

1-1-2000

Production of Gibberellic Acid and Cytokinin By *Phanerochaete chrysosporium* ME446 Immobilized on Polyurethane Foam

SERPİL ÜNYAYAR

Follow this and additional works at: <https://journals.tubitak.gov.tr/biology>



Part of the [Biology Commons](#)

Recommended Citation

ÜNYAYAR, SERPİL (2000) "Production of Gibberellic Acid and Cytokinin By *Phanerochaete chrysosporium* ME446 Immobilized on Polyurethane Foam," *Turkish Journal of Biology*. Vol. 24: No. 3, Article 11. Available at: <https://journals.tubitak.gov.tr/biology/vol24/iss3/11>

This Article is brought to you for free and open access by TÜBİTAK Academic Journals. It has been accepted for inclusion in Turkish Journal of Biology by an authorized editor of TÜBİTAK Academic Journals. For more information, please contact academic.publications@tubitak.gov.tr.

Poliüretan Köpük Üzerine Tutuklanmış *Phanerochaete chrysosporium* ME446'da Gibberellik Asit ve Sitokin Üretimi*

Serpil ÜNYAYAR

Mersin Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 33342 Mersin-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 08.06.1998

Özet: *Phanerochaete chrysosporium* ME446 gibberellik asit (GA_3 eşdeğeri) ve sitokin (zeatin eşdeğeri) üretmek üzere poliüretan köpük üzerine tutuklanmıştır. Maksimum gibberellik asit üretimi hem serbest hem de tutuklanmış hücrelerde 6. günde (sırasıyla 44.43 $\mu\text{g/mL}$ ve 61.22 $\mu\text{g/mL}$) belirlenmiştir. Maksimum sitokin üretimi ise hem serbest hem de tutuklanmış hücrelerde 12. günde (sırasıyla 9.61 $\mu\text{g/mL}$ and 16.33 $\mu\text{g/mL}$) saptanmıştır. Gibberellik asit ve sitokin üretimi tutuklanmış sistemde serbest fungal miselyuma göre daha fazla verim elde edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Phanerochaete chrysosporium* ME446, tutuklama işlemi, poliüretan köpük, gibberellik asit, sitokin.

Production of Gibberellic Acid and Cytokinin By *Phanerochaete chrysosporium* ME446 Immobilized on Polyurethane Foam

Abstract: The fungus *Phanerochaete chrysosporium* ME446 was entrapped on polyurethane foam to synthesize gibberellic acid (GA_3 equivalent) and Cytokinin (zeatin equivalent). Maximum gibberellic acid was defined on the 6th day (44.43 $\mu\text{g/mL}$ and 61.22 $\mu\text{g/mL}$, respectively) in both free and immobilized cells. Maximum cytokinin was defined on the 12th day (9.61 $\mu\text{g/mL}$ and 16.33 $\mu\text{g/mL}$, respectively) in both free and immobilized cells. An immobilized system of gibberellic acid and cytokinin production resulted in comparatively higher yield than free fungal mycelium.

Key Words: *Phanerochaete chrysosporium* ME446, immobilization, polyurethane foam, gibberellic acid, cytokinin.

Giriş

Bitki büyüme hormonları bitki büyüme ve gelişmesinde rol oynayan en önemli içsel faktörlerdir. Yüksek organizasyonlu bitkiler (1), funguslar (1,2), yosunlar ve likenler (3) ve bakterilerin (4) gibberellin ve sitokin sentezlediklerine dair kanıtlar bulunmaktadır. Gibberellinler ve sitokinler, bitkiler üzerindeki fizyolojik etkilerinden dolayı bir çok tarımsal uygulamada kullanılmaktadır.

Tarımcılar ve insanlık için bitki hormonlarının her geçen gün daha da önem kazanır olması ve sınırlı tarım alanlarında verimliliğin artırılması amacı, bitki büyüme maddelerinin daha fazla elde

Bu çalışma ME.Ü. FEFB (SÜ) 1995-2/1 nolu proje ile desteklenmiştir.

edilebileceği çalışmaların yoğunlaştırılmasını zorunlu kılmaktadır. Son yıllarda bitki büyüme maddelerinin elde edilmesinde geniş oranda mikroorganizmalar kullanılmaya başlanmıştır.

Mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen biyokimyasal dönüşümlerden; besin, kimya, tıp ve fermentasyon olaylarına dayalı endüstri kollarında geniş ölçüde yararlanılmaktadır. Bu dönüşümlerde ilk aşamada serbest mikroorganizmalar kullanılmış, daha sonra mikroorganizmaların çeşitli yüzeylerde üreyebilmesi nedeniyle mikroorganizmaların tutuklanarak kullanılabilmesi düşüncesi ortaya çıkmıştır.

Son yıllarda tutuklanmış hücrelerden yararlanılmakta ve böyle katalizörlerin yeni özellikleri kullanılmaktadır (5). Bu çalışmaların bir nedeni, böyle organizmaların endüstriyel açıdan kullanımında önemli bir parametre olan sekonder metabolit üretim fazını mümkün olduğu kadar uzatmaktır. Kumar ve Lonsane (6) tutuklanmış hücrelerin bazı avantajları olduğunu bildirmektedir. Bunlar: a) Jel ve hücreler arasındaki fizikokimyasal ilişkilerin korunmasına bağlı üstün bir denge oluşturur, b) Uygun olmayan çevre faktörlerine karşı hücreleri korur, c) Yüksek oranda substrat alınmasına doğru hücrelerin geçirgenliğini değiştirir, d) Fermentasyon bölgesinden son ürünleri hızla uzaklaştırır, e) Biyokatalist sistemin kendini kolaylıkla yenilemesini sağlar. Birçok endüstri kolunda, ekonomik önemi olan maddelerin (enzimler, antibiyotikler, bitki büyüme hormonları, steroidler ve organik asitler vd.) üretiminde alışlagelmiş yöntemler kullanılmakla birlikte, son yıllarda gerek laboratuvar koşullarında gerek pilot düzeyde yapılan çalışmalarda çeşitli tutuklama işlemleri gerçekleştirilmeye başlanmıştır.

Tutuklanmış funguslar tarafından diğer sekonder metabolitler (gibberellik asit, patulin ve penisilin) geniş oranda çalışılmıştır (5,7). Buna karşılık, tutuklanmış *Phanerochaete chrysosporium* ME446'da gibberellik asit ve sitokin üretilmesi konusunda bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, *Phanerochaete chrysosporium* ME446 poliüretan köpük üzerine tutuklanarak serbest ve tutuklanmış mikroorganizmalar gibberellik asit ve sitokin üretilmesi yönünden karşılaştırılmıştır.

Materyal ve Metod

Organizma

Çalışmalarda kullanılan fungus suşu *Phanerochaete chrysosporium* ME446 Mersin Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Çevre Teknolojisi Laboratuvarından sağlanmıştır.

Fungus Üretimi

Çalışmalarda temel besiyeri olarak Sabouroud dextrose agar üreme ortamı kullanılmıştır (8). Besiyerinin pH'ı 5.0'e ayarlanarak otoklavda (120°C, 1 atm. basınç ve 15 dk.) sterilize edilmiştir.

Mikroorganizma tutuklama işlemleri

Phanerochaete chrysosporium ME446 poliüretan köpük üzerine tutuklama işlemleri bazı değişiklikler yapılarak Capdevila vd. (9)'nin önerdiği yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle göre, stok basal mineral (SBM) besiyeri 250 mL'lik erlenmayere 100 mL olacak şekilde

Kullanılan Madde	g/L
KH_2PO_4	0.2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.5
Glukoz	10.0

Tablo 1.

konulmuştur. SBM'nin içeriği Tablo 1'de verilmiştir. Besiyerlerinin ilk setine 1x1x0.5 cm boyutlarında hazırlanan poliüretan köpük (30 PPT) 3'er tane olacak şekilde yerleştirilmiştir. Erlenlerin üzerine plastik tıpa ve tıpalara açılan iki delikten cam boru geçirilmiştir. Cam boruların uçlarının besiyerine girmesi sağlanmıştır. Cam boruların dışarıda kalan uçları cam pamuğu ile tıkanmıştır. Bu şekilde hazırlanan düzenek otoklavda (120°C, 1 atm. basınç ve 15 dk.) sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrası her bir erlene 1 mL miselyum süspansiyonu ekilmiştir.

İnkübasyon 30°C, %65 nem içeren statik ortamda 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Ekim işleminden sonra kültürler ilk 5 gün 2 dk. %100 oksijenle havalandırılmıştır. Bu şekilde miselyumların kolaylıkla poliüretan köpüğe tutunmaları sağlanmıştır.

Üreme kuru ağırlık cinsinden hesaplanmıştır (8). Kültür ortamından süzülerek ayrılan poliüretan köpük ve miselyum kütlesi 70°C'de 24 saat kurutulmuştur. Önceden saptanan köpük ağırlığı bu bileşimin ağırlığından çıkarılarak üreme g kuru ağırlık/L olarak tayin edilmiştir. Gibberellik asit (GA_3 eşdeğerli) ve sitokinin (zeatin eşdeğerli) ekstraksiyonu ve saflaştırılması işlemleri Ünyayar vd. (2)'nin önerdiği yönteme göre yapılmıştır.

Kültür periyoduna bağlı olarak (1., 6., 12. ve 18. gün) üreme ve gibberellik asit ve sitokinin miktarı belirlenerek poliüretan köpük üzerine tutuklanmış organizma ve serbest organizma gibberellik asit ve sitokinin üretimi yönünden karşılaştırılmıştır.

İstatistik Analizler

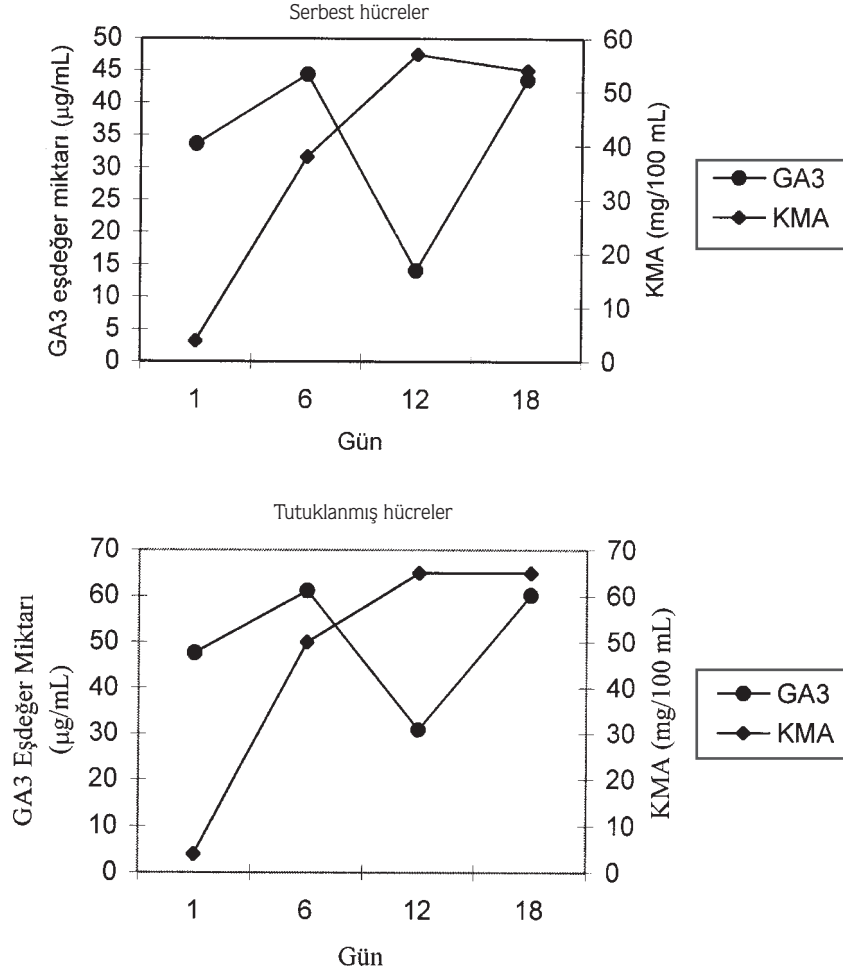
Verilerin istatistik analizleri SPSS 6.0 paket programı ile yapılmıştır.

Sonuçlar ve Tartışma

Bu çalışmada, SBM besiyeri içindeki poliüretan köpük üzerine tutuklanmış ve serbest *Phanerochaete chrysosporium* ME446 gibberellik asit ve sitokinin verimi yönünden karşılaştırılmıştır.

Bulgularımıza göre hem üreme hem de gibberellik asit ve sitokinin verimi yönünden gruplar arasındaki farklılığın önemli olduğu saptanmıştır ($P < 0.05$).

En yüksek gibberellik asit miktarı 6. günde serbest mikroorganizmada 44.43 µg/mL, tutuklanmış mikroorganizmada 61.22 µg/mL ve 18. günde sırasıyla 43.51 µg/mL ve 60.22 µg/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 1).

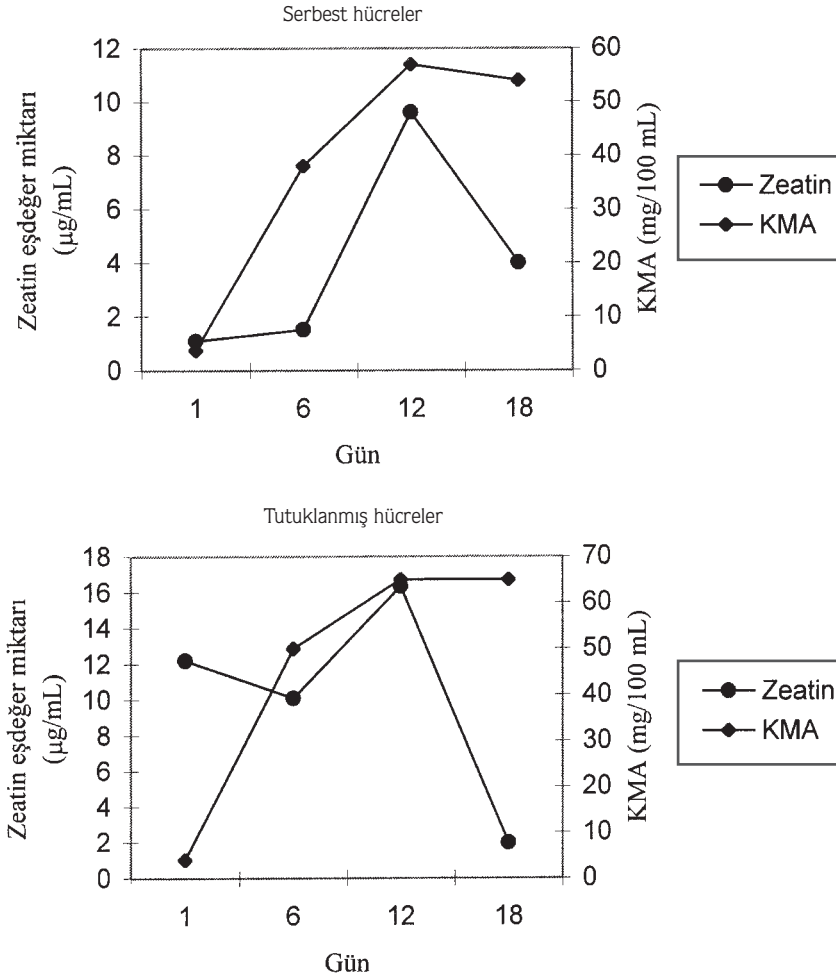


Şekil 1.

Serbest ve tutuklanmış mikroorganizmalar arasında gibberellik asit verimi yönünden farklılığın önemli olduğu saptanmıştır ($P<0.05$).

En yüksek sitokin miktarı 12. günde serbest mikroorganizmada $9.61 \mu\text{g/mL}$, tutuklanmış mikroorganizmada $16.33 \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur (Şekil 2).

Serbest ve tutuklanmış mikroorganizmalar arasında sitokin verimi yönünden farklılığın önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$).



Şekil 2.

Kuru misel ağırlığı (KMA) hem serbest hem de tutuklanmış mikroorganizmalarda 1. günden 18. güne kadar sürekli bir artış göstermiştir. Tutuklanmış mikroorganizmaların KMA'si serbest olanlara göre daha yüksek değerlerde bulunmuştur. KMA'ı yönünden tutuklama işleminin daha verimli olduğu tespit edilmiştir. Serbest ve tutuklanmış mikroorganizmaların KMA'si arasındaki farklılıkların önemli olduğu saptanmıştır ($P<0.05$).

Mikroorganizmalarda tutuklama işlemleri diğer endüstriyel ürünlerin yanısıra bitki büyüme

hormonlarından sadece gibberellik asit üretimi için uygulanmıştır, sitokinin üretimi konusunda bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Tutuklama ajanı olarak poliüretan köpük kullanan araştırmacılar GA₃ veriminin tutuklanmış organizmalarda serbest organizmalara göre daha yüksek düzeyde olduğunu bildirmişlerdir. Bunun nedenini havanın oksijeni ile temas eden miseliyal yüzeyin artmasına bağlamışlardır (9, 10, 11). Bu veriler bizim bulgularımızla da uyum göstermektedir. Buna karşılık, Kumar ve Lonsane (6), serbest mikroorganizmalarda daha fazla GA₃ üretildiğini bildirmişlerdir. Kahlon ve Malhotra (12) inkübasyon periyodu arttıkça GA₃ düzeyinin artmakta olduğunu ve en yüksek düzeyin 12. günde 565 mg/L olarak bulunduğunu bildirmişlerdir. Bulgularımıza göre, en yüksek gibberellik asit düzeyi hem serbest hem de tutuklanmış organizmada 6. günde elde edilmiş (sırasıyla 44.43 µg/mL, 61.22 µg/mL), 12. günde gibberellik asit düzeyi belirgin bir azalma göstermiştir (sırasıyla 14.07 µg/mL, 30.94 µg/mL). Saucedo vd. (7) tutuklanmış hücrelerde en yüksek GA₃ veriminin 15. günde 45 mg/L olarak saptamışlardır. Çalışmamızda sitokinin miktarı ise hem serbest hem de tutuklanmış mikroorganizmada inkübasyon periyodu artıp fungusun sekonder metabolizma fazına girdiği 12. günde maksimum seviyeye ulaşmış, fakat 18. Günde belirgin bir azalma meydana gelmiştir.

Çalışmamızın sonucunda, *Phanerochaete chrysosporium* ME446'nın poliüretan köpük üzerine tutuklanmasının gibberellik asit ve sitokinin üretimini ve KMA'nı arttırdığını söyleyebiliriz. Bu sonuç literatür bilgilerimizle de desteklenmektedir.

Kaynaklar

1. Davies, P.J., Plant Hormones, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 1995.
2. Ünyayar, S., Topcuoğlu, Ş.F. and Ünyayar, A., A modified method for extraction and identification of indole-3-acetic acid (IAA), gibberellic acid (GA₃), abscisic acid (ABA) and zeatin produced by *Phanerochaete chrysosporium* ME446, Plant Physiology and Biochemistry, Special issue, 307, 1996.
3. Ergün, N., Bazı yosun ve likenlerde içsel büyüme hormonlarının (oksin, gibberellin, absisik asit ve sitokinin) üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antakya, 1997.
4. Gonzalez-Lopez, J., Salmeron, V., Martinez-Toledo, M.V., Ballesteros, F. and Ramos-Cormenzana, F., Production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* ATCC12837 in chemically-defined media and dialysed soil media, Soil Biol.Biochem., 18, 1, 119-120, 1986.
5. Jones, A. and Pharis, R.P., Production of gibberellins and bikaverin by cells of *Gibberella fujikuroi* immobilized in carrageenan, J.Ferment.Technol., 65,6,717-722, 1987.
6. Kumar,P.K.R. and Lonsane, B.K., Immobilized growing cells of *Gibberella fujikuroi* P-3 for production of gibberellic acid and pigment in batch and semi-continuous cultures, Appl.Microbiol.Biotech., 28,537-542, 1988.
7. Saucedo, J.E.N., Barbotin, J. and Thomas, D., Continuous production of gibberellic acid in a fixed-bed reactor by immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi* P-3 in calcium alginate beads, Appl.Microbiol. Biotechnol., 30,226-233, 1989.

8. Ünyayar, A. ve Kolankaya, N., Kağıt hamuru eldesi için biyoteknolojik yaklaşım, Doğa Türk Biyoloji Dergisi, 14, 1, 51-58,1990.
9. Capdevila, C., Corrieu, G. and Asther, M.A., A feedharvest culturing method to improve lignin peroxidase production by *Phanerochaete chrisosporium* INA-12 immobilized on polyurethane foam, J. Ferment.Bioeng., 68, 1, 60-63,1989.
10. Kirkpatrick, N., Reid, I.D., Ziomek, E. and Paice, M.G., Biological bleaching of hardwood kraft pulp using *Trametes (Coriolus) versicolor* immobilized in polyurethane foam, Appl.Microbiol.Biotech., 33, 105-108,1990.
11. Cihangir, N. ve Aksöz, N., Tütuklanmış *Aspergillus niger*'den gibberellik asit eldesi, Doğa Türk Biyoloji Dergisi, 17, 175-180, 1993.
12. Kahlon, S.S. and Malhotra, S., Production of gibberellic acid by fungal mycelium immobilized in sodium alginate, Enzyme Microb.Technol., 8, 613-616, 1986.