Yerel *Fusarium fujikuroi* (Sawada) Wollenw. Suşları ile Gibberellik Asit Üretimi

Selen Yüzüak

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Mayıs 2018

Gibberellic Acid Production by Local *Fusarium fujikuroi* (Sawada) Wollenw. Isolates

Selen Yüzüak

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

May 2018

Yerel *Fusarium fujikuroi* (Sawada) Wollenw. Suşları ile Gibberellik Asit Üretimi

Selen Yüzüak

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

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Yamaç

Mayıs 2018

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Selen Yüzüak'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Yerel *Fusarium fujikuroi* (Sawada) Wollenw. izolatları ile gibberellik asit üretimi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisans üstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Mustafa Yamaç

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Prof. Dr. Mustafa Yamaç

Üye : Prof. Dr. Zeki Yıldız

Üye : Doç. Dr. İlknur Dağ

Üye : Doç. Dr. Nalan Yılmaz Sarıözlü

Üye : Dr. Öğr. Üyesi. Sevil Pilatin

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

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Mustafa Yamaç danışmanlığında hazırlamış olduğum "Yerel Fusarium fujikuroi (Sawada) Wollenw. Suşları ile Gibberellik Asit Üretimi" başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 18/05/2018

Selen Yüzüak

İmza



ÖZET

Türkiye nüfusunun büyük bir kısmı geçimini tarımdan sağlamaktadır. Artan nüfus ve değişen çevre koşulları göz önüne alındığında, bitkisel üretimden yüksek miktarlarda verim elde etmek önemli bir gerekliliktir. Üretim verimini etkileyen sulama, gübreleme, toprak analizi, ziraai mücadele gibi etmenlerin yanı sıra, hormonların tohum çimlenmesi ve meyve gelişimini sağlama, verim kapasitesini ve ürünlerin hasat sonrası dayanım süresini artırma gibi olumlu etkileri bilinmektedir. Bitkilerde doğal olarak mevcut olan bu hormonların en yaygını gibberellik asittir.

Bu çalışmada Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünden temin edilen *Fusarium fujikuroi* suşlarının gibberellik asit üretim miktarlarının belirlenmesi, üretim koşullarının optimizasyonu ve immobilizasyonun üretim üzerine etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Denemeye alınan 20 adet *Fusarium fujikuroi* suşı içerisinden, üretim miktarı göz önüne alınarak çalışmaya H014W35-3B1 kodlu suş ile devam edilmiştir. Derin, statik ve katı faz kültür yöntemlerine göre gibberellik asit üretimi incelenmiş ve çalışmanın 10. gün sonuçlarına göre en yüksek gibberellik asit üretimi gösteren derin kültür yöntemi ile çalışmaya devam edilmiştir.

Üretim verimini artırmada rol oynayan etmenlerin optimizasyonu için Plackett-Burman ve merkezi bileşke deney tasarımları uygulanmıştır. Daha sonra *Fusarium fujikuroi*' nin serbest veya immobilize miselleri ile gibberellik asit üretim miktarları karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda H014W35-3B1 kodlu *Fusarium fujikuroi* suşları tarafından gerçekleştirilen GA_3 üretimi 164,16 mg/L den optimum koşullar altında 635,00 mg/L düzeyine arttırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Fusarium fujikuroi*, Gibberellik Asit, Kültür tipi, Optimizasyon, İmmobilizasyon.

SUMMARY

The huge part of population of Turkey does its livelihood with agriculture. If we consider the increasing number of population and the changing enviromental aspects, to obtain high yield of herbal production is significant necessity. Besides the things that impress yield of production such as irrigation, fertilizing, soil analysis, control of pests; there are known positive effects of hormones on seed germination and provide fruite development, increase yield capacity and increase the resistance time after harvest. The most common naturally occuring hormone in plants is gibberellic acid.

In this study, it was aimed to determine the amount of gibberellic acid production by *Fusarium fujikuroi* isolates obtained from Samsun Ondokuz Mayıs University, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture , to optimize production conditions, and to determine the effect of immobilization on gibberellic acid production. Considering the amount of production, the study was continued with the H014W35-3B1 coded isolate which was selected from the twenty *Fusarium fujikuroi* isolates taken in the experiment. Gibberellic acid production was investigated according to shaken, static and solid phase culture methods and the study continued with the shaken culture method showing the highest gibberellic acid production according to the results of the 10th day of the work.

Plackett-Burman and central composite designs were applied to optimize the factors that has play a role in increasing production efficiency. The amount of gibberellic acid production was then compared with the free and immobilized mycelia of *Fusarium fujikuroi*. In the study, the production of GA_3 by H014W35-3B1 Fusarium fujikuroi strains was increased to 635.00 mg / L under optimum conditions of 164,16 mg / L.

Keywords: *Fusarium fujikuroi*, Gibberellic acid, Culture type, Optimization, Immobilization.

TEŞEKKÜR

Tez ve laboratuvar çalışmalarım boyunca desteğini, sabrını, kıymetli bilgi ve tecrübeleri esirgemeyen, hayata duruşunu hep örnek aldığım çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Mustafa Yamaç' a,

Çalışılan *Fusarium fujikuroi* suşlarını bize sunan Prof. Dr. Berna Tunalı' ya,

Tezin istatistiksel deney tasarımı aşamasında yakın ilgi ve desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Zeki Yıldız ve Dr. Derya Berikten' e,

Tez süresince yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Fungikültür Laboratuvarı çalışanlarına, Ayşe Gökdal, Özgür Egemen Kepçeler ve Kardelen Kepçeler' e,

Tüm hayatım boyunca varlığını hep yanımda hissettiğim, eğitim hayatım boyunca beni destekleyen başta sevgili annem Sevim Yazıcı, dayılarım Orhan ve Tekin Yazıcı olmak üzere bütün aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Selen Yüzüak

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET vi

SUMMARY vii

ŞEKİLLER DİZİNİ xii

ÇİZELGELER DİZİNİ xiv

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xv

1.GİRİŞ VE AMAÇ 1

2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI 4

2.1.Bitki Gelişim Düzenleyicileri 4

2.1.1.Gibberellinler 5

2.1.1.1.Gibberellinlerin tarihçesi 5

2.1.1.2.Gibberellinlerin genel özellikleri 5

2.1.1.3.Gibberellik asitlerin fizyolojik etkileri ve uygulama alanları 7

2.1.1.4.Mikrobiyal gibberellik asit biyosentezi 8

2.2.Gibberellik Asit Üretiminin Optimizasyonu 12

2.3. İstatistiksel Deney Tasarımı 14

3.MATERYAL VE YÖNTEM 17

3.1.Materyal 17

3.1.1.Yerel *Fusarium fujikuroi* suşları 17

3.1.2.Besiyerleri 18

3.1.3.Kimyasal maddeler ve çözeltiler 20

3.2.YÖNTEM 21

3.2.1.Gibberellik asit miktar tayini için yöntem seçilmesi 21

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.2.*Fusarium fujikuroi* suşlarının GA_3 üretme potansiyellerinin belirlenmesi 23
3.2.3.GA_3 üretimini arttıran kültür yönteminin belirlenmesi 23
3.2.3.1.İzolattan inokülant eldesi 23
3.2.3.2.Derin kültür yöntemi 24
3.2.3.3.Statik kültür yöntemi 24
3.2.3.4.Katı faz kültür yöntemi 24
3.2.4.İstatistiksel deney tasarımları ile optimizasyon 24
3.2.4.1.Plackett-Burman deney tasarımı 25
3.2.4.2.Merkezi bileşke deney tasarımı 27
3.2.5.İmmobilizasyonun üretim verimi üzerine etkisi 28
3.2.5.1.Poliüretan köpük ile immobilizasyon 29
3.2.5.2.Naylon sünger ile immobilizasyon 30
3.2.5.3.Paslanmaz çelik sünger ile immobilizasyon 30
4.BULGULAR VE TARTIŞMA 32
4.1. Gibberellik Asit Miktar Tayini İçin Yöntem Seçilmesi 32
4.2. *Fusarium fujikuroi* İzolatlarının GA_3 Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi 33
4.3.GA_3 Üretimini Arttıran Kültür Yönteminin Belirlenmesi 35
4.3.1.Derin kültür yöntemi 35
4.3.2.Statik kültür yöntemi 36
4.3.3.Katı faz kültür yöntemi 37
4.4.İstatistiksel Deney Tasarımları ile Optimizasyon 38
4.4.1.Plackett-Burman deney tasarımı 38

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.4.2.Merkezi bileşke deney tasarımı 42

4.5.İmmobilizasyonun Üretim Verimi Üzerine Etkisi 47

5.SONUÇ VE ÖNERİLER 49

KAYNAKLAR DİZİNİ 54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

1.1. Türkiyede yıllara göre tarım miktarı ve nüfus karşılaştırma grafiği.....1
2.1. Gibberellinlerin kimyasal yapısı.....6
2.2. GA_3'ün kimyasal yapısı.....6
2.3. GA_{12}-aldehit biyosentezi 9
2.4. *Fusarium fujikuroi* 'den Gibberellik asit biyosentezi.....10
3.1. Farklı GA_3 konsantrasyonları ile elde edilen HPLC kromotogramları.....21
3.2. Farklı GA_3 konsantrasyonlarının HPLC de analizi ile elde edilen GA_3 standart cevap doğrusu.....22
3.3. Farklı GA_3 konsantrasyonlarının spektrofotometrik yöntemde analizi ile elde edilen GA_3 standart cevap doğrusu.....22
3.4. Poliüretan köpük ile immobilizasyon.....29
3.5. Naylon sünger ile immobilizasyon.....30
3.6. Paslanmaz çelik sünger ile immobilizasyon.....31
4.1. Spektrofotometre ve HPLC ile GA_3 tayin değerleri karşılaştırılması.....32
4.2. Spektrofotometre ve HPLC ile GA_3 tayini için serpilme diyagramı.....33
4.3. *Fusarium fujikuroi* suşlarının GA_3 üretim miktarlarının karşılaştırılması.....34
4.4. H014W35-3B1 kodlu suş kolonisinin üst ve altının makromorfolojik görüntüsü.....35
4.5. H014W35-3B1 numaralı izolatı tarafından derin kültür yöntemi ile GA_3 üretimi.....36
4.6. H014W35-3B1 numaralı izolatı tarafından statik kültür yöntemi ile GA_3 üretimi.....36
4.7. H014W35-3B1 numaralı izolatı tarafından katı kültür yöntemi ile GA_3 üretimi.....37
4.8. H014W35-3B1 numaralı suşın derin, statik ve katı kültür tipinde karşılaştırılması.....38
4.9. H014W35-3B1 numaralı suşın Plackett-Burman deney tasarımına göre üretim miktarlarının karşılaştırılması.....40
4.10. Plackett – Burman deney tasarımında kullanılan değişkenlerin GA_3 üretimi üzerine etkisini gösteren pareto grafiği.....41
4.11. Gibberellik asit üretimine laktoz ve ürenin etkisi.....45
4.12. Gibberellik asit üretimine pH ve ürenin etkisi.....45

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.13. Gibberellik asit üretimine laktoz ve pH etkisi.....46
4.14. İmmobilize ve serbest hücrelerde gibberellik asit üretim miktarı karşılaştırılması ...48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

1.1. Türkiyede ki çeşitli tarım ürünlerinin üretim ve ekim alanı miktarlarının yıllara göre değişimi....2
2.1. Gibberellik asitin uygulama alanları....7
2.2. GA_3 üretiminde kullanılan mineral tuzlar....13
3.1. Çalışmada kullanılan yerel *Fusarium fujikuroi* suşları....17
3.2. Mobil fazdaki Gibberellik asitin HPLC analiz koşulları....21
3.3. Plackett – Burman deney tasarımında kullanılan değişkenler ve seviyeleri....25
3.4. Plackett – Burman deney tasarımı....26
3.5. Merkezi Bileşke deney tasarımında kullanılan değişkenler ve seviyeleri....27
3.6. Merkezi Bileşke deney tasarımı....28
4.1. *Fusarium fujikuroi* suşlarının gibberellik asit üretim miktarları....33
4.2. H014W35-3B1 numaralı suşın Plackett-Burman deney tasarımına göre ürettiği GA_3 miktarları....39
4.3. *Fusarium fujikuroi* suşının GA_3 üretimi açısından PB deney tasarımı analiz sonuçları....41
4.4. Merkezi bileşke deney tasarımının öngörülen ve gözlenen sonuçları....42
4.5. GA_3 üretim miktarı için tahmin edilen regresyon değerleri....43
4.6. Merkezi bileşke deney sonuçları Anova tablosu....44
4.7. İmmobilize ve serbest hücreler ile gibberellik asit üretim miktarı....47
5.1. Plackett-Burman sonuçlarına göre belirlenen değişkenler....50
5.2. GA_3 üretiminde kullanılan optimize koşullar....51
5.3. Gibberellik asit üretim basamaklarının üretim açısından karşılaştırılması....52

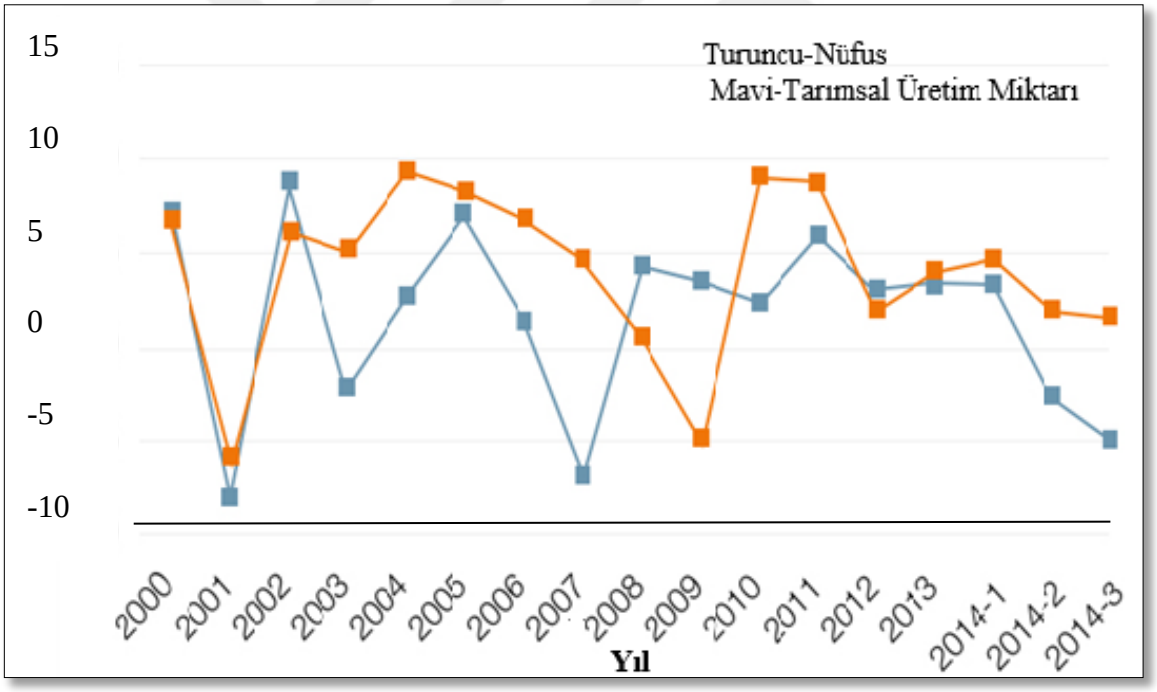
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
BGD	Bitki Gelişim Düzenleyicisi
GA_3	Gibberellik asit
PB	Plackett – Burman
MBT	Merkezi Bileşke Tasarım
PDA	Potato Dekstroz Agar
PDB	Potato Dekstroz Broth
rpm	Dakikadaki dönüş hızı
mg	Miligram
L	Litre
ml	Mililitre
HCl	Hidroklorik asit
NaOH	Sodyum hidroksit

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Türkiyede tarım çok eski zamanlardan beri kullanılan, insanların temin edemedikleri besinleri üretme yoluna gittiği bir süreçtir. Tarım sadece insanların besin ihtiyaçlarını giderdiği, ekonomik bir faaliyet alanı olarak düşünülmemelidir. Ayrıca kültürel ve ekolojik düzeni oluşturan bir bütündür. Toplumda kendine yeterlilik, sanayide hammadde temininde, gelir dağılımının düzenlenmesinde, kırsal miras ve çevrenin korunmasında da rolü vardır (Türkiye İstatistik Kurumu, 2008).

Türkiye yüksek miktarlarada araziye sahip olduğu halde üretim veriminin azlığı söz konusudur. Üretim verimi ve nüfus artışının paralel gitmemesi tarım alanında giderek artan bir açığa neden olmaktadır (Şekil 1.1.) (Yıldız vd., 2017).



Şekil 1.1. Türkiye'de yıllara göre tarımsal üretim miktarları ve nüfus karşılaştırma grafiği (Yıldız vd., 2017)

1980-2014 yılları arasında milli gelirde yüksek miktarda artış gözlenirken, tarımsal büyümede gerçekleşen artış çok düşük seviyelerde kalmıştır (Yağcıoğlu, 2015).

Çizelge 1.1. de yer alan verilere göre buğday, arpa, pamuk, susam, nohut, kuru fasulye, mercimek, şeker pancarı ve bağ ekim alanlarında yıla bağlı olarak önemli gerilemeler yaşanmaktadır. Tarım alanlarındaki azalmanın üretim hacmi düşüşüne neden olması doğal bir sonuçtur. Ancak bazı ürünlerde tarım alanları değişmediği halde yıllık üretimin gerilediği görülmektedir (Yağcıoğlu, 2015). Bu tip ürünlerde ürün verimini arttırmak için çok çeşitli stratejiler kullanılmaktadır. Üretim verimini artırmaya yönelik bu stratejilerden birisi de bitki büyüme hormolarının kullanılmasıdır. Bu hormonlardan gibberellik asit çekirdeksiz üzüm, narenciye, armut, kiraz, vişne, şeftali, çilek, enginar, patates, marul, biber gibi tarım ürünleri ve süs bitkilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Çizelge 1.1. Türkiyede ki çeşitli tarım ürünlerinin üretim ve ekim alanı miktarlarının yıllara göre değişimi (Yağcıoğlu, 2015)

Ürün Adı	**1991**		**2000**		**2014**	
	Bin Ton	**Bin Dekar/ Bin Adet**	**Bin Ton**	**Bin Dekar/ Bin Adet**	**Bin Ton**	**Bin Dekar/ Bin Adet**
Buğday(dane)	20,400	96,300	21,000	94,000	19,000	79,191
Mısır(dane)	2,180	5,180	2,300	5,550	5,950	6,586
Mısır(silajlık)	-	-	-	-	18,563	4,016
Arpa	7,800	34,500	8,000	36,290	6,300	27,872
Yonca(yeşil ot)	1,675	1,726	1,807	2,508	13,433	6,923
Fiğ(dane+ot)	717	2,570	790	2,253	4,291	4,876
Çeltik	200	404	350	580	830	1,109
Kütlü pamuk	1,512	5,986	2,261	6,542	2,350	4,681
Üzüm	3,600	5,860	3,600	5,350	4,175	4,662
Zeytin	640	87,705	1,800	97,770	1,768	168,997
Patates	4,600	2,004	5,370	2,050	4,175	1,303
Tütün	241	2,817	200	2,366	75	993
Şeker pancarı	15,474	4,013	18,821	4,100	16,743	2,888
Susam	43	940	24	509	18	264
Nohut	855	8,780	548	6,360	450	3,885
Kuru fasülye	214	1,780	230	1,760	215	911
Mercimek	640	7,900	353	4,720	345	2,495

Çizelge 1.1. Türkiyede ki çeşitli tarım ürünlerinin üretim ve ekim alanı miktarlarının yıllara göre değişimi (Yağcıoğlu, 2015) (devam)

Ürün Adı	1991		2000		2014	
	Bin Ton	Bin Dekar/ Bin Adet	Bin Ton	Bin Dekar/ Bin Adet	Bin Ton	Bin Dekar/ Bin Adet
Elma	1,900	39,451	2,400	38,380	2,480	66,133
Portakal	830	11,900	1,070	12,515	1,780	14,995
İncir	314	10,900	240	9,770	300	10,673
Kiraz	150	6,391	230	9,965	446	26,319
Mandalina	390	7,870	560	9,217	1,047	13,322
Domates	6,200	-	8,890	2,084	11,850	1,830
Hıyar	1,010	-	1,825	463	1,846	338
Biber	920	-	699	1,480	789	2,232
Karpuz	3,820	-	3,940	1,247	3,886	955
Fındık	315	265,963	470	292,851	412	355,410

Bu çalışmada seçilen bir *Fusarium fujikuroi* suşı tarafından gibberellik asit üretimi için çevresel ve besinsel koşulların istatistiksel deney tasarımı yöntemleri ile optimizasyonu hedeflenmiştir. Çalışmada üretilen gibberellik asit miktarını artırmak için farklı kültür yöntemlerinin denenmesi, çevresel ve besinsel koşulların optimizasyon, için Plackett-Burman ve merkezi bileşke deney tasarımları ve ayrıca immobilizasyon yöntemleri kullanılmıştır.

2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1.Bitki Gelişim Düzenleyicileri

Bitkiler tarafından doğal olarak oluşturulup, eser miktarlarda bile bitkilerde büyüme, gelişme ve fizyolojik olayları kontrol eden, bitki içerisinde taşınabilen organik maddelere "bitki hormonu" adı verilir. Bitkilerin doğal ürünü olan bütün hormonlara "bitki gelişim düzenleyicileri" (BGD) de denir. Bazı BGD ler eser miktarlarda bitkiye etki etmediğinden bitkilerin doğal sentezlediği tüm hormonlar bitki gelişim düzenleyicileri olduğu halde bütün bitki gelişim düzenleyicileri hormon değildir (Gökdere, 2009).

Bitki gelişim düzenleyicilerinin; çelikle çoğalmayı sağlamak, tohumların çimlenme gücünü arttırmak, çimlenmeyi teşvik etmek veya geciktirmek, soğuğa dayanıklılığı arttırmak, meyvelerde tohum oluşumunu arttırmak, meyve iriliğini arttırmak, meyve muhafaza süresini arttırmak, bitkilerin hastalık ve zararlılara dayanıklılığını arttırmak, yabancı ot kontrolünü sağlamak, hasat öncesi meyve dökülmesine engel olmak, makineli hasatı kolaylaştırmak için tüm bitkilerin aynı zamanda olgunlaşmasını sağlamak ve hasatta iş gücünü azaltmak, özellikle doku kültürü çalışmalarında kök sürgün ve yumru oluşumunu teşvik etmek gibi işlevleri bulunmaktadır (Kulmay ve Eryiğit, 2011).

BGD lerin doğal olduğu gibi sentetik üretimi de yapılmaktadır. Fakat BGD lerin büyümeyi teşvik edici özelliklerinin yanı sıra inhibe edici özellikler de gösterdiği bilinmektedir. Oksinler, gibberellinler, sitokininler stimülatör özellik gösterirken, absisik asit ve etilen inhibitör olarak görev yapar (Çetin, 2004).

2.1.1.Gibberellinler

2.1.1.1.Gibberellinlerin tarihçesi

Gibberellinler hakkındaki ilk yazılı veriler çiftçiler tarafından üretilen pirinci etkileyen "bakana" adı verilen hastalığa odaklanmış bir grup Japon bilim insanı tarafından sunulmuştur (Hori, 1903). Pirinç bitkilerindeki gereğinden fazla uzama, yeşil ve açık yeşil yapraklar, boş taneler tahıl veriminde düşüşe sebep olmaktadır. Bu hastalığa bir fungal patojen tarafından salgılanan bir maddenin neden olduğu Kurosawa (1926) tarafından keşfedilmiştir. Hsieh vd., (1977) bu patojenin *Gibberella fujukuroi* olarak adlandırılan bir tür kompleksine ait olan bir türden olduğunu saptamıştır.

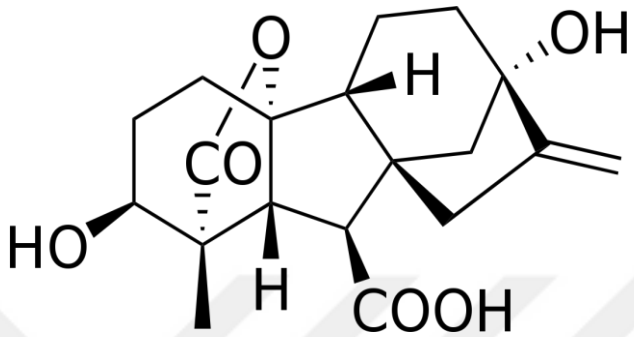
1920 ve 1940 yılları arasında konuya ilişkin birçok çalışma bulunmaktadır. Büyüme koşullarının değiştirilmesi ile kristal bir yapı elde edilmiş ve gibberellin terimi ilk kez bu yapı için kullanılmıştır. Bu formun iki aktif formu, (A ve B formları) keşfedilmiş, kimyasal ve biyolojik özellikleri incelenmiştir (Yabuta ve Sumiki, 1938). İkinci dünya savaşının sonlarına doğru Japonya' da gibberellik asit ile ilgili çalışmalar durmuş, savaş sonrasında ABD ve Britanya'da başlamıştır (Rodrigues vd, 2012).

1950 li yılların ortalarında İngiliz bilim insanları tarafından gibberelik asidin bitkilerde doğal büyüme ve gelişmeyi etkilediği keşfedilmiştir. *Fusarium fujikuroi'*nin mutantları kullanılarak biyoteknolojik yolla yüksek miktarda GA_3 üretimi başlamıştır. (Bömke ve Tudzynski, 2009). Bir İngiliz firması daha fazla gibberellin üretmek için *Gibberella moniliforme* türlerini seçip optimizasyon yapmıştır ve gibberellin izole edilip gibberellik asit adını vermişlerdir. Bu gibberellik asit Japonyadan gelen gibberellin A nın fizyolojik özelliklerine sahiptir. Bu nedenle gibberellinleri GA_1, GA_2 ve GA_3 olarak sınıflandırmışlardır (Takahashi, 1986).

2.1.1.2.Gibberellinlerin genel özellikleri

Kimyasal olarak gibberellinler tetrasiklik diterpenoid iskelet yapısındadırlar (Şekil 2.1.). Dört ya da beş halka sistemini oluşturan 19, 20 karbon içerebilen yapılarının

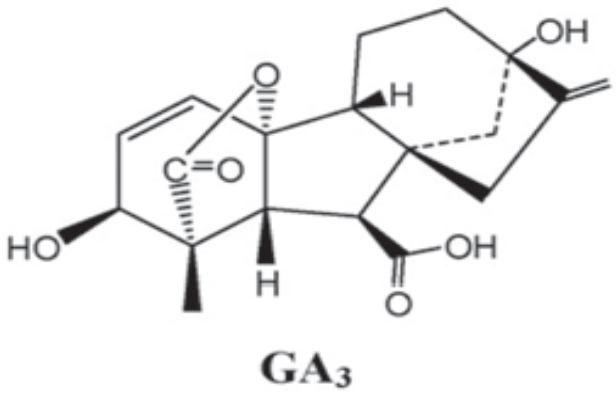
değişken beşinci karbonu laktondur. İçerdikleri karbon sayısına göre C19 gibberellinleri ve C20 gibberellinleri olarak adlandırılırlar. C19 gibberellinler C20 gibberellinlerden bir CO_2 çıkarılması ile oluşmuştur. Bütün biyoaktif gibberellinler C19 dur. Ancak her C19 biyoaktif değildir (Bömke ve Tudzynski, 2009).



Şekil 2.1. Gibberellinlerin kimyasal yapısı (Mander, 1992)

Gibberellinlerin molekül yapıları birbiri ile benzerlik göstermesine rağmen, halka sistemindeki bağların pozisyonları, sayıları, tipleri, hidroksil gruplarının bulunduğu yerler gibi özelliklerden dolayı çeşitlenmeler gösterir (Topçuoğlu ve Ünyayar, 1995).

Gibberellinlerin en önemlisi GA_3 olarak bilinmektedir (Şekil 2.2.). Gibberallik asitin kimyasal formülü; $C_{19}H_{22}O_6$, molekül ağırlığı; 346g/ml, erime noktası; 233-235^{O}C, suda çözünürlüğü; 5 g/L, organik çözücüleri; etanol, metanol, etilasetat, butil asetat, aseton ve oktanol, pKa; 4'tür (Gökdere, 2009).



Şekil 2.2. GA_3'ün kimyasal yapısı (Rodrigues vd, 2012).

2.1.1.3.Gibberellik asitlerin fizyolojik etkileri ve uygulama alanları

Bitkilerde doğal olarak bulunan gibberellinlerden çok az kısmı fizyolojik etkiye sahiptir. Bunlardan ticari-tarımsal açıdan kullanılanlar GA_3, GA_4 ve GA_7'dir. Gelişmiş bitkilerde en çok tayin edilen ve aktiviteye sahip gibberellin gibberellik asittir. Bir kg yaş ağırlıkta 0,001-1,0 mg arasında GA_3 bulunur (Gökdere, 2009).

GA_3'ler tohum ve tohum dormansisini ortadan kaldırma, bodur bitkilerde gövde uzaması, çiçeklenmenin başlaması, büyümenin genç evresinin uzun olmasını, çiçeklenmeden bir süre önce verildiğinde çekirdeksizliği, çiçeklenmeden sonra verildiğinde iri tane oluşumunu, gövde büyümesinde kırmızı ışığın engelleyici etkisini kaldırma gibi pozitif etkileri vardır (Çetin, 2002). Aşağıdaki çizelgede bazı gibberellik asit uygulamaları verilmiştir (Çizelge 2.1.) (Rodrigues vd, 2012).

Çizelge 2.1. Gibberellik asitin uygulama alanları

Gibberellik asit etki alanları	**Gibberellik asit etkilerinin sonuçları**	**Referans**
Keten tohumu ve tuz stresinden kaynaklanan metabolik değişikliklerin onarımında GA_3 ve Kalsiyum Klorürün etkileri	Bitki boyu, ısırgan sayısı, yaprak sayısı, yaprak alanı, taze ve kuru ağırlıklarda artma	Khan vd., 2010
Dişi sıçanlarda ve yavrularında GA_3'ün hepatik fonksiyon üzerindeki etkileri	Annelerin ve onların yavrularının vücut ağırlığında artış	Troudi, Samet and Zeghal, 2010
Çilek üzerine etkileri	Taç yüksekliği, taç yayı, yaprak sapı uzunluğu, yaprak sayısı ve yaprak alanı artışı	Sharma and Singh, 2009
Mısır bitkileri üzerine etkisi	Tuz stresinin etkisini tersine çevirme	Tuna vd., 2008

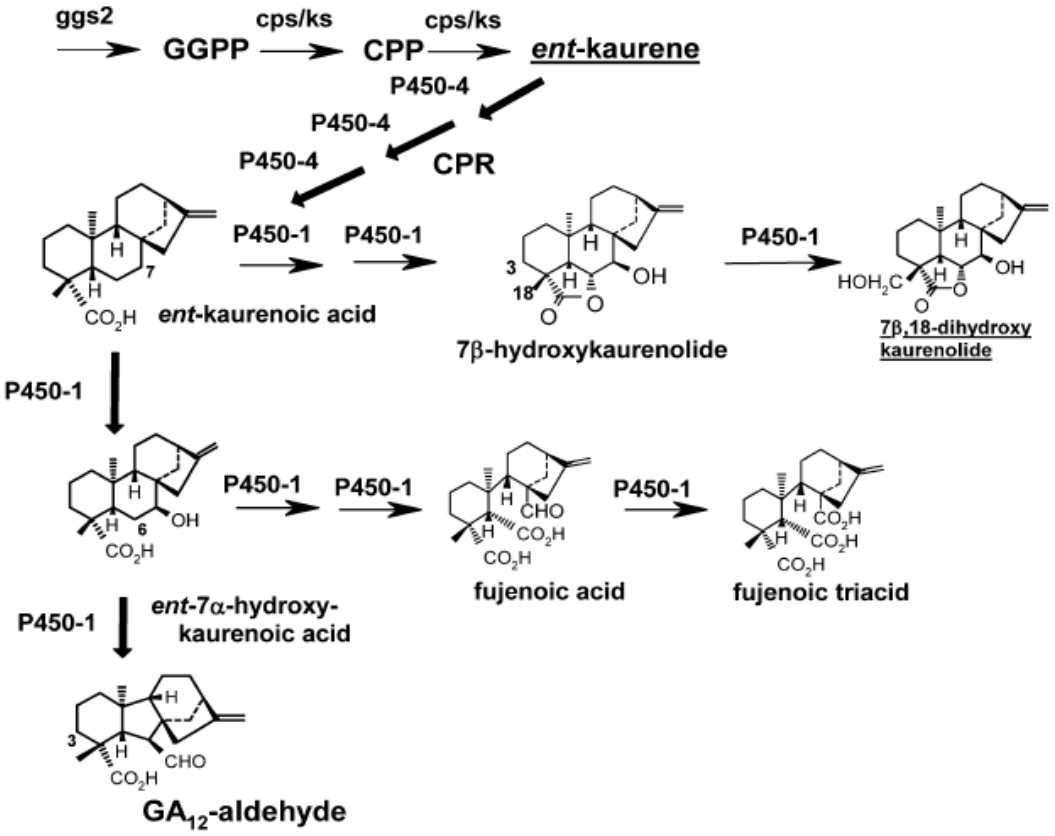
Çizelge 2.1. Gibberellik asitin uygulama alanları (devam)

Cüce bezelye tohumları üzerine etkisi	Büyüme	Baumgartner vd., 2008
Patates yumruları üzerine etkisi	Hücre uzamasını teşvik etme	Alexopoulos vd., 2007
Sıçan doku sistemleri	Lipitlerin peroksidasyonunu destekleme ve antioksidatif sistemleri değiştirme	Celik, Turker and Tuluce, 2007
Meyveler	Meyve ağırlığını artırma	Chang and Lin, 2006
Greyfurt	Kütle ve tane sayısını artma, tohum sayısını azalma	Botelho, Pires and Terra, 2003
Portakal	Hasat kontrolü, yaşlanmayı engelleme	Kumar and Lonsane, 1989

2.1.1.4.Mikrobiyal gibberellik asit biyosentezi

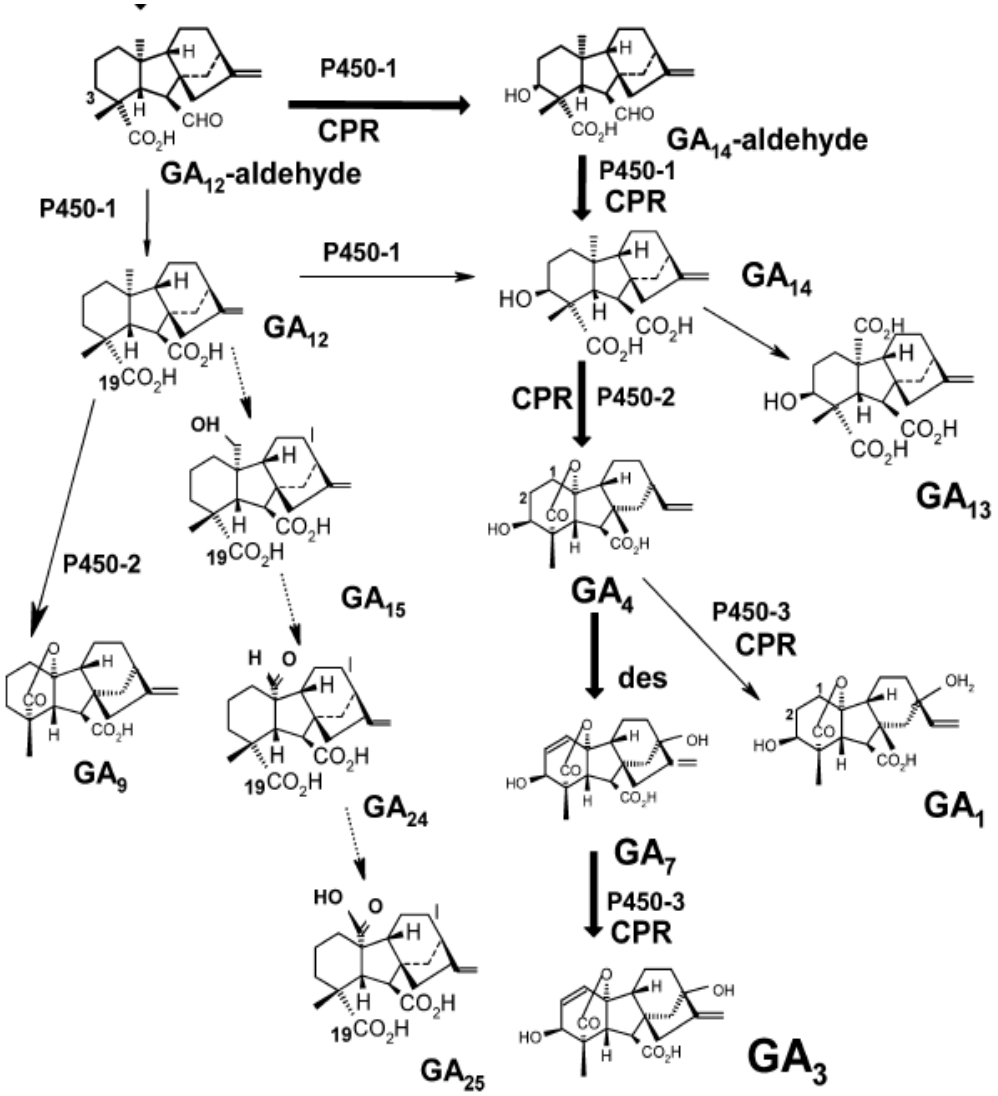
Gibberellik asit'in ismi bu bitki hormonunun üretimini gerçekleştirdiği belirlenen ilk mikroorganizma olan *Fusarium fujikuroi*' den gelmektedir. Pirinç bitkisindeki "bakana" hastalığına neden olması ile belirlenen *Fusarium fujikuroi* kaynaklı gibberellik asit' e ilişkin çalışmalar, bir taraftan yüksek miktarda GA_3 üreten üretici tür/suşların elde edilmesi yönünde ilerlerken, diğer taraftan *Fusarium fujikuroi* tarafından üretilen GA_3 miktarının arttırılması, endüstriyel boyutta üretim ve verim parametrelerinin geliştirilmesi, elde edilen GA_3 nın *in vivo* koşullarda etkinliğinin sorgulanması gibi alanlarda ilerlemektedir. Bu anlamda *Fusarium fujikuroi* hiçbir zaman modası geçmeyecek olan bir üretici konumundadır. Günümüzde *Fusarium fujikuroi*' nin geçerli ismi *Fusarium fujikuroi* olarak bilinmektedir (Anonim, 1931). Bu nedenle bu tez kapsamında da bu isim tercih edilmiştir.

GA_3'lar diğer diterponoidler gibi hidroksimetilglutaryil (HGM) den koenzim A ile mevalonik asit, izopentenil difosfat, geranil difosfat (GPP), farnesil difosfat (FPP) ve geranilgeranil difosfat (GGPP) üretilir. İlk GA_3'ya özgü olan ara ürün ent-kaurene, CPP aracılığı ile GGPP den iki aşamada üretilir. Ent-kaurene'nin sıralı oksidasyonu ile ent-kaurenoik asit ve ent-7α-hidroksikaurenoik asit sentezlenir. C6β da gerçekleşen son oksidasyon sonucunda halkada ki büzülme ile GA_{12}-aldehit oluşumu gerçekleşir. Bu ilk adım mantar ve bitkilerde aynıdır (Şekil 2.3.) (Tudzynski, 2005).



Şekil 2.3. GA_{12}-aldehit biyosentezi (Tudzynski, 2005).

Fusarium fujikuroi de GA_{12}- aldehit 3β-GA_{14}-aldehid'e hidroksillenerek GA_{14}'ü oluşturur. 20C lu GA_{12}- aldehit oksidasyon ile 19C lu GA_4-aldehit'e dönüştürülür. İlk biyolojik aktiviteye sahi olan GA_4 , GA_7 'ye doyurularak GA_3'e dönüştürülür (Şekil 2.4.) (Tudzynski, 2005).



Şekil 2.4. *Fusarium fujikuroi* ile gibberellik asit biyosentezi (Tudzynski, 2005).

Gibberellik asit, funguslardan, bakterilerden, yosunlardan ve likenlerden elde edilebilmektedir (Gökdere, 2009). Karadeniz vd. (2006), bazı bakteri suşları *(Proteus mirabilis, P. vulgaris, Klebsiella pneumoniae, Bacillus megaterium, B. cereus)* ile çalışarak gibberellik asit üretim seviyesini HPLC ile 119,6 mg/L olarak belirlemişlerdir.

Karakoç ve Aksöz (2005), *Aspergillus niger* ile bazı atıklarda (Melas, peyniraltı suyu, zeytinyağı karasuları ve çeşitli meyve suları) gibberellik asit üretimi konusunda araştırmalar gerçekleştirmişler ve 30 °C, pH 5,0 ve 12 gün inkübasyon süresini gibberellik asit üretimi için optimum koşullar olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca çalkalamanın üretim verimini artırdığını saptamışlardır. Çalışmada gibberellik asit üretim miktarı 238,7 mg/L olarak belirlenmiştir.

Ergün ve ark. (2002), bazı yosun ve likenlerde gibberellik asit üretimini spektrofotometrik yöntem ile belirlemişlerdir ve en yüksek gibberellik asit üretim miktarını *Homalothecium sericeum* ile 58,98 mg/ml elde etmişlerdir.,

Panchal (2016), *Fusarıum monılıforme* ile çeşitli karbon kaynakları (sukroz, laktoz, maltoz, çözünür nişasta, gliserol, buğday unu ve mısır unu) ve çeşitli azot kaynakları (NH_4CI, NH_4NO_3, $(NH4)_2S0_4$, $(NH_4)Mo0_4$ ve üre) ile hazırlanan besiyerini %80 oranında mineral tuz çözeltisi ile nemlendirmiş ve 28±1 °C de 10 ile 12 günlük sonucunda inkübasyon sonunda 18,70 mg /g gibberellik asit elde etmiştir.

Gökdere ve Ateş (2014), *Fusarium fujikuroi* ile yapmış olduğu immobilizasyon çalışmasında, kalsiyum aljinat jel tanecikleri ile immobilize ederek gibberellik asit üretimini 75,00 mg/L den 119,6 mg/L ye çıkarmıştır.

Rodrigues vd (2009), *Fusarium fujikuroi* suşları ile çeşitli substratların (sitrik kağıt hamuru, soya kepeği, şeker kamışı küspesi, soya kabuğu, manyok küspesi ve kahve kabuğu) katı faz fermantasyonu ile nem oranı % 75-80, sıcaklık 29 °C'de yapılan çalışmada sitrik kağıt hamuruna sukroz ilavesi ve 3 günlük katı fermantasyonu sonucunda 5,9 g/kg gibberellik asit üretimi elde etmişlerdir.

Machado vd (2002) tarafından, kahve kabuğu, manyok küspesi , başlangıç pH 5,2 ve nem oranı % 77 olan besiyeri ile 6 günlük katı faz fermentasyonu sonunda 0,925 g/kg gibberellik asit üretim değeri elde edilmiştir.

Escamilla vd (2000), *Fusarium fujikuroi* tarafından sıcaklık, pH, C:N oranı ve pirinç unu konsantrasyonlarının gibberellik asit üretimi üzerine etkilerini araştırmışlardır.

En yüksek gibberellik asit üretiminin C:N oranının 36,8, pH'ın 5, pirinç ununun 2 g/L ve en etkili parametrenin 30 °C de sıcaklık olduğu koşullarda gerçekleştiği belirtilmiştir.

Kumar (1987), katı faz fermantasyonu ile buğday kepeği, çözünür nişasta, keten tohumu yağı ve üre içeren besiyeri ortamını, mineral tuz-asit çözeltisi ile nemlendirerek gibberellik asit üretiminde %18,2 lik artış sağlamıştır.

Gibberellik asit miktar tayininin yapılabilmesi için ise çeşitli yöntemler mevcuttur. Spektrofotometre en basit ve en yaygın yöntem olarak kullanılmaktadır (Hollmann vd, 1995; Ergün vd., 2002). Spektrofotometrede okunan gibberellik asit, başka maddeler ile birlikte okunabilmektedir. Bu durumda fermantasyon sıvısında bulunan diğer maddeleri uzaklaştırmak için bir ön işlem gereklidir. Ölçülen ekstrakt içinde sadece gibberellik asit varlığının saptanması için herhangi bir kimyasal test bulunmadığından kütle spektrometrisi de tercih sebebi olmuştur. Kütle spektrometrisi ile sıvı kromatografinin birleşimi ve kütle spektrometrisi ile elekrtoforez birleşimi ile GA_3 analizi doğrudan yapılmaktadır. Diğer kullanılan yöntemlerden biride yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)' dir (Rodrigues vd, 2012) (Gökdere, 2009).

2.2.Gibberellik Asit Üretiminin Optimizasyonu

Bitkilerde çok düşük oranlarda etki gösterebilen gibberellik asidi, mikrobiyal yolla yüksek miktarlarda ve düşük maliyette üretebilmek için üretim koşullarını optimize etmek gerekmektedir.GA_3 üretim verimini arttırmada beslenme faktörlerinden; azot, karbon kaynakları, pH, sıcaklık, havalandırma, su aktivitesi ve mineral tuzlar, kültür tipinin belirlenmesinden ve immobilizasyon yönteminden yararlanılabilinir.

Besiyeri ortamındaki azot miktarının azlığında GA_3 üretiminin başladığı, ortama azot ilave edildiğinde ise GA_3 üretiminin baskılandığı gözlemlenmiştir (Rodrigues vd, 2012). Panchal ve Desai, (2016) azot kaynağı olarak NH_4Cl, NH_4N0_3, $(NH_4)_2S0_4$, NH_4MoO_4 ve üreyi inceleyip en iyi üretimi ürede elde etmişlerdir.

Karbon kaynağı olarak glukoz, sakkaroz, maltoz, nişasta, gliserol gibi çeşitli karbon kaynakları tercih edilebilinirken atıkların giderilmesi, çevre kirliliğini azaltmak adına buğday kepeği, mısır püskülü, buğday unu, kahve çekirdeği gibi karbon kaynaklarıda tercih sebebi olabilir.

Karbon ve azota ek olarak eser miktarlarda mineral tuz solisyonlarının üretim verimini artırdığı saptanmıştır. Çizelge 2.1. de bazı çalışmalarda GA_3 üretiminde kullanılan mineral tuz miktarları verilmiştir (Panchal ve Desai, 2016).

Çizelge 2.2. GA_3 üretiminde kullanılan mineral tuzlar (Panchal ve Desai, 2016).

Mineral Tipi	**Verim (g/L)**	**Kaynak**
K_2HPO_4	3–7 g/L	Shukla vd., 2005, Gelmi vd., 2002, Escamilla vd., 2000
	5 g/L	Pastrana vd., 1995
	1,61 g/ L	Gelmi vd., 2000
$MgSO_4.\ 7H_2O$	0,5–2 g/L	Shukla vd., 2005, Escamilla vd., 2000, Corona vd., 2005
	0,45 g/L	Gelmi vd., 2002
KCl	0,81 g/L	Gelmi vd., 2000
$FeSO_4$	0,02g/L	Gelmi vd., 2000
	0,07 g/L	Bandelier, Renaud and Durand, 1997
$ZnSO_4.\ 7H_2O$	1,49 g/L	Corona, Sanchez and Agostin, 2005
	0,15 g/L	Gelmi vd., 2000
$CuSO_4.\ 5H_2O$	0,18 g/L	Gelmi vd., 2000
	0,07 g/L	Bandelier vd., 1997

Gibberellik asit üretimi için genellikle pH 3.5-6.0 aralığında seçilmiştir. Eleazer vd. (1999)'na göre gibberellik asit üretimi için optimum pH 5 dir ve pH'ın 5,5 'in üzerine çıkmasıyla GA_4 ve GA_7'nin üretiminin arttığını saptamıştır. Gelmi vd. (2000), başlangıç pH'ını 4.5, Tomasini vd. (1997) başlangıç pH'ını 6.0, Machado vd. (2001), kahve kabuğu ve manyok küspesi ile başlangıç pH'ını 5.0-5.4 arasında, Shukla vd. (2005) pirinç unu ile başlangıç pH'sı 5.0 olacak biçimde üretim yapmıştır.

Sıcaklığın gibberellik asit üzerine etkisi kullanılan suşa bağlıdır. Gelmi vd. (2002) 25 ° C, Borrow vd. (1964) 28.5 ila 29.5 ° C, Bandelier vd. (1997) 28 ° C, Rodrigues vd.

(2009) 29 ° C ve Karakoç ve Aksöz, (2010) 30 ° C sıcaklıkta gibberellik asit üretimi çalışmıştır.

Yüksek bir havalandırma optimum üretim için kritik öneme sahiptir. Miselyum gelişimi boyunca oksijen talebi artar ve daha sonra gibberellik asitin oluştuğu durağan faz başlar. Holme ve Zacharias (1965) reaktör hacminden bağımsız olarak 0.25 vvm havalandırma oranı önermiştir. Borrow vd. (1961) 5 L reaktör için 0.6 vvm ve 20 L reaktör için 0.25 vvm oranını önermiştir.

Fusarium fujikuroi'nın katı ve sıvı fermantasyonu, kimyasal sentezi ve bitkilerden ekstraksyonu mümkündür. Ekonomik açıdan ise *Fusarium fujikuroi* mantarından katı ve sıvı fermantasyonu tercih sebebidir (Donnell vd. 1998).

2.3. İstatistiksel Deney Tasarımı

Geleneksel yöntemlerle bir zamanda bir faktöre bağlı yapılan çalışmalarda kontrollü deney grupları oluşturularak etkisi merak edilen değişkenin incelenmesi mümkündür. Fakat artan değişken sayısı ile doğrusal olarak iş yükü, zaman ve maliyet de artmaktadır. Günümüzde ise istatistiksel deney tasarımları ile birçok değişken aynı zamanda çalışılmakta, hem değişkenlerin üretim miktarı üzerine etkileri hem de birbiri üzerine etkileri gözlenebilmektedir.

İstatistiksel deney tasarımları deney süreci kapsamında bilgi edinilmek için kullanılan yöntemlerdir. Bu yöntemler matematiksel ve istatistiksel teknikleri bir araya getirerek değişkenlerin analizini yapmaktadır. İstatistiksel deney tasarımı yöntemleri belirlenirken ihtiyaca göre doğru yöntemi tercih etmek önemlidir (Montgomery, 2001). Deney tasarımında bağımsız değişkenlerin birbiri ve yanıt ile olan etkileşimleri incelenmekte ve bağımsız değişkenler bu doğrultuda tercih edilmelidir (Banga vd, 2003).

Plackett-Burman deney tasarımında önemli olan değişkenin etki yönünün bulunmasıdır. Bu deney tasarımında $Y= \beta 0 + \Sigma \beta i Xi$ $(i = 1, \ldots. k)$ formülü

kullanılmaktadır. Burada Y tahmin değerini, β0 sabit değeri, β1 regresyon katsayısını, X bağımsız değişkeni ve k değişken sayısını gösterir (Deshmukh vd, 2010).

Cevap yüzey yönteminde tasarlanmış deneylere göre polinom oluşturarak tahmin değeri oluşturmak hedeflenir. Cevap yüzey yönteminde genellikle ikili polinomlar kullanılırken polinom sayısı arttırılabilinir. Cevap yüzey yönteminde Doehlert matrix, merkezi bileşke tasarımı (MBT), üç düzeyli hibrit tasarım, bir faktör tasarımı, pentagonal tasarım, D-optimal tasarım, faktöriyel tasarım ve üç boyutlu dizayn olan Box-Behnken gibi deney tasarım modelleri bulunmaktadır. Çalışmanın içeriğine göre en uygun tasarım modeli seçilerek devam edilmelidir. Merkezi bileşke deney tasarımı çalışmada ki bağımsız değişkenler arasındaki etkileşimin yüksekliğinden, belirlenen sınırlar dışında çalışma olanağı sunduğundan tercih sebebidir (Montgomery, 2001).

Sürekli artış gösteren ülke nüfusuna oranla tarım alanlarının azalması, olumsuz çevre koşulları ve üretim veriminin giderek düşmesi gibi sebeplerden tarım alanında yeterli bir yükseliş olmamaktadır. Bir çok tarım ürününde kendiliğinden sentezlenen gibberellik asitin tarımda üretimin verimini artırmak için kullanılan bir seçenek olmasına rağmen ülkemizde gibberellik asit ithal edilmektedir. Oysa ki bir çok araştırmacı tarafından sentetik olarak ya da mikrobiyolojik yollar ile üretimi mümkün kılınmıştır. Çalışmamızda gibberellik asit keşfine sebep olan *Fusarium fujikuroi* türüne ait yerel suşlar ile çalışılmıştır. Diğer çalışmalara ışık tutması bakımından geniş kültür koleksiyonu ile çalışılarak yüksek miktarlarda gibberellik asit üretim potansiyeline sahip türler keşfedilmelidir. Literatür taramalarında istatistiksel optimizasyon çalışmalarına çok fazla raslanmamıştır. Oysa ki günümüzde yeni ürün elde etme, mevcut ürüne etki eden faktörlerin ürün ve birbiri üzerindeki etkileri, çevresel faktörler gibi ürün sürecini geliştirmeye yönelik bir çok istatistiksel deney tasarıları mevcuttur. Bir çok deney tasarımından çalışma için uygun olanın tercih edilmesi istenilen başarının sağlanmasında en önemli faktördür.

Çalışmamızda minimum zamanda ve maliyette maksimum üretim hedeflenmiştir. Bu bağlamda iki istatistiksel deney tasarımı kullanılarak öncelikle üretim miktarını

artırmaya yardımcı değişkenler belirlenmiş, sonra bu değişkenlerin optimum üretim için uygun konsantrasyonları saptanmıştır.

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1.Materyal

3.1.1.Yerel *Fusarium fujikuroi* suşları

Çalışma için kullanılan organizmalar Prof. Dr. Berna Tunalı (Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü) dan temin edilmiştir (Çizelge 3.1.). Organizmalar uzun süreli saklama yöntemi olarak + 4 ºC' de steril toprakta saklama yöntemi ile yılda bir defa aktiflenmiştir ayrıca aktif kullanım için Potato Dekstroz Agar (PDA) ortamında + 4 ºC' de saklanmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan yerel *Fusarium fujikuroi* suşları

Suş Kodu	Organizma Adı	Genbank Erişim Numarası	Organizma Lokasyonu
F1	*F. verticilloides*	H014W51-5K2	Çorum/Alaca yolu üzeri
F2	*F. proliferatum*	H014W22-2K1	Sivas/ Çermik
F3	*F. verticilloides*	H014W12-5B1	Tokat/Çerçi/Pazar
F4	*F. verticilloides*	H014W48-3K2	Yozgat/Sarayköy
F5	*F. proliferatum*	H014W11-4K1	Tokat/Pazar
F6	*F. proliferatum*	H014W5-4B3	Amasya/Merkez/Dadı
F7	*F. verticilloides*	H014W35-3B1	Sivas/Şarkışla/Merkez
F8	*F. verticilloides*	H010W65-4B2	Samsun/Bafra
F9	*F. verticilloides*	H010W10-1B3	Sakarya/Madenler
F10	*F. verticilloides*	010Z5A1	*
F11	*F. verticilloides*	H09W8-1K1	Çorum/Osmancık
F12	*F. verticilloides*	H09W139-1K2	Çorum/Seydim
F13	*F. verticilloides*	H09W21-5K1	Zonguldak/Nebioğlu
F14	*F. verticilloides*	H012W14-1K2	Konya/Kadınhanı
F15	*F. proliferatum*	15H11-3K2	Edirne/Keşan yolu

Çizelge 3.1. Yerel *Fusarium fujikuroi* suşları (devam)

Suş Kodu	**Organizma Adı**	**Genbank Erişim Numarası**	**Organizma Lokasyonu**
F16	*F. proliferatum*	15H12-3B2	Edirne/Keşan
F17	*F. proliferatum*	15H7-4K1	Tekirdağ/Malkara yolu
F18	*F. verticilloides*	15MT10-B1	*
F19	*F. verticilloides*	15MT15-C1	*
F20	*F. verticilloides*	H09W98-3K1	*

*Suşların elde edildiği lokasyon bilinmemektedir.

3.1.2.Besiyerleri

Patates dekstroz agar (PDA)

Ticari hazır besiyerinden (Merck) 39 g/L oranında tartılarak hazırlanmış ve organizmaları aktiflemek için kullanılmıştır. Hazırlanan besiyeri otoklavda 1,2 atm basınç ve 121 ^{o}C sıcaklıkta 15 dakika işlem görerek steril edilmiştir.

Patates dekstroz broth (PDB)

Ticari hazır besiyerinden (Merk) 24 g/L oranında tartılarak hazırlanmış ve immobilizasyon yöntemi için kullanılmıştır. Hazırlanan besiyeri otoklavda 1,2 atm basınç ve 121 ^{o}C sıcaklıkta 15 dakika işlem görerek steril edilmiştir.

Modifiye besiyeri

Glukoz	40,0 g
Pirinç unu	2,0 g
KH_2PO_4	3,0 g
NH4Cl	1,0 g
MgSO4	1,5 g

Distile su 1000 ml

Fusarium fujikuroi suşlarından gibberellik asit üretim miktarının taranmasında kullanılmıştır. Hazırlanan besiyeri otoklavda 1,2 atm basınç ve 121 ^{o}C sıcaklıkta 15 dakika işlem görerek steril edilmiştir.

Modifiye sıvı besiyeri

Buğday kepeği	1000	g
Mineral – tuz Solisyonu		
$ZnSO_4$ $7H_2O$	0,0035	g/10L
$CuSO_4$ 5 H_2O	0,0035	g/10L
$FeSO_4$ $7H_2O$	0,0035	g/10L
$MgSO_4$ 7 H_2O	3,5	g/10ml

Beş kg buğday kepeği 25 L distile su ile 28 $^{\circ}$C, 150 rpm de 24 saat çalkalandıktan sonra tülbent bezinden geçirilerek süzülmüştür. Süzüntü 3 dk 6000 rpm de santrifüjlendikten sonra 10 L alınmış ve mineral tuz çözeltisi 10 ml suda çözülerek sıvı besiyerine eklenmiştir. pH 5 olarak ayarlandıktan sonra (1M NaOH ve HCl) 250 ml erlenlere 100 ml dağıtılmış ve besiyeri otoklavda 1,2 atm basınç ve 121 ^{o}C sıcaklıkta 15 dakika işlem görerek steril edilmiştir. $MgSO_4$ 7 H_2O'dan 3,5 g tartılmış ve 10 ml distile su ile çözüldükten sonra filtreden geçirilerek steril edilmiştir. İnokülant sırasında her erlene inokülant ile birlikte 1 ml ilave edilmiştir. Bu besiyeri gibberellik asit üretimini artırmayı amaçlayan kültür tipi seçimi aşamasında kullanılmıştır.

Modifiye Katı Besiyeri

Buğday Kepeği	400	g
Mineral – Tuz Solisyonu 10 kat seyreltilerek kullanılmıştır.		
$ZnSO_4$ $7H_2O$	0,007	g
$CuSO_4$ 5 H_2O	0,007	g
$FeSO_4$ $7H_2O$	0,007	g

HCl (%37)	16,70 ml
$MgSO_4$ 7 H_2O	0,053 g
Distile Su	83,30 ml

250 ml lik erlenlere 10 g buğday kepeğinden dağıtılmıştır ve 1:1 oranında mineral tuz solisyonu ile nemlendirilmiştir. Hızırlanan besiyeri besiyeri 1,2 atm basınç ve 121 ^oC sıcaklıkta 60 dakika işlem görerek steril edilmiştir. $MgSO_4$ 7 H_2O'dan 0,053 g tartılmış ve ve 60 ml distile su ile çözüldükten sonra filtreden geçirilerek steril edilmiştir. İnokülant sırasında her erlene inokülant ile birlikte 1 ml ilave edilmiştir. Bu besiyeri gibberellik asit üretimini artırmayı amaçlayan kültür tipi seçimi aşamasında kullanılmıştır.

3.1.3.Kimyasal maddeler ve çözeltiler

Etil asetat (Merck)

Sıvı besiyerinden ekstraksiyon ile gibberellik asit analizi için kullanılmıştır.

Tween 80 (Merck)

İnokülant aşamasında spor süspansiyonu hazırlamak içi kullanılmıştır.,

Standart GA_3 (Merck)

Üretilen gibberellik asit miktarını belirlemek için kullanılan standart cevap doğrusu hazırlanmasında kullanılır.

Mobil faz çözeltisi

%30 metanol ve 0.01 M fosforik asit hazırlanarak HPLC analizinde kullanılmıştır.

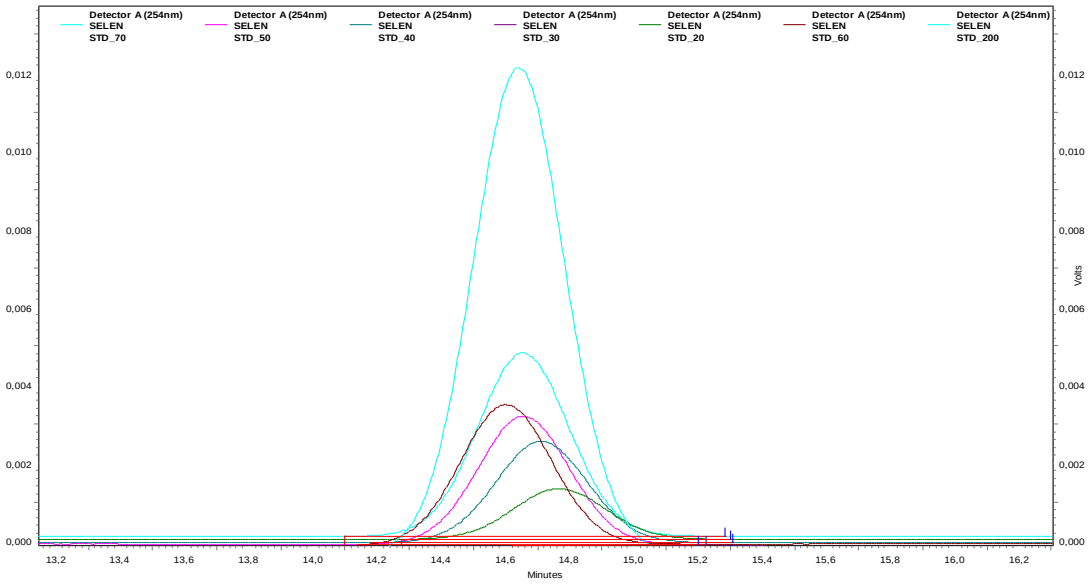
3.2.YÖNTEM

3.2.1.Gibberellik asit miktar tayini için yöntem seçilmesi

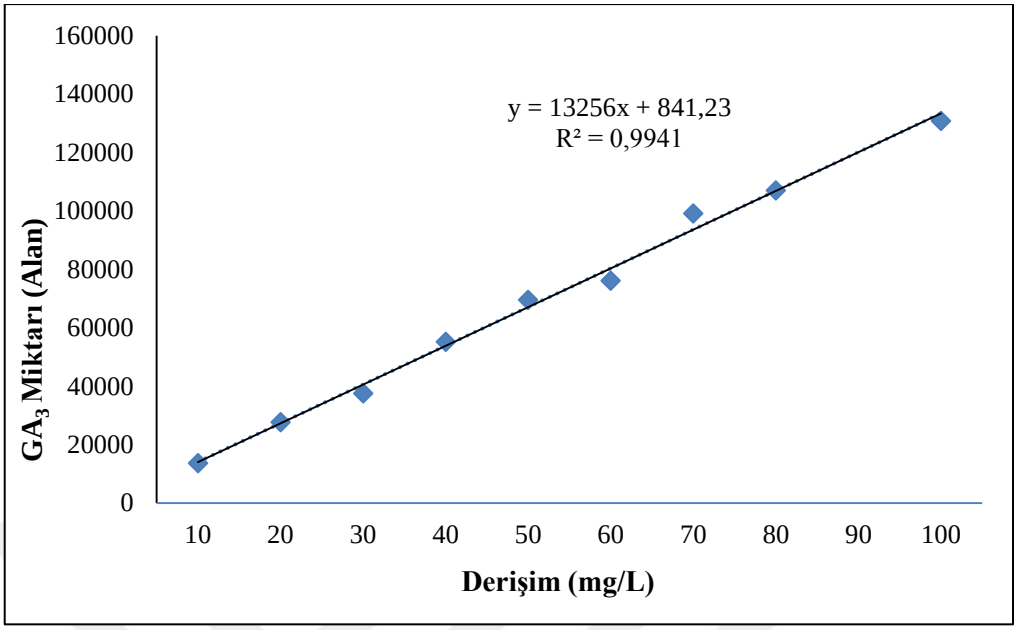
Çalışma kapsamında GA_3 tayini amacı ile kullanılacak yöntemin belirlenmesi ile öncelikle HPLC ve spektrofotometrik yöntem karşılaştırılmıştır. Standart GA_3 (Sigma) ile 10-200 mg/L derişim aralığında çözeltiler hazırlanmış, HPLC ve spektrofotometrede standart cevap doğruları elde edilmiştir. Çizelge 3.2 de gibberellik asitin HPLC analiz koşulları ifade edilmektedir (Syahputra vd., 2013, Shukla vd, 2005). Bu koşullarda farklı konsantrasyonlarda standart GA_3 konsantrasyonları ile elde edilen GA_3 kromatogramları Şekil 3.1. de, standart cevap doğrusu ise Şekil 3.2. de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Mobil fazdaki Gibberellik asitin HPLC analiz koşulları

Kolon tipi	C-18
Kolon Sıcaklığı (°C)	45
Enjeksiyon Hacmi (µl)	10
Hareketli Faz Bileşimi	%30 metanol ve 0,01 M fosforik asit
Hareketli Faz Akış Hızı (mL/dak)	1
Analizin Yapıldığı Dalga Boyu (nm)	254

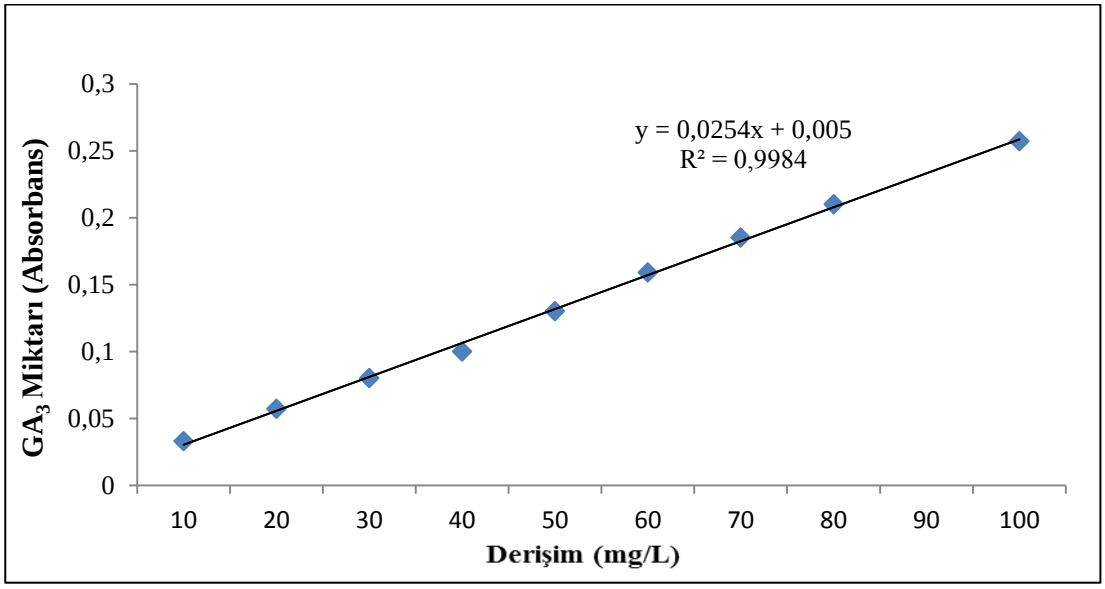


Şekil 3.1. Farklı GA_3 konsantrasyonları ile elde edilen HPLC kromotogramları



Şekil 3.2. Farklı GA_3 konsantrasyonlarının HPLC de analizi ile elde edilen GA_3 standart cevap doğrusu

Spektrofotometrik GA_3 standart cevap doğrusuı oluşturulması için, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart GA_3 (Sigma) çözeltilerinin absorbansı 254 nm de okunmuştur (Berrios vd, 2004; Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Farklı GA_3 konsantrasyonlarının spektrofotometrik yöntemde analizi ile elde edilen GA_3 standart cevap doğrusu

3.2.2. *Fusarium fujikuroi* suşlarının GA_3 üretme potansiyellerinin belirlenmesi

Bu aşamada kullanılan 20 adet *Fusarium fujikuroi* suşının GA_3 üretme potansiyelleri karşılaştırılarak en yüksek konsantrasyonda GA_3 üreten suş belirlenmiştir. Stok kültürde korunan suşlar Potato Dekstoz Agar (PDA) besiyerlerinde oda sıcaklığında, gün ışığında 7 gün üretilerek aktif hale getirilmiştir. Bu besiyerleri üzerine 20 ml % 0,1 lik steril tween 80 aktarılmış, besiyeri yüzeyindeki sporlar steril 5 mm çapında cam boncuklar aracılığı ile süspansiyon haline getirilmiş ve elde edilen spor süspansiyonu steril olarak hazırlanan şişelerde toplanmıştır. Spor süspansiyonu Thoma lamı ile sayılarak 10^6 adet /ml ye ayarlanarak kullanılmıştır (Panchal, 2016).

İzolatların gibberellik asit üretim miktarlarını belirlemek için modifiye besiyeri pH'ı 5'e ayarlanarak 250 ml' lik erlenlere 100 ml dağıtılmış ve steril hale getirilmiştir. Hazırlanan spor süspansiyonundan her erlene 5 ml inoküle edilmiş ve 100 rpm de 30 ^oC de 10 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 10. gününde kültür sıvısı Whatman 1 filtre kağıdından süzülerek süpernatant elde edilmiştir. Süpernatant'ın pH'ı 2,5'e ayarlanarak 1:3 oranında etil asetat ile üç aşamada ekstrakte edilmiştir.

3.2.3.GA_3 üretimini arttıran kültür yönteminin belirlenmesi

Seçilmiş olan suş ile gibberellik asit üretim miktarını artırmak için üç farklı kültür tipi çalışılmıştır. Buradaki amaç üretim miktarının artmasını sağlayan kültür tipini belirleyerek çalışmayı optimum koşullara taşımaktır.

3.2.3.1.<u>İzolattan inokülant eldesi</u>

Aktif olarak üreyen suş petrilerine 20 ml %0,1 lik tween80 ile hazırlanmış steril su aktarılmış ve besiyeri yüzeyinde üreyen mikroorganizmaların sporları spor süspansiyonu halinde toplanmıştır. Spor süspansiyonu içindeki spor sayısını thoma lamı sayım yöntemi ile 10^6 ya ayarlanarak kullanılmıştır (Panchal, 2016).

3.2.3.2.Derin kültür yöntemi

Modifiye sıvı besiyeri içeriği hazırlanarak seçilen suşın spor süspansiyonundan 7 ml her erlene inoküle edilmiştir. Erlenler 20 gün boyunca 100 rpm' e ayarlanmış çalkalamalı etüvde ve 28 ºC de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon boyunca 2 günde bir hasat yapılmıştır. Suşların üretim potansiyellerinin belirlenmesi başlığında olduğu gibi ekstraksiyon yapılmıştır.

3.2.3.3.Statik kültür yöntemi

Modifiye sıvı besiyeri içeriği hazırlanarak seçilen suşın spor süspansiyonundan 7 ml her erlene inoküle edilmiştir. Erlenler 20 gün boyunca 28 ºC'ye ayarlanmış etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Erlenler, yüzeyinde film oluşmaması için her gün el ile hafifçe çalkalanmıştır. İnkübasyon boyunca 2 günde bir hasat yapılmıştır. Ekstraksiyon, suşların üretim potansiyellerinin belirlenmesi başlığında olduğu gibi gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.4.Katı faz kültür yöntemi

Modifiye katı besiyeri içeriği hazırlanarak suşun spor süspansiyonundan 7 ml her erlene inoküle edilmiştir. Erlenler 20 gün boyunca 28 ºC'ye ayarlanmış etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon boyunca 2 günde bir hasat yapılmıştır**.** Hasat için katı faz kültürden ekstraksiyon yapabilmek adına erlenlere 100 ml steril distile su eklenmiştir. Çalkalamalı etüvde 100 rpm de 2 saat çalkalanmış ve suşların üretim potansiyellerinin belirlenmesi başlığında olduğu gibi ekstraksiyon yapılmıştır.

3.2.4.İstatistiksel deney tasarımları ile optimizasyon

Üretim koşullarının optimizasyonu ile üretim verimini artırmak için ile Plackett-Burman deney tasarımı (PB) ve merkezi bileşke deney tasarım (MBT) modelleri kullanılmıştır.

3.2.4.1.Plackett-Burman deney tasarımı

Plackett-Burman deney tasarımında birden fazla besinsel (karbon, azot, mineral) ve çevresel faktörün karşılaştırılması ile gibberellik asit üretimini arttıran değişkenlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. 19 tane değişkenin iki farklı konsantrasyonu ile çalışılmıştır (Çizelge 3.3) ve bu değişkenler arasında üretim miktarını artırıcı yönde etkileyen değişkenler seçilmiştir.

Çizelge 3.3. Plackett – Burman deney tasarımında kullanılan değişkenler ve seviyeleri

Değişken Kodu	**Değişkenler**		**Düşük Değer**	**YüksekDeğer**
			(- 1)	**(+ 1)**
X_1	İlave substrat (%)	Pirinç unu	0	0.2
X_2	İlave karbonkaynağı (%)	Glukoz	0	3
X_3		Laktoz	0	3
X_4		Nişasta	0	3
X_5		Maltoz	0	3
X_6	Azot kaynağı (%)	NH_4Cl	0	0,2
X_7		NH_4NO_3	0	0,2
X_8		Yeastextract	0	0,2
X_9		Üre	0	0,2
X_{10}	Mineral (%)	KH_2PO_4	0	0,1
X_{11}		$CuSO_4$ 5 H_2O	0	0,1
X_{12}		$FeSO_4$ $7H_2O$	0	0,1
X_{13}		$ZnSO_4$ $7H_2O$	0	0,1
X_{14}		$MgSO_4 7H_2O$	0	0,1
X_{15}	Keten Tohum Yağı (%)		0	1
X_{16}	İnokülant Miktarı (%)		5	10
X_{17}	İnkübasyon Sıcaklığı (^oC)		28	28
X_{18}	Besiyeri Başlangıç pH		3,5	7
X_{19}	Karıştırma hızı (rpm)		100	200

Deney tasarımı değişken sayısının bir fazlası ile oluşturulmaktadır (Çizelge 3.4.). Çalışmaya seçilen suş ve üretim miktarını artırdığı gözlenen derin kültür yöntemi ile devam edilmiştir. 250 ml lik erlene 100 ml olacak şekilde, Çizelge 3.4. e göre hazırlanan besiyeri içeriği buğday kepeği özütü ile sulandırılmıştır (1:5 oranında buğday kepeği ve distile su, 150 rpm de 28 ^{0}C de 24 saat çalkalanıp, tülbent bezi ile süzüldükten sonra süzüntü 3 dk 6000 rpm de santrüfüjlenerek kullanılmıştır). Hazırlanan besiyeri otoklavda 1,2 atm basınç ve 121 ºC sıcaklıkta 15 dakika işlem görerek steril edilmiştir ve Thoma lamı sayım yöntemi ile 10^6 ya ayarlanan spor süspansiyonundan 10 ml inoküle edilmiştir. Erlenler 10 gün boyunca çalkalamalı etüvde ve 28 ºC de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 10. gününde hasat yapılmıştır. Ekstraksiyon suşların üretim potansiyellerinin belirlenmesi başlığında olduğu gibi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.4. Plackett – Burman deney tasarımı

	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	X_{12}	X_{13}	X_{14}	X_{15}	X_{16}	X_{17}	X_{18}	X_{19}
1	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
2	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+
3	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
4	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
5	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
6	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
7	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+		+	-	+	-
8	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
9	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+		+	-
10	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
11	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-
12	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
13	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+
14	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+
15	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
16	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
17	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
18	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
19	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-		+	+	-	+
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.2.4.2.Merkezi bileşke deney tasarımı

Merkezi bileşke deney tasarımı ile birden fazla değişkenin varlığında, bu değişkenlerin birbiri üzerine etkileşimleri ile üretim veriminin artırılması hedeflenmiştir. Plackett-Burman yöntemi ile belirlenen değişkenlerin yüksek (+1) ve düşük (-1) konsantrasyonları arasında küp oluşturulmuş, merkeze orta değer olarak 0, kübik yapının dışında kalan noktalar + α ve – α olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.5.).

Çizelge 3.5. Merkezi Bileşke deney tasarımında kullanılan değişkenler ve seviyeleri

Değişken kodu	**Değişkenler**		**-α(1,63)**	**- 1**	**0**	**+ 1**	**+α(1,63)**
X_{18}	pH		1,74	3	5	7	8,26
X_3	Laktoz	%	0,37	1	2	3	3,63
X_9	Üre	%	0,0685	0.1	0.15	0.2	0,2315
Keten Tohumu Yağı (%)			1				
İnkübasyon Sıcaklığı (^oC)			28				
Karıştırma hızı (rpm)			100				
İnokulum miktarı (%)			10				

Oluşturulan deney tasarımı 3 değişken ve 20 deneme grubundan oluşmaktadır (Çizelge 3.6.). Çalışmaya H014W35-3B1 genbank erişim numaralı suş ve üretim miktarını artırdığı gözlenen derin kültür yöntemi ile devam edilmiştir. 250 ml lik erlene 100 ml olacak şekilde, Çizelge 3.6. ya göre hazırlanan besiyeri içeriği buğday kepeği özütü ile sulandırılmıştır. Hazırlanan besiyerinin sterilizasyon ve inokülasyonu, inkübasyon koşulları ile ekstraksiyon yöntemi önceki başlıkta belirtildiği biçimde uygulanmıştır.

Çizelge 3.6. Merkezi Bileşke deney tasarımı

Değişken / Deneme	X_{18} (pH)	X_3 (Laktoz)	X_9 (Üre)
1	3	1	0,20
2	5	3,63	0,15
3	5	0,37	0,15
4	3	3	0,20
5	5	2	0,2315
6	3	1	0,10
7	5	2	0,15
8	5	2	0,15
9	5	2	0,0685
10	7	1	0,20
11	5	2	0,15
12	5	2	0,15
13	5	2	0,15
14	7	3	0,20
15	3	3	0,10
16	1,74	2	0,15
17	7	1	0,10
18	5	2	0,15
19	7	3	0,10
20	8,26	2	0,15

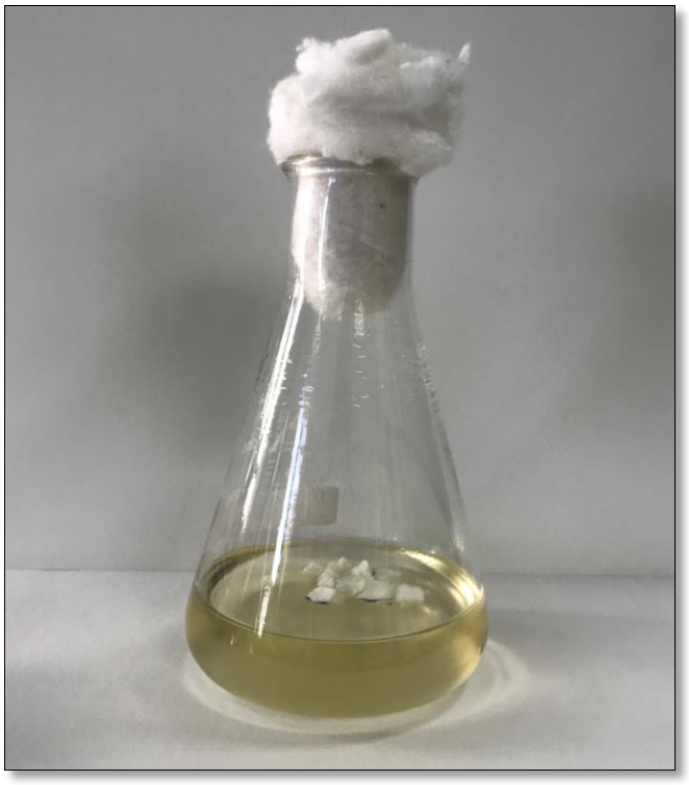
3.2.5.İmmobilizasyonun üretim verimi üzerine etkisi

Seçilmiş olan suşun katı bir destek üzerine tutunarak üretim miktarının artırılması hedeflenmiştir.

3.2.5.1.Poliüretan köpük ile immobilizasyon

Poliüretan köpük 0,5 cm^3 boyutunda küçük küpler haline getirilmiştir. Küpler 1 kere methanol ve 2 kere distile su ile yıkanarak oda sıcaklığında bir gece kurutulmuştur. 250 ml lik erlenlere 100 ml PDB besiyeri hazırlanmıştır ve erlen başına 10 adet köpük konulmuştur. Hazırlanan besiyeri otoklavda 1,2 atm basınç ve 121 ^oC sıcaklıkta 15 dakika işlem görerek steril edilmiştir. Thoma lamı sayım yöntemi ile 10^6 ya ayarlanan spor süspansiyonundan 10 ml inoküle edilmiş ve erlenler 4 gün boyunca 100 rpm' e ayarlanmış çalkalamalı etüvde ve 28 ºC de inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.4.).

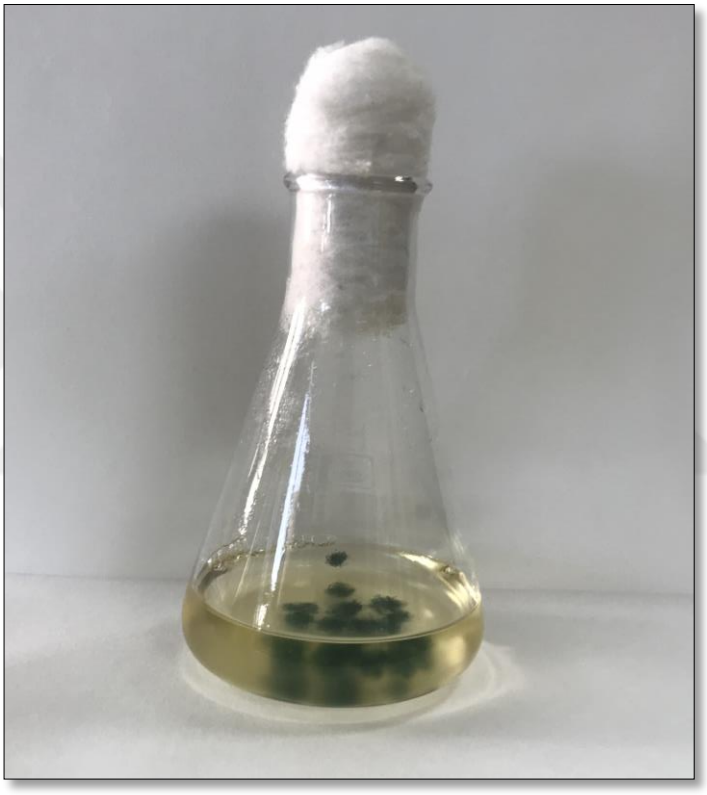
İmmobilize edilmiş erlenlerden besiyeri süzülerek iki kez steril distile su ile yıkanmıştır. Merkezi Bileşke deney tasarımı sonucunda elde edilmiş optimize besiyeri hazırlanarak ve otoklavda 1,2 atm basınç ve 121 ^oC sıcaklıkta 15 dakika işlem görerek steril edilmiştir ve her erlene 100 ml eklenmiştir. Erlenler 10 gün boyunca 100 rpm' e ayarlanmış çalkalamalı etüvde ve 28 ºC de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hasat yapılmıştır ve suşların üretim potansiyellerinin belirlenmesi başlığında olduğu gibi ekstraksiyon yapılmıştır.



Şekil 3.4. Poliüretan köpük ile immobilizasyon

3.2.5.2.Naylon sünger ile immobilizasyon

Naylon sünger 0,5 cm^3 boyutunda küçük küpler haline getirilmiştir. Süngerler 10 dk kaynatılmış ve 3 kere distile su ile yıkanarak oda sıcaklığında bir gece kurutulmuştur. 250 ml lik erlenlere 100 ml PDB besiyeri hazırlanmıştır ve erlen başına 10 adet naylon sünger konulmuştur(Şekil 3.5.). Sterilizasyon, ekstraksiyon, inokülasyon ve inkübasyon işlemleri poliüretan köpük ile immobilizasyon yöntemi ile aynı şekilde gerçekleştirilmiştir.

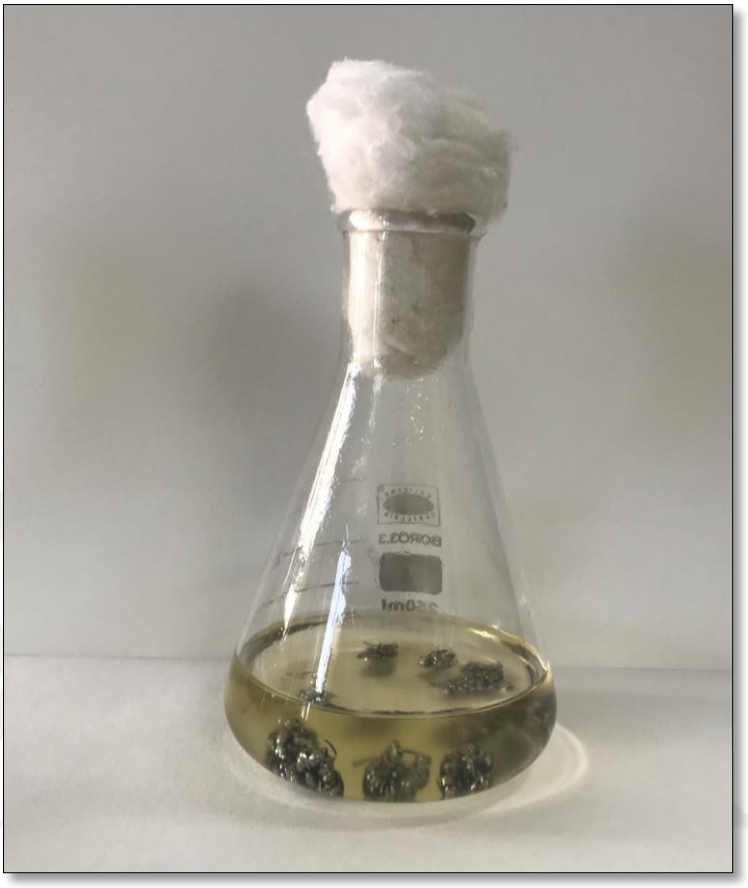


Şekil 3.5. Naylon sünger ile immobilizasyon

3.2.5.3.Paslanmaz çelik sünger ile immobilizasyon

Paslanmaz çelik sünger 0,5 cm^3 boyutunda küçük küpler haline getirilmiştir. Süngerler 10 dk kaynatılmış ve 3 kere distile su ile yıkanarak oda sıcaklığında bir gece kurutulmuştur. 250 ml lik erlenlere 100 ml PDB besiyeri hazırlanmıştır ve erlen başına 10 adet paslanmaz çelik sünger konulmuştur (Şekil 3.6.). Sterilizasyon, ekstraksiyon,

inokülasyon ve inkübasyon işlemleri poliüretan köpük ile immobilizasyon yöntemi ile aynı şekilde gerçekleştirilmiştir.

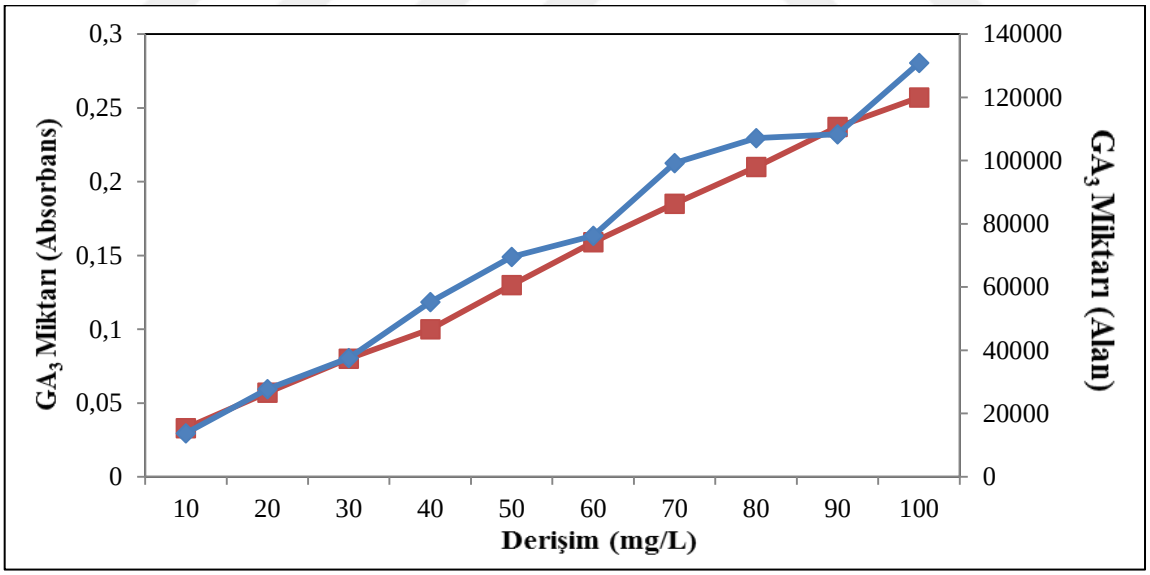


Şekil 3.6. Paslanmaz çelik sünger ile immobilizasyon

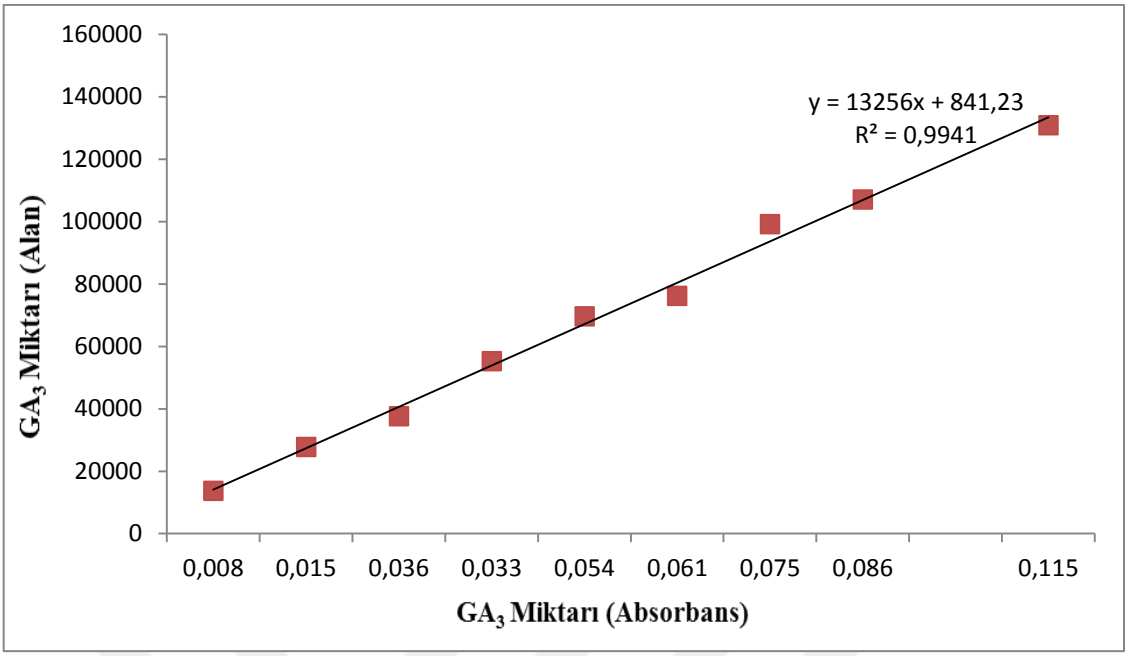
4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Gibberellik Asit Miktar Tayini İçin Yöntem Seçilmesi

Çalışmanın tüm aşamalarında fungus suşları tarafından üretilecek olan gibberellik asit miktar tayininin hızlı, ucuz ve kolay biçimde belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla öncelikle farklı konsantrasyonlarda standart GA_3 çözeltileri HPLC ve spektrofotometrik yöntem ile analiz edilerek elde edilen veriler karşılaştırılmış ve çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılmak üzere bir yöntem belirlenmiştir. Her iki yöntem ile elde edilen verilerin ilişkisinin belirlenmesi için HPLC ve spektrofotometre verileri birlikte grafiklenmiş (Şekil 4.1.) ve serpilme diyagramı çıkarılmıştır (Şekil 4.2.). Şekil 4.2 de ifade edilen katsayının değeri, bu iki yöntemin birbirinin yerine kullanılabileceğini ifade etmektedir. Bu yolla çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılmak üzere daha hızlı, ucuz ve kolay bir yöntem olan spektrofotometrik yöntem tercih edilmiştir.



Şekil 4.1. Spektrofotometre ve HPLC ile GA_3 tayin değerleri karşılaştırılması



Şekil 4.2. Spektrofotometre ve HPLC ile GA_3 tayini için serpilme diyagramı

4.2. *Fusarium fujikuroi* İzolatlarının GA_3 Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Çalışmada gibberellik asit keşfinde sebep olan *Fusarium fujikuroi* suşları kullanılmış ve 20 adet suş ile tarama çalışması gerçekletirilmiştir. *Fusarium fujikuroi* suşlarının 10 günlük inkübasyonu sonrasında elde edilen GA_3 üretim miktarları Çizelge 4.1. ve Şekil 4.3. de sunulmuştur.. H014W35-3B1 (F7) numaralı suşlın gibberellik asit üretim miktarı diğerlerine göre daha yüksektir. Çalışmaya üretim veriminin 164,16 mg/L olan H014W35-3B1 suş ile devam edilmiştir.

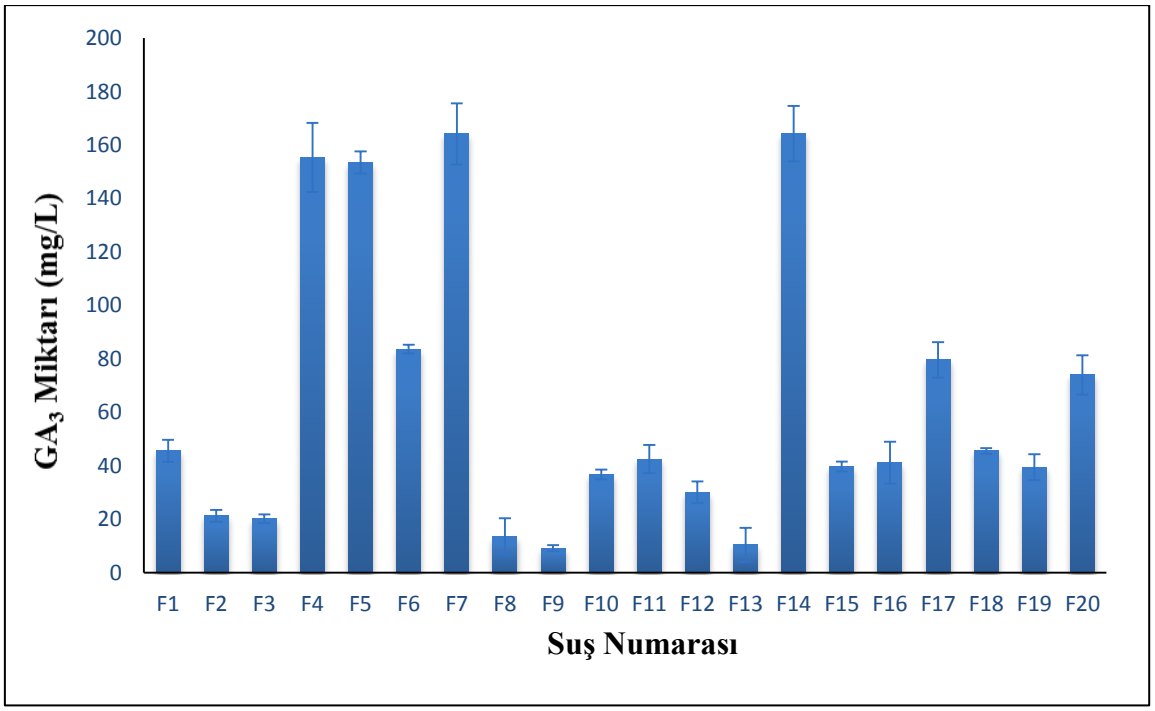
Çizelge 4.1. *Fusarium fujikuroi* suşlarının gibberellik asit üretim miktarları

Suş No	**Genbank Erişim Numarası**	**İstatistiksel sonuçlar (mg/l)**
F1	H014W51-5K2	45,56 ± 4,15 a*
F2	H014W22-2K1	21,25 ± 2,23 bcgf*
F3	H014W12-5B1	20,22 ± 1,63 cfg*
F4	H014W48-3K2	155,1 ± 12,93 d*
F5	H014W11-4K1	153,42 ± 4,09 d*

Çizelge 4.1. *Fusarium fujikuroi* suşlarının gibberellik asit üretim miktarları (devam)

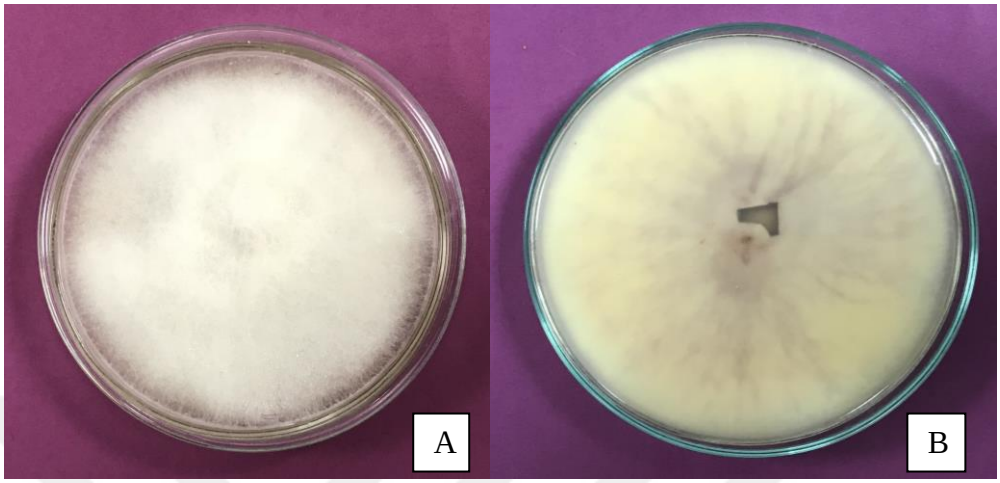
F6	H014W5-4B3	83,66 ±1,65 e*
F7	H014W35-3B1	164,16 ± 11,49 d*
F8	H010W65-4B2	13,52 ± 6,83 fg*
F9	H010W10-1B3	9,19 ± 1,09 f*
F10	010Z5A1	36,71 ± 1,83 abc*
F11	H09W8-1K1	42,5 ± 5,256 a*
F12	H09W139-1K2	30,14 ± 4,04 abcg*
F13	H09W21-5K1	10,42 ± 6,35 f*
F14	H012W14-1K2	164,27 ± 10,33 d*
F15	15H11-3K2	39,72 ± 1,81 ab*
F16	15H12-3B2	41,16 ± 7,85 ab*
F17	15H7-4K1	79,61 ± 6,62 e*
F18	15MT10-B1	45,55 ± 1,09 a*
F19	15MT15-C1	39,5 ± 4,88 ab*
F20	H09W98-3K1	74,01 ± 7,36 e*

*Aynı harfler istatistiksel olarak benzerliği ifade etmektedir



Şekil 4.3. *Fusarium fujikuroi* suşlarının GA_3 üretim miktarlarının karşılaştırılması

Fusarium fujikuroi suşlarının üretim miktarları Şekil 4.3. de karşılaştırılmış ve kültür tipini belirlemek amacı ile üretim miktarı yüksek olan H014W35-3B1 suşu ile çalışmaya devam edilmiştir (Şekil 4.4.).



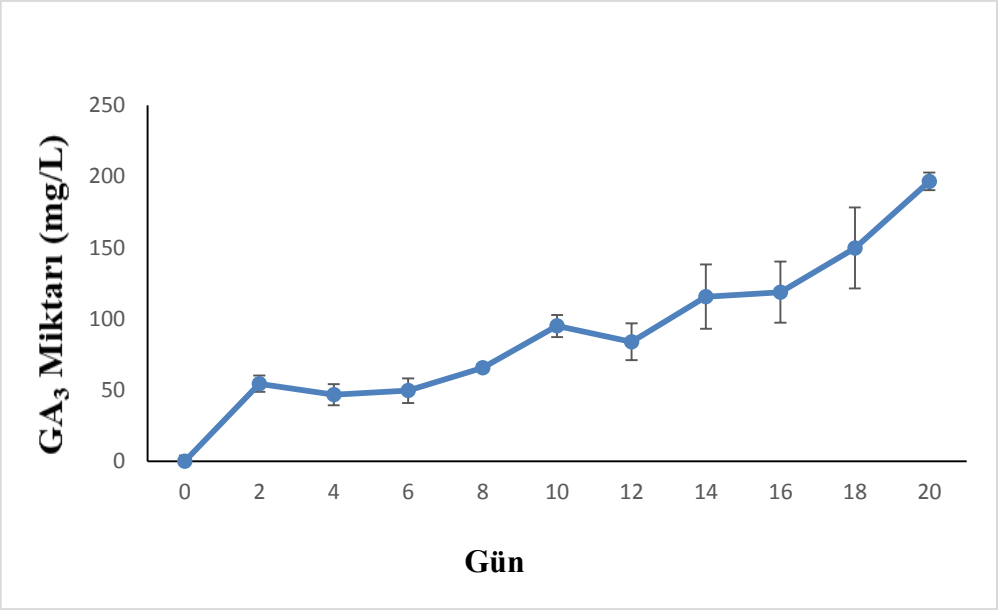
Şekil 4.4 H014W35-3B1 kodlu suş kolonisinin üst (A) ve altının (B) makromorfolojik görüntüsü

4.3.GA_3 Üretimini Arttıran Kültür Yönteminin Belirlenmesi

Seçilmiş olan H014W35-3B1 numaralı suş ile gibberellik asit üretim miktarını artırmak için üç farklı kültür tipi çalışılmıştır. Çalışmanın 10. gün sonuçlarının karşılaştırılmasına göre kültür yöntemi belirlenmiştir.

4.3.1.Derin kültür yöntemi

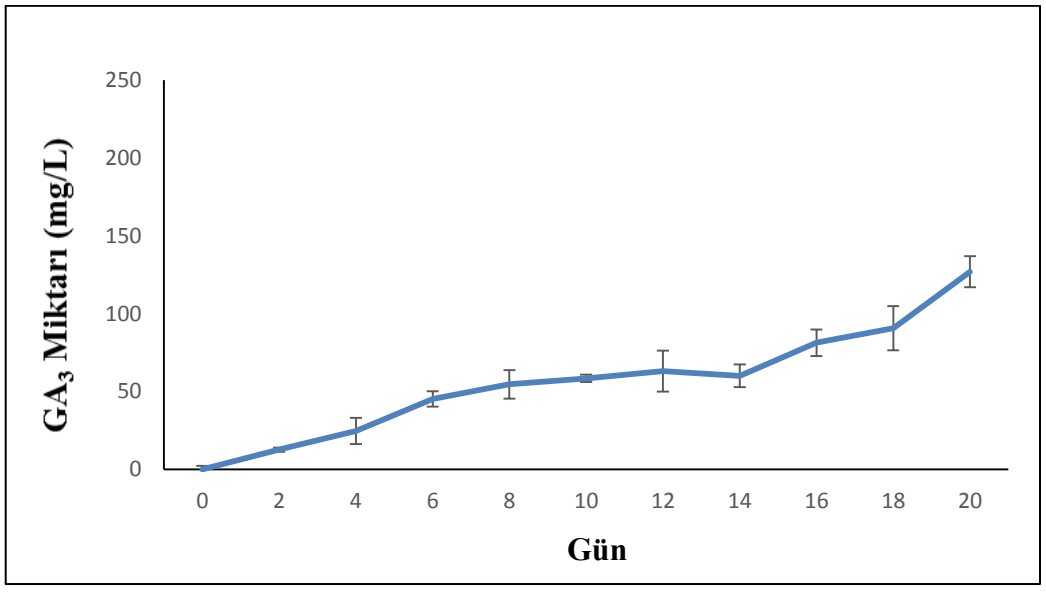
H014W35-3B1 genbank erişim numaralı suşun derin kültür yöntemi ile zamana bağlı gibberellik asit üretim miktarı Şekil 4.5. de gösterilmektedir.



Şekil 4.5. H014W35-3B1 numaralı izolatı tarafından derin kültür yöntemi ile GA_3 üretimi

4.3.2.Statik kültür yöntemi

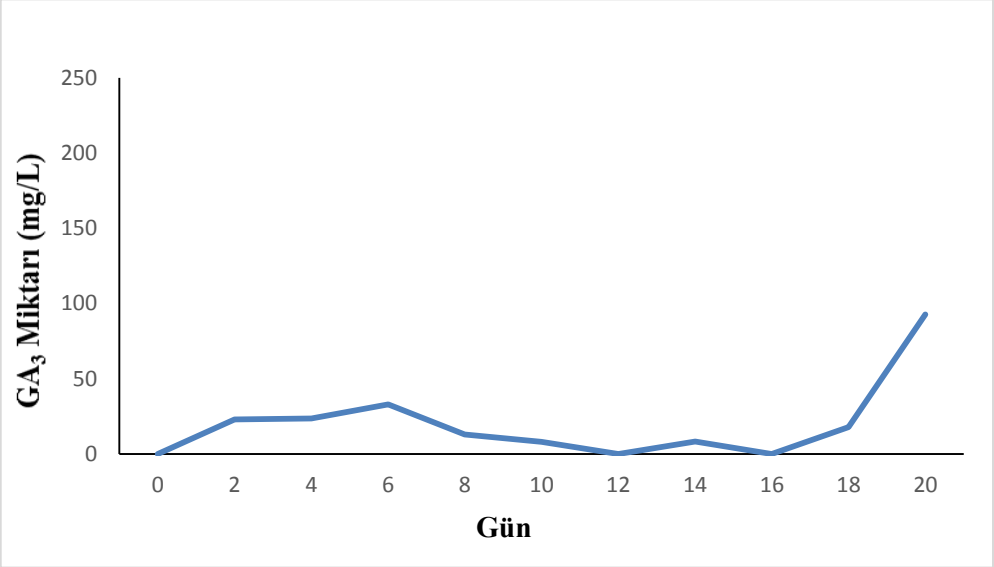
H014W35-3B1 numaralı suşın statik kültür yöntemi ile zamana bağlı gibberellik asit üretim değerleri Şekil 4.6 da ifade edilmiştir.



Şekil 4.6. H014W35-3B1 numaralı izolatı tarafından statik kültür yöntemi ile GA_3 üretimi

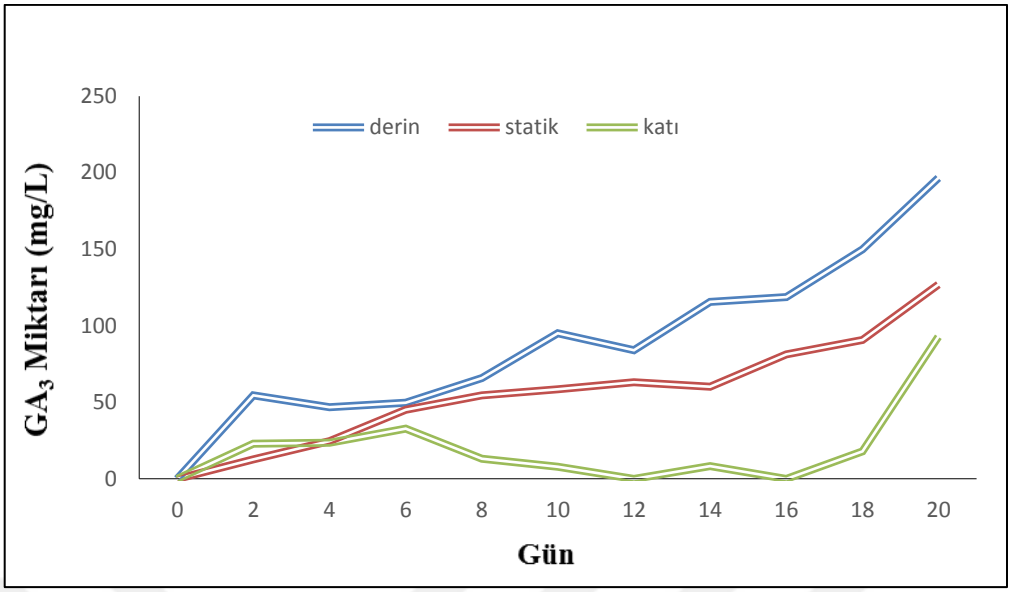
4.3.3.Katı faz kültür yöntemi

H014W35-3B1 genbank erişim numaralı suşın statik kültür yöntemi ile gibberellik asit üretim miktarı Şekil 4.7. de gösterilmektedir.



Şekil 4.7. H014W35-3B1 numaralı izolatı tarafından katı kültür yöntemi ile GA_3 üretimi

H014W35-3B1 numaralı suşın her üç kültür yöntemi ile zamana bağlı gibberellik asit üretim miktarları Şekil 4.8. de sunulmuştur. Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde de derin kültür tipinin katı ve statik kültür tiplerine göre üretim veriminde daha başarılı olduğu gözlenmektedir.



Şekil 4.8. H014W35-3B1 numaralı suşın derin, statik ve katı kültür tipinde karşılaştırılması

Soccol vd. (2006) katı fermantasyon tekniğinin sıvı fermantasyon tekniğine göre yüksek verim ve ekonomik avantaj sağladığını savunmaktadırlar. Fakat Gelmi vd. (2000)'ne göre zayıf ısı dağılımı, besin maddelerinin organizma tarafından yavaş alınımı, Rodrigues vd, 2012'e göre ise ortamın pH, ısı, besin koşulları, gibi parametrelerinin kolay kontrol edilmesi gibi faktörlerden dolayı sıvı fermentasyon tekniğini tercih etmektedirler. Şekil 4.8. de elde edilen sonuçlara göre katı fermentasyon tekniğinde nemlendirme veriminden kaynaklandığı düşünülen beklenen verim elde edilememiştir ve çalışma sıvı fermentasyon tekniğinin üretim verimini etkileyen koşulları gerçekleştirmede daha başarılı olduğunu gösterir.

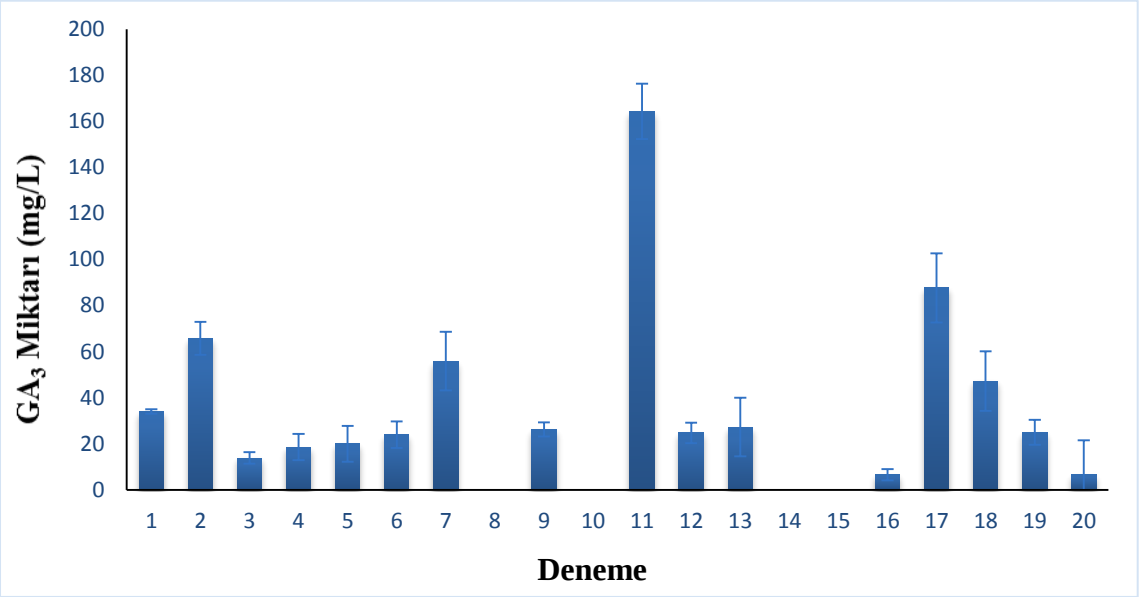
4.4.İstatistiksel Deney Tasarımları ile Optimizasyon

4.4.1.Plackett-Burman deney tasarımı

Plackett-Burman deney tasarımında uygulanan her denemede üretim miktarı belirlenip istatistiksel analizi yapılmıştır. Deney gruplarında belirlenen gibberellik asit üretim miktarları Çizelge 4.2. de ve Şekil 4.9. de gösterilmektedir.

Çizelge 4.2. H014W35-3B1 numaralı suşun Plackett-Burman deney tasarımına göre ürettiği GA_3 miktarları

Deneme	**GA_3 üretim miktarı (mg/L)**	**Standart Sapma Değerleri**
1	34,07	1,00
2	65,77	7,15
3	13,84	2,48
4	18,58	5,66
5	20,04	7,77
6	23,96	5,72
7	55,93	12,71
8	0	0
9	26,26	3,12
10	0	0
11	164,35	11,99
12	24,74	4,40
13	27,28	12,71
14	0	0
15	0	0
16	6,55	2,42
17	87,70	15,06
18	47,26	12,96
19	25,02	5,41
20	6,77	4,94

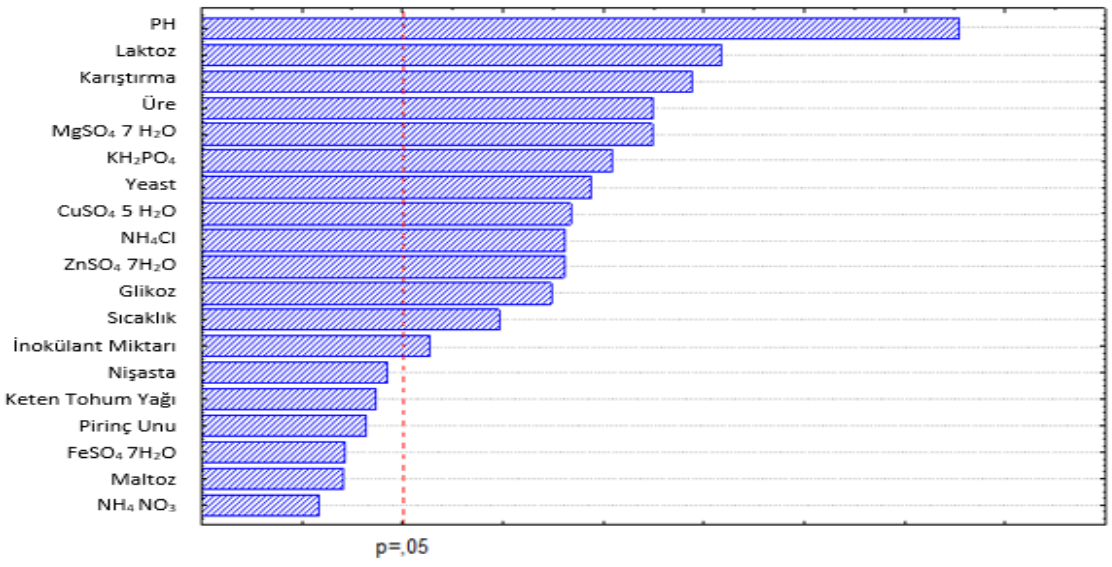


Şekil 4.9. H014W35-3B1 numaralı suşun Plackett-Burman deney tasarımına göre üretim miktarlarının karşılaştırılması

Plackett-Burman deney tasarımında Çizelge 4.3 de istatistiksel analiz değerlendirmeleri verilmiştir. Buna göre değişkenlerin üretim miktarları üzerine etkileri coeff değerleri ile belirlenmiştir. Coeff değerleri üretim verimini etkileyen değerleri göstermektedir. Plackett-Burman deney tasarımında kullanılan değişkenlerin anlamlı ve büyüklüğünü gösteren pareto grafiği ise Şekil 4.10. da gösterilmilştir.

Çizelge 4.3. *Fusarium fujikuroi* suşının GA_3 üretimi açısından PB deney tasarımı analiz sonuçları

Factor	Effect Estimates; Var.:y; R-sqr=,93821; Adj:,90885 (DERİŞİM) 19 Factor Screening Design; MS Residual=120,9324 DV: y									
	Effect	Std.Err.	t(40)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	31,4429	1,419697	22,14762	0,000000	28,5736	34,3122	31,4429	1,419697	28,5736	34,31223
(1)x1	-3,6575	2,839395	-1,28812	0,205106	-9,3961	2,0811	-1,8287	1,419697	-4,6981	1,04057
(2)x2	-14,0748	2,839395	-4,95697	0,000014	-19,8134	-8,3362	-7,0374	1,419697	-9,9067	-4,16809
(3)x3	23,6693	2,839395	8,33603	0,000000	17,9307	29,4079	11,8346	1,419697	8,9653	14,70396
(4)x4	-4,8504	2,839395	-1,70825	0,095341	-10,5890	0,8882	-2,4252	1,419697	-5,2945	0,44412
(5)x5	-2,3031	2,839395	-0,81114	0,422085	-8,0418	3,4355	-1,1516	1,419697	-4,0209	1,71774
(6)x6	-14,8622	2,839395	-5,23429	0,000006	-20,6008	-9,1236	-7,4311	1,419697	-10,3004	-4,56179
(7)x7	-0,9094	2,839395	-0,32030	0,750411	-6,6481	4,8292	-0,4547	1,419697	-3,3240	2,41459
(8)x8	16,3583	2,839395	5,76118	0,000001	10,6196	22,0969	8,1791	1,419697	5,3098	11,04845
(9)x9	19,8150	2,839395	6,97859	0,000000	14,0763	25,5536	9,9075	1,419697	7,0382	12,77680
(10)x10	-17,5276	2,839395	-6,17299	0,000000	-23,2662	-11,7889	-8,7638	1,419697	-11,6331	-5,89446
(11)x11	15,1850	2,839395	5,34798	0,000004	9,4464	20,9237	7,5925	1,419697	4,7232	10,46184
(12)x12	2,4724	2,839395	0,87076	0,389079	-3,2662	8,2111	1,2362	1,419697	-1,6331	4,10554
(13)x13	-14,8346	2,839395	-5,22458	0,000006	-20,5733	-9,0960	-7,4173	1,419697	-10,2866	-4,54801
(14)x14	-19,8110	2,839395	-6,97720	0,000000	-25,5497	-14,0724	-9,9055	1,419697	-12,7748	-7,03620
(15)x15	4,1772	2,839395	1,47115	0,149076	-1,5615	9,9158	2,0886	1,419697	-0,7807	4,95790
(16)x16	7,1811	2,839395	2,52910	0,015481	1,4425	12,9197	3,5906	1,419697	0,7212	6,45987
(17)x17	11,1417	2,839395	3,92398	0,000334	5,4031	16,8804	5,5709	1,419697	2,7015	8,44018
(18)x18	37,1417	2,839395	13,08086	0,000000	31,4031	42,8804	18,5709	1,419697	15,7015	21,44018
(19)x19	-22,0157	2,839395	-7,75368	0,000000	-27,7544	-16,2771	-11,0079	1,419697	-13,8772	-8,13856



Şekil 4.10. Plackett – Burman deney tasarımında kullanılan değişkenlerin GA_3 üretimi üzerine etkisini gösteren pareto grafiği

İstatistiksel değerlendirmeler ile bağımsız değişkenlerin *Fusarium fujikuroi* suşı tarafından GA_3 üretimi üzerine etki değerleri için aşağıdaki eşitlik elde edilmiştir.

GA_3 (µg/ml): $Y_{GA} = 31,44 - 1,83_{PİRİNÇ\ UNU} - 7,04_{GLİKOZ} + 11,83_{LAKTOZ} - 2,43_{NİŞASTA} - 1,15_{MALTOZ} - 7,43_{NH4CL} - 0,45_{NH4NO3} + 8,17_{YEAST\ EKSTRAKT} + 9,91_{ÜRE} - 8,76_{KH2PO4} + 7,59_{CuSO45H2O} + 1,24_{FeSO47H2O} - 7,42_{ZnSO47H2O} - 9,91_{MgSO47H2O} + 2,09_{KETEN\ TOHUM\ YAĞI} + 3,59_{İNOKÜLANT} + 5,57_{SICAKLIK} + 18,57_{pH} - 11,01_{KARIŞTIRMA\ HIZI}$

Plackett – Burman deney tasarımı sonucu GA_3 üretiminin artırıcı yönde etki gösteren pH, laktoz ve üre merkezi bileşke deney tasarımına taşınırken; keten tohum yağı, inkübasyon sıcaklığı ve inokülant miktarı üst limite, karıştırma hızı ise alt limite sabitlenip çalışmaya devam edilmiştir.

4.4.2.Merkezi bileşke deney tasarımı

Merkezi bileşke deney tasarımında GA_3 üretim miktarının optimizasyonu için kullanılan laktoz , üre ve pH'ın deneme gruplarının öngörülen ve gözlenen GA_3 üretim değerleri Çizelge 4.4. de verilmektedir.

Çizelge 4.4 Merkezi bileşke deney tasarımının öngörülen ve gözlenen sonuçları

Deneme	**pH**	**Laktoz**	**Üre**	**GA_3 Üretimi (mg/L)**	
				Öngörülen	**Gözlenen**
1	3	1	0,20	86,90	47,30
2	5	3,63	0,15	296,50	243,90
3	5	0,37	0,15	34,50	105,30
4	3	3	0,20	272,30	281,90
5	5	2	0,23	397,20	4,60
6	3	1	0,10	115,10	74,10
7	5	2	0,15	293,80	211,00
8	5	2	0,15	293,80	275,20
9	5	2	0,07	66,00	75,40
10	7	1	0,20	374,00	352,30
11	5	2	0,15	293,80	353,70
12	5	2	0,15	293,80	291,70
13	5	2	0,15	293,80	309,40
14	7	3	0,20	596,60	625,50

Çizelge 4.4 Merkezi bileşke deney tasarımının öngörülen ve gözlenen sonuçları (devam)

15	3	3	0,10	214,90	225,30
16	1,74	2	0,15	221,90	253,40
17	7	1	0,10	25,70	4,10
18	5	2	0,15	293,80	315,50
19	7	3	0,10	16,90	189,40
20	8,26	2	0,15	413,30	400,00

Deneyin sonuçları ANOVA istatistiksel analizi ile değerlendirilmiştir ve MBT modelinde kullanılan değişkenlerin optimizasyonu için hesaplanan regresyon eşitiği ile gibberellik asit miktarı tahmin edilmektedir (Çizelge 4.5.).

GA_3 (µg/ml): Y_{GA} = 293 + 58,7 pH + 80,4 Laktoz +101,6 Üre + 8,9 pH*pH - 48,3 Laktoz*Laktoz - 23,4 Üre*Üre + 9,1 pH*Laktoz + 94,3 pH*Üre + 21,4 Laktoz*Üre

Çizelge 4.5. GA_3 üretim miktarı için tahmin edilen regresyon değerleri

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant		293,8	21,0	14,00	0,000	
pH	117,4	58,7	14,1	4,15	0,002	1,00
Laktoz	160,8	80,4	14,1	5,68	0,000	1,00
Ure	203,2	101,6	14,1	7,18	0,000	1,00
pH*pH	17,9	8,9	14,2	0,63	0,544	1,01
Laktoz*Laktoz	-96,6	-48,3	14,2	-3,39	0,007	1,01
Ure*Ure	-46,8	-23,4	14,2	-1,64	0,131	1,01
pH*Laktoz	18,2	9,1	18,2	0,50	0,630	1,00
pH*Ure	188,7	94,3	18,2	5,17	0,000	1,00
Laktoz*Ure	42,8	21,4	18,2	1,17	0,268	1,00

Yapılan deney tasarımının anlamlılığını güçlendirmek için regresyon katsayısına (belirlilik düzeyi) bakılmış ve gibberellik asit üretimi için R^2 değeri %93,50 hesaplanmıştır. Çoklu modellerde belirlilik kat sayısı ile birlikte düzeltilmiş R^2 (adj. R^2) hesaplanmalıdır. Çalışmada gibberellik asit için adj. R^2 %87,65 bulunmuştur. Çizelge 4.6. da ki P ve F değerleri çalışmanın ve parametrelerin anlamlılığını göstermek için kullanılmaktadır. Çalışmanın P değeri < 0,001 F değeri 15,98 olarak bulunmuştur. Çalışmada ki uyum eksikliği F değeri 1,32 dir.

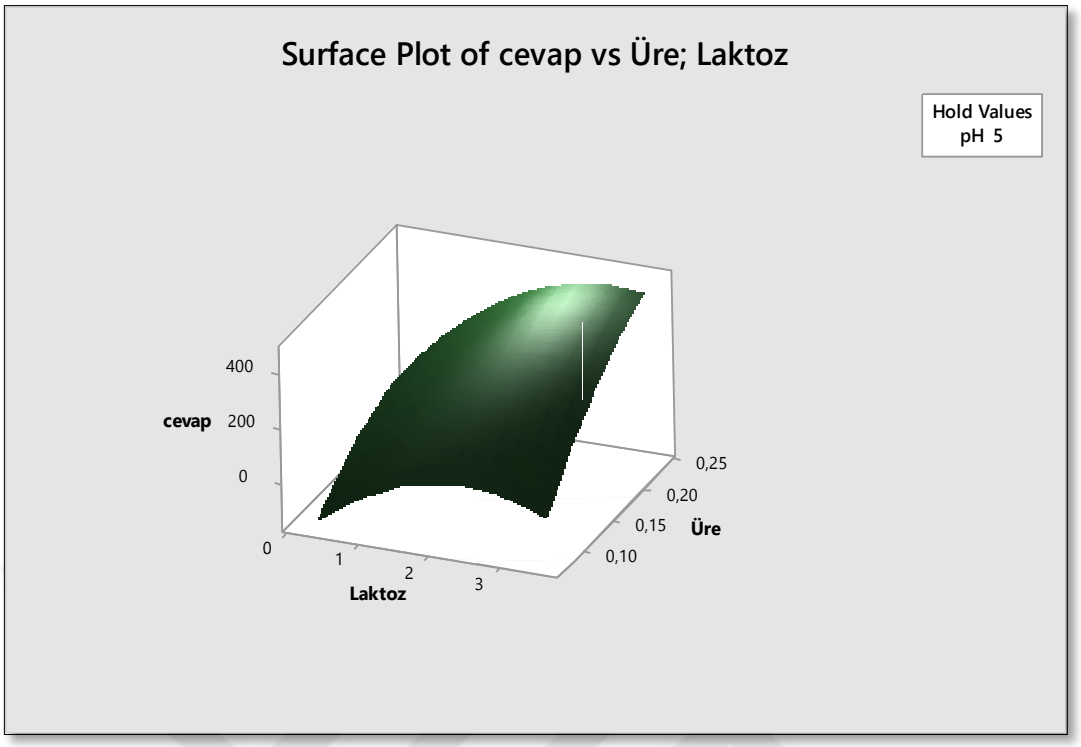
Çizelge 4.6. Merkezi bileşke deney sonuçları Anova tablosu

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	383314	42590	15,98	0,000
Linear	3	269421	89807	33,71	0,000
pH	1	45894	45894	17,22	0,002
Laktoz	1	86038	86038	32,29	0,000
Ure	1	137489	137489	51,60	0,000
Square	3	38383	12794	4,80	0,025
pH*pH	1	1051	1051	0,39	0,544
Laktoz*Laktoz	1	30626	30626	11,49	0,007
Ure*Ure	1	7195	7195	2,70	0,131
2-Way Interaction	3	75510	25170	9,45	0,003
pH*Laktoz	1	659	659	0,25	0,630
pH*Ure	1	71185	71185	26,72	0,000
Laktoz*Ure	1	3666	3666	1,38	0,268
Error	10	26644	2664		
Lack-of-Fit	5	15152	3030	1,32	0,384
Pure Error	5	11492	2298		
Total	19	409958			

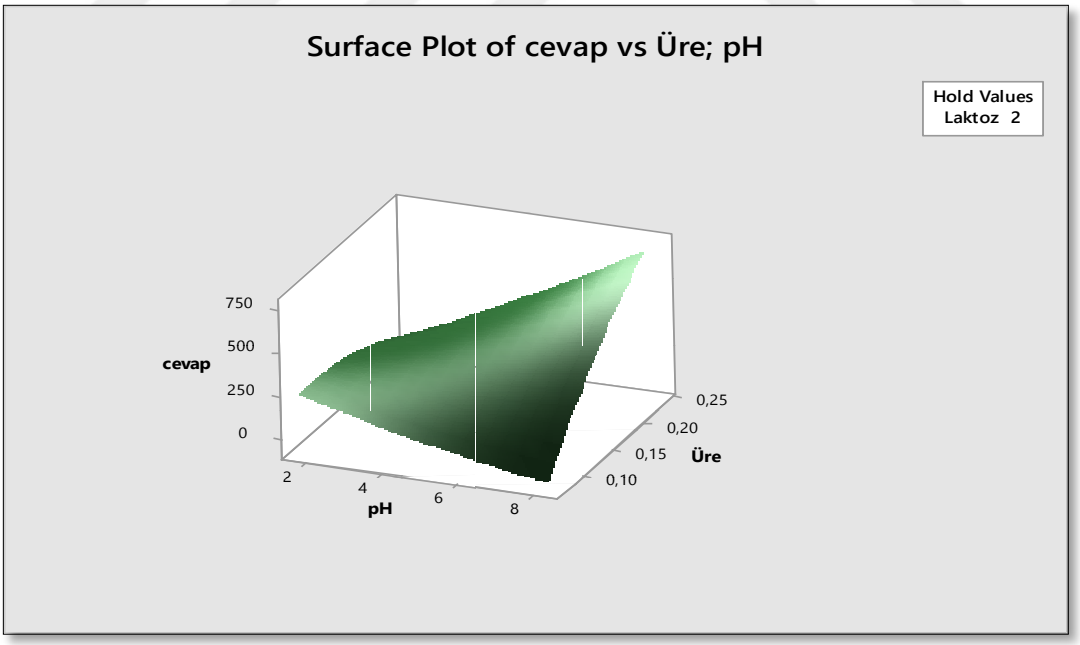
Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
51,6179	93,50%	87,65%	68,08%

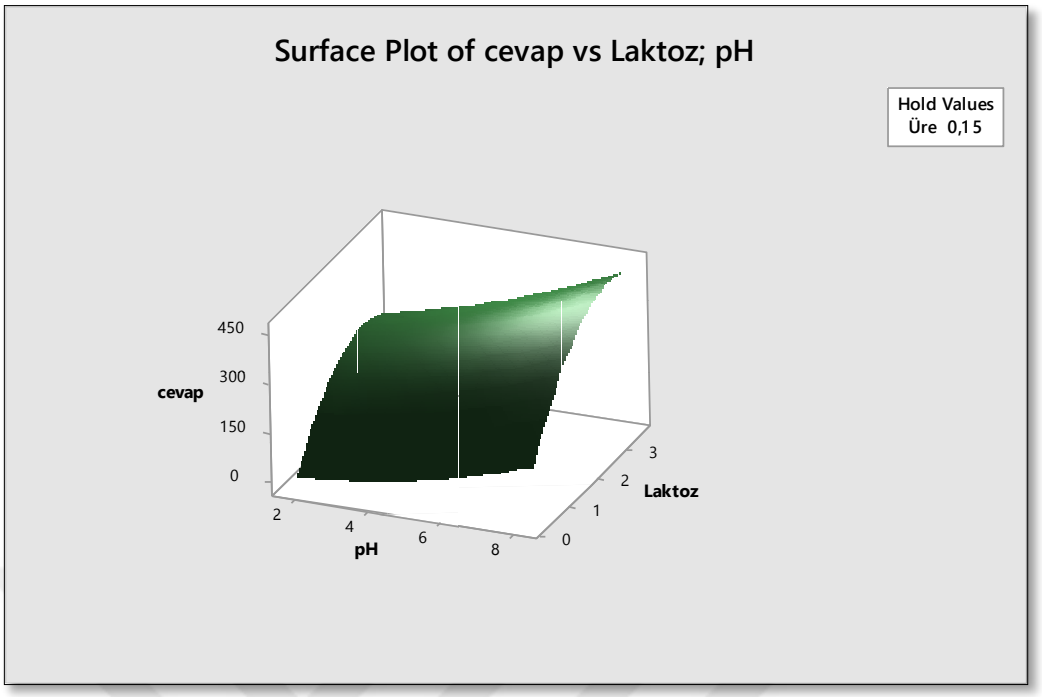
Deney grubundaki pH, laktoz ve üre değişkenlerinin arasındaki etkileşimi anlamak ve optimum noktalarını belirlemek için üç boyutlu cevap yüzey grafikleri çizilmiştir. Çalışmada keten tohum yağı, inokülant miktarı, sıcaklık ve çalkalama hızı sabit tutulmuştur. Şekillerdeki en açık renkli bölgeler gibberellik asit üretim miktarındaki maksimum bölgeleri ifade etmektedir. Şekil. 4.11 de pH 5 e sabit tutularak laktoz ve üre karşılaştırılmıştır. Şekil 4.12. de laktoz 2 mg/L ye sabit tutularak üre ve pH karşılaştırılmıştır. Şekil 4.13 de ise üre 0,15 mg/L ye sabit tutularak laktoz ve pH ın gibberellik asit üretim miktarları karşılaştırılmıştır. İstatistiksel modele göre pH 8,26, laktoz 3,33364 mg/L, ürenin 0,2315 mg/L koşullarında gibberellik asit üretim miktarının en yüksek olacağı bulunmuştur.



Şekil 4.11 Gibberellik asit üretimine laktoz ve ürenin etkisi



Şekil 4.12 Gibberellik asit üretimine pH ve ürenin etkisi



Şekil 4.13 Gibberellik asit üretimine laktoz ve pH etkisi

Eleazer (1999), *Fusarium fujikuroi* küfü yaptığı çalkalamalı erlenlerde glukoz, tuz solüsyonu ve pirinç unu ile belirli konsatrasyonlarda denemeler yapmıştır. Gibberellik asidin en yüksek üretimi 100 g/L glukoz, 1 g/L NH_4CI ve 2 gr/L pirinç unu ile 1 g/L KH_2PO_4 ve $MgS0_4$ konsantrasyonları elde etmiştir. Çalışmaya plackett-burman L9 (3^4) deney tasarımında sıcaklık ve pH'ın üretim verimi üzerine etkisini inceleyerek devam etmiş ve üretim verimlerini 0,144 mg/ L ile 2.862 mg/ L arasında saptamıştır. Cevap yüzey istatistiksel deney tasarımı ve biyoreaktör ile üretim miktarını 2.862 mg/ L den 3,9 mg/ L ye çıkarmıştır. En yüksek üretim 30 $^{\circ}C$ ve 5 pH da elde etmiştir. Machado vd., (2004) *Fusarium fujikuroi* küfü ile kahve kabuğu ve cassava küspesini kullanarak sıkıştırılmış yatak biyoreaktörde katı faz fermantasyonu gibberellik asit üretimi yapmış ve 6. günde 0,925 g/kg gibberellik asit elde etmiştir. Doğan (2013), yaptığı tarama çalışması ile 2580,50 mg/L gibberellik asit üretimi göstermiş *Pleurotus eryngii* (Hakkari) suşı ile çalışmaya devam etmiştir. Derin kültür tipi ve istatistiksel analiz yöntemleri sonucunda besiyeri içeriğini %5 fruktoz, % 0,3 $NaNO_3$, %0,15 KH_2PO_4, 1000µg/L tiamin 25 ^{o}C sıcaklıkta, pH 7 ve 150 rpm karıştırma hızı olarak belirlemiş ve 18 günlük inkübasyon sonucunda üretim miktarını 7926,17 mg/L, reaktör boyutunda ise 14 gün sonucunda 10545,00 mg/L olarak elde etmiştir. Panchal vd.(2016) katı fermantasyon tekniği ile 500

ml lik erlenlerde buğday kepeğine ilave sükroz, laktoz, maltoz, nişasta gliserol ve mısır unu gibi karbon kaynakları, NH_4Cl, NH_4N0_3, $(NH_4)_2S0_4$, NH_4M0O_4 ve üre gibi azot kaynakları ile optimizasyon gerçekleştirmiştir. Çeşitli azot ve karbon kaynakları ile yapılan çalışmada nişastanın ve ürenin üretim verimini arttırdığını saptamışlardır ve gibberellik asit üretimini 96 ve 168 saatleri arasında 154 µgm/gm 'den 1160 µgm/gm ye taşımıştır.

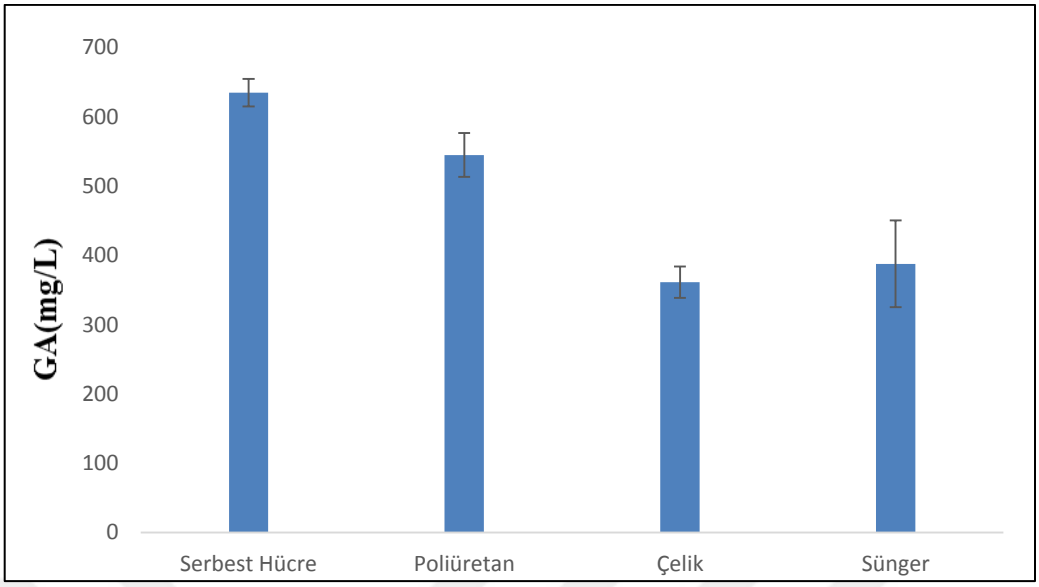
Literatür çalışmaları göstermiştir ki üretim miktarında üretim koşulları kadar önemli rol oynayan etmenlerden biri de organizma tercihidir. Çalışmamız kullanılan yöntemler bakımından üretim verimini artırmada bir üstünlük sağlasa da, çalışmaya başlarken yapılan tarama çalışmasında 164,16 mg/L gibberellik asit üretimi elde edilmiştir. Çalışmamızda sabit sıcaklık değeri olarak 28 °C ve 19 değişkenli Plackett-Burman deney tasarım kullanılmıştır. Elde edilen değerler sonucunda belirlen besiyeri içeriği merkezi bileşke deney tasarımına taşınmış ve üretim miktarımızı 635.00 mg/L'ye çıkarılarak 6,68 kat artış sağlanmıştır.

4.5.İmmobilizasyonun Üretim Verimi Üzerine Etkisi

Gibberellik asit üretim verimini artırmak için poliüretan köpük, naylon sünger ve paslanmaz çelik süngere immobilize edilmiş hücreler ile çalışılmıştır. Üretim verimini karşılaştırmak için optimize besiyeri ile hazırlanan serbest hücreler kullanılmıştır. Çizelge 4.7. de 10 günlük inkübasyon sonunda elde edilen gibberellik asit üretim miktarları verilmiştir. Şekil 4.14 de ise immobilize hücreler ve optimize besiyeri ile hazırlanan serbest hücreler karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.7. İmmobilize ve serbest hücreler ile gibberellik asit üretim miktarı

	GA_3 üretim miktar (mg/L)
Serbest hücre	635,00
Poliüretan köpük	545,00
Paslanmaz çelik sünger	361,37
Naylon sünger	387,74



Şekil 4.14. İmmobilize ve serbest hücrelerde gibberellik asit üretim miktarı karşılaştırılması

İmmobilize hücrelerin serbest hücrelere göre daha yüksek verim elde ettiği birçok litaratürde gözlenmektedir. Ünyayar (1999) en yüksek gibberellik asit miktarını 18. günde serbest mikroorganizmalarda 43.51 µg/mL ve immobilize organizmalarda 60.22 µg/mL olarak belirlenmistir. Kumar (1987) immobilize hücreler ile gibberellik asit miktarını 79 mg/L, Escamilla vd. (1999) bioreaktör ile gibberellik asit üretimini 8. günde 2,86 g/L olarak elde etmişlerdir. Gökdere ve Ateş (2014) gibberellik asit üretimini serbest hücreler ile 75.2 mg/L, immobilize hücreler ile 119,2 mg/L olarak saptamışlardır. Çalışmamızda immobilizasyon ile en yüksek üretim verimi gösteren poliüretan köpük 545,00 mg/L üretim gösterek bir artış sağlamıştır fakat optimize besiyeri ile karşılaştırıldığında bir başarı elde etmemiştir.

Çalışmamızın sonuçları doğultusunda ise optimize besiyeri ile hazırlanan serbest hücrelerin üretim verimi immobilize hücrelere göre daha başarılıdır. Optimize besiyerindeki üretim 635,00 mg/L iken, poliüretan köpük ile 545,0 mg/L, paslamaz çelik ile 361,37 mg/L, naylon sünger ile 387,74 mg/L bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda immobilize yöntemin gibberellik asit üretimini serbest hücre kadar artırmadığı saptanmıştır.

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Üretim alanlarının daralması ve üretilen ürünlerin verimsizliği günümüz problemlerinin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Bu problemlerin önüne geçebilmek tamamen mümkün olmasa da bitki büyüme hormonlarının şartları iyileştirdiği bilinmektedir. En çok tercih edilen hormonların başında ise gibberellik asit gelmektedir. Bitkilerde doğal olarak sentezlenen gibberellik asit kimyasal olarak temin edilsede üretim maliyeti bakımından mikroorganizmalar kullanılarak üretilmesi tercih sebebi olmuştur. Bu çalışmada üretim maliyetinin azaltılması ile ters orantılı olarak tarama çalışması, kültür tipi, istatistiksel analiz yöntemleri ve immobilizasyon ile üretim veriminin artırılması hedeflenmiştir.

Litaratür çalışmaları göstermiştir ki *Fusarium fujikuroi* organizması ile gibberellik asit üretimi üzerine birçok çalışma bulunmakta ve bu çalışmalarda çeşitli besiyeri içerikleri kullanılmaktadır; Machado vd. (2002) kahve kabuğu, manyok küspesi, glukoz ve mineral tuz solisyonu, Shukla vd. (2005) pirinç unu, Kumar ve Lonsane (1990) buğday kepeği, nişasta ve keten tohum yağı, Gökdere ve Ateş (2014) glukoz, mısır unu, NH_4Cl, KH_2PO_4 ve $MgSO_4$, Panchal vd.(2016) buğday kepeği, glukaz, nişasta, fruktoz, sükroz, üre, NH_4Cl, NH_4N0_3, $(NH_4)_2S0_4$, NH_4M0O_4, $ZnS0_4$. 7 H_2O, $CuS0_4$. 5 H_20, $FeS0_4$. 7 H_2O. Bu çalışmaların sonucunda modifiye besiyeri içeriği belirlenmiştir.

Belirlenen modifiye besiyeri ile üç farklı kültür tipi yöntemleri çalışılmış ve gibberellik asit üretim miktarları Şekil 4.8. da karşılaştırılmıştır. 10 gün sonucunda statik kültür 58,46 mg/L, derin kültür 95,10 mg/L, katı kültür 7,95 mg/L gibberellik asit üretimi gözlenmiştir. Çalışmaya en iyi üretim gösteren derin kültür yöntemi ile devam edilmiştir.

Gibberellik asit üretim miktarını artırabilmek için fermantasyon tekniğinin dışında, besinsel ve çevresel etkenlerin optimizasyonu gerçekleştirilir. Bu çalışmada *Fusarium fujikuroi* suşı için belirlenen çevresel ve besinsel değişkenlerden GA_3 üretimi üzerine artıcı etkisi olan değişkenin seçilebilmesi için plackett-burman deney tasarımı, seçilen

değişkenin optimum üretim gösterdiği değer için merkezi bileşke deney tasarımı kullanılmıştır.

Plackett-Burman deney tasarımında 19 değişken 20 deneme grubu ile istatistiksel olarak incelenmiştir (Şekil 4.6). İstatistiksel analiz sonuçlarına göre üretim verimini artırıcı yönde etkileyen değişkenleri seçebilmek için coeff verileri kullanılarak formülize edilmiştir. Değişkenlerden pirinç unu (-1,83), glukoz (-7,04), laktoz (11,83), nişasta (-2,43), maltoz (-1,15), NH_4Cl (-7,43), NH_4NO_3 (-0,45), yeast extract (8,18), üre (9,91), KH_2PO_4(-8,76), $CuSO_4$ 5 H_2O (7,59), $FeSO_4$ 7 H_2O (1,24), $ZnSO_4$ 7 H_2O (-7,42), $MgSO_4$ 7 H_2O (-9,91), keten tohum yağı (2,01), inokülant miktarı (3,59), inkübasyon sıcaklığı (5,57), pH (18,57), karıştırma hızı (-11,01) değerlerini göstermiştir. Şekil 4.7 de sunulan pareto grafiği ile pozitif yönde anlamlı olduğu gözlenen, ilave karbon kaynağı olarak laktoz, azot kaynağı olarak üre ve pH kontrollü değişken keten tohum yağı, sıcaklık, karıştırma hızı ve inokülüm miktarı sabitlenmiş değişken olarak seçilmiştir.

Çizelge 5.1. Plackett-Burman sonuçlarına göre belirlenen değişkenler

Değişkenler	**Konsantrasyon**
PH	7
Laktoz (%)	3
Üre (%)	0,2
Keten Tohum Yağı (%)	1
İnkübasyon Sıcaklığı (^oC)	28
Karıştırma Hızı (rpm)	100
İnokulum miktarı (%)	10

Etkisi araştırılan değişkenlerden pH, laktoz, üre'nin beş konsantrasyonu ve keten tohum yağı, inkübasyon sıcaklığı, karıştırma hızı sabitlenecek şekilde 20 deneme grubu ile istatistiksel olarak çalışılmıştır. Çalışma sonrasında öngörülen ve gözlenen sonuçlar karşılaştırılmış istatistiksel analizi yapılmıştır. Çalışma R^2 değerine bakarak kontrol edilmiştir. R^2 değerinin 0-1 arasında olması ve 0,75 den büyük olması modelin uygunluğunu göstermektedir. Gibberellik asit üretimi için R^2 değeri 0,93 dür. Bu R^2

değerinin %93 olması çalışmanın tahmin edilen değerlere uyumluluk gösterdiği bilgisini verir. Deneye yeni parametreler eklendiğinde R^2 değerinin artırılması mümkün olduğundan çoklu deney tasarımlarında düzeltilmiş R^2 (adj. R^2) değerlerinede bakılmalıdır. Çalışmamızda düzeltilmiş R^2 değeri 87.65 dir. Bu yakınlık ise çalışmanın uyumunu göstermektedir. F ve P değerleri modelin ve model parametrelerinin anlamlılıklarını göstermek için kullanılmaktadır. P değerleri 0,05'den küçük olması modeli anlamlı kılmaktadır. Çalışmamızın F değerinin 15,984 ve P değerinin 0,000 olması çalışmanın anlamlı olduğunu göstermiştir.

Gibberellik asit üretiminde optimum seviyeyi belirleyebilmek için cevap yüzey grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerde pH, laktoz ve üreden biri sabit tutularak diğer değişkenlerin gibberellik asit üretimi üzerine etkisi gösterilmektedir. Bu grafiklerden elde edilen değerler Şekil 5.3. da verilmiştir.

Çizelge 5.2 GA_3 üretiminde kullanılan optimize koşullar

Değişkenler	**Konsantrasyonlar**
pH	8,26
Laktoz (%)	3,33
Üre (%)	0,23
Keten Tohumu Yağı (%)	1
İnkübasyon Sıcaklığı (^oC)	28
Karıştırma Hızı (rpm)	100

Çalışmamızda gibberellik asit üretim verimini artırmaya yönelik *Fusarium fujikuroi* suşları ile tarama çalışması gerçekleştirilmiş ve seçilen suş ile kültür tipi, modifiye besiyeri, modifiye besiyeri bileşimlerinin konsantrasyonu ve immobilizasyon yöntemi gerçekleştirilmiştir. Bu aşamalardaki gibberellik asit üretim miktarları Çizelge 5.4. ile özetlenmiştir.

Çizelge 5.3. Gibberellik asit üretim basamaklarının üretim açısından karşılaştırılması

Çalışma Basamakları	**GA_3 Üretimi (mg/L)**
Tarama	164,16
Kültür Tipi Belirleme	95,10
PB ile optimizasyon	164,35
MBT ile optimizasyon doğrulaması	635,00
İmmobilizasyon	545,0

Elde edilen veriler doğrultusunda gibberellik asit üretim miktarı derin kültür tipi seçilerek 164,16 mg/L den 95,10 mg/L'ye düşmüştür. Kültür tipi çalışılma koşulları araştırılırken diğer koşulların aynı olması sağlanmalıdır. Katı kültür tipinde karbon kaynağı olarak buğday kepeği kullanılırken, derin kültür ve statik kültür tipinde de buğday kepeği özütü kullanılmıştır. Tarama çalışmasından sonra değişen besiyeri koşulları ile kültür tipi belirleme yönteminde bir düşüş gözlenmiştir. Bu düşüş istatistiksel deney tasarımları ile giderilmiştir.

Plackett-Burman deney tasarımı ve merkezi bileşke deney tasarımı ile gibberellik asit üretimi sırası ile 164,35 mg/L ve 635,00 mg/L'ye çıkarılmıştır. Bu sonuçlar üretimde derin kültür yönteminden 95,10 mg/ L Plackett-Burman istatistiksel yöntemi ile % 172,82 lik bir artış olduğunu, merkezi bileşke deney tasarımı ile ise üretimde % 667,72 lik bir artış gözlenmektedir.

Sonuç olarak 20 adet *Fusarium fujikuroi* suşları arasında seçilen H014W35-3B1 genbank erişim numaralı suşının kültür tipi, istatistiksel analiz yöntemleri ve immobilizasyonu başarılı bir şekilde gerçekleşmiş ve üretim verimi tarama çalışmasında 164,16 mg/ L den üretimde 635,00 mg/ L ye % 386,82 oranı ile 3,87 kat kadar artırılmıştır.

Bu çalışma doğrultusunda gibberellik asit üretim miktarının pik gösterdiği günü belirlemek için gün optimizasyonu ile birlikte yine üretim verimini gözlemleyebilmek için çalışmanın reaktör boyutuna taşınması hedeflenmektedir. Bu çalışmada kullanılan 20 suşın dışında Türkiye genelindeki bölgelerden elde edilen *Fusarium fujikuroi* suşları ile tarama çalışması genişletilebilir. Diğer bir çalışma konusu olarak elde edilen gibberellik asitin

saflaştırılması ile bitkiler üzerinde *in vivo* çalışmalar sağlanıp çalışma uygulamaya aktarılması araştırılabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Alexopoulos, A. A., Akoumianakis, K. A., Vemmos, S. N., Passam, H. C., 2007, The Effect of Postharvest Application of Gibberellic Acid And Benzyl Adenine on The Duration of Dormancy of Potatoes Produced by Plants Grown From TPS, Postharvest Biology and Technology, 46, 54–62.

Bandelier, S., Renaud, R., Durand, A., 1997, Production Of Gibberellic Acid By Fed-Batch Solid State Fermentation in as Aseptic Pilot-Scale Reactor, Process Biochemistry, 141–145.

Banga, J. R., Balsa-Canto, E., Moles, C. G., ve Alonso, A. A., 2003, Improving Food Processing Using Modern Optimization Methods, Trends Food Sci & Tech, 131-144.

Baumgartner, S., Shah, D., Schaller, J., Kampfer, U., Thurneysen, A., Heusser, P., 2008, Reproducibility Of Dwarf Pea Shoot Growth Stimulation by Homeopathic Potencies of Gibberellic Acid, Complementary Therapies in Medicine, 16, 183–191.

Bilkay, I. A., Karakoç, Ş., Aksöz, N., 2010, Indole-3-Acetic Acid And Gibberellic Acid Production in *Aspergillus niger*, Turk J Biol, 34, 313-318.

Borrow, A., Kessell, R. H. J., Jefferys, E. G., 1961, Metabolism Of *Fusarium fujikuroi* in Stirred Culture, Canadian Journal of Microbiology, 7, 227–234.

Borrow, A., Brown, S., Jefferys, E. G., Kessel, R. J. H., Lloyd, E. C., Lloyd, P. B., 1964, The Kinetics of Metabolism of *Fusarium fujikuroi* in Stirred Culture, Canadian Journal of Microbiology, 10, 407–944.

Botelho, R. V., Pires, E. J. P., Terra, M. M., 2003, Efeitos Do Thidiazuron E Do Acido Giberelico Nas Características Dos Cachos E Bagas De Uvas 'Niagara Rosada' Na Regiao De Jundiai-SP, Revista Brasileira de Fruticultura, 25, 96–99.

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.

Celik, I., Turker, M., Tuluce, Y., 2007, Abcisic Acid and Gibberellic Acid Cause İncreased Lipid Peroxidation and Fluctuated Antioxidant Defense Systems of Various Tissues İn Rats, Journal of Hazardous Materials, 30, 623–629.

Çetin, V., 2002, Meyve ve Sebzelerde Kullanılan Bitki Gelişmeyi Düzenleyiciler, Gıda ve Yem Bilimi Tekmolojisi,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Çetin, N., 2004, Mikrobiyal Yolla Üretilen İndol Asetik Asidin Zeytin Hasadında Kullanılma Olanakları, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Chang, J. C., Lin, T.S., 2006, GA_3 İncreases Fruit Weight İn `Yu Her Pau` Litchi, Scientia Horticulturae, 108, 442–43.

Corona, A., Sanchez, D., Agostin, E., 2005, Effect Of Water Activity on Gibberellic Acid Production by *Fusarium fujikuroi* Under Solidstate Fermentation Conditions. Process Biochemistry, 40, 2655–2658.

Deshmukh, D., V., Puranik, P., R., 2010, Application of Plackett-Burman Design to evaluate Media Components Affecting Antibacterial Activity of Alkaliphilic Cyanobacteria Isolated from Lonar Lake, Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem, 35 (2) ; 114–120

Doğan, B., Basidiomycetes Türlerinin Gibberellik Asit, Absisik Asit ve İndol Asetik Asit Üretimi Açısından Taranması, Üretim Koşullarının Optimizasyonu ve Reaktör Çapında Üretimi, 2013, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 75 s.

Donnell, O. K., Cigelnik, E., Nirenberg, H. I., 1998, Molecular Systematics and Phylogeograpyy of The *Fusarium fujikuroi* Species Complex Mycologia, 465–493.

Eleazar, M., Escamilla, S., Dendooven, L., Ignacio, P., Magana, R., Parra, S., Torre, M., 1999, Optimization of Gibberellic Acid Production by İmmobilized *Fusarium fujikuroi* Mycelium in Fluidized Bioreactors, Journal of Biotechnology,147–155

Ergün, N., Topcuoğlu, Ş. F., Yıldız, A., 2002, Auxin (Indole-3-acetic acid), Gibberellic acid (GA_3), Abscisic Acid (ABA) and Cytokinin (Zeatin) Production by Some Species of Mosses and Lichens, Tübitak, 13-18

Escamilla, E. M., Dendooven, L., Magana, I. P., Parra, R., Torre, M., 2000, Optimization of Gibberellic Acid Production by İmmobilized *Fusarium fujikuroi* Mycelium in Fluidized Bioreactors. Journal of Biotechnology, 76, 147–155.

Gelmi, C., Perez-Correa, R., Gonzalez, M., Agosin, E., 2000, Solid Substrate Cultivation of *Fusarium fujikuroi* on An İnert Support, Process Biochemistry, 35, 1227–1233.

Gelmi, C., Perez-Correa, R., Agostin, E., 2002, Modeling *Fusarium fujikuroi* Growth And GA_3 Production in Solid-State Fermentation, Process Biochemistry, 37, 1033–1040.

Gökdere, M., 2009, Serbest ve İmmobilize *Fusarium fujikuroi* Fungusu Kullanılarak Ekstraktif Fermentasyonla Gibberellik Asit Üretimi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 92 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Gökdere, M., Ateş, S., 2014, Extractıve Fermentatıon of Gıbberellıc Acıd Wıth Free and Immobılızed *Fusarium fujikuroi*, Preparative Biochemistry and Biotechnology

Hollmann, D., Switalski, J., Geipel, S., Onken, U., 1995, Extractive fermentation of Gibberellic acid by *Fusarium fujikuroi*, Journal of Fermentation and Bioengineering, 79, 594–600.

Holme, T., Zacharia, B., 1965, Gibberellic Acid Formation in Continuous Culture, Biotechnology and Bioengineering, 7, 405–412.

Hori, S., 1903, Bakanae Disease of Rice: Lectures on Plant Disease, Seibido, Tokyo, 1, 114.

Hsieh, W. H., Smith, S. N., Zinder, W. C., 1977, Mating Groups in *Fusarium moliniforme*. Phytopathology, 67, 1838–1842.

Index Fungorium, http://www.indexfungorum.org/ ,1931

Karadeniz, A., Topçooğlu, Ş. F., İnan, S., 2006, Auxin, Gibberellin, Cytokinin and Abscisic Acid Production in Some Bacteria, World Journal of Microbiology & Biotechnology, 1061–1064

Karakoç, Ş. B., Aksöz, N., 2005, Bazı Matrikslere Tutuklanmış *Aspergillus niger* 'den Gibberellik Asit Üretimi, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 03,01,16.

Khan, M. N., Siddiqui, M. H., Mohammad, F., Naeem, M., Khan, M. M. A., 2010, Calcium Chloride and Gibberellic Acid Protect Linseed (*Linum Usitatissimum* L.) From Nacl Stress By İnducing Antioxidative Defence System and Osmoprotectant Accumulation, Acta PHysiologiae Plantarum, 32, 121–132

Kumar, P. K. R., Lonsane, B. K., 1987, Extraction of Gibberellic Acid From Dry Mouldy Bran Produced Under Solid-State Fermentation, Process Biochemistry, 10, 138–43.

Kumar, P. K. R., Lonsane, B. K., 1989, Microbial Production of Gibberellins: State of The Art, Advances in Applied Microbiology, 34, 29–139

Kumlay, A. M., Eryiğit, T., 2011, Bitkilerde Büyüme ve Gelişmeyi Düzenleyici Maddeler: Bitki Hormonları, Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech, 1(2), 47-56.

Kurosawa, E., 1926, Experimental Studies on The Nature of The Substance Excreted by The Bakanae Fungus, Transactions, Natural History Society of Formosa, 213.

Machado, M. M. C., Soccol, C. S., Olıveıra, B. H., Pandey, A., 2002, Gibberellic Acid Production by Solid-State Fermentation in Coffee Husk, Applied Biochemistry and Biotechnology, 179, 102–103.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Machado, C. M. M., Oliveira, B. H., Pandey, A., Soccol, C. R., 2001, Coffee Husk as Substrate For The Production of Gibberellic Acid By Fermentation, Book on Coffee Biotechnology and Quality, 401–8.

Montgomery, D. C. (2001), Design and Analysis of Experiments, Fifth Edition, John Wiley and Song Inc, 684 p.

Panchal, R., 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

Pandey, A., Soccol, C. R., Mitchell, D., 2000, New Developments in Solid State Fermentation: I-Bioprocesses And Products Process, Biochemistry, 1153–1169

Pastrana, L. M., Gonzalez, M. P., Torrado, A., Murado, M. A., 1995, A Fedbatch Culture Model for İmproved Production of Gibberellic Acid From A Waste Medium, Biotechnology Letters, 17, 263–268.

Rakeshkumar R. P., Piyushbhai V. D., 2016, Study Of Gıbberellıc Acıd Productıon By Solid State Fermentation Using *Fusarıum Moniliforme* Sheldon, International Journal of Applied Sciences and Biotechnology, 402-407

Rodrigues, C., Vandenberghe, L. P. S., Oliveira, J., Soccol, C. R., 2012, New Perspectives of Gibberellic Acid Production: A Review, Critical Reviews in Biotechnology, 32:3, 263-273.

Sharma, R. R., Singh, R., 2009, Gibberellic Acid İnfluences The Production of Malformed and Button Berries, and Fruit Yield And Quality in Strawberry (Fragaria x ananassa Duch.), Scientia Horticulturae, 119, 430–433.

Shukla, R., Chand, S., Srivastava, A. K., 2005, Batch Kinetics and Modeling Of Gibberellic Acid Production By *Fusarium fujikuroi*, Enzyme and Microbial Technology, 36, 492–497.

Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. S., Rodrigues, C., Pandey, A., 2006, New Perspectives for Citric Acid Production and Application, Food Technology and Biotechnology, 44, 141–9.

Syahputra, B. S. A., Sinniah, U. R., Rastan, S. O. S., Ismail, M. R., 2013, Changes in Gibberellic Acid (GA_3) Content in *Oryza sativa* Due to Paclobutrazol Treatment

Takahashi, Y., 1986, Chemistry of Plant Hormones CRC Press, Boca Raton, 277.

Tarım İstatistikleri, 2008, Türkiye İstatistik Kurumu

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

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, TUBİTAK.

Tomasini, A., Fajardo, C., Barrios-González, J., 1997, Gibberellic Acid Production Using Different Solid-State Fermentation Systems, World Ournal of Microbiology & Biotechnology, 13, 203–206.

Troudi, A., Samet, A. M., Zeghal, N., 2010, Hepatotoxicity Induced By Gibberellic Acid in Adult Rats and Their Progeny, Experimental and Toxicologic Pathology, 62, 637–642.

Tudzynski, B., 2015, Gibberellin Biosynthesis in Fungi: Genes, Enzymes, Evolution, And Impact on Biotechnology, Appl Microbiol Biotechnol.

Tuna, A. L., Kaya, C., Dikilitas, M., Higgs, D., 2008, The Combined Effects of Gibberellic Acid and Salinity on Some Antioxidant Enzyme Activities, Plant Growth Parameters and Nutritional Status in Maize Plants, Environmental and Experimental Botany, 1–9.

Ünyayar, S., Ünyayar, A., Ünal, E., 1999, Production Of Auxin and Abscisic Acid By PHanerochaete Chrysosporium ME446 Immobilized on Polyurethane Foam, Tübitak, 769-774

Yabuta, T., Sumuki, T., 1938, Communication to The Editor, Journal Of The Agricultural Chemical Society of Japan, 14, 1526.

Yağcıoğlu, M., 2015, Tarımsal Büyüme ve Dış Ticaret Üzerine Makro Değerlendirmeler, İzmir Ticaret Borsası Ar-Ge Müdürlüğü

Yıldız, D., Yıldız, N. Ç., Ilgaz, Y., Güneş, M. Ş., Yıldız, D., 2017, Türkiye'deki Tarımsal İşgücünün Demografik ve Yapısal Dönüşümü Projesi