food, Agriculture & Environment, 1(2), 250-253.

KAYNAKLAR (Devam)

- SWAİN, M. R., Ray, R.C., 2008, Optimization of cultural conditions and their statistical interperation for production of indole-3-acetic acid by *Bacillus subtilis* CM5 using cassava fibrous residue, Journal of Scientific & Industrial Research, 67, 622-628.
- TAKAYAMA T., Yoshida H., Araki K., Nakayama K., 1983, Microbial Production of Abscisic Acid with *Cercospora rosicola*, Biotechnology Letters, 5, 55-58.
- TOMASİNİ, A., Fajardo, C., Barrios-Gonzalez, J., 1997, Gibberellic acid production using different solid-state fermentation systems, World Journal of Microbiology & Biotechnology 13, 203-206.
- TOPÇUOĞLU, F., Ünyayar, S., 1995, Beyaz-Çürükçül Fungus *Phanerochaete chrysosporium* ME446' da Bitki Büyüme Maddelerinden Auxin, Sitokinin ve Gibberellin Üretimi ve Biyolojik Aktivitelerinin Tayini, Temel Bilimler Araştırma Grubu, TÜBİTAK.
- ÜNYAYAR, S., 2000, Poliüretan Köpük Üzerine Tutuklanmış *Phanerochaete chrysosporium* ME446'da Gibberellik Asit ve Sitokinin Üretimi, Turk J Biol, 24, 513-519.