

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SOSYAL BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
İŞLETME ANABİLİM DALI
ÜRETİM YÖNETİMİ BİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

MISIR BİTKİSİNİN GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ
ORGANİZMA (GDO) ANALİZİNDE GERÇEK
ZAMANLI PCR (POLİMERASE CHAIN
REACTION) PARAMETRELERİNİN MERKEZİ
KOMPOZİT TASARIM İLE OPTİMİZASYONU

Meryem DEMİRCİOĞLU

2502080057

TEZ DANIŞMANI:

Prof. Dr. Özlem AKÇAY KASAPOĞLU

İstanbul-2022

ÖZ

MISIR BİTKİSİNİN GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMA (GDO) ANALİZİNDE GERÇEK ZAMANLI PCR (POLİMERASE CHAIN REACTION) PARAMETRELERİNİN MERKEZİ KOMPOZİT TASARIM İLE OPTİMİZASYONU

MERYEM DEMİRCİOĞLU

Toplam kalite yönetiminde, karşılaşılan problemleri bir daha ortaya çıkmayacak şekilde çözmek temel hedeftir. Deney tasarımı, her alanda geniş bir şekilde uygulanan istatistiksel bir teknik olup kalitenin geliştirilmesinde birçok katkıda bulunmaktadır. Bu çalışma, deney tasarımı tekniklerini kullanarak mısırdaki GDO (Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar) gen bölgesinin aranması ve düzgün bir şekilde çoğaltılması için gerçek zamanlı PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) parametrelerinin çok yanıtlı optimizasyonu sağlanarak çabuk, güvenilir ve en düşük maliyetle GDO analizinin gerçekleştirilmesini amaçlamaktadır. Bu çalışmada birçok riske sahip olduğu düşünülen genetiği değiştirilmiş ürünlerin tespitinde rol oynayan C_t değeri ve PCR ürün konsantrasyonuna etki eden faktörler ve bu faktörlerin seviyeleri tespit edilmiştir. Bu faktörlerin yanıt değerlerine olan etkileri Minitab.18 programında yüzey yanıt yöntemlerinden merkezi kompozit tasarım metodu ile belirlenmiş ve faktörler optimize edilmiştir. Optimum faktör seviyeleri kullanılarak doğrulama deneyleri gerçekleştirilerek oluşturulan model doğrulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Toplam kalite yönetimi, deney tasarımı, istatistiki analizler, istatistiksel yöntemler, GDO, GDO analizi, PZR, gerçek zamanlı PZR, yüzey yanıt yöntemi, merkezi kompozit tasarım, çok yanıtlı problem, optimizasyon, çok yanıtlı optimizasyon, modelleme, Minitab 18.

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF REAL TIME PCR (POLIMERASE CHAIN REACTION) PARAMETERS BY CENTRAL COMPOSITE DESIGN IN GENETICALLY MODIFIED ORGANISM (GMO) ANALYSIS OF CROP PLANT

MERYEM DEMİRCİOĞLU

In total quality management, the main goal is to solve the problems encountered in a way that will not occur again. Experimental design is a statistical technique widely applied in every field and makes many contributions to the improvement of quality. This study aims to perform GMO (Genetically Modified Organism) analysis quickly, reliably and at the lowest cost by providing multi-response optimization of real-time PCR parameters to search and properly amplify the GMO gene region in maize using experimental design techniques. In this study, the ct value, which plays a role in the detection of genetically modified products, which are thought to have many risks, and the factors affecting the PCR product concentration and the levels of these factors were determined. The effects of these factors on the response values were determined by the central composite design method, one of the surface response methods, in Minitab.18 program and the factors were optimized. The model was validated by performing validation experiments using optimum factor levels.

Key Words: Total quality management, design of experiment, statistical analysis, statistical methods, GMO, GMO analysis, PCR, real time PCR, response surface method, central composite design, multi response problem, multi response optimization, optimization, modelling, Minitab 18.

ÖNSÖZ

Bu çalışmada yanıt yüzey yöntemlerinde merkezi kompozit tasarım yöntemi kullanılarak GDO analizinde PCR'a etki eden faktörlerin incelenmesi, koşulların çok yanıtla optimize edilmesi, elde edilen sonuçlarla literatüre katkıda bulunulması amaçlanmıştır

Bu çalışma 6 bölümden meydana gelmektedir. Birinci bölüm konu ile ilgili daha önce yapılan çalışmalar üzerinde durulmuş, ikinci bölümde GDO (Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar) ile ilgili bilgiler verilmiş, üçüncü bölümde PCR (Polimeraz Chain Reaction) yöntemi ve PCR'ı etkileyen parametreler anlatılmış, dördüncü bölümde kalite ile ilgili kavramlardan bahsedilmiş, beşinci bölümde deney tasarımı yaklaşımı ve kullanılan yöntemler ele alınmış, uygulama kısmı olan altıncı bölümde deneylerin tasarım aşaması, kullanılan materyal ve metodlar, deneylerin uygulanışı, modelin optimizasyonu açıklanmış ve elde edilen sonuçlar ortaya konmuştur.

Çalışmamın başından sonuna her aşamasında beni her konuda yüreklendiren, bana inanıp güvenen, hiçbir konuda yardımını esirgemeyen, her zaman bana büyük bir özveriyle yaklaşan danışman hocam sayın Prof. Dr. Özlem Akçay Kasapoğlu başta olmak üzere, tasarım aşamasında değerli fikir ve tecrübelerinden faydalandığım sayın hocam Prof.Dr. Şükrü Alp Baray'a, bu aşamalara gelmemde emeği olan çok değerli hocam sayın Prof.Dr Necdet Özçakar'a ve katkısı olan bütün hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez konumun temellerini atmamda büyük rolü olan Mısır Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Biyoteknoloji Laboratuvar Birim Sorumlusu Dr.Mesut Esmeray'a, uygulama kısmını gerçekleştirmem için bana imkan sağlayan Balıkesir Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürü sayın İlhami İlhan'a, deneylerin uygulanma aşamasında bana zaman ayıran, her konuda yardımcı olan ve bu konudaki bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Balıkesir Gıda Kontrol Müdürlüğü Moleküler Biyoloji Laboratuvar Birim Sorumlusu Alper Güngör'e, beni her zaman cesaretlendiren ve moral veren mesai

arkadaşım Tuğçe Göktürk'e ve beni destekleyen bütün arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışmayı bitirmem için büyük fedakarlıkta bulunan ve her konuda bana destek olan eşim Soner Demircioğlu'na, bu günlere gelmemi sağlayan Anneme ve Babama, varlıklarıyla bana güç veren, annelik duygusunu tattırarak her konuda göğüs germeyi öğreten beni bu çalışma ile paylaşmak durumunda kalan sevgili yavrularım Kerem, Betül ve Elif'e çok teşekkür ederim.

Meryem DEMİRCİOĞLU
İstanbul, 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZ.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ.....	iv
TABLolar.....	x
ŞEKİLLER.....	xii
KISALTMALAR	xiv
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM LİTERATÜR TARAMASI

2. BÖLÜM GDO (GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALAR)

2.1. Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO) Tanımı.....	14
2.1. GDO'nun Tarihçesi.....	15
2.2. GDO'ların Beklenen Faydaları.....	18
2.3. GDO'ların Olası Zararları	21
2.4. Dünya'da GDO Hakkında Yasal düzenlemeler	24
2.5. Türkiye'de GDO ile İlgili Yasal Düzenlemeler	26
2.5.1. GDO Analizi Sonucunda Ürünün Kabul veya Reddi	32
2.6. GDO Analiz Yöntemleri	33
2.6.1. GDO'larda Temel Genetik Elementler	33
2.6.1.1. Promotorlar	34
2.6.1.2. Terminatörler.....	34
2.6.2. GDO Analiz Aşamaları.....	34
2.6.2.1. DNA İzolasyonu.....	35
2.6.2.2. DNA Safılık ve Konsantrasyon Tespiti	38

2.6.2.3.	GDO Tarama Analizi.....	38
2.6.2.4.	Tip Belirleme (Gen Tanımlama) Analizi.....	38
2.6.2.5.	Miktar Analizi	39

3. BÖLÜM

PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

3.1.	PCR (Polymerase Chain Reaction) Tanımı.....	40
3.2.	PCR'in Tarihçesi	40
3.3.	PCR Temel Bileşenleri ve Optimizasyonu	41
3.4.	PCR Temel Aşamaları	41
3.5.	PCR Kullanım Alanları.....	43
3.6.	PCR Etkileyen Faktörler	44
3.6.1.	Enzim Konsantrasyonu	44
3.6.2.	DNA Konsantrasyonu.....	44
3.6.3.	Primerler.....	45
3.6.4.	Sıcaklık	45
3.6.5.	Deoksinükleotid Trifosfatlar (dNTPs).....	46
3.6.6.	Magnezyum Konsantrasyonu	46
3.6.7.	Prob Konsantrasyonu.....	47
3.6.8.	Devir Sayısı.....	47
3.6.9.	Diğer Reaksiyon Unsurları.....	47
3.7.	PCR Çeşitleri.....	47
3.7.1.	Çoklu (Multiplex) PCR.....	47
3.7.2.	RAPD PCR.....	48
3.7.3.	Gerçek zamanlı (Real Time) PCR.....	49
3.7.3.1.	Real Time PCR'in Fazları ve C _t Değeri	49
3.7.3.2.	Real Time PCR' da Kullanılan Başlıca İzleme Sistemleri	50

4. BÖLÜM

KALİTEYE AİT TEMEL KAVRAMLAR

4.1.	Kalite Kavramı ve Kalite İlgili Temel Unsurlar	53
4.1.1.	Tasarım Kalitesi ve Uygunluk Kalitesi	54
4.2.	Kalitenin Kimlik Değişimi	56
4.2.1.	Muayene	57
4.2.2.	İstatistiksel Kalite Kontrol	57
4.2.3.	Toplam Kalite Kontrol	58
4.2.4.	Toplam Kalite Yönetimi	59
4.3.	Kalite Maliyetleri	60
4.4.	Kalite Geliştirme Teknikleri	63

5. BÖLÜM

DENEY TASARIMI YAKLAŞIMI

5.1.	Deney Tasarımının Tanımı	65
5.2.	Deney Tasarımın Tarihçesi	68
5.3.	Deney Tasarımının Temel Prensipleri	70
5.3.1.	Tekrarlama	70
5.3.2.	Rassallaştırma	71
5.3.3.	Bloklama	71
5.4.	Deney Tasarımı Aşamaları	72
5.5.	Deney Tasarımı Türleri	73
5.5.1.	Bölünmüş Parseller Tasarımı	73
5.5.2.	Rassal Blokları Tasarımı	74
5.5.3.	Latin Karesi Deney Tasarımı	75
5.5.4.	Tam Faktöriyel Deney Tasarımı	76
5.5.5.	Kesirli Faktöriyel Deney Tasarımı	77

5.6.	Yanıt Yüzey Metodu (Response surface methodology = RSM)	78
5.6.1.	Merkezi Kompozit Tasarımlar	80
5.6.2.	Box-Behnken Tasarımları	85
5.7.	Çoklu Yanıt Optimizasyonu ve İstenebilirlik (Desirability) Fonksiyonu	87

6. BÖLÜM

UYGULAMA

6.1.	Metodoloji	90
6.1.1.	Kullanılan Kimyasal ve Malzemeler	90
6.1.2.	Kullanılan Cihaz ve Aletler	91
6.1.3.	DNA İzolasyonu	92
6.1.4.	DNA Konsantrasyon ve Saflık Tespiti	94
6.1.5.	GDO Tarama Analizi	95
6.1.6.	Faktörler Seviyeleri ve Yanıt Değişkenlerinin Belirlenmesi	95
6.1.7.	Deneyin Yapılışı	96
6.1.8.	Merkezi Kompozit Tasarımın Uygulanması ve Modelin Oluşturulması 100	
6.1.9.	Modelin Optimizasyonu	117
6.1.10.	Onay Deneyleri ile Modelin Doğrulanması	119
SONUÇ		120
KAYNAKÇA		127
ÖZGEÇMİŞ		152

TABLÖLAR

Tablo 2.1 Onaylı, Onaysız ve Onay Sürecindeki GDO Genleri (Anonim, 2018; Anonim, 2021a)	29
Tablo 4.1 Kalite Maliyet Bileşenleri (Kolarik, 1995: 40)	61
Tablo 5.1 Rassal Blokları Deney Tasarımı Örneği	75
Tablo 5.2 Latin Karesi Tasarımı Örnekleri (Montgomery, 2005: 136).....	76
Tablo 5.3 5 X 5 Latin Karesi Tasarımı Örneği (Cochran ve Cox, 1957: 119).	76
Tablo 5.4 Tam Faktöriyel Deney Tasarımı Örneği (Antony, 2003: 55).	77
Tablo 5.5 Kesirli Faktöriyel Tasarımı Örneği	78
Tablo 5.6 Bir Dönersel Merkezi Kompozit Tasarımı için Değerleri	84
Tablo 5.7 Bir Box Behnken Tasarımı	86
Tablo 6.1 Deneydeki DAS 40278 Hedef Genine ait Primer ve Probların Dizinleri ..	91
Tablo 6.2 Deney Tasarımında Kullanılan Faktör ve Seviyeleri	95
Tablo 6.3 Real Time PCR Sıcaklık-Zaman Ayarları	98
Tablo 6.4 Merkezi Kompozit Tasarım ile Yapılan Deneylerin Sonuçları	99
Tablo 6.5 Lineer Programlamada c_t Yanıtı (Y_1) için Varyans Analizi Sonuçları....	101
Tablo 6.6 Lineer Programlamada c_t Yanıtı (Y_1) için Regresyon Katsayıları	101
Tablo 6.7 Lineer Programlamada Ürün Konsantrasyonu Yanıtı (Y_2) için Varyans Analizi Sonuçları	102
Tablo 6.8 Lineer Programlamada Ürün Konsantrasyonu Yanıtı (Y_2) için Regresyon Katsayıları	103

Tablo 6.9 İkinci Dereceden Modelin c_t Yanıtı (Y_1) için Varyans Analizi Sonuçları ve R^2 Değerleri	104
Tablo 6.10 İkinci Dereceden Modelin c_t Yanıtı (Y_1) için Regresyon Katsayıları ...	105
Tablo 6.11 İkinci Dereceden Modelin Ürün Konsantrasyonu Yanıtı (Y_2) için Varyans Analizi Sonuçları ve R^2 Değerleri	106
Tablo 6.12 İkinci Dereceden Modelin Ürün Konsantrasyonu Yanıtı (Y_2) için Regresyon Katsayıları	107
Tablo 6.13 İndirgenmiş Modelin c_t Yanıtı (Y_1) için Varyans Analizi Sonuçları ve R^2 Değerleri.....	109
Tablo 6.14 İndirgenmiş Modelin c_t Yanıtı (Y_1) için Regresyon Katsayıları	110
Tablo 6.15 İndirgenmiş Modelin Ürün Konsantrasyonu Yanıtı (Y_2) için Varyans Analiz Sonuçları ve R^2 Değerleri	113
Tablo 6.16 İndirgenmiş Modelin Ürün Konsantrasyonu Yanıtı (Y_2) için Regresyon Katsayıları	114
Tablo 6.17 Merkezi Kompozit Tasarımda Düşük Yüksek ve Hedef Yanıt Değerleri.....	117
Tablo 6.18 Merkezi Kompozit Tasarım ile elde edilen Optimum Faktör Seviyeleri ve Yanıtları.....	117
Tablo 6.19 Merkezi Kompozit Tasarım Yöntemi ile elde edilen Yanıt Değerlerine ait Optimum Sonuç Aralıkları.....	117
Tablo 6.20 Onay Deneyinin Sonuçları ile Modelin Tahmin Değerlerinin Karşılaştırılması.....	119

ŞEKİLLER

Şekil 2.2 GDO Analiz Aşamaları	35
Şekil 2.3 Hücre membranının parçalanması ve DNA'nın ekstrasyonu	37
Şekil 3.1 PCR'ın 3 Temel Aşaması (Andy, 1999)	42
Şekil 3.2 Hedef Bölgenin PCR Ekspansiyel Çoğalma Aşaması (Andy, 1999).....	43
Şekil 3.3 Real Time PCR Yönteminin Fazları (Anonim, 2021b)	50
Şekil 4.1 Dizayn Kalitesi İçin En Uygun Kalite Derecesinin Saptanması	55
Şekil 4.2 Uygunluk Kalitesini Etkileyen Maliyet Unsurları	56
Şekil 5.1 Bir Sistem veya Sürecin Genel Gösterimi (Lunani vd., 1997).....	66
Şekil 5.2 Şekil Merkezi Kompozit Tasarımın Deney Noktaları	81
Şekil 5.3 $k = 2$ ve $\alpha = 422$ değerleri için merkezi bileşik tasarım	83
Şekil 5.4 $k = 3$ ve $\alpha = 423$ değerleri için merkezi bileşik tasarım	83
Şekil 6.1 DNA Saflık ve Konsantrasyonu Ölçümü yapılan Mikro UV Spektrofotometre	94
Şekil 6.3 Deney Sonuçlarına ait Amplifikasyon Grafiği	100
Şekil 6.4 Primer ve Prob Konsantrasyonunun C_t değerine Etkisinin Kontur Grafiği...	111
Şekil 6.5 Primer ve Prob Konsantrasyonunun C_t değerine Etkisinin Yüzey Grafiği	112
Şekil 6.6 Primer ve Prob Konsantrasyonunun Ürün Konsantrasyonuna Etkisinin Kontur Grafiği	115
Şekil 6.7 Primer ve Prob Konsantrasyonunun Ürün Konsantrasyonuna Etkisinin Yüzey Grafiği	116

Şekil 6.8 Merkezi Kompozit Tasarım ile Elde Edilen Optimizasyon Grafiği	118
--	-----



KISALTMALAR

F	Forward (İleri)
ELISA	Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay
FRET	Floresan Rezonans Enerji Transferi
GDO	Genetiği Değiştirilmiş Organizma
KCl	Potasyum Klorür
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
mRNA	Mesajcı Ribo Nükleik Asit
MGB	Minors Groove Binder (kincil Oluk Bağlayıcı)
MS	Mean Square (Kareler Ortalaması)
NaCl	Sodyum Klorür
OFAT	One Factor At a Time (Her Seferinde Tek Faktör)
PCR	Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
P	Performans
P-Value	Significance (Anlamlılık) Değeri
R	Rewerse (Ters)
RAPD	Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA
RSM	Response Surface Methodology (Yanıt Yüzey Yöntemi)
ssDNA	Single Stranded Deoksiribo Nükleik Asit (Tek İplikli DNA)
SE	Standard Error (Standart Hata)
SS	Sum of Square (Kareler Toplamı)
SQC	İstatistiksel Kalite Kontrol
Q	Kalite
TKY	Toplam Kalite Yönetimi
UV	Ultra Viyole
VIF	Variance İnflation Factor (Varyans Genişlik Faktörü)

GİRİŞ

Dünyada en çok tüketilen tahıl mısırdır. Ülkemizde mısır yılda iki kez hasad edilebilmektedir ve birçok sahada değerlendirilebilmesinden dolayı büyük bir öneme sahiptir. Mısır tanesinin her bir bölümü ve hatta koçan kısmı bile farklı sektörlerde kullanım alanı bulmaktadır.

Mısırdan, gıda amacıyla doğrudan tüketim, nişasta bazlı şeker veya mısır özü yağı olarak faydalanılabilmektedir. Öte yandan mısır, silajlık bitkilerin başında gelmektedir. Fermentasyona elverişli karbonhidrat oranının yüksek olması ve kolay sıkıştırılabilmesinden dolayı diğer bitkilere kıyasla daha kolay silolanabilmektedir. Diğer yandan yüksek enerji değerine sahip olması ve ruminant hayvanlar tarafından sevilerek tüketilmesi sebebiyle kaba yem kaynağı olarak çok fazla kullanılmaktadır.

Gıda ve yemden başka mısırın kullanım alanı bulduğu yerlerden bazıları şu şekilde sıralanabilmektedir: Otomotiv, Aspirin, antibiyotik ve farklı ilaç türleri, boya ve cila sanayii, traş kremleri, alkol üretimi, tekstil sektörü, kağıt ve tutkal sanayii, diş macunları, dericilik, çeşitli temizlik ürünleri. Mısır bitkisi, ilaçtan kozmetiğe, hayvancılıktan gıdaya çok farklı alanda kullanılabilmesi nedeniyle çok yüksek katma değere sahiptir. Mısırın bu kadar geniş kullanım alanına sahip olması mısır üretiminin önemini de arttırmaktadır. Giderek tarım alanlarının azalması, insan gücünün maliyetli olması gibi sorunlar da mısır üretiminde verimin arttırılması ile çözüm bulmaya çalışılmaktadır. Yüksek verimli mısır üretmek için olumsuz iklim koşullarına (yüksek sıcaklık, kuraklık, hastalık, zararlılar v.b.) dayanıklı mısır çeşitleri üretmek gerekmektedir. Verimi yüksek, dayanıklı mısır çeşitleri üretirken mısırın genetiği hakkında bilgi sahibi olmak gerekir. Bu durumda biyoteknoloji alanında çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

GDO çalışmaları bu biyoteknolojik çalışmaların başında gelmektedir ve bu çalışmalar hızla artmaktadır. GDO çalışmaları yaygınlaştıkça beraberinde getirdiği riskler de daha fazla tartışma konusu haline gelmektedir. GDO'lu ürünlerle ilgili insanların kafasında çok soru işareti olduğundan, kullanımı, piyasaya sürülmesi,

ithalatı, ihracatı v.b. birçok konuda sıkı denetim ve önlemler alınmaya çalışılmakta ve bu konuda birçok ülke yasal düzenlemeler getirmektedir.

Bütün bu denetimler ve tespitler laboratuvar koşullarında yapılan GDO analizleri ile mümkündür. Real Time PCR (Polimerase Chain Reaction), GDO tespiti ve miktar analizinde en fazla kullanım alanı bulan yöntemdir. PCR (Polimerase Chain Reaction) biyoteknoloji çalışmalarında en yaygın kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir. Herhangi bir canlının DNA'sında bulunan belli bölgelerin sentezlenmesi (amplifikasyonunu) işlemine dayanan PCR yöntemi, hem basit hem de yüksek başarı oranına sahip bir DNA çoğaltma metodudur. PCR yöntemi çok kısa zamanda DNA molekülünü milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını yapabilmektedir.

PCR için çok fazla koşulun sağlanması ve çok fazla materyal hazırlanması gerekir. Hazırlanan materyaller çok küçük miktarlarda olduğundan çok fazla dikkat gerektirmektedir. Bu yüzden yapılan çalışmanın güvenilirliği açısından PCR hazırlığında hassasiyet önemlidir. PCR 'ın oluşması için çok fazla materyal gerektiğinden, bunu etkileyen de çok fazla faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerdeki en ufak bir sapma PCR'ın oluşmasını engellemektedir. Bu yüzden genellikle reaksiyonun başlaması için bu faktörleri değiştirerek defalarca deneme yapmak gerekir. Bu durum hem zaman, hem emek hem de kaynak kaybına yol açmaktadır. Kullanılan laboratuvar malzemelerinin pahalı olması da çok yüksek maliyetlere yol açmaktadır.

Günümüzde teknolojik gelişmeler sonucu insanlar her alanda kolay, hızlı ve ucuz olanı bulmaya yönelmekte ve tüketicilerin bilinçli davranışları da aynı oranda artmaktadır. Bu koşullar altında, üreticiler, ürünlerini üretirken müşteri ihtiyaçlarını gidermekten çok daha fazlasını karşılamak, çok hızlı bir dağıtım ve pazarlama ağı ile müşterilere ulaştırmak mecburiyetindedir. Rekabetin arttığı bu zamanda, daha kaliteli ürünün, daha düşük maliyetle ve daha hızlı üretiminin sağlanması ancak kalite bilincinin yükselmesi ile gerçekleştirilebilir. Günümüzde kalite bilinci çok arttığı için artık kalite, kontrolden ziyade, sürekli geliştirilmesi ve üretilmesi gereken bir faaliyettir.

Ar-ge çalışmalarını, kaliteyi arttırmak ve hataları önleyerek kayıpları en aza indirmek için istatistiksel yöntemleri kullanarak yapmak bir zorunluluk haline gelmiştir. İstatistiksel analiz, cevabı aranan sorulara, verilerin işlenmesi yoluyla cevap bulan bir yöntemdir. Bu amaçla birçok istatistiksel metod geliştirilmiş ve uygulama alanı bulmuştur. İlişki diyagramları, etkileşim diyagramları gibi çeşitli geliştirilen diyagramlar, matris veri analizi, Poke Yoke, hata modu ve analizi, kalite fonksiyonu göçerimi ve deney tasarımı en son geliştirilen ve yaygın olarak kullanılan istatistiksel metodlardandır. Bu metodlardan deney tasarımı, her alanda geniş bir şekilde uygulanmakta olan bir istatistiksel teknik olup birçok fayda sağlamaktadır ve bu çalışmada deney tasarımı yöntemi kullanılarak elde edilen verilerin analizi sonucu bize yüksek kaliteyi elde etme konusunda sağladığı faydalar ortaya konmaya çalışılmıştır.

Deney tasarımı, bir ürün veya prosese etki eden faktörlerden önemli olanları ve bunların en uygun değerlerini belirleyen bir tekniktir. Bu yöntem sayesinde birden fazla faktörün etkisi aynı anda araştırılabilmektedir. Regresyon analizinin kullanımıyla faktörler ile yanıt arasındaki ilişki matematiksel bir denkleme dönüştürülmekte ve rassal bir şekilde ürün veya prosesteki farklılıklar, istatistiksel tekniklerle incelenmektedir. Ayrıca iyi bir planlama sayesinde çok daha az sayıda deneyle çok fazla bilgi elde edilebilmektedir. Deneylerin yapılışı yüksek maliyetler gerektirdiğinden bu husus çok büyük bir fayda sağlamaktadır. Zamanımızda deney tasarımı başlı başına bir bilim dalı şekline dönüşmüştür.

Deney tasarımı yaklaşımı söz konusu faktörlerin farklı seviyelerinin çıktı değeri üzerinde oluşturdukları değişimleri ve bu değişimlerin altında yatan nedenleri araştırarak optimize ederek, müşteri memnuniyetini ve sistemin güvenilirliğini arttırmayı amaçlamaktadır. Bunun için yapılan araştırma ve geliştirme çalışmalarında da belirli bir sistematik sağlamaktadır. Yanıt yüzey yöntemi günümüzde kullanılan en etkili istatistiksel deney tasarımı yöntemlerinden olmakla birlikte klasik metodlara göre hem maliyeti çok daha düşük hem de avantajları çok daha fazladır.

Döndürülebilirlik imkanı tanınması ve aynı zamanda ikinci derece modeldeki karesel değişkenleri tahmin edebilmesi özelliklerinden dolayı bu çalışmada yanıt

yüzey yöntemlerinden merkezi kompozit tasarım yöntemi kullanılmıştır. Ortogonal olarak bloklanmış tasarımlar blok etkileri ile modeldeki değişkenlerin tahminlenmesi ve regresyon katsayıları arasındaki değişimin azaltılmasına olanak sağlamaktadır. Ayrıca α değeri ile faktörlerin daha geniş bir aralıkta incelenmesi, merkezi denemelerin fazlalığı ile hatanın doğru şekilde tanımlanması ve kararlı bir model oluşturulması yöntemin seçilmesindeki diğer sebeplerdir. Böylece bu yöntemle az sayıda deney ve düşük maliyetle çok fazla bilgi edinilmeye çalışılmıştır.

PCR ve GDO analizi alanında deney tasarımı ve yanıt yüzey yöntemini konu alan daha önce yapılmış çalışmaların az sayıda olması sebebiyle bu çalışmaya gerek duyulmuş ve bu çalışmanın önceki çalışmalara katkıda bulunması amaçlanmıştır.

Bu çalışma, deney tasarımı tekniklerini kullanarak mısır DNA'sında DAS 40278-9 GDO gen bölgesinin aranması ve düzgün bir şekilde çoğaltılması için Real Time PCR parametrelerinin (DNA konsantrasyonu, primer konsantrasyonu, prob konsantrasyonu, master mix konsantrasyonu) optimizasyonu sağlanarak çabuk, güvenilir ve en düşük maliyetle GDO analizinin gerçekleştirilmesini amaçlamaktadır. Bu çalışma ile birçok riske sahip olduğu düşünülen GDO' lu ürünlerin analizinde gen taraması ve GDO miktar tespitinde önemli rol oynayan c_t değeri ve PCR ürün konsantrasyonuna etki eden faktörler ve bu faktörlerin seviyeleri tespit edilerek, bu faktörlerin (DNA konsantrasyonu, primer konsantrasyonu, prob konsantrasyonu, master mix konsantrasyonu) hem karşılıklı kendi aralarındaki etkileşimleri hem de yanıt değerlerine (c_t değeri ve PCR ürün konsantrasyonu) olan etkileri yüzey yanıt yöntemlerinden merkezi kompozit tasarım metodu ile tespit edilmeye ve incelenmeye çalışılmıştır.

Ülkemizde gıda amaçlı GDO'lu ürünün üretimi ithalatı, ihracatı, piyasaya sürülmesi yasak olduğundan, yem amaçlı GDO'lu ürünlerin üretiminin yasak olması ile birlikte ithalatı ve piyasaya sürülmesi bazı yasal düzenlemelerle sınırlandırılmıştır. Eşik değerin üzerinde onaylı GDO gen bölgesi saptanan yem ürünlerinin ithalatı etiketle GDO'lu olduğunun bildirilmesi şartıyla ithalatına izin verilir. Eşik değerin altındaki onaylı genler bulaşan olarak değerlendirilir. Bu bakımlardan GDO analizinde

genlerin taranması ve sonrasında miktar tespitinde etkili olan c_t değerinin güvenilir ve doğru bir şekilde elde edilmesi GDO’lu ürünün doğru bir şekilde değerlendirilmesi açısından büyük önem taşır.

Oluşturulan modelin optimizasyonu yine merkezi kompozit tasarım ile yapılarak en düşük c_t değeri ve en yüksek PCR rn konsantrasyonunun elde edildiği optimum faktör seviyeleri belirlenmeye çalışılmıştır ve elde edilen optimum faktör seviyeleri ile deney yapılarak elde edilen yanıt değerleri ile modelden elde edilen değerler karşılaştırılarak modelin doğrulanması sağlanmıştır.



1. BÖLÜM

LİTERATÜR TARAMASI

GDO ve PCR alanında deney tasarımı ile ilgili çalışmalar aşağıda kronolojik olarak sıralanmıştır.

Cobb ve Clarkson (1994), Taguchi yöntemini kullanarak, PCR (Polimeraz Chain Reaction) optimizasyonuna primer, DNA, Mg^{++} ve dNTP konsantrasyonlarının etkisi üzerinde çalışmıştır. Faktörler 3 seviye seçilmiştir. Bu çalışmayla Taguchi yönteminin reaksiyon optimizasyonunda hızlı ve güvenilir bir metod olduğu görülmüştür ve sonraki çalışmalara bir fikir vermiştir.

Boleda ve arkadaşları (1996), deney tasarımı yöntemlerinden Kesirli Faktöriyel tasarım ve Merkezi Kompozit tasarımı kullanarak kolay, çabuk ve ucuz bir PCR optimizasyonunu amaçlamıştır. Bu çalışmada insan kan hücresinden alınan DNA kullanılmış olup, DNA ekstrasyon yöntemleri, DNA miktarı gibi faktörler, Mg^{++} konsantrasyonu ve aralarındaki etkileşimler üzerinde çalışmıştır.

Niens ve arkadaşları (2005), genotiplemede PCR koşullarının optimizasyonu için faktöriyel tasarım yöntemini kullanmıştır. Bu çalışmada iki deney tasarlanmıştır. İlk deneyde tampon, primerler, DNA, $MgCl_2$, taq polimeraz, bağlanma sıcaklığı ve döngü sayısı faktörlerini 2 seviyede incelemiştir. Bu deneyde etkisi yüksek görünen tampon, taq polimeraz, sıcaklık, $MgCl_2$ ve aralarındaki etkileşim ikinci bir deneyle tekrar araştırılmıştır. Bu çalışma ile çok düşük maliyetle çok önemli sonuçlar elde edilmiştir.

Fattah ve Gaballa (2006), çalışmalarında Box Behnken yüzey yanıt yöntemini kullanarak PCR koşullarını optimize etmiştir. Çalışmada; primer konsantrasyonu, Taq polimeraz, Mg^{++} , bağlanma sıcaklığı, döngü sayısı ve uzama süresi faktör olarak alınmış 3 seviye halinde incelenmiştir.

Souza ve arkadaşları (2011), venöz tromboembolizm rahatsızlığının teşhisinde anahtar görevi olan genleri Gerçek Zamanlı PCR (Real Time PCR) yöntemiyle tespit ederken Taguchi deney tasarımını kullanarak en iyi PCR parametrelerini belirlemeye çalışmıştır. Master mix, primer, prob konsantrasyonları ve döngü sayısı parametrelerinin etkilerini 3 seviyede incelemiştir.

Thanakiatkrai ve Welch (2011), SBR Green I boyasıyla gerçek zamanlı PCR optimizasyonunda Taguchi deney tasarım yöntemini kullanmıştır. Bu çalışmada Taguchi, faktöriyel tasarım ve regresyon analizinden elde edilen sonuçlar karşılaştırmışlardır. 27 deneyle faktöriyel tasarımla elde edilen sonuçların sadece 9 deney yaparak Taguchi tasarım yöntemiyle daha hızlı ve daha düşük maliyetle elde edilebileceğini görmüşlerdir.

Zhang ve arkadaşları (2012), üç ayrı mikroorganizmanın (Salmonella, S.aureus ve E.coli) seçici zenginleştirilmiş et suyunda multiplex PCR'da tespiti için yüzey yanıt yöntemlerinden merkezi kompozit tasarımı kullanmışlardır. NaCl, LiCl ve KSCN oranlarını 3 faktör olarak ele alınıp 3 ayrı mikroorganizmanın tespit sonuçları yanıt olarak ele alınmıştır.

Camacho ve arkadaşları (2013), Dünyada çok fazla gıda zehirlenmesine yol açan Salmonella spp. Bakterisinin DNA'sı üzerinde multiplex PCR optimizasyonu için çalışmıştır. Deney tasarımı tekniklerinden faktöriyel tasarım yöntemini kullanarak 4 seviyede MgCl₂ konsantrasyonu ve 5 seviyede bağlanma sıcaklığı faktörünün reaksiyona etkisini ve bu 2 faktörün aralarındaki etkileşim üzerinde yoğunlaşmışlardır. Ayrıca bu çalışmayla PCR etkinliğini hesaplamışlardır. Faktöriyel tasarımın diğer PCR yöntemlerinde de kullanılabileceği sonucuna varmışlardır.

Nabi ve arkadaşları (2016), multiplex PCR yöntemiyle mısır bitkisinde GDO (Genetiği Değiştirilmiş Organizma) teşhisinde optimizasyonun daha hızlı, kolay ve ucuz yapılabilmesi için Kesirli Faktöriyel tasarım yöntemini kullanmışlardır. GDO nun tespitinde gösterge olan 4 ayrı gen ve bunların her biri için ayrı ayrı primerler kullanılmıştır. Bu genlerin 1 tanesi daha önceki bir çalışmadan referans olarak

kullanılmış, diğer 3 tanesi bu çalışmada ilk olarak incelenmiştir. GDO gen bölgeleri, işlenmiş gıda ürününde araştırılmıştır.

Lafrance ve arkadaşları (2021) çalışmalarında, domatesin sarı yaprak kıvrılma virüsüne (TYLCV) karşı direnç sağladığı sırasıyla Ty-1, Ty-2 ve Ty-3 genlerine bağlı TG178, TG105A ve P6-25 moleküler markerların tespitinde PCR parametrelerini optimize etmeyi amaçlamıştır. Sıcaklık, tavlama, DNA miktarı, MgCl₂ ve primer konsantrasyonu olmak üzere dört faktörü, merkezi bir bileşik tasarım (CCD) ile incelemiştir.

GDO, PCR ya da deney tasarımı açısından bu çalışma ile benzerlik gösteren diğer çalışmalar ise aşağıdaki şekilde sıralanmıştır.

PCR yöntemi kullanılsa da çok benzer olan DNA amplifikasyonu parmakizi (DAF= DNA Amplification Fingerprint) üzerine yapılan bir çalışmada (Caetano Anollés, 1998), Taguchi Tasarımı ile primer, DNA, enzim, dNTP, MgCl₂, konsantrasyonları ve sıcaklık olmak üzere 6 faktörü birden incelemiştir.

Kitchen ve arkadaşları (2010), kantitatif gerçek zamanlı PCR üzerinde PowerNest programını kullanarak deney tasarlamış nested (iç içe) ANOVA analizi, güç analizi gibi istatistiksel yöntemleri kullanmıştır.

Çöpçüoğlu (2011), doktora tezinde DNA hibridizasyonun dayalı *Listeria monocytogenes* tayininde elektrokimyasal genosensörlerin merkezi kompozit ile tasarım ve optimizasyonu üzerinde çalışmıştır. indikatorsüz DNA dizi algılama yöntemi kullanılarak, prob immobilizasyon yönteminin biyosensor seçiciliği üzerine etkisini belirlemek için hedef konsantrasyonu, inhibizasyon süresi ve tuz konsantrasyonu olmak üzere üç faktörün etkisi incelenmiş ve bu faktörler optimize edilmiştir.

Wadle ve arkadaşları (2016) multiplex gerçek zamanlı PCR’da RNA üzerinde deney tasarımı uygulamış, 7 tane faktörü farklı sayıda seviyelerde incelemiş ve c_t değerini yanıt değişkeni olarak ele almıştır.

PCR ile ilgili ülkemizde yapılan diğer çalışmalara bakılacak olursa:

Caner ve Çarlı (2001), çalışmalarında PCR’ın bazı kanatlı enfeksiyonlarının tanısındaki yerini ortaya koymaya çalışmışlardır.

Yetilmezler (2010), tez çalışmasında insan sağlığı açısından büyük risk taşıyan *brucella* ve *listeria* patojen mikroorganizmalarının sığır sütünde tespit edilmesi amacıyla PCR koşullarının iyileştirilmesi üzerinde çalışmıştır.

Özmen (2011), tez çalışmasında *mycoplasma gallisepticum* mikroorganizmasının real time PCR yöntemini kullanılarak tavuk trakelerinde tespit edilmesi ve elde edilen verilerin istatistiksel yöntemlerle analizi üzerinde çalışmıştır.

Yıldırım ve arkadaşları (2011), buğdayda PCR ve olası sorunların optimizasyonu üzerinde çalışmışlardır. $MgCl_2$, dNTP, primer konsantrasyonları, sıcaklık gibi parametrelerinin ayrı ayrı optimizasyonunu sağlamaya çalışmışlardır.

Kanturvardar Tütenyurd (2013), doktora tezinde solunum yollarındaki viral enfeksiyona etki eden faktörlerin tespit edilmesinde in-house PCR koşullarının optimize edilmesi üzerinde çalışmıştır.

Tütünoğlu (2013), gibberellik asitin *Allium cepa* l. var. *cepa* (*Alliaceae*) üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi üzerinde çalışmıştır.

Kahya ve arkadaşları (2013), PCR’ın mikrobiyolojideki kullanım alanı ve PCR parametrelerinin etkileri ve optimizasyonu üzerinde çalışmışlardır.

Valipour (2015), doktora tezinde biyo teknoloji alanında doğal bakteri suşlarından tirozinaz enziminin izole edilmesi, üretici genin çoğlatılması, enzimin karakterizasyonu ve l-dopa ve melanin üretimi gibi konularda PCR'ın kullanılabilirliği ile ilgili çalışmıştır.

Çarhan ve arkadaşları (2016) çalışmalarında, son zamanlarda geliştirilen dijital PCR'ın diğer PCR yöntemlerine göre üstünlükleri, avantajları, dezavantajları ve kullanım alanları ortaya koymaya çalışmıştır.

GDO analizi ile ilgili yapılan çalışmalara bakılacak olursa:

Henegariu ve arkadaşları (1997), multiplex PCR'da bileşenlerin konsantrasyonu, bağlanma sıcaklığı, döngü sayısı gibi önemli parametrelerin kademeli olarak optimizasyonu üzerinde çalışmışlardır.

Vaitilingom ve arkadaşları (1999), bazı karakteristik gıda örneklerindeki genetiği değiştirilmiş Maksimizer mısır ve Roundup Ready soyanın gerçek zamanlı PCR yöntemiyle yüzde olarak miktar tespiti için çalışmışlardır.

Terry ve Harris (2001), Roundup Ready soya unu ve soya proteini örneklerinde iki farklı Scorpion ve Taqman problemleri ile gerçek zamanlı PCR denemeleri yaparak, delta c_t değerleri ile tespit ettikleri GDO miktarlarını karşılaştırmışlardır.

Brodmann ve arkadaşları (2002), dört çeşit genetiği değiştirilerek geliştirilen ve gıda içeriğinde bulunan mısır üzerinde gerçek zamanlı PCR ile miktar tespiti ile ilgili çalışmıştır. Çalışmada haşerelere dayanıklı Bt176 (Maximizer mısır), Mon810 (YieldGard), ve herbisit toleranslı T25 (Liberty Link™) genetiği değiştirilmiş mısırlar kullanılmıştır.

Permingeat ve arkadaşları (2002) çalışmalarında, NOS terminatör bölgesine bağlanacak şekilde dizayn edilen primer çifti ve prob ile kullanılan gerçek zamanlı

PCR yönteminin diğerlerinin arasından Roundup Ready soya and GA21 mısır gibi transgenik çeşitlerinin miktarını tespit edebileceğini ortaya koymuştur.

James ve arkadaşları (2003), genetiği değiştirilmiş mısır, soya ve kanolanın multiplex PCR metodu güvenilir bir şekilde tespit ve tanımlamasını yapmaya çalışmışlardır. Soyada; Roundup Ready, mısırdaki Bt11, 176, T14/25 ve Mon810, kanolada ise; Oxy 235, GT73, MS8/RF3, HCN92/28 çeşitleri kullanılmıştır.

Huang ve Pan (2004), zararlılara karşı dayanıklı MON810 ve herbisit toleranslı NK603 mısırdaki primer dizaynı yapmış ve multiplex PCR ile miktar tespiti için metod geliştirme üzerine çalışmışlardır. Avrupa laboratuvarları arası test sonuçlarına göre geliştirilen metod kabul edilebilir bulunmuştur.

Taverniers ve arkadaşları (2004), Roundup Ready soyada iki yeni gerçek zamanlı PCR metodu ve kalibratör olarak iki farklı plazmit DNA parçası üzerinde çalışmışlardır. İlk metotta tek hedefli genomik DNA'dan seyreltilmiş plazmit DNA parçası, ikinci metotta ise çok hedefli (tek molekülde iki bölge içeren) plazmit DNA parçası kalibratör olarak kullanılmıştır. Bu iki metotta elde edilen delta C_t değerleri karşılaştırılmıştır.

Wall ve arkadaşları (2004), multiplex PCR yöntemiyle virüse dayanıklı transgenik papaya ve kabak tespiti ve tanımı üzerinde çalışmışlardır.

Hernandez ve arkadaşları (2005), genetiği değiştirilmiş dört çeşit mısırdaki (Bt11, MON810, T25 ve GA21) tespitinde kullanılan multiplex PCR metodunun laboratuvarları arasında transferi üzerinde çalışmışlardır. 4 gen bölgesinin aynı anda tespit edilmesi amacıyla primer dizaynı ve PCR optimizasyonu sağlanmış ve geliştirilen metodun başka laboratuvarlarda doğruluğu sağlanmıştır.

Forte ve arkadaşları (2005), mısır ve soya içeren gıda ürünlerinde multiplex PCR metodu ile NOS terminatör ve 35s promotor gen bölgelerinin tespiti üzerinde çalışmışlardır.

Onishi ve arkadaşları (2005), 8 ayrı genetiği değiştirilmiş mısır gen bölgesinin eş zamanlı tespiti için multiplex PCR metodu geliştirmek için çalışmışlardır. Çalışmada Bt11, GA21, Event176, MON863 MON810, NK603, TC1507 ve T25 mısır çeşitlerini kullanmışlardır. Sonuçlara göre genetiği değiştirilmiş mısırın taranmasında bu multiplex PCR yönteminin etkin bir kalitaif tespitte kullanılabileceği görülmüştür.

Yang ve arkadaşları (2005), zararlılara dayanıklı genetiği değiştirilmiş üç farklı pamuk dizininin gerçek zamanlı multiplex PCR'da Taqman prob kullanarak tanımı ve miktar tespiti için çalışmışlardır. Çalışmalarını genetiği değiştirilmiş Mon531, GK19 ve SGK321 pamuklarında Cry1A(c) gen bölgesi üzerinde yapmışlardır.

Rønning ve arkadaşları (2006), Buğday ve arpada PKABA1 referans geninin gerçek zamanlı ikili PCR yöntemiyle tanımı ve miktar tespiti üzerinde çalışmışlardır.

Yoke-Kqueen ve Radu (2006), Genetiği değiştirilmiş organizmalarda RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNAs, Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) analizi üzerinde çalışmışlardır. Sertifikalı soya ve mısır referans materyalleri, soya ve mısır tohumu, işlenmiş gıda ve yemlerde oluşan 78 numune RPD tekniği ile analiz edilmiştir. Bu çalışma ile RAPD tekniğinin GDO'lu numunenin ayırımında bir ön işlem olarak kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

Yin ve arkadaşları (2012), Porcine Pseudorabies, Porcine Parvovirus ve Porcine Circovirus Tip 2 virüslerinin eş zamanlı tespitinde multiplex PCR'ın optimizasyonu üzerinde çalışmışlardır. Çalışmada bu üç virüsün her biri için özel primer çiftleri dizayn edilmiş ve tekli PCR koşullarında optimum primer, MgCl₂, dNTP ve Taq DNA polimeraz konsantrasyonları ile bağlanma sıcaklık değerleri belirlenmiştir.

Güven (2014), doktora çalışmasında soya içeren işlenmiş gıdalarda GDO miktarlarının belirlenmesi ve pişirme koşullarının GDO miktarına etkisi üzerine gerçek zamanlı PCR tekniği ile çalışmıştır.

Ünal (2019), yüksek lisans tezinde çeşitli yem ve gıdalarda GDO'nun saptanması amacıyla yeterlilik test kiti yapılması üzerinde çalışmıştır.



2. BÖLÜM

GDO (GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALAR)

2.1. Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO) Tanımı

Son zamanlarda geliştirilen biyoteknolojik yöntemler kullanılarak farklı türler arasında gen aktarılması yoluyla kalitesi ve verimi daha yüksek, zararlı ve hastalıklara karşı daha dayanıklı bitki ve hayvan çeşitleri geliştirilmiştir. Bu şekilde geliştirilen ürün ya da canlılar Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO) ya da Transgenik Ürün olarak adlandırılmaktadır (Haspolat, 2004).

Biyogüvenlik Kanunu'na göre GDO'nun tanımı; Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizma, “biyoteknolojik teknikler yardımıyla gen transferi ile elde edilen insan dışındaki canlı organizma”; GDO ürünlerinin ise, “GDO içeren, kısmen veya tamamen GDO'lardan üretilen veya GDO'lardan meydana gelen ürün” şeklinde yapılmıştır (Anonim, 2010).

1980'li yılların akabinde bitki biyoteknolojisi konusunda ilerlemeler kaydedilmiş ve 1996'da Flavr Savr isminde uzun raf ömürlü domates ilk genetiği değiştirilmiş ürün olarak tüketime sunulmuştur. Sonraki genetiği değiştirilip piyasaya sürülen ürünler kolza, mısır, pamuk ve patatestir (Atsan ve Erem Kaya, 2008).

Hayvaların ıslahında çok öncelerden beri verimin arttırılması, kalitenin yükseltilmesi ve hastalıklara karşı dayanıklılığın arttırılması üzerinde çalışılmaktadır. Bunun için yüksek kaliteye sahip ve iyi özelliklere sahip hayvanlar seleksiyon melezlemelerde kullanılarak diğer nesillere bu özelliklerin aktarılması amaçlanmaktadır. Ancak bu yöntem için çok fazla emek ve zaman gerektirmektedir. Bu nedenle klasik ıslah tekniklerine ilaveten en son geliştirilen tekniklerin de kullanılması bir gerekliliktir (Anonim, 2004).

Koyun, sığır, keçi, ve domuz gibi çiftlik hayvanlarının üretiminde transgen teknolojisi kullanılarak istenilen genlerin kolaylıkla aktarılması sağlanmaktadır. Bu teknik DNA'nın bütün canlılarda benzer yapıya sahip olmasından dolayı uygulama imkanı bulabilmektedir (Çiçekçi, 2008).

2.2.GDO'nun Tarihçesi

İnsanlar yerleşik toplum düzenine geçtiği, başka bir deyişle tarıma başladığından bu yana doğayı değiştirmektedir. Son 10.000 yıldır da, evcilleştirdiği bitki ve hayvanların genetiğini geliştirmek için çalışmaktadır. Bu çalışmaların başlangıç noktası, istenilen özelliklere sahip bitki ve hayvan seçimi olmuş ve akabinde elle melezleme, radyasyon aracılığı ile mutasyon ıslahı ve benzer teknikler ile süre gelmiştir. Dünyada nüfusun artması nedeniyle bu çalışmalar artış göstermiş, zaman içinde farklı metodlar geliştirilmiş ve tarım üzerinde çalışan çeşitli bilim dalları meydana gelmiştir. 20. yüzyılda hızla artan dünya nüfusunu beslemeyecek kadar tarım ürünlerinin elde edilmesinde “Yeşil Devrim” adı verilen gelişmelerin de oldukça katkısı olmuştur (Çetiner, 2017).

Tarım alanında görülen teknolojik gelişmeler, ar-ge faaliyetleri, reform niteliğindeki değişimler ve bunların neticesinde çeşitli alanlarda görülen etkiler Yeşil Devrim olarak adlandırılmaktadır ve 1960'lı yılların ortasından itibaren bugünlere kadar etkisini korumaktadır. Ancak Yeşil Devrim, tarımsal üretimi arttırmasına karşın, çok büyük çevresel sorunlara da yol açmıştır. Yeşil Devrimin başlamasıyla yanlış ve gereğinden fazla miktarda kimyasal gübre kullanımı tarım alanlarının çoraklaşmasına ve su kaynaklarının kirlenmesine sebep olmuş, gereksiz ve yanlış tarım ilacı kullanımı insan sağlığı ve çevreyi olumsuz etkilemiş, öte yandan fosil yakıtların kimyasal gübre üretimin için gerekli olması ve de sulama ve mekanizasyondan dolayı yakıt kullanımının artması gibi sebepler tarım alanındaki üretim nedeniyle karbon salımını arttırmıştır (Çetiner, 2018).

Moleküler biyoteknoloji ve gen teknolojisi alanındaki hızlı gelişmeler neticesinde, 1960'ta genetiği değiştirilmiş ilk gıda üretilmiştir. Süreç 1973 yılında

bakterilerden gen aktarılması ile başlamış ve 1980'li yıllardan beri de giderek hızlanmıştır. Ticari anlamda 1990'da ilk transgenik bitki üretiminin başlaması ve 1996 yılında geliştirilen Flavır Savr adındaki genetiği değiştirilmiş domates ürününün piyasada yer almasıyla, GDO'lu ürünlerin dünya çapında üretimi hızla yaygınlaşmaya başlamıştır. Ayrıca GDO'ların kullanımına yalnızca tarımda değil, sanayi, tıp, ve çevre ürünleri gibi birçok alanda da başlanmıştır (Denli, 2012).

İlk genetiği değiştirilmiş organizma 1970'lerde üretilmiştir. Ancak Asurlular tarafından MÖ 870 yılında hurma meyvesinde yapay tozlaşmanın uygulandığını gösteren tabletten anlaşıldığına göre, insanlık tarihinde genlerin değiştirilmesi ile ilgili bilgilerin milattan öncelere kadar uzanmaktadır (Aksu, 2019).

Dünyadaki GDO tartışmaları 1980'li yılların başlarında başladığı halde, GDO üretim teknolojilerinin başlangıcı 1950'li yıllara dayanmaktadır. GDO teknolojisinin ilk ürünleri, bitkilerden elde edilmiştir. Bu amaçla ilk önce GDO teknolojisinin temeli olan hücre doku kültürü yöntemleri geliştirilmiştir. Bitki doku kültürü tekniği ile test tüpü içinde (yani, in vitro) bitkinin farklı bölümlerinden yeni bitkicikler üretilmiş ve bu olaya rejenerasyon denilmiştir. Klasik ıslah tekniklerinde melezleme işlemleri genetik yapıları çok benzer türler arasında yapılabilirken, GDO teknolojisi ile farklı herhangi iki türe ait organizmanın genetik kaynaklarının bir hücrede toplanması ile başka yeni bir bitkinin üretimi mümkün hale gelmiştir. Yine aynı zamanlarda hayvan doku kültürü teknikleri üzerinde de bilimsel çalışmalar yapılmış ve ilk kez test tüpü içinde tavşan hücreleri kullanılarak suni döllenme gerçekleştirilmiştir (Curtis, 2016).

1980'li yıllarda, (*Agrobacterium tumefaciens*) bakterisinin kendi DNA'sının bir parçasını bitkilere aktararak bitkilerde tümör oluşumuna sebep olduğu tespit edilmiştir (Özcan, 2001). 1980 yılının başında Frank Ruddle ve arkadaşları ilk kez bir hayvan üzerinde çalışarak genetiği değiştirilmiş bir fare elde etmişlerdir. Aynı yıllarda evcil hayvan olarak genetik yapısı değiştirilmiş domuz üretilmiştir. Transgenik bakterilerin ilk uygulama alanlarından birisi de şeker hastalığının tedavisinde kullanılmak üzere bir bakterinin genetiği değiştirilerek insülin üretilmesi olmuştur (Önde, 2011). Ayrıca, insan ve koyunda süt oluşturan bazı genler insandan farelere

aktarılarak farelerin genetik yapıları değiştirilmiştir. 1980’li yılların sonlarına doğru ise, süt oluşumunda rol alan genlerin aktarıldığı ilk transgenik koyun Tracy olarak isimlendirilmiş, sonrasında da transgenik boğa ve inek elde edilmiştir. İnsan sağlığı alanında da kanser çalışmalarında kanserli transgenik farelerden faydalanılmıştır. Bitkiler üzerinde yapılan benzer çalışmalarla, bitkiye gen aktarımında; bakteriden aktarılan gen bölgesinden hastalığa yol açan kısımların çıkartılarak bunların yerine hastalığa sebep olmayan başka bir gen yerleştirilebildiğinin tespit edilmesi üzerine, ilaç yapımında kullanılan maddelerin üretimi başlamıştır (Aksu, 2019).

GDO teknolojisinde, 1990 yılından sonra hızlı bir gelişme kaydedilmiştir. Nitekim, üzerinde deneysel çalışmaların halen sürdüğü, insanda bir çeşit genetik değişim uygulaması olarak görülen ve mutasyona uğrayan gen veya genlerin yerine sağlam gen bölgelerinin hastalara aktarılması şeklinde tanımlanan “gen terapisi” tekniği yardımıyla hastalar iyileştirilmiştir. 1990’ların sonuna doğru ise, GDO teknolojisinin yanı sıra klonlama teknolojisi ortaya çıkmış ve bilim adamları tarafından klonlanmış hayvanların üretimine başlanmıştır. Daha sonra, Dolly (Denli, 2012) adı ile bilinen çekirdek aktarımı tekniğiyle kopyalanan ilk canlı olan koyun tarihe geçmiş, ardından transgenik klonlanmış Polly adlı koyun üretilmiştir. Diğer taraftan, direkt tüketicileri ilgilendiren özelliklere sahip genetik yapısı değiştirilmiş bitkilerin üretimi başlanmış olup, insan kan proteini ve hemoglobin üreten transgenik tütün bunun en iyi örneğidir. İlaç üretiminde kullanılan monoklonal antikorlar ve çeşitli rekombinasyon sonucu oluşan proteinlerin elde edilmesinde bitkilerden başka hayvanlar ve mikroorganizmalardan da faydalanılmıştır.

2000 yıllarında, GDO alanındaki gelişmeler en gözde çağına ulaşmıştır. Başta Özellikle sağlık alanı olmak üzere transgenik bitkiler, mikroorganizmalar ve hayvanların sayesinde tarım, hayvancılık ve endüstri alanlarında da çok önemli gelişmeler kaydedilmiştir (Aksu, 2019).

2.3. GDO'ların Beklenen Faydaları

İnsanlar tarih öncesinden beri gıda gereksinimindeki artışa yetişebilmek amacıyla gıda kaynaklarını arttırmak ya da seçenekleri çoğaltmak için uğraşmışlardır. İnsanların bu gayretlerine iklimde meydana gelen farklılıklar, nüfusun artması, teknoloji alanındaki yenilikler de eklenince zamanımızdaki biyoteknolojik gelişmeler oldukça önem kazanmıştır. Başta tarım alanında yapılan araştırmalar neticesinde GD ürünler elde edilmiştir (Tiryaki ve Acar, 2004: 121). Çeşitli sektörlerde GDO'ların yer alması sonucu bazı faydaların edinildiğine dair görüşler bulunmaktadır.

Tarımdan elde edilen ürünlerin çevresel çevre koşullarındaki değişime tolerans gösterebilmesi, hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılıklarının artırılması, , pestisit kullanımının azaltılması, bitkisel ve hayvansal ürün veriminin artırılması, gıdaların besin değerinin artırılması, ürünlerin raf ömrünün uzatılması, aşı ve ilaç üretiminde, hastalık risklerinin azaltılması ve organ naklinde GDO'ların faydalarının olduğu varsayılmaktadır.

Verimi arttırmak amacıyla hastalık ve böceklerle karşı dayanıklı bitkilerin geliştirilmesi üzerinde GDO çalışmaları yapılmaktadır. Bitkilerde zararlılarla mücadele etmenin yolu tarımsal mücadele ilaçlarının kullanılmasıdır. Ancak ilerleyen zamanlarda ilaçlamaya maruz kalan bitkiler bunlara karşı bir savunma sistemi geliştirdiğinden yapılan ilaçlamadan beklenen sonuç alınamamaktadır. Diğer yandan kullanılan kimyasal ilaçların doğayı ve insan sağlığına karşı bir tehlike arz etmesi nedeniyle insanlar başka çözümler arayışına girmiş ve bitkiler üzerinde GDO araştırmalarına yönelmiştir (Bayraç vd., 2014:30). Toprakta bulunan *Bacillus Thuringiensis* (Bt) bakterisi bt genine sahip bir mikroorganizmadır. Bt geni transfer edilen bitkileri yiyen böcekler zarar görmekte hatta ölmektedirler. Bu işlemle birlikte bitkilerin zararlılardan korunması sağlanmıştır. Bu yöntem başta mısır olmak üzere, patates ve soya bitkilerinde uygulanmıştır. Ayrıca virüslere dayanıklı bitkiler de GDO çalışmaları ile geliştirilmektedir. Tütün, domates ve kabak bitkilerinin genetik yapıları değiştirilerek virüslere karşı bağışıklık kazanmaları sağlanmaktadır (Çelik ve Balık, 2007).

Tütün bitkisine tripsin inhibitör geninin transferi aracılığıyla bu bitkinin sürgün kurduna karşı savunma geliştirmesi GDO ile bitkilerin zararlılardan korunmasına örnek olarak gösterilebilmektedir (Haspolat, 2012).

GDO sayesinde bitkilerde zararlılara karşı oluşan savunma sisteminin, kullanılacak pestisit miktarını azaltacağı ve bunun sonucunda arı, uğur böceği gibi zararsız ya da faydalı böceklerin ölmeyeceği, çiftçilerin daha düşük maliyetle üretim yapabileceği ve kimyasalların çevreyi daha az kirleteceği düşünülmektedir (Korkut ve Soysal, 2013: 12-13).

Bazı bitkilerde herbisitlerden korunabilmeleri için genetiklerinin değiştirilmesi yoluna gidilmektedir. Böylece herbisit kullanılması ile bitkiler zarar görmeden yabancı otlardan arındırılacağı tahmin edilmekte, ayrıca toprakta az işlem görmesi sonucu, su kaybı ve erozyonun azalacağı düşünülmektedir (Çelik ve Balık, 2007: 19). Soya fasulyesi, mısır, kanola, yonca ve pamuk herbisitlere karşı dirençlilik konusunda en başta gelmektedir (Bayraç v.d., 2014: 33).

Farklı çevre koşulları bitkisel gelişimi olumsuz yönde etkilemektedir. Özellikle yüksek sıcaklık, kuraklık, topraktaki yüksek tuzluluk, don, yüksek nem v.b. çevre koşullarına karşı dayanıklılık gösteren bitkilerin üretilmesi verimi yükselteceği ve tarım için uygunsuz olan alanlarda da ekim yapılmasına olanak sağlanacağı varsayılmaktadır. Kuraklığa dayanıklı bitkilerin geliştirilmesinin tarımda daha az su kullanımını mümkün kılacağı düşünülmektedir (Korkut ve Soysal, 2013: 11). Bu amaçla Çinli bilim adamı Xu ve çalışma arkadaşları 1996'da kuraklığa dayanıklılığı sağlayan HVA1 genini arpadan pirince aktarmışlardır (Bayraç v.d., 2014: 32).

Genetik çalışmalar sayesinde daha yüksek verimli bitki veya hayvan kaynaklı ürünler elde edilebilmektedir. Yapılan çalışmalar neticesinde hayvanlardan daha yüksek miktarda ve kalitesi yüksek et ve diğer hayvansal ürünler elde edilebilmekte, bakteri ve virüslere karşı daha dayanıklı hayvanlar üretilmekte, hayvanlarda daha kısa zamanda gelişmeleri mümkün hale gelmektedir (Aydın, 2012: 8).

Daha uzun raf ömrüne sahip gıda ürünlerinin elde edilmesi de genetik çalışmalar ile mümkündür. Ürünlerin raf ömürlerininin uzatılması, dayanıklılığı artıran gen bölgelerinin ürünlere aktarılması ile olgunlaşma sürelerinin uzatılması temel esastır. Bu işlem sayesinde ürünlerin çürümeleri önlenerek üretim maliyetleri düşürülmektedir (Erbelet, 2014: 23).

İlaç ve aşı üretiminde de GDO'dan faydalanılmaktadır. Mikroorganizmaların genetik yapısının değiştirilmesi ile elde edilen insülin ilaç üretimine örnek verilebilmektedir. Dünyada şeker hastalığına yakalanan kişi sayısı sürekli artış göstermektedir. Veba, kuduz hepatit v.b. hastalıklara karşı aşı geliştirmek amacıyla mısır, domates, tütün, kanola patates v.b. bitkiler üzerinde araştırmalar sürmektedir. Bu yolla insanların bu şekilde geliştirilen ürünlerle beslenmesi sonucunda aşılınmaları hedeflenmektedir. Gen transferi yapılan farelerin incelenmesiyle bu farelerin sütünde bazı aşılarda tespit edilmiştir. İleriki zamanlarda insanların sütlerinden yararlandığı çiftlik hayvanlarında da bu tarz çalışmaların uygulanması düşünülmektedir. Amerikalı bilim insanları genetiği değiştirilmiş domates ürününde veba aşısı geliştirmişlerdir. Sağlık bakımından değerinin farkına varılan omega 3 ve omega 6 yağ asitleri açısından bazı bitkilerin içeriği gen aktarımı yoluyla zenginleştirilmektedir (Bayraç vd., 2014: 26-29).

Genetik çalışmalar yardımıyla bazı hayvanlar üzerinde böbrek, kalp, karaciğer v.b. organların üretilerek insanlarda kullanılabileceği bildirilmektedir (Pamuk, 2010: 94).

Çin'de transgenik pamuk yetiştiren çiftçilerin sağlık sorunlarında azalma saptanmıştır. Bu azalmanın sebebi olarak daha az kullanılan tarım ilaçları gösterilmiştir. Ayrıca gen teknolojisi sayesinde, yer fıstığı, yumurta, inek sütü, soya, buğday, kabuklu deniz canlıları, balık, fındık gibi besin maddelerinin içerisinde bulunan alerjiye neden olan maddelerin çıkartılarak, bu gıdaların alerjik özellikleri azaltılabilmektedir (Kulaç vd., 2006: 152).

Gıda ürünlerinin özellikle insan sağlığına faydalı besin maddeleri bakımından değerini artırmak amacıyla da GDO'lar kullanılmaktadır. Genetik çalışmalar sayesinde bitkilerin vitamin, karbonhidrat, lif ve yağ bakımından içeriği yükseltilebilmektedir. Bu işlem 2 şekilde gerçekleştirilmektedir. İlki, bitkilerde bulunan besin maddelerinin elde edilmesinde görevli olan gen bölgelerinin daha çok çalışmasını sağlamak, diğeri de, diğer canlılardan bu maddelerin üretimini sağlayan gen bölgelerini üzerinde çalışılan canlıya aktarmaktır (Bayraç vd., 2014: 26-27). “Altın Pirinç”, gıda ürünlerinin besin içeriğini geliştirmeye gösterilebilecek bir örnektir. A vitamini ve demir yönünden zenginleştirmek amacıyla Altın Pirincin genetik yapısı değiştirilmiştir.

Dünya üzerindeki 3 milyona yakın sayıda çocukta A vitamini eksikliği sebebiyle görme konusunda sorunlar bulunmakta ve 50 bine yakın sayıda çocukta ise kör olma riski görülmektedir. A vitamini bakımından içeriği arttırılmış altın pirinç ürünü bu sorun için bir çözüm olarak görülmektedir (Kulaç vd., 2006: 152).

Gen teknolojisi yardımıyla üzerinde çalışılan canlıya büyüme hormonunun aktarılması sayesinde ineklerdeki süt miktarında %15 artış görülmüş, ayrıca et miktarı bakımından da yükseliş meydana gelmiştir (Güngören, 2012: 35).

Genetik çalışmalar yardımıyla bitkilerin A, C ve E vitaminleri bakımından içeriklerinin arttırılması yoluyla bazı sağlık sorunlarının giderilmesi amaçlanmaktadır (Pamuk, 2010: 94).

2.4. GDO'ların Olası Zararları

GD ürünlerin kullanıldıkları alanlar arttıkça insan sağlığına ve doğaya karşı zararları tartışma konusu olmuştur. Araştırmalara göre GD ürünlerin çevreye bazı zararlarının olduğu görülmektedir. GD ürün ekimi yapılan alanlardan normal tarım yapılan alanlara gen kaçışı meydana gelebilmektedir. Gen kaçış mesafesi bitkinin türü ve iklim şartlarına bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Bu mesafe, bazı türlerde 400 metre iken, bazılarında daha da uzun olabilmektedir (Bayraç vd., 2014: 43-44).

Aynı türdeki bitkiler arasında gerçekleşen gen kaçışı yatay gen kaçışı olarak adlandırılırken, farklı türdeki bitkiler arasında gerçekleşen kaçış ise dikey gen kaçışı olarak adlandırılmaktadır. Bu olay bitkilerdeki çeşitliliğin azamasına ve tarım alanlarında tek tip ürün yetiştirilmesine yol açmaktadır. Bu durum ise dünyada zamanla insanların aç kalmasına sebep olacaktır. İrlanda’da tarımı yapılan tektip patates ürününe bulaşan bir hastalık nedeniyle ürünler zarar görmüş ve temel gıdası patates olan yaklaşık bir milyon insan açlık ve ölüm tehlikesi altında kalmış olup nüfusun ¼’ü yok olmuştur. Çin’de GD kanola ürününden yabancı hardal ürününe gen geçtiği, ABD’de ise normal mısır ürününe bt geninin geçtiği ortaya konmuştur (Korkut ve Soysal, 2013: 17).

GD ürünler herbisitlere karşı dayanıklı halde elde edilmektedir. Ancak tarım bölgelerinde yapılan kimyasal ilaçlamanın, GD ürünlerinin dayanıklılığından dolayı zarar görmeyeceği düşüncesiyle ilaçlamada dozun arttırılmasına yol açmaktadır. Bu olay da çevre kirliliğine, canlıların zarar görmesine neden olmaktadır. Yüksek dozda kimyasal ilaçlamanın başka türden canlılara da zarar vermesine 1999’da Losey ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma örnek olarak verilebilir. Çalışma kral kelebeklerinin ölümüne neden olan bt mısır poleninin süt otuna sürülmesi ile yapılmıştır (Bayraç vd., 2014: 47).

Yabancı ot ilaçlarının herbisitlere dirençli GD bitkisel ürünlerini etkilememesi sebebiyle çiftçiler çok yüksek dozda yabancı ot ilacı kullanmaya başlamış hatta glifosat ilacının üst limitin elli katı arttırıldığı bazı ülkelerde görülmüştür (Demirkol, 2015: 58). 1996-1998 yılları arasında ABD’de toplam tarım ilacı kullanımı azalmasına rağmen, 2007 yılında %20, 2008 yılında ise %27 artış göstermiştir. Ayrıca yabancı ot ilaçlarına dayanıklı hale getirilen GD ürünlerindeki bu özelliklere neden olan genlerin tozlaşma ile diğer yabancı türlere, mantarlara veya böceklere geçmesiyle kimyasal ilaçlara dayanıklılık gösteren zararlılar veya yabancı otlar türeyebilmektedir (Korkut ve Soysal, 2013: 18).

GD bitkilerin ardında hasat sonrasında tarım alanında bir sonraki sene için tohum kalmamaktadır. Genetik kullanımı sınırlayıcı teknoloji ya da terminatör gen kullanımı olarak adlandırılan bu teknoloji yoluyla tohumlar kısırlaştırılmakta veya tohum üretebilmek için bu alandaki şirketlerin sattığı ilaçlara bağımlı hale getirilmektedir. Bu olay bir yandan bitki çeşitliliğini olumsuz etkilediği gibi, diğer yandan maliyeti de arttırmaktadır (Korkut ve Soysal, 2013: 16).

Genetik çalışmalarla elde edilmiş bir gıdanın alerjik özelliğe sahip bir gen bölgesinin diğer bir gıdaya transfer edilmesi sonucu yeni alerjik proteinler meydana gelebilmektedir. Brezilya fındığının içeriğinde olan ve alerjik etkiye sahip 2S geninin soya bitkisine aktarılması ile Brezilya fındığına alerji gösteren insanlar GD soyaya da alerjik reaksiyon göstermiştir. Bu da gen aktarımının gen transferinin alerjik reaksiyona sebep olduğunu kanıtlamaktadır. GD soya ürününün kullanımının başlaması nedeniyle İngiltere’de meydana gelen alerji vakalarında %50 artış gözlenmiştir. Hindistan’da GD pamuk üretimi yapan çiftçilerin derilerinde ve gözlerinde alerjik belirtiler tespit edilmiştir (Şen ve Altınkaynak, 2014: 34). Branum ve Lukacs ABD’ de yaptıkları bir çalışmada, 1993’ten 2006 yılına kadar geçen zamanda gıda alerjisi şikayetiyle 18 yaşının altındaki küçük çocuklarda doktora gitme oranı 3 katına, tedavi edilen çocuk sayısı 4 katına çıktığı gözlenmiştir (Demirkol, 2015: 174).

Genetik çalışmalar sonucunda bitkiler arası gen transferi ile toksik özellikler görülebilmektedir (Korkut ve Soysal, 2013: 14). GD patates ürününün farelerde sindirim sistemlerinin zarar görmesine, ayrıca insanların akyuvarlarında pestisit özelliğine sahip olan kardelenden bitkisinden elde edilmiş lektin geni görülmüştür (Bayraç vd., 2014: 59).

GD genlerin diğerlerinin içinden seçilmesi amacıyla işaretleyici genlerden yararlanılmaktadır. Çoğunlukla işaretleyici gen olarak antibiyotiğe karşı dayanıklı gen bölgeleri kullanılmaktadır. Bu işaretleyici genler hedef organizmaya transfer edilir ve hedeflenen organizmaya antibiyotik verilir. Transfer yapılmayan canlılar yaşayamazken, dayanıklı gen bölgesi transfer edilen canlılar yaşamını

sürdürebilmektedir. İnsan ve hayvanların antibiyotiğe karşı dirençli genleri içeren GD ürünleri tüketmesi sonucunda bu dayanıklı gen bölgeleri organizmalara aktarılabilir. Birçok hastalığın tedavisi için kendisinden faydalanılan antibiyotik ilaçlar dayanıklı genlerden dolayı etkisini kaybedebilmekte ve bazı sağlık sorunlarının tedavisi zorlaşabilmektedir (Şen ve Altınkaynak, 2014: 33-34).

Antibiyotiğe karşı dayanıklı genlerin özellikle ağız ve bağırsak bölgelerinde yer alan mikroorganizmalara geçtiği bildirilmektedir (Demirkol, 2015: 181). AB, antibiyotiğe dirençli gene sahip GDO'lu bitkilerin satış amacıyla ekimine 2001 yılında yayınladığı bir yönerge ile 2004 yılında, 2008 yılında ise deney amacıyla ekilmesine izin verilmemiştir (Demirkol, 2015: 137).

GD ürünlerin kanser ve kısırlık gibi hastalıkların olasılığını yükselttiği düşünülmektedir. Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu 2007'de gerçekleştirdiği bir araştırma sonucunda, gen aktarılmış soya ürününü tükettiği bilinen farelerden doğan yavruların, tüketmeyen farelerden doğan yavrulardan daha küçük oldukları hatta bazı yavruların ancak 3 hafta yaşayabildiği tespit edilmiştir. İskoçya Rowett Enstitüsü'nün yaptığı çalışmada ise GD patates ürününü tüketen farelerin sindirim sisteminde bozukluk, bağışıklık sisteminde zayıflama ve kan yapılarında problemler görülmüştür (Haspolat, 2012: 77).

Günlük enerji ihtiyaçlarının yüzde 2'sini GD yağ asitlerinden sağlayan bayanlar, enerji ihtiyaçlarını bu ürünlerden karşılamayan bayanlara kıyasla yüzde 73 daha yüksek kısırlık riskine sahiptir. 99 farklı çocuksuz çift üzerinde çalışılmış olup, 3 ay içerisinde 15 kez GD soya ürünü tüketen erkeklerin sperm sayılarında %74 düşüş gözlenmiştir (Namazcı, 2019).

2.5. Dünya'da GDO Hakkında Yasal düzenlemeler

Dünyada GDO hakkında iki tip mevzuat sistemi bulunmaktadır. Birincisi süreç esaslı mevzattır ve AB ve Avustralya gibi bazı ülkelerde bulunmaktadır. İkinci sistem

olan ürün esaslı mevzuat ise Kanada ve ABD gibi bazı ülkeler tarafından kullanılmaktadır. Ürün esaslı mevzuat sisteminde yapılan genetik değişikliğin niteliği değil, son ürünün özellikleri ve kullanım amacı dikkate alınmaktadır.

Ülkeler arasında GD ürünlerin etiketlenmesi konusunda farklılıklar mevcuttur. Örneğin GD ürünlerin etiketlenmesi Kanada ve ABD’de zorunlu değilken, Çin’de bir zorunluluktur.

GDO ile ilgili düzenlemeler esnasında bazı ülkeler geleneksel muadillik prensibini esas alırken bazı ülkeler ise ihtiyatilik prensibini esas almaktadır. Geleneksel muadillik prensibinde transgenik ürünler geleneksel muadilleri ile aynı ve güvenli görülmektedir. İhtiyatilik prensibinde ise genetiği değiştirilmiş ürünler ayrı bir ürün şeklinde değerlendirilmektedir. Bu yüzden bu prensibi benimseyen ülkelerde bu ürünler ile ilgili pek çok yasal düzenleme yapılmaktadır. ABD, Kanada ve Arjantin geleneksel muadillik ilkesini benimseyen ülkelerin başında gelmektedir, yani GD ürünlerin birçoğunun üretimi ve tüketimini onaylamaktadır. Diğer taraftan AB’de ve Japonya’da tüketicilerin korkuları dikkate alınmakta ve İhtiyatilik prensibi esaslı GDO’ya yönelik düzenlemeler bulunmaktadır. Japonya ve AB ülkelerinde GDO ile ilgili kontrol amaçlı katı düzenlemeler bulunmaktadır. Ürünlerin etiketlenmesi konusunda zorunluluk getirilmiştir. Yeni Zelanda ve Avustralya ülkelerinin mevzuatında muadillik prensibini benimsemekte olup buralarda da etiketleme mecburiyeti bulunmaktadır.

Çin’de 2002’den önce tarımsal biyogüvenlik konusunda ürün temelli bir yaklaşım içindeydi. Ancak daha sonra Çin’de etiketlemenin zorunlu hale getirilmesi ile süreç esaslı bir sisteme geçilmiştir.

Tarım alanındaki biyoteknolojik gelişmeler sonucunda oluşabilecek tehlikeleri önleyebilecek bir mevzuat sistemi oluşturmak hem maliyetli hem de çok zaman aldığından, birçok az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkede hala bu konuda yasal bir düzenleme mevcut değildir (Türkoğlu, 2007).

2.6. Türkiye’de GDO ile İlgili Yasal Düzenlemeler

Bir insanlık mirası olarak Türkiye’nin biyolojik çeşitliliğine bakıldığında, bu çeşitliliğin muhafaza edilmesi konusunda ulusal olduğu kadar dünya çapında da Türkiye’ye sorumluluk yüklenmesi bir zorunluluktur (Tekeli, 2009). Türkiye bu bağlamda, 1992’de BM tarafından imzalanan Biyoçeşitlilik Sözleşmesine canlı çeşitliliğinin zarar görmemesi, sürekli kullanılabilirliği, gen kaynaklarından sağlanacak faydaların adaletli bir vaziyette bölünmesi hususlarında 1996 yılında katılmıştır. Biyolojik çeşitliliğin muhafazası konusunda hedefe varılabilmesi için yapılması gereken işlemleri ortaya koymak üzere Çevre Bakanlığı ile Orman Bakanlığı’nın birlikte hazırladığı “Ulusal Biyolojik Çeşitlilik Stratejisi ve Eylem Planı” kabul edilmiştir (Anonim, 2007). Ayrıca, biyolojik çeşitliliğin korunması amacıyla gerçekleştirilen diğer bir faaliyet ise 2010 yılında Tohum Gen Bankası’nın kurulmasıdır. Türkiye Tohum Gen Bankası’nın çalışmalara başlaması gen kaynaklarının muhafazası, biyolojik çeşitlilik ve genetik kaynakların değerlendirilmesi konularında büyük katkısı olmuştur (Aykas, 2016).

Ayrıca Türkiye, canlı çeşitliliğinin zarar görmemesi, genetik kaynaklardan sürekli bir şekilde yararlanılabilmesi, bunun için bilincin arttırılması ve yasal düzenlemelerin yapılması gibi konularda 2004’te Cartagena Protokolüne katılarak, sorumluluk üstlenmiştir.

Türkiye’nin katıldığı uluslararası anlaşmaların yüklediği sorumluluk sebebiyle kabul edilen Biyogüvenlik Yasası ve Yönetmeliği 2010 yılında yürürlüğe girmiştir. Bu yasa kabul edilmeden önce Türkiye’de GDO’ların ekimi, dikimi, üretimi ve ithalatı kanunla belirlenmemiştir. Konuyla ilgili mevzuattaki tek düzenleme, 1998’de Tarım ve Köyişleri Bakanlığı’nın sunduğu “Transgenik Kültür Bitkilerinin Alan Denemeleri Hakkında Talimat” idi. Bu talimat çerçevesinde, konu hakkında 2001 yılında TBMM’ye verilen bir soru önergesine: transgenik çeşitleri araştırmak için, Tarım ve Orman Bakanlığı’nın kontrolü altında olmak üzere, Tarımsal Araştırma Enstitüleri bünyesinde patates, mısır ve pamuk bitkilerinin ekimi yapıldığı, cevabı verilmiştir. Ayrıca Bu kapsamda uluslararası tohum şirketleri olan Monsanto, Deltapine, Pioneer

gibi şirketlerle çalışıldığı, belli bölgelerde ve belli ürünlerde alan denemelerinin yapıldığı, bu amaçla ABD’den tohum ithal edildiği cevabı verilmiştir (Anonim, 2001).

Türkiye’nin dahil olduğu uluslararası anlaşmalar kapsamında 06 Ekim 2009’da ilk GDO ile ilgili Yönetmelik yürürlüğe girmiştir. Yönetmeliğin 11. ve 20. maddelerinin yürütmesi Danıştay 10. ve 13. Daireleri Müsterek Heyeti tarafından oy çokluğu ile durdurulmuştur. Bu durdurmanın gerekçesi, yem ve gıda kullanım amaçlı genetiği değiştirilmiş canlılar ve bunların ürünlerinin işlenmesi, ithalatı, ihracatı, denetim ve kontrolünün yönetmelikle değil kanunla düzenlenmesinin gerekliliği idi. Bu doğrultuda, 5977 Sayılı Biyogüvenlik Kanunu 26 Mart 2010’da Mecliste kabul edilmiştir ve Resmi Gazetede yayınlanmıştır. Kanuna göre direkt yasaklanan faaliyetler 5. Maddesinde aşağıdaki şekilde maddeler halinde sıralanmıştır (Anonim, 2010).

- GDO ve bunlardan elde edilen ürünlerin onaysız piyasaya arz edilmesi.
- GDO ve bunlardan elde edilen ürünlerin, Kuruldan çıkan karara uygunsuz bir şekilde tüketilmesi ya da tükettirilmesi.
- Bitki ve hayvanlardan genetiği değiştirilerek ürün elde edilmesi.
- GDO ve bunlardan elde edilen ürünlerin Kurulun belirlediği alan ve amaçtan farklı olarak piyasaya arz edilmesi.
- GDO ve bunlardan elde edilen ürünlerden devam mamaları ve devam formülleri, bebek mamaları ve bebek formülleri ile bebek ve küçük çocuk ek gıdalarında yararlanılması.

26.09.2010’da uygulanmaya başlayan Biyogüvenlik Yasası’nın hazırlık aşamasında, Cartagena Biyogüvenlik Protokolü esas alınmış ve GDO ile ilgili ‘ihtiyatlılık ilkesi’ne bağlı kalınmış. Ayrıca kanunda GDO ticareti ile ilgili yasaklar ve yaptırımlar da ele alınmıştır.

Biyogüvenlik Kanunu, genetiği değiştirilmiş ürünlerin ticaretine engel olmamakta, bu ürünlerin ticaretine ilişkin düzenlemeler getirmektedir. Dolayısıyla Kanunla birlikte GDO üretimi ve ticareti yasal bir çerçeveye dahil edilmiştir. Kanunun

temelinde GDO ve ürünlerine ilişkin faaliyetler üzerinde düzenleme yapılmıştır. Başka bir deyişle insan ve doğanın korunması çerçevesinde GDO ticareti serbest hale getirilmiştir (Atalık, 2010).

Kanunun amacı ilk başta GDO ve ürünlerinden kaynaklanabilecek riskleri önlemek, daha sonra ise insan ve çevre sağlığının korunması, biyolojik çeşitliliğin muhafaza edilmesi, sürdürülebilmesi ve bu doğrultuda biyogüvenlik sisteminin kurulmasıdır. Bu düzenlemeye göre Kanun, GDO ve bunlardan elde edilen ürünlerin biyoçeşitlilik ve her türlü canlının sağlığı açısından riskli olduğunu ön görmektedir. Buna rağmen GDO ve bunlardan elde edilen ürünler ile ilgili olarak ar-ge işlemleri, işleme teknolojisi, piyasaya arz etme, takip, kullanım amacı, ithalat, ihracat, sevk etme, lojistik, depolama, paketlenme, etiketlenme, v.b. eylemler ile ilgili düzenlemeler getirmiş; GDO ve ürünlerinin ihracatı, ithalatı, deneysel amaçlı serbest bırakılması, piyasaya arz edilmesi ve GD bakterilerin kapalı alanlarda kullanımı gibi konularda başvurunun nasıl yapılacağı, başvuruların yapılacak risk değerlendirmesine göre nasıl kabul ve reddedileceği konularına yer verilmiştir.

GDO ve bunlardan elde edilen ürünlerin, canlıların sağlığı ve doğa ile canlı türlerindeki çeşitliliği tehlikeye atması, tüketici ve üreticinin seçme şansının kalmaması, ekolojik dengede ve ekosistemde bozulmalara yol açması, GDO ve bunlardan elde edilen ürünlerin etrafa dağılma ihtimalinin olması, canlı türlerindeki çeşitliliğe zarar vermesi, başvuran kişinin biyogüvenliğin teminatı için gerekenlerin yapılması konusunda istenen teknik bilgi ve beceriye sahip olmaması durumunda yapılan başvuruların kabul edilmeyeceği Kanunun 3. maddesinde ayrıca düzenlenmiştir.

Kanunla etiketlenme ile ilgili de düzenleme yapılmış olup, yem amaçlı kullanılacak ve onaylı genleri ihtiva etmesi halinde, Bakanlık tarafından belirlenen eşik değerden fazla oranda GDO ve bunlardan elde edilen ürünleri ihtiva etmesi durumunda etiket bilgilerinde, üründe GDO bulunduğunun açık bir şekilde yazılması zorunlu tutulmuştur.

GDO ve bunlardan elde edilen ürünler için yapılan başvurularda değerlendirmenin yapılması amacıyla Biyogüvenlik Kurulu oluşturulmuş, kurulun görev ve yetkileri Kanunda belirtilmiştir. Kurula Türkiye'de GDO ile ilgili tüm işlemleri denetleme yetkisi verilmiştir. Biyogüvenlik Kurulu, on tanesi soya on beş tanesi mısır olmak üzere olmak üzere toplamda 25 GDO geninin yem ya da yem ham maddesi olarak ithal edilerek kullanımına onay vermiştir (Erdoğan, 2015).

Tablo 2.1 Onaylı, Onaysız ve Onay Sürecindeki GDO Genleri (Anonim, 2018; Anonim, 2021a)

			35S	NOS	FMV	ONAY DURUMU	CRM
SOYA	1	DAS-68416-4	-	-	-	ONAYSIZ	432A-432D
	2	DAS-81419-2	-	-	-	ONAYSIZ	437A-437B
	3	MON 87751	-	-	-	ONAYSIZ	215A
	4	MON 87769	-	-	-	ONAY SÜRECİNDE	809B
	5	A2704-12	+	-	-	ONAYLI	0707B9
	6	GTS 04032-6	+	+	-	ONAYLI	410BP
	7	MON 89788	-	-	+	ONAYLI	906B2
	8	DAS-44406-6	-	-	-	ONAYLI	436A-436B
	9	FG72	+	-	-	ONAYLI	610A4
	10	DP-305423-1	-	-	-	ONAYLI	426C-426D
	11	A5547-127	+	-	-	ONAYLI	0707C5
	12	DP-356043-5	+	-	-	ONAYLI	425B-425C-425D
	13	CV127-9	-	-	-	ONAYLI	911C
	14	MON 87701	-	-	-	ONAYLI	809A
	15	MON 87705	-	-	+	ONAYLI	210A
	16	MON 87708	-	-	-	ONAYLI	311A
MISIR	1	MZHG0JG	+	+	+	ONAYSIZ	1114C
	2	MON 87411	+	-	-	ONAYSIZ	215B
	3	MON 87403	+	-	-	ONAYSIZ	216A
	4	DP-4114	+	-	-	ONAYSIZ	439B
	5	5307	-	+	-	ONAYSIZ	411D
	6	3272	-	+	-	ONAY SÜRECİNDE	420C
	7	DAS 40278	-	-	-	ONAYLI	433A-433D
	8	MON 87427	+	+	-	ONAYLI	512A
	9	TC 1507	+	-	-	ONAYLI	418D
	10	DAS 59122	+	-	-	ONAYLI	424D
	11	MON 810	+	-	-	ONAYLI	417B-417C-417D
	12	MON 89034	+	+	+	ONAYLI	906E
	13	MON 88017	+	+	-	ONAYLI	406D

			35S	NOS	FMV	ONAY DURUMU	CRM
	14	MON 87460	+	+	-	ONAYLI	709A
	15	BT 11	+	+	-	ONAYLI	412BK
	16	MIR 162	-	+	-	ONAYLI	1208A2
	17	MIR 604	-	+	-	ONAYLI	607A2
	18	T25	+	-	-	ONAYLI	306H9
	19	GA 21	-	+	-	ONAYLI	414F
	20	MON 863	+	+	-	ONAYLI	417B-417C-417D
	21	NK 603	+	+	-	ONAYLI	415F
	22	VCO-01981-5	?	?	?	TR DE YAPILMIYOR	438B
	23	DP098140	+	-	-	TR DE YAPILMIYOR	427D
PAMUK	1	281-24-36	-	-	-	ONAYSIZ	422B-422D
	2	3006-210-23	-	-	-	ONAYSIZ	422B-422D
	3	GHB614	-	-	-	ONAYSIZ	1108A5
	4	T304-40	+	+	-	ONAYSIZ	429B-429C
	5	GHB119	+	+	-	ONAYSIZ	428B-428C
	6	LLCOTTON2 5	+	+	-	ONAYSIZ	306E5
	7	MON 531	+	+	-	ONAYSIZ	804C
	8	MON 1445	+	+	+	ONAYSIZ	804B
	9	MON 15985	+	+	-	ONAYSIZ	804D
	10	MON 88913	+	-	+	ONAYSIZ	906D
	11	MON 88701	+	+	-	TR DE YAPILMIYOR	113A
KANOLA	1	GT73	-	-	+	ONAY SÜRECİNDE	304B
	2	MS1	-	+	-	ONAY SÜRECİNDE	711A3
	3	MS8	-	+	-	ONAY SÜRECİNDE	306F7
	4	RF3	-	+	-	ONAY SÜRECİNDE	306G6
	5	T45	+	-	-	ONAY SÜRECİNDE	208A6
	6	TOPAS 19/2	+	-	-	ONAY SÜRECİNDE	711D4
	7	MON 88302	-	-	+	ONAY SÜRECİNDE	1011A
	8	DP-073496-4	?	?	?	TR DE YAPILMIYOR	434B
ŞEKER PANCARI	1	RUR H7-1	-	-	+	ONAYSIZ	419B
PİRİNÇ	1	LLRICE62	+	-	-	ONAYSIZ	306 I9
PATATES	1	EH92-527-1	-	+	-	ONAYSIZ	421B
TOPLAM	60						

Biyogüvenlik Kanunu'na dayanarak GDO ve Ürünlerine Dair Yönetmelik, hazırlanmış olup 13 Ağustos 2010 tarihli Resmi Gazetede yayımlanmıştır. Yönetmeliğin en dikkat çekici düzenlemeleri, gıda ve yem olarak kullanım amaçlı genetiği değiştirilmiş canlı ve ürünleri ile ilgili başvuruların değerlendirilmesi, karar verilmesi, ithalat, ihracat, izleme, etiketleme, piyasaya arz etme, denetim ve kontrolü, genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar ile ilgili ar-ge ile ilgili işlemler ve deneysel amaçlı eylemlerin, çevre ile irtibatını engelleyerek, kontrollü bir şekilde, belirlenmiş alanlarda yapılacak denemelere ilişkin usul ve esasların belirlenmesidir.

29 Mayıs 2014 tarihinde değişiklik yapılarak, yönetmeliğe “GDO bulaşanı” kavramı getirilmiş olup, *“Genetik modifikasyon teknolojisi uygulanan veya uygulanmayan bir üründe, birincil üretim aşaması dahil üretim, imalat, işleme, hazırlama, işleme tabi tutma, önlenemeyen veya tesadüfi olarak bulaşan GDO’ları analiz sonucunda üründe yüzde 0,9 ve altında GDO tespit edilmesi halinde bu durumun GDO bulaşanı olarak değerlendirileceği, GDO bulaşanı olan ürünlerde bulaşan olarak tespit edilen genlerin Biyogüvenlik Kurulu tarafından onaylanmış olması durumunda ürünlerin onay amacına uygun olarak kullanılabilmesi”* şeklinde düzenlenmiştir.

Yapılan bu değişiklik üzerine kamuoyunda oluşan “GDO’lar serbest bırakıldı” algısı üzerine Bakanlık “..AB ve çoğu ülkede onaylı GDO ürünleriyle insanların beslenmesi yasak olmamasına karşın, Türkiye’de GDO ihtiva eden gıdaların üretim ve ithalatının yasak olduğu, dolayısıyla, ülkemizde GDO ve bunlardan elde edilen ürünlerin gıda olarak kullanımının ve GDO üretiminin tamamen yasak..’ olduğu şeklinde basın açıklaması yapmıştır (Anonim, 2014).

Sonuç olarak Türkiye Cartagena Biyogüvenlik Protokolü’ne dahil olarak genetiği değiştirilmiş ürünlerin taşıdığı bütün riskleri de göze almış bulunmaktadır. Dolayısıyla GDO ile ilgili net ve şeffaf bir yol izlemesi ve bu doğrultuda uygulama konusunda gerekli usul ve esasları kurması bir gerekliliktir. Ayrıca Biyoçeşitlilik Sözleşmesinin tarafı olan Türkiye için tüm insanlığın ortak sorunu olarak görülen biyoçeşitliliğin korunması önemli sorumluluktur (Çoban, 2010). Ülkemizin sahip

olduğu gen kaynaklarının GDO'ya karşı korunması en başta gelen yükümlölüklerindendir (Erden Atak, 2018).

2.6.1. GDO Analizi Sonucunda Ürünün Kabul veya Reddi

Tarım ve Orman Bakanlığı'nın yayınladığı Biyogüvenlik Mevzuatı Talimatı'na göre Bakanlığın bünyesindeki Gıda Kontrol Laboratuvarları tarafından yapılan GDO Tarama analizleri sonucunda;

Eğer ürün yem amaçlı kullanılmak üzere GDO içerdіđini etiketinde beyan etmiş olması durumunda terminatör gen bölgeleri (p35S, tNOS, pFMV v.b)'ne bakılmaksızın direkt sadece onaysız genlere bakılır. Eğer onaysız gene rastlanırsa miktar analizi yapılır. Eğer miktar % 0,9 eşik değerinin altında ise bulaşı kabul edilir ve ürünün yem olarak kullanımına izin verilir. Ancak % 0,9 eşik değerinin üstünde sonuç elde edilirse ürünün onaysız GDO içerdіđine karar verilir ve ürünün hiçbir şekilde kullanımına izin verilmez. Eğer onaylı gene rastlanırsa ürün etiketinde GDO içerdіđi belirtildiği için yem amaçlı kullanımı uygun görülür. Ancak ürün etiketinde beyan bulunmayan yem ürününde onaylı GDO geni tespit edilirse ürünün etiketlenmesi koşuluyla kullanımına izin verilir.

Eğer ürün gıda amaçlı kullanılacak ise herhangi bir promotor/terminatör gen bölgesi (p35S, tNOS, pFMV v.b)'ne rastlanması durumunda onaylı ya da onaysız gen olup olmadığına ve miktar analizine bakılmaksızın ürünün gıda amaçlı kullanımına izin verilmez. Bu durumda ürün sahibi yem amaçlı kullanmak istediğini belirtirse o zaman yem amaçlı ürüne uygulanan prosedür aynı şekilde bu ürüne de uygulanır. (Anonim, 2018).

2.7. GDO Analiz Yöntemleri

GDO analiz yöntemlerinde orijinal çeşit ile gen aktarımı yapılmış bitki arasındaki farktan faydalanılır.

Şuanki teknolojik gelişmeler ışığı altında mısır, pamuk, soya, gibi bitkilerde genetik işlemlerin tespit edilmesinde 2 farklı metod geliştirilmiştir. Bu yöntemler:

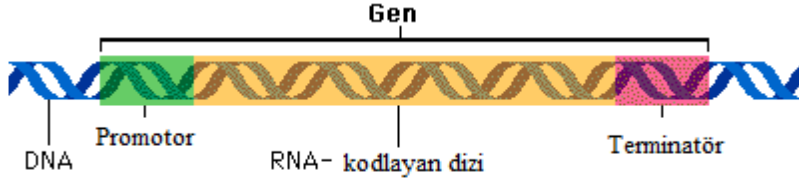
- ELISA (Enzyme linked immuno sorbent assay) yöntemi antijen ile antikorların bağlanma özelliğinden yararlanarak özel proteinlerin varlığını tespit eder.
- PCR (Polymerase Chain Reaction), ürüne transfer edilen gen bölgelerinin tespitini temel alır.

Bu iki teknik sayesinde numunedeki yüzde cinsinden GDO miktarı öğrenilebilmektedir. PCR'a dayalı yöntem, AB'de geçerliliği onaylanan ilk yöntemdir (Lipp et al., 1999).

Bu çalışmada GDO analizi PCR yöntemi kullanıldığından tezin ilerleyen bölümlerinde PCR yöntemi ile ilgili daha detaylı bilgilere yer verilmiştir.

2.7.1. GDO'larda Temel Genetik Elementler

GDO'lu bitkiler bazı ortak genetik elementler içermektedir. Aktarılan DNA bölgesi promotor dizi, gen ve bir terminatör dizi içermektedir. Promotor dizi açma kapama düğmesi gibi davranarak, genin mRNA'ya transkripsiyonunu kontrol eder. Terminatör bölge genin transkripsiyonunu durdurur (Güven, 2014).



Şekil 2.1 GDO'lu bir Gen Kaseti

2.7.1.1. Promotorlar

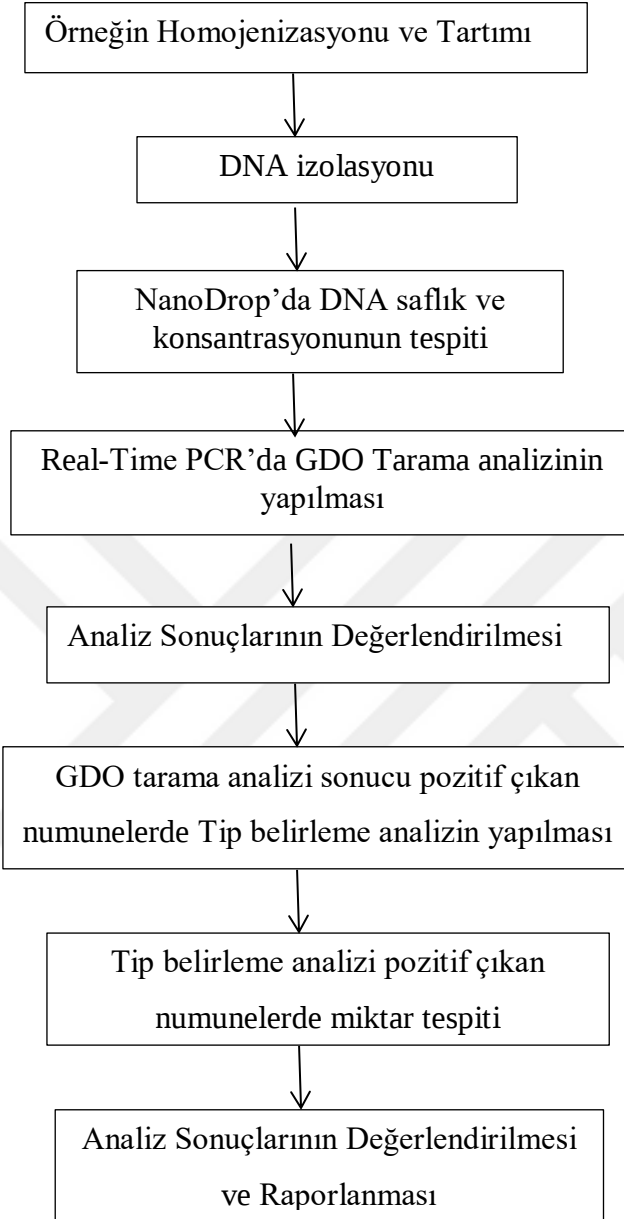
Promotorlar gen kasetinin 5' ucunda bulunan, RNA polimeraz tarafından tanınan ve hedef genin transkripsiyonunda kullanılan DNA dizileridir (Browning and Busby, 2004). En sık kullanılan promotorlar bir virüsten aktarılan 35S promotor ve diğer türevi FMV'dir. Bu nedenle pek çok GDO tespitinde bu promotor dizilerin tespiti esas alınır (Matsuoka v.d., 2002).

2.7.1.2. Terminatörler

Terminatörler transkripsiyon protein kompleksinin çözünmesiyle transkripsiyonu durduran DNA dizileridir. Terminatör, gen dizisinin sonunda ya da 3' ucunda bulunmaktadır. En sık kullanılan terminatör, A. Tumefaciens napoline sentez geninden aktarılan T-NOS'dur (Arne v.d., 2012).

2.7.2. GDO Analiz Aşamaları

Günümüzde GDO tarama ve miktar analizlerinde sıklıkla kullanılan ve en doğru sonuç veren yöntem Real Time PCR yöntemidir. Şekil 2.2'de Real Time PCR için GDO analiz aşamaları görülmektedir.



Şekil 2.2 GDO Analiz Aşamaları

2.7.2.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu çoğu moleküler biyoloji çalışmalarında ilk adımdır. Nükleik asit ekstraksiyon yöntemlerinin amacı spesifik analiz için çeşitli canlılardan saf nükleik asit elde etmektir. PCR ile yapılan analizlerde en büyük rol oynayan faktörler

nükleik asitlerin saflığı ve kalitesidir. Saflığı yüksek nükleik asit elde edebilmek amacıyla ekstraksiyon tekniklerinden en uygun olanı seçilmelidir (Somma v.d., 2004).

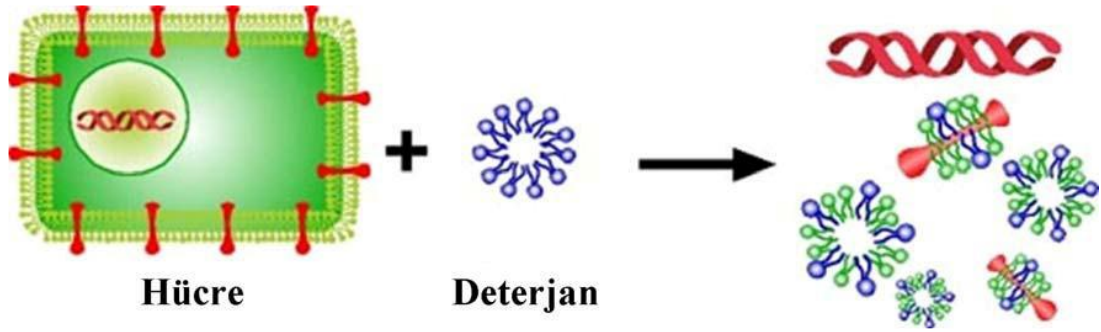
Nükleik asitlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması amacıyla çok çeşitli yöntemlerin kullanılması ile birlikte, en uygun teknik çoğunlukla şu kıstaslara göre seçilmektedir:

- Hedeflenen nükleik asit
- Kaynak olarak kullanılacak canlı
- Başlangıç materyali (doku, tohum, yaprak, işlenmiş materyal vb.)
- Aranılan sonuçlar (verim, saflık için gereken süre)
- Sonraki işlem (PCR, klonlama, işaretleme, blotlama vb.)

Nükleik asitlerin ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesi için hücre parçalanması, hücre nükleazların inaktivasyonu ve nükleik asitlerin parçalanmış hücreden ayrımı işlemlerinin gerçekleştirilmesi gerekir. İyi bir parçalama işlemi birtakım tekniklerin bileşimiyle meydana gelir. Bu işlem kompleks başlangıç materyalini parçalayacak sertlikte, fakat elde edilmek istenen nükleik asidin zarar görmeyeceği hassaslıkta olmalıdır. Temel parçalama işlemi aşağıda belirtilen teknikler yardımıyla yapılabilir:

- Mekanik parçalama (hipotonik parçalama, öğütme, v.b.)
- Kimyasal uygulama (deterjan, tiol, kaotropik katkı maddeleri v.b.)
- Enzim uygulaması (Proteinaz K v.b.)

Şekil 2.3' te DNA'nın deterjan kullanımı ile nasıl hücreden ayrıldığını göstermektedir.



Şekil 2.3 Hücre membranının parçalanması ve DNA'nın ekstrasyonu

Hücresinin parçalanması ile elde edilen Hücre ekstraktından nükleik asitlerin saf hale getirilmesi için çoğunlukla aşağıda belirtilen yöntemlerin birarada uygulanması gerekmektedir (Zimmermann et al., 1998):

Ekstraksiyon / presipitasyon (Çökeltme): Çözücü ile ekstraksiyon işlemi çoğu zaman nükleik asitlerden kontaminantları uzaklaştırmak amacıyla kullanılmaktadır.

Kromatografi: Kromatografi yöntemleri farklı ayırıştırma tekniklerinden oluşabilir. Jel filtrasyonu tekniği ile moleküller büyüklükleri azaldıkça sırasıyla elenir. İyon değişimi kromatografisinde, hedeflenen molekül ve kolon matrisindeki fonksiyonel gruplar arasında bulunan elektrostatik etkileşimden faydalanılır. Adsorpsiyon kromatografisinde ise biyolojik moleküllerin aksine nükleik asitlerin, belirli tuzların varlığında seçici olarak silika veya cam yüzeylerin üzerine tutunma özelliğinden faydalanılmaktadır.

Santrifüjasyon: Seçici santrifüj işlemi güçlü bir saflaştırma yöntemidir. Genellikle, santrifüj yöntemi bir başka yöntemle birlikte kullanılmaktadır.

Afinite kolon ayırımı: Birçok saflaştırma tekniği son zamanlarda nükleik asitlerin antijen ve antikor çekiminin sabitlenmesi işlemini manyetik ayırıştırma işlemiyle bir araya getirmiştir. Bu yöntem, manyetik bir ayırıştırma yoluyla hızlı ve basit bir şekilde santrifüj, faz ayırıştırmanın bazı kısımları ve ekstraksiyon işlemlerini

gerçekleştirdiği için nükleik asitlerin saflaştırılmasını kolaylaştırmaktadır. (Somma v.d., 2004).

2.7.2.2. DNA Saflık ve Konsantrasyon Tespiti

Nükleik asitlerin konsantrasyonu genelde bir boş örneğe (köre) karşı ultraviyole ışığı altında 260 nm’de sahip oldukları absorpsiyon A (optik yoğunluk, OD) ölçülerek tespit edilmektedir. Kontaminant tespiti, oransal hesaplara belirlenebilmektedir. Proteinlerin absorblanması 280 nm’de olduğundan, nükleik asitin saflık hesabında A260/A280 oranı hesaplanmasında kullanılmaktadır. Saf DNA’nın yaklaşık 1,8 değerinde olması beklenmektedir. Absorpsiyonun 230 nm’de görülmesi; karbonhidratlar, aromatik bileşenler, peptitler vb. bileşiklerin kontaminasyonunu ifade etmektedir. Saf numunelerin A260/A230 değeri yaklaşık 2,2 olması istenir. DNA konsantrasyonu ise özellikle mısır numunelerinde genellikle 40 ng/μl’ye ayarlanmaktadır.

2.7.2.3. GDO Tarama Analizi

GDO tarama analizlerinde, 35S ve FMV promotor, NOS terminatör bölgeleri taranmaktadır. Bunun için geliştirilmiş diziye özgü primer ve probalar ya da piyasada ticari olarak mevcut GDO tarama analizi kitleri kullanılabilmektedir. Bu bölgelerden herhangi birinin pozitif çıkması GDO tespit edildiği anlamına gelmektedir (Anonim, 2013b; Anonim, 2016b).

2.7.2.4. Tip Belirleme (Gen Tanımlama) Analizi

GDO Tarama analizi pozitif olan örneklerde öncelikle bitki spesifik analizleri yapılarak içeriğinde, soya, mısır, pamuk, kanola, şeker pancarı gibi bileşenler tanımlandıktan sonra, tespit edilen türe ait olası GDO genleri, uygun primer probalar veya ticari kitler ile tespit edilmektedir (Anonim, 2013b; Anonim, 2016a).

2.7.2.5. Miktar Analizi

Onaylı gen bölgelerini etiketleyebilmek, GDO'lu DNA ve toplam bitki DNA'sının standart eğrilerini oluşturmak için kantitatif standartlara ihtiyaç duyulmaktadır. Standartlarla ilgili önemli bir diğer konu ise biyolojik etkenlerdir. Bitkilerle çalışırken, zigotluk, doku kromozom sayısı, GD bitkinin orjini gibi faktörler GDO miktarının belirlenmesinde etkili faktörlerdir. GDO'ların varlığı % olarak ifade edilmektedir. Bir numunenin içerdiği GDO miktarı, ürünün toplamındaki genetiği değiştirilmiş ürünün miktarı olarak belirtilmektedir (Chaouachi v.d., 2013).

3. BÖLÜM

PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

3.1. PCR (Polymerase Chain Reaction) Tanımı

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR/PCR), çeşitli canlılara ait DNA'nın özel bir bölgesinin primerler, oligonükleotitler ve enzimler yardımıyla laboratuvar ortamında kopyalarının sentezlenmesini sağlayan tepkimelerden oluşan bir yöntemdir (Persing, 1991).

3.2. PCR'ın Tarihçesi

Moleküler araştırmalar DNA'nın yapısı ile ilgili çalışmaları temel almaktadır. DNA'nın dizi analizinin gerçekleştirilebilmesi (Maxam ve Gilbert, 1977), kesim yapan enzimlerin bulunması (Roberts, 1987), rekombinant DNA teknolojisinin geliştirilmesi (Watson ve ark., 1992) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu gibi büyük öneme sahip buluşların ard arda gerçekleştirilmesi, biyoteknoloji alanında çok önemli gelişmelerin kaydedilmesine sebep olmuştur (Southern, 1975; Sanger v.d., 1977). Son zamanların en büyük keşiflerinden biri olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) yöntemi ilk defa 1985'te kullanılmıştır (Anonim, 2004). Biyoteknoloji alanında Moleküler biyolojide çok geniş kullanım alanı bulan bu yöntem, kısaca, nükleik asitlerin uygun şartlarda kopyalanması şeklinde ifade edilebilir. PCR, DNA zincirlerinin yüksek ısı yardımıyla birbirinden ayrılması (denatürasyon), sonrasında primerlerin (sentetik oligonükleotitler) hedef DNA'ya bağlanması (yapışma) ve zincirin uzamasından meydana gelen döngünün defalarca tekrarlanması esasına dayanır. Döngülerin tekrarlanması ile DNA'dan milyarlarca çoğaltılabilir. Bu yöntemin kullanılması ile çalışmaların daha çabuk ve güvenilirliği daha yüksek olması sağlanmıştır. Moleküler biyolojinin vazzgeçilmesi haline gelen PCR yönteminden çok farklı alanlarda yararlanılmaktadır (Weining ve Langridge, 1991).

3.3. PCR Temel Bileşenleri ve Optimizasyonu

PCR'ın temel bileşenleri; kalıp DNA, DNA'nın dizilişine göre tasarlanan ve zincirleri açılan DNA'ya bağlanan primerler, deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP'ler), DNA polimeraz, $MgCl_2$ ve tampon sıvıdır. Taq DNA polimeraz enzimi; *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilir ve PCR'da en çok kullanılan DNA polimeraz enzimidir (Siqueira ve Roças, 2003).

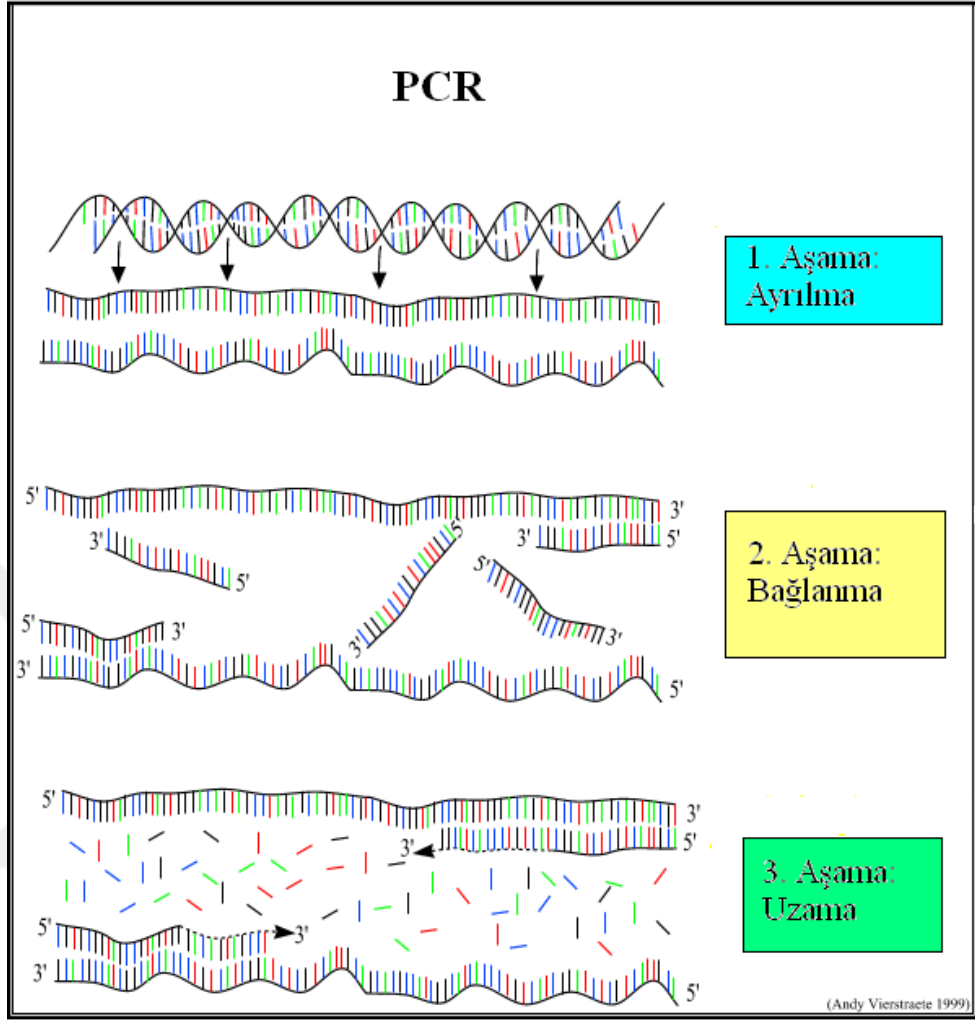
PCR'ın koşulların optimum hale gelememesinin sebebi kullanılan bileşenlerin miktar ya da çeşidi olduğu gibi daha başka nedenler de olabilmektedir. Primer konsantrasyonu ve yapısı, $MgCl_2$ konsantrasyonu, sıcaklık ve zaman değerleri (özellikle annealing sıcaklığı) ve polimeraz enziminin özellikleri başlıca sebeplerdendir. Denemeler yapılarak optimum reaksiyon koşullarının ve kullanılan maddelerin uygun miktarlarının belirlenmesi ile inhibitör özellikteki etkenler de önlenabilmektedir. PCR faktörlerinin optimizasyonu için erime noktasına göre değişik konsantrasyon ve sıcaklıklardaki reaksiyonların sonuçları arasında karşılaştırmalar yapılmaktadır (Roux, 1995).

3.4. PCR Temel Aşamaları

Reaksiyon üç basamaklı döngünün tekrarı şeklinde olur:

1. Denatürasyon (DNA'nın ikili sarmal yapısının bozulması)
2. Annealing (Primerin bağlanması)
3. Uzama (elongasyon) (Prichard ve Tait, 2001).

Bu 3 temel aşama Şekil 3.1 gösterilmektedir.

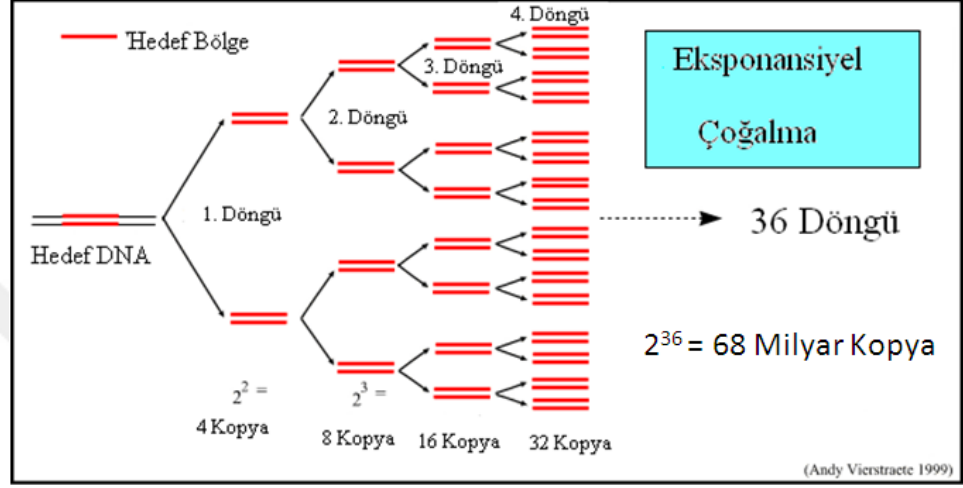


Şekil 3.1 PCR'in 3 Temel Aşaması (Andy, 1999)

Denatürasyon aşamasında, kalıp DNA molekülü, 95°C sıcaklıkta ikili sarmal yapısı ayrılarak iki adet tek zincirli DNA dizisi haline dönüşmektedir. Bağlanma aşamasında, primerler kalıp DNA'daki hedef bölgeye ortalama 55°C'de yapışmakta ve 72°C'de DNA polimeraz (Taq polimeraz) enziminin desteğiyle primerlerden hareketle zincirin uzamasıyla DNA içerisindeki hedef bölgenin çoğaltma işlemi meydana gelmektedir. Bağlanma ve uzama sıcaklıklarının çok yakın olduğunda, 60°C'de bağlanma ve uzama aşamaları birleştirilerek işlem birarada yürütülebilmektedir. Döngü şeklinde olan Bu ısıl işlem 25-45 kez tekrarlanarak döngü şeklinde meydana gelmektedir ve çoğalan DNA'ların agaroz jelde görüntülenebilir hale 25 döngü sonunda gelmektedir. Bahsedilen termal döngü işleminin yapılabileceği, çeşitli

soğutma sistemleri, tüp kapasiteleri, ısı düzeneklerine sahip farklı PCR cihazları (thermocyclers = termal döngü cihazı) bulunmaktadır (Kanturvardar Tütenyurd, 2013).

Şekil 3.2’de DNA’nın 36 döngü sonucunda çoğalma işlemi gösterilmektedir.



Şekil 3.2 Hedef Bölgenin PCR Ekspansiyon Çoğalma Aşaması (Andy, 1999)

3.5. PCR Kullanım Alanları

PCR'ın kullanıldığı başlıca alanlar şu şekildedir:

1. Kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tespiti,
2. Prenatal teşhis,
3. Patojen mikroorganizmaların tespiti,
4. Adli tıp alanı,
5. Onkogenesinin araştırılması,
6. Gen ekspresyonu ve klonlama,
7. DNA dizi analizinde, büyük miktarda DNA örneklerinin oluşturulmasında,
8. Bilinmeyen dizilerin tanımlanması,
9. Geçmiş DNA'ların araştırılması ve evrimin açıklanması,
10. Restriksiyon Fragment Length Polimorfizm Analizi,

11. Invitro fertilizasyon yapılan tek hücrede, implantasyon öncesi genetik testlerin yapılması ve sonra implantasyon gerçekleştirilmesi ile bebeğin normal doğmasının sağlanması,
12. DNA protein interaksiyonunun incelenmesinde (footprinting) kullanılabilmektedir (Yetilmezler, 2010).

3.6. PCR Etkileyen Faktörler

PCR'ı etkileyen birçok faktörün bulunmasıyla birlikte, bu çalışmada üzerinde durulan faktörler bu bölümde açıklanmıştır.

3.6.1. Enzim Konsantrasyonu

PCR için önerilen Taq DNA polimeraz enzim konsantrasyonu diğer koşullar optimize edildiğinde 100 µl reaksiyonda 1-2.5 ünedir. Ancak kullanılması gereken enzim miktarı kullanılan kalıp DNA ya da primerin çeşidine veya konsantrasyonuna bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Enzim konsantrasyonunun az olması reaksiyon sonunda oluşacak ürün (DNA)'nın az olmasına sebep olur. Yüksek Enzim konsantrasyonu ise spesifik olmayan bantların meydana gelmesine sebep olabilmektedir (Innis ve Gelfand, 1990).

3.6.2. DNA Konsantrasyonu

Düzgün bir çoğalma (amplifikasyon), DNA'nın kalitesi ve konsantrasyonu ile çok yakından ilgilidir. DNA miktarının arttıkça elde edilecek ürünün de fazla olacağı düşüncesi, DNA miktarı hakkında en çok yapılan yanlışlardan biridir. Çoğunlukla çok düşük miktarda kullanılan kalıp DNA, zayıf amplifikasyona dolayısıyla istenen ürünün yeterince elde edilememesine yol açarken, yüksek miktarda DNA kullanıldığında ise spesifik olmayan ürünlerin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Yıldırım, 2010).

3.6.3. Primerler

Primer konsantrasyonu 0,1-0,5 µM arasında genellikle idealdir. Daha yüksek primer konsantrasyonları yanlış bağlanmalara ve istenmeyen ürünlerin meydana gelmesine sebep olabilir. Bu da istenen ürünün daha az elde edilmesine yol açar. Düşük primer konsantrasyonu da aynı şekilde istenen miktarda ürün elde edilememesine sebep olur (Innis ve Gelfand, 1990).

20 bazdan kısa primerlerin bağlanma sıcaklığını bulabilmek için DNA erime sıcaklığı $T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$ eşitliği ile hesaplanabilmektedir. Eşitlikteki T_m DNA'nın erime sıcaklığını, G, A, C ve T ise nükleotid bazlarını sembolize etmektedir. Daha uzun primerlerde yapışma sıcaklığının hesaplanabilmesi için primer dizaynında kullanılan bilgisayar programlarında kullanılan termodinamik parametrelerin hesaba katılması gerekmektedir (Dieffenbach ve ark., 1993).

Primer bağlanması için gerekli süre ve sıcaklık; kullanılan primerin kompozisyonu, konsantrasyonu ve uzunluğuna bağlıdır. Uygun bağlanma sıcaklığı doğru hesaplanmış olan T_m sıcaklığından 5 °C daha düşüktür. Çünkü Taq DNA polimeraz enzimi belli bir sıcaklığın üzerinde aktif iken primer uzaması düşük sıcaklıkta meydana gelmektedir (Innis ve Gelfand, 1990).

3.6.4. Sıcaklık

Primerlerin DNA polimeraz enzimi ile uzaması için ihtiyaç duyulan süre, hedef DNA'nın konsantrasyonu, uzunluğu, ve ortamın sıcaklığı ile bağlantılı bir şekilde farklılık göstermektedir. Genellikle primerlerin uzaması 72 °C de oluşmaktadır. Bu sıcaklık değeri, Taq DNA polimeraz enziminin iyi bir şekilde çalışması için gereklidir. Baz uzunluğu ile ilişkili olarak primerlerin uzaması için ihtiyaç duyulan süre değişmektedir (Innis ve Gelfand, 1990; Dieffenbach v.d., 1993).

PCR'ın özgülüğü ile hibridizasyon sıcaklığı arasında doğru orantı bulunmaktadır. Yüksek sıcaklıkta PCR'da büyük bir sorun olan yanlış hibridizasyon olasılığı azalmaktadır. Yüksek sıcaklık kullanıldığında yanlış nükleotitlerin primerlerin 3' uçlarına bağlanması önlenmiş olur. Düşük hibridizasyon sıcaklığında ise istenmeyen küçük DNA parçalarının oluşması mümkündür (Kahya vd., 2013).

3.6.5. Deoksinükleotid Trifosfatlar (Deoxynucleotid Triphosphates, dNTPs)

PCR uygulamalarından optimal sonuç elde edebilmek için genelde her bir deoksinükleotid (A, G, C, T) konsantrasyonu 20- 200 μ M arasında olması gerekir. Bu dört bazın konsantrasyon oranlarının eşit olması gerekmektedir. Başlangıç stok solüsyonunun 10 μ M kadar seyreltilip, -20° C de küçük hacimlerde saklanması gerekir. Yüksek konsantrasyonda dNTP kullanılması, sentezlenmesi istenen DNA dizisinden farklı dizilerin hatalı olarak ortaya çıkmasına yol açabilmektedir. Bu nedenle PZR güvenilirliğini ve spesifikliğini arttırmak için gerekenden yüksek konsantrasyonda dNTP kullanmamak gerekir (Innis ve Gelfand, 1990).

3.6.6. Magnezyum Konsantrasyonu

PCR reaksiyon karışımında Mg^{+2} konsantrasyonunun ortalama 0.5-2.5 μ M olması gereklidir. Mg^{+2} iyonları; DNA erime sıcaklığına, DNA polimeraz enzim aktivitesine ve primer bağlanmasını etkileyebilmektedir. dNTP'ler Mg^{+2} iyonunu bağlama özelliğine sahiptir. Bu yüzden dNTP konsantrasyonundaki artış serbest Mg^{+2} konsantrasyonunu azaltabilmektedir. PCR optimizasyonu yapılırken bu durum hesaba katılmalıdır. Mg^{+2} iyonları; polimeraz enzimi aktivitesini uyarır, dNTP'ler ile çözünebilir yapılar meydana getirirler, çift iplikli DNA'nın erime sıcaklığını (T_m) yükseltirler ve primer ile kalıp DNA arasındaki hibridizasyonun gerçekleşmesi için ortam oluştururlar. Bu yüzden Mg^{+2} iyonlarının ürün verimi ve PCR'ın özgülüğü üzerinde çok büyük bir rolü bulunmaktadır. Mg^{+2} iyonlarının konsantrasyonunun düşük olması az ürün oluşumuna, Mg^{+2} iyonlarının konsantrasyonunun yüksek olması ise istenmeyen ürünlerin meydana gelmesine yol açmaktadır (Kahya v.d., 2013).

3.6.7. Prob Konsantrasyonu

Gerçek zamanlı PCR’da çoğalan hedef bölgenin görüntülenmesini sağlamak amacıyla kullanılan problardaki konsantrasyon değişiklikleri PCR sonucunu etkilemektedir (Pryor ve Wittwer, 2006).

3.6.8. Devir Sayısı

PCR’ın çalışma koşulları doğru oluşturulduğu durumda 25-40 arasında devir sayısı yeterli gelmektedir. Devir sayısı ile çoğaltılacak kalıp DNA’nın miktarı arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır. Fazla devir sayısı istenmeyen bantların meydana gelmesine, az devir sayısı az miktarda DNA’nın oluşmasına yol açmaktadır (Innis ve Gelfand, 1990).

3.6.9. Diğer Reaksiyon Unsurları

Uygun reaksiyon ortamı oluşturmak için kullanılan tampon çözelti, çeşitli tuzlar (NaCl veya KCl) ve DMSO çözeltisi de kullanıldıkları miktara göre PCR’ı etkilemektedir (Innis ve Gelfand, 1990).

3.7. PCR Çeşitleri

Teknolojik gelişmelerle birlikte PCR tekniklerinde de çeşitlilik zaman içerisinde artış göstermiştir ve çok fazla PCR çeşidi bulunmaktadır. Bu tez çalışması klasik PCR yöntemi ile ilgili olup, bu bölümde sadece literatür özetlerinde önümüze çıkan PCR çeşitlerine yer verilmiştir.

3.7.1. Çoklu (Multiplex) PCR

Çoklu PCR yönteminde, PCR karışımına bir çift primerden daha fazla sayıda primerin eklenmesi ile aynı anda farklı bölgelere ait DNA parçalarının çoğaltılması sağlanmaktadır. Bu yöntemin en büyük faydası, tek bir numunede, pek çok özelliğin

aynı anda araştırılabilmesi ya da tek özelliğin farklı bölgelerinin tiplendirme amacıyla saptanmasına imkan tanınmasıdır. Sonuçların görüntüleme işlemi, agaroz jel elektroforezi yöntemi ile ve çoğalan DNA parçacıklarının gözle görülebilecek bantlar şeklinde, molekül ağırlıklarına göre sıralanmaları ile gerçekleştirilmektedir (Kanturvardar Tütenyurd, 2013).

Bu yöntemin optimizasyonu klasik PCR'a göre çok daha zordur. Primerlerin birbirleri ile etkileşime girmesi, PCR koşullarının tüm hedefler için aynı olmaması ve hedef bölgelerin hepsinin aynı verimlilikte çoğalmaması, çeşitli problemler ortaya çıkabilmektedir (Kanturvardar Tütenyurd, 2013).

3.7.2. RAPD PCR

RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA, Randomly Amplified Polimorphic DNAs) ilk kez 1990 yılında rastgele primerlerin kullanıldığı ve temelinde Polimeraz Zincir Reaksiyonununun yer aldığı bir yöntem şeklinde meydana çıkmıştır. RAPD yöntemi, incelenen canlı türünün DNA'sına rassal olarak seçilmiş, 9-10 bp uzunluğuna sahip oligonükleotitten oluşan primerin, düşük sıcaklıkta rastgele bağlanması yoluyla çoğaltılması esasına dayanır. Sonrasında meydana gelen ürün standart jel elektroforezinde yürütülüp bantlar şeklinde görüntülenerek incelenmektedir (Öz Aydın, 2004).

RAPD tekniğinde kullanılan rasgele dizaynedilmiş kısa primer, hedef DNA'nın iki zincirinin de farklı bölgelerine bağlanabilir. Reaksiyon sonucunda, bu farklı bağlanmalar sebebiyle değişik uzunluklara sahip DNA parçaları meydana gelebilir. Analizi yapılan DNA kalıpları farklı olduğunda primerlerin bağlandıkları bölge de farklılık göstereceğinden agaroz jelde değişik uzunluğa sahip bantlar gözlenecektir. Bu teknik diğer yöntemlerden daha duyarlıdır ve farklı mikroorganizmaların tespitinde daha iyi sonuçlar elde edilmektedir (Kılıç v.d., 2003).

3.7.3. Gerçek zamanlı (Real Time) PCR

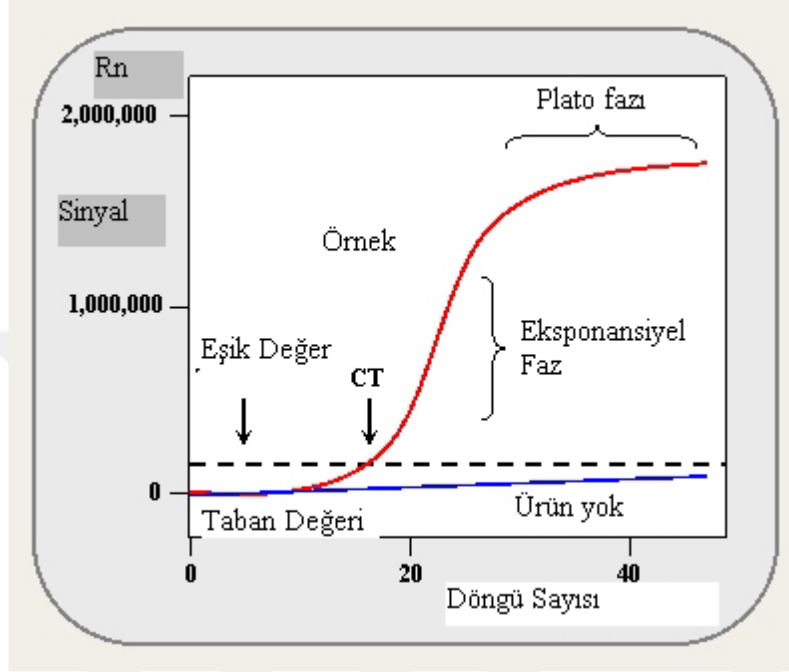
Gerçek zamanlı PCR uygulaması, PCR solüsyonuna floresan özellikli boyaların ve termal döngü cihazına direkt bilgisayarın eklenmesiyle, DNA sentezinin eş zamanlı görüntüleyebilen bir PCR yöntemidir. Çoğalan hedef bölgenin görüntülenmesini sağlayan floresan özellikteki boya; serbest halde olan SYBR Green I, primere bağlı olan Akrep problemleri veya proba bağlı TaqMan problemleri kullanılabilmektedir (Pryor ve Wittwer, 2006).

Gerçek zamanlı PCR aynı zamanda "kinetik PCR" ve "homojen PCR" olarak da adlandırılmaktadır. Gerçek zamanlı (Real-time) PCR birçok avantaja sahiptir. Gerçek zamanlı PCR; gen anlatımının analizi, patojen mikroorganizmaların tespiti, kromozomlarda görülen sayısal veya yapısal bozuklukların tespiti ve ayrıca son gelişmelerle birlikte "real-time" immüno PCR yöntemiyle protein belirlemesi gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Piyasada birçok "real-time" cihazı bulunmaktadır. Bu cihazlar arasındaki en belirgin farklar; hızı, dalga boyları, ve aynı anda paralel gidebilen reaksiyon kapasiteleridir. "Gerçek zamanlı PCR" teknolojisi, gün geçtikçe daha geniş kullanım alanına sahip olmakta ve kullanıcılar tarafından çok fazla tercih edilmektedir. Bunun sebebi de genin kendini dışı vurumunda daha hassas, verimli, hızlı ve daha üretken olmasıdır (Günel, 2007).

3.7.3.1. Real Time PCR'ın Fazları ve C_t Değeri

Real Time PCR işlemi, çoğalmanın görüntülenemeyecek kadar az olduğu taban değer, logaritmik çoğalmanın gözlemlendiği eksponansiyel faz ve PCR solüsyonunun içerisindeki çoğalma için gerekli olan malzemelerin tükendiği plato fazından oluşmaktadır. Reaksiyonun sonunda gözlenen çoğalmanın düzeyi oluşan ürün miktarı ile doğru orantılıdır. Ürünün çoğalmaya başladığı ve eşik değeri geçtiği döngü sayısı c_t (cycle threshold), ürün konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Ürün miktarı ne kadar çoksa, çoğalmaya o kadar erken başlayacağından daha düşük döngü sayısında eşik değeri geçilmektedir ve c_t değeri o kadar düşmektedir. Real Time PCR yöntemiyle,

miktar tayini yapılmış standart örnekler aracılığı ile kantitasyon yapılabilmektedir (Kanturvardar Tütenyurd, 2013).



Şekil 3.3 Real Time PCR Yönteminin Fazları (Anonim, 2021b)

Real Time PCR yönteminde prob adı verilen floresan ile işaretli, çoğalan ürünün görüntülenmesini sağlayan, hedef DNA'ya bağlanan, oligonükleotid yapıdaki diziler kullanılmakta ve farklı tekniklerle çalışan prob çeşitleri bulunmaktadır (Kanturvardar Tütenyurd, 2013).

3.7.3.2. Real Time PCR' da Kullanılan Başlıca İzleme Sistemleri

Real Time PCR'ın duyarlılığı, reaksiyonun oluşması ve izlenmesi amacıyla yararlanılan kimyasal metodlara ve meydana gelen sinyalin gözlemlenmesi için kullanılan cihaza göre değişmektedir. Bu amaçla geliştirilmiş kimyasalların başlıcaları: Hibridizasyon problemleri (TaqMan problemleri, moleküler fenerler, FRET problemleri, scorpions v.b.), interkalatör boyalar (SYBR Green I, etidiyum bromid,).

SYBR Green I boyası: Higuchi ve arkadaşları (1992, 1993) çalışmalarında, etidiyum bromid yerine, toksik özelliği daha az, 10-25 kat daha duyarlı fazla

duyarlılığa sahip ve spesifikasyonu daha yüksek olan SYBR Green I boyasını ilk kez kullanarak real time PCR amplifikasyonunu gerçekleştirmişlerdir (Haugland, 2002).

SYBR Green I boyası, dsDNA'nın ikincil oluşuna bağlanır ancak ssDNA'ya bağlanamaz. Bu işlemin sonucunda floresan yayımı yaklaşık 800-1000 kat kadar artış gösterir. PCR başladığında DNA'nın sentezlenmesiyle miktarında meydana gelen artış, floresan sinyallerinin de artışına yol açmaktadır. SYBR Green I tabanlı yöntemlerin başlıca zorluğu, bu yapının istenmeyen DNA'yı da tanıma ihtimalidir (Weighardt v.d., 2006).

Floresan Rezonans Enerji Transferi (FRET) problemleri: FRET problemleri verici florofor ile alıcı florofor arasında enerji transferi esasına dayanmaktadır (Haugland, 2002).

FRET için temel esaslar:

- Alıcı ve verici moleküller birbirine yakın olmalıdır.
- Alıcı absorpsiyon spektrumunu ile vericinin yayılım spektrumunu ile uyumlu olmalıdır.
- Alıcı ve verici dipol geçişleri paralele yakın olmalıdır.

Degradasyon problemleri (TaqMan prensibi): TaqMan, PCR'da reaksiyon sırasında Taq polimeraz enziminin 5'-3' ekzonükleaz aktivitesini degradasyon probununun kesilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Degradasyon probu (TaqMan probu) çoğunlukla 20-30 uzunluğuna sahip bir oligonükleotitten meydana gelmektedir. Prob ortamda DNA bulunduğunda, PCR esnasında primerin sağ ve sol kısımlarının arasına bağlanmaktadır. PCR ürününün artması haberci boya floresanında artışa sebep olmaktadır (Querci v.d., 2006).

Moleküler Beacon (İkaz Işığı): Moleküler Beacon, stem-loop (ilmek) şeklinde yapıya sahip problemlerdir. Loop (halka) dizini probun spesifik hedefine, stem (gövde) dizini ise kendi içinde bütünleyicidir (Tyagi and Kramer, 1996).

Probun 3' ve 5' uçları florofor (haberci) ve quencher (söndürücü) boyalara kovalent bağlanmış halde bulunmaktadır. Stem-loop kapandığı zaman florofor ile

quencher birbirine yakınlaşmaktadır. Bu esnada floroforun yaydığı bütün fotonları quencher emmektedir. Komplementer dizinler olduğunda prob açılır ve hedefi melezleştirir. Florofor ile quencher birbirinden uzaklaşır ve prob floresan ışığı yaymaya başlar (Weighardt v.d., 2006).

Scorpions: “Scorpions” olarak adlandırılan prob ailesi bu alandaki diğer gelişmelerdendir. Bir Scorpion stem- loop yapısına sahip özel prob dizinlerinden meydana gelmektedirler (Thelwell v.d., 2000).

Tek bir moleküle bağlanması, homojen prob sistemlerine nazaran bazı üstünlükler getirmektedir. Scorpion ölçümlerinde; TaqMan, Moleküler Beacon ve FRET analizlerindeki gibi, primerlerden başka ayrı bir prob kullanımına gerek duyulmaz.

TaqMan MGB (Minors groove binder, ikincil oluk bağlayıcı) problemleri: MGB molekülü, çift zincirli DNA’nın minor oluğuna yerleşen, küçük bir hilal biçimindedir (Kutyavin v.d., 2000).

TaqMan problemlerinde MGB grubu quencher boya ile birlikte 3’ ucuna bağlı bulunmaktadır. Genel prensiplere dayalı tasarlanmasına rağmen, TaqMan MGB problemleri normal TaqMan problemlerine (çoğunlukla 18-40 mer) kıyasla çok daha kısa (çoğunlukla 13-20 mer) olduğu için ayrıştırıcı özelliğinin yanında, yüksek stabilizasyona sahiptir. TaqMan MGB problemleri başta multipleks çalışmalar olmak üzere kantitatif PCR çalışmalarında birçok avantaja sahiptir.

4. BÖLÜM

KALİTEYE AİT TEMEL KAVRAMLAR

4.1. Kalite Kavramı ve Kalite İlgili Temel Unsurlar

Kalitenin ayrıntılı bir tanımı yapmadan önce kalitenin ne olmadığı ifade edilecek olursa: Kalite pek çok kişinin sandığı gibi “mutlak anlamda en iyi” anlamına gelmez. Kaliteye ürünün sahip olduğu fonksiyona, yani hizmet ettiği amaca göre bir anlam yüklenebilir (Kobu,1998: 471).

Kalitenin çok farklı tanımları yapılabilir. Kalite için yapılan en geleneksel tanımlama “kullanıma uygunluk”olarak yapılmaktadır. Kullanıma uygunluk tanımı, tasarım kalitesi ve uygunluk kalitesinin birleşiminden oluşmaktadır. Çoğu zaman insanlar kalitenin tanımını yaparken bir ürünün fonksiyonlarının sahip olması beklenen, bir ya da birden fazla özellikler dikkate almaktadırlar. Bu tanım iyi bir çıkış noktası olarak görülse de daha net ve kapsamlı tanımlamalar mevcuttur. Kalite, pazara uyan makul bir fiyatta, güvenilir ve benzer olmanın önceden bilinebilme derecesidir. “Kalite değişkenlikle ters orantılıdır” tanımı ise daha moderndir ve daha yaygın kullanılmaktadır. Kalite, rekabet içinde bulunan ürün ve servisler konusunda müşteriler tarafından başlıca tercih kriteri olmuştur. Bu durum müşterinin kim olduğuna bağlı olarak daha da genişleyebilir. Bu nedenle kalitenin anlaşılması ve geliştirilmesi, işin başarılı olması, işin büyümesi ve rekabet gücü bakımından kritik bir rol oynar. Şirket politikasının bir parçası olarak uygulanan kalite iyileştirilmesi anlayışı yapılan yatırımlarda çok önemli ölçüde geri dönüşümleri meydana getirmektedir (Montgomery, 2001: 3).

Kalite kavramı insanlık tarihi kadar eskidir. Tarih bakıldığında kaliteye farklı açılardan önem verilmiştir. Önceleri müşteri odaklılık olmazsa olmazken, zaman içinde kitle üretiminin artması bunun gerçekleştirilmesini zorlaştırmıştır. Artan rekabet koşullarıyla birlikte “müşteri odaklı kalite” kavramı günümüzde tekrar önemli hale gelmiştir. Kalite problemlerinden model oluşturmak çok zor olduğu için, sezgisel

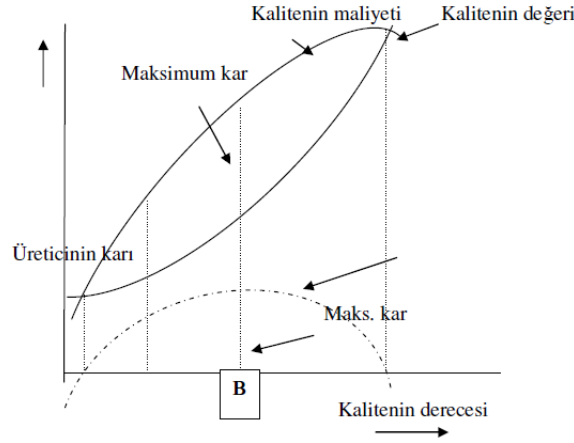
ya da analitik metodlarla bu problemlerin çözümü oldukça güçtür. Ancak, sezgisel metodlara başvurma konusunda bir eğilim bulunmaktadır. Kalite, çoğunlukla üreticiler için, süreç içinde ve süreç dışında olmak üzere iki açıdan kontrol edilmek istense de, zamanımızda daha çok tasarımla ilgili süreç dışındaki kalite kontrolüne önem verilmiştir. Genellikle kalite kavramı insanların algılarına göre karışıklık göstermektedir. Mesela iyi, güzel v.b. tanımlar göreceli olduğu halde bir mal veya hizmete ait kalite değerinin değişmemesi gerekmektedir. İnsanlar mal ya da hizmet talep ederken istedikleri kalitenin derecesini kestiremediklerinden “olabildiğince iyi (kaliteli) olsun “ anlayışı hakimdir (Kobu, 1998).

Kalite $Q=P/E$ oranı şeklinde ifade edilmektedir. Bu eşitlikte kalite, performans değerinin beklentilere bölümüdür. “Q” değerinin, 1 den fazla olması durumunda, müşterinin ilgili ürün veya servis hakkında olumlu bir düşünceye sahip olduğu anlamına gelmektedir. P ve E’nin değeri kişinin algısına bağlıdır (Besterfield, 1994).

Bu açıklamalar ışığında ürün kalitesi ile ilgili şu şekilde genel bir tanım yapılabilir: Bir ürünün kalitesi, tüketicinin ihtiyaçlarını imkan dahilindeki en düşük maliyetle karşılamayı hedefleyen üretim ve mühendislik özelliklerinin bir araya gelmesiyle ortaya çıkmaktadır. Bir ürünün kalitesi, tasarım kalitesi ve uygunluk kalitesi olarak, iki ögenin birleşiminden meydana gelmektedir.

4.1.1. Tasarım Kalitesi ve Uygunluk Kalitesi

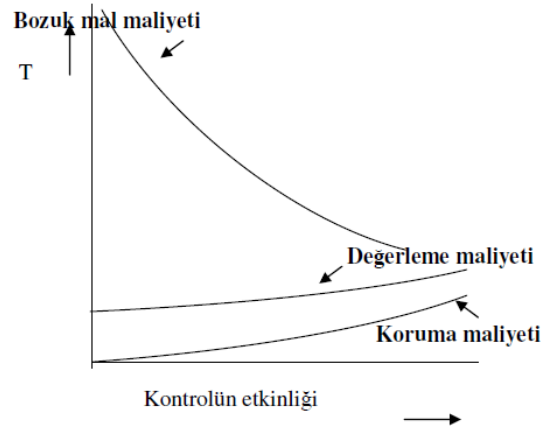
Tasarım kalitesi saptanırken kalitenin sahip olduğu değer ile kalitenin elde edilmesi için gereken maliyet arasındaki optimum noktanın bulunması amaçlanmaktadır. Şekil 4.1’de üretici açısından karın maksimum değerini aldığı B noktasının en uygun dizayn kalitesinin olduğu anlaşılmaktadır. İlk başta müşteri satın aldığı ürünün kalitesini önemser, ancak ihtiyacın üzerindeki belli bir kalite düzeyi tüketicinin ilgisi dışında kalır.



Şekil 4.1 Dizayn Kalitesi İçin En Uygun Kalite Derecesinin Saptanması

İmalatçı tüketicinin taleplerinin ayrıntılı olarak ürün ve proses özelliklerine yansıtmak mecburiyetindedir. Ürünü tasarlayanlar ürünün performansını ve maliyetini dengede tutması gerekmektedir. İmalat sırasında kullanılan makineler arızalanabilir, üretimde çalışanlar hata yapabilir, hammadde kaynaklı problemler ortaya çıkabilir, kontrol altındaki iş akışlarında bile ön görülemeyen problemler meydana gelebilir. İmalatçının tutumu bu durumda büyük önem arz etmektedir, aksaklıklara rağmen, son ürünün tasarlandığı şekilde fonksiyonlarını yürütmesi gerekir. Kalite ürün özelliklerini tanımlansa da üretimin yapabildiği kadardır (Evans ve Lindsay, 1989: 7).

Uygunluk kalitesi, tasarım kalitesi ile belirlenen spesifikasyonların üretimde gerçekleştirilme derecesidir. Uygunluk kalitesinin belli bir düzeyde gerçekleştirilebilmesi için Şekil 4.2’de görülen maliyetlerin dengelenmesi çalışılır. Grafikte görüldüğü gibi kontrolün etkinliği, başka bir deyişle kalite standartlarına uygunluk derecesi arttıkça, koruma ve değerlendirme maliyetinde yavaşça bir yükseliş gözlenmesine rağmen, hatalı ürün maliyetinde hızlıca bir düşüş meydana gelmektedir (Kobu, 1998: 472).



Şekil 4.2 Uygunluk Kalitesini Etkileyen Maliyet Unsurları

Bir ürünün kalitesi farklı şekillerde ele alınabilmektedir. Aşağıdaki maddelere kalitenin boyutları da denilebilmektedir.

1. Performans terimiyle anlatılmak istenen üründen beklenen işi ürünün yapabilirliği
2. Güvenilirlik (Reliability) terimiyle ürünün hangi periyotta arızalanacağı,
3. Dayanıklılık (Durability) terimiyle ürünün dayanma derecesi,
4. Servis imkanıyla ürünün tamiratının kolalık derecesi,
5. Özellikler terimiyle ürünün yapması ve sahip olması gerekenleri,
6. Algılanan kalite terimiyle ürünün ya da markanın prestiji,
7. Standartlara uygunluk terimiyle ürünün tasarımcının istediği şekilde yapılma derecesi ifadeedilmek istenmektedir (Montgomery, 2001: 3).

4.2. Kalitenin Kimlik Değişimi

Kalitenin kimlik değişimi sırasıyla muayene, istatistiksel kalite kontrol, toplam kalite kontrol ve son olarak toplam kalite yönetimi olarak dört evre halinde ele alınabilmektedir:

4.2.1. Muayene

Endüstri devriminin öncesinde, atölye tipi üretim yapılan dönemlerde kalite o ürünün üretimini yapan işçinin sorumluluğundaydı. Endüstri devrimi esnasında, ilk kez takım tezgâhlarının kullanılması sonucunda imalat ve malın yapısı kompleks bir hal almıştır. Üretimde çalışan kişi sayısının artması ve dolayısıyla şirketlerin genişlemesi üretilen ürününün kalitesinden o ürünü üreten işçiyi sorumlu tutmuştur. Bu durum I. Dünya Savaşı sırasında hatalı ürün maliyetinin hayati boyuta ulaşması nedeniyle sona ermiştir. Bombaların patlamaması, araçların çok fazla arızalanması savaşın sonucunda belirleyici olmuştur. Bu nedenle son üründe muayene işleminin başlanması ile üretimden sonra kusurlu mallar ayıklanmaya başlanmıştır.

Muayene, ham madde veya işlenmiş ürünün tamamında uygulanan bir kontrol işlemidir. Bu işlem, öznel yapılabildiği gibi, sayısal değerlerle de gerçekleştirilebilir. Buradaki dikkat edilmesi gereken nokta, malların tamamının kontrolden geçirilmesidir. Bu yüzden muayenenin yapılması genelde mümkün değildir ve yüksek maliyet gerektirir. Bu alanda muayene görevini üstlenen kişi sadece işlerin yapılışının kontrolü ve hataların tespit edilmesi ile yükümlüdür. Buradaki hedef bozuk malların müşteriye gitmesini önlemektir. Bu sistem müşteriye koruma altına almış fakat üretici açısından problemler ortaya çıkarmıştır. Bu problemlerin başlıcası muayene ile ayrılan bozuk malların üreticiye ayrı bir maliyet getirmesidir. Bu yüzden imalatı yapanı da koruma altına alan bir yöntem arayışına gidilmiş olup istatistiksel kalite kontrol sistemi uygulanmaya başlanmıştır (Doğan, 1991: 13).

4.2.2. İstatistiksel Kalite Kontrol

İstatistiksel tekniklerin kalite yönetiminde sistemli bir şekilde ilk kez kullanılışı, 1920’li yıllarda olmuştur. Britanya’da bulunan İngiliz Okulu İstatistikçileri istatistiksel kalite kontrol metodlarının alt yapısı olan istatistiğin temellerini atmışlardır. Sonrasında ise İstatistiksel Kalite Kontrol (SQC) ile ilgili kavram ve düşünceler istatistikçiler tarafından değiştirilmiştir. İstatistiksel kalite kontrol, örneklemeyi esas alan, belli periyotlarda yapılan ölçümler yoluyla kalitenin sürekli

takip edilmesine dayalı bir tekniktir. Ürünün tamamının kontrolünün olanaksız veya maliyetinin çok yüksek olduğu durumlarda, çok uzun zamanda küçük miktardaki örneklerin ölçülmesiyle, kalitenin değerlendirilmesi, kalitedeki bozulmaların belirlenerek araştırılması ve tedbirlerin uygulanması amacıyla raporlanması şekline gerçekleştirilmektedir (Yücel, 2007: 5).

İstatistiksel kalite kontrol metodlarla elde edilen sonuçların genellikle alınacak kararlarda yeterlilik göstermemesi, “toplam kalite kontrolü” sisteminin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. 1960’lı yıllarda doğan bu sistemde, ürünün tasarlanmasından hammaddenin gelmesi, üretim sırasındaki işlemler ve son ürüne kadar her aşamada ayrı ayrı kalite kontrolü yapılmalıdır (Yücel, 2007: 5).

4.2.3. Toplam Kalite Kontrol

Armand V. Feigenaum, “toplam kalite kontrol” ifadesini; kalitenin geliştirilmesi, korunması ve iyileştirilmesi için yapılan çalışmalara şirketin bütün departmanlarının dahil edilmesi ve tüketici memnuniyetini de benimseyerek mal ya da hizmetin ekonomik açıdan en uygun şekilde üretilmesi için gerçekleştirilen işlemlerin bütünü olarak ifade etmektedir. Şüphesiz, toplam kalite kontrolünü kabul edip uygulayan bir üst yönetimin liderliğinde, şirkete ait bütün birimlerin kalitenin iyileştirilmesi amacıyla yaptıkları bütün işler “toplam kalite yönetimi” şeklinde tanımlanabilir (Işığışok, 2005: 11).

Toplam kalite kontrol, tüm basamaklardaki çalışanların hepsini ele alarak performansın artırılması için; bütün bir şekilde, devamlı ve düzenli olarak iyileştirme çalışmalarıdır. Japon endüstri standartları ise toplam kalite kontrolü, müşterilerin gereksinimlerine karşılık veren kaliteli mal ya da hizmeti uygun maliyetle imal eden bir üretim yöntemleri sistemi şeklinde ifade etmektedir. Ayrıca istatistiksel yöntemleri kullanan modern kalite kontrolünün, “istatistiksel kalite kontrol” şeklinde tanımlamasını yapmaktadır (Yücel, 2007: 3).

Toplam Kalite Kontrolü sistemi her basamaktaki yönetiye klavuzluk eden, kararlarını daha doğru ve faydalı bir şekilde vermelerini sağlayan bir araçtır. Bu yöntemin amaca ulaşacak şekilde geliştirilmesi ve verimli bir şekilde uygulamaya konulabilmesi için, müşteri taleplerinin tespit edilmesi ve değerlendirmeye alınması, ihtiyaç duyulan donanımların sağlanması, işletme içinde çalışanlar arasındaki pozitif iletişimin sağlanması ve kaliteyi ilgilendiren terimlerin çalışanların tamamı tarafından doğru ve tam bir şekilde kavranması bir gerekliliktir (Kobu,1987:15-16).

Hem yönetim hem teknik açısından toplam kalite kontrolünün büyük etkilerinin olmasından dolayı 1980’den beri “kalite kontrol örgütünde toplam kalite kontrolü”, “yeni iş stratejisi olarak kalite” ve “toplam kalite yönetimi” gibi anlayışlar ortaya çıkmaya çıkmıştır.

4.2.4. Toplam Kalite Yönetimi

Toplam Kalite Yönetimi (TKY), tüketici taleplerini herşeyden daha önemli gören ve müşterinin tanımladığı kalite kavramını, bütün çalışmalar esnasında mal ve hizmet içeriğinde meydana getiren bir yönetimdir. Piyasanın sert rekabet koşulları altında, şirketlerin varlığını sürdürebilmesi için bu sistemin özümzenmesi gerekmektedir. En yalın ifade ile TKY (Madu ve PracticeKuen, 1995: 321);

Toplam = Şirketteki bütün çalışanların dahil olması,

Kalite = Tüketici ihtiyaçlarının tam olarak giderilmesi,

Yönetim = Kaliteli mal veya hizmet elde etmek için bütün şartların temin edilmesi.

TKY’nin başlıca gerekliliklerden biri de çalışanlarla karşılıklı ve düzgün iletişimin sağlanmasıdır. Firmanın açık görüşlülüğe sahip olması ve bütün çalışanlar tarafından hedeflerden haberdar olması istenen amaca ulaşabilmek için çok önemlidir. Doğru bir iletişimin sağlanabilmesi için yalın organizasyon uygulanmalı, hiyerarşi kaldırılmalı ve açık kapı uygulamaları kullanılmalıdır (Argun, 1997: 10).

TKY'nin en önemli özelliği, kalitenin eskiden olduğu gibi yalnızca tek bir birime değil işletmenin bütün birimlerine ait olarak ele alınmasıdır. Burada, en üstten en aşağıya kadar işletmenin bütün çalışanlarını, tedarikçi ve tüketiciyi de kapsayan bir sistem olması kastedilmektedir. TKY'de kalite, kontrol yoluyla değil, üretim sırasında sağlanmaktadır. Kusurların kontrolle elenmesinden ziyade “ilk defasında hatasız üret” anlayışı ile “kusurlara oluşmadan engel olunması” anlayışı temel alınmaktadır. TKY'nin başlıca ilkesi tüketici isteklerinin karşılanmasıdır. TKY'nin hedefi, tüketicinin isteklerini daha iyi karşılayacak şekilde mal ve hizmet kalitesini iyileştirmektir (Rand, 1997: 11).

4.3. Kalite Maliyetleri

Meydana gelen kusurları tamir edtmek ya da yeniden hatasız ürün üretmek çok fazla süre ve maliyet gerektirmektedir. Zamanımız şartlarında ise, şirketlerin zaman ve para kaybına toleransları yoktur. Kalitenin maliyetleri; önleme maliyetleri, başarısızlık maliyetleri, ölçme ve değerlendirme maliyetlerinin toplamından meydana gelmektedir. Başarısızlık maliyeti de içsel ve dışsal başarısızlık maliyetinden oluşmaktadır (Ataş, 2001: 89).

Tablo 4.1'de kalite maliyetini oluşturan bileşenler 4 grupta toplanarak belirtilmiştir.

Tablo 4.1 Kalite Maliyet Bileşenleri (Kolarik, 1995: 40)

1. Önleme Maliyetleri	2. Ölçme ve Değerlendirme Maliyetleri
1.1. Pazarlama, müşteri kullanıcı algılaması 1.2. Ürün, servis, tasarım geliştirme Kalite iyileştirme faaliyetlerinin planlanması, tedarikçi ürünlerinin değerlendirilmesi, malzeme ürün değerlendirme testlerinin tasarımı, servis değerlendirme testlerinin tasarımı 1.3. Satın alma Tedarikçilerin gözden geçirilmesi 1.4. İmalat sürecinin onaylanması, 1.5. Kalite yönetimi Yönetici ücretleri, kalite iyileştirme Çalışmaları	2.1. Satın alma Gelen malzemelerin muayene ve testleri, kaynaklarının muayene ve kontrol programları 2.2. Operasyonlar (imalat veya hizmet) Operasyon muayene, test ve değerlendirmeleri, muayene ve testlerin ayarlanması, özel testler, süreç kontrol ölçümleri, Ölçme ve test ekipmanlarının tasarımı ve ölçüm ekipmanlarının alımı, bakım ve geliştirilmesi, operatör kalite eğitimleri kalibrasyonu
3. İçsel Başarısızlık Maliyetleri	4. Dışsal Başarısızlık Maliyeti
3.1. Ürün veya hizmet tasarımındaki Başarısızlıklar Tasarım düzeltme çalışmaları, tasarım değişiklikleri dolayısıyla oluşan yeniden işlemler ve fireler 3.2. Satın alma başarısızlıkları Satın alınmış malzemenin reddedilmesi veya değiştirilmesi, tedarikçi düzeltme faaliyetleri 3.3. Operasyon Başarısızlıkları Yeniden işleme ve hurdalar, yeniden muayene ve test işlemleri	4.1. Şikayetlerin incelenmesi ve müşteri/kullanıcı servisi 4.2. İade mallar 4.3. Garanti Yükümlülükleri 4.4. Sorumluluklar 4.5. Cezalar 4.6. Satış kayıpları

Konu ile ilgili araştırma yapıldığında, üretimde hatayı engellemek amacıyla harcanan paranın, kusurlu malları onarmak amacıyla harcanan paradan çok daha fazla olduğu anlaşılmıştır. Üretim yapılırken kalite ön planda tutulması sayesinde kusurlu ürün üretiminden kaynaklanan tamir, hurdaya çıkarma, tüketici memnuniyetsizliği gibi maliyeti yükselten durumlar minimuma indirilmiş olur (Kolarik, 1995: 39).

Kalite maliyetlerinin tespit edilip incelenmesiyle aşağıda sıralanan faydalar elde edilebilir (Burnak, 1997: 64).

1. Kaliteye yönelik programların ve kontrol çalışmalarının etkinliğine ilişkin değerlendirmeler yapılması sağlanır.
2. Uygulanan program ve projelerde gerekli düzenlemeler yönlendirilir.
3. Ürünlerin gerçek maliyetlerinin belirlenmesi ve buna bağlı olarak fiyatlandırılması sağlanır.
4. Sorunların varlığı ve çözüm önceliklerinin belirlenmesi sağlanır.
5. Dış alımların daha sağlıklı yapılmasına katkıda bulunur.
6. Kaliteye yönelik çalışmaların işletme içinde düzenli bir biçimde dağılması sağlanır.
7. Muhasebe açısından, bütçelemenin daha duyarlı yapılmasına yardımcı olur.
8. Yöneticiler ile diğer personel arasında iyi ve anlaşılabilir bir iletişim kurulur.
9. Öngörülen proje ve yatırımlara yönelik veriler oluşturulur.

Kalite ancak işletme ve çalışanlarına yapılan yatırımla iyileştirilebilir. Bu tür yatırımların geri dönüş süresinin hesaplanması çok zor olduğundan firma sahipleri geçmişte, bu yatırımlar gereksiz olarak görülmekteydi. Ancak, kalitesiz üretimden kaynaklanan zarar hesap edildiğinde çok yüksek olduğu anlaşıncı, işletme sahipleri kalite kavramını önemsemeye başladılar. Yapılan bütün bu çalışmalar ışığında üretim sırasında meydana gelen hatalar kontrol altına alınarak nedenleri araştırılıp aynı zamanda da hataların tekrarlanmasını önlemek açısından gerekli düzeltmeler yapılmaktadır. Bu sayılan çalışmaların tümü üretim süreci üzerinde denemelerin yapılmasını gerektirmektedir. Yapılan deneylerin sonuçlarının uygulanabilir olması açısından gerçek üretim hattını iyi temsil etmesi, aynı zamanda da işletmeye getireceği

maliyetin çok yüksek olmaması istenmektedir. Sayılan amaçları gerçekleştirmede kullanılan yöntem “Deney Tasarımı”dır (Aytekin, 2010).

4.4. Kalite Geliştirme Teknikleri

Kalitenin geliştirilmesi değişime dayanmaktadır. İki tür değişim tanımlanmıştır: Kademeli ve ani değişim. Kademeli değişimler, küçük iyileştirmelerden herkesi kapsayan sürekli değişimlere kadar sonuçlar doğurmaktadır. Ani değişimler ise yenilik ve buluşlarla oluşmaktadır (Moen v.d.,1991: 1).

Teknoloji geliştirme mühendislerinin çoğu, çeşitli piyasa gereksinimlerini sağlamak ve yeni sistemlerin amaç fonksiyonlarını ayarlamak için geleneksel güvenilirlik mühendislik yöntemlerini kullanır. Bu yöntemler, hata oranlarını azaltmada marjinal bir etkiye sahiptir. Kaliteyi temelli olarak iyileştirmek için mühendislerin yeni ürün veya süreç teknolojilerinin temel fonksiyonlarının robustluğunu iyileştirmeye odaklanmalı ve gerçek koşullarda ideal fonksiyonlara yaklaşan temel fonksiyonları yapmak için parametre tasarım yöntemlerini kullanmaları gerekmektedir. Bu robust tasarım faaliyetleri, gerçek ürünler tasarlanmadan önce araştırma ve geliştirme departmanları tarafından gerçekleştirilmelidir. Amaç yeni teknolojilerin üretilebilirlik yönünü geliştirmektir (Taguchi, 1997: 534).

Kalite geliştirme teknikleri aşağıdaki şekilde sıralanmıştır.

Eski Araçlar:

1. Akış Diyagramı
2. Histogram
3. Sebep - Sonuç Diyagramı
4. Dağılım Diyagramı
5. Pareto Analizi

6. Kontrol Kartı
7. Beyin Fırtınası

Yeni Araçlar:

1. İlişki Diyagramı
2. Sistematik Diyagram
3. Etkileşim Diyagramı
4. Matris Veri Analizi
5. Matris Diyagramı
6. Ok Diyagramı
7. Poke Yoke
8. Süreç Karar Program Seması
9. Kıyaslama
10. Hata Modu Ve Analizi
11. Deney Tasarımı
12. Kalite Fonksiyon Göçerimi – QFD Tekniği.

5. BÖLÜM

DENEY TASARIMI YAKLAŞIMI

5.1. Deney Tasarımının Tanımı

Araştırmacılar “deney” terimini, bir sistem ya da prosese ait bir parçası ya da özelliği araştırmak için gerçekleştirilen faaliyetler olarak tanımlamaktadır. İstatistik bilimine göre deney denince, yeni bilgiler edinmek, önceki çalışmalardan elde edilmiş çıkarımları onaylamak ya da doğruluğunu reddetmek amacıyla tasarlanmış bir işlem akla gelmektedir. Yapılan deneylerin amacı bazen bir bazen de birden fazla soruya cevap aramak olabilmektedir. Kesin ve karşılaştırmalı olarak ya da tek ve çok faktörlü olarak deneyler farklı şekillerde gerçekleştirilebilmektedir (Çömlekçi, 2003: 21).

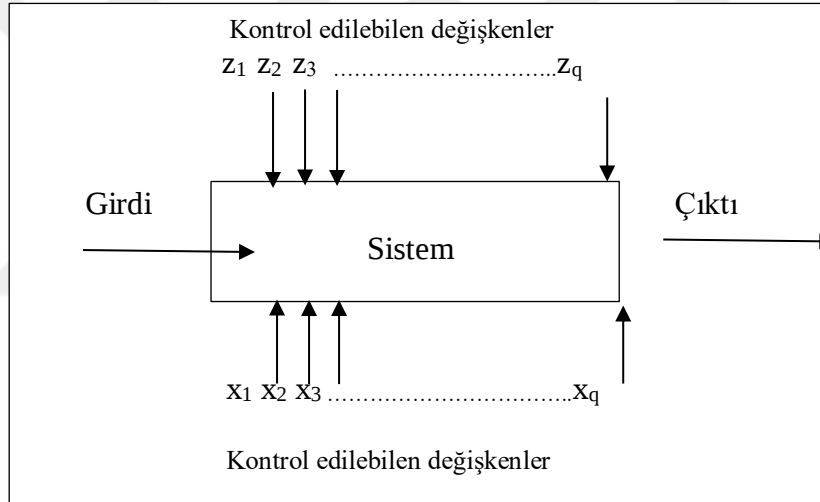
Kesin ve karşılaştırmalı deneyler, bir tez ya da etkiyi elde etmek amacıyla uygulanabileceği gibi, ayrıca daha önceden elde edilen bir tezi doğrulamak ya da reddetmek amacıyla da yapılabilir. Tek ve çok faktörlü deneyler ise, bir ya da daha fazla faktörün bir durum ya da prosese sahip olduğu etkiyi tespit etmek amacıyla yalnızca o ana özgü planlanan koşullar altında gerçekleştirilen deneylerdir. Bu türdeki deneyler, deney tasarımlarında uygulanan deneylerdir. Tasarlanmış deney; bir sistem veya prosese etki eden faktörlerin belli bir amaçla planlı bir şekilde değiştirilerek elde edilen çıktıda meydana gelen değişikliklerin kaynağının tespit edilmesi için yapılan denemeler anlamına gelmektedir (Çömlekçi, 2003: 21 - 25).

Deney tasarımı için yapılan değişik tanımlamalar bulunmaktadır. Deney tasarımı; bağımlı değişkendeki farklılığın sebebi olduğu düşünülen bağımsız değişkenin bağımlı değişken üzerindeki etkilerinin incelenmesi için kendisinden faydalanılan bir araçtır. Deney Tasarımı, bir prosese etki eden faktörlerin özellikle değiştirilerek elde edilecek çıktı değişkeni üzerinde meydana gelen farklılığın elde edilmesi, araştırılması, incelenmesi ve yorumlanması şeklinde ifade edilebilir.

Deney tasarımı yaklaşımı söz konusu faktörlerin farklı seviyelerinin çıktı değeri üzerinde oluşturdıkları değişimleri ve bu değişimlerin altında yatan nedenleri

araştırarak optimize ederek, müşteri memnuniyetini ve sistemin güvenilirliğini arttırmayı amaçlar. Bunun için yapılan araştırma ve geliştirme çalışmalarında da belirli bir sistematik sağlar (Aytekin, 2010).

DOE (Design of Experiment), prosesin en iyilenmesinde, proses değişkenlerinin belirlenmesinde ve proseste kararlılığın sağlanmasında kullanılan faydalı bir tekniktir. Bir proses ya da sistemi genel hatlarıyla Şekil 5.1’de gösterilmektedir. $X_1, X_2, \dots, X_p$ kontrol edilebilen değişkenler ve $Z_1, Z_2, \dots, Z_q$ ise kontrol edilemeyen değişkenlerdir (Lunani vd., 1997: 332).



Şekil 5.1 Bir Sistem veya Sürecin Genel Gösterimi (Lunani vd., 1997).

Kalite mühendisliğinde DOE’nin sağladığı en önemli yararların başında prosesin değişkenliğini azaltarak kalitenin iyileştirilmesidir. Kalite mühendisliğinin temeli, prosesi etkileyen faktörlerin tespit edilip prosesin kararlı hale getirilmesidir. Deney tasarımı kullanılan teknikler, farklı bir proses oluşturmak ve etkinliği arttırmak için mevcut prosesi iyileştirmek amacıyla yapılan çalışmalarda büyük bir öneme sahiptir (Logothesis, 1992: 231).

Deney tasarımı kullanılan yöntemler; yalnızca istatistik tabanlı bir uygulama değildir. Deney tasarımı yöntemi her alanda araştırma geliştirme

alışmalarında kullanılabilmekte, kaliteyi arttırmakta, maliyetleri dūřürmekte, elde edilen sonuçların güvenirliliğini yükseltmekte ve aynı zamanda tüm diğerk teknikleri desteklemekte ve tamamlamaktadır (Keleş, 1996: 56; Park ve Vining, 2000: 67).

Uygulamada sağladığı avantajlar;

- Performans ve kalitenin arttırılması,
- Maliyetlerin azaltılması,
- Ar-ge çalışmalarının daha hızlı gerçekleştirilmesi,
- Ürünün ve/veya prosesin kalitesini oluşturan parametrelerin daha robust olması (duyarlılığının düşük olması)

olarak ifade edilebilir.

Deney tasarımı ile değişik koşullar altında elde edilen sonuçlar aşağıdakilere ulaşabilmek amacı ile değerlendirilir (Kağnıcıoğlu, 1998: 24):

- Ürün performansı üzerine en fazla etkisi olan faktörlerin belirlenmesi,
- Ürün performansının istenilen hedef değere yakın olmasını sağlamak için etkili faktörlerin değerlerinin belirlenmesi,
- Ürün performansındaki varyasyonu en küçükleyen etkili faktör değerlerinin belirlenmesi,
- Kontrol edilemeyen faktörlerin etkisini en küçükleyen etkili faktör değerlerinin belirlenmesi.

DOE'nin amacı, robust (sağlam, güçlü, karalı ve kolay etkilenmeyen) bir proses oluşturabilmektedir. Burada asıl amaç Değişkenliğe sebep olan, kontrol altına alınamayan etkenlerden en az etkilenen prosesi oluşturabilmektir (Montgomery, 2004: 125).

Deney tasarımı tekniklerinin ürün ve süreç geliştirme sürecinin en başında uygulanmasının sağladığı faydalar aşağıda sıralanmaktadır (Montgomery, 2004: 127):

- Süreç çıktılarının iyileşmesi
- Hedeflenen değerdeki farklılıkların azalması
- Geliştirme için gereken sürenin kısalması
- Ar-ge için gereken toplam maliyette düşüş gözlenmesi

Deney tasarımı prosesle ilgili kalite karakteristiklerini etkileyen önemli faktörlerin belirlenmesi konusunda yol göstermektedir. Planlanmış bir deney, girdi faktörlerinin sistematik olarak değiştirilerek çıktı üzerindeki etkisinin tespit edilmesi işlemidir.

Deney tasarımı, çeşitli çıktı üzerinde faktör etkilerinin belirlenmesinde kullanılan klasik bir tekniktir. Bu yöntemde, her bir yeni denemede mevcut faktörlerden birinin değeri azaltılır veya arttırılır ve diğer faktörler sabit tutulur. Bu durumda herhangi bir karakteristik için yapılacak deneyin deneme sayısı, faktörler iki seviyeli ise $2n$, seviye sayısı üç seviyeli ise $3n$ olur (burada n faktör sayısını gösterir). Yani her bir faktör için tüm seviyelere ait ayrı ayrı denemenin yapılması gerekmektedir. Bunun sonucunda faktör sayısının artmasıyla deney sayısında da geometrik bir artış olacaktır. Deney sayısındaki bu artış çok fazla maliyet gerektirdiğinden ve çok fazla vakit aldığından kalite iyileştirmede kullanmak için çok uygun değildir. Fakat bu dezavantajları gideren ve deney tasarımına dayanarak geliştirilen istatistiksel yöntemler mevcuttur (Aydın, 1994: 104).

5.2. Deney Tasarımın Tarihçesi

Francis Bacon (1581–1626), ancak doğru planlanmış deneyler yoluyla değişkenlerin etkilerinin açıklanabileceğini savunmuştur. “Experimentum Crucis” isimli kaynakta, “bir deneyde yalnızca A faktöründe değişiklik yapıldığında ve öteki bütün faktör ve koşullar sabit kaldığı durumda, gözlenen değerdeki farklılıkların sebebi A faktörüdür” açıklamasında bulunmuştur.

Daha sonra uygulanan her seferinde tek faktör (one factor at a time - OFAT) tekniği, 20. yüzyıla kadar hiç değiştirilmeden aynı şekilde kullanılmıştır. Fakat bu

konudaki düşünceler İngiliz istatistikçi Sir Ronald Alymer Fischer (1890–1962) tarafından değiştirilmiştir. 1925’te “Statistical Methods for Research Workers” adlı kitabı yayınlanmış ve bunu 10 yıl sonra yazdığı temel eser olan “The Design of Experiments” takip etmiştir (Tozkoparan, 2010) .

Fisher deney tasarımı, tarım alanlarında araştırmalar yaparken keşfetmiş ve geliştirmiştir. Buna ek olarak Fisher, deney verilerinin analizi için çok yaygın olarak kullanılan ve klasik bir metod sayılan “Varyans Analizi” yöntemini kazandırmıştır. Yöntemin kullanımı, Amerika’da tarımsal alanda üretimi geliştirmek amacıyla kısa sürede yaygınlaşmış ve Amerika’nın tarım alanında dünyada lider konumuna gelmesinde büyük rol oynamıştır. Sonrasında ilaç ve kimya endüstrisinde de uygulanmıştır ancak üretim alanında, 1970’li yıllara kadar çok az kullanılmıştır (Durmaz, 2008).

Fisher, “one factor at a time” yönteminin araştırmalar için faydalı ve uygun bir yöntem olmadığı sonucunu çalışmaları ile kesin olarak ortaya koymuştur. Bunun nedeni biyoloji, tıp ve teknoloji alanındaki problemlerin çözümünde bu yöntemin faktörlerin karşılıklı etkileşimlerini tam anlamıyla açıklayamamasıdır. Buna karşın çok faktörlü deney tasarımları, faktörlerin birbirlerinden bağımsız etkileşimlerinin varlığında, çok daha güvenilir sonuçlar elde edilmektedir (Fisher, 1935).

Fisher, tam faktöriyel tasarım ve kısmi faktöriyel tasarım metodlarını ilk kez uygulayan kişidir. Fisher’in eserlerinde faktöriyel varyans analizi, tam veya kısmi faktöriyel deney planları ve ortogonal polinomlar gibi metodlar yer almaktadır (Ülker, 2015).

1937’ de Fisher, L.H.C. Tippet ile birlikte kısmi faktöriyel deney planlarını tasarlayarak uygulamıştır. Daha sonraları Cochran ve Cox, Davies, A. Linder, yakın zamanda da Box, Hunter, Hicks, Scheffler ve G. Taguchi bu çalışmaları ileriletmiş ve eserlerini yayınlarak modern deney tasarımı tekniklerine büyük katkı sağlamışlardır (Tozkoparan, 2010).

Deney tasarımı 1980'lerin başında, Amerika'nın imalat sektöründeki Japon kalitesinin nedenlerini araştırması sonucu yeniden keşfedilmiştir. O zamanlarda deney tasarımı, Japonya'da kullanılmıştır. Bu uygulamalarda Genichi Taguchi öncülük etmiş olup ve etkili sonuçlar elde edilmiştir. Taguchi'nin üretimdeki uygulamaları sayesinde bu tekniğin üretim alanında kullanımı artmıştır (Şirvancı, 1997).

Taguchi deney tasarımlarında genellikle kısmi faktöriyel deney planlarını başlangıç olarak göz önüne almış ve ortogonal dizilerin tanımını yaparak yeni ve işletmelerde çalışanların kolayca uygulayabilecekleri bir yöntem geliştirmiştir.

Günümüzde deney tasarımı, mevcut süreçlerin performansını geliştirmek için kullanılan bir yöntemdir. Yeni süreçlerin yapılandırılmasında da yaygın bir kullanımı bulunmaktadır (Montgomery, 2008; Myers v.d., 2012).

5.3. Deney Tasarımının Temel Prensipleri

İstatistiksel deney tasarımı denildiğinde; deneylerden elde edilen sonuçların geçerli ve objektif olabilmesi için, istatistiksel metodlar kullanılarak bilgilerin uygun olarak işlenebildiği bir deney planlanması anlaşılır. Deneysel tasarımın başlıca üç prensibi vardır: tekrarlama (replication), rassallaştırma (randomization) ve bloklama (blocking).

5.3.1. Tekrarlama

Tekrarlama, bir deneyde bir faktör ve seviyenin ikilisinin bir kereden fazla gerçekleştirilmesidir. Tekrarlamanın amacı deneyde değişkenliğin belirlenebilmesidir (Çömlekçi, 2003: 23). Ayrıca hassasiyetin ölçülemeyeceği deneyler tekrar edilerek hassasiyet değeri elde edilmiş olur. Ayrıca tekrarlanan deneylerin sayesinde ölçümde yapılabilecek hatalar tespit edilebilir ve kontrol edilemeyen faktörlerin etkilerinin dengelenmesi ile ilgili sapmayı düşürmek için kullanılabilir (Natrella, 1974: 27-30).

5.3.2. Rassallaştırma

Rassallaştırma, modern deney tasarımının en önemli özelliklerinden biridir ve R.A. Fisher tarafından ortaya atılmış bir terimdir (Hasgöl, 2010: 14). Rassallaştırma rastgele bir şekilde denemelerin sıralanması ve gerçekleştirilmesi ile gerçekleştirilmektedir. İstatistiksel tekniklerde gözlem veya hata değişkenler bağımsız ve rassal olarak kabul edilir. Bu ön kabul rassallaştırma yapılarak geçerli hale getirilmektedir. Burada amaç rassallaştırma sayesinde, sırasıyla yapılacak deneylerden kaynaklanacak yanlılık ile sistematikliği önlemektir (Erbaş ve Olmuş, 2006: 8).

5.3.3. Bloklama

Bloklama, yapılan deneyin hassasiyetini arttırmak ve elde edilecek sonuçların geçerliliğini arttırmak için denemelerin parçalara bölünmesi işlemi olarak tanımlanmaktadır. Deneyin ayrıldığı her bir bölüme blok denmektedir. Burada hedef, deneyin hata düzeyinin minimize edilmesidir (Sert, 2009).

Bloklama, bazı açılardan benzerlik gösteren deneyleri bir arada toplayarak, faktörler ile bu faktörlere ait seviyelerin etkilerini tespit etmek amacıyla uygulanmaktadır. Bu sayede kontrol altına alınamayan faktörlerin etkisi azaltılmış olur. Sistemik değişkenlik tespit edilemediğinde, deneyin gruplara bölünerek gerçekleştirilmesi sonuçların doğruluğunu arttırmaktadır (Morris, 2011: 6).

Blokların homojenliğinin sağlanması dikkat edilmesi gereken diğer bir konudur. Bu amaçla bloklar birbirine yakın deney birimlerinden oluşturulmalıdır. Bloklar oluşturulurken, farklı hammadde veya farklı operatörle ya da farklı zamanlarda gerçekleştirilen deneyler aynı grupta yer alabilir. Grupların aralarındaki farklılıkların deneysel hatadan ayrılması deneyin doğru olarak yapılması bakımından önem taşımaktadır (Antony, 2003: 10).

5.4. Deney Tasarımı Aşamaları

Deneyssel tasarım yöntemini kullanırken öncelikle deneylere dahil olan herkesin çalışmanın esasının ne olduğu hakkında bilgiye sahip olması, bilgilerin nasıl toplanacağını bilmesi, en azından kalitatif olarak bu bilgilerin nasıl analiz edileceği konusunda fikir sahibi olması bir gerekliliktir.

1. Problemin tanımlanması: Oldukça açık görünmesine karşın, uygulamada problem çözmek için yapılması gereken deneylerin belirlenmesi, görüldüğü kadar kolay değildir. Problemlerin bir liste haline getirilmesi ve hangi deneylerin çözüme yardımcı olabileceğinin belirlenmesine yararlı olabilmektedir.

2. Faktörlerin, seviyelerin ve sınırlarının belirlenmesi: Faktör denildiğinde prosesin ya da sistemin performansına etki eden değişkenler anlaşılmaktadır. Bu değişkenler çok sayıda olabilir, bunlardan bazıları deneylerin konusu dışında kaldığı için dikkate alınmaz. Bazıları deneye etkide bulunduğu halde inceleme dışında tutuldukları için sabit tutulur. Ayrıca kontrol edilemez etkenler de mevcuttur. Deneyi planlayan kişi etkenleri seçtikten sonra bu etkenlerin hangi aralıkta değişeceğini ve hangi seviyelerde olacağını belirlemek zorundadır. Bunu yapabilmek için proses hakkında teorik ve pratik açıdan bilgiye sahip olmak gerekir.

3. Cevap değişkeninin belirlenmesi: Tasarımcı bu değişkeni belirlerken sistem ya da proses hakkında aydınlatıcı bilgiye ulaşabileceğinden emin olmalıdır. Cevap değişkeninin yinelenebilir ve tam ölçülebilir olması önemlidir.

4. Deneyssel tasarımın seçilmesi: Hangi tasarımın seçileceği konusunda kaç faktör olduğu, bunların seviye ve sınırları etkilidir. Tekrar sayısı, uygun deneme sayısı ve rastgeleleştirme ile bloklamanın varlığı ya da yokluğu tasarımın seçimini belirlemektedir.

5. Deneylerin gerçekleştirilmesi: Denemelerin hazırlanan plana uygun yapılması büyük bir önem taşır. Deney aşamasında yapılacak hatalar sonuçların geçerliliğini bozar. Planın açıkça ortaya konması başarı için gereklidir.

6. Bilgilerin istatistiksel değerlendirilmesi: İstatistiksel yöntemler elde edilen bilgilerin analizinin yapılmasını ve sonuçların tarafsız olarak değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Hipotez testi ve güven aralığı sonuçların değerlendirilmesi ve analiz edilmesinde önemli bir katkı sağlamaktadır. Verilerden elde edilen eşitlik, cevap değişkeni ve faktörler arasındaki ilişkiyi değerlendirmekte kullanılır. Artık analizi ve modelin uygunluk testi de önemli analiz tekniklerindendir.

7. Sonuçlar ve tartışma: Deneyi yapan kişi elde ettiği verilerden elde ettiği sonuçları yorumlayabilmelidir. Yorum aşamasında genellikle çizilen grafiklerden de yararlanır. Gerekli durumlarda sonuçların geçerliliğini sağlamak için bazı denemeler tekrarlanabilir (Montgomery, 1996).

5.5. Deney Tasarımı Türleri

Deney tasarımları yapılacak deneyin çeşidine, kaç tane faktör inceleneceğine faktörlerin kaç seviyede ele alınacağına göre farklılıklar göstermektedir. Deney tasarımları genel hatlarıyla aşağıdaki başlıklardaki gibi türlere ayrılmaktadır.

5.5.1. Bölünmüş Parseller Tasarımı

Bu tasarım ilk kez tarımda kullanıldığı için, parsel tasarımı denmektedir. Aynı anda iki ayrı faktör incelendiğinde faktörlerin biri ana parsele, diğeri ise alt parsellere rastgele yerleştirilir (Şenoğlu ve Acıtaş, 2010: 207).

Boru imalatında şekillendiricinin sıcaklığı ile kullanılan malzemelerin oranının borunun mukavemetine etkileri incelenmek istendiğinde, malzemeler üç farklı oranlarda karıştırılmaktadır. Daha sonra bu karışım oranları ana parsel olarak ele

alınmaktadır. Sıcaklık faktörünün ise dört farklı seviyesi yani alt parseller her bir karışım oranına atanır.

Bu yöntemde çoğunlukla, öneminin fazla olduğu tahmin edilen bir faktöre it farklı seviyeler, alt parsellere uygulanmaktadır. Ayrıca ikinci faktörün seviye sayısı yani alt parsel sayısı, ilk faktörün seviye sayısından yani ana parsel sayısından daha çok olduğu için, ikinci faktörün etkisi, ilk faktörünkine göre daha ayrıntılı olarak incelenmektedir.

Bu tasarım türünde rassallaştırma, iki aşamada yapılmaktadır.

1. İlk faktörün seviyeleri, ikinci faktörün seviyelerine rastgele yerleştirilmektedir.

2. İkinci faktörünün seviyeleri her bir ana parseldeki alt parsellere rassal olarak yerleştirilmektedir (Şenoğlu ve Acıtaş, 2010: 208).

5.5.2. Rassal Blokları Tasarımı

Bu tasarıma, ilk defa tarım alanında, çeşitli gübrelerin, farklı mahsüller üzerindeki etkilerini gözlemek amacıyla başvurulmuştur. Bu yöntem deneyde kullanılan girdiler homojen olduğunda kullanılabilir (Tamhane, 2009: 169).

Tasarlanacak proses ya da sistem, eşit büyüklükte bloklara ayrılır ve mümkün olduğu kadar homojen bölünürler. Ancak bu bloklar kendi aralarında heterojen olacak şekilde ayrılmalıdır. Bloklama sayesinde deneysel hatanın azaltılarak deneyin hassasiyeti arttırılmaktadır.

Bu teknik blok tasarımlarından en fazla kullanılanıdır. Bazı durumlarda ekonomik, fiziksel ya da beşeri sebeplerden dolayı deneylerin bloklara ayrılması bir gereklilik olabilmektedir (Şenoğlu ve Acıtaş, 2010: 63).

Örneğin, herhangi bir ürünün üç çeşit makinede üretilabiliyor olsun. Makine çeşidinin ürün kalitesi üzerinde sahip olduğu etkiyi araştırmak için bir deney tasarımı yapalım. Bu ürünü üç ayrı hammadde ile üretmemiz gerektiğini varsayalım. Böyle bir durumda her üç hammaddenin kullanıldığı deneyler için her bir hammaddenin ayrı bir blokta toplanması gerekmektedir. Bu şekilde Tablo 5.1 'de gösterilen tasarım oluşmaktadır.

Tablo 5.1 Rassal Blokları Deney Tasarımı Örneği

1.Makine	2. Makine	3.Makine	I. Blok
2.Makine	3. Makine	1.Makine	II. Blok
3.Makine	1.Makine	2.Makine	III. Blok

5.5.3. Latin Karesi Deney Tasarımı

Latin karesi tasarımında da bloklama işlemi esas alınmaktadır. Bu tasarımdaki farklılık, deneyler arasındaki heterojenliğin bir tek değişkenle önlenemediği durumda iki tane bloklama değişkeninin kullanılmasıdır. Latin karesi tasarımında, satır sayısı, sütun sayısı ve deneme sayıları birbirine eşittir (Lee, 1935: 211). Deneylerin her biri, satır ve sütunlarda sadece birer defa yer almaktadır.

Deney sayısı : a

Satır sayısı : r

Sütun sayısı : c

Bu tasarımda $r = c = a$ olduğundan r^2 'dir.

Tasarımın boyutlarını ifade etmek için r x r Latin Karesi deyimi kullanılmaktadır. (Şenoğlu ve Acıtaş, 2010: 97).

Tablo 5.2 Latin Karesi Tasarımı Örnekleri (Montgomery, 2005: 136).

4 X 4	5 X 5	6 X 6
A B C D	A D B E C	A D C E B F
B D A C	D A C B E	B A E C F D
C A D B	C B E D A	C E D F A B
D C B A	B E A C D	D C F B E A
	E C D A B	F B A D C E
		E F B A D C

Bir fabrikada, çeşitli müziklerin işçiler üzerindeki etkilerini incelemek için bir tasarım örneği verelim. Müzik çeşitleri A, B, C, D, müziğin olmaması ise E olsun. 5 x 5 latin karesi tasarımında, haftanın 5 ayrı gününde 5 hafta süresince farklı müzik türünün etkisi üzerinde çalışılacak olursa, deney tasarımı Tablo 5.3'te gösterilmektedir (Cochran ve Cox, 1957: 119).

Tablo 5.3 5 X 5 Latin Karesi Tasarımı Örneği (Cochran ve Cox, 1957: 119).

Haftalar	Pazartesi	Salı	Çarşamba	Perşembe	Cuma
1	A	B	C	D	E
2	B	C	D	E	A
3	C	A	E	B	D
4	D	E	A	C	B
5	E	D	B	A	C

5.5.4. Tam Faktöriyel Deney Tasarımı

Faktöriyel deney tasarımları, seviye ve faktör sayılarının birden fazla olduğu ve deney çıktısı üzerindeki etkilerinin incelendiği tasarım çeşididir. Tam faktöriyel tasarım, faktör ve seviyelerden oluşabilecek bütün kombinasyonlarını içeren deneylerin tamamından meydana gelmektedir. (Morris, 2011: 143).

Fisher ve Yates, bu tekniği önermiştir ve her defasında bir faktörün seviyesini değiştirip diğer faktörleri sabit tutarak her faktörün etkisini teker teker, ayrı ayrı inceleyen klasik usul yöntemlere kıyasla çok daha az maliyetlidir. Bu yöntemin en büyük avantajı, birden çok sayıdaki faktörün ana etkilerini ve faktörler arasındaki etkileşim etkilerini aynı anda incelenebilmesidir. Bu tarz uygulamalar özellikle mühendislik alanlarında çok fazla başvurulmaktadır (Şenoğlu ve Acıtaş, 2010: 147).

Bu yöntemde deneme sayısı hesabına örnek verecek olursak; 4 faktörlü ve 3 seviyeden oluşan bir tasarımda gerçekleştirilmesi gereken deney sayısı bütün faktörlerin seviyelerini çarparak hesaplanır. Buna göre yapılması gereken deney sayısı $3^4 = 81$ 'dir.

Tablo 5.4 Tam Faktöriyel Deney Tasarımı Örneği (Antony, 2003: 55).

Proses Parametreleri	Etiket	Düşük Seviye	Yüksek Seviye
Kaplama Süresi	A	4 Saniye	12 Saniye
Kaplama solüsyon Sıcaklığı	B	16 °C	32 °C

Tablo 5.4'te gösterilen 2 faktör ve 2 seviyeli tasarımda yapılacak deney sayısı $2^2 = 4$ 'tür.

5.5.5. Kesirli Faktöriyel Deney Tasarımı

Kesirli faktöriyel deney tasarımının kullanım amacı, tam faktöriyel tasarımı gerçekleştirmek için gereken süre ve parayı azaltmaktır. Bu da yapılacak deney sayısının azaltılması ile sağlanmaktadır. Bu tür yöntemlerde Bu tür tasarımlarda ortogonal dizinlerden faydalanılmaktadır. Deney sayısı azaltılırken faktörlerin kendi başına etkilerinden daha ziyade faktörlerin kendi aralarındaki etkileşimlerde bir azaltmaya gitmek daha faydalı bir seçimdir (Antony, 2003).

Kısmi faktöriyel deney tasarımlarının en olumsuz tarafı bütün faktör ve seviye kombinasyonlarının denenmemesi sebebiyle bazı faktörler arasındaki etkileşimlerin

etkilerinin tam anlamıyla araştırılamamasıdır. Mesela her bir faktörün 2 seviyeli olduğu bir tasarımda kesirli faktöriyel tasarım yöntemi uygulanacak olursa yapılması gereken deney sayısı 2^k değil, 2^{k-p} olmaktadır. 2^{4-1} kesirli faktöriyel tasarımı örneği Tablo 5.5’ te verilmiştir (Şanyılmaz 2006; Bayrakdar, 2009).

Tablo 5.5 Kesirli Faktöriyel Tasarımı Örneği

Deney No	A	B	C	D
1	-	-	-	-
2	+	-	-	+
3	-	+	-	+
4	+	+	-	-
5	-	-	+	+
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	+

Bu yöntemde yapılması gereken deney sayısının düşürülmesi için başvurulabilecek başka bir yol ise faktörlerin seviyelerini “alt değer” ve “üst değer” şeklinde belirleyerek seviye sayısını azaltmaktır. Faktörlerin seviye sayısı arttırıldığında yapılması gereken deney sayısı da daha fazla olacaktır (Karslıoğlu, 2013).

5.6. Yanıt Yüzey Metodu (Response surface methodology = RSM)

Yanıt Yüzey Metodu, proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonunda kullanılan matematiksel ve istatistiksel teknikler bütünüdür. Yaygın olarak kullanıldığı alan, birçok değişkenin bir proses ya da ürünün performansını veya kalitesini etkilediği durumlardır. Bu performans ölçümleri veya kalite özelliğine “yanıt” adı verilir. Bağımsız değişkenler olarak ifade edilen giriş değişkenleri, deney esnasında araştırmacının kontrolü altında bulunmaktadır.

Yanıt Yüzey Metodu, prosesi ve bağımsız değişkenleri inceleyen bir deneysel stratejiden, çıktı ve değişkenler arasındaki ilişkiyi uygun olarak ifade eden empirik istatistiksel bir modellemekten ve istenen değerlerde yanıt oluşturan değişkenlerin seviye veya değerlerini bulmak için kullanılan optimizasyon metotlarından meydana gelmektedir.

Örneğin bir araştırmacı kimyasal bir proseste verimi maksimum yapan sıcaklık (x_1) ve basıncı (x_2) bulmak istesin. Prosesin verimi sıcaklık ve basıncın bir fonksiyonudur ve aşağıdaki eşitlik ile gösterilmektedir.

$$Y = f(x_1, x_2) + \varepsilon$$

ε , yanıt için gözlenen hatayı ifade etmektedir. Tahmini yanıt $E(y) = f(x_1, x_2) = \eta$ ile gösterilecek olursa, $\eta = f(x_1, x_2)$ olur. Bu eşitlikte η , yanıt yüzeyi adını alır. Yanıt yüzeyi genellikle η ile x_1 ve x_2 'nin seviyeleri arasında çizilen grafikler ile gösterilmektedir.

Çoğu RSM probleminde yanıt ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişki bilinmemektedir. İlk aşamada, y ile bağımsız değişkenler arasındaki fonksiyonel ilişkiyi bulmak için düşük dereceli bir polinomal eşitlik kullanılır. Eğer yanıt bağımsız değişkenler tarafından lineer bir fonksiyon ile modellenmiş ise yaklaşımcı fonksiyon birinci derecedendir.

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 \dots \dots + \beta_k x_k + \varepsilon$$

Eğer sistemde bir eğri söz konusu ise, ikinci-dereceden polinomal bir fonksiyon kullanılır.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

En küçük kareler yöntemi, polinomlarda yer alan parametrelerin değerini bulmak için kullanılır. Yanıt yüzey analizi uydurulmuş (fit edilmiş) yüzey kullanılarak gerçekleştirilir. Uydurulmuş (fit edilmiş) yüzey, gerçek yanıt fonksiyonuna yeteri kadar yaklaştırılmış ise uydurulmuş yüzeyin analizi gerçek sistemin analizine eşdeğer olacaktır. Parametrelerin daha etkin bir şekilde tahmin edilebilmesi için veri toplamada uygun deney tasarımlarının kullanılması gerekir. Yanıt yüzeylerini uyumlu hale getirmek için kullanılan tasarımlara “Yanıt Yüzey Tasarımları” adı verilir. Merkezi kompozit tasarım ve Box Behnken tasarımı, ikinci dereceden modelleri uyumlu hale getirmek için en yaygın kullanılan yanıt yüzey tasarımlarıdır (İnan, 2009).

5.6.1. Merkezi Kompozit Tasarımlar

Merkezi kompozit tasarımlar (CCD) (Central Composite Designs) ikinci dereceden tasarımlarda en sık kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir. Bu yöntemi 1951’de ilk kez Box ve Wilson literatüre kazandırmıştır. Tasarım, iki-seviyeli deneyler için tanımlanmış birden fazla faktörlü deneyler tam (full) veya kesirli (fractional) deneyler şeklinde oluşturulabilir. Kesirli deneylerde Çözüm-V (Resolution-V) oluşmaktadır. Şekil 5.2’de gösterildiği gibi deneyin oluşturulacağı noktalar $2k$ sayıda ekseninde, 2^k sayıda köp noktasında ve n_c sayıda merkez noktasında meydana gelmektedir (Myers ve Montgomery 2002).

X_1	X_2		X_k	
-1	-1	...	-1	} 2^k çok etkenli deneye ait nokta (küp noktaları)
-1	-1	...	1	
-1	1	...	-1	
-1	1	...	1	
1	-1	...	-1	
1	-1	...	1	
1	1	...	-1	
1	1	...	1	
$-\alpha$	0	...	0	} $2k$ eksen (yıldız) noktası
α	0	...	0	
0	$-\alpha$	...	0	
0	α	...	0	
.	.			
.	.			
.	.			
0	0	...	$-\alpha$	
0	0	...	α	
0	0	...	0	} n_c merkez noktası
0	0	...	0	
0	0	...	0	

Şekil 5.2 Şekil Merkezi Kompozit Tasarımın Deney Noktaları

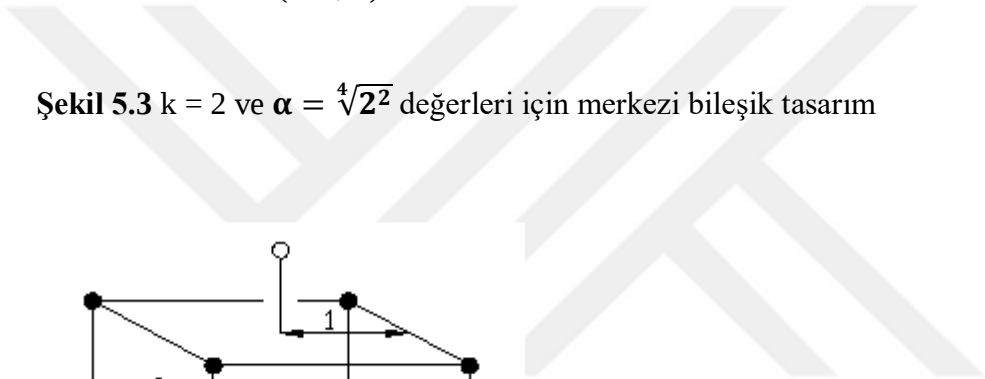
Bu tasarımın en büyük kolaylığı en baştan bir tasarım oluşturmaksızın 2^k faktöriyel tasarıma sadece merkez ve eksen noktaları ilave edilerek deney tasarımının oluşturulabilmesidir. Merkezi kompozit tasarımlarında elde edilen model eşitliğinde birinci ve ikinci derece terimler ile ikili faktörler arası etkileşimi ifade eden terimler bulunabilmektedir. Merkez noktaya ait denemeler tasarımın eğimini oluşturulmak amacıyla gerekli verileri edinmeye yaramaktadır. Eğer tasarımda bir eğim mevcut ise, ikinci dereceden terimlerin daha etkin bir şekilde tahminine olanak tanımaktadır (Myers ve Montgomery 2002).

Tasarımın içerdiği 3 ayrı deneme noktası (2^k , $2k$, n_c) kendine has ve önemli rollere sahiptir. Deney kesirli tekrar olarak gerçekleştiğinde sonuçların Çözüm-V (Resolution-V) olarak verilmesi iki faktör etkileşiminin ve doğrusal terimlerin tahmini

için bilgileri diğer bilgilerden arındırılmış olarak temin eder. Faktöriyel noktalar etkileşimli terimlerin tahmine katkısını sağlayan noktalardır. Eksen noktaları ikinci dereceden terimlerin tahmini için gerekli bilgileri belirlemektedir. Eksen noktaları olmasaydı sadece $\sum_{i=1}^k \beta_{ii}$ ikinci dereceden terimlerin toplamı tahmin edilebilirdi. Eksen noktalarının etkileşimli terimlerin tahminine hiçbir etkisi bulunmamaktadır. Merkezi denemelere hatanın doğru bir şekilde ifade edilebilmesi için ihtiyaç duyulmaktadır ve ikinci dereceden terimlerin tahmini için gerekli bilgileri temin etmektedir (Myers ve Montgomery 2002).

Merkezi kompozit tasarımların esnekliği merkez noktalardaki deneme sayısına (n_c) ile α değerine yani eksen uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Bu yüzden n_c ve α değerleri doğru belirlenmesi, düzgün bir tasarım oluşturulması konusunda büyük bir rol oynamaktadır. α değeri, çözümün araştırıldığı bölge (region of interest (R)) ve çözümde kullanılan bölgenin (region of operability /O) büyüklüğüne bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

Şekil 5.3 ve 5.4, $k = 2$ ve $k = 3$ değerlerinin kullanıldığı merkezi kompozit tasarımlar yer almaktadır. Burada $k = 2$ olduğunda, eksen uzunluğu $\alpha = \sqrt[4]{2^2}$ ve $k = 3$ olduğunda ise, eksen uzunluğu $\alpha = \sqrt[4]{2^3}$ olur. $k = 2$ olduğunda bir daire yüzeyinde sekiz noktada deney tasarımı oluşturulmuştur ve orjin noktasında merkezi denemeler bulunmaktadır. $k = 3$ olduğunda ise tasarım modeli 14 nokta ve merkezi denemelerden oluşmaktadır.



The diagram shows a unit cell with atoms at the corners and midpoints of the edges. A shaded sphere is located at the center of the cell. The angle α is defined as the angle between the line connecting the center of the shaded sphere to a corner atom and the line connecting the center of the shaded sphere to the midpoint of the edge connecting that corner atom to another corner atom.



Döndürülebilirlik ve ortogonal bloklama özelliğine de sahip olan merkezi kompozit tasarım yöntemi ikinci dereceden modelde bulunan kuadratik terimleri de

tahmin edebilmektedir. Ortogonal olarak bloklanan tasarımlar modeldeki terimlerin ve blok etkilerinin ayrı bir şekilde tahmin edilebilmesini ve regresyon katsayılarındaki değişikliğin en aza indirilmesini sağlar. Tasarımlardaki döndürülebilirlik, bütün noktaların merkez noktaya eşit mesafede olma özellikleri sayesinde tahmin çeşitliliğini gidermekte, bu durum da daha güvenilir tahmin yapılmasını sağlar. Merkezi bileşik tasarımlarda, dönersellik α değerinin seçimi ile gerçekleşmektedir.

Döndürülebilirliği sağlayan α değeri deney sayısına bağlı olarak değişmektedir.

$$\alpha = [\text{Deney Sayısı}]^{1/4}$$

Tam faktöriyel ise :

$$\alpha = [2^k]^{1/4}$$

Burada k, kullanılacak faktör sayısını ifade etmektedir (Myers ve Montgomery, 2002).

Tablo 5.6’da dönersel merkezi kompozit tasarımlarda açıklayıcı değişkenlerinin farklı sayıları için α değerleri gösterilmektedir (Myers 1971).

Tablo 5.6 Bir Dönersel Merkezi Kompozit Tasarımı için Değerleri

k	F	N	α
2	4	8+n _c	1.414
3	8	14+n _c	1.682
4	16	24+n _c	2.000
5	32	42+n _c	2.378
5($\frac{1}{2}$ rep)	16	26+n _c	2.000
6	64	76+n _c	2.828
6($\frac{1}{2}$ rep)	32	44+n _c	2.378
7	128	142+n _c	3.364
7($\frac{1}{2}$ rep)	64	78+n _c	2.828

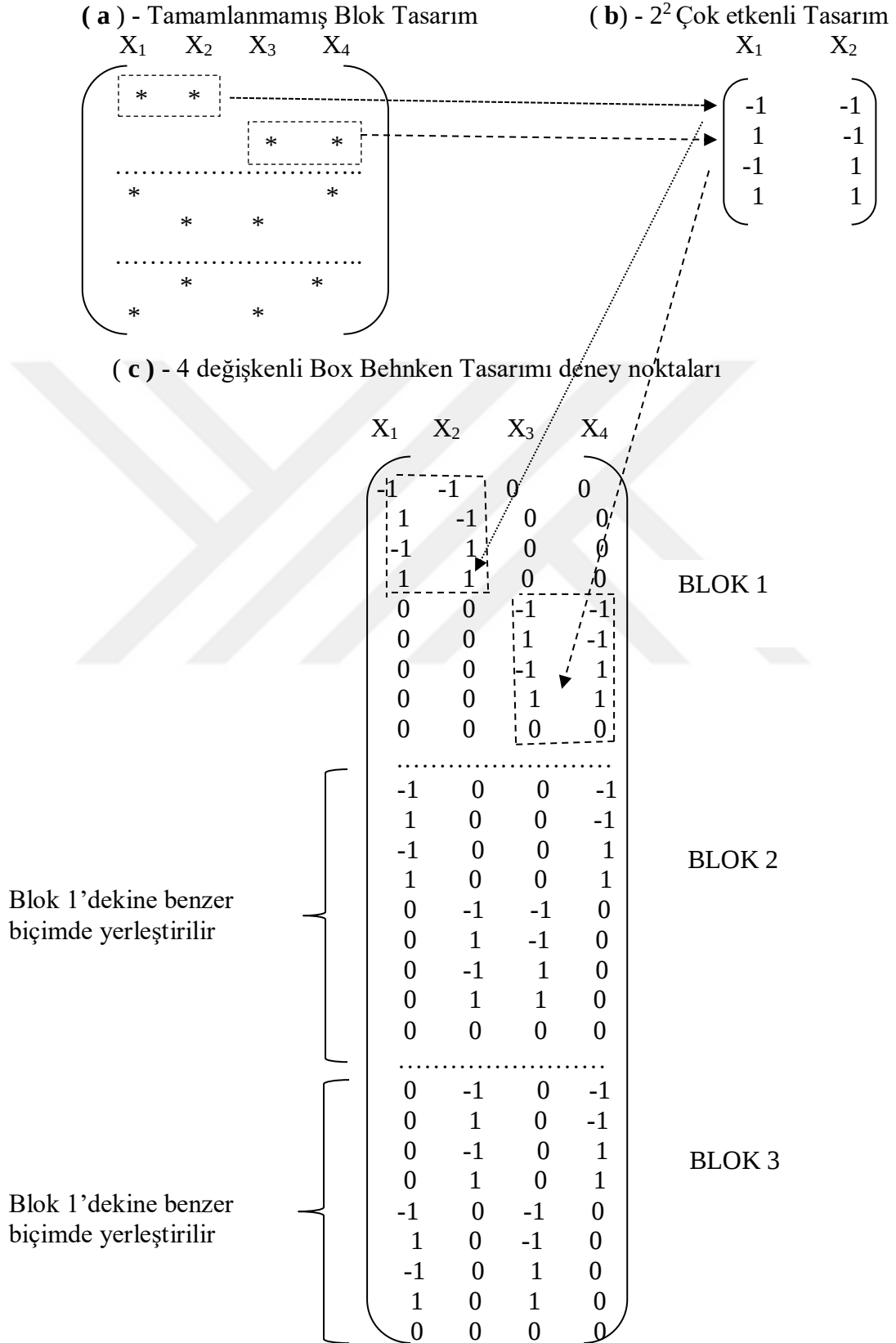
Burada dönerselliğin gayesi dengeli bir tasarım oluşturmaktır. Ancak tasarım alanında her zaman bu sabitlik sağlanamamaktadır. İkinci dereceden dönersel

özellikteki tasarımların kararlılığı için merkezde fazla sayıda denemenin uygulanması gerekmektedir. Küresel veya küresele yakın tasarımlarda merkezi noktalarda 3 veya 5 tane deneme sağlam bir denge oluşturmak için yeterlidir (Myers ve Montgomery 2002).

5.6.2. Box-Behnken Tasarımları

İkinci derece model parametrelerinin tahminlenmesinde kullanılan üç seviyeli çok etkenli ve dönersel tasarımların bir çeşidi olan Box-Behnken tasarımları 1960 yılında Box ve Behnken tarafından geliştirilmiştir. Box-Behnken tasarımlarında her bir faktör üç seviyeye sahiptir. Box-Behnken tasarımları merkezi kompozit tasarımlara nazaran daha ekonomik bir tasarım türüdür (Köksoy 2001). Box-Behnken tasarımlarının avantajlarından bir tanesi küresel bir tasarım olması ve sadece üç düzeyde verilere sahip olmasıdır. Box-Behnken tasarımları, tamamlanmamış bir blok tasarımının (incomplete block design) uygun bir şekilde iki düzeyli çok etkenli bir tasarımla birleştirilmesi sonucunda ortaya çıkarlar (Şehirlioğlu 1997). Bu durumu anlatabilmek için 4 değişkenli tasarım Tablo 5.7’de gösterilen (a), (b), ve (c) şekillerinde verilmiştir.

Tablo 5.7 Bir Box Behnken Tasarımı



Tablo 5.7’ de (a) şeklinde verilen matrisin her bir satırı, tamamlanmamış blok tasarımın bloklarını göstermektedir. Her bir blokta mevcut 4 denemenin ikisi gerçekleşecektir ve bu bloklarda gerçekleşecek denemeler “*” ile gösterilip (c) de 2^2 tasarım olarak verilen matrisin sütunlarına konulmuştur. Bu sütunlarda geriye kalan kısımlar 0 ile belirtilmiştir. En son, oluşturulan tasarıma her bir bloğa (0,0,0,0) şeklindeki merkez noktalarından birer tane olmak üzere toplam 3 tane deneme daha eklenir. Tasarım matrisindeki her bir etken 3 düzeyli olup, düzeyler -1, 0 ve 1 şeklinde belirtilmiştir (Box ve Draper 1987). Bu tasarım, dik bloklama (orthogonally blocked) özelliğini taşımaktadır, yani ikinci derecede model parametre tahminleri blok etkisinden etkilenmezler (Köksoy 2001).

Box-Behnken tasarımları için deneme noktasının sayısı $N = 2k(k - 1) + n_c$ denklemiyle belirlenmektedir. Bu denklemde k faktör sayısını n_c merkezi deneme sayısını belirtmektedir (Baş, 2010). Tasarımda tüm faktörler için alt ve üst sınırlar aynı anda hiçbir zaman kapsamadığı için, uç değerlerin yaratacağı tatmin edici olmayan sonuçlar da engellenmiş olur. Özetle Box-Behnken tasarımları, ikinci dereceden modellerin tahminine, ardışık (sequential) tasarımların kurulumuna, modelin güven eksikliğinin analizine ve bloklara olanak sağlama özelliğinden dolayı tercih edilen bir yanıt yüzeyi tasarımıdır.

Box Behnken ve merkezi kompozit tasarımların genel olarak kullanıldığı alanlar ve bunlarla ilgili çalışmalara genel olarak bakılacak olursa; Biyoteknoloji, kimya, kimya mühendisliği, çevre, gıda teknolojileri, imalat ve eczacılık alanlarında her iki tasarım da kullanılmıştır (Tania ve Deborah 2002).

5.7. Çoklu Yanıt Optimizasyonu ve İstenebilirlik (Desirability) Fonksiyonu

İstenebilirlik (Desirability) fonksiyonunun temeli, tüm yanıtların istenebilirlik değişkenlerini içeren “istenebilirlik fonksiyonu” olarak tanımlanan tek bir ortak fonksiyon altında toplanmasını ve bu fonksiyonun istenen sonuçları verecek şekilde maksimizasyonuna dayanmaktadır. Bu yöntemin avantajları farklı değerlere sahip yanıtların birarada incelenebilmesi, yanıtların tek bir fonksiyona kolayca

çevrilebilmesi ve sayısal veya sayısal değere sahip olmayan yanıtların kullanılabilmesidir. İstenebilirlik fonksiyonu, tüm yanıtların birene hesaba katıldığı, 0 ile 1 arasında değişen tek bir yanıt katsayısıdır ve bu değerin 1'e yaklaşması araştırmacı tarafından istenen kriterlerin sağlandığını göstermektedir (Koç, 2009).

Yanıt maksimize edilmek istendiğinde;

$$d = \begin{cases} 0, & y < L \\ \left(\frac{y-L}{T-L}\right)^r, & L \leq y \leq T \\ 1, & y > T \end{cases}$$

Yanıt minimize edilmek istendiğinde;

$$d = \begin{cases} 1, & y < T \\ \left(\frac{U-y}{U-T}\right)^r, & T \leq y \leq U \\ 0, & y > U \end{cases}$$

eşitlikleriyle hesaplanmaktadır. Yanıt maksimize ya da minimize edilmek istendiği durumda istenebilirlik fonksiyonu tek yönlü olarak tanımlanır.

Eğer yanıtın belli bir aralıkta olması istendiğinde;

$$d = \begin{cases} 0, & y < L \\ \left(\frac{U-y}{U-T}\right)^{r_1}, & L \leq y \leq T \\ \left(\frac{U-y}{U-T}\right)^{r_2}, & T \leq y \leq U \\ 0, & y > U \end{cases}$$

eşitliğiyle hesaplanır. Yanıtın belli bir aralıkta olması istendiği durumda fonksiyon tek yönlü olarak tanımlanır.

Eşitlikte kullanılan L ; deneylerden elde edilen en küçük değeri, T ; hedef değeri, U ise deneylerden elde edilen en yüksek değeri, r ; ağırlık katsayısını ifade etmektedir.

İstenebilirlik (desirability) fonksiyonu her bir yanıt için ayrı ayrı oluşturulur ve daha sonrasında yanıtların geometrik ortalamasından ortak bir fonksiyon elde edilerek çoklu yanıt için tek bir amaç fonksiyonu oluşturulur. Ortak amaç fonksiyonuna ait D değeri aşağıdaki eşitlikle hesaplanmaktadır.

$$D = (d_1.d_2.....d_m)^{1/m}$$

Bu ortak fonksiyona ait D değerini maksimize eden bağımsız değişken değerleri, her iki yanıt değişkenini istenen hedefe ulaştıran optimum faktör değerlerini vermektedir (Montgomery, 2004).

6. BÖLÜM

UYGULAMA

Bu bölümde çalışmanın deneyin uygulanması esnasında kullanılan malzeme, kimyasal ve cihazlar, deneylerin tasarımı için belirlenen faktör ve seviyeler belirlenmesi, deneyin uygulanmadan önce yapılan DNA izolasyonu, DNA konsantrasyon ve saflık tespiti gibi hazırlık aşamaları, merkezi kompozit tasarım ile tasarlanan deneylerin yapım aşamaları, elde edilen modelin çıktıları, modelin yine merkezi kompozit tasarım ile optimizasyonu, elde edilen sonuçlar ve grafikler almaktadır.

6.1. Metodoloji

Bu çalışmada GDO analizinde kullanılan real time PCR parametrelerinden belirlemiş olduğumuz 4 tanesinin (DNA konsantrasyonu, primer konsantrasyonu, prob konsantrasyonu (F+R) ve mater mix konsantrasyonu) farklı seviyelerinin PCR çıktısı ve ürününe (C_t değeri ve PCR ürün konsantrasyonu) olan etkileri Merkezi Kompozit Tasarım (Cental Composite Design-CCD) yöntemi ile araştırılmıştır. Oluşturulan modelin optimizasyonu yapılarak incelenen faktörlerin optimum seviyeleri belirlenerek yanıt değişkenleri merkezi kompozit tasarım yöntemi ile eniyilenmiştir.

6.1.1. Kullanılan Kimyasal ve Malzemeler

DNA İzolasyonu için Kullanılan Kimyasal ve Malzemeler:

- Eurofins GeneSpin Kit Seti
- Santrifüj tüpleri (1,5-2,0 ml hacimlik tek kullanımlık)
- Proteinase K
- RNase
- İsoopropanol
- DNA Temizleme Kolonu
- N-hekzan
- Tek kullanımlık otomatik pipet uçları

GDO Tarama ve Tip ve Belirleme Analizleri için Kullanılan Kimyasal ve Malzemeler:

- DNA: Yemlik mısırdan izole edilmiştir. DAS 40278-9 GDO gen bölgesi üzerinde çalışılmıştır. Bu gen pormotor veya terminatörlerle tespit edilememekte olup kendine özgü primer ile belirlenebilmektedir.
- Primer: Forward ve revers primerlerin toplam konsantrasyonu şeklinde ele alınmıştır. Mycosynth marka primer kullanılmıştır

- Prob: Mycrosynth marka SYBR Green I kullanılmıştır.

Deneyde kullanılan Hedef Gene ait Primer ve Probların Dizinleri aşağıdaki T’de gösterilmektedir.

Tablo 6. 1 Deneydeki DAS 40278 Hedef Genine ait Primer ve Probların Dizinleri

DAS40278 Geni Hedef Dizisi	
DAS-40278-9_5’-f1	5’ – CAC GAA CCA TTG AGT TAC AAT C– 3’
DAS-40278-9_5’-r3	5’ – TGG TTC ATT GTA TTC TGG CTT TG– 3’
DAS-40278-9_5’-S2	5’ 6FAM- CGT AGC TAA CCT TCA TTG TAT TCC G – TAMRA 3’
DAS40278 hmg Referans Geni Dizisi	
MaiJ-F	5’ – TTg GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA– 3’
mhmj-R	5’ – GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T– 3’
mhmj-P	5’ 6FAM- CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA - TAMRA 3’

- Master mix: Daha önceki bölümlerde bahsi geçen PCR’ı önemli derecede etkileyen faktörlerin de bulunduğu bir karışımdır. PCR’da kullanılan master mixler piyasada farklı içerikler ve markalarda bulunabilmektedir. Bu çalışmada FluoCycle II™ Master mix kullanılmıştır.

FluoCycle II™ Master mixin içeriği: 100 mM KCl, 20mM tris HCl, 0,8 mM her bir dNTP (A, T, G, C), 20 birim/ml Taq DNA polimeraz enzimi, 8mM MgCl₂ ve stabilizatörler şeklindedir.

- Distile Su: Oluşan son karışım hacmini 25 µl’ ye tamamlamak için kullanılmıştır.

6.1.2. Kullanılan Cihaz ve Aletler

DNA İzolasyonu için Kullanılan Cihaz ve Aletler:

- Öğütücü, Öğütücü Kapları
- Biyogüvenlik Kabinleri Class II
- Otomatik Pipetler
- Santrifüjler
- Vorteksler
- Termal çalkalayıcı
- Nanodrop spektrofotometre

GDO Tarama ve Tip ve Belirleme Analizleri için Kullanılan Cihaz ve Aletler:

- Tek kullanımlık otomatik pipet uçları
- Santrifüj tüpleri (1,5-2,0 ml hacimlik tek kullanımlık)
- Biyogüvenlik Kabinleri Class II
- Otomatik Pipetler
- Santrifüjler
- Vorteksler
- Plate Santrifüj
- Real Time PCR

6.1.3. DNA İzolasyonu

Yemlik mısır numunesinde yapılan DNA izolasyonu işlemi Eurofins GeneSpin Protokolü ile yapılmıştır.

Eurofins GeneSpin Kit Protokolü

- İzolasyon işlemine başlamadan önce kutu içerisinde bulunan Genespin Wash Buffer 2 solüsyonunun üzerine 48 ml absolute etanol ve ProteinazK'nın üzerine de 600 µl proteinaz buffer solüsyonu eklenir. Solüsyonlar hazır/sa/hazırlandıktan sonra ekstraksiyona başlanılır.
- En az 500 g olarak laboratuvara gelen numune homojen hale getirilir.

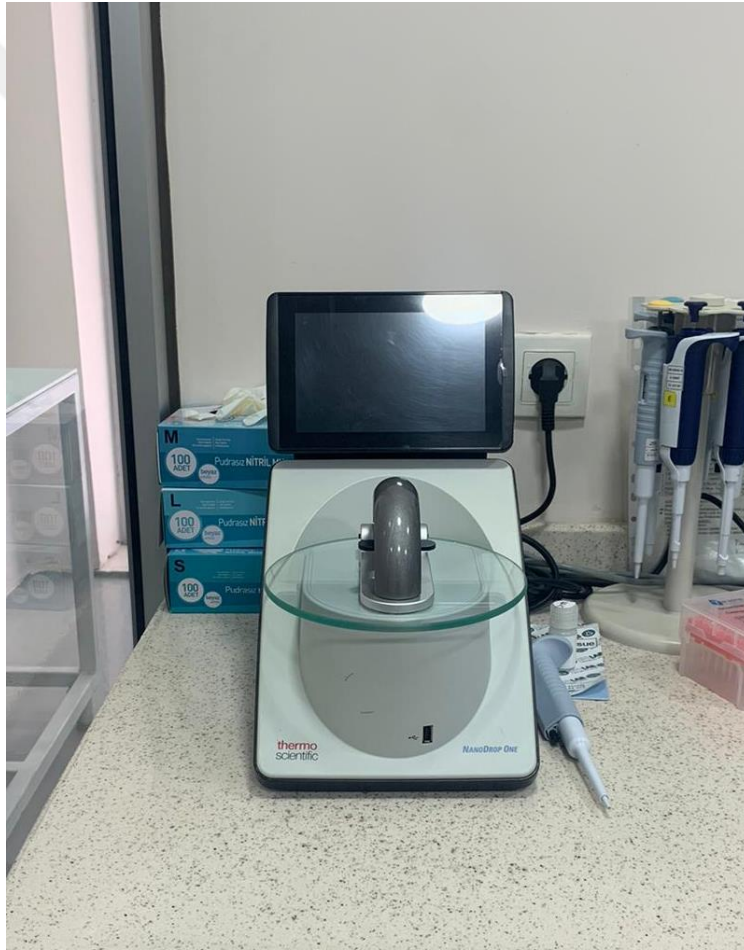
- Eppendorf tüpüne 0,2 g tartılır. (Numunenin türüne göre tartım miktarı azaltılıp çoğaltılabilir.)
- Kodlanmış numune içeren eppendorf tüplerine 550-850-1000 µl lysis buffer eklenir ve vortekslenir. Eğer numune higroskopik yapıda ise lysis solüsyonu miktarları arttırılmalıdır.
- 15 dakika sonra 10-30 µl Proteinaz K ekle ve 1200 RPM thermal çalkalayıcıya alınır.
- Tüpler 65°C'da en az 30 dk inkübe edilir. DNA veriminin düşük olduğu örneklerde, liziz aşamasında 1 gece bekletilir. İnkübasyon süresi sonunda, RNA bakımından zengin numunelere 20 µl RNase (10mg/ml stok solüsyonundan) eklenip, 30 dakika oda koşullarında bekletildikten sonra >10.000 g'de 10 dk santrifüj edilir. İnkübasyonlar 1200 rpm'ye ayarlanmış çalkalamalı ısıtıcı blok üzerinde gerçekleştirilerek enzim etkinliği arttırılabilir.
- Çalışılacak numune sayısı (paralelleri ile birlikte) için kullanılacak Elution Buffer solüsyonunun miktarı hesaplanır ve temiz bir eppendorf tüpüne belirlenen miktar alınarak 70°C'ye ısıtılır.
- Supernatantı ayrılan numuneden 600-650 µl yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne alınır, üzerine 600 µl Binding Buffer ve 600 µl Etanol konularak vortekslenir.
- Oluşan karışım toplamda 3 seferde 600-650 µl spin kolono alınarak her seferinde 11.000 rcf de 1 dk santrifüjlenir.
- Santrifüjleme işlemleri (toplamda 3 sefer) bittikten sonra yeni toplama tüpü üzerine yerleştirilen spin kolonun üzerine 400 µl wash buffer1 solüsyonu eklenir, 1 dk 11.000 g'de santrifüj edilir ve altta biriken sıvı atılır.
- Yeni toplama tüpü üzerine yerleştirilen spin kolon üzerine 650 µl wash buffer 2 solüsyonu eklenir, 1 dk 11.000 g'de santrifüj edilir ve altta biriken sıvı atılır.
- Yeni toplama tüpü üzerine yerleştirilen spin kolon üzerine tekrar 250 µl wash buffer 2 solüsyonu eklenir, 2 dk 11.000 rcf'de santrifüj edilir ve C5 solüsyonu kolondan tamamen uzaklaştırılır.

Spin kolon yeni bir 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne yerleştirilir ve üzerine önceden 70°C'de ısıtılmış elution buffer solüsyonundan 100 µl ilave edilir ve 5 dk oda

sıcaklığında inkübe edildikten sonra 1 dk 11.000 g’de santrifüj edilerek DNA alttaki tüpte toplanılır (Anonim, 2018; Anonim, 2013).

6.1.4. DNA Konsantrasyon ve Safılık Tespiti

İzolasyonu tamamlanan DNA’dan 1 ng/μl kullanılarak DNA’nın safılık değeri Mikro UV Spektrofotometrede (Nanodrop) ölçülmüş ve A260/A280 oranı 1,82 ölçülmüş ve DNA konsantrasyonu 40 ng/μl’ ye ayarlanmıştır.



Şekil 6.1 DNA Safılık ve Konsantrasyonu Ölçümü yapılan Mikro UV Spektrofotometre

6.1.5. GDO Tarama Analizi

Real Time PCR’da gen tarama işlemi ile promotor/terminatör gen bölgeleri taranmış ve bu bölgelere rastlanmamıştır (Anonim, 2013b; Anonim, 2016b).

6.1.6. Faktörler Seviyeler ve Yanıt Değişkenlerinin Belirlenmesi

Real Time PCR’ etkileyen faktörlerin ve seviyelerdeki parametrelerin seçiminde bu konuda yapılan önceki çalışmalar (Souza, 2011; Thanakiatkrai ve Welch, 2011) ve sektörel tecrübelerden (Anonim, 2013b; Anonim 2016a) yararlanılmıştır.

Merkezi Bileşik Tasarım yönteminde kullanılan α değeri faktör sayısı (k)’ ye göre değişmektedir.

Çalışmada 4 faktör kullanıldığından (k=4) : $\alpha = (2^k)^{1/4}$

$\alpha = 2$ olarak hesaplanmış ve kullanılmıştır. Sonuç olarak α ’nın da eklenmesi ile tasarım 5 seviyeli hale gelmiştir.

Tablo 6.2 Deney Tasarımında Kullanılan Faktör ve Seviyeleri

Faktör No	Faktörler	Seviyeler				
		- $\alpha(-2)$	-1	0	1	+ $\alpha(+2)$
X ₁	DNA Kons. (µl/reak.)	3	4	5	6	7
X ₂	Primer Kons. (F+R) (µl/reak.)	0,5	1	1,5	2	2,5
X ₃	Prob (SYBR Green I) Kons. (µl/reak.)	0,5	0,75	1	1,25	1,5
X ₄	Master Mix Kons. (µl/reak.)	7,5	10	12,5	15	17,5

c_t değeri, GDO analizinde tip belirlemeden sonra miktar tayininde ürünün GDO’lu mu yoksa GDO bulaşanı mı olduğunun doğru tespit edilmesi konusunda % 0,9 eşik değerinin düzgün hesaplanması açısından önemlidir. Ayrıca reaksiyonun

etkinliği ile ilgili de bilgi vermektedir. Düşük c_t değeri PCR koşullarının uygunluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. O yüzden bu çalışmada c_t değeri “en küçük en iyi” şeklinde ele alınmıştır.

Ürün konsantrasyonu ise, PCR sonucu elde edilen replike olmuş DNA dizinlerinin konsantrasyonunu yani çoğalma miktarını ifade etmektedir. Reaksiyon sonucu oluşan PCR ürünü ne kadar fazla ise reaksiyon o kadar uygun koşullarda meydana gelmiş demektir. O yüzden ürün konsantrasyonu yanıt değışkeni için “en büyük en iyi şeklinde” çalışılmıştır.

6.1.7. Deneyin Yapılışı

Merkezi Kompozit Tasarım yöntemi Minitab.18 programı kullanılarak tam faktöriyel, 16 (2^k) küp nokta, 8 eksen nokta ($2k$) ve 7 merkez nokta (n_c) olmak üzere 31 deney 3 tekrarlı olacak şekilde toplam 93 deney tasarlanmıştır.

Deneylerin hazırlık ve uygulama aşamaları sırasında koşullarda bir değışiklik olmamıştır. Deneyler başından sonuna kadar aynı kişi tarafından uygulanmıştır. Bütün deneylerde aynı malzemeler ve cihazlar kullanılmış olup deneylerin tamamı aynı gün içinde tek seferde, bölümlere ayrılmadan yapılmıştır.

Deneyler Balıkesir Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü bünyesindeki Moleküler Biyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 6.2 Deneyde kullanılan Real Time PCR Cihazı

Tasarlanan deneylerin hazırlık ve uygulama aşamaları aşağıdaki şekildedir.

- Yapılan tip belirleme analizi sonucunda Promotor/terminatör genlerle tespit edilemeyen DAS 40278-9 genine rastlanmıştır (Anonim, 2013b; Anonim, 2016a).
- Varlığı tespit edilmiş olan DAS 40278-9 geni üzerinde yukarıda bahsedilen 4 faktör ve 5 seviye halinde incelenmek üzere 3 tekrarlı 31 deney için 93 tane kuyucuk ayrı ayrı deney tasarım planındaki seviyelere göre hazırlanan mixler ile doldurulmuştur. Hazırlanan mixler distile su ile 25 µl'ye tamamlanmıştır yani her bir kuyucukta 25 µl karışım bulunmaktadır (Anonim, 2013b; Anonim, 2016a).

Bütün deneylerde aynı saflaştırılmış DNA, aynı primer ve aynı prob kullanılmıştır. Sadece deneylerin tasarımına göre faktör seviyeleri değiştirilmiştir.

Real Time PCR'ın ayarları Tablo 6.3'te gösterilmektedir.

Tablo 6.3 Real Time PCR Sıcaklık-Zaman Ayarları

	Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü
1	Başlangıç Denatürasyon	95°C	600	1
2	Amplifikasyon : Denatürasyon	95°C	15	45
3	Bağlanma ve Uzama	60°C	60	

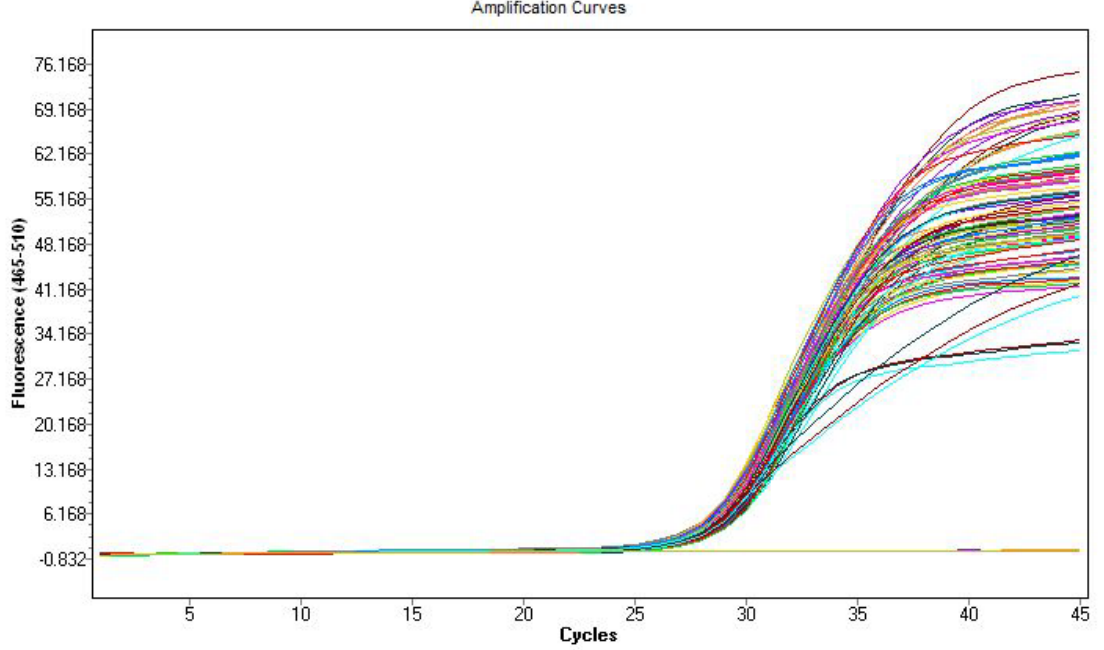
- Termal döngü sonunda elde edilen PCR ürünleri (replike olan DNA) Şekil 6.1’de görüntüsü olan Mikro UV Spektrofometrede (nanodrop) ölçülmüş ve tespit edilen değerler kaydedilmiştir.

Real Time PCR’den termal döngü sonunda 3 tekrarlı 31 deneyden elde edilen c_t değerleri ve PCR ürün konsantrasyonları Tablo 6.4’te gösterilmektedir.

Tablo 6.4 Merkezi Kompozit Tasarım ile Yapılan Deneylerin Sonuçları

Deney No	DNA X ₁	Primer (F+R) X ₂	Prob X ₃	Master Mix X ₄	C _t Değeri (sayı) Y ₁			PCR Ürün Kons. (ng/μl) Y ₂		
					1.tekrar	2.tekrar	3.tekrar	1.tekrar	2.tekrar	3.tekrar
1	-1	-1	-1	-1	28,57	28,61	28,54	856	853	858
2	1	-1	-1	-1	27,9	27,91	28,04	1090	1088	1095
3	-1	1	-1	-1	28,81	28,86	28,97	698	695	700
4	1	1	-1	-1	28,21	28,21	28,04	1108	1105	1112
5	-1	-1	1	-1	28,58	28,65	28,76	802	799	805
6	1	-1	1	-1	27,97	27,93	27,83	1104	1108	1101
7	-1	1	1	-1	28,92	29,12	29,07	602	605	798
8	1	1	1	-1	28,48	28,49	28,25	956	959	952
9	-1	-1	-1	1	28,81	28,87	28,85	694	698	690
10	1	-1	-1	1	28,33	28,44	28,32	982	986	979
11	-1	1	-1	1	29,19	29,28	29,32	581	583	580
12	1	1	-1	1	28,52	28,45	28,5	906	902	908
13	-1	-1	1	1	29,03	28,95	28,97	641	643	639
14	1	-1	1	1	28,55	28,29	28,47	938	940	935
15	-1	1	1	1	29,68	29,66	29,39	552	549	555
16	1	1	1	1	28,93	28,84	28,75	712	715	710
17	-2	0	0	0	29,36	29,56	29,68	567	571	565
18	2	0	0	0	28,27	28,33	28,08	1023	1026	1019
19	0	-2	0	0	28,08	27,92	27,94	1068	1071	1064
20	0	2	0	0	28,99	29,05	28,89	654	657	650
21	0	0	-2	0	28,59	28,51	28,14	952	948	955
22	0	0	2	0	28,94	28,9	28,87	658	663	652
23	0	0	0	-2	27,26	27,27	27,24	1146	1149	1141
24	0	0	0	2	28,12	28,15	28,05	1051	1053	1054
25	0	0	0	0	28,75	28,81	28,87	794	798	792
26	0	0	0	0	28,76	28,6	28,73	782	785	786
27	0	0	0	0	28,76	28,79	28,29	802	800	801
28	0	0	0	0	28,91	28,72	28,85	794	791	796
29	0	0	0	0	28,85	28,32	28,87	792	795	798
30	0	0	0	0	28,55	28,62	28,82	802	800	804
31	0	0	0	0	28,8	28,83	28,76	798	801	803

Deney sonuçlarının c_t değerlerini gösteren amplifikasyon grafiği aşağıdaki Şekil 6.3'te gösterilmektedir.



Şekil 6.3 Deney Sonuçlarına ait Amplifikasyon Grafiği

6.1.8. Merkezi Kompozit Tasarımın Uygulanması ve Modelin Oluşturulması

Merkezi kompozit tasarım yöntemi Minitab.18 programı kullanılarak full faktöriyel 7 merkez noktalı 31 deney 3 tekrarlı olacak şekilde toplam 93 denemelik bir tasarım oluşturulmuştur. Deneylerin hazırlık ve uygulama aşamaları sırasında koşullarda bir değişiklik olmadığı için bloklama yapmaya gerek duyulmamıştır.

Minitab.18 programına Stat/DOE/Create Response Surface Design sekmesinden yöntem olarak Central Composite, full faktöriyel, ayrıca 4 faktör, 7 merkez noktalı 31 deney, 3 tekrar, %95 güven aralığı seçilmiştir.

Elde edilen çıktılar, Analyze Response Surface Design sekmesinden programa girilmiş aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

Sadece bağımsız değişkenlerin etkisi birinci dereceden modelle incelendiğinde Minitab.18 programı çıktısında C_t değeri ve ürün konsantrasyonu yanıt değişkenleri için aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 6.5 Lineer Programlamada c_t Yanıtı (Y_1) için Varyans Analizi Sonuçları

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	4	14,4908	3,62271	42,39	0,000
Linear	4	14,4908	3,62271	42,39	0,000
DNA	1	7,7684	7,76837	90,91	0,000
Primer	1	3,0217	3,02170	35,36	0,000
Prob	1	0,6709	0,67087	7,85	0,006
M.mix	1	3,0299	3,02990	35,46	0,000
Error	88	7,5198	0,08545		
Lack-of-Fit	20	6,4597	0,32298	20,72	0,000
Pure Error	68	1,0601	0,01559		
Total	92	22,0106			

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,292321	65,84%	64,28%	61,30%

Tablo 6.6 Lineer Programlamada c_t Yanıtı (Y_1) için Regresyon Katsayıları

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	28,6082	0,0303	943,78	0,000	
DNA	-0,3285	0,0345	-9,53	0,000	1,00
Primer	0,2049	0,0345	5,95	0,000	1,00
Prob	0,0965	0,0345	2,80	0,006	1,00
M.mix	0,2051	0,0345	5,95	0,000	1,00

$$Y_1 = 28,6082 - 0,3285 X_1 + 0,2049 X_2 + 0,0965 X_3 + 0,2051 X_4$$

C_t yanıt değeri için bütün bağımsız değişkenlerin etkisi 0,05'ten küçük p değerleri ile anlamlı bulunmuştur. %68,94 bulunan R^2 değeri, c_t değerindeki değişimlerin % 68,94'ünün modeldeki bağımsız değişkenlerden kaynaklandığı anlamına gelmektedir.

Tablo 6. 7 Lineer Programlamada Ürün Konsantrasyonu Yanıtı (Y_2) için Varyans Analizi Sonuçları

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	4	2104040	526010	67,08	0,000
Linear	4	2104040	526010	67,08	0,000
DNA	1	1292028	1292028	164,76	0,000
Primer	1	385003	385003	49,09	0,000
Prob	1	159707	159707	20,37	0,000
M.mix	1	267302	267302	34,09	0,000
Error	88	690098	7842		
Lack-of-Fit	20	663621	33181	85,22	0,000
Pure Error	68	26476	389		
Total	92	2794138			

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
88,5552	75,30%	74,18%	71,84%

Tablo 6.8 Lineer Programlamada Ürün Konsantrasyonu Yanıtı (Y₂) için Regresyon Katsayıları

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	838,04	9,18	91,26	0,000	
DNA	134,0	10,4	12,84	0,000	1,00
Primer	-73,1	10,4	-7,01	0,000	1,00
Prob	-47,1	10,4	-4,51	0,000	1,00
M.mix	-60,9	10,4	-5,84	0,000	1,00

$$Y_2 = 838,04 + 134,0 X_1 - 73,1 X_2 - 47,1 X_3 - 60,9 X_4$$

Ürün konsantrasyonu yanıt değeri için de c_t yanıt değerinde olduğu gibi bütün bağımsız değişkenlerin etkisi 0,05'ten küçük p değerleri ile anlamlı bulunmuştur. %75.3 bulunan R² değeri, ürün konsantrasyonundaki değişimlerin %68,94'ünün modeldeki bağımsız değişkenlerden kaynaklandığı anlamına gelmektedir.

Her iki yanıt değeri için de birinci dereceden model uygun görüldüğü halde modelin yanıt değişkenlerindeki değişimleri daha iyi tanımlayabilmek amacıyla ikinci dereceden modelin uygunluğu araştırılmıştır.

İkinci dereceden modelin her iki yanıtı ait minitab çıktıları aşağıdaki gibidir.

Tablo 6. 9 İkinci Dereceden Modelin c_t Yanıtı (Y_1) için Varyans Analizi Sonuçları ve R^2 Değerleri

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	14	19,9817	1,42726	54,87	0,000
Linear	4	14,4908	3,62271	139,27	0,000
DNA	1	7,7684	7,76837	298,65	0,000
Primer	1	3,0217	3,02170	116,17	0,000
Prob	1	0,6709	0,67087	25,79	0,000
Master mix	1	3,0299	3,02990	116,48	0,000
Square	4	5,2820	1,32050	50,77	0,000
DNA*DNA	1	0,4902	0,49018	18,84	0,000
Primer*Primer	1	0,0529	0,05287	2,03	0,158
Prob*Prob	1	0,0349	0,03491	1,34	0,250
Master mix*Master mix	1	4,3042	4,30419	165,47	0,000
2-Way Interaction	6	0,2088	0,03480	1,34	0,251
DNA*Primer	1	0,0403	0,04025	1,55	0,217
DNA*Prob	1	0,0008	0,00075	0,03	0,865
DNA*Master mix	1	0,0073	0,00725	0,28	0,599
Primer*Prob	1	0,1230	0,12302	4,73	0,033
Primer*Master mix	1	0,0050	0,00500	0,19	0,662
Prob*Master mix	1	0,0326	0,03255	1,25	0,267
Error	78	2,0289	0,02601		
Lack-of-Fit	10	0,9688	0,09688	6,21	0,000
Pure Error	68	1,0601	0,01559		
Total	92	22,0106			

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,161281	90,78%	89,13%	86,91%

Tablo 6. 10 İkinci Dereceden Modelin c_t Yanıtı (Y_1) için Regresyon Katsayıları

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	28,7267	0,0352	816,23	0,000	
DNA	-0,3285	0,0190	-17,28	0,000	1,00
Primer	0,2049	0,0190	10,78	0,000	1,00
Prob	0,0965	0,0190	5,08	0,000	1,00
Master mix	0,2051	0,0190	10,79	0,000	1,00
DNA*DNA	0,0756	0,0174	4,34	0,000	1,03
Primer*Primer	-0,0248	0,0174	-1,43	0,158	1,03
Prob*Prob	0,0202	0,0174	1,16	0,250	1,03
Master mix*Master mix	-0,2240	0,0174	-12,86	0,000	1,03
DNA*Primer	-0,0290	0,0233	-1,24	0,217	1,00
DNA*Prob	-0,0040	0,0233	-0,17	0,865	1,00
DNA*Master mix	0,0123	0,0233	0,53	0,599	1,00
Primer*Prob	0,0506	0,0233	2,17	0,033	1,00
Primer*Master mix	0,0102	0,0233	0,44	0,662	1,00
Prob*Master mix	0,0260	0,0233	1,12	0,267	1,00

$$Y_1 = 28,7267 - 0,3285 X_1 + 0,2049 X_2 + 0,0965 X_3 + 0,2051 X_4 + 0,0756 X_1^2 - 0,0248 X_2^2 + 0,0202 X_3^2 - 0,2240 X_4^2 - 0,0290 X_1X_2 - 0,0040 X_1X_3 + 0,0123 X_1X_4 + 0,0506 X_2X_3 + 0,0102 X_2X_4 + 0,0260 X_3X_4$$

c_t değeri yanıt değişkeni (Y_1) için ikinci dereceden modelde düzeltilmiş R^2 değeri %89,13'e yükselmiştir. Bu değerden bağımsız değişkenler, kendi aralarındaki etkileşimler ve kuadratik etkilerinin toplamının c_t yanıt değişkeninin %90,78'ini tanımladığı anlaşılmaktadır. Ancak primer miktarı ve prob miktarı faktörlerinin kuadratik etkileri, %95 güven aralığında anlamsız çıkarken DNA miktarı ve master mix miktarının kuadratik etkileri %95 güven aralığında %100 değeri ile yüksek oranda anlamlı bulunmuştur. DNA miktarı ile diğer üç faktör arasındaki etkileşimi %95 güven aralığında anlamsız bulunmuştur. Ayrıca master mix miktarı ile prob miktarı ve primer

miktarı etkileşimleri de %95 güven aralığında anlamsız çıkmıştır. Primer miktarı ve prob miktarı arasındaki etkileşim %95 güven aralığında 0,033 p değeri ile (%96,7) anlamlı çıkmıştır.

Tablo 6.11 İkinci Dereceden Modelin Ürün Konsantrasyonu Yanıtı (Y_2) için Varyans Analizi Sonuçları ve R^2 Değerleri

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	14	2547678	181977	57,59	0,000
Linear	4	2104040	526010	166,47	0,000
DNA	1	1292028	1292028	408,90	0,000
Primer	1	385003	385003	121,85	0,000
Prob	1	159707	159707	50,54	0,000
Master mix	1	267302	267302	84,60	0,000
Square	4	413063	103266	32,68	0,000
DNA*DNA	1	8699	8699	2,75	0,101
Primer*Primer	1	3410	3410	1,08	0,302
Prob*Prob	1	5080	5080	1,61	0,209
Master mix*Master mix	1	372426	372426	117,87	0,000
2-Way Interaction	6	30574	5096	1,61	0,155
DNA*Primer	1	668	668	0,21	0,647
DNA*Prob	1	8401	8401	2,66	0,107
DNA*Master mix	1	5188	5188	1,64	0,204
Primer*Prob	1	13300	13300	4,21	0,044
Primer*Master mix	1	1230	1230	0,39	0,534
Prob*Master mix	1	1789	1789	0,57	0,454
Error	78	246460	3160		
Lack-of-Fit	10	219984	21998	56,50	0,000
Pure Error	68	26476	389		
Total	92	2794138			

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
56,2116	91,18%	89,60%	86,42%

Tablo 6.12 İkinci Dereceden Modelin Ürün Konsantrasyonu Yanıtı (Y₂) için Regresyon Katsayıları

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	795,9	12,3	64,89	0,000	
DNA	133,96	6,62	20,22	0,000	1,00
Primer	-73,13	6,62	-11,04	0,000	1,00
Prob	-47,10	6,62	-7,11	0,000	1,00
Master mix	-60,93	6,62	-9,20	0,000	1,00
DNA*DNA	-10,07	6,07	-1,66	0,101	1,03
Primer*Primer	6,31	6,07	1,04	0,302	1,03
Prob*Prob	-7,69	6,07	-1,27	0,209	1,03
Master mix*Master mix	65,89	6,07	10,86	0,000	1,03
DNA*Primer	3,73	8,11	0,46	0,647	1,00
DNA*Prob	-13,23	8,11	-1,63	0,107	1,00
DNA*Master mix	-10,40	8,11	-1,28	0,204	1,00
Primer*Prob	-16,65	8,11	-2,05	0,044	1,00
Primer*Master mix	-5,06	8,11	-0,62	0,534	1,00
Prob*Master mix	-6,10	8,11	-0,75	0,454	1,00

$$\begin{aligned}
Y_2 = & 795,9 + 133,96 X_1 - 73,13 X_2 - 47,10 X_3 \\
& - 60,93 X_4 - 10,07 X_1^2 + 6,31 X_2^2 - 7,69 X_3^2 + 65,89 X_4^2 + 3,73 X_1 X_2 - 13,23 X_1 \\
& X_3 - 10,40 X_1 X_4 - 16,65 X_2 X_3 - 5,06 X_2 X_4 - 6,10 X_3 X_4
\end{aligned}$$

Ürün konsantrasyonu yanıt değişkeni için ikinci dereceden modelde düzeltilmiş R^2 değeri %89,60'a yükselmiştir. Bu değerden bağımsız değişkenler, kendi aralarındaki etkileşimler ve kuadratik etkilerinin toplamının c_t yanıt değişkeninin %91,18'ini tanımladığı anlaşılmaktadır. Sadece master mix'in kuadratik etkisi %95 güven aralığında anlamlı bulunmuştur, diğer bağımsız değişkenlerin kuadratik etkileri %95 güven aralığında anlamsız çıkmıştır. Faktörlerin kendi aralarındaki etkileşimine bakıldığında sadece primer miktarı ve prob miktarı arasındaki etkileşim 0,044 p değeri ile (%95,6) anlamlı çıkmış, diğer faktörler arasındaki etkileşimler anlamsız bulunmuştur.

Her iki yanıt değişkeni için de ikinci dereceden model uygun bulunmuştur. %95 güven aralığında p değeri 0,05'ten küçük olan faktör kareleri ve etkileşimler modelden çıkarılarak tekrar hesaplanmıştır.

Her iki yanıt değişkeni için de %95 güven aralığında anlamsız bulunan değişkenler modelden çıkarılınca oluşan yeni modelde bütün değişkenler anlamlı bir hale gelmiştir. Ancak her iki yanıtta da R^2 değerlerinde küçük te olsa bir düşüş gözlenmiştir. c_t değeri için düzeltilmiş R^2 değeri %89,13'ten %89,12'ye düşerken, ürün konsantrasyonu için düzeltilmiş R^2 değeri %89,60'tan %89,21'e düşmüştür. Yani modelin bağımsız değişkenlerin yanıtları %95 güven aralığında anlamlı bir şekilde tanımlama oranlarında çok küçük bir düşüş meydana gelmiştir.

Ayrıca her iki yanıtta da R^2 ve düzeltilmiş R^2 değerleri arasındaki fark yaklaşık %1,5'ten %0,7'ye düşmüştür. Yani bu durumdan modelden çıkarılan değişkenlerin yanıtların tanımlanmasında önemli bir etkilerinin olmadığı anlaşılmaktadır.

Oluşan yeni indirgenmiş modelin regresyon sonuçları aşağıdaki gibidir.

Tablo 6. 13 İndirgenmiş Modelin c_t Yanıtı (Y_1) için Varyans Analizi Sonuçları ve R^2 Değerleri

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	7	19,7978	2,82826	108,64	0,000
Linear	4	14,4908	3,62271	139,16	0,000
DNA	1	7,7684	7,76837	298,41	0,000
Primer	1	3,0217	3,02170	116,07	0,000
Prob	1	0,6709	0,67087	25,77	0,000
Master mix	1	3,0299	3,02990	116,39	0,000
Square	2	5,1840	2,59198	99,57	0,000
DNA*DNA	1	0,5064	0,50636	19,45	0,000
Master mix*Master mix	1	4,3766	4,37655	168,12	0,000
2-Way Interaction	1	0,1230	0,12302	4,73	0,032
Primer*Prob	1	0,1230	0,12302	4,73	0,032
Error	85	2,2128	0,02603		
Lack-of-Fit	17	1,1527	0,06781	4,35	0,000
Pure Error	68	1,0601	0,01559		
Total	92	22,0106			

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,161346	89,95%	89,12%	87,84%

Tablo 6.14 İndirgenmiş Modelin c_t Yanıtı (Y_1) için Regresyon Katsayıları

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	28,7224	0,0258	1111,72	0,000	
DNA	-0,3285	0,0190	-17,27	0,000	1,00
Primer	0,2049	0,0190	10,77	0,000	1,00
Prob	0,0965	0,0190	5,08	0,000	1,00
Master mix	0,2051	0,0190	10,79	0,000	1,00
DNA*DNA	0,0760	0,0172	4,41	0,000	1,01
Master mix*Master mix	-0,2235	0,0172	-12,97	0,000	1,01
Primer*Prob	0,0506	0,0233	2,17	0,032	1,00

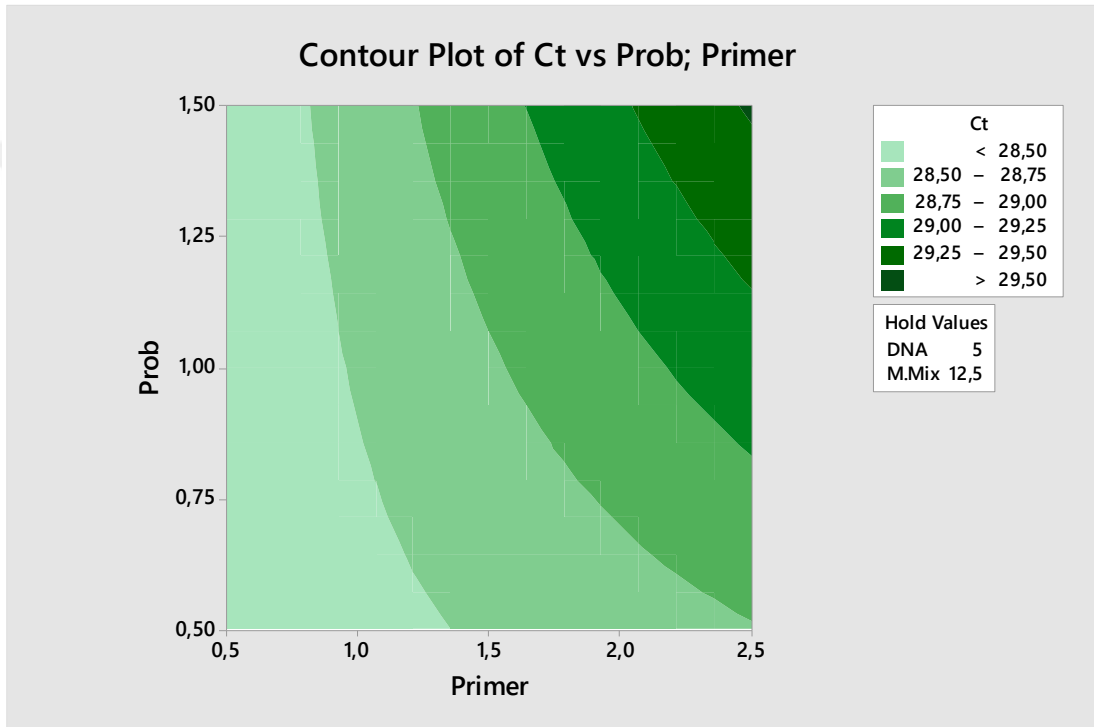
$$Y_1 = 28,7224 - 0,3285 X_1 + 0,2049 X_2 + 0,0965 X_3 + 0,2051 X_4 + 0,0760 X_1^2 - 0,2235 X_4^2 + 0,0506 X_2 X_3$$

c_t yanıt değişkeni için sonuçlara bakılacak olursa quadratik değişkenler ve etkileşimlerden p değeri 0,05'ten büyük olan yani model içinde anlamsız görünenler çıkarıldıktan sonra oluşturulan yeni model bütün bağımsız değişkenleriyle anlamlı hale gelmiştir.

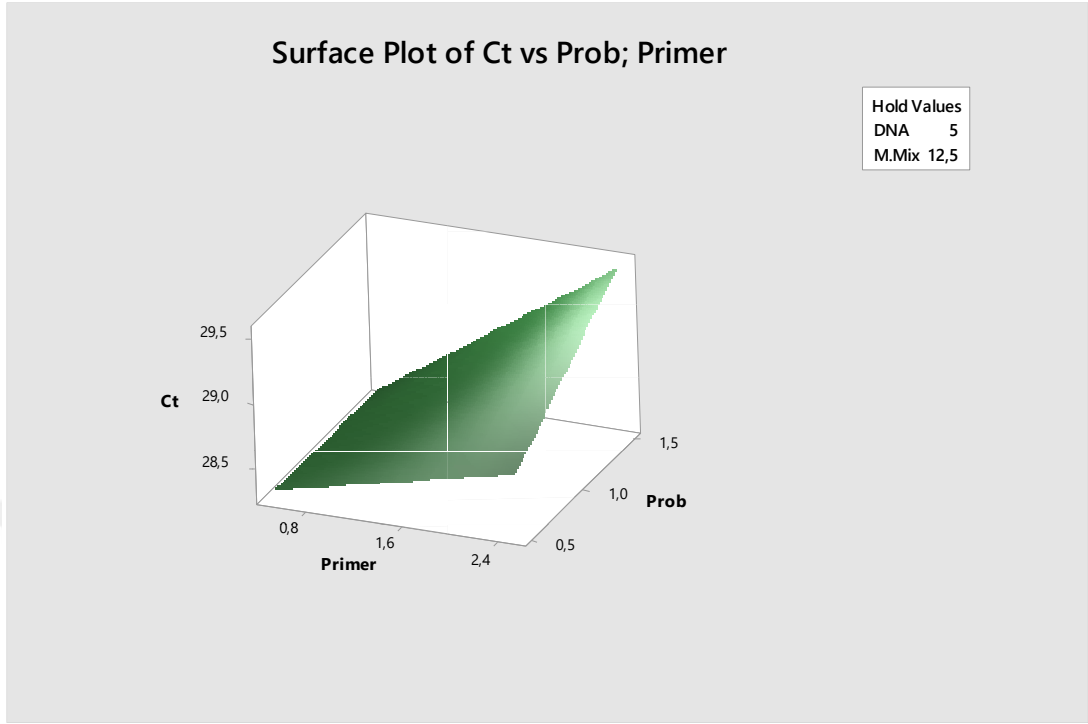
Model eşitliğini ve değişkenlerin kat sayılarını inceleyecek olursak; diğer bütün değişkenler sabit tutulduğunda DNA konsantrasyonu 1 birim arttırıldığında c_t değeri 0,3285 birim azalmaktadır. Katsayıları (-) olan DNA konsantrasyonu ve master mixin karesi değişkenleri arttığında yanıt değişkeni c_t değerinin azalacağı anlamına gelmektedir. Diğer yandan (+) katsayılı primer konsantrasyonu, prob konsantrasyonu, master mix konsantrasyonu, DNA konsantrasyonunun karesi ile primer konsantrasyonu ve prob konsantrasyonu etkileşimi değişkenlerindeki artış c_t değerinin de artmasına sebep olmaktadır.

Modeldeki bağımsız değişkenler c_t değerindeki değişimin %89,12'sini tanımlamaktadır.

c_t yanıt değişkenine ait modelde anlamlı bulunan tek anlamlı etkileşim olan pimer ve prob konsantrasyonlarının etkileşimlerini gösteren kontur ve yüzey plotları aşağıdaki gibidir.



Şekil 6.4 Primer ve Prob Konsantrasyonunun c_t Değerine Etkisinin Kontur Grafiği



Şekil 6. 5 Primer ve Prob Konsantrasyonunun c_t değerine Etkisinin Yüzey Grafiği

Şekil 6.4 ve 6.5'te, DNA ve master mix konsantrasyonları merkez noktasında sabit tutulduğunda primer ve prob konsantrasyonlarının c_t yanıt değerine olan etkileri gösterilmektedir. Kontur ve yüzey grafiklerinden primer ve prob konsantrasyonlarının yüksek seviyelerinde c_t değerinin de yükseldiği anlaşılmaktadır. Primer ve prob konsantrasyonu ile c_t değeri arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır. Primer konsantrasyonunun c_t değerine olan etkisi prob konsantrasyonuna nazaran daha yüksektir yani primer konsantrasyonundaki değişim prob konsantrasyonundakine göre c_t değerini daha çok etkilemektedir. Primer konsantrasyonu yüksek seviyede iken prob konsantrasyonundaki artış c_t değerini düşük primer seviyesine göre daha bariz bir şekilde arttırmıştır. Aynı şekilde prob konsantrasyonu yüksek seviyede iken primer konsantrasyonundaki artış c_t değerinde, düşük prob seviyesine göre daha bariz bir şekilde artışa sebep olmuştur.

Tablo 6.15 İndirgenmiş Modelin Ürün Konsantrasyonu Yanıtı (Y₂) için Varyans Analizi Sonuçları ve R² Değerleri

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	6	2512274	418712	127,75	0,000
Linear	4	2104040	526010	160,49	0,000
DNA	1	1292028	1292028	394,21	0,000
Primer	1	385003	385003	117,47	0,000
Prob	1	159707	159707	48,73	0,000
Master mix	1	267302	267302	81,56	0,000
Square	1	394934	394934	120,50	0,000
Master mix*Master mix	1	394934	394934	120,50	0,000
2-Way Interaction	1	13300	13300	4,06	0,047
Primer*Prob	1	13300	13300	4,06	0,047
Error	86	281864	3277		
Lack-of-Fit	18	255387	14188	36,44	0,000
Pure Error	68	26476	389		
Total	92	2794138			

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
57,2493	89,91%	89,21%	87,51%

Tablo 6. 16 İndirgenmiş Modelin Ürün KonsantrasyonuYanıtı (Y₂) için Regresyon Katsayıları

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	786,25	7,58	103,69	0,000	
DNA	133,96	6,75	19,85	0,000	1,00
Primer	-73,13	6,75	-10,84	0,000	1,00
Prob	-47,10	6,75	-6,98	0,000	1,00
Master mix	-60,93	6,75	-9,03	0,000	1,00
Master mix*Master mix	66,89	6,09	10,98	0,000	1,00
Primer*Prob	-16,65	8,26	-2,01	0,047	1,00

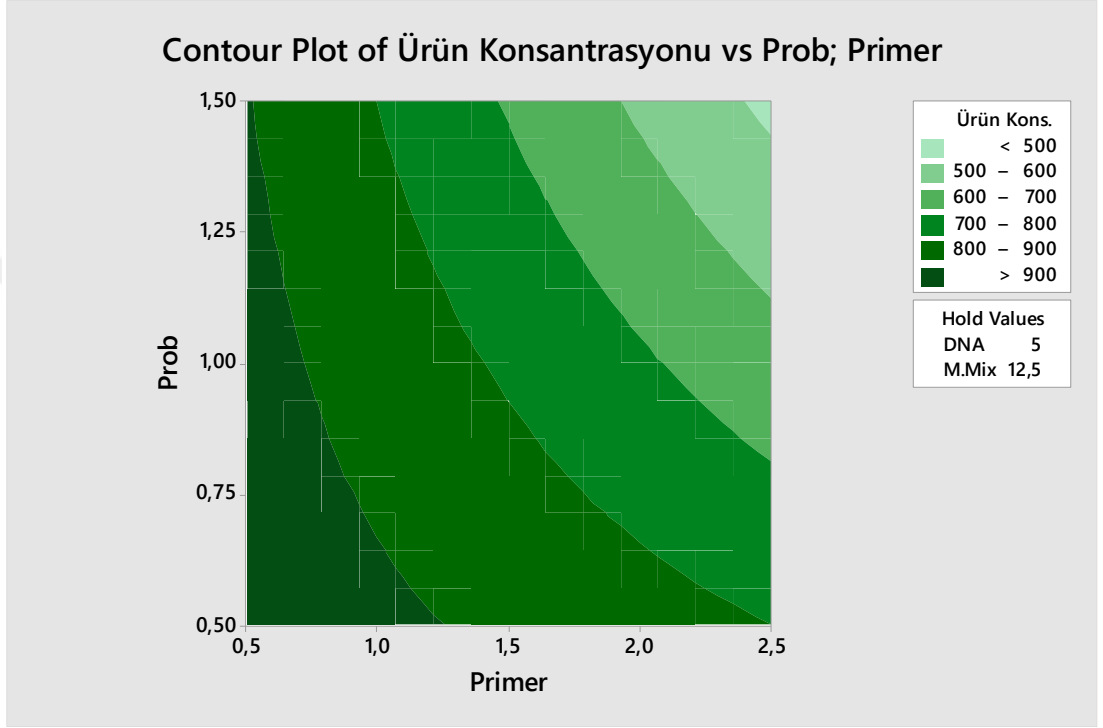
$$Y_2 = 786,25 + 133,96 X_1 - 73,13 X_2 - 47,10 X_3 - 60,93 X_4 + 66,89 X_4^2 - 16,65 X_2X_3$$

Ürün konsantrasyonu yanıt değişkeni için sonuçlara bakılacak olursa quadratik değişkenler ve etkileşimlerden p değeri 0,05'ten büyük olan yani model içinde anlamsız görünenler çıkarıldıktan sonra oluşturulan yeni model bütün bağımsız değişkenleriyle anlamlı hale gelmiştir.

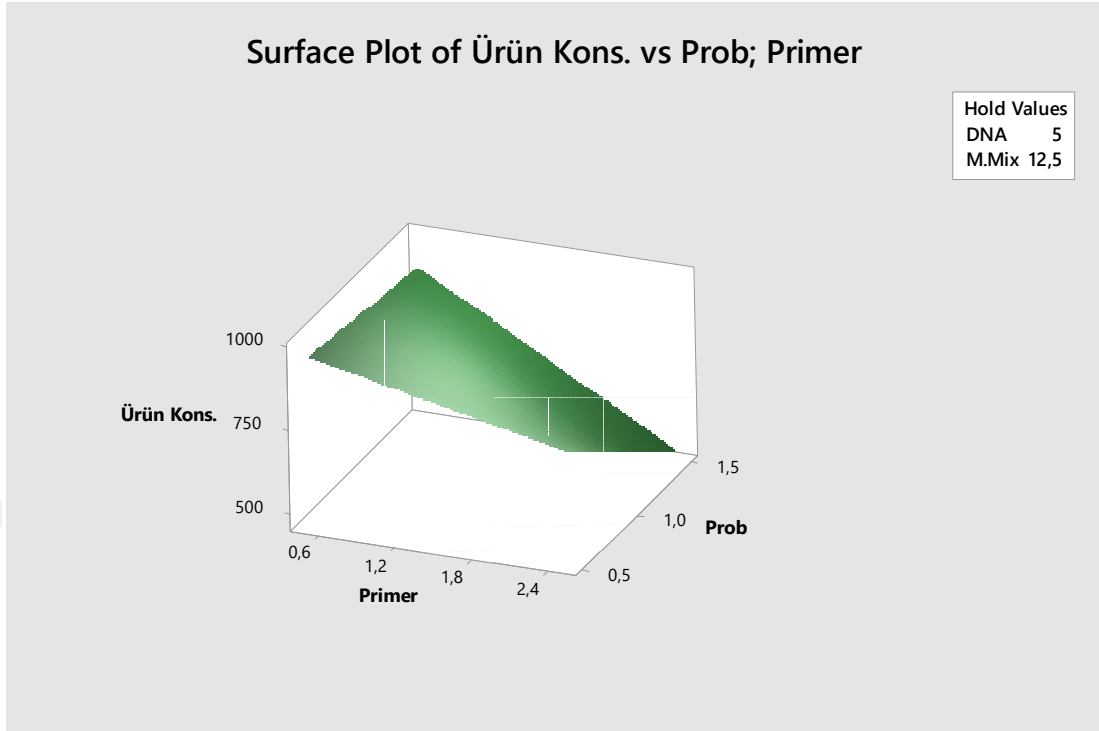
Model eşitliğini ve değişkenlerin kat sayılarına bakılacak olursa; diğer bütün değişkenler sabit tutulduğunda DNA konsantrasyonu 1 birim arttırıldığında ürün konsantrasyonu 133,96 birim artmaktadır. Katsayıları (-) olan primr, prob, master mix konsantrasyonları ile primer ve prob konsantrasyonu etkileşimi arttığında yanıt değişkeni ürün konsantrasyonunun azalacağı anlamına gelmektedir. DNA konsantrasyonu ve master mixin karesinin katsayıları (+) olduğundan bu değişkenlerdeki artış ürün konsantrasyonunda artış meydana getirmektedir.

Modeldeki bağımsız değişkenler ürün konsantrasyonundaki değişimin %89,21'ini tanımlamaktadır.

Ürün konsantrasyonu yanıt değişkenine ait modelde anlamlı bulunan tek etkileşim olan pimer ve prob konsantrasyonlarının etkileşimlerini gösteren kontur ve yüzey grafikleri aşağıdaki gibidir.



Şekil 6. 6 Primer ve Prob Konsantrasyonunun Ürün Konsantrasyonuna Etkisinin Kontur Grafiği



Şekil 6. 7 Primer ve Prob Konsantrasyonunun Ürün Konsantrasyonuna Etkisinin Yüzey Grafiği

Şekil 6.6 ve Şekil 6.7, DNA ve master mix konsantrasyonları merkez noktasında sabit tutulduğunda primer ve prob konsantrasyonlarının ürün konsantrasyonuna olan karşılıklı etkilerini göstermektedir. Kontur ve yüzey grafiklerinden primer ve prob konsantrasyonlarının yüksek seviyelerinde ürün konsantrasyonunda düşüş olduğu görülmektedir. Primer ve prob konsantrasyonu ile ürün konsantrasyonu arasında ters bir orantı bulunmaktadır. Primer konsantrasyonundaki değişiklik prob konsantrasyonuna göre ürün konsantrasyonunu daha çok etkilemektedir. Prob konsantrasyonu en yüksek seviyede iken primer konsantrasyonunda meydana gelen artış sonucu ürün konsantrasyonunda bariz bir azalma gözlenirken, prob konsantrasyonunun en düşük seviyesinde iken prob konsantrasyonunda meydana gelen artışla ürün konsantrasyonunda meydana gelen azalma daha düşüktür. Aynı şekilde primer konsantrasyonu en yüksek seviyede iken prob konsantrasyonunda meydana gelen artış sonucu ürün konsantrasyonu bariz bir şekilde azalırken, primer konsantrasyonunun en düşük seviyesinde iken prob konsantrasyonunda meydana gelen artışla ürün konsantrasyonunda daha az bir düşüş gözlenmektedir.

6.1.9. Modelin Optimizasyonu

Bu bölümde, en son elde ettiğimiz ikinci dereceden model minitab.18 programının DOE/Response Surface/Response Optimizer sekmesinden optimize edilmiştir. Optimizasyon sonucunda elde çıktılar aşağıdaki şekildedir.

Tablo 6. 17 Merkezi Kompozit Tasarımda Düşük Yüksek ve Hedef Yanıt Değerleri

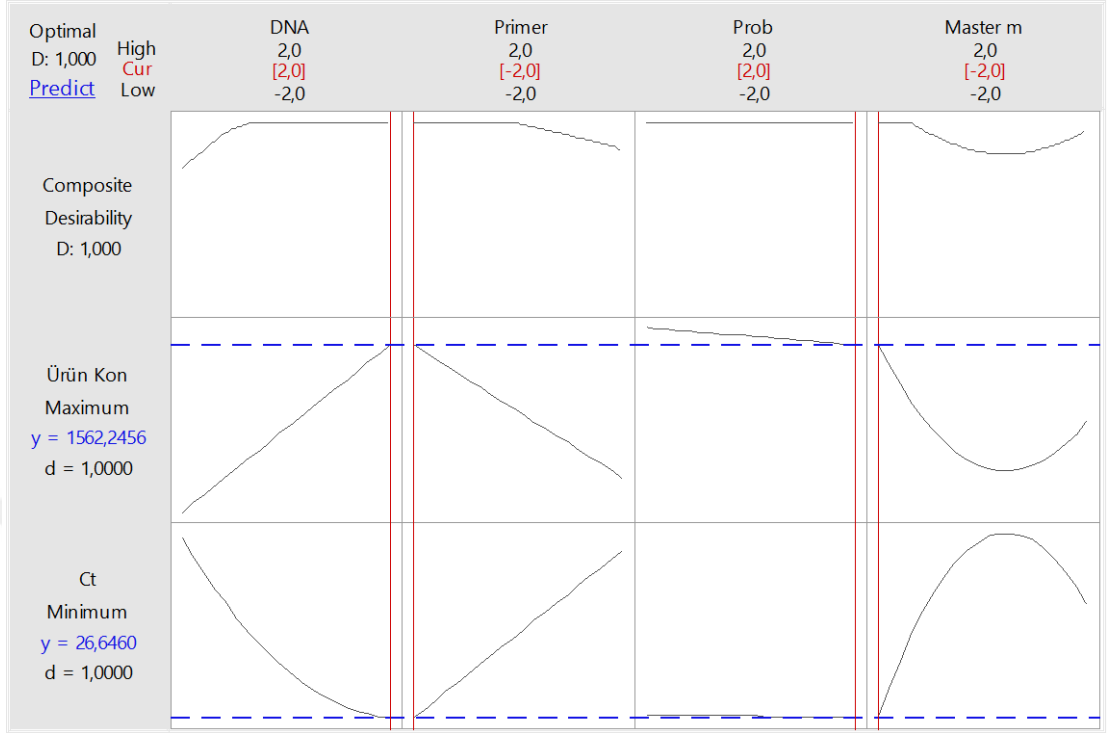
Response	Goal	Lower	Target	Upper	Weight	Importance
Ürün Kons.	Maximum	549	1149,00		1	1
Ct	Minimum		27,24	29,68	1	1

Tablo 6. 18 Merkezi Kompozit Tasarım ile elde edilen Optimum Faktör Seviyeleri ve Yanıtları

Solution	DNA	Primer	Prob	Master mix	Ürün Kons. Fit	Ct Fit	Composite Desirability
1	2	-2	2	-2	1562,25	26,6460	1

Tablo 6. 19 Merkezi Kompozit Tasarım Yöntemi ile elde edilen Yanıt Değerlerine ait Optimum Sonuç Aralıkları

Response	Fit	SE Fit	95% CI	95% PI
Ürün Kons.	1562,2	47,4	(1468,1; 1656,4)	(1414,5; 1709,9)
Ct	26,646	0,147	(26,355; 26,937)	(26,213; 27,079)



Şekil 6. 8 Merkezi Kompozit Tasarım ile Elde Edilen Optimizasyon Grafiği

Elde edilen optimizasyon sonuçlarına göre +2 seviyesinde DNA (7 µl/reaksiyon) ve prob (1,5 µl/reaksiyon) konsantrasyonu, -2 seviyesinde primer (0,5 µl/reaksiyon) ve master mix (7,5 µl/reaksiyon) konsantrasyonu kullanıldığında en düşük c_t (26,65) ve en yüksek ürün konsantrasyonu (1562,25) elde edilmektedir.

Elde edilen optimizasyon sonuçlarına göre hem yanıtların ayrı ayrı hem de ortak fonksiyonun D değerleri 1 olarak elde edilmiştir ve alabileceği en yüksek değerdedir.

6.1.10. Onay Deneyleri ile Modelin Doğrulanması

Modelde elde edilen optimum faktör seviyeleri kullanılarak onay deneyi yapılmış ve modelde tahmin edilen yanıt değerleri ile onay deneylerinden elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak modelin doğrulanması sağlanmıştır. Doğrulama deneylerinden elde edilen sonuçlar ile modelden hesaplanan değerler birbirine yakın bulunmuştur ve deney sonuçları Minitab optimizasyon sonuç tablosundaki optimum yanıt değer aralığına dahildir.

Tablo 6. 20 Onay Deneyinin Sonuçları ile Modelin Tahmin Değerlerinin Karşılaştırılması

Yanıtlar	Tahmini Değer	Deney Sonucu	Fark
Y ₁ (c _t değeri)	26,65	26,92	-0,27
Y ₂ (Ürün Kons.)	1562,25	1483,26	78,99

SONUÇ

GDO çalışmaları verimi daha yüksek, hastalık, kuralık yüksek sıcaklık gibi faktörlere daha dayanıklı, daha yüksek besin içeriğine sahip ürünlerin elde edilmesi için kullanılan biyoteknolojik çalışmaların başında gelmektedir ve bu çalışmalar hızla artmaktadır. Birçok bitki ve hayvan üzerinde yapılması ile birlikte mısır bitkisi, GDO alanında üzerinde en yoğun çalışmalarının yapıldığı bitkilerin başında gelmektedir. GDO çalışmaları günden güne arttıkça beraberinde getirdiği riskler de daha fazla tartışılmaya başlanmıştır. GDO'lu ürünlerle ilgili çok fazla soru işareti olduğundan, kullanımı amacı, piyasaya sürülmesi, ithalatı, ihracatı v.b. birçok konuda sıkı denetim ve önlemler alınmakta ve bu konuda birçok ülke yasal düzenlemeler getirmektedir.

GDO analizinde en yaygın kullanılan yöntem Real Time PCR (Polimerase Chain Reaction) yöntemidir. PCR için çok fazla koşulun sağlanması ve materyal hazırlanması gerekir. PCR 'ın oluşması için çok fazla materyal gerektiğinden, bunu etkileyen de çok fazla faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerdeki en ufak bir sapma PCR'ın oluşmasını engellemektedir. Bu yüzden genellikle reaksiyonun başlaması için bu faktörleri değiştirerek defalarca deneme yapmak gerekir. Bu durum hem zaman, hem emek hem de kaynak kaybına hem de yüksek maliyete yol açmaktadır.

Deney tasarımı yaklaşımı söz konusu faktörlerin farklı seviyelerinin çıktı değeri ya da değerleri üzerinde oluşturdukları değişimleri ve bu değişimlerin altında yatan nedenleri daha az sayıda deneme ile araştırıp optimize edebilmektedir. Yanıt yüzey yöntemi günümüzde kullanılan en etkili istatistiksel deney tasarımı yöntemlerinden olmakla birlikte klasik metodlara göre hem maliyeti çok daha düşük hem de avantajları çok daha fazladır.

Bu çalışma ile birçok riske sahip olduğu düşünülen GDO' lu ürünlerin analizinde gen taraması ve GDO miktar tespitinde önemli rol oynayan c_p değeri ve PCR ürün konsantrasyonuna etki eden faktörler ve bu faktörlerin seviyeleri tespit edilerek, bu faktörlerin (DNA konsantrasyonu, primer konsantrasyonu (F+R), prob

konsantrasyonu, master mix konsantrasyonu) hem karşılıklı kendi aralarındaki etkileşimleri hem de yanıt değerlerine (c_p değeri ve PCR ürün konsantrasyonu) olan etkileri yüzey yanıt yöntemlerinden merkezi kompozit tasarım metodu ile tespit edilmiş ve incelenmiştir.

Çalışmada araştırılan faktörlerin her biri ayrı bir öneme sahiptir. DNA ve primer konsantrasyonu düzgün bir çoğalma ile yakından ilgilidir. Düşük miktarda DNA ve primer kullanımı istenen ürünün yeterince elde edilememesine yol açarken yüksek miktarda kullanımı istenmeyen ürünlerin oluşmasına sebep olmaktadır. Aynı şekilde görüntüleme amaçlı kullanılan prob miktarı yeterli olmadığında doğru sonuç elde edilememektedir. Master mix ise aslında birden fazla faktörün birleşimi şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Çünkü reaksiyon üzerinde her birinin ayrı ayrı etkisi olan MgCl, Taq polimeraz enzim ve dNTP'leri içerdiğinden çok boyutlu ayrı bir öneme sahiptir. Master mix bu etkenlerin karışımı halinde temin edildiği ve kullanıldığından, karışım halinde faktör olarak ele alınmıştır.

Merkezi Bileşik Tasarım yönteminin uygulamasında Minitab.18 programı ile tam faktöriyel, 7 merkez noktalı 31 deney 3 tekrarlı olacak şekilde toplam 93 deney yapılmıştır. Deneylerin hazırlık ve uygulama aşamaları sırasında koşullarda bir değişiklik olmadığından bloklama yapılmamıştır.

Yapılan tekrarlarla deneydeki ve deneyler arasındaki değişkenlik tespit edilerek oluşturulan modelde hata tanımının doğru bir şekilde yapılması ve deney sonuçlarının ortalaması ile faktör etkilerinin daha kesin bir tahmini sağlanmıştır.

Merkezi kompozit tasarım yönteminin kullanılması ile modelde döndürülebilirlik ve aynı zamanda ikinci derece modeldeki kuadratik terimlerinin tahmininin yapılabilme imkanları sağlanmıştır. Ayrıca α değeri ile faktörlerin daha geniş bir aralıkta incelenmesini, merkezi denemelerin fazlalığı ise hatanın doğru şekilde tanımlanması ve kararlı bir model oluşturulmasını sağlanmıştır. Ayrıca az sayıda deney ve maliyetle çok fazla veri elde edilmiştir.

Yapılan çalışma sonucunda dört faktörün de modelde yüksek oranda önemli bulunmuştur ve incelenen her iki yanıt değişkeni üzerinde önemli etkiye sahip oldukları görülmüştür. Faktörlerin % 95 güven aralığında kendi başına c_t değerinin (Y_1) % 68,4'ünü ürün konsantrasyonunun ise (Y_2) %75,3'ünün tanımladığı sonucu elde edilmiştir. İkinci dereceden modelde elde edilen sonuçlara bakıldığında faktörlerin sadece kendi etkilerinin yanında kuadratik etkilerinin ve aralarındaki etkileşimlerin de yanıt değişkenlerinin değişimde anlamlı bir rol oynadığı anlaşılmış olup R^2 değerleri c_t değeri için % 90,78, ürün konsantrasyonu için ise % 91,18'e yükselmiştir. Bu yüzden model ikinci derecede ele alınmış ve incelenmiştir. İkinci dereceden modelde % 95 güven aralığında p değeri 0,05'ten büyük olan yani önemli bir etkiye sahip olmadığı tespit edilen kuadratik değişkenler ve etkileşimler modelden çıkarıldığında R^2 değerlerinde küçük bir düşme gözlenmiş ancak bütün değişkenlerin anlamlı hale geldiği yeni bir model oluşturulmuştur.

Lineer değişkenlerin kat sayılarına bakıldığında DNA konsantrasyonu (X_1) ile c_t değeri (Y_1) arasında ters ilişki olduğu yani DNA konsantrasyonu (X_1) arttıkça c_t değerinin (Y_1) arttığı, diğer 3 faktör ile doğrusal bir ilişki olduğu yani bu 3 faktör arttıkça c_t değerinin (Y_1) azaldığı sonucu elde edilmiştir. Primer (X_2), prob (X_3) ve master mix (X_4) değişkenleri ise arttıkça Ürün konsantrasyonunun (Y_2) azaldığı görülmüştür. Ürün konsantrasyonu (Y_2) ile sadece DNA konsantrasyonu (X_1) arasında doğru bir orantı bulunmuştur. Elde edilen modelde regresyon katsayılarına bakıldığında her iki yanıt üzerinde de en fazla DNA konsantrasyonunun (X_1) etkiye sahip olduğu görülmüştür. Daha sonra c_t değeri (Y_1) için diğer faktörlerin etki düzeyi çoktan aza doğru sırasıyla master mix (X_4), primer (X_2) ve prob (X_3) konsantrasyonu şeklinde iken ürün konsantrasyonu (Y_2) için primer (X_2), master mix (X_4) ve prob (X_3) konsantrasyonu şeklinde olduğu anlaşılmaktadır.

c_t değeri (Y_1) için DNA konsantrasyonu (X_1^2) ve master mixin kuadratik etkileri (X_4^2) anlamlı bulunurken, ürün konsantrasyonu (Y_2) için ise sadece master mixin (X_4) kuadratik etkisi anlamlı bulunmuştur. C_t değeri (Y_1) ile master mixin kuadratik etkisi (X_4^2) arasında ters bir ilişki gözlenirken, diğer anlamlı bulunan kuadratik değişkenler arttığında her iki yanıt değişkeninin de arttığı görülmüştür.

En son elde edilen indirgenmiş modelde her iki yanıt için de anlamlı bulunan tek etkileşim olan primer (X_2) ve prob (X_3) konsantrasyonlarının etkileşimi kontur ve yüzey grafiklerine bakıldığında c_t değeri ile primer (X_2) ve prob konsantrasyonları (X_3) arasında doğru orantı olduğu görülmüştür. Primer konsantrasyonunun (X_2) c_t değerine olan etkisi prob konsantrasyonuna (X_3) göre daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. Ürün konsantrasyonuna (Y_2) etkilerine bakıldığında primer (X_2) ve prob konsantrasyonları (X_3) ile aralarında ters bir orantı olduğu görülmüştür. Prob konsantrasyonu en yüksek seviyede iken primer konsantrasyonunda meydana gelen artış sonucu ürün konsantrasyonunda bariz bir azalma gözlenirken, primer konsantrasyonunun en düşük seviyesinde iken prob konsantrasyonunda meydana gelen artışla ürün konsantrasyonunda meydana gelen azalma primer konsantrasyonundakine kıyasla daha düşük olduğu saptanmıştır.

Çalışmada incelenen yanıtlara bakılacak olursa; GDO analizinde tip belirleme analizinden sonra miktar tayininde ürünün GDO'lu mu yoksa GDO bulaşanı mı olduğunun doğru tespit edilmesi için % 0,9 eşik değeri kritik bir önem taşır. c_t değeri miktar tayininin hesaplamasında kullanıldığından, doğru ve güvenilir bir şekilde hesaplanabilmesi için önem taşımaktadır. Ayrıca reaksiyonun etkinliği ile de ters orantılıdır. Düşük c_t değeri PCR koşullarının uygunluğunun yüksek olduğu göstermektedir. O yüzden bu çalışmada c_t değeri minimize edilmeye çalışılmıştır.

Ürün konsantrasyonu ise, PCR sonucu elde edilen replike olmuş DNA dizinlerinin konsantrasyonunu yani çoğalma miktarını ifade etmektedir. Reaksiyon sonucu oluşan PCR ürünü ne kadar fazla ise reaksiyon o kadar uygun koşullarda meydana gelmiş demektir. O yüzden ürün konsantrasyonu yanıt değişkeni maksimize edilmeye çalışılmıştır.

Merkezi kompozit tasarımın sağladığı diğer bir avantaj ise çok yanıtlı modelin optimize edilebilmesidir. Oluşturulan modelin optimizasyonu merkezi kompozit tasarım yöntemi ile yapılarak iki ayrı optimum yanıt değeri için oluşturulan ortak bir çekicilik (desirability) fonksiyonu ile faktörlerin ortak optimum seviyeleri belirlenmiştir. +2 seviyesinde DNA (7 μ l/reaksiyon) ve prob (1,5 μ l/reaksiyon)

konsantrasyonu, -2 seviyesinde primer (0,5 µl/reaksiyon) ve master mix (7,5 µl/reaksiyon) konsantrasyonu optimizasyon sonucu elde edilen optimum faktör seviyeleridir. Bu seviyelerde faktörler ayarlandığında en düşük c_t (26,65) ve en yüksek ürün konsantrasyonu (1562,25 ng/ µl) elde edileceği anlaşılmıştır.

PCR ve GDO analizi alanında deney tasarımı ve yanıt yüzey yöntemi ile ilgili şimdiye kadar çok az sayıda çalışmanın olması nedeniyle bu çalışmaya gerek duyulmuş ve bu çalışma ile literatürde bazı eksiklikler giderilmeye çalışılmıştır.

GDO dışındaki PCR alanında yapılan çalışmalara bakıldığında; Klasik PCR ile yapılan deney tasarımı çalışmaları: Cobb ve Clarkson (1994), Taguchi yöntemiyle primer, DNA, $MgCl_2$ ve dNTP konsantrasyonları 4 faktör ve 3 seviyede; Boleda ve arkadaşları (1996), merkezi kompozit tasarım ile DNA ve $MgCl_2$ konsantrasyonunu 2 faktör ve 5 seviyede; Niens ve arkadaşları (2005), faktöriyel tasarımla 7 faktörü 2 seviyede; Fattah ve Gaballa (2006), Box Behnken yüzey yanıt yöntemiyle 6 faktör 3 seviyede tek bir yanıt için uygulanmıştır. Bu çalışma ile karşılaştırıldığında başta PCR yöntemi ve incelenen DNA kaynağı bakımından ayrılmakla birlikte, kullanılan deney tasarımı yöntemi, faktör ve seviye sayıları, yanıtın kendisi ve yanıt sayısı bakımlarından da farklılık göstermektedir. Boleda ve arkadaşlarının (1996) çalışması sadece kullanılan deney tasarımı yöntemi (merkezi kompozit tasarım) bakımından aynıdır.

Real time PCR ile Souza ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan çalışma kullanılan faktörler ve sayıları bakımından bu çalışma ile en çok benzeyen çalışmadır. Çalışmada kullanılan 3 faktör (primer, prob ve master mix konsantrasyonu) aynı iken 1 faktör (döngü sayısı) farklıdır. Faktörlerdeki diğer farklılıklar forward ve revers primerin iki ayrı faktör olarak incelenmesi ve kullanılan prob çeşididir. Bunların dışında yine incelenen DNA kaynağı, kullanılan deney tasarımı yöntemi, yanıtın kendisi ve yanıt sayısı bakımlarından bu çalışmadan ayrılmaktadır. Çalışmada Taguchi tasarım yöntemi ile erime eğrisi yanıt değişkeni incelenmiştir. Sadece real time PCR yönteminin kullanılması bakımından bu çalışmayla aynıdır.

Real time PCR ile Thanakiatkrai ve Welch (2011) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise Taguchi deney tasarımı ile regresyon analizi sonuçları karşılaştırılmıştır ve sadece kullanılan c_t yanıt değeri bakımından benzerlik göstermektedir.

Zhang ve arkadaşları (2012), mikrobiyoloji alanında multiplex PCR ile üç ayrı DNA üzerinde yaptıkları çalışmada merkezi kompozit tasarımını 3 faktör ve 5 seviye şeklinde uygulamışlardır. Bu çalışma ile sadece kullanılan deney tasarımı yöntemi aynıdır.

Multiplex PCR ile yapılan bir diğer çalışmada (Camacho ve ark., 2013) ise $MgCl_2$ ve sıcaklık faktörü, faktöriyel tasarım yöntemi ile incelenmiş olup bu çalışmadan her bakımdan ayrılmaktadır.

GDO ile ilgili deney tasarımı üzerine tek bir çalışma yapılmış olup (Nabi ve ark., 2016) çalışmada multiplex PCR'da 4 ayrı gen ve primerleri, sıcaklık, DMSO ve $MgCl_2$ faktörleri 2 seviyede kesirli faktöriyel tasarım yöntemi ile incelenmiştir. Çalışmada kullanılan PCR yöntemi, deney tasarımı yöntemi, incelenen faktörler, seviye sayısı, araştırılan DNA gen bölgesi ve hem yanıtın kendisi hem de yanıt sayısı bakımından bu çalışmadan farklılık göstermektedir.

PCR ile ilgili bir diğer deney tasarımı çalışmasında (Lafrance ve ark., 2021) Ty-1, Ty-2 ve Ty-3 genlerine bağlı TG178, TG105A ve P6-25 moleküler markerların tespitinde PCR parametrelerini optimize etmeyi çalışılmıştır. Sıcaklık, tavlama, DNA miktarı, $MgCl_2$ ve primer konsantrasyonu olmak üzere dört faktörün, merkezi bir bileşik tasarım (CCD) ile incelenmesiyle bu çalışma ile faktör sayısı ve kullanılan yöntem bakımından benzerlik göstermektedir.

Bu çalışma GDO alanında; real time PCR kullanımı, yemlik mısırdaki DAS 40278-9 GDO gen bölgesi üzerinde çalışılması, merkezi kompozit tasarım yöntemiyle 4 faktörün bir arada 5 seviyede araştırılması, çoklu yanıtın incelenmesi ve optimize edilmesi bakımlarından ilk kez yapılmıştır.

Bu çalışma ile GDO analizi ve real time PCR alanında yüzey yanıt yöntemlerinden merkezi kompozit tasarımının etkin bir yöntem olduğu, bu alanda geniş kullanım alanı bulabileceği ve hata payı düşük ve güvenilir sonuçlar elde edilebileceği sonucuna varılmıştır. Bunlara ilaveten çalışmada kullanılan faktör ve seviye sayısı ele alındığında bütün denemeler tam faktöriyel tasarım olarak ele alındığında 4 faktörün her biri teker teker 5 seviye halinde incelenmesi gerekmektedir. Yani bütün kombinasyonlar denenmesi halinde $4^5 = 625$ deneme yapılması gerekirken merkezi kompozit tasarım 31 deneme ile 4 faktörün 5 seviye halinde yanıtlara etkisinin araştırılmasına ve optimize edilmesine olanak sağlanmıştır.

Ayrıca GDO'lu ürünlerin insan sağlığına karşı muhtemel zararları ve insanların GDO ile ilgili endişeleri bu çalışmanın önemini daha da arttırmaktadır. Özellikle günümüzde yaşanan Covid pandemisi ile insanlar hastalıklara karşı direnç kazanmak ve sağlıklı yaşamak için beslenme konusunda daha hassasiyet göstermeye başlamıştır. GDO'lu ürünlerin bağışıklık sistemini zayıflatması, kanser riskini arttırması gibi olası risklerinden dolayı özellikle yanlış GDO analizi sonucunda özellikle gıda olarak yanlışlıkla kullanımı, GDO'lu ürünlerin gıda amaçlı kullanımı ülkemizde yasak olduğu için kabul edilemez bir hatadır. Yem amaçlı kullanımına izin verilmesiyle birlikte, GDO analizinde yapılabilecek yanlış tespit sonucunda GDO'lu ürün GDO'suz olarak etiketlenerek tüketicinin yanlış bilgilendirilmesine, habersizce tüketilen GDO'lu yemlerin dolaylı olarak insan sağlığını da tehdit etmesine sebep olması muhtemeldir.

Bundan sonraki çalışmalarda GDO analizi ya da real time PCR konusunda kullanılmamış farklı deney tasarımı yöntemleri denenebilir, yöntemler karşılaştırılabilir, faktör sayısı arttırılabilir, farklı faktörler ya da farklı çıktılar yine merkezi kompozit tasarım ile araştırılabilir, farklı bitkisel ya da hayvansal GDO gen bölgeleri üzerinde çalışılabilir. GDO alanında miktar tayini ile ilgili farklı deney tasarımı araştırmaları yapılabilir. Deney tasarımı ile incelenen faktörler farklı algoritmalarla optimize edilebilir.

KAYNAKÇA

- Abdel-Fattah, Yasser R., Ahmaed A.Gaballa: “Synthesis of DNA Ladder by Polymerase Chain Reaction and Optimization of Yield Using Response Surface Methodology”, **Biotechnology**, 5(2), 2006, s. 166-172.
- Andy V.: “Principle of the PCR”, (Çevrimiçi), [https:// users.ugent.be /~avierstr principles/pcr.html](https://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html), 1999, 10 Nisan 2021.
- Anonim: Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Araştırma Planlama ve Koordinasyon Kurulu Başkanlığının TBMM Başkanlığına hitaplı 26.10.2001 tarih ve 3916 sayılı yazısı, (Çevrimiçi), <http://www2.tbmm.gov.tr/d21/7/7-4808c.pdf>, 5 Nisan 2021.
- Anonim: TÜBİTAK Biyoteknoloji ve Gen Teknolojileri Stratejisi Vizyon 2023 Projesi, Biyoteknoloji ve Gen Teknolojileri Strateji Grubu, Ankara, 2004.
- Anonim: Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Strateji Geliştirme Başkanlığının, TBMM Başkanlığına hitaplı, 13.06.2006 tarih ve 2114 sayılı yazısı. <http://www2.tbmm.gov.tr/d22/7/7-14323c.pdf> 241 ERBAŞ, 2006.
- Anonim: Ulusal Biyolojik Çeşitlilik Stratejisi ve Eylem Planı, T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü Doğa Koruma Dairesi Başkanlığı, Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi Ulusal Odak

Noktası, 2007, (Çevrimiçi), <http://www.nuhungemisi.gov.tr/DosyaRaporSunum/Belgeler/bb951776-e874-40ce-842b-d90ae82b6381.pdf>, 10 Nisan 2021.

Anonim: Danıştay 10. Dairesinin 2009/14646 esas, 20.11.2009 tarihli Yürütmeyi Durdurma Kararı, 2009, (Çevrimiçi), www.gidahareketi.org/Files/GDO-Yonetmelik-durdurma.doc, 10 Nisan 2021.

Anonim: Biyogüvenlik Kanunu, **Resmi Gazete**, Başbakanlık Mevzuatı Geliştirme ve Yayın Genel Müdürlüğü, 26 Mart 2010, Sayı: 27533, Kanun No.5977.

Anonim: **TS EN ISO 21571** Gıda Maddeleri - Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar Ve Türetilmiş Ürünlerin Belirlenmesi İçin Analiz Metotları - Nükleik Asit Özütlemesi, 2013a.

Anonim: **TS EN ISO 24276** Gıdalar - Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar ve Türevlerinin Tespiti için Analiz Yöntemleri - Tarifler ve Genel Kurallar, 2013b.

Anonim: **Eurofins GeneSpin Catalogue**, Kit for isolation of high-Quality DNA from Food and Feed Samples, Cat. No. 522440605, 2018.

Anonim: Gıda Tarım Hayvancılık Bakanlığı, 29.05.2014 tarihli ‘GDO Yönetmeliği ile İlgili Basın Açıklaması’, (Çevrimiçi), <http://www.tarim.gov.tr/Sayfalar/Detay.aspx?OgeId=50&Liste=BasinAciklamalari>, 2 Nisan 2021.

- Anonim: Event-specific method for the quantitation of Maize DAS-40278-9 using real-time PCR /**EURL Metot**, 2016a.
- Anonim: **Eurofins GeneScan GMO Screen RT** (35S/NOS/FMV IPC), 2016b.
- Anonim: **Tarım ve Orman Bakanlığı Biyogüvenlik Mevzuatı Uygulama Talimatı**, 2018, (Çevrimiçi), [https://vskn.tarimorman.gov.tr/pendik/Belgeler/BIYOG%C3%9CVENLIK_MEVZUATI_UYGULAMA_TALIMATI_30.05.2018_Degisikligi_pdf.%20\(1\).pdf](https://vskn.tarimorman.gov.tr/pendik/Belgeler/BIYOG%C3%9CVENLIK_MEVZUATI_UYGULAMA_TALIMATI_30.05.2018_Degisikligi_pdf.%20(1).pdf), 18 Nisan 2021.
- Anonim: Balıkesir Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü Moleküler Biyoloji Birimi Dökümanı, 2021a.
- Anonim: Model of Real Time Quantitative PCR Plot, 2021b, (Çevrimiçi), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechQPCR.shtml>, 22 Mayıs 2021.
- Aksu, Simge: “Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizma Ve Ürünlerden Doğan Hukuki Sorumluluk”, Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, İzmir, 2019.
- Antony, Jiju: **Design of Experiments for Engineers and Scientists**, Butterworth Heinemann, 1. Baskı, ABD., 2003.
- Argun, T. : “Toplam Kalite Yönetimi”, **Executive Excellence Dergisi**, Rota Yayınları, İstanbul, 1997.

Arne Holst-Jensen,
Yves Bertheau,
Marc de Loose,
Lutz Grohmann,
Sandrine Hamels,
Lotte Hougs,
Dany Morisset,
Sven Pecoraro,
Maria Pla,
Marc Van den Bulcke,
Doerte Wulff :

“Detecting Unauthorized Genetically Modified Organisms (GMOs) and Derived Materials”, **Biotechnology Advances**, 30, 2012, s.1318–1335.

Atalık, Ahmet,
İlgin Özkaya Özlüer,
Fevzi Özlüer,
Aykut Çoban,
Murat Özgen,
Mustafa Akçelik,
Okan Ertuğrul,
Nükhet Turgut:

Biyogüvenlik Yasası ve Korkunun Ekolojisi, Görünmez Elin Ekolojisi, Biyogüvenlik ve GDO,
Yayına Hazırlayan: Ekoloji Kolektifi, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, 1. Baskı, Ankara, 2010.

Ataş, B.:

Sürekli İyilestirmede Altı Sigma Yaklaşımı,
Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Eskisehir: Osman Gazi Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, 2001.

Atsan, Tecer,
Tuğba Erem Kaya:

“Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların (GDO) Tarım ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri”, **Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 22 :2, 2008,s. 1-6.

- Aydın, Bahar: **“Küreselleşme Sürecinde Tarımsal Yapıdaki Dönüşümler, Organik Tarım ve Türkiye Örneği,** Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, İstanbul, 2012
- Aydın, M.E.: “Taguchi Deneysel Tasarım Metodu Ve Segman Sanayinde Bir Uygulama”, **Standard Ekonomik ve Teknik Dergi**,394 1994, s. 102-109.
- Aykas, Lerzan,
Necla Taş,
Neşe Adanacıoğlu,
Erdoğan Oğur,
Umut Özer: “Ulusal Tohum Gen Bankası”, **Anadolu Dergisi**, 26: 2 , 2016, s.136.
- Baş S.: “Cevap Yüzeyi Tasarımları Ve Sinir Ağları Yaklaşımı”, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010.
- Bayraç, Abdul Tahir,
Gülsüm Kalemtaş,
Mehmet Cengiz
Baloğlu, Musa Kavas,
Seraç Önde: **Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar,** ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık, 3. Baskı, 2014.
- Bayrakdar, Osman
Muzaffer: “Hata Türleri ve Etkileri Analizi (HTEA) ve Taguchi Metodu’nun Bonfiglioli A.Ş.’ de Ortak Uygulaması”, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2009.

- Besterfield, Dale H. **Quality Control**, New Jersey, Prentice Hall Int, Inc., Fourth Edition, 1994.
- Boleda, M.D., P. Briones, J., Farrés, L. Tyfield, R. Pi: "Experimental Design: A Useful Tool for PCR Optimization", **BioTechniques**, 21, 1996, s. 134-140.
- Box G.E.P., N.R. Draper: **Empirical Model-Building and Response Surfaces**, Wiley, 1987.
- Brodmann, P. D., E.C. Ilq, H. Berthoud, A. Herrmann: "Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Methods For Four Genetically Modified Maize Varieties And Maize DNA Content In Food", **Journal of AOAC International**, 85:3, 2002, s. 646-653.
- Burnak, N.: **Toplam Kalite Yönetimi-İstatistiksel Süreç Kontrolü**, Osman Gazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Yayınları, 1997.
- Caetano-Anollés, Gustavo: "DAF Optimization Using Taguchi Methods and the Effect of Thermal Cycling Parameters on DNA Amplification", Research Reports, **BioTechniques**, 25:3, 1998, s. 472-480.
- Camacho, J. L., E. M. Torres, C. Cadena, J. Prieto, L.L. Prieto, D.A. Torregroza: "The Use of Factorial Design, Image Analysis, and an Efficiency Calculation for Multiplex PCR Optimization", **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, 2013, s. 249-252.

- Caner, Vildan,
K. Tayfun Çarlı: “Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Pcr) ve Bazı Tavuk
İnfeksiyonlarındaki Yeri”, **j Fac Vet Med**, 20, 2001, s.
137-145
- Chaouachi, M.,
A. Be´rard,
K. Said: “Relative Quantification in Seed GMO Analysis: State of
Art and Bottlenecks”, **Transgenic Reserch**, 22, 2013, s.
461–476.
- Cobb, Benjamin D.,
John M.Clarkson: “A simple procedure for optimising the polymerase chain
reaction (PCR) using modified Taguchi methods
Nucleic Acids Research, 22:18, 1994, s. 3801 3805.
- Cochran, William G.,
Gertrude M.Cox.: **Experimental Design**, John Wiley & Sons, 2. Baskı,
ABD, 1957.
- Curtis, Mark D.: **Bitki Biyoteknolojisi ve Genetik: İlkeler, Teknikler ve
Uygulamalar**, (Çev. Ed. Hüseyin Avni Öktem ve Meral
Yücel), 1. Basımdan Çeviri-Gözden Geçirilmiş Yeni
Basım, Nobel Akademik Yayıncılık Yayınevi, Ankara,
2016, s. 159-192.
- Çarhan, Ahmet,
Elif Ercan,
Tuğba Yalçınkaya: “Dijital PZR ve Kullanım Alanları”, **Türk Hijyen ve
Deneysel Biyoloji Dergisi**, 73:2, 2016, s. 183-198.
- Çelik, Venhar,
Dilek Turgut Balık: “Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO)”, **Erciyes
Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, 23(1-2),
2007, s.13-23.
- Çetiner, Selim: “GDO-Kanser İlişkisi Kanıtlandı mı?”, Ekim, 2012,
(Çevrimiçi), <http://research.sabanciuniv.edu> /20604

/1/GDO_Kanser_%C4%B0li%C5%9Fkisi_kan%C%
B1tland%C4%B1_m%C4%B1.pdf, 16 Nisan 2021.

Çetiner, Selim: “Yeşil Devrim de Neymiş?”, 19 Haziran, 2013, (Çevrimiçi), <http://www.tarlasera.com/makale-3677-yesil-devrim-de-neymis?>, 16 Nisan 2021.

Çiçekçi, O.: “İlköğretim Okullarında Görevli Öğretmenlerin Transgenik Ürünler (GDO) Konusundaki Bilgilerinin Ve Görüşlerinin Belirlenmesi”, Yüksek Lisans, Gazi Üniversitesi, Eğitim Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2008.

Çiftçi Aytekin, A.G.: “Kalite Geliştirme Sürecinde En İyileme Problemlerine Deney Tasarımı Yönteminin Uygulanması”, Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, İzmir, 2010.

Çoban, Aykut: **Türkiye’de GDO Düzenlemesi ve Sosyo-Ekolojik Sorunlar, Görünmez Elin Ekolojisi, Biyogüvenlik ve GDO**, Yayına Hazırlayan: Ekoloji Kolektif, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ankara, 2010.

Çömlekçi, Necla: **Deney Tasarımı İlke Ve Teknikleri**, Alfa yayınları, İstanbul, 2003.

Demirkol, Kenan: **GDO Çağdaş Esaret**, 3.Baskı, Kaynak Yayınları, İstanbul, 2015.

Denli, Muzaffer: **Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO)**, İstanbul Ticaret Odası Yayınları, İstanbul, 2012.

- Dieffenbach ve ark.: “General concepts for PCR primer design”, **PCR Methods Applications**, 1993, s. 530-537.
- Doğan, Ü.: **Kalite Yönetimi ve Kontrolü**, İzmir, 1991.
- Durmaz, S., “Taguchi Metodunun Kauçuğun Vulkanizasyonu Prosesine Uygulanması”, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008.
- Erbaş, Semra Oral, Hülya Olmuş: **Deney Düzenleri ve İstatistik Analizleri**, Gazi Kitabevi, 2006.
- Erbelet, Elif: “Gıda Güvenliğinin Türk Tarım Politikalarındaki Yeri ve Türk Tarımına Etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, 2014.
- Erden Atak, Ebru: “Genel Kamu Hukuku Yönünden Beslenme Hakkı”, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Ankara, 2018.
- Erlich, A. H., Gelfand, D., Sninsky, J. J.: Recent advances in Polymerase Chain Reaction, Science, 252, 1992, s. 1643-1652.
- Evans, James R., William M. Lindsay: **The Management and Control of Quality**, New York U.S.A., West Publishing Company, 1989.
- Fisher, R.A.: **The Design of Experiments**, Oliver and Boyd, Edinburgh, 1935.

- Forte, V.T., A. Di Pinto, C. Martino, G.M. Tantillo, G. Grasso, F.P. Schena: “A General Multiplex-PCR Assay For The General Detection Of Genetically Modified Soya And Maize”, **Food Control**, 16, 2005, s. 535-539.
- Günel T., “Gen Anlatımının Kantitatif Analizi "Real-Time PCR", **BİYOGEN**”, İstanbul, Türkiye Klinikleri J Med, 27(5), 2007, s. 763-7.
- Güngören, Ahmet Volkan: “Genetiği Değiştirilmiş Tarım Ürünlerinin Türkiye Açısından Değerlendirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2012.
- Güven, Gönül: “Soya İçeren İşlenmiş Gıdalarda GDO Miktarının Belirlenmesi Ve Pişirme Koşullarının GDO Miktarına Etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2014.
- Hasgöl, Özlem: “Üretim Parametrelerinin Güçlü Tasarımı Ve Bir Gıda İşletmesinde Uygulanması”, İstanbul Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, 2010.
- Haspolat, Iraz: “Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar ve Biyogüvenlik”, **Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi**, 59, 2012, s.75-80.
- Haugland, R.P.: **The Handbook of Fluorescent Probes and Research Products**, Dokuzuncu baskı, Molecular Probes, Inc, 2002,(Çevrimiçi), [http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The Handbook.html](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html), 20 Nisan 2021.

Henegariu, O., N.A. Heerema, S.R. Dlouhy, G.H. Vance, P.H. Vogt: “Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by Step Protocol”, **BioTechniques**, 23, 1997, s. 504-511.

Hernandez, M., D. Rodriguez-Lazaro, D. Zhang, T. Esteve, M. Pla, S. Prat: “Interlaboratory Transfer Of A PCR Multiplex Method For Simultaneous Detection Of Four Genetically Modified Maize Lines: Bt11, MON810, T25, And GA21”, **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 53, 2005, s. 3333-3337.

Innis, M.A., D.H. Gelfand, M.A. Gelfand, D.H. Sninsky, J.J. White T.J.: **PCR Protocols A Guide to Methods and Applications**, Academic Press, 1990.

Işığık, E.: **Toplam Kalite Yönetimine Bakış Açısıyla İstatistiksel Kalite Kontrol**, Ezgi Kitabevi, Bursa, 2005.

İnan, S.: “Zirkonyum–Mangan Oksit / Pan Kompozit Kürelerinin Hazırlanması Ve Stronsiyum Sorpsiyonunun İncelenmesi”, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2009.

James, D., A.M. Schmidt, E. Wall, M. Green, S. Masri: “Reliable Detection and Identification of Genetically Modified Maize, Soybean, and Canola by Multiplex PCR Analysis”, **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 51, 2003, s. 5829-5834.

- Kağnıcıoğlu, C. H.: “Üretim Öncesi Kalite Kontrolünde Taguchi Yöntemi ve Kükürtdioksit Giderici Sitrat Yöntemine Uygulanması”, Yayınlanmamış Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Eskişehir, 1998.
- Kahya Serpil, Esra
Büyükcangaz,
K. Tayfun Carlı: “Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu”, **Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 32:1, 2013, s. 31-38.
- Kanturvardar
Tütenyurd, Melis: “Solunum Yolu Viral Enfeksiyon Etkenlerinin Saptanmasında In-House PCR Optimizasyonu”, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2013.
- Karşlıoğlu, Zeynep: “Fire Analizinde Deney Tasarımı”, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, 2013.
- Keleş, Ö.: “Matkap Uçlarının ark ve PVD ile TiN Kaplanması Proses Parametrelerinin Taguchi Metodları ile Optimizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 1996.
- Kılıç A., M. Yapar,
M.A. Saraçlı,
M. Baysallar, L.
Doğancı: “Spinal Kord Yaralanmalı Hastalardan İzole Edilen Escherichia Coli Suşlarının Random Amplifiye Polimorfik Dna-Pcr (Rapid) Yöntemi İle Genetik Analizi”, **Gülhane Tıp Dergisi**, 45 (2), 2003, s. 143 – 146.
- Kitchen Robert R.,
Mikael Kubista,
Ales Tichopad: “Statistical Aspects of Quantitative Real-Time PCR Experiment Design”, 50, **Methods**, 2010, s. 231-236.

- Kobu, Bülent: **Endüstriyel Kalite Kontrol**, İstanbul Üniversitesi İşletme Fakültesi İşletme İktisadi Enstitüsü Yayınları, 1987.
- Kobu, Bülent: **Üretim Yönetimi** İstanbul Üniversitesi İşletme Fakültesi İşletme İktisadi Enstitüsü Yayınları, 1998.
- Koç, Banu,
Figen Kaymak Ertekin: “Yüzey Yanıt Yöntemi ve Gıda İşleme Yöntemleri”, Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Derleme, GD08060, 2009, İzmir.
- Kolarik, W.J.: **Creating Quality, Concepts, Systems, Strategies and Tools**, Industrial Engineering Series, Singapore, McGraw-Hill Inc, 1995.
- Korkut, Deniz,
Ahmet Soysal: **Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar**, Halk Sağlığı Uzmanları Derneği (Hasuder) Yayınları, Ankara, 2013.
- Köksoy O.: “Taguchi ve Cevap Yüzeyi Felsefelerinin Birleştirilmesi: Problem ve Çözüm Teknikleri”, Hacettepe Üniversitesi, 2001.
- Kulaç, İbrahim,
Yücel Ağirdil,
Mehmet Yakın: "Sofralarımızdaki Tatlı Dert, Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar ve Halk Sağlığına Etkileri", **Türk Biyokimya Dergisi (Turkish Journal Of Biochemistry- Turk J Biochem)**, 31(3), 2016, s.151-155.

- Kutyavin, I.V.,
I.A. Afonina, A. Mills,
V.V. Gorn,
E.A. Lukhtanov,
E.S. Belousov,
M.J. Singer,
D.K. Walburger,
S.G. Lokhov, A.A.
Gall,
R. Dempcy, M.W.
Reed, R.B. Meyer, J.
Hedgpeth:
- “3'-Minor Groove Binder-DNA Probes Increase Sequence Specificity at PCR Extension Temperatures”, **Nucleic Acids Research**, 28, 2000, s. 655-661.
- Lafrance R.,
C. Villicana,
J. B. Vald´ez-Torres,
H. Martínez-Montoya,
O. Castillo-Ruiz,
S. E. Aleman-Castillo,
M. J. Esparza-Araiza,
J. Leon-Felix:
- “Optimization of PCR-Based TYLCV Molecular Markers by Response Surface Methodology”, **Gene**, 785, 145606, 2021.
- Lee Wayne:
- Experimental Design and Analysis**, W.H. Freeman And Company, ABD, 1935.
- Lipp, Markur,
Peter Brodmann,
Klaus Pietsch,
Jean Pauwels,
Elke Anklam:
- “IUPAC Collaborative Trial Study of a Method to Detect Genetically Modified Soybeans and Maize in Dried Powder”, **Journal of AOAC International**, 82, 1999, s. 923-928

- Logothesis, N.: **Managing For Total Quality, From Deming to Taguchi and SPC**, New York, Prentice-Hall, 1992.
- Lunani, M.,
V.N. Nair,
G.S. Wasserman: “Graphical Methods for Robust Design With Dynamic Characteristics”, **Journal of Quality Technology**, 29(3), 1997, s. 327-338.
- Madu, C.N., C.
PracticeKuen : “A Comparative Analysis Of Quality Manufacturing Firms in The U.S. And Taiwan”, **Decision Science**, 26:5, U.S.A., 1995.
- Matsuoka, T.,
H. Kuribara, K.
Takubo,
H. Akiyama, H. Miura,
Y.Goda, Y. Kusakabe,
K. Isshiki, M. Toyoda,
A. Hino: “Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (*Zea mays*)”, **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 50, 2002, s. 2100-2109
- Maxam, A., W. Gilbert: “A new method Sequencing DNA”, **Proceeding of the National Academy of Sciences**, 74, 1977, s. 560-564.
- Moen, R.D., T.W.
Nolan, L.P. Provost : **Improving Quality Through Planned Experimentation**, New York, McGraw-Hill, 1991.
- Montgomery, Douglas C.: **Introduction To Statistical Quality Control**, New York, John Wiley & Sons, Fourth Edition, 2001.
- Montgomery, Douglas C.: **Design and Analysis of Experiments**, 6. Edition, Wiley-Interscience, New York, ABD, 2004.

- Morris Max, D.: **Design of Experiments an Introduction Based on Linear Models**, CRC Press, ABD, 2011.
- Myers, R.H. **Response Surface Methodology**, Ally and Bacon Inc., Boston, 1971.
- Myers, R.H.,
D.C. Montgomery: **Response Surface Methodology Process and Product Optimization Using Designed Experiments**, John Wiley & Sons, Inc., ABD, 2002.
- Myers, R.H.,
D.C. Montgomery,
G.H. Vining,
T.J. Robinson: “Generalized Linear Models with Applications in Engineering and the Sciences”, 2. Edition John Wiley and Sons, 2012.
- Nabi, Nesrine,
Mohamed Salem
Zellama,
Ahmed Ben Hafsa,
Maher Chaouachi: “A new Multiplex PCR-based Strategy to Detect GM Maize Events with 2k Fractional Factorial Plan in Processed Food”, **Journal of Research in Biological Sciences**, 02, 2016, s.35-43.
- Namazcı, Gürsel: “Endüstriyel Tarım ve Endüstriyel Tarımsal Uygulamalarının Çevreye Etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Trabzon, 2019
- Natrella, Mary G.: **Design and Analysis of Experiments, Quality Control Handbook**, Section 27, Editör: J. M. Juran, Dr. Frank M. Gryna, R. S. Bingham, Jr, McGraw-Hil Book Company, 1974

- Niens, Marijke,
Geert T. Spijker,
Arjan Diepstra,
Gerard J. te Meerman:
“A factorial experiment for optimizing the PCR conditions in routine genotyping”, **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 2005, s. 157-162.
- Onishi, M., T.
Matsuoka, T. Kodama,
K. Kashiwaba,
S. Futo, H. Akiyama,
T. Maitani, S. Furui,
T. Oguchi, A. Hino:
“Development of A Multiplex Polymerase Chain Reaction Method for Simultaneous Detection of Eight Events of Genetically Modified Maize”, **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 53, 2005, s. 9713-21.
- Önde, Sertaç:
Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar, 2. Basım, ODTÜ Yayıncılık, Ankara, 2011.
- Öz Aydın S.:
“Rapid (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) Belirleyicileri Ve Bitki Sistematiği”, **Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, 6, 2004.
- Özcan, Sebattin ,
Serkan Uranbey,
Cengiz Sancak,
İskender Parmaksız,
Ekrem Gürel,
Mehmet Babaoğlu:
“Agrobacterium Aracılığıyla Gen Aktarımı”, **Bitki Biyoteknolojisi II-Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları**, (Ed. Sebahattin Özcan, Ekrem Gürel, Mehmet Babaoğlu), Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 2001, s. 148, 149.
- Özmen, Murat:
“Tavuk Trakelerinde *Mycoplasma Gallisepticum*’un Real-Time Pcr Tekniği İle Saptanması Ve İstatistik Analizi”, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2011.

- Pamuk, Şebnem: "Genetiği Değiştirilmiş Gıdalara Genel Bir Yaklaşım", **Kocatepe Veterinary Journal**, 3(2), 2010, s.91-100.
- Park, S.,
G. Vining: **Statistical Proses Monitoring and Optimization**,
New York, Marcel Dekker, 2000, s. 489.
- Permingeat, H.R.,
M.I. Reggiardo,
R.H. Vallejos: "Detection and Quantification of Transgenes in Grains by
Multiplex and Real-Time PCR", **Journal of
Agricultural Food Chemistry**, 50, 2002, s. 4431-4436.
- Persing H. D.: "Polymerase Chain Reaction: Trends to benches", **J.
Clin. Microbiol.**, 29, 1991, s. 1281-1285.
- Prichard R.,
Tait A.: "The Role of Molecular Biology in Veterinary
Parasitology", **Vet. Parasitol.**, 98, 2001, s. 169-194.
- Pryor, Robert J.,
Carl T. Wittwer: "Real Time Polymerase Chain Reaction and Melting
Curve Analysis", (Çevrimiçi), <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16916250/>, **Methods Mol Biol**, 336:19, 2006, s. 19-32.
- Querci, M., M. Jermini,
G.V. Eede: "The Analysis of Food Samples for the Presence of
Genetically modified organisms", **Office for Official
Publications of the European Communities**, 2006.
- Rand, J.R.: **Kalite ve Öğrenme**, Executive Excellence Dergisi, Rota
Yayınları, İstanbul, 1997.

- Roberts, R.J., “Restriction and Modification Enzymes and Their Recognition Sequences”, **Gene Amplif Anal**, 5, 1987, s. 1-49.
- Roux K.H.: “Optimization and troubleshoo-ting in PCR”, **Genome Research**, 4, 1995, s. 185-194.
- Rønning, S.B., K.G. Berdal, C.B. Andersen, A. Holst-Jensen: “Novel Reference Gene, PKABA1, Used in a Duplex Real-Time PCR for Detection and Quantification of Wheat and Barley”, **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 54, 2006, s. 682-687.
- Sanger, F., S. Nicklen, A.R. Coulson: “DNA Sequencing with Chain-Terminating İnhibitors”, **Proceeding of the National Academy of Sciences**, 7, 1977, s. 5463-5467.
- Sert Ş.: “Düzenli Mezopor Yapısına Sahip Sio2 Temelli Adsorban Sentezi Ve Uranyum Sorpsiyonunda Kullanılabilirliğinin İncelenmesi”, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2009.
- Siqueira J. F., I.N. Roças: “PCR Methodology as Avaluable Tool for Identification of Endodontic Pathogens”, **J. Dent.**, 31(5), 2003, s. 333-339.
- Somma, M., M. Querci, M. Jermini, G. Van den Eede: “Extraction and Purification of DNA, In The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically, Modified Organisms”, **European Commission Joint Research Centre**, Özel Baskı, 1.03.114:4, 2004.

- Southern, E.M.: “Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis”, **Journal Molecular Biology**, 98, 1975, s. 503- 517.
- Souza, H. J., C.B. Moyses, F.J. Pontes, R.N. Duarte, C. E. Silva, F.L. Alberto, M.B. Silva: “Molecular Assay Optimized by Taguchi Experimental Design Method for Venous Thromboembolism Investigation”, **Molecular and Cellular Probes**, 25, 2011, s. 231-237.
- Şanyılmaz, M.: “Deney Tasarımı ve Kalite Geliştirme Faaliyetlerinde Taguchi Yöntemi ile Bir Uygulama”, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2006.
- Şen, Selen, Sevin Altıncaynak: "Genetiği Değiştirilmiş Gıdalar ve Potansiyel Sağlık Riskleri", **Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi**, 18(1), 2014, s.31-38.
- Şenoğlu Birdal, Şükrü Acıtaş: **İstatistiksel Deney Tasarımı**, Nobel Yayınları, 1. Baskı, Ankara, 2010.
- Şirvancı, M.: **Kalite İçin Deney Tasarımı Yaklaşımı, Taguchi Yaklaşımı**, Literatür Yayınları, İstanbul, 1997.
- Taguchi, G.: “Quality Engineering (Taguchi Methods) For the Development Of Electronic Circuit Technology”, **IEEE Transactions on Reliability** (IEEE Reliability Society), 44: 2, s. 225–229.

- Tamhane Ajit C.: **Statistical Analysis of Designed Experiments**, John Wiley & Sons, ABD, 2009.
- Tania, P.,
J.S. Deborah: “An Annotated Bibliography of Application Papers Using Certain Classes of fractional factorial and related designs”, **Journal of Statistical Planning and Inference** 106, 2002, s. 245 - 269.
- Taverniers, I.,
E. Van Bockstaele,
M. De Loose: “Cloned Plasmid DNA Fragments as Calibrators for Controlling Gmos Different Real-Time Duplex Quantitative PCR Methods”, **Ana. Bioana. Chem**, 378, 2004, s. 1198-1207.
- Tekeli, İlhan, **Kültür Politikaları ve İnsan Hakları Bağlamında Doğal ve Tarihi Çevreyi Korumak**, Tarih Vakfı Yurt Yayınları, İstanbul, 2009.
- Terry, C.F., N. Harris: “Event-Specific Detection Of Roundup Ready Soya Using Two Different Real Time PCR Detection Chemistries”, **European Food Research Technology**, 213, 2001, s. 425-431.
- Thanakiatkrai,
Phuvadol,
Welch Lindsey: “Using the Taguchi Method for Rapid Quantitative PCR Optimization with SYBR Green I”, **Int J Legal Med**, 2011,
- Thelwell, N.,
S. Millington, A.
Solinas,
J. Booth, T. Brown: “Mode of Action and Application of Scorpion Primers to Mutation Detection”, **Nucleic Acids Research**, 28, 2000, s. 3752-3761.

- Tiryaki, İskender,
Zeki Acar: "Genetik Yapısı Değiştirilmiş Bitkiler: Dünü, Bugünü ve Geleceği", **Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 20:2, 2004, s.121-126.
- Tozkoparan, D.: "Plasma Sprey Kaplama Kalitesine Etki Eden Faktörlerin Taguchi Yöntemiyle Optimizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010.
- Türkoğlu, Selda: "Avrupa Birliği'nde Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar ve Yeni Gıdalara İlişkin Yasal Düzenlemeler", AB Uzmanlık Tezi, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Dış İlişkiler Ve Avrupa Birliği Koordinasyon Dairesi Başkanlığı, Ankara, 2007.
- Tütünoğlu, Burçak, "Gibberellik Asitin (Ga3) Allium Cepa L. Var. Cepa (Alliaceae) Üzerindeki Sitotoksik Ve Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2015.
- Tyagi, S., F.R. Kramer: "Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridisation", **Nature Biotechnology**, 14, s. 303-308.
- Ülker A.: "Yüksek Yoğunluklu Polietilen Polimer Malzemenin Sürtünme Karıştırma Kaynağında Kaynak Parametrelerinin Kaynak Mukavemeti Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması Ve Kaynak Parametrelerinin Taguchi Deneysel Tasarım Yöntemi İle Optimizasyonu", Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2015.

- Ünal, Taha Turgut: “Gıda ve Yem Ürünlerinde Gdo Tespiti için Yeterlilik Test Kiti Geliştirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2019.
- Ürküt Çöpçüoğlu, Zümrüt: *Listeria Monocytogenes* Tayinine Yönelik Dna Hibridizasyonuna Dayalı Elektrokimyasal Genosensör Tasarımı Ve Optimizasyonu, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011, İzmir.
- Vaïtilingom, M., H. Pijnenburg, F. Gendre, P. Brignon: “Real-Time Quantitative PCR Detection of Genetically Modified Maximizer Maize and Roundup ready Soybean in Some Representative Foods”, **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 47, 1999, s. 5261-526.
- Valipour, Ebrahim: “Doğal Bakteri Suşlarından Tirozinaz Enzim İzolasyonu, Karakterizasyonu, Üretici Genin Klonlanması, Rekombinant Enzimin Karakterizasyonu Ve L-Dopa Ve Melanin Üretimi Gibi Biyoteknolojide Kullanılabilirliği”, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2015.
- Wadle, S., M. Lehnert, S. Rubenwolf, R. Zengerle, F. von Stetten: “Real-time PCR probe optimization using design of experiments approach”, **Biomolecular Detection and Quantification**, 7,2016, S. 1-8.
- Wall, E.M., T.S. Lawrence, M.J. Green and M.E. Rott: “Detection and identification of transgenic virus resistant papaya and squash by multiplex PCR”, **European Food Research Technology**, 219, 2004, s. 90- 96.

- Watson, D.J., M. Gilman, J. Witkowski, M. Zoller, **Recombinant DNA. Scientific American Books**, 1992, New York.
- Weighardt, F.: “Quantitative PCR for GMO Detection”, **Office for Official Publications of the European Communities**, 10. Bölüm, 2006, s. 175-193.
- Weining, S., P. Langridge: “Identification and Mapping of Polymorphism in Cereals Based on the Polymerase Chain Reaction”, **Theor. Appl. Genet.**, 82, 1991, s. 209-216.
- Yang, L., A. Pan, K. Zhang, J. Guo, C. Yin, J. Chen, C. Huang, D. Zhang: “Identification and Quantification of Three Genetically Modified Insect Resistant Cotton Lines Using Conventional and Taqman Real-Time Polymerase Chain Reaction Methods”, **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 53, 2005, s. 6222-6229.
- Yetilmezler, Elif: “Sığır Sütünde Brucella ve Listeria Tanısı için PCR Optimizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, 2011.
- Yıldırım, Ahmet, Necdet Kandemir, Özlem Ateş Sönmezoğlu, Tuğba Güleç: “Buğdayda Polimer Zincir Reaksiyonu ve Olası Sorunların Optimizasyonu”, **Anadolu Tarım Bilim Dergisi**, 26:1, 2011, s. 36-39.
- Yin S., S. Yang, Y. Shang, X. Xuepeng Cai, X. Liu: “Development and Optimization of Multiplex- PCR for Simultaneous Detection of Porcine Pseudorabies Virus,

- Porcine Parvovirus, and Porcine Circovirus Type 2”, **Intern. J. Appl. Res. Vet. Med**, 10, 2012, s. 169-175.
- Yoke-Kqueen, C.,
S. Radu: “Random amplified polymorphic DNA analysis of genetically modified oraganisms”, **Journal of Biotechnology**, 127, 2006, s. 161-166.
- Yücel, Mustafa: “8. Türkiye Ekonometri ve İstatistik Kongresi”, İnönü Üniversitesi, Malatya, 24-25 Mayıs 2007.
- Zhang, Qiao Yan,
Wen Wu Zhou,
Yu Zhou, Xiao Fu
Wang, Jun Feng Xu: “Response Surface Methodology to Design a Selective Co Enrichment Broth of Escherichia coli, Salmonella Spp. and Staphylococcus aureus for Simultaneous Detection by Multiplex PCR”, *Microbiological Research*, 167, 2012, s. 405-412.
- Zimmermann, A.,
J. Lüthy, U. Pauli: “Quantitative and Qualitative Evaluation of Nine Different Extraction Methods for Nucleic Acids on Soya Bean Food Samples”, **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und – Forschung**, A 207, 1998, s. 81–90.

ÖZGEÇMİŞ

İlkokulu Ziya Gökalp İlkokulu'nda, orta ve lise öğrenimini Zeytinburnu İmam Hatip Lisesi'nde tamamladı. Lisansını 2005 yılında Selçuk Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünde tamamladı. Sonrasında İstanbul Üniversite İşletme Bölümünde Üretim Yönetimi Ana Bilim dalında tezli yüksek lisansını 2008 yılında tamamladı. Yüksek lisans tezinde istatistiksel proses kontrolü ve ISO22000 üzerinde çalıştı. 2008 yılında yine İstanbul Üniversite İşletme Bölümünde Üretim Yönetimi Ana Bilim dalında doktora programına başladı. Ayrıca 2007-2009 yılları arasında Elvan Gıda A.Ş.'de kalite mühendisi olarak çalıştı. 2011 yılında Tarım Bakanlığı'nın Zeytinburnu İlçe Müdürlüğü'ne atandı. Burada 2016 yılının sonuna kadar gıda kontrol görevlisi olarak çalıştı. Sonrasında 2016-2020 yılları arasında Sakarya Mısır Araştırma Enstitüsü'nde araştırmacı olarak görev yaptı.

2020 Aralık ayından beri halen Balıkesir Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü'nde Mikotoksin Laboratuvarı'nda görev yapmakta olan Meryem DEMİRCİOĞLU evli ve 6 yaşında Kerem, 5 yaşında Betül ve 3 yaşında Elif adında 3 çocuk annesidir.