

Hidrokarbonla Kirlenmiş Topraklardan İzole Edilen Bakterilerden Pigment Üretimi

Sezen Yıldırım

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Eylül, 2014

Production of Pigment by Isolated Microorganisms from Hydrocarbon Pollution of Soil

Sezen Yıldırım

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

September, 2014

Hidrokarbonla Kirlenmiş Topraklardan İzole Edilen Bakterilerden Pigment Üretimi

Sezen Yıldırım

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Yönetmelięi Uyarınca

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Ahmet Çabuk

İkinci Danışman: Yrd. Doç. Dr. Pınar Aytar

Eylül, 2014

ÖZET

Renk maddeleri her türlü ürün için önemlidir. Tüketici, ürünün ilk önce rengine daha sonra içeriğine dikkat etmektedir. Bu nedenle ilk başlarda doğada bulunan bitkiler, daha sonraları ise mikroorganizmalar renk elde etmek için kullanılmaktadır. Doğal olana ilgi arttıkça, sentetik boyaların kullanımı azalmaya başlamış ve mikrobiyal pigmentlerin pazar payı artmaya başlamıştır.

Sunulan tez çalışması kapsamında, başka bir çalışmada kullanılmak üzere Eskişehir sanayi bölgesinde hidrokarbonla kirlenmiş topraklardan izole edilen mikroorganizmalardan pigment üretici 4 izolat olduğu belirlenmiştir. Etkin üretici 4 izolat için mineral tuz ortamında gerçekleşen inkübasyon sonrasında örneklerden ekstraksiyon çalışmaları yapılmış ve ekstrakte edilebilen C1 ve C7 izolatları çalışma için seçilmiştir.

Etkin üretici izolat ile mikrobiyal pigment üretimi için besiyeri bileşenleri ve inkübasyon süresi optimizasyonu yapılmıştır. Optimum inkübasyon süresi 10 gün, optimum pH ise 7 olarak belirlenmiştir. C1 izolatı için mikrobiyal pigment üretimine en çok gün, CH_3COONa , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 etki ederken C7 izolatı için gün, NH_4Cl , KH_2PO_4 , maya özütü, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, glikoz etki etmektedir. Mikrobiyal pigment üretici izolatlar 16S rRNA sekans analizi sonuçlarına göre %100 benzerlik oranı ile *Gordonia terrae* strain M1-3 ve *Enterobacter ludwigii* strain AB-188 ile benzerlik göstermiştir.

Anahtar Kelime: Mikrobiyal pigment, *Gordonia terrae*, *Enterobacter ludwigii*, Plackett-Burman

SUMMARY

Color is important for all kinds of products. At first, consumers take care of color of product and then content. Therefore, at first naturally occurring plants, and later microorganism is used to obtain the color. When interest in natural ones increased, began to decrease the use of synthetic dyes and microbial pigments market share began to increase.

The thesis project presented, in order to use in another project, it has been identified from the microorganisms which are insulated from the hydrocarbon polluted soil in Eskişehir industrial area that there are 4 isolates which are pigment generator. After incubation of 4 efficient producers isolates in mineral salts medium, extraction studies have been made from the samples and C1 and C7 extractable isolates have been selected for the study.

With efficient producers isolates, medium components and the incubation time are optimized for microbial pigment production. The optimum incubation time 10 days and optimum pH was determined to be 7. While days, CH₃COONa, FeSO₄·7H₂O, K₂HPO₄, KH₂PO₄ effects on C1 isolates for microbial pigment production, for C7 isolate effects from days, NH₄Cl, KH₂PO₄, yeast extract, MgSO₄·7H₂O, glucose. When 16S rRNA analysis was carried out, this bacterium was shown that it was a close relative with %100 similarity ratio of *Gordonia terrae* strain M1-3 and *Enterobacter ludwigii* strain AB-188 species.

Key words: Microbial pigment, *Gordonia terrae*, *Enterobacter ludwigii*, Plackett-Burman

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının başlangıcından bitimine kadar bilgisi ve tecrübesi ile her türlü desteği sağlayan, ilgi ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli danışman hocam Doç. Dr. Ahmet ÇABUK'a ve ikinci danışmanım olan Yrd. Doç. Dr. Pınar AY TAR'a,

İstatistiksel deney tasarımları noktasında desteğini gördüğüm hocam Prof. Dr. Nimetullah BURNAK ve Arş. Gör. Yeliz BURUK'a,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardım ve dayanışmalarından ötürü başta Serap GEDİKLİ ve Ezgi YARDIMCI olmak üzere tüm Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışanlarına;

Hayatımın her anında olduğu gibi tez çalışmam süresince de her türlü desteği sağlayan, her zaman moral kaynağı olan, gösterdikleri sabır ve anlayıştan ötürü değerli aileme teşekkür ederim.

Sezen YILDIRIM

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZET.....	i
SUMMARY.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Pigmentler	2
2.1.1.Sınıflandırılması	5
2.1.2. Karakteristik Özellikleri ile Doğal Pigmentler.....	5
2.1.2.1.Tetrapiol Türevleri.....	5
2.1.2.2. İzoprenoid Türevleri.....	6
2.1.2.3.Tetrapiol'den Farklı n-heterosiklik Bileşikler	6
2.1.2.3.1.Pürinler.....	6
2.1.2.3.2.Pterinler.....	6
2.1.2.3.3.Flavinler.....	6
2.1.2.3.4.Fenazinler.....	6
2.1.2.3.5.Fenoksazinler.....	6
2.1.2.3.6.Betalainler.....	6
2.1.2.4.Benzopiran Türevleri.....	7
2.1.2.5.Kinonlar.....	7
2.1.2.6.Melanin	8
2.1.3.Mikrobiyal Pigment.....	11
2.1.3.1.Bakteriler.....	13
2.1.3.2.Funguslar.....	15

2.1.3.3. Yeşil Mikroalgler	16
2. 1.4. Mikrobiyal Pigment Üretimine Örnekler.....	22
2.1.4.1. <i>Monascus purpureus</i>	22
2.1.4.2. <i>Rhodotorula</i>	23
2.1.5. Mikrobiyal Pigmentlerin Pazar Payı.....	23
2.1.6. Fiziksel ve Kimyasal Koşulların Mikrobiyal Pigment Üretimi Üzerine Etkisi.....	26
2.1.7. Mikrobiyal Pigment Üretimi Üzerine Yapılan Bazı Çalışmalar.....	27
2.1.7.1. Kullanılan Çözgenler ve Özellikleri.....	29
2.1.8. Çeşitli Biyosüreçlerde Uygulanabilecek Potansiyel Deneysel Tasarımlar.....	30
2.1.9. Plackett Burman İstatistiksel Deney Tasarımı.....	31
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	32
3.1. Materyal.....	32
3.1.1. Kullanılan Büyüme Ortamları.....	32
3.1.1.1. Kullanılan Büyüme ortamı.....	32
3.1.1.2. Nutrient Agar.....	33
3.1.1.3. Nutrient Broth.....	33
3.1.2. Kullanılan Çözeltiler.....	33
3.1.3. Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar.....	33
3.2. Yöntem.....	34
3.2.1. Kullanılan Mikroorganizmalar.....	34
3.2.2. Etkin Pigment Üretici İzolatın Belirlenmesi.....	34
3.2.3. Renk Maddesinin Ekstraksiyonu.....	34
3.2.4. Mikrobiyal Pigment Standart Grafiğinin Hazırlanması.....	35
3.2.5. Plackett Burman İstatistiksel Deney Tasarım Yöntemi ile Besiyeri Bileşimi Optimizasyonu.....	35
3.2.5.1. Plackett Burman İstatistiksel Deney Tasarım Yöntemi Doğrulama Deneyleri.....	37
3.2.6. Üretilen Mikrobiyal Pigmentin Antimikrobiyal Aktivite Deneyleri.....	37
3.2.7. Çevresel Faktörlerin Mikrobiyal Pigment Üretimi Üzerine Etkisi.....	37
3.2.7.1. pH'ın Etkisi.....	37
3.2.8. Pigment Karakterizasyonu.....	38
3.2.8.1. FTIR analizi.....	38
3.2.9. Mikrobiyal Pigment Üretici İzolatın Belirlenmesi.....	38
3.2.9.1. Üretici İzolatın Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyonu.....	38
3.2.9.1.1. Üretici Mikrororganizmadan DNA Ekstraksiyonu	39
3.2.9.1.2. PCR Ürünlerinden Dizi Analizi	40

4. BULGULAR.....	41
4.1. Alınan Toprak Örneklerinden Mikroorganizma İzolasyonu.....	41
4.2. Mikrobiyal Pigment Üretici Etkin İzolatın Belirlenmesi.....	41
4.3. C1 ve C7 İzolatları ile Mikrobiyal Pigment Üretimi Optimizasyonu.....	41
4.4. Plackett Burman İstatistiksel Deney Tasarım Yöntemi ile Besiyeri Bileşimi Optimizasyonu.....	42
4.4.1. Plackett Burman İstatistiksel Deney Tasarım Yönteminin Önerdiği Doğrulama Deneyleri.....	42
4.4.2. Plackett Burman İstatistiksel Deney Tasarımına göre Sonuca Etkili Besiyeri Bileşenleri.....	43
4.5. Üretilen Mikrobiyal Pigmentin Karakterizasyonu.....	44
4.5.1. Spektrofotometrik Spektrumların Belirlenmesi.....	44
4.5.1.2. Standart Eğri Grafiklerinin Hazırlanması.....	45
4.5.2. FTIR Spektroskopisi ile Temel Yapı Analizi.....	46
4.6. Renk Maddelerinin pH Stabilesi.....	48
4.7. Mikrobiyal Pigmentin Antibakteriyel Aktivitesi.....	50
4.8. Pigment Üreticilerinin Karakterizasyonları.....	51
5.TARTIŞMA-SONUÇ.....	52
6.KAYNAKLAR DİZİNİ.....	61

KISALTMALAR DİZİNİ

°C :	Santigrat derece
µl :	Mikrolitre
L :	Litre
mg :	Miligram
ml :	Mililitre
r.p.m. :	Revolutions per minute / Dakikada
FTIR :	Fourier Transform Infrared Spektroskopi
nm :	Nanometre
PCR :	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
g :	Gram

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 2.1. Gıda endüstrisinde kullanılan bazı pigmentlerin kimyasal yapıları (Dufosse et al., 2006)	9
Şekil 2.2. <i>Monascus purpureus</i> 'tan pigment ekstraksiyon basamakları.....	22
Şekil 4.1. Besiyeri bileşenlerinin C1 izolatından elde edilen mikrobiyal pigment üretimi üzerine etkisi. (L:gün, J: CH ₃ COONa, F: FeSO ₄ .7H ₂ O, A: K ₂ HPO ₄ , D: KH ₂ PO ₄)	43
Şekil 4.2. Besiyeri bileşenlerinin C7 izolatından elde edilen mikrobiyal pigment üretimi üzerine etkisi. (L:gün, C: NH ₄ Cl, B: KH ₂ PO ₄ , H: maya özütü, E: MgSO ₄ .7H ₂ O, K:glikoz)	44
Şekil 4.3. C1 izolatının 465 nm'deki standart eğri grafiği.....	45
Şekil 4.4. C7 izolatının 375 nm'deki standart eğri grafiği.....	46
Şekil 4.5. C7 izolatından üretilen mikrobiyal pigmentin FTIR spektroskopisi bulguları.....	47
Şekil 4.6. C1 izolatından üretilen mikrobiyal pigmentin FTIR spektroskopisi bulguları.....	48
Şekil 4.7. C7 ve C1 izolatlarının farklı pH'lardaki mikrobiyal pigment üretimleri.....	49
Şekil 4.8. C1 ve C7 izolatlarından üretilen mikrobiyal pigmentlerin antibakteriyel aktiviteleri.....	50

ÇİZELGELER DİZİNİ**SAYFA**

Çizelge 2.1. Karotenoid üretimi gerçekleştiren algler.....	17
Çizelge 2.2. Pigment üreten mikroorganizmaların istesi (Malik et al., 2012).....	18
Çizelge 2.3. Dünya pazarında izin verilen pigmentler.....	25
Çizelge 3.1.Plackett Burman İstatistiksel Deney Tasarım Yöntemi tarafından önerilen besiyeri bileşimleri.....	36
Çizelge 3.2.Mikroorganizmanın 16S rRNA genlerinin çoğaltılması için gerekli reaksiyon şartları.....	39
Çizelge 4.1.İzolatların morfoloji ve gram özellikleri ile mikrobiyal pigment üretim yetenekleri.....	41
Çizelge 4.2. Plackett Burman Deney Tasarım Yöntemi tarafından önerilen besiyeri içeriklerinin mikrobiyal pigment üretim değerleri. (Çalışma koşulları: 35 °C; 125 r.p.m.; 5 ve 10 gün, ölçüm koşulları; 25 °C)	42
Çizelge 4.3.Plackett Burman istatistiksel deney tasarım yönteminin önerdiği doğrulama besiyerleri mikrobiyal pigment üretim değerleri.....	42

BÖLÜM 1

1.GİRİŞ

Renkler çevreyi algılama açısından önemlidir ve yüksek yapılı canlılarda bu algılama birbirleriyle olan etkileşim için daha da önemlidir. Örneğin birçok kuş karşı cinsi çekmek için parlak, renkli tüylerini gösterir, bir bukalemun için renk kamuflaj açısından önemli iken zehirli bir kurbağa parlak rengiyle avcılarını uyarır (Liu, 2009). Renk yediğimiz gıdalarda da önemli bir rol oynar. Tüketici, bir gıda maddesinin ilk olarak göze hitap etmesini ister. Gıda maddesinin rengi, insan üzerinde olumlu veya olumsuz etki yaratabilir. Herhangi bir gıdanın tadına ve diğer özelliklerine ait değerlendirmeler, renk algısından sonra söz konusu olmaktadır. Buna göre, gıda maddelerinin rengi gıdaların seçiminde önemli bir kalite kriteridir. Bu sebepten, gıda ürünlerinin tabii rengini korumak ve hatta bazen düzeltmek üzere renk maddeleri kullanılmaktadır (Büyüksırt, 2011). Örneğin, tüketici çekici olmayan bir renk ile karşılaştığı zaman, gıdanın besleyici olmadığını ya da zararlı olduğunu varsayar. Öte yandan, tipik olmayan renkteki ürünler (örneğin; yeşil peynir veya mavi içecek) çoğu durumda tüketiciler tarafından reddedilir. Domates kırmızı, limon sarı veya havuç turuncu gibi besin öğelerinin tipik renkleri ile ilişkilendirilir. Bu nedenle, renk gıdaların birincil kimliğidir ve bozulmuş gıda tüketimine karşı da koruyucu bir önlemdir (Dufosse, 2006). Gıdalarda yer alan sentetik boyalar tartışmalı bir konudur ve uzun yıllardır çelişkilere yol açmıştır. Ticari olarak üretilen yapay renk maddeleri (sertifikalı renk maddeleri), doğal kaynaklardan üretilen renk maddelerine kıyasla, boyama güçlerinin yüksek olması, teknolojik işlemlere karşı daha stabil olmaları, az miktarlarda kullanılarak ürüne istenilen rengi kazandırmaları ve böylece maliyeti düşürmeleri nedeniyle, gıda üreticileri tarafından doğal renk maddelerine tercih edilmektedirler (Büyükpamukçu, 1995). Modern tüketicinin sentetik boyaları incelemesi ve olumsuz değerlendirmesi sebebiyle doğal renklendiricilere olan ilgi artmıştır (Dufosse, 2006). Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar doğal pigment kaynaklarıdır. Bazı şirketler gıdaları gıdalarla boyamaya karar vermişlerdir bunun için de esas olarak bitki özleri ve bitkilerden ekstrakte edilmiş pigmentler kullanılmıştır. Örneğin kırmızı için pancar, çilek ve biber, sarı için safran ve kadife çiçeği, yeşil için ise yeşil yapraklı sebzeler kullanılmıştır.

Doğal renk maddeleri, bitkisel, hayvansal, mikrobiyal ve inorganik kaynaklardan ve hatta meyve sebze sanayi atıklarından elde edilen özütler şeklinde olabilmektedir. Renk

aralıkları sınırlı olan bu renk maddeleri, yapay renklendiricilere göre daha zayıf bir stabiliteye ve renklendirme gücüne sahip olmasına rağmen son yıllarda yapılan toksikolojik araştırmalarla yapay renklendiricilerin sağlık üzerine olumsuz etkilerinin ortaya konması nedeni ile gıdaların renklendirilmesinde yeniden kullanılmaya başlanmıştır (Ashfaq and Masud, 2002).

Yapılan bu tez çalışmasında hidrokarbon ile kirlenmiş alanlardan izole edilmiş bazı bakteri izolatlarının pigment üretme yetenekleri değerlendirilmiş ve pigment üretim ortamında etkili olabilecek bileşenler, Plackett Burman deneysel tasarımı ile optimize edilmiştir. Sonrasında elde edilen pigment maddeleri çeşitli tekniklerle karakterize edilmiştir.



BÖLÜM 2

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Pigmentler

Pigmentler görünür bölge dalga boyu aralığında ışık absorbe eden kimyasal bileşiklerdir. Üretilen molekül kromofor adı verilen özgül moleküler yapıya sahiptir. Bu yapı enerjiyi yakalar ve dış yörüngedeki bir elektronu kopararak bir üst orbitale gönderir. Absorblanamayan enerji yansıtılır. Yansıtılan enerji göz tarafından yakalanır ve uyarılan sinir hücreleri tarafından beyne iletilerek rengin algılanması sağlanır (Delgado-Vargas, 2000).

Teknik anlamda bir pigment; suda çözünmeyen ve saydam olmayan, görünür bölgede ışığı soğurabilen ve çeşitli malzemelere renk vermekte kullanılan, yoğun renkli kimyasal örtücü bileşikler olarak tanımlanabilir. Pigmentler; renk aralığı sınırlı doğal pigmentler ve renk aralığı geniş olan sentetik pigmentler olarak ayrılabilir. Sülfatlar, çeşitli metal oksitler ve sülfürler doğal inorganik pigment olarak kullanılır. Pigmentlerin organik ya da inorganik birçok örneği vardır.

Doğal organik pigmentler; metallerle oluşturdukları koordinasyon bileşiklerini, suda çözünmeyen organik bileşikleri ve organik bileşiklerin metal tuzlarını kapsar. Organik pigmentler inorganik pigmentlere göre daha parlak ve dayanıklıdır. Pigmentler esas olarak boyarmadde özelliği gösteren maddelerdir. Ancak bir boyarmadde ile bir pigment karşılaştırıldığında önemli farklılıklar görülebilmektedir. Pigmentlerin boyarmaddelerden farkı; mekanik olarak materyal yüzeyine tutunmasıdır. Ayrıca pigmentler suda çözünmezler. Dolayısıyla sudaki yağ ve yağdaki su emülsiyonlarında dağılmış halde kullanılırlar. Pigmentlerin çoğu; yüksek haslık değerleri sayesinde olumsuz koşullarda renklerini koruyabilirler. Geçmişte pigmentler; boya, matbaa mürekkebi, plastik, kauçuk, kâğıt v.b. gibi alanlarda kullanılmıştır (Büyüksirt, 2011).

Boyama sanatı uzun bir tarihe sahiptir ve birçok boya tarih öncesine kadar uzanır. Boyalar Avrupa'da Bronz Çağı'nda uygulanmıştır. Doğal boyaların kullanımının ilk yazılı kaydı Çin'de bulunan M.Ö 2600'e dayanır. Hint yarımadasında boyamanın erken İndus Vadisi döneminde (M.Ö 2500) bulunduğu, Mohenjodaro ve Harappa Uygarlığı'na (M.Ö. 3500) ait bez kalıntılardaki kökboyası izleri ve renkli giysilerin bulguları ile kanıtlanmış olmuştur.

Mısır'da renkli bezlere sarılmış mumyalar bulunmuştur. Mısır'da Kral Tutankamon'un mezarında bulunan kırmızı kumaşların kimyasal testleri alizarin yani kök boyadan elde edilen bir pigmentin varlığını gösterdi. Kırmızı, Orta ve Kuzey Amerika'daki Aztek ve Maya kültürü dönemin insanlar tarafından kullanılmıştır. MS 4. yüzyılda, bu tür çivit otu, kök boya, kaynak, kızılağaç, indigo ve koyu kırmızımsı-mor boyalar biliniyordu. Japonya'da Nara döneminde (8.yüzyıl) doğal biyorenklendiricilerin kullanıldığı Shosoin metninde geçen renkli soya ve adzuki fasulyesi keki ile bilinmektedir (Aberoumand, 2011).

Pigmentler hayatımızın her alanında gözlemleyebileceğimiz renkleri oluşturur. Dünya üzerindeki tüm organizmalarda bulunurlar ve bitkiler pigmentlerin en temel üreticilerindendir. Yaprak, meyve, sebze, çiçeklerde bulunabileceği gibi aynı zamanda deri, gözler, diğer hayvansal yapılar, bakteriler ve funguslarda da bulunabilir. Doğal ve sentetik pigmentler ilaç sektöründe, tekstilde, gıdalarda, mobilya sektöründe, kozmetikte ve diğer alanlarda kullanılmaktadır. Ayrıca doğal pigmentlerin kazandırdığı güzelliklerin yanında önemli bir görevi de vardır; fotosentez, karotenoidler ve klorofil olmadan canlı yaşamı olamazdı (Delgado-Vargas, 2000).

Stres koşulları altında bitkilerde flavonoid sentezi görülmektedir; kinonlar ışık enerjisini kimyasal enerjiye çevirmede oldukça önemlidirler. Melanin insanlarda ve diğer omurgalılarda koruyucu bir ekran rolü oynar. Bazı funguslarda ise melanin hayati döngüler açısından önemlidir. Son olarak birçok pigmentin kanser ve kardiyovasküler hastalıklarda farmakolojik aktivitesinin olduğunun bilinmesi pigmentlerin insanlar için önemini vurgulamaktadır. Ayrıca insanlar tarih boyunca ürünler ile renklerini ilişkilendirmişlerdir. Bu durum gıda sektörü için de geçerlidir. Tarihsel olarak gıda sektörünün başlarında tüketiciler gıdalarda kullanılan çeşitli pigmentlerin doğal ya da sentetik olmasına dikkat etmemişlerdir. Fakat son zamanlarda insanlar sentetik pigment ve hastalık ilişkilendirmesini yaparak sentetik pigmentlere olan korkularını göstermişlerdir. Bu durum da doğal pigmentlerin farmakolojik faydaları görüldükçe ortaya çıkmaya başlamıştır. Ancak insan gıdalarında kullanılmasına izin verilen pigmentler oldukça sınırlıdır. Katkı maddesi olarak kabul edildiğinden kullanımı sıkı kurallar altında yapılmaktadır (Delgado-Vargas, 2000).

2.1.1. Sınıflandırılması

Pigmentler kökenleri bakımından doğal, sentetik veya inorganik olarak adlandırılırlar. Doğal pigmentler bitkiler, hayvanlar, mantarlar ve mikroorganizmalar gibi yaşayan canlılardan elde edilirler. Sentetik pigmentler laboratuvar ortamında elde edilir. İnorganik pigmentler doğada bulunabilir veya sentezle üretilmiş olabilirler. Pigmentler kromoforların kimyasal yapıları dikkate alınarak sınıflandırılabilir. Kromoforlar ile konjuge yapıları: karotenoidler, antosiyaninler, betalainler, karamel, sentetik pigmentler ve göller. Metal-koordine porfirinler; miyogloblin, klorofil ve türevleridir.

2.1.2. Karakteristik Özellikleri ile Doğal Pigmentler

Doğal pigmentler karakteristik yapılarına göre sınıflandırılabilir;

- Tetrapiol Türevleri: klorofil ve heme grubu renkleri.
- İzoprenoid Türevleri: karotenoidler ve iridoidler.
- Tetrapiol'den farklı N-heterosiklik Bileşikler: pürinler, piterinler, flavinler, fenazinler, fenoksazin ve betalainler.
- Benzopiran Türevleri (oksijenli heterosiklik bileşikler): antosiyaninler ve diğer flavonoid pigmentler.
- Kinonlar: benzokinon, naftokinon, antrakinon.
- Melanin.

2.1.2.1. Tetrapiol Türevleri

Bu bileşikler pirol halkasına sahiptirler, doğrusal veya dairesel şekilde sıralanırlar. Fitokromlar alglerde çok yaygındır ve temel yapıları bilinmektedir. Bu siklik bileşiklerde bir porfirin halkasına yapışmış demir atomundan oluşan heme grupları görülmektedir. Bu grup hemoglobin, miyogloblin olarak hayvanlarda, aynı zamanda sitokromlarda, peroksidazlarda, katalazlarda, vitamin B12 ve prostetik gruplarında geniş bir dağılıma sahiptir. Fakat klorofil, tetrapiol türevlerinin en önemli alt grubunu oluşturmaktadır. Klorofil yüksek yapılı bitkiler ve alglerde kloroplastlarda bulunur. Klorofil yapıların sayısı yıllarla artış göstermiştir; 1960'lı yıllara kadar sadece 3 yapı tanımlanmış, 1970 yılına kadar 20, 1980 yılına kadar ise 100'den fazla yapı tanımlanmıştır. Yüksek bitkiler, eğrelti otları, yosunlar, yeşil algler ve prokaryotik

organizmalarda klorofil a ve klorofil b olmak üzere 2 çeşit klorofil bulunmaktadır. Geri kalan gruplar ise algler ve bakterilerde bulunmaktadır (Delgado-Vargas, 2000).

2.1.2.2. İzoprenoid Türevleri

Terpenoidler olarak da adlandırılan izoprenoidler, doğal bileşikler içerisinde oldukça geniş bir aileyi temsil eder. Birden çok fonksiyonu yerine getirdikleri için (hormon, pigment, fitoaleksin) tüm canlılar aleminde bulunurlar. 23.000'den fazla özgün yapıda izoprenoid yapısı tanımlanmıştır ve bu sayı her geçen yıl artmaktadır. Kinonlar ve karotenoidler bu grubun temel iki alt grubunu oluşturur. Bunlara ek olarak son zamanlarda iridoidler de bitki izoprenoid yapısı olarak üçüncü bir grup halini almıştır (Delgado-Vargas, 2000). 600'den fazla karotenoid çeşidi belirlenmesine rağmen sanayide üretilen ve gıdalarda renk maddesi olarak kullanılan karotenoidler birkaç türdür. Ticari olarak kullanılan karotenoid çeşitlerinden β -karoten ve β -apo-8-karotenalinin renk verme özelliğinin yanı sıra A vitamini aktivitesi de bulunmaktadır (Aksan, 2005).

2.1.2.3. Tetrapiroiden Farklı n-heterosiklik Bileşikler

2.1.2.3.1. Pürinler: Nükleotidlerin çoğunluğunu kapsayan pürinler, DNA ve RNA gibi iki büyük makromolekülde bulunmaktadır. Bu makromoleküller yaşamsal moleküllerdir ve yaşayan tüm canlılarda mevcuttur. Altın ve gümüş balığında serbest pürinler de bulunmuştur.

2.1.2.3.2. Pterinler: Pteridin halka sistemi muhtemelen yaşamın her halinde mevcuttur. Doğal pteridinlerin çoğu C-2 konumunda bir amino grup, C-4 konumunda ise bir hidroksil grup taşır. Ayrıca 2,4-dihidroksipteridinler flavin biyosentezinde önemli bileşikler olarak tanımlanmışlardır. Pterinler bazı böceklerde, omurgalıların gözlerinde, insan idrarında ve bakterilerde (*Lactobacillus casei* and *Streptomyces faecalis*) renkten sorumludur.

2.1.2.3.3. Flavinler: Bu bileşikler içinde, bir pteridin ve bir benzen halkası kondanse edilmiştir. Riboflavinler bu grubun en temel yapılarıdır ve yaşayan tüm canlı mikroorganizma hücrelerinde ve bitkilerde sentezlenir. Riboflavin sütte bulunur, diğer kaynakları yeşil yapraklı sebzeler, et ve balıktır.

2.1.2.3.4. Fenazinler: Bakterilerde bulunur.

2.1.2.3.5. Fenoksazinler: Mantarlar ve böceklerde bulunur.

2.1.2.3.6. Betalainler: Yüksek yapılı bitkiler arasında betalainlerin ortaya çıkışı, Caryophyllales ile sınırlı kalmıştır. Aynı zamanda betalainler yüksek yapılı mantarlardan olan

Amanita, *Hygrocybe*, and *Hygrosporus*'da da bulunmaktadır. Yüksek bitkilerde betalainler farklı organlarda bulunmaktadır. Aizoaceae ve Portulacaceae çiçeklerinde kırmızı, sarı, pembe ve turuncu renk verirken, Cactaceae meyvesinde mor pigmentasyon gösterirler. R1-N-R2 yan gruplarına bağlı olarak sarı betaksantin ve kırmızı-mor betasiyanin olmak üzere iki yapısal gruptan oluşurlar. 50'den fazla betalain bilinmektedir ve bunların hepsi aynı temel yapıya sahiptir. Renk farklılıkları çift bağların yerlerindeki farklılığa dayandırılabilir (Delgado-Vargas, 2000).

2.1.2.4.Benzopiran Türevleri

En çok çalışılan sekonder metabolitler flavonoidlerdir. Bunlar, bir C3 birimi (merkezi piran halkası) ile bağlanmış iki aromatik halkaya sahip fenolik bileşiklerdir ve piran halkasının oksidasyon durumuna bağlı olarak 13 sınıfa ve karakteristik renge ayrılmışlardır: Antosiyaninler, auronlar, çalkonlar, sarı flavonoller, flavonlar, renksiz flavonollar, flavinler, dihidroflavonoller, dihidrokalkonlar, lösoantosiyanidler, kateşinler, flavanlar ve izoflavonoidler. Flavonoidler suda çözünür ve vasküler bitkilerde geniş bir dağılım gösterir. Bitkinin her kısmında yer almaktadır. 5000'den fazla flavonoid kimyasal olarak karakterize edilmiştir ve yeni yapılar sürekli olarak tarif edilmektedir.

Flavonoidler, antosiyaninlerin en önemli pigmentleridir. Taç yapraklarda, meyvelerde, yapraklarda ve köklerde turuncudan maviye kadar renk oluşumu sağlarlar. Flavonoidler, çiçek türlerinin %15'inde tek başına ya da karotenoidlerle birlikte bulunabilirler ve sarı bir renk verir (Delgado-Vargas, 2000).

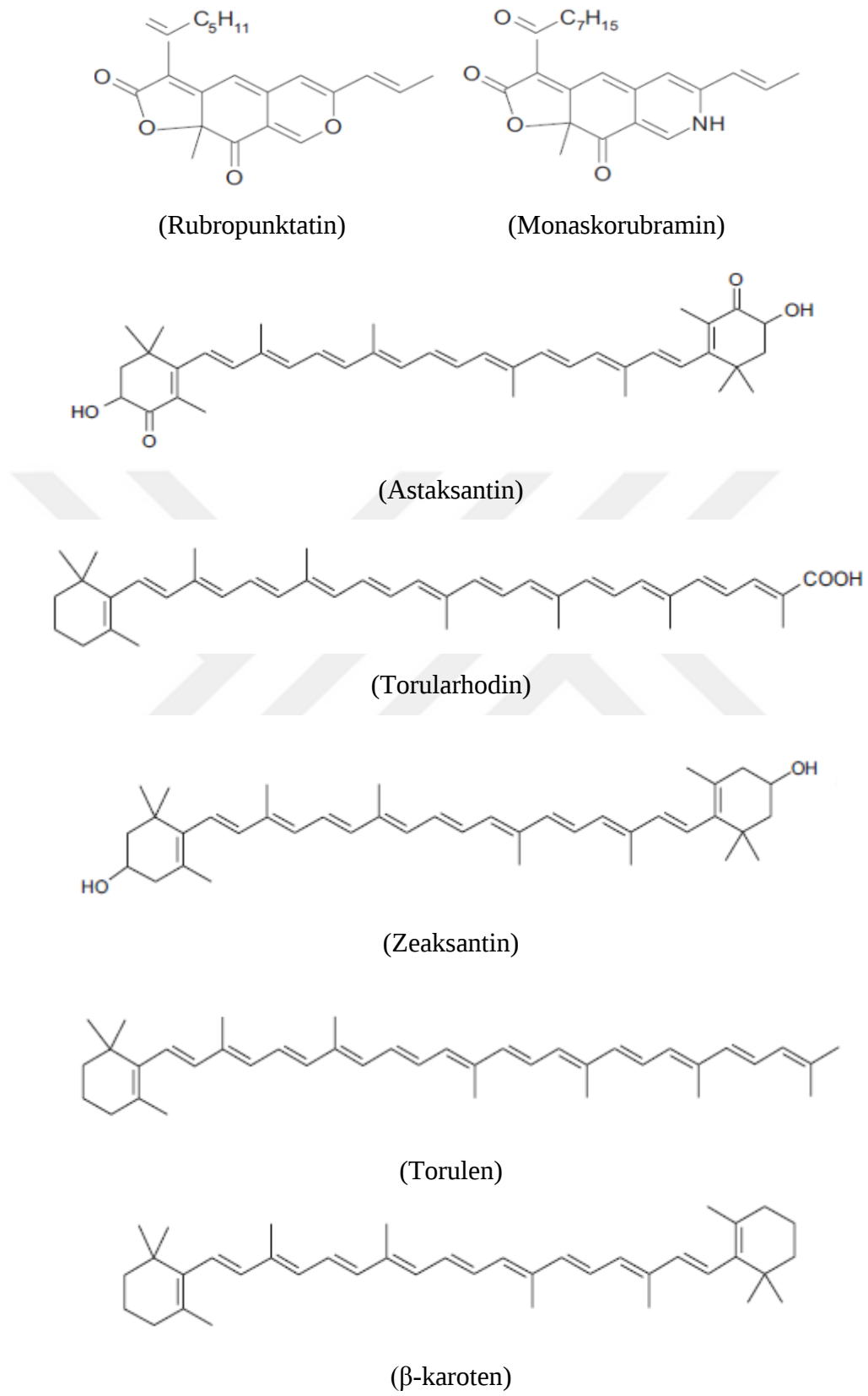
2.1.2.5.Kinonlar

Kinonlar çok fazla sayıda renklendirici bileşiğe sahiptirler. Bu grup sayı ve yapısal farklılık bakımından en büyük gruptur. Diğer doğal pigmentlere göre daha büyük bir dağılım gösterirler (karotenoidler ve melanin hariç). Temel yapısı bir tür aromatik monosiklik ya da polisiklik bileşiği olan doymamış siklik ketondan oluşur. Kinonlar; benzokinonlar, naftokinonlar, antrakinonlar ve karışık kinonlar olarak ayrılabilir. Dibenzokinonlar, diantrakinonlar, dinaftokinonlar da tanımlananlar arasındadır. Kinonlar yapı ve çeşitlilik farkı sayıca fazla olmalarına neden olmaktadır. Kinonlar yüksek yapılı bitkiler ve alglerde kloroplastlarda bulunan plastokinonlarda, ubikinonlar yaşayan organizmalarda her yerde, menakinonlar bakterilerde, naftokinonlar hayvanlarda ve antrokinonlar likenlerde,

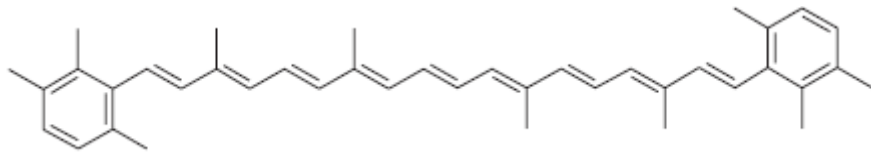
mantarlarda, çiçekli bitkilerde ve böceklerde bulunur. Çoğu kinon, metabolik yolların yan ürünüdür ve bazı canlılar tarafından (mantarlar) büyük miktarlarda üretilirler. Genel olarak kinonlar sarı, kırmızı ve kahverengi renklendirme yaparlar. Fakat kinon tuzları mor, mavi ve yeşil renk verir (Delgado-Vargas, 2000).

2.1.2.6.Melanin

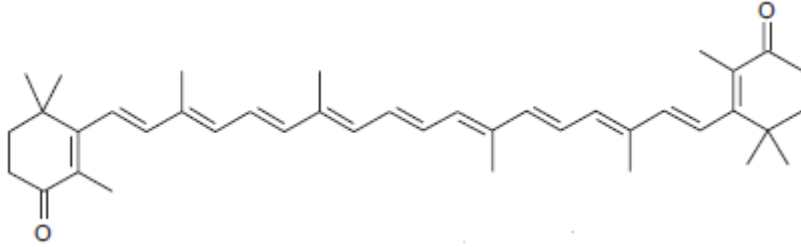
Melaninler, monomerleri indol halkası olan azotlu polimerik bileşiklerdir. Genel olarak melaninler homopolimer değildirler fakat makromoleküllerin bir karışımıdır. Melaninler hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda siyah, gri ve kahverengi renklendirmeden sorumludurlar. Eumelanin omurgalı ve omurgasız hayvanlarda yaygın bulunmaktadır. Phaemelaninler, memeliler ve kuşlarda bulunan makromoleküllerdir. Allomelanin ise tohumlar, sporlar, mantarlar ve bazı eklembacaklılarda tespit edilmiştir. Şekil 2.1, özellikle gıda endüstrisinde kullanılan pigmentlerin kimyasal yapılarını göstermektedir (Delgado-Vargas, 2000).



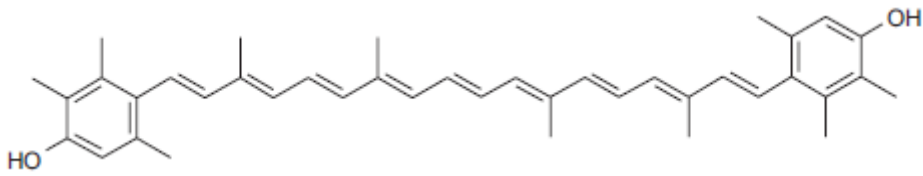
Şekil 2.1. Gıda endüstrisinde kullanılan bazı pigmentlerin kimyasal yapıları (Dufosse et al., 2006)



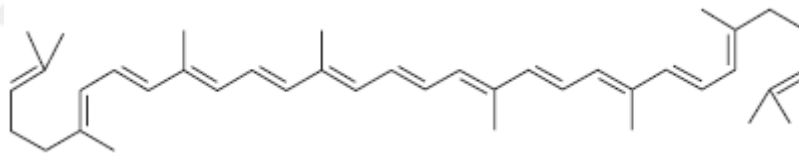
(İzorenieraten)



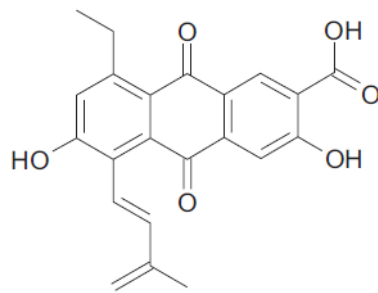
(Kantaksantin)



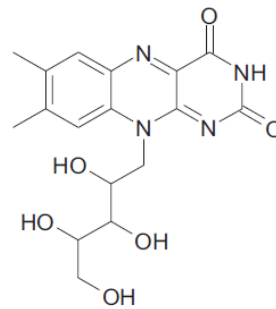
(3,3'-dihidroksi izorenieraten)



(Likopen)



(Arpink kırmızısı)



(Riboflavin)

Şekil 2.1. Gıda endüstrisinde kullanılan bazı pigmentlerin kimyasal yapıları (Dufosse et al., 2006) (devamı)

2.1.3. Mikrobiyal Pigment

Mikroorganizmalar pigment üretimi için kullanıldığında üretilen ürün mikrobiyal pigment adını alır (Joshi et al, 2003).

İşlenmiş gıdalara renk eklenmesi eski bir uygulama olsa da mikrobiyal pigment yeni bir olgudur. Avrupa’da mikroorganizmalar kullanılarak pigment üretiminde ilk başarılı çalışma, *Blakeslea* küfünden β -karoten elde edilmesiyle sağlanmıştır. Bu yeni kaynak, 1995’te Avrupa Gıda Katkı Maddeleri listesinde yer almıştır. AB Sağlık ve Tüketiciyi Koruma Dairesi, bu yolla sentezlenen β -karoteni kimyasal yollarla üretilene eşdeğer kabul etmiştir ve bu nedenle renklendirici olarak kullanımına izin vermiştir (Dufosse et al., 2005).

Filipinler’de geleneksel tatil yiyeceği olan Nata, mikrobiyal boyanmış bir gıdadır ve Endonezya, Japonya ve Tayvan’da da oldukça popülerdir.

Doğal pigmentlerin çoğu üzüm, pancar, kırmızı biber, annato, dişi böcekler (*Coccus cacti*) gibi bitki ve hayvanlardan ya da mikroorganizmalardan (*Monascus*, *Rhodotula*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Yarrowia*, *Phaffia* gibi) ekstrakte edilir. Karotenoid, antrokinon, klorofil gibi pigmentler mayalardan, bakterilerden, mantarlardan ve alglerden elde edilebilmektedir. Doğal pigmentlere olan ilgi doğal karakterleri, kullanımdaki güvenilirlik, medikal faydaları, vitamin gibi besin kaynağı olmaları, üretiminin mevsim ve coğrafi şartlardan bağımsız olması, kontrol edilebilirliği ve verimi nedeniyle artmıştır. Bazı mikrobiyal pigmentler nişasta ve meyve suyu atıklarından da üretilmektedir. Bu da çevre kirliliğini azaltmada önemli bir rol oynamaktadır. Bazı pigmentler suda çözünmez, düşük kararlılık gösterir, farklı pH’larda farklı renkler gösterir, aromasızdır ve higroskopiktir. Sınırlı renk aralığı, spesifik gıdalarda kullanılabilirliği ve düşük pigment içeriği, gıdalardaki toplu işleme gibi nedenler mikrobiyal pigmentlerin sorunudur. Fakat bu sorunlar uygun teknoloji ve kalite güvence önlemleri ile en aza indirilebilir.

Mikrobiyal pigmentlerin bazı özellikleri şu şekildedir;

- Ultraviyole ışınlar karşı koruma,
- Oksidanlara karşı koruma,
- Aşırı ısı ve soğuğa karşı koruma,
- Diğer mikroorganizmalar tarafından üretilen doğal antimikrobiyal bileşiklere karşı koruma,
- Antimikrobiyal aktivite gösterme,

- Fotosentez yoluyla enerji alımı,
- Demir gibi maddelerden besin kazanımı (Liu and Nizet, 2009).

Mikroorganizmalar antibiyotikler, enzimler, vitaminler, tekstüre maddeler ve benzeri gibi çeşitli moleküllerin üretimi için uzun zamandır kullanılmaktadır. Doğal maddelerin kullanımında gıda endüstrisinde artan bir ilgi vardır. Bitki ya da mikroorganizmalar gibi biyolojik kaynaklardan elde edilen bu tür renk gibi maddeler, doğal olarak kabul edilir. Ayrıca, bazı doğal renklendiriciler antioksidan olarak kullanım için ticari potansiyele sahiptir. Endüstri artık gıda, kozmetik veya tekstil uygulamaları için bazı mikrobik pigmentleri üretebilmektedir. Doğada, renk zengin ve pigment üretebilen mikroorganizmalar (mantar, maya ve bakteri) oldukça yaygındır (Venil et al, 2009).

Birçok sayıda bakteri, küf, maya ve alg pigment üretebilmektedir. Uygun türler pigment üretimi için bazı kriterleri yerine getirmelidir;

1. Karbon ve azot kullanım yeteneği bakımından geniş bir yelpazaya sahip olmak,
2. pH, sıcaklık, mineral konsantrasyonu gibi etkenlere karşı toleranslı olup, ılımlı büyüme koşullarına sahip olmak,
3. Kabul edilebilir renk verimi sağlamak,
4. Toksik ve patojenik olmamak,
5. Kolay ekstrakte edilebilir olmak (Joshi et al, 2003).

Monascus sp. pigmenti, *Xanthophyllomyces dendrorhous*'den üretilen astaksantin, *Penicillium oxalicum*'dan üretilen Arpink kırmızısı, *Ashbya gossypii*'den üretilen riboflavin ve *Blakeslea trispora*'dan üretilen β -karoten gibi günümüzde fermantatif üretimli gıda katkı maddesi olan pigmentlerin marketlerde satışı serbesttir. Ayrıca birçok mikroorganizma da biyorenlendirici üretimi gerçekleştirmektedir. *Serratia* ve *Streptomyces* de bu konuda oldukça iyi mikroorganizmalardır.

İndigo ve indigoid pigmentler tekstil, ilaç, gıda endüstrisinde kullanılır. İndigo biyosentezinde rol oynayan mikroorganizmalar izole ve karakterize edilmiş ve üretimden monooksijenaz ve dioksijenaz enzimlerinin sorumlu olduğu tespit edilmiştir. Bazı genler bu enzimleri kodlamak için klonlanmıştır. Bu tip bakteriler ile indigo üretimi için daha verimli fermantasyon sistemleri oluşturulmuştur. Mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen indigo biyotransformasyonu halen araştırılmaktadır. Bu çalışmaların indigo ve indigo gibi pigmentlerin üretiminin geliştirilmesinde yeni yöntemler sağlayacakları düşünülmektedir (Han et al., 2008).

2.1.3.1.Bakteriler

Bakteriler iyi bir pigment kaynağıdır. Çoğunlukla karotenoidler, özellikle de β -karoten üretirler. *Streptomyces chrestomycetius rubescens* likopen üretimi gerçekleştirirken, *Flavobacterium* sp. de zeaksantin ve lutein üretimi ile önem kazanmıştır. *Flavobacterium*'un mutant bir suşu glikoz, mısır şurubu ve palmitik asit ilavesi ile baz ortamında, düşük sıcaklıkta zeaksantin üretimi gerçekleştirebilmektedir. *Brevibacterium* KY-431'3, aslen petrol ortamından izole edilmiştir ve kantaksantin ve az miktarda da β -karoten içermektedir. Bu organizma Japonya'da kantaksantin biyosentezi için model organizma olarak kullanılmaktadır. *Corynebacterium* sp. ve *Rhodococcus maris*'de kantaksantin üretimi için adapte edilmiş mikroorganizmalardır (Joshi et al, 2003).

Bazı bakteri grupları farklı büyüme aşamalarında çeşitli pigmentler üretirler. *Cryptococcus neoformans* melanin pigmenti üretir ve bu da önemli bir antioksidan işlevi görür. Melanize *Cryptococcus* hücreler oksijen ve nitrojen türevlerine karşı, melanize olmayan hücrelere göre daha dayanıklıdır. *Azotobacter chroococcum*'da reaktif oksijen türlerine karşı korunma amaçlı olduğu düşünülen melanin üretmektedir. Grup B *Streptococcus* tarafından üretilen pigment de süperoksit H_2O_2 ve oksidatif strese karşı direnç gösterir (Venil et al, 2009).

Stafiloksantin, kendi adını taşıyan altın rengiyle, insan patojeni de olan *Staphylococcus aureus* tarafından üretilen, en iyi tanınan bakteriyel pigmentler arasındadır. Stafiloksantin karotenoidlerin içerdiği tek ve çift bağlardan oluşan yapıya alternatif olarak C_{30} polien karbon omurga içerir. Bu alternatif bağlar reaktif oksijen türlerinin fazla enerjisini absorbe edebilmektedir. Doğal tipte ana suş ile karşılaştırıldığında pigmentsiz mutant *S.aureus*'un, hidrojen peroksit, süperoksit radikalleri, hidroksi radikali, hipoklorid ve tek değerlikli oksijene karşı daha duyarlı olduğu görülmüştür (Liu et al, 2009).

Likopen mikroorganizmalarda bir son ürün olarak değil, bir öncü olarak üretilir. 1968 yılında *Streptomyces chrestomyceticus* subsp. *rubescens*'den likopen üretimi tanımlanmış ve patent alınmıştır.

Lutein, yüksek fotosentetik organizmalarda bulunan bir karotenoid tipidir. Yeşil algler ve bitkilerde bol bulunur fakat siyanobakteriler ve fototrofik bakterilerde bulunmaz. Bu nedenle lutein üretiminde sadece yeşil mikro algler üretici kabul edilir.

Zeaksantin de lutein gibi tipik bir kloroplastik pigmenttir. Aralarındaki farklılık, sınırlı sayıda fotosentetik olmayan bakterilerde ve siyanobakterilerde lutein bulunmasıdır. Sarı

pigment olarak bilinen zeaksantin ya da 3,3-dihidroksi β -karoten, kanatlı hayvan yemlerinde kullanılır ve hayvanların deri ve yumurta sarılarının rengini vurgular. Serbest zeaksantin deniz flavobakterilerinde tanımlanmıştır. Farklı firmalar tarafından birçok farklı zeaksantin patenti alınmıştır. *Flavobacterium* zeaksantininin ticari üretimi az olmasına karşın ticarileştirilmesi aşamasına yaklaşılmıştır. Mutant bir suştan 335 mg zeaksantin/L üretimi rapor edilenler arasındadır.

Fotosentetik olmayan bakterilerden dört türün kantaksantin içerdiği bildirilmiştir. Fakat bunlardan ikisinin ticari olarak yemlere pigment maddesi olarak katılması mümkün değildir. İlk endişe, 1954 yılında izole edilen, bitki patojeni olan, mutant *Corynebacterium michinagense*'dir. Kantaksantin miktarı hakkında bir veri yoktur, hatta karotenoid varlığı ile ilgili bazı şüpheler de mevcuttur. *Micrococcus roseus*'da diğer bir tartışma konusudur. Bir çalışma grubu tekrar tekrar bu suşta kantaksantin olduğunu rapor etmiş fakat bu grup dışında hiçbir araştırmacı bu sonuca ulaşamamıştır. Diğer iki tür *Brevibacterium* KY-4313 ve *Rhodococcus maris*'de kantaksantin varlığı doğrulanmıştır.

Astaksantin içeren iki bilinen tür bildirilmiştir. İlki *Mycobacterium lacticola* sadece hidrokarbonlu besiyerinde pigment üretimi gerçekleştirmektedir. Diğer astaksantin üreten tür olan *Brevibacterium* 103, gazyağı üzerinde büyüme ve pigmentasyon gösterir. Rodoksantin gıda ya da yem katkı maddesi için ticari olarak üretilmese de astaksantin için bir alternatif olabilir. Rodoksantin deneysel olarak *Pseudomonas extorquens*'de tespit edilmiştir (Nells and De Leenheer, 1990).

İnsan patojenleri olarak bilinen *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* ve *P. ovale* dahil olmak üzere sıtma parazitleri, enfeksiyon sırasında hemozin olarak bilinen kahverengi bir pigment maddesi oluştururlar. Oluşan pigment bir plazmodyal ürün değil aksine heme grubu detoksifikasyonu sonucu oluşan bir üründür. Hemozinin nasıl yapıldığı konusunda birçok teori vardır. Konakçı tarafından gerçekleştirilen süreçler ya da belirli plazmodyal detoksifikasyon enzimleri ile olabilir (Liu et al, 2009).

Proteus mirabilis, insan idrar yolu enfeksiyonlarına neden olan Gram(-) bir bakteriyel ajan, serbest radikal olarak işlev görebilen melanin pigmenti üretir.

Burkholderia cepacia'dan izole edilen melanin pigmentinin makrofaj süperoksit üretimini azaltan antioksidan özelliği bulunmaktadır.

İnsanlarda ölümcül etkiye neden olabilen *Chromobacterium violaceum*'dan üretilen violasin, mor bir pigmenttir.

2.1.3.2.Funguslar

Phycomycetes taksonuna ait mantarların çeşitli türleri, özellikle *Mucorales* türleri, önemli β -karoten kaynaklarıdır ve β -karoteni yoğun olarak biriktirirler. Daha önceleri kullanılan ve değerli sayılan β -karoten kaynağı *Ascomycetes* (*Penicillium sclerotiorum* ve *Neurospora crassa*) ya da *Deuteromycetes* (*Rhodotorula aurantiaca*) mantarlarının verimi daha düşüktür. Seksüel formların birleşmesi sonucu β -karoten miktarında önemli bir artış gözlenmiştir. Karşı cinsten suşların karışık kültürlerinin, ayrı olan kültürlerle göre 5-15 kat daha fazla β -karoten içerdiği görülmüştür. Hormonal aktivitesi olan ve çiftleşme sırasında üretilen trisporik asitin β -karoten üretimini teşvik edici olduğu ortaya konulmuştur. β -karoten, funguslardaki ana pigment maddesidir. Üreticisi oldukları diğer önemli bir pigment maddesi de *Blakeslea trispora* tarafından üretilen likopendir.

Geleneksel fermente bir ürün olan ang-khak (kırmızı pirinç), fermente pirinçten yapılır ve renklendirici olarak öğütülmüş *Monascus purpureus* kullanılır.

İmmobilize *Monascus* kültürlerinden üretilen pigment 6 temel pigment (kırmızı, sarı ve mor pigmentli poliketidler) içerir ve asitle çözünme göstermez (Joshi et al, 2003). *Mucorales* familyasının iki türü özellikle dikkate alınmalıdır. *Phycomyces blakesleeanus*'un karotenogenezis genetiği çalışmak için iyi bir model organizma olduğu kanıtlanmıştır. Mutasyona uğraması kolay olduğundan β -karoten biyosentez yolu aşamalarındaki enzimler kolayca hasara uğratılabilmektedir. Öte yandan *Blakeslea trispora* endüstriyel β -karoten üretimi için büyük ölçekli fermentasyon süreçlerinin geliştirilmesinde önemli rol oynamıştır.

Pigment veriminde gelişmeler kültür koşulları değiştirildiğinde elde edilmiştir. Pigment oluşumunu uyarıcı bazı besinler bulunmuştur. Tahıllar, lipidler (bitkisel yağlar, beyaz yağ), hidrokarbonlar ve bazı aminoasitler biyosentetik öncüler olarak kabul edilirler.

β -karoten üretimindeki en önemli artış, büyümeyi etkilemeyen, direkt olarak biyosentetik yoldaki anahtar enzimleri aktif hale getiren kimyasalların ilavesi ile olmuştur.

Melanin, canlılar aleminde sıkça raslanan bir pigmenttir. Melaninler kinon içeren oksidatif polimerizasyon ile oluşturulmuş farklı yapıdaki yüksek moleküllerdir. 3 oksidasyon basamağı içerirler. İnsan saç ve derisinin normal bileşeni olan melanin, iki önemli fungal patojen olan *Cryptococcus neoformans* ve *Aspergillus fumigatus* yüzeyinde de tespit edilmiştir. Son mutageniz çalışmalar immün sistemi baskılanmış hastalarda ciddi fırsatçı enfeksiyon bu iki ajanın melanin üretiminin bir virulans fonksiyonu doğrulamıştır (Nells et al, 1990).

C.neoformans difenollerin veya homogentisik asitlerin dönüşümü ile kahverengi veya siyah pigment üreten maya benzeri kapsüllü bir mantardır. Bu renklenme mısır unu agar üzerinde kolonilerin daha hızlı belirlenmesinde de kullanılmaktadır. *A. fumigatus* ise büyüme evresi sırasında melanin benzeri bir madde üreten iplikli bir mikroorganizmadır.

Bir Çek Cumhuriyeti firması (Ascolor) 2004 yılında Quimper-Fransa'da düzenlenen Uluslararası Kongre'de sunulan 'Gıdalardaki Pigmentler' başlıklı çalışmada, bir renk maddesi olan antrakınon üretimi için *Penicillium* kullanmıştır. Son birkaç yıldır çok sayıda toksikolojik çalışma yapılmış, güvenlik değerlendirmeleri sonucunda AB'de kullanım için iki yıllık onay alınmıştır (Dufosse et al., 2005).

2.1.3.3.Yeşil Mikroalgler

Algler birçok sayıda pigment üretebilmektedirler. Yeşil alglerden *Dunaliella salina*, belirli stres koşullarına maruz bırakıldığında hücrelerinde kuru ağırlığının %14'ünden fazla β -karoten biriktirir. Pigment fermasyonunun kinetiği mikrobiyal sekonder metabolitlerin tipik örnekleridir. Maksimum verim büyümenin durağan fazında görülür. β -karoten birikimini arttıran stres koşulları yüksek ışık yoğunluğu, yüksek sıcaklık, azot ve fosfor eksikliği ve özellikle yüksek tuzluluktur. β -karoten üretiminde iki aşamalı üretim yani düşük tuzluluktan yüksek tuzluluğa giden üretimde verim daha fazladır. Fakat ara tuz oranına sahip tek aşamalı üretim endüstriyel bakış açısı bakımından daha uygundur. Doğal β -karoten, sentetik muadillerine göre daha yüksek bir fiyata toz olarak ya da bitkisel yağlarda süspansiyon olarak pazarlanmaktadır.

Chlorella, *Chlorococcum*, *Chlamydomonas*, *Spongiococcum* cinslerine ait lutein üretimi için özel koşulları barındıran birçok patent tanımlanmıştır. *Chlorella pyrenoidosa*, lutein üretiminde glikoza daha toleranslı davrandığı, daha hızlı büyüdüğü ve daha yüksek verim verdiği için *Spongiococcum*'a göre daha umut verici olmuştur.

Yeşil mikro algler azot eksikliğine yanıt olarak sekonder ketokarotenoidler oluşturma yeteneğine sahiptirler. Böyle durumlarda astaksantin neredeyse her zaman kantaksantin yerini alır. Ancak bir suşta, *Dictyococcus cinnabarinus*'ta, kantaskantin dominanttır.

Azot eksikliği durumunda yeşil alglerde astaksantin ve kantaksantin oluşumu aynı ilkeler tarafından belirlenir. *Haematococcus pluvialis* astaksantin sentezleyebilme kabiliyeti ile özellikle dikkat çekmektedir. Astaksantin biyosentez yolunun aydınlatılmasında da model organizma olarak kullanılmaktadır. Bu ya da başka bir yeşil alg tarafından büyük ölçekli astaksantin üretimi gerçekleştirilmek istendiğinde alg tarafından iki fazlı bir fermantasyon

yapılacaktır. İlk aşamada alg bol mineral içeren bir ortamda çoğalacaktır. Keto karotenoid üretimi bu birincil ortamdan azot kaynağı olarak örneğin potasyum nitratın çıkarılmasıyla olacaktır. Astaksantin tamamen hücre içinde kaldığından son verim, üretilen biyokütle miktarına bağlı olacaktır (Nells et al, 1990).

Çizelge 2.1. Karotenoid üretimi gerçekleştiren algler

Pigment	Üretici Alg	Kullanım Alanı
β -Karoten	<i>Dunaliella salina</i>	Gıda renklendiricisi
Lutein	<i>Chlorococcum</i> sp. <i>Chlamydomonas</i> sp. <i>Spongiococcum</i> sp. <i>Chlorella pyreniodasa</i>	Kanatlı hayvan yemi
Kantaksantin	<i>Hematococcus</i> sp. <i>Chlorella</i> sp. <i>Chlamydomonas</i> sp. <i>Scenedesmus</i> sp. <i>Ankistrodesmus</i> sp. <i>Dictyococcus cinnanarinus</i>	Kanatlı hayvan yemive balık yemi
Astaksantin	<i>Hemacoccus pluvialis</i>	Balık yemi

Çizelge 2.2. Pigment üreten mikroorganizmaların istesi (Malik et al., 2012)

Mikroorganizma(lar)	Pigment/molekül	Renk/oluşum
Bakteriler		
<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	Astaksantin	Pembe-kırmızı
<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	Astaksantin	Pembe-kırmızı
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Kantaksantin	Koyu kırmızı
<i>Flavobacterium</i> sp., <i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i>	Zeaksantin	Sarı
<i>Achromobacter</i>	-	Krem
<i>Bacillus</i>	-	Kahverengi
<i>Brevibacterium</i> sp.	-	Turuncu-sarı
<i>Corynebacterium michigannise</i>	-	Grimsi-kremsi
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	İndigoidin	Mavi
<i>Rugamonas rubra</i> , <i>Streptoverticillium rubrirecticuli</i> , <i>Vibrio gaogenes</i> , <i>Alteromonas rubra</i>	Prodigiosin	Kırmızı
<i>Rhodococcus maris</i>	-	Mavimsi kırmızı
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Astaksantin	Pembe-kırmızı
<i>Haloferax alexandrinus</i>	Kantaksantin	Koyu kırmızı
<i>Staphylococcus aureus</i>	Stafiloksantin zeaksantin	Altın sarısı
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Violasein	Mor

Çizelge 2.2. (devamı) Pigment üreten mikroorganizmaların listesi (Malik et al., 2012)

Bakteriler (devamı)		
<i>Serratia marcescens</i> , <i>Serratia rubidaea</i> ,	Prodigiosin	Kırmızı
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piyosiyanin	Mavi-yeşil
<i>Xanthomonas oryzae</i>	Ksantomonadin	Sarı
<i>Janthinobacterium lividum</i>	Violasein	Mor
Algler		
<i>Dunaliella salina</i>	B-karoten	Kırmızı
<i>Chlorococcum</i>	Lutein	
<i>Hematococcus</i>	Kantaksantin	
Funguslar		
<i>Aspergillus sp.</i>	-	Turuncu-kırmızı
<i>Aspergillus galucus</i>	-	Koyu kırmızı
<i>Blakeslea trispora</i>	B-karoten	Krem
<i>Helminthosporium catenarium</i>	-	Kırmızı
<i>Helminthosporium avenae</i>	-	Bronz
<i>Penicillium cyclopium</i>	-	Turuncu
<i>Penicillium nalgeovensis</i>	-	Sarı
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	-	Kırmızı
<i>Haematococcus pluvialis</i>	-	Kırmızı

Çizelge 2.2. Pigment üreten mikroorganizmaların listesi (Malik et al., 2012) (devamı)

Funguslar		
<i>Monascus</i> sp.	-	Kırmızı-turuncu
<i>Monascus purpureus</i>	-	Kırmızı-Sarı
<i>Monascus roseus</i>	-	Turuncu-pembe
<i>Monascus</i> sp.	-	Sarı
<i>Penicillium oxalicum</i>	-	Kırmızı
<i>Blakeslea trispora</i>	-	Kırmızı
<i>Cordyceps unilateralis</i>	-	Koyu kan kırmızısı
<i>Ashbya gossypi</i>	-	Sarı
<i>Mucor circinelloides</i> , <i>Neurospora crassa</i> and <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	-	Sarı-turuncu
<i>Penicillium purpurogenum</i> , <i>Paecilomyces sinclairii</i>	-	Kırmızı
<i>Paecilomyces farinosus</i>	-	Kırmızı
Mayalar		
<i>Cryptococcus</i> sp.	-	Kırmızı
<i>Saccharomyces neoformans</i> var. <i>nigricans</i>	-	Melanin karası
<i>Phaffia rhodozyma</i>	-	Pembe-kırmızı
<i>Rhodotorula</i> sp. <i>Rhodotorula glutinis</i>	-	Turuncu-kırmızı

Çizelge 2.2. Pigment üreten mikroorganizmaların listesi (Malik et al., 2012) (devamı)

Mikroorganizma(lar)	Pigment/molekül	Renk/oluşum
Mayalar		
<i>Yarrowia lipolytica</i>	-	Kahverengi
Aktinomisetler		
<i>Streptoverticillium rubrreticuli</i>	-	Kırmızı
<i>Streptomyces echinoruber</i>	-	Kırmızı

2.1.4. Mikrobiyal Pigment Üretimine Örnekler

Mikrobiyal pigment üretimindeki temel mikroorganizmalar şu şekilde sıralanır;

2.1.4.1. *Monascus purpureus*

Monascus pigmenti, doğuya özgü geleneksel bir gıdanın renklendiricisi olarak kullanılır. Bu pigment maddesi, buharlı pirinç üzerinde büyüyen *Monascus purpureus*'dan katı faz fermentasyonu ile ekstrakte edilir. *Monascus pigmentinin* kalitesini arttırmak (sudaki çözünürlüğü) için reaksiyona proteinler, amino asitler, nükleik asitler, lakkaik asit, kitosan, amino alkoller ile kimyasal modifikasyonlar gerçekleştirilir. Şekil 2.2., *Monascus purpureus*'tan pigment ekstraksiyonu göstermektedir.

Besiyeri (maltoz, maya özütü, glikoz, KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2)

↓
Sterilizasyon

↓
İnokülasyon

↓
İnkübasyon
(28 °C, 14 gün, karanlık)

↓
Misel toplama

↓
Renkli miseller

↓
Kurutma

↓
Öğütme

↓
Çalkalama

↓
Filtrasyon

↓
Kurutma (80 °C, 24 saat)

↓
Pigment

Şekil 2.2. *Monascus purpureus*'tan pigment ekstraksiyon basamakları

2.1.4.2. *Rhodotorula*

Rhodotorula pigment üretiminde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. *Rhodotorula*'nın büyümesi için gerekli olan besiyeri oldukça karmaşıktır ve birçok kimyasal içermektedir. Elma ezmesi, elma suyu işleme sanayisi endüstriyel atıkları ucuz ve glikoz, asit ve mineraller bakımından zengin olduğu için pigment üretiminde tercih edilmektedir.

Rhodotorula karotenoid dışında yağ ve vitamin açısından da zengindir. Maksimum absorbans değeri 200-400 nm arasında, daha düşük absorbansı ise 400-600 nm arasındadır. Bu absorbans değerleri de pigmentin tek değil iki bileşenden oluştuğunu gösterir.

Rhodotorula hücreleri 30 °C'de, 5 gün süreyle inkübasyona bırakılır. Santrifüj yapıldıktan sonra distile su ile yıkanır. Küçük ve beslemeli-kesikli fermentör kullanılarak, *Rhodotorula glutinis* ve *Debaromyces castellii* ile yapılan fermantasyonda sadece ilk 96-120 saat arası biyokütle artışı görülür. Karotenoid üretimindeki optimum koşullar; fermentör kapasitesi 1 lt, sıcaklık 30 °C, hava akışı 1 dk⁻¹, manyetik karıştıma hızı 220 rpm ve köpürmeyi engelleyici ajan %0,3 w/v'dır (Joshi et al, 2003).

2.1.5. Mikrobiyal Pigmentlerin Pazar Payı

Biyolojik olarak üretilen pigmentin pazar payını tahmin etmek bölgesel istatistiklerin yetersizliği, annatto özü gibi düşük teknoloji ürünlerinin varlığı ya da toz haline getirme işleminin dünya çapında birçok küçük şirket tarafından yapılabilmesi nedeniyle zordur. Bir tarafta, gıda endüstrisinde, tekstil, boyama, ilaç ve kozmetikler için giderek artan tercih olan bakteriyel pigmentler, diğer taraftan da, bazı durumlarda, sentetik analoglarına göre birkaç kat daha pahalı olabilir. Benzersiz bir örneği, sentetik yollarla kilogramı 500 dolara üretilen sentetik karoten pigmentine karşı bakteriyel karoten yaklaşık olarak kilogramı 1000 dolara mal olmaktadır. Bakteriyel pigment daha pahalı olsa da pazarda rekabet edebilmektedir. Bunun anlamı da önemli olanın “doğal” olması demektir. Küreselleşme, yeniden yapılanma ve globalleşmenin artması son birkaç yıl içinde pigment sanayisinin şekillenmesinde önemli bir eğilim olmuştur. Organik pigmentler ve boyalar için küresel talebin Global Industry Analysts' e göre 2017 yılına kadar yaklaşık 10 milyon tona ulaşması bekleniyor. Başlangıçta tedarikçi İngiltere, İsviçre, Almanya tarafından hakim olunan küresel boya imalat sanayi son 20 yılda Asya'ya kaymıştır.

Bakteri suşlarının geliştirilmesi için ucuz ve yenilenebilir substratlardan yararlanmak doğal pigmentlerin fiyatının sentetik pigment fiyatlarıyla rekabet edebilir duruma gelmesini

sağlayabilir. Bu nedenle pigment üretimi için ucuz substratlar keşfetmenin üretim maliyetini düşüreceği düşünülmektedir. Bakteriyel pigment fiyatı sentetik boyalar ile karşılaştırıldığında nispeten yüksek olsa da, üretim maliyeti ile azaltılabilir:

- Bu tür bakterilerin ekimi için büyüme ortamı olarak ananas atıkları, şeker kamışı küspesi ve melas gibi tarımsal atıkların kullanımı.
- Yerel izole vahşi tip bakteri suşlarının kullanımı herhangi bir genetik değişiklik yapılmayacağı için maliyetini ortadan kaldırır.
- Basit ekstraksiyon tekniklerinin kullanılması.

Bakteri pigmentleri gelişmiş çevresel kabul edilebilirlik nedeniyle iyi bir fırsat sunması ve üstün performans özellikleri nedeniyle de klasik veya geleneksel sınıflarda organik pazarı domine etmeye devam etmesi bekleniyor.

Çekici bir görünüme sahip olması gıdaların geliştirilmesi önemli bir hedeftir. Gıda üreticileri, yapay renk maddelerinin neden olduğu sağlık sorunlarından beri doğal gıda boyalarına dönmeye başlamışlardır.

Doğal gıda renklendiricilerinin kullanılabilirlik eksikliği nedeniyle gıda sektöründe talep özellikle daha fazladır. Bu talep, renklendirilmiş gıdaların daha doğal, sağlıklı bir şekilde sunulması ve temiz bir etiket beyanını sağlamanın ardındaki itici güç olabilir. Bu nedenle çeşitli kaynaklardan gıda sınıfı renklendiriciler ve onların potansiyellerini keşfetmek gereklidir. Birçok doğal renkler mevcut olmasına rağmen, mikrobiyal renklendiriciler kolay üretim nedeniyle, gıda boyar maddesi olarak önemli bir rol oynamaktadır. Mikrobiyal fermentasyon yoluyla doğal gıda renklendiriciler sanayinin ucuz üretim, daha kolay ekstraksiyon, suşu iyileştirmek yoluyla daha yüksek verim, hammadde yetersizliğinin olmaması ve mevsimsel değişimlerden etkilenmemesi gibi avantajları vardır. Mikroorganizmalar, yüksek verimle boya elde etmek için renk maddesi üreten genleri kodlayan bölgelerin eklenmesi ile (örneğin zerdeçal) de pigment üretebilirler. Bu pigmentlere doğal bir gıda renklendiricisi gözüyle bakmak sadece insan sağlığı açısından değil, aynı zamanda sentetik pigmentleri üretirken çevreye salınan zararlı kimyasalların azalması nedeni ile biyolojik çeşitliliği korumak açısından da önemlidir (Venil et al, 2013).

Avrupa Birliği'nde 43 pigmentin gıda katkı maddesi olarak kullanımına izin verilmiştir. Bunlardan 16 tanesi bitkilerden elde edilmiştir. Amerika'da 2 kategorideki pigmentlerin kullanımına izin verilmiştir; (1) sertifikalı renk katkı maddeleri, (2) sertifikadan muaf renklendiriciler. Amerika'daki sertifikadan muaf bazı renklendiriciler zerdeçal reçinesi, annatto özütü, kırmızıbiber reçinesi, β -karoten, kırmızı özütü, sebze ve meyve suları, üzüm

kabuğu özütü, karamel rengi ve titanyum dioksittir. Uzun zamanlardan beri doğal renklendiricilerle ilgilenilmesine rağmen özellikleri, kullanılabilirlikleri ve dağıtımları hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Ağırlıklı olarak Kuzey Amerika ve Avrupa'daki bitkilerin %95'i karakterize edilmiştir. Bu nedenle yeni bitki pigmenti kaynakları ayak basılmamış alanlar veya denizlerde aranmalıdır.

1994 yılında uluslar arası doğal renklendiriciler 250 milyon dolarlık pazarın 125 milyon dolarlık bir kısmını kaplamaktaydı. Doğal gıda renklendiricileri sanayisinde de yıllık %5-10 arasında büyüme görülmektedir. Doğal pigmentlerin önde gelen uluslararası faaliyet gösteren tedarikçileri (1) Chr. Hansen's Lab. (Danimarka), (2) Warner Jenkinson-Europe Ltd (İngiltere), (3) Kalsec Inc (ABD), (4) Quest International (Hollanda).

Ticari pigmentler ve renklendiricilerin riskleri ve sağlık üzerine etkileri üzerine birçok derleme yayımlanmıştır. Çizelge 2.3. Dünya pazarında izin verilen pigmentleri göstermektedir.

Çizelge 2.3. Dünya pazarında izin verilen pigmentler

Molekül	Renk	Mikroorganizma	Durum
Ankaflavin	Sarı	<i>Monascus sp.</i> (fungus)	IP
Antrakinin	Kırmızı	<i>Penicillium oxalicum</i> (fungus)	IP
Astaksantin	Pembe-kırmızı	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> (<i>Phaffia rhodozyma</i>) (maya),	DS
Astaksantin	Pembe-kırmızı	<i>Agrobacterium aurantiacum</i> (bakteri)	RP
Astaksantin	Pembe-kırmızı	<i>Paracoccus carotinifaciens</i> (bakteri)	RP
Kantaksantin	Koyu kırmızı	<i>Bradyrhizobium sp.</i> (bakteri)	RP
Likopen	Kırmızı	<i>Blakeslea trispora</i> (fungus)	DS
Likopen	Kırmızı	<i>Fusarium sporotrichioides</i> (fungus)	RP
Melanin	Siyah	<i>Saccharomyces neoformans</i> var. <i>nigricans</i> (maya)	RP
Monaskorubramin	Kırmızı	<i>Monascus sp.</i> (fungus)	IP
Naftakinon	Koyu kırmızı	<i>Cordyceps unilateralis</i> (fungus)	RP
Riboflavin	Sarı	<i>Ashbya gossypii</i> (fungus)	IP
Rubrolone	Kırmızı	<i>Streptomyces echinoruber</i> (bakteri)	DS
Rubropunctatin	Turuncu	<i>Monascus sp.</i> (fungus)	IP
Torularhodin	Turuncu-kırmızı	<i>Rhodotorula sp.</i> (maya)	DS
Zeaksantin	Sarı	<i>Flavobacterium sp.</i> (bakteri)	DS
Zeaksantin	Sarı	<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i> (bakteri)	RP
β-karoten	sarı-turuncu	<i>Blakeslea trispora</i> (fungus)	IP

Çizelge 2.3. Dünya pazarında izin verilen pigmentler(devamı)

β-karoten	sarı-turuncu	<i>Fusarium sporotrichioides (fungus)</i>	RP
β-karoten	sarı-turuncu	<i>Mucor circinelloides (fungus)</i>	DS
β-karoten	sarı-turuncu	<i>Neurospora crassa (fungus)</i>	RP
β-karoten	sarı-turuncu	<i>Phycomyces blakesleeanus (fungus)</i>	RP
Bilinmeyen	Kırmızı	<i>Penicillium purpurogenum (fungus)</i>	DS
Bilinmeyen	Kırmızı	<i>Paecilomyces sinclairii (fungus)</i>	RP

Çeşitli pigmentler bitkilerin yanı sıra birçok kaynaktan karakterize edilmiştir. Yüksek bitkilerin aksine tek hücreli algler ve funguslardan biyoteknolojik üretim yapmak daha uygundur. Çünkü bunlar mevcut kültür teknikleri kullanılarak yetiştirilebilir. Gıdaların işlenmesi sırasında *Monascus* ve türevlerinin gösterdikleri yüksek kararlılık göz önüne alındığında mantarların yeni pigmentlerin kaynağı olması muhtemel görünmektedir.

2.1.6. Fiziksel ve Kimyasal Koşulların Mikrobiyal Pigment Üretimi Üzerine Etkisi

Pigmentlerin ifade durumu oksijen, beslenme durumu, sıcaklık, koloninin yaşı, ve şekil değişimi de dahil olmak üzere, bir dizi çevresel faktörden etkilenebilir. Örneğin, *Arthrobacter atrocyaneus* 24 °C'de mavi pigmentasyon gösterirken, 37 °C'de hiçbir pigmentleşme görülmemektedir. *Rhodospirillum rubrum*, *Micrococcus luteus* ve *Sarcina aurantiaca* farklı sıcaklıklarda büyüme gösterirken pigmentasyon sergilerler (Cardona et al, 2010).

Mikrobiyal pigment üretimi, kullanılan mikroorganizmanın türüne göre farklı sıcaklıklarda olabilir. *Monascus* sp. 25-28 °C'de büyüme ve pigmentasyon gösterirken, *Pseudomonas* 35-36 °C'de büyüme ve pigment üretimi gerçekleştirir.

Üretilen pigment türü ve büyüme de mikroorganizmaların yetiştirildiği ortamın pH'ından etkilenir. Değişen pH ile görülen renk değişimleri bir mikroorganizmadan diğerine farklılık gösterebilir. *Monascus* sp. ve *Rhodotorula* için optimum pH 5,5-6,5 ve 4,0-4,5 arasındadır. Nötr ve alkali pH dereceleri likopen üretimi için uygunken, asidik pH'lar β-karoten üretimi için uygundur.

Pigment üretici mikroorganizmaların miselyal büyümeleri glikoz, fruktoz, maltoz, laktoz, galaktoz gibi karbon kaynaklarından etkilenmektedir. Glikoz ve glikoz oligosakkaritleri büyüme ve pigment üretimi açısından daha iyi kaynaklardır. *Monascus* sp. için pigment üretimi nişasta ve dekstrin ile en iyi derecedeyken, glikoz ve maltoz ile orta

derecede, fruktoz ile en zayıf derecededir. *M. purpureus*'da karbon kaynağı olarak glikoz ve maltoz kullanılarak yapılan fermentasyon sonrasında koyu karaciğer rengi pigment oluşurken, karbon kaynağı olarak sükroz kullanıldığında hafif, pürüzlü kırmızı renkli bir pigment elde edilmiştir. *Phaffia rhodozyma* ile yapılan pigment üretimlerinde sellobiyozun pigmentasyonu diğer kaynaklara oranla daha fazla teşvik ettiği görülmüştür. D-mannitol de pigmentasyonu teşvik edicidir, fakat glikoz hem büyümeyi hem pigmentasyonu artırır. Kullanılan şeker çeşidi pigmentin şeklini de etkilemektedir.

Pigment üretimi, mikroorganizmanın türüne göre kullanılan azot kaynağından da etkilenmektedir. *Monascus* pigmentleri için en iyi kaynak amonyum klorür iken, bunu amonyum nitrat ve glutamat izler. Potasyum nitrat en zayıf azot kaynağı iken glutamat pigment üretimi için olağanüstü bir azot kaynağı olmuştur. Pepton, *Monascus* sp.'de pigment üretiminde büyük rol oynamaktadır. %1,5 MSG besiyerinde büyüyen *Monascus purpureus*'dan canlı bir kırmızı renk elde edilirken, diğer azot kaynakları kullanıldığında bulanık pigmentler elde edilmiştir. *Aspergillus* cinsinden elde edilen pigment üretimi amonyum fosfatın bu organizma için yaşamsal olduğunu, *Bacillus* cinsinden elde edilen pigment üretimi de tirozin ve histidinin pigment üretimini desteklediğini ortaya koymuştur.

Fermentasyon mikrobiyal pigment üretimini etkileyen bir diğer faktördür. Katı hal fermentasyonu, batık fermentasyona oranla 3 kat daha fazla pigment verir. *M. purpureus*'da verim katı kültürde sulu kültüre oranla daha fazladır. Besiyeri bileşenleri, pH ve çalkalama hızı da pigment üretimini etkilemektedir.

Mineraller de pigment üretiminde önemli rol oynamaktadırlar. Çinko, sıvı ortamda büyümeyi durdururken, katı ortamda güçlü bir büyüme ve pigmentasyon gözlemlenmiştir. Bazen çinko bir büyüme inhibitörü ve pigment üretimi için glikoz alımını artırıcı olarak görev yapar. Mangan ise *Lactobacillus plantarum* ve *Streptococcus lactis*'de pigment üretimini uyarıcı etki yapar (Joshi et al, 2003).

2.1.7. Mikrobiyal Pigment Üretimi Üzerine Yapılan Bazı Çalışmalar

Doğada birçok bakteri, alg, küf ve mayanın yapısında β -karoten bulunmaktadır. Biyoteknolojik olarak en çok çalışma *Phycomyces blakeleeanus* (*Mucoraceae*) ve *Blakesleea trispora* (*Choanopheraceae*) algleri üzerinde yapılmıştır. Bunun yanında *Mucor mucedo*, *Ustilago violaceae*, *Neurospora crassa*, *Fusarium aquaeductum*, *Choanophora cucurbitarum* küfleri, *Rhodotorula* mayaları, *Dunalinella salina* ve *Dunalinella bardawill*

(yüksek tuz ortamlarında yaşayabilen) mikroalglerinin de β -karoten sentezlediği belirtilmiştir (Kahyaoglu ve Kıvanç, 2006).

Mikroalglerden, *Haematococcus* kullanılarak astaksantin veya *Dunaliella* kullanılarak β -karoten gibi karotenoidler üretilmiştir. Araştırmacılar fikobiliprotein veya fikosiyanin ile ilgili olarak, gıdalarda kullanıldığı için toksikolojik çalışmalar yürütmüşlerdir. Kırmızı mikroalg *Porphyridium aerugineum* mavi renk kaynağıdır. Bu tür, diğer kırmızı mikroalglerden farklıdır (Dufosse et al., 2005).

Yapılan bir çalışmada, *Coriolus versicolor* IFO 30340, *Paecilomyces canadensis* NC-1, ve *Streptomyces werraensis*-TT 14'dan 27°C ve 37°C'de ürettikleri renklere bağlı olarak geliştirilmiştir. Çalışmada farklı sıcaklıklarda farklı renkte kültürler elde edilmiştir. Kahverengi pigmentler bu mikroorganizmaların sınıflandırılmasında kullanılmıştır (Terasawa et al., 1996).

Yapılan bir araştırmada organizmaları tanımlamak amacıyla, grup B streptokoklarda pigment üretimine dayalı testler kullanılmıştır. Bu testin, β -hemolitik türlerde %99,5 pozitif olduğu, hemolitik olmayan türlerde ise pigmentin üretilmediği belirlenmiştir. Bu özellik karışık kültürden grup B streptokokların ayrımı için kullanılmıştır (Noble et al., 1983).

Zaika and Smith (2006) tarafından yürütülen bir araştırmada altı küf, dört maya ve iki *Streptomyces* türünden elde edilen ekstraktların domuz yağı üzerindeki antioksidan etkisi incelenmiştir. *Aspergillus niger* ekstraktı güçlü bir antioksidan etki göstermiştir. *A. niger* ekstraktının kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırılan iki bileşenin domuz yağının oksidasyonunu önlediği tespit edilmiştir. Bu bileşenlerden bir tanesinin yapışkan kahverengi bir pigmenti (BR), diğerinin ise parlak sarı kristal pigmenti (Y) içerdiği tespit edilmiştir. BR pigmenti infrared spektrofotometrede güçlü karbonil grup ve metil-metilen grup absorpsiyonu göstermiştir. Elde edilen spektral verilere göre; Y pigmenti doğrusal naftopiron yapıya sahiptir. Y pigmenti nadiren *A. niger* miselinden elde edilirken, BR pigmenti daha fazla elde edilmiştir. Sonuçlar göre; *A. niger* miselindeki birden çok madde antioksidan özelliğe sahiptir. Kahverengi ve sarı pigmentler antioksidan etki ile ilgilidir. Çalışma, *A. niger* ekstraktının antioksidan etkide sinerjik etkilerinin önemli olduğunu göstermiştir.

Mısır'da yapılan bir çalışmada *Streptomyces* türleri, topraktan izole edilmiş ve kırmızı renkte gram pozitif bakterilere karşı antibiyotik aktivitesi gösteren bir pH indikatörü üretilmiştir. Bu üretilen organizmaların *Streptomyces* cinsine ait olduğu ve gri renkte misel oluşturdıkları belirlenmiştir. Mikroorganizmanın besiyerinin ortasında dağılmayan menekşe renkte misellere sahip olduğu tespit edilmiştir. Glikoz ve sodyum nitratın, bu antibiyotığın

üretimi için en uygun besiyeri bileşenleri olduğu kanıtlanmıştır. Söz konusu pigment, sıvı besiyerinden ekstrakte edilmiş ve saflaştırılmıştır. Çözünürlük, romatoid faktör değerleri, minimal inhibisyon konsantrasyonu, görsel rotasyon, UV ve IR spektrumu üzerinde çalışılmıştır. Erime noktasının 180°C olduğu ve yapısında %51,71 karbon, %6,25 hidrojen, ve %42,04 oksijen içerdiği belirlenmiştir (Hussein and El-Gammal, 2007).

Fitoplankton hücreleri ve fototrofik sülfür bakterileri üzerinde yapılan bir araştırmada klorofil ve karotenoidler birbirlerinden hızlı bir şekilde ayrılmışlardır. Liyofilize edilen örnekler, oda sıcaklığında ve karanlıkta aseton ile ekstrakte edilmiştir. Pigmentler hekzan-aseton karışımı ile bir silika kolonunda ayrıştırılmıştır (80:20, v/v). Yaklaşık 20 alg ve bakterinin klorofil ve karotenoid pigmentleri bir seferde ayrılmıştır. Bu yöntem doğal örneklerdeki klorofil içeriğinde eser miktarlarda bulunan karotenoidlerin (>6 ng/l) ve feofitinlerin (>200 ng/l) ayrılmasını sağlamıştır. Bu yöntem Vechten gölü (Hollanda) örneklerine uygulanmış ve yöntemin göldeki derinlik dağılımı ve biyokütle değişiklikleri açısından alg ve bakteri sayısının tahmininde yararlı olduğu kanıtlanmıştır (Korthals and Steenbergen, 1985).

Kahyaoğlu ve Kıvanç (2006) yaptıkları çalışmada, bazı mikroorganizmalarla endüstriyel atık maddelerin değerlendirilmesi, besin ve ilaç endüstrisinde A vitaminin öncü maddesi olarak kullanılan β -karotenin üretilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada β -karoten sentezleyen ve özellikle biyoteknolojik araştırmalarda sıkça kullanılan *Phycomyces blakesleeanus* NRRL 1465, *Blakesleea trispora* NRRL 2456, *Phycomyces nites* NRRL 2245 ve *Mucor mucedo* NRRL 3654 küfleri kullanılmıştır. Bu çalışmada şeker endüstrisinin bir atığı olan melas, ve şilempe ile süt fabrikalarının atığı olan peyniraltı suyu kullanılmıştır. Ayrıca yapay besin ortamı olarak YPK ve malt ekstrakt kullanılmıştır. Melas, şilempe ve peyniraltı suları kullanılmadan önce ön işlemlerden geçirilmiştir. β -karoten miktarı YPK ortamında 1.8-12.1 mg/l, malt ekstrakt ortamında 7.9-27mg/l, melas ortamında 6.1-43.3 mg/l, şilempe ortamında 3-9.9 mg/l ve peyniraltı suyu ortamında 4.4-12.5 mg/l arasında değiştiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, melas, şilempe ve peyniraltı suyu gibi bazı endüstriyel atık maddelerin β -karoten üretiminde kullanılabileceği görülmüştür.

2.1.7.1.Kullanılan Çözgenler ve Özellikleri

Çözücü, belirli sıcaklık ve hacimdeki bir katı, sıvı ya da gaz halde bulunan çözünen maddeyi çözerek çözelti oluşturan sıvı ya da gaz maddedir. Organik çözücüler boya inceltici

olarak (toluen, terebentin), kuru temizlemede (tetrakloretilen), kozmetik temizleyici ve yapıştırıcı çözücüler olarak (aseton, metil asetat, etil asetat), deterjanlarda (terpenler), parfümlerde (etanol), leke temizleyicilerde (hekzan-petrol eteri) ve kimyasal sentezlerde kullanılır. İnorganik çözücülerin kullanımı (su hariç) genellikle kimya araştırmaları ve bazı teknolojik uygulamalarla sınırlıdır.

Etanol: Etil alkol ya da bitkisel alkol olarak da bilinir; berrak, renksiz ve yanıcı bir kimyasal bileşiktir. Alkollü içkilerin büyük bir kısmında bulunur ve endüstride çözücü olarak kullanılır. Kimyasal formülü C_2H_5OH 'dır. Etanol, $-114,1^{\circ}C$ ' de erir, $78,5^{\circ}C$ 'de kaynar ve $20^{\circ}C$ 'deki yoğunluğu 0.789 g/ml 'dir (Shakhashiri, 2009).

Metanol: 1 atm'de $64,6$ derecede kaynayan akışkan bir sıvı olup, parlak olmayan mavimsi bir alevle yanar. Kimyasal formülü CH_3OH 'dır. Bütün organik çözücülerde her oranda çözünür. Metanol, $-98^{\circ}C$ ' de erir, $65^{\circ}C$ ' de kaynar ve $20^{\circ}C$ ' deki yoğunluğu $1,01 \text{ g/ml}$ dir (Anonymous, 2011). Endüstride, karbonmonoksit ile hidrojenin reaksiyonundan elde edilir ve sentetik reçinelerin üretilmesinde kullanılan formaldehidin sentezi için gereklidir. Metanol, organik çözücülerle kolayca karışır (Altınışik, 2007).

Aseton: Kimyasal formülü C_3H_6O 'dır. Ketonlar sınıfının ilk üyesidir ve dimetil keton olarak da bilinir. Keskin kokuludur. Odunun kuru kuruya damıtılmasından, kalsiyum asetatın ısıtılmasından, teknikte izopropanolün bakır katalizörlerinden $250^{\circ}C$ 'de dehidrojenlenmesinden, etanol ve su buharının $250^{\circ}C$ 'de gaz fazında Fe_2O_3 katalizörlüğünde karışımından elde edilir. Molekül ağırlığı $58,08$, kaynama noktası $56,29^{\circ}C$, donma noktası $-94,7^{\circ}C$ ve $20^{\circ}C$ 'deki yoğunluğu $0,7900 \text{ g/ml}$ 'dir (Akkapılı, 2009).

Kloroform: Renksiz, tatlı kokulu bir sıvıdır ve yanıcı değildir. Ağır, renksiz bir sıvı olup $61^{\circ}C$ 'de kaynar. Yoğunluğu $1,48 \text{ g/cm}^3$ 'tür. Kolay buharlaşır. Yağları çözer. Kloroform çeşitli yöntemlerle sentez edilebilir, Teknikte Liebig tarafından bulunan yöntem tercih edilir. Bu yöntem, etil alkol veya asetonun, kireç kaymağı veya sodyum hipoklorid ile oksidasyonu ve klorlanmasına dayanır.

2.1.8.Çeşitli Biyosüreçlerde Uygulanabilecek Potansiyel Deneysel Tasarımlar

Deney tasarımı, bir süreçteki girdi faktörleri üzerine istenilen değişikliklerin sistematik bir şekilde yapılması ile cevap değişkeni üzerindeki değişkenliğin gözlenmesi ve yorumlanmasıdır. Deney tasarımları ile sonuç üzerinde en etkin girdi faktörlerini belirlemek, performans özelliğini hedef değere en yakın sonuca ulaştıracak şekilde girdi faktörlerinin

seviyelerini belirlemek, kontrol edilmeyen girdi etmenlerinin sonuç üzerindeki etkisinin en az olacağı kontrol edilebilen girdi faktörleri kombinasyonunu oluşturmak, tüm faktör ve seviyelerin eş zamanlı deneye tabi tutulmak suretiyle optimizasyon sürecini kısaltmak mümkündür. Deney tasarımı sırasında kullanılan 3 ilke söz konusudur. Bunlar rassallaştırma, tekraralama ve bloklama ilkeleridir (Çömlekçi, 2003). Rassallık, çevresel gelişmelerin belirli bir kurala ve düzene bağlı olmadan tesadüfi olarak oluşmasıdır. Deney tasarımı için rassallaştırmanın en önemli yolu bağımsız faktörlerin seviyelerinin her bir deney için rassal olarak atanmasıdır. Deneylerin birden fazla sayıda yapılmasıdır, tekraralama deney hatasının ölçümünü sağlamak için gereklidir. Hata, tesadüfler ve değişkenliğe katloda bulunabilecek diğer faktörler nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Belirli bir anlamlılık düzeyinde gerçekleştirilen istatistiksel anlamlılık testinin kesinliği arttırılmak isteniyorsa deneydeki tekraralama sayısının artırılması gerekir. Bloklama bir deneyin hassasiyetini artırmak için kullanılan bir teknik olup deney alanının bölümlere ayrılmasıdır. Burdaki temel düşünce, benzer deneysel birimlerin gruplara bölünmesidir (Çömlekçi, 2003).

Deney tasarımları genel olarak tesadüfi parselleri, tesadüfi blokları, latin karesi, tam faktöriyel ve kısmi faktöriyel deney tasarımları olmak üzere 5 ayrı grupta incelenebilir (Şanyılmaz, 2006).

2.1.9. Plackett Burman İstatistiksel Deney Tasarımı

Plackett Burman deney tasarımı birinci derecede modele dayanmaktadır. Plackett Burman İstatistiksel Deney Tasarım yöntemi fiziksel ya da endüstriyel bir araştırma içinde meydana gelebilecek sorunlara karşı sürecin etkinliğini belirlemek amacıyla tasarlanmıştır. Var olan nicel değişkenlerin yapılan denemelerle sonuca katkıları ölçülerek süreç etkinliklerinin arttırılması hedeflenmiştir. Minimum 11 faktör ve her bir faktörün bir alt bir de üst limiti olmak üzere iki düzeyinin kullanıldığı tasarımda denenen düzeylerden elde edilen veriler ışığında her bir faktör için farklı düzeyler önerilmektedir. Bunun yanı sıra sonuca katkısı olan kritik faktör ve düzeyler de belirlenebilmektedir. Deney tasarımının en büyük avantajı deneysel zaman kaybını, malzeme tüketimini ve endüstriyel çapta iş gücünü azaltarak zaman kaybını önemli ölçüde minimize etmesidir. Yapılan doğrulama deneyleri kabul edilebilir güven aralıkları ile sistemin kendi içindeki tutarlılığını ve güvenilirliğini de test etmektedir (Plackett and Burman, 1946).

BÖLÜM 3

3.MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kullanılan Büyüme Ortamları

Çalışma süresince üretici mikroorganizmanın saklanması, üretim ortamı için aşı kültürlerin hazırlanmasında ve mikrobiyal pigment üretimi için aşağıdaki besiyeri kullanılmıştır.

3.1.1.1. Kullanılan Büyüme ortamı

Çalışma süresince üretici mikroorganizmanın saklanması, üretim ortamı için aşı kültürlerin hazırlanmasında ve mikrobiyal pigment üretimi için aşağıda sıralanan MSM Broth besiyeri kullanılmıştır.

Bileşenler	<u>(g/L)</u>
Glikoz	20
K ₂ HPO ₄	5,6
NH ₄ Cl	2,7
KH ₂ PO ₄	2,1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,19
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,001
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,003
Maya özütü	0,05
MnSO ₄ .H ₂ O	0,05
CH ₃ COONa	1
Distile su	1000 ml

110°C’de 25 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir.

3.1.1.2. Nutrient Agar

<u>Bileşenler</u>	<u>(g/L)</u>
--------------------------	---------------------

Nutrient Agar	20
---------------	----

Distile su	1000 ml
------------	---------

Merck’den temin edilen hazır besiyeri kullanılmıştır. 121°C’de 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir.

3.1.1.3. Nutrient Broth

<u>Bileşenler</u>	<u>(g/L)</u>
--------------------------	---------------------

Nutrient Broth	8
----------------	---

Distile su	1000 ml
------------	---------

Merck’den temin edilen hazırbesiyeri kullanılmıştır. 121°C’de 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Çözeltiler

Pigment ekstraksiyonu için kullanılan kimyasallar Merck’den temin edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Çalkalamalı etüv (Edmund-Bühler SM-30)

Dizi analizi cihazı (Beckman CEQ 8000)

FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrometer) (Perkin Elmer 100 FT-IR)

Otoklav (Hirayama HG 80 HLV)

Statik etüv (Binder ED 53)

Sterilizatör (Heraeus)

Santrifüj (Hettich Zentrifugen Germany)

Spektrofotometre (Shimadzu)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Kullanılan Mikroorganizmalar

Bu tez çalışmasında pigment üretimi için kullanılan bakteri izolatlar daha önce laboratuvarımızda yapılmış bir tez çalışmasında kullanılmak üzere petrokimyasal kirliliği bulunan sanayi bölgesinden izole edilmiştir. İzolasyon sonucu elde edilen saf kültürler nutrient agar besiyerinde +4 °C’de saklanmaktadır.

3.2.2. Etkin Pigment Üretici İzolatın Belirlenmesi

Bu çalışmada daha önce izole edilmiş bakteri izolatları arasında morfolojik açıdan renkli görünen kolonilere sahip mikroorganizmalar pigment üretimi açısından değerlendirilmek amacı ile nutrient agar besiyerine ekilmiş ve 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen mikroorganizmalar arasında pigmentli mikroorganizmalar tespit edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda pigmentli koloni oluşturan organizmalar nutrient broth besiyerine transfer edilmiş ve inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.3. Renk Maddesinin Ekstraksiyonu

Nutrient agar besiyerinde geliştirilen mikroorganizmalar öze yardımıyla nutrient broth besiyerine alınarak, her bir izolat için 100 ml’lik sıvı kültürler hazırlanmıştır. 1 günlük inkübasyon süresinin sonunda spektrofotometrede optik dansitesi ölçülen aş kültürlerden 100 ml MSM Broth besiyerine ekim yapılmıştır. 10 gün süresince 35 °C de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılan örnekler inkübasyon süresinin sonunda 50’şer ml’lik steril santrifüj tüplerine aktararak 6000 rpm’de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılıp, dipte kalan renkli hücre kısmına 20 ml çeşitli çözümler eklenerek 1 gece boyunca bekletilmiştir. Denenen etanol, metanol, aseton ve kloroform çözümlerinden C1 izolatının ürettiği pigment maddesi etanol ve metanolde çözünme gösterirken, C7 izolatının ürettiği pigment maddesi aseton ve kloroformda çözünme göstermiştir. 1 gecenin sonunda çözgenli süpernatant kısım 6000 rpm’de 10 dk santrifüj edilip hücrelerden arındırılarak steril falkonlara alınıp, spektrum taramaları yapılmıştır. Kuru biyokütle elde etmek amacı ile petrilere kalın katmanlar halinde dökülen renk maddeleri, 60 °C’lik etüvde kurumaya bırakılmıştır. 5 günün sonunda kuruyan maddeler petrilere kazınarak cam şişelere alınmıştır.

3.2.4. Mikrobiyal Pigment Standart Grafiğinin Hazırlanması

Kurutulmuş olan renk maddeleri kendi çözücülerinde tekrar çözülerek 50, 100, 250, 500 ve 1000 µg/ml'lik solüsyonları hazırlanmıştır. C1 izolatı için 465 nm, C7 izolatı için ise 375 nm dalga boyunda pigmentlerin verdiği renklerin absorbansları ölçülerek pigment maddesinin µg/ml'ye karşılık gelen standart grafiğı elde edilmiştir.

3.2.5. Plackett Burman İstatiksel Deney Tasarım Yöntemi ile Besiyeri Bileşimi Optimizasyonu

Çeşitli besiyeri bileşenlerinin mikrobiyal pigment üretimi üzerine etkisini net olarak görebilmek için Çizelge 3.1'de verilen 11 farklı besiyeri bileşeninin bir alt bir de üst limit olmak üzere 2 değeri için Plackett Burman istatiksel deney tasarım yöntemi ile deney tasarımı yapılmıştır (Desing Expert Anova). Yapılan tasarıma göre önerilen 12 farklı besiyeri bileşimi için 35 °C'de 125 r.p.m. çalkalama hızında 5 ve 10 gün süre ile inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyonlar sonrasında besiyeri sıvıları 6000 r.p.m. hızında 10 dakika süre ile santrifüj edilerek hücreler besiyeri süpernatantından uzaklaştırılmıştır. Süpernatantından ayrılan C1 izolatına ait pellet üzerine 20 ml etanol, C7 izolatına ait pellet üzerine ise aseton ilave edilmiştir. 5 dk boyunca vorteks ile çevrilen hücreler ile çözgenin homojenik olarak karışması sağlanmıştır.

Çizelge 3.1 Plackett Burman deneysel tasarımına göre gerçekleştirilen optimizasyonda kullanılan faktör ve düzeyleri göstermektedir.

Çizelge 3.1. Plackett Burman İstatistiksel Deney Tasarım Yöntemi tarafından önerilen besiyeri bileşimleri

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11
Std	A K ₂ HPO ₄	B KH ₂ PO ₄	C NH ₄ Cl	D MnSO ₄ .H ₂ O	E MgSO ₄ .7H ₂ O	F FeSO ₄ .7H ₂ O	G CaCl.2H ₂ O	H Maya özütü	J CH ₃ COONa	K Glikoz	L Gün
1	4	3,5	1	1	0,4	0,003	0,001	0,01	0,5	25	5
2	3	3,5	4	0,01	0,4	0,003	0,007	0,01	0,5	15	10
3	4	1	4	1	0,05	0,003	0,007	2	0,5	15	5
4	3	3,5	1	1	0,4	0,0005	0,007	2	3	15	5
5	3	1	4	0,01	0,4	0,003	0,001	2	3	25	5
6	3	1	1	1	0,05	0,003	0,007	0,01	3	25	10
7	4	1	1	0,01	0,4	0,0005	0,007	2	0,5	25	10
8	4	3,5	1	0,01	0,05	0,003	0,001	2	3	15	10
9	4	3,5	4	0,01	0,05	0,0005	0,007	0,01	3	25	5
10	3	3,5	4	1	0,05	0,0005	0,001	2	0,5	25	10
11	4	1	4	1	0,4	0,0005	0,001	0,01	3	15	10
12	3	1	1	0,01	0,05	0,0005	0,001	0,01	0,5	15	5

3.2.5.1. Plackett Burman İstatistiksel Deney Tasarım Yöntemi Doğrulama Deneyleri

İstatistiksel deney tasarım yöntemi önerilen besiyerlerinden alınan sonuçlardan yola çıkarak deneylerin doğruluğunu ortaya koymak amacı ile doğrulama deneyleri önermektedir. Doğrulama deneylerinden elde edilen bulguların tahmin edilen değerlere yakın olması sistem başarısını göstermektedir.

3.2.6. Üretilen Mikrobiyal Pigmentin Antimikrobiyal Aktivite Deneyleri

Mikrobiyal pigmentin antimikrobiyal aktivite deneylerinde agar difüzyon yöntemi kullanılmıştır. 24 saatlik aktif bakteri kültürlerinin yoğunluğu McFarland 0,5 standardı ile belirli bir yoğunluğa (150×10^6 hücre/ml) ayarlanmıştır. Nutrient agar besiyerine yayma plaka yöntemi ile başlangıç mikroorganizma konsantrasyonu 150×10^6 hücre/ml olan mikroorganizma kültüründen nutrient agar üzerine 100 µl ekim yapılmıştır. 1000 mg/ml derişiminde mikrobiyal pigmentler ve kontrol grubu olarak çözücüler nutrient agar besiyerine 5 µl damlatılmıştır. 35°C’de 24 saat süre inkübasyona bırakılmıştır. Denemede kullanılan mikroorganizmalar; *S.aureus* 25923 ATCC, *B. subtilis* 3610 NCIB, *M. luteus* 196 NCIB, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* NRRL B-3711, *Proteus vulgaris* NRRL B-123 türleri ile *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* ve *Enterococcus faecalis* suşlarıdır, bu suşlar ESOĞÜ Tıp Fakültesi klinik izolatu olup Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda muhafaza edilmektedir.

3.2.7. Çevresel Faktörlerin Mikrobiyal Pigment Üretimi Üzerine Etkisi

3.2.7.1. pH’ın Etkisi

İstatistiksel deney tasarım yöntemi ile önerilen doğrulama besiyerlerinin pH’ları NaOH ve HCl ile 3, 4, 5, 6, 9 ve 10’a ayarlanarak ekimler yapılmış ve 35 °C’de 125 r.p.m. çalkalama hızında 10 gün süre ile inkübasyon yapılmıştır.

3.2.8. Pigment Karakterizasyonu

Üretilen pigmentin karakterizasyonu kapsamında inkübasyon sonrasında kültür sıvısından pigmentin alınması için 6000 r.p.m. hızında 15 dakika süre ile santrifüj edilerek besiyeri uzaklaştırılmıştır. Daha sonrasında dipte kalan renkli hücre kısmına uygun çözücüler ilave edilerek 24 saat +4 °C’de bekletilmiştir. 1 gecenin sonunda çözgenli süpernatant kısım 6000 rpm’de 10 dk. santrifüj edilip hücrelerden arındırılarak steril şişelere alınıp, spektrum taramaları yapılmıştır. Kuru biyokütle elde etmek amacı ile petrilere kalın katmanlar halinde dökülen renk maddeleri, 60 °C’lik etüvde kurumaya bırakılmıştır. 5 günün sonunda kuruyan maddeler petrilere kazınarak cam şişelere alınmıştır. Yapılan tüm karakterizasyon basamaklarında elde edilen bu kuru madde kullanılmıştır.

3.2.8.1. FTIR analizi

Bu çalışmada pigment olarak kullanılan maddelerin kimyasal yapılarındaki olası grupların belirlenmesi için fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analizleri yapılmıştır. FTIR analizleri için kuru pigmentler ile hazırlanan KBr diskleri kullanılmıştır. Toz haline getirilmiş pigment örnekleri potasyum bromür (KBr) ile %1 oranında karıştırılarak (1 mg kuru adsorbent örneği ve 100 mg KBr) preslenmiş ve disk haline getirilmiştir. Diskin FTIR spektrumu 400-4000 cm^{-1} bölgesinde alınmıştır. FTIR spektroskopisi Bruker Tensor 27 kullanılarak yapılmıştır.

3.2.9. Mikrobiyal Pigment Üretici İzolatın Belirlenmesi

Üretici suşun tür düzeyinde tanımlanması için moleküler identifikasyon yöntemleri kullanılmıştır.

3.2.9.1. Üretici İzolatın Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyonu

Etkin mikrobiyal pigment üretici izolatın türünü belirlemek amacı ile moleküler yöntemler kullanılmıştır.

3.2.9.1.1.Üretici Mikroroganizmadan DNA Ekstraksiyonu

Mikrobiyal pigment üretici izolatın 16S rRNA geni amplifikasyonu için nutrient agar ortamında geliştirilen bakteri kolonileri steril çubuk yardımı ile tek koloni 200µl steril distile su/DPEC (di-etilpirokarbonat) su içerisine alınmış 95°C’de 15 dakika bekletildikten sonra 13.000 r.p.m’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant PCR sürecinde kalıp olarak kullanılmak üzere -20°C’de saklanmıştır (Anton, et.al.,1999; Dyll and Smith,2004).

Çalışmada kullanılan izolat için bakterilerde kullanılan spesifik primer; AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG T (5’-3’) primer dizisi kullanılmıştır. Bu primerler 5’-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3’ (27F) ve 5’-GGGCGG(AT)GTGTACAAGGC-3’ (1387R) dizilimindeki primer kullanılmıştır (Marchesi et al., 1998; Lane, 1992). Elde edilen PCR ürünleri %1’lik agaroz jellerde gözlenmiştir. Reaksiyon için uygulanan reaksiyon şartları Çizelge 3.2.’de sunulmaktadır.

Çizelge 3.2. Mikroorganizmanın 16S rRNA genlerinin çoğaltılması için gerekli reaksiyon şartları

İlk Denatürasyon	94°C	3dk
30 döngü		
Denaturasyon	94°C	30 sn
Bağlanma	50°C	1 dk
Uzama	72°C	1 dk
Son Uzama	72°C	10 dk
Bekleme	4°C	Süresiz

PCR ürünlerinin saflaştırılması amacıyla “Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kiti” kullanılmıştır. Buna göre %1 lik jelde yürütülen PCR ürünleri UV transilluminator üzerinde gözlenerek, steril bisturi ucu ile istenilen bantlar agaroz jelden kesilmiştir. DNA içeren agaroz parçaları tartılarak, bunların üzerine her 10 mg için 10 µl olmak üzere membran bağlama çözeltisi eklenmiştir. Tüp hafifçe vortekslenerek karıştırıldıktan sonra 60 °C’de 5-15 dakika (agaroz tamamen eriyinceye kadar) su banyosunda inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda GFX kolonu “toplama tüpü” içine yerleştirilmiş ve su banyosundan çıkarılan örnek kolona konarak 13000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Toplama tüpünde toplanan sıvı atılıp filtre yeniden tüpe yerleştirilerek üzerine 700 µl yıkama tamponu eklenip tekrar 13000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Toplama tüpü atılarak kolona yeni bir toplama tüpü yerleştirilerek üzerine 50 µl elusyon buffer (otoklavlanmış distile su) eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyondan sonra 13000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenerek saflaştırılmış ürünler elde edilmiştir.

3.2.9.1.2. PCR Ürünlerinden Dizi Analizi

DNA ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilen DNA’nın 16S rRNA geni PCR ile amplifiye edilerek bu ürünlerin direkt olarak dizi analizlerinin eldesi yoluna gidilmiştir. ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer ile PCR ürünlerinin baz dizilerinin belirlenmesi amacıyla dizi analiz kitinde önerilen şartlar uygulanmıştır..

İzolatin dizi analizi sonrası gen analizi; NCBI ‘National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) veritabanındaki BLAST (Altschul vd., 1997) programı ile gerçekleştirilmiştir.

BÖLÜM 4

4.BULGULAR

4.1. Alınan Toprak Örneklerinden Mikroorganizma İzolasyonu

Alınan toprak örnekleri ile yapılan izolasyon çalışmasında 70 mikroorganizma izole edilmiştir. İzolatların mikrobiyal pigment üretim yetenekleri nutrient agar besiyerindeki koloni renklerine göre belirlenmiş ve 4 üretici izolat (C1, C7, C6 ve A16 izolatları) seçilmiştir.

Çizelge 4.1. İzolatların morfoloji ve gram özellikleri ile mikrobiyal pigment üretim yetenekleri

İzolatin Kodu	Morfoloji ve Gram Özelliği	Mikrobiyal Pigment Üretim Yeteneği ve Renk
A16	(-) Kokkobasil	Var-Beyaz
C1	(+) Basil	Var-Turuncu
C6	(-) Basil	Var-Sarı
C7	(-) Basil	Var-Pembe

4.2. Mikrobiyal Pigment Üretici Etkin İzolatın Belirlenmesi

Nutrient agar besiyerindeki koloni renklerine göre seçilen izolatlardan üretim besiyerine ekim yapılmış ve besiyerindeki renk farklılıkları gözlemlenmiştir. Bu farklılıklara göre pigmentasyonun en belirgin olduğu C1 ve C7 izolatları mikrobiyal pigment üretimi için seçilmiş olup bundan sonraki çalışmalarda kullanılmıştır.

4.3. C1 ve C7 İzolatları ile Mikrobiyal Pigment Üretimi Optimizasyonu

Mikrobiyal pigment üretimi için üretim ortamı bileşenlerinin en uygun miktarlarının belirlenmesi amacı ile Plackett-Burman istatistiksel deney tasarımı yöntemi ile optimizasyon çalışması yapılmıştır.

4.4. Plackett Burman İstatistiksel Deney Tasarım Yöntemi ile Besiyeri Bileşimi Optimizasyonu

Çizelge 4.2’de verilen Plackett Burman deney tasarım yöntemi tarafından önerilen besiyeri içeriklerinin mikrobiyal pigment üretimi üzerine etkisini görmek amacıyla renk yoğunlukları okunmuştur. Elde edilen bulgulara göre C1 izolatu için 2 ve 10. besiyerlerinin, C7 izolatu için ise 7 ve 8. besiyeri bileşenlerinin mikrobiyal pigment üretimi üzerine daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Plackett Burman Deney Tasarım Yöntemi tarafından önerilen besiyeri içeriklerinin mikrobiyal pigment üretim değerleri. (Çalışma koşulları:35 °C; 125 r.p.m.; 5 ve 10 gün, ölçüm koşulları; 25 °C)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C1	2,8495	13,42	1,119	3,5065	0,189	3,81	9,80	3,66	3,20	12,816	7,02	6,27
C7	0,296	0,316	0,147	0,275	0,172	0,331	0,41	0,406	0,177	0,317	0,253	0,16

4.4.1. Plackett Burman İstatistiksel Deney Tasarım Yönteminin Önerdiği Doğrulama Deneyleri

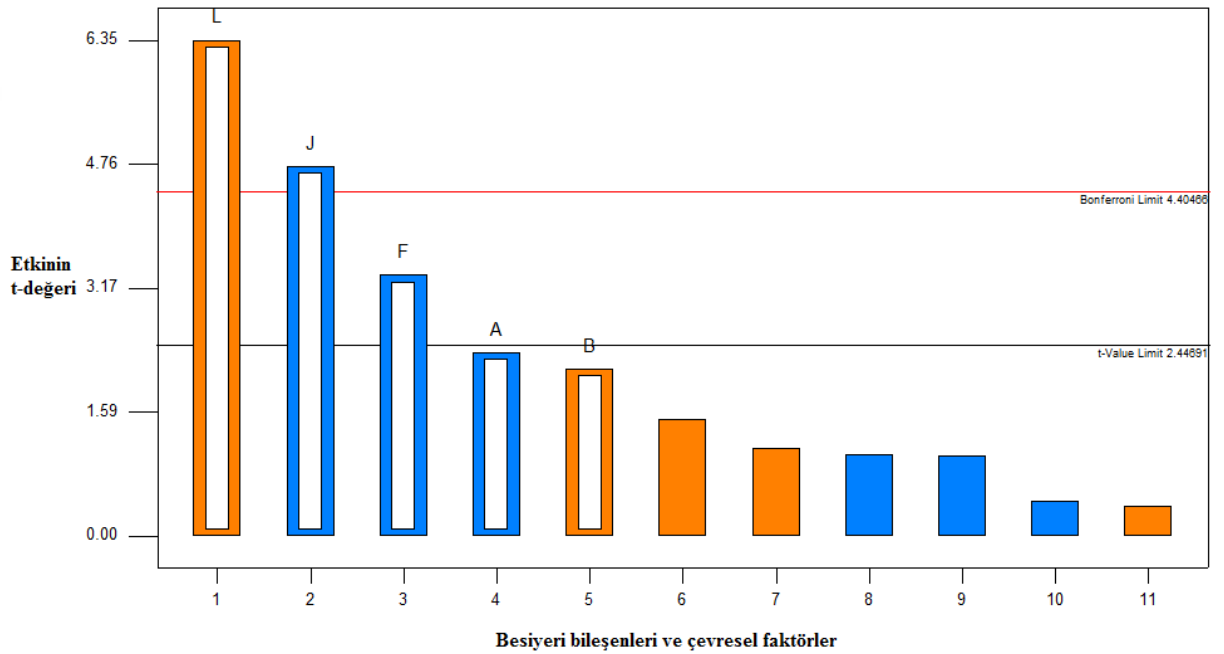
Plackett Burman istatistiksel deney tasarım yönteminin önerdiği besiyeri mikrobiyal pigment üretimi ölçüm sonuçlarına göre önerilen doğrulama besiyeri içerikleri 4.3’de verilmektedir.

Çizelge 4.3. Plackett Burman istatistiksel deney tasarım yönteminin önerdiği doğrulama besiyerleri mikrobiyal pigment üretim değerleri

	Önerilen	Güven Aralığı	Deneyisel sonuç
C1	13,5334	11,0185-16,0483	12,454
C7	0,4105	0,3857-0,4353	0,3885

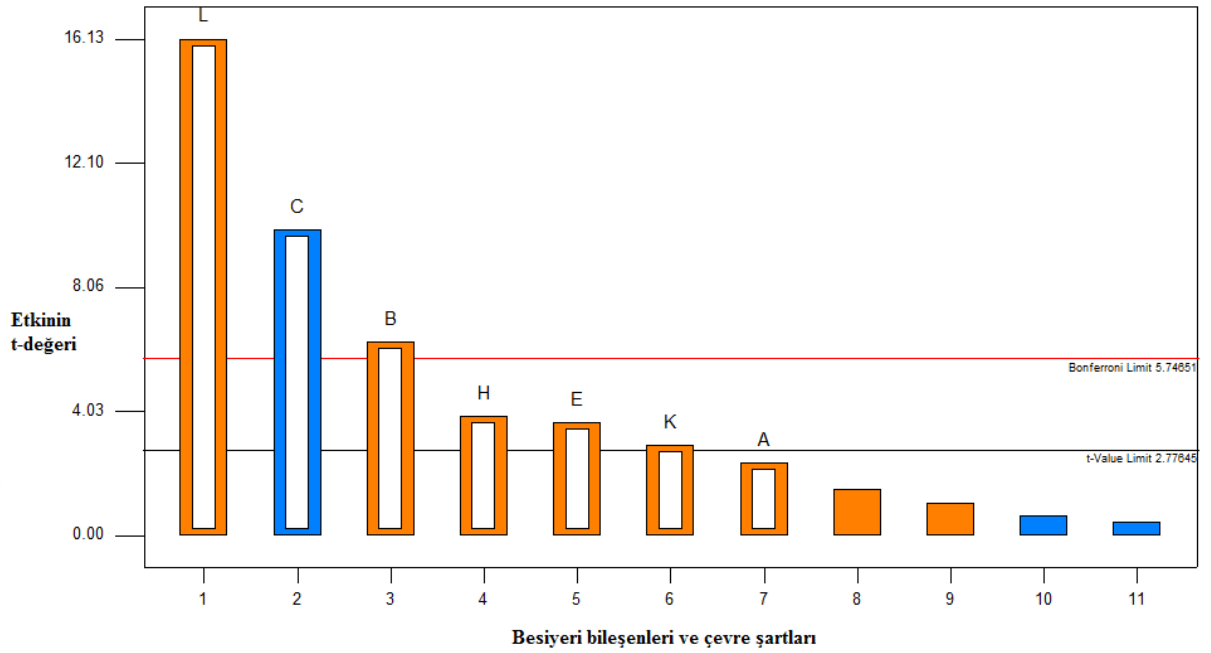
4.4.2. Plackett Burman İstatistiksel Deney Tasarımına göre Sonuca Etkili Besiyeri Bileşenleri

Deney bulgularına göre C1 izolatından elde edilen mikrobiyal pigment üretimine %44,8 oranında inkübasyon süresi, %24,9 oranında CH_3COONa bileşeni, %12,39 oranında $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ bileşeni, %6,16 oranında K_2HPO_4 bileşeni, %5,08 oranında KH_2PO_4 bileşeninin etkisi olduğu görülmüştür.



Şekil 4.1. Besiyeri bileşenlerinin C1 izolatından elde edilen mikrobiyal pigment üretimi üzerine etkisi. (L:gün, J: CH_3COONa , F: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, A: K_2HPO_4 , D: KH_2PO_4)

Elde edilen deney bulgularına göre C7 izolatından mikrobiyal pigment üretimine %58,47 oranında gün, %22,14 oranında NH_4Cl , %8,87 oranında KH_2PO_4 , %3,39 oranında maya özütü, %3,05 oranında $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, %1,92 oranında glikozun etkisi olduğu görülmüştür.



Şekil 4.2. Besiyeri bileşenlerinin C7 izolatından elde edilen mikrobiyal pigment üretimi üzerine etkisi. (L:gün, C: NH_4Cl , B: KH_2PO_4 , H: maya özütü, E: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K:glikoz)

4.5. Üretilen Mikrobiyal Pigmentin Karakterizasyonu

Mikrobiyal pigmentin karakterizasyonu kapsamında spektrum taraması ve FTIR spektroskopisi analizleri yapılmıştır.

4.5.1. Spektrofotometrik Spektrumların Belirlenmesi

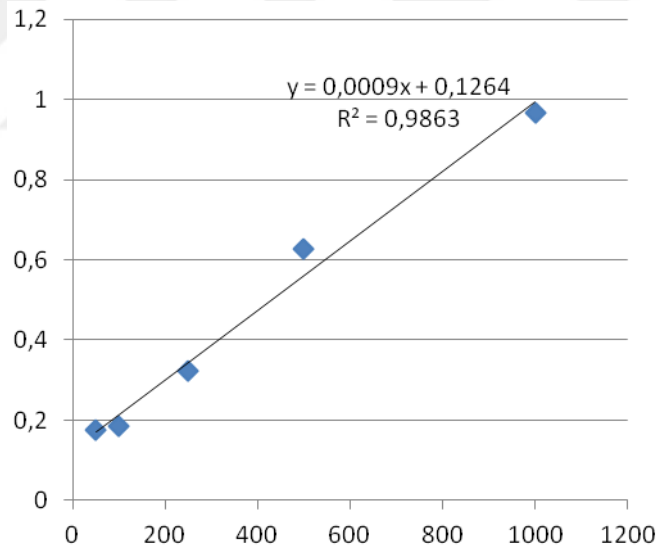
Spektrofotometrenin temel mantığı, hazırlanan çözeltilerden belirli spektrumlarda ışık geçirilmesi ve bu ışığın ne kadarının çözelti tarafından absorblandığının bulunması esasına dayanır. Çözeltinin içerdiği madde miktarı ne kadar fazla ise daha fazla ışık, çözelti tarafından soğurulur. Spektrofotometre çözeltinin içinden geçebilen yani çözelti tarafından absorblanmayan ışığın yoğunluğunu tespit ederek çözelti içeriğindeki aranan maddenin miktarı hakkında kantitatif bilgi verir (Hışıl, 2002). Bu amaçla her 200 ile 800 nm dalga boylarında absorbsiyon taraması yapılmış ve renk maddelerinin 280 ile 200 nm dalga boyları arasında yüksek absorpsiyonlar verdiği görülmüştür. Örneklerin analizinde özellikle UV bölgedeki ölçümlerde, bulaşık proteinlerden olduğu kaynaklanan yüksek absorpsiyon bölgeleri tespit edilmiştir. Bilindiği üzere 260-280 nm

dalga boyları arasında proteinler ve genetik materyaller yüksek absorpsiyon değerlerine sahiptir. Yapılan bazı çalışmalarda kinon moleküllerinde özellikle 280 nm dalga boylarından başlayarak 300 nm dalga boylarına kadar olan bölgelerde yüksek absorbans noktalarının olduğu tespit edilmiştir (Zhu et al., 2009).

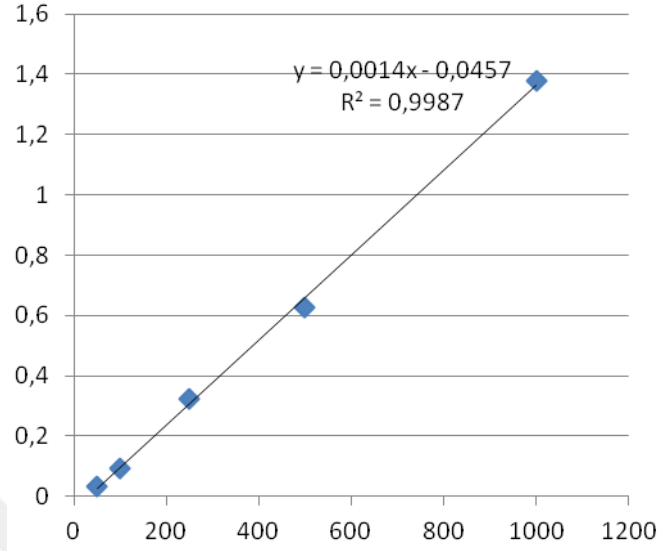
Yapılan spektrum taramalarında protein kaynaklı yüksek absorbans değerlerinin dışında renk maddelerinin absorbans verdiği dalga boyu C1 izolatu için 465 nm, C7 izolatu için 375 nm olarak ölçülmüştür.

4.5.1.2. Standart Eğri Grafiklerinin Hazırlanması

Spektrum taraması için C1 ve C7 izolatından hazırlanan kuru mikrobiyal pigmentler uygun çözücüde çözülerek 50, 100, 250, 500 ve 1000 ppm konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler ile spektrofotometrede uygun spektrumda okumalar yapılmıştır.



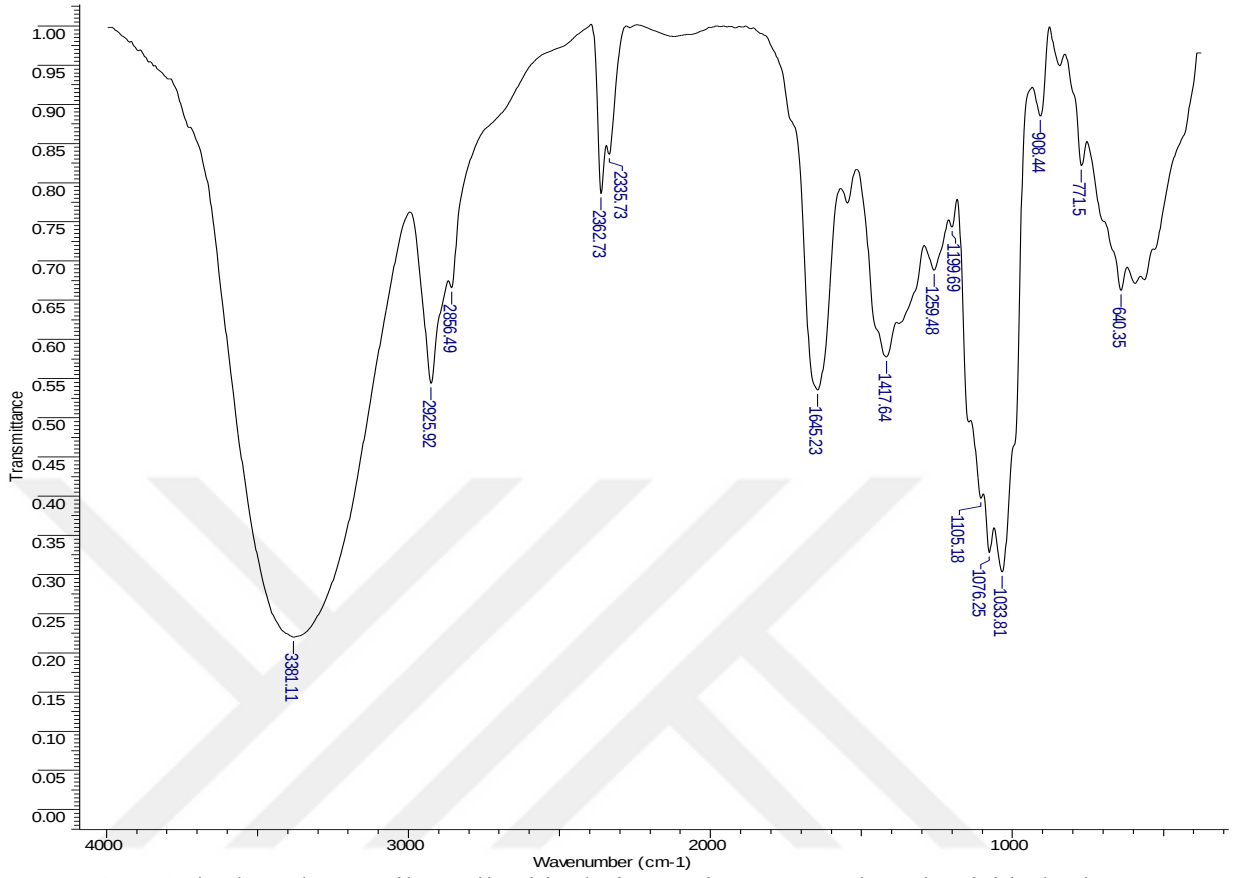
Şekil 4.3. C1 izolatının 465 nm'deki standart eğri grafiği



Şekil 4.4. C7 izolatının 375 nm'deki standart eğri grafiği

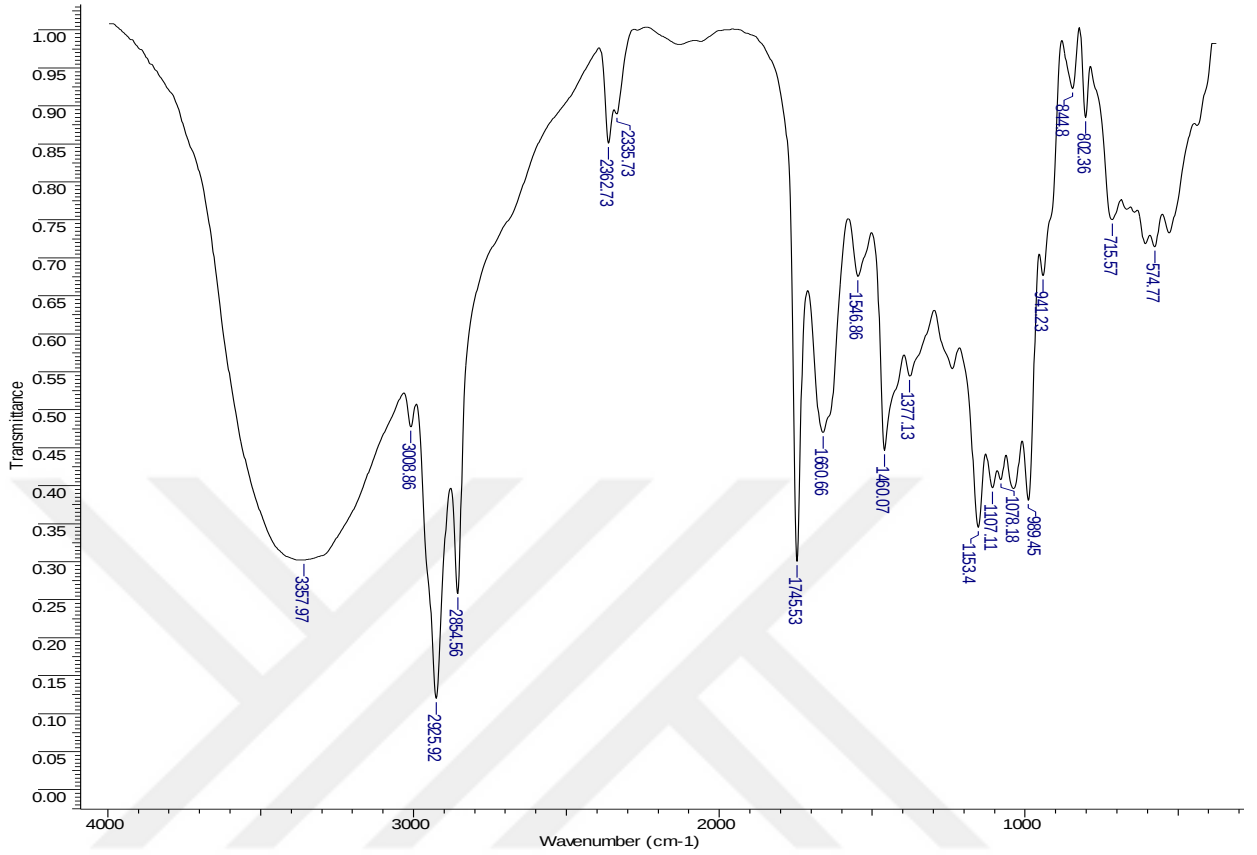
4.5.2. FTIR Spektroskopisi ile Temel Yapı Analizi

Teknolojinin gelişmesi ve yapılan çalışmaların artmasıyla birlikte organik bileşiklerin tanımlanmasında FTIR spektroskopisinin kullanılabilirliği artmıştır. Pek çok molekülün IR spektrumları alınarak zengin bir bilgi birikimi oluşmuştur. Yapılan bu araştırmalar optik izomerler dışında hemen hemen bütün bileşiklerin IR spektrumunun birbirinden farklı olduğunu göstermiştir. IR bölgesi elektromanyetik spektrumun görünür bölgesi ile mikro dalga bölgesi arasında yer almaktadır. Bu bölge $4000-400\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu arasındır. IR spektrumu organik maddenin kimyasal yapısı ve bağ yapısı ile ilgili doğrudan bilgi sağlamaktadır. C1 ve C7 izolatlarından elde edilen her bir pigment maddesi için FTIR analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.5 ve 4.6).



Şekil 4.5. C7 izolatından üretilen mikrobiyal pigmentin FTIR spektroskopisi bulguları

C7 izolatından üretilen mikrobiyal pigment için yapılan FTIR grafiğinde görülen piklerde $3,400\text{--}3,200\text{cm}^{-1}$ aralığında görülen pik OH ve NH_2 gerilmesine dayanmaktadır. Öte yandan $2,930\text{--}2,860\text{cm}^{-1}$ aralığındaki pik CH_2 ve CH_3 gerilmesini göstermektedir. $1,650\text{--}1,620\text{cm}^{-1}$ aralığındaki pikler aromatik $\text{C} = \text{C}$ ya da $\text{C} = \text{O}$ grupları arasındaki gerilme titreşimlerini göstermektedir. $1,320\text{--}1,390\text{cm}^{-1}$ aralığındaki bantlar ise pigmentin yapısında pirol ve/veya indol bulunduğunu göstermektedir.



Şekil 4.6. C1 izolatından üretilen mikrobiyal pigmentin FTIR spektroskopisi bulguları

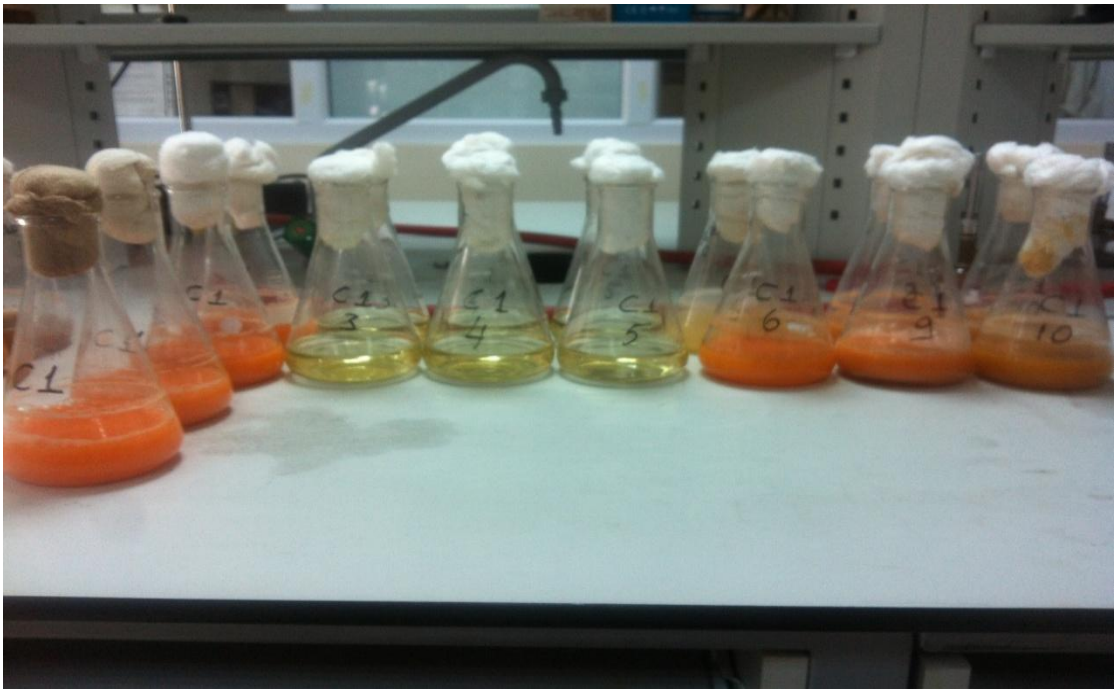
C1 izolatından üretilen mikrobiyal pigmentin FTIR spektroskopisinde 1460 cm^{-1} ve 1728 cm^{-1} bölgelerindeki orta şiddetli pikler kırmızı biyorenkendiriciler için parmak izi bölgesi olarak bilinmektedir. 1460 ve 1450 cm^{-1} bölgelerindeki pikler pigment maddesinin içinde alifatik grupların varlığını göstermektedir. 1320 ve 1390 cm^{-1} aralığındaki pikler pirol/indol halkalarının varlığını; 2860 ve 2930 cm^{-1} aralığı CH_2 ve CH_3 gruplarını, 2923 cm^{-1} deki pikler metil, metilen ve metan gruplarını göstermektedir. $3400\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ aralığında görülen pik OH ve NH_2 gerilmesine dayanmaktadır.

4.6. Renk Maddelerinin pH Stabilitesi

pH stabilizasyonunu sağlamak için Plackett-Burman istatistiksel deney tasarımının önerdiği besiyeri pH 3, 4, 5, 6, 9 ve 10'a ayalanmış ve spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. C7 izolatı pH 3, 4, 5 ve 6'da üreme göstermezken pH 9 ve 10'da renk kahverengiye dönmüş ve suya da renk vermiştir.

C1 izolatında ise pH 3, 4 ve 5 de üreme gözlenmemiş, pH 6 da renk görülmüş, pH 9 ve 10 da rengin kahverengiye doğru koyulaştığı görülmüştür. (Şekil 4.7)

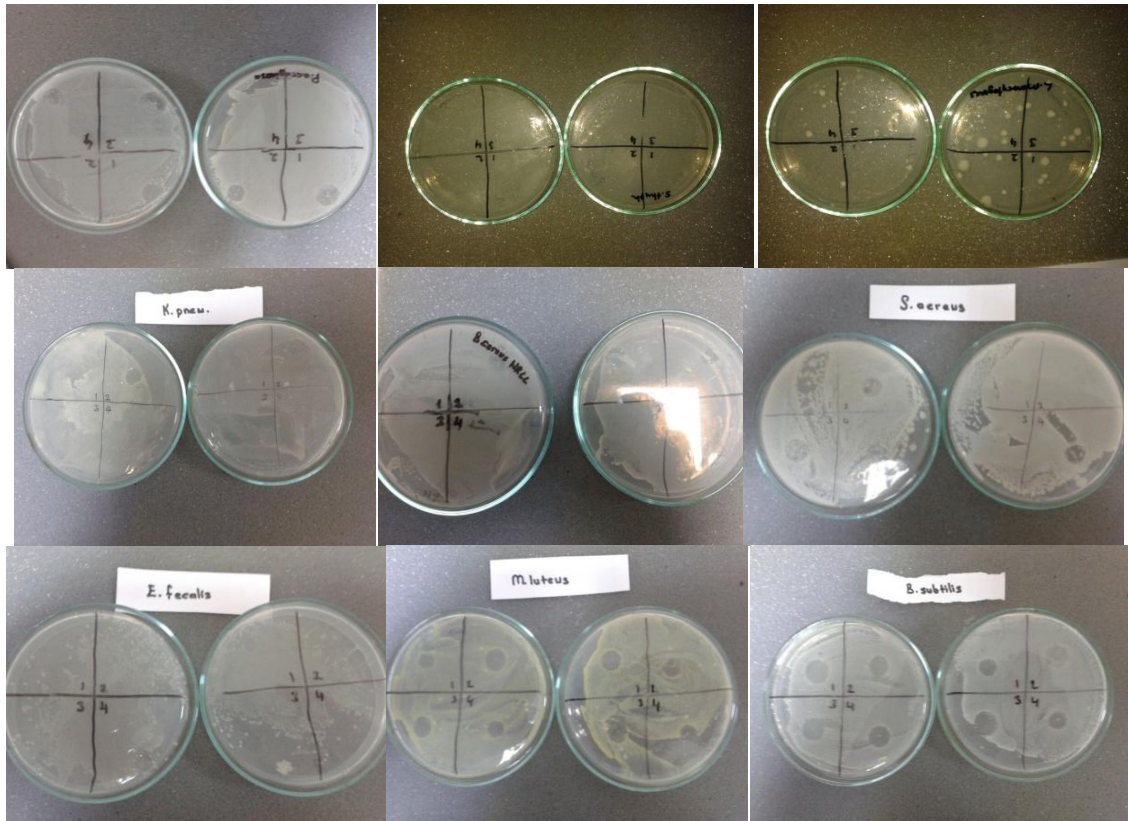
Hem C1 hem de C7 izolatı için yapılan spektrum taramalarında absorbanans değerlerinin değişmediği görülmüştür.



Şekil 4.7. C7 ve C1 izolatlarının farklı pH'lardaki mikrobiyal pigment üretimleri

4.7. Mikrobiyal Pigmentin Antibakteriyel Aktivitesi

Mikrobiyal pigment; *S.aureus* 25923 ATCC, *B. subtilis* 3610 NCIB, *M. luteus* 196 NCIB, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus*, *Bacillus cereus* NRRL B-3711, *Proteus vulgaris* NRRL B-123 gibi mikroorganizmalar üzerinde herhangi bir antibakteriyel etkiye sahip olup olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. C1 ve C7 izolatlarından üretilen mikrobiyal pigmentlerin antibakteriyel aktiviteleri

Bu deney sonucunda çözücülerden kaynaklı bir antibakteriyel aktivite görülmüş, pigmentin kendisinin ise herhangi bir antibakteriyel etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.8).

4.8. Pigment Üreticilerinin Karakterizasyonları

Üretici mikroorganizmaların identifikasyonu 16S rRNA sekans analizi ile gerçekleştirilmiştir. Pigment üretimi açısından etkin izolatların Blast değerlendirmesi sonucunda C7 izolatının, %100 oranında *Gordonia terrae* strain M1-3'e, C1 izolatının ise %100 oranında *Enterobacter ludwigii* strain AB-188'e benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.



BÖLÜM 5

5.TARTIŞMA

Pigment üreten mikroorganizmalar taksonomik çalışmalar ve fermentasyon ve biyoproses mühendisliği gibi biyoteknolojik potansiyelleri nedeniyle bilimsel topluluğun ilgisini uyandırmıştır.

Pek çok gıda maddesi, boya, kozmetik ve ilaç üretim işlemlerinde kullanılmış olan birçok yapay sentetik boya maddelerini bünyesinde barındırmaktadır. Gıda, boya, kozmetik ve ilaç üretim süreçlerinde doğal pigmentlerin kullanımı son yıllarda sentetik pigmentler ve bunların endüstriyel yan ürünlerinin insan ve çevre üzerindeki zararlı etkileri nedeniyle artmaktadır.

Yapay renklendiricilerin, doğal renklendiricilere göre renk tonlarının ve renk şiddetlerinin kuvvetli olması, farklı pH seviyelerinde stabilitelerinin yüksek olması, uygulama kolaylığı ve maliyetinin düşük olması gibi özelliklerinden dolayı gıdalarda kullanımları hızla artmış ve doğal renklendiricilere ilgi azalmıştır. Doğal renk maddelerinin birçok fiziksel ve kimyasal etkilere karşı (ısı, ışık, pH gibi) stabilitelerinin düşük olması ve gıdalarda kullanımlarında çeşitli problemler yaşanmasına karşın, son yıllarda yapılan araştırmalarda sağlık üzerinde olumlu etkileri nedeniyle birçok sektörde bu maddelerin kullanımlarının arttığı gözlenmektedir (Büyüksırt, 2011).

Boyalar iplik, yün, ipek kumaş gibi tekstil malzemelerini renklendirmek için kullanılır ve giysiler üzerinde uygulanır. Yaygın olarak kullanılan boyalar annatto, indigo, harda kamaladır. Doğal boyalar kumaşa yedirmek için bir sabitleyici gerektirir. Doğanın Renkleri (TcoN) tamamen çevre dostu olan, bitkisel boyama sürecini araştırma odaklı dünyada sadece birkaç tane kalan doğal boyama birimlerinden biridir. Birim, doğal indigo fermentasyon sürecinde uzmanlaşmıştır. Ürünler, ilaç ve gübre kullanılmadan organik ve yetişkin olmalıdır. Üretim yöntemleri çevre dostudur ve uygulamalar su tasarrufu sağlamaktadır. Kullanılan su her adımdan sonra saklanır, boyama işlemi ve tarımsal kullanım için geri dönüştürülebilir.

Sentetik kökenli pigmentlerin çevreye neden olduğu toksisite problemleri doğal pigmentlere bir yönelime neden olmuştur. Doğal pigmentlerden olan mikrobiyal kaynaklı pigmentler potansiyel olarak sentetik pigmentler için iyi bir alternatif olmaktadır. Ayrıca mikroorganizmalardan pigment üretimin avantajları olarak da ucuz kültür ortamında hızlı ve kolay büyüme ve farklı tonlarda renk elde edilebilme sıralanabilir (Venil et al, 2009).

Mikroorganizmalar karotenoidler, melaninler, flavinler, kinonlar, prodigiosinler ve daha özel monascinler, violacein veya indigo gibi farklı pigmentler üretmektedir. Günümüz endüstrisi, gıda ve diğer sanayi uygulamaları için bazı mikrobiyal pigmentleri üretebilmektedir. Doğal biyorenkendiricilerin birçoğu mikrobiyal bozulmadan gıdayı korumak için belli bakterilere, virüslere ve mantarlara karşı antagonistik aktivite göstermektedir. Bazı protozoa ve böceklerle karşı da aktiftir. Siyanobakteriler sadece klorofil a'ya sahiptir, bundan başka diğer fotosentetik pigmentleri ise çeşitli fikobiliproteinler ve karotenoidlerdir. Klorofil özellikle reçel, jöle, şeker, dondurma ve diğer çeşitli ürünlerde kullanılmakta, ancak renklendirici olarak sınırlı kullanımı bulunmaktadır. Çeşitli alglerin (*Dunaliella*, *Dictyococcus* ve *Haematococcus*), bazı filamentli mantarların (*Ascomycetes*) ve mayaların (*Cryptococcus*, *Phaffia*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* ve *Sporobolomyces*) karotenoid ürettikleri literatürde rapor edilmiştir (Ökmen ve Türkcan, 2012). Bakteriler de çeşitli sebeplerle pigment üretebilirler ve bu onlar için önemli bir rol oynar. Siyanobakteriler gibi bazı bakteriler fotosentez gerçekleştirebilmek için fikobilin pigmentlerine sahiptir (Ahmad et al, 2012). Bakterilerden üretilen pigment, Doğu ülkelerinde çok daha fazla kullanılmakta olup uygulama alanlarının fazlalığı nedeni ile yoğun olarak araştırılan bir konu olmuştur.

Yapılan bu tez çalışmasında da bakteriyel kaynaklı pigment üretimi üzerine yoğunlaşmış, pigment üretici mikroorganizma(lar)ın üretim koşullarının optimizasyonu, üretilen mikrobiyal pigmentin karakterizasyonu ve üretici suşların identifikasyonu çalışılmıştır.

Çalışmada kullanılan izolatlar arasında mikrobiyal pigment üretimi için en uygun izolatlar C1 ve C7 olarak belirlenmiştir. Kullanılan besiyeri pH'ı 6,8'e ayarlanmıştır. Seo ve arkadaşlarının *Auereobasidium pullulans* ile yaptıkları çalışmada

benzer besiyeri bileşimi pH'ı da 6,8 olarak bildirilmiştir (Seo et al, 2004). Aksu ve Eren de *Rhodotorula mucilaginosa* ile yaptıkları karotenoid sentezi çalışmalarında üretim için en etkili pH'ın 7,0 olduğunu bildirmiştir (Aksu ve Eren, 2005). Ahmad ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalardan ilkinde *Chromobacterium violaceum*'dan ham menekşe renkli pigmentlerin üretimi sırasında düşük pH değerlerinde pigmentin rengini yeşilimsi-mavi, pH 3 ila 9 arasında parlak koyu mavi olarak tanımlamışlardır. Bazik pH değerlerinde ise renksizdir. Ahmad ve arkadaşlarının yaptıkları diğer çalışmada ise *Serratia marcescens*'den kırmızı renkli pigment maddesinin tanımlamışlardır. Çalışmalarında kırmızı pigment maddesinin pH 2'de pembe, pH 9' da turuncu ve pH 7'de kırmızı olduğunu belirtmişlerdir (Ahmad et al, 2012). Yapılan bu tez çalışmasında besiyeri üzerinde pH değişimleri yapılarak mikrobiyal pigmentlere pH'ın etkisi araştırılmıştır. Besiyeri pH'ı 3, 4, 5, 6, 9 ve 10'a ayarlanmış ve izolatların mikrobiyal pigment üretim yeteneklerine bakılmıştır. pH 3, 4 ve 5 de bakteri üremesi görülmezken pH 6' da C1 izolatında üreme ve pigmentasyon görülmüş, C7 izolatında ise sadece üreme görülmüş, pigmentasyon görülmemiştir. pH 9 ve 10 da ise her iki izolatta da üreme ve pigmentasyon olmasına rağmen pigment renkleri kahverengiye dönmüştür (Şekil 4.7).

C1 ve C7 izolatlarından pigment üretimi için optimum sıcaklık 37 °C olarak belirlenmiştir. Goswami ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kendi izolatlarından pigment üretimi için uygun sıcaklığı 30 °C olarak belirlemişlerdir (Goswami et al, 2010). Cardona ve arkadaşları yaptıkları deneylerde bakterilerin 25 °C'nin altında veya üzerindeki sıcaklıklarda pigment kaybetmesine neden olabilecek termal şoka karşı duyarlı olduklarını belirtmişlerdir. Bu duruma örnek olarak da sadece 25 °C' de büyüme ortamı sağlandığında kırmızı pigmentasyon gösteren *Serratia marcescens*'i göstermişlerdir (Cardona et al, 2010). Venil ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *S. marcescens*'in 37 °C'de besleyici et suyu içerisinde pigmentleşme göstermeyip 30 °C'de gösterdiğini fakat 37 °C'de toz fıstık suyu içerisinde neredeyse 30 °C'de besleyici et suyu içerisindeki kadar pigmentleşme gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu da sıcaklığın pigmentleşme için tek başına yeterli olmadığını göstermektedir (Venil et al, 2009).

Besiyeri optimizasyonu en fazla ürün verimini elde etmek için önemli süreçlerden biridir ve besiyeri içeriği, çalışma koşulları, pH, sıcaklık, havalandırma ve

çalkalama gibi çeşitli faktörleri içerir. Klasik optimizasyon (tek faktörlü deneyler) her zaman iyi kabul edilmiştir fakat çok sayıda deney tekrarı gerektirmesi, daha fazla zamana ihtiyaç duyulması ve zahmetli olması gibi birçok dezavantajı vardır. Tarama ve optimizasyona istatistiksel yaklaşım, besiyeri ve farklı metabolitlerin üretimindeki süreç optimizasyonu açısından önem kazanmıştır (Sharmila et al, 2012). Etkin üretici izolatların mikrobiyal pigment üretimi için gereksinim duyduğu besinsel bileşenlerin ve bu bileşenlerin miktarlarının belirlenmesi amacıyla istatistiksel olarak Plackett Burman deney tasarım yöntemi ile optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Deney tasarımı, belirlenmiş bir tasarım matrisine göre süreç üzerinde etkili olması muhtemel süreç değişkenlerinin, değerlerinin sistematik olarak değiştirilerek, bir deney veya bir takım sıralı deneylerin gerçekleştirilmesi yöntemidir. Özellikle araştırma geliştirme faaliyetlerinde kullanılan bir kalite tekniğidir. Bu yöntem deneylerin sayısını azaltmak ve deneylere etki eden faktörlerin tek başlarına ve diğer faktörlerle birlikte deney sonuçlarını nasıl etkilediklerini ortaya koymak için geliştirilmiştir. Deney tasarımı yaklaşımı, söz konusu faktörlerin farklı seviyelerinin çıktı değerleri üzerinde oluşturdukları değişimleri ve bu değişimlerin altında yatan nedenleri araştırarak bunları optimize etmeyi ve sistemin güvenilirliğini artırmayı hedefler. Deney tasarımı teknikleri sadece istatistiksel bir yaklaşım değil, tüm araştırma-geliştirme faaliyetlerinde kullanılabilecek, kaliteyi artıran, maliyetleri düşüren, sonuçların güvenilirliğini sağlamlaştıran tekniklerdir. Uygulamada getirdikleri avantajlar; performans ve kalitenin artırılması, maliyetlerin düşürülmesi, araştırma ve geliştirme faaliyetlerinin hızlandırılması ve prosesin kalite özelliklerini belirleyen değerlerin kontrol edilemeyen veya edilmesi zor faktörlere karşı daha az duyarlı olması şeklinde sıralanabilir (Kumar et al, 2008). Optimizasyon çalışmalarında gerek zamandan gerekse maliyetten tasarruf edilmesi, istenen sonuca etki eden kritik faktörlerin ve düzeylerin net olarak görülebilmesi ve sistemin kararlılığının sağlanması açısından istatistiksel deney tasarım yöntemleri büyük önem taşımaktadır (Çelikdemir, 2012).

Yapılan bu tez çalışmasında, Plackett Burman istatistiksel deney tasarım yöntemine göre minimum 11 faktör için iki düzey denemesi yapılmıştır. Elde edilen deneysel veriler Desing Expert deney tasarımı Anova programı ile düzenlendiğinde spesifik olarak hangi faktörün sonuca ne kadar katkısı olduğu ve hangi faktörlerin kritik,

hangilerinin etkisinin zayıf olduğunu ortaya konmuştur. Klasik optimizasyon çok fazla deney gerektiren ve zaman alan bir süreç olmasına rağmen istatistiksel yöntemlerle yapılan optimizasyon çalışmaları ise daha az ancak kritik deneylerle net ve spesifik sonuç vermesi açısından önem taşımaktadır. Çizelge 3.1’de verilen Plackett Burman deney tasarım yöntemi tarafından önerilen besiyeri içeriklerinin mikrobiyal pigment üretimi üzerine etkisini görmek amacıyla ölçümler yapılmıştır.

Elde edilen deney bulgularına göre hem C1 hem de C7 izolatlarından mikrobiyal pigment üretimi üzerine en fazla etkinin inkübasyon süresi olduğu gözlenmiştir. C1 izolatı için bu etki değerleri; %44,8 iken, C7 izolatı için %58,47 olmuştur. C1 izolatı için CH_3COONa %24,9; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ %12,39; K_2HPO_4 %6,16; KH_2PO_4 %5,08 oranında etki ederken C7 izolatı için bu değerler NH_4Cl %22,14; KH_2PO_4 %8,87; maya özütü %3,39; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ %3,05; glikoz %1,92 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1 ve 4.2). Zhou ve arkadaşları, *Monascus anka* ile yaptıkları çalışmada mikrobiyal pigment üretimi için en etkin besiyeri bileşenlerini NH_4NO_3 , KH_2PO_4 ve pepton olarak belirtmiştir (Zhou et al, 2009). Sharmila ve arkadaşları, *Monascus purpureus* (MTCC 369) ile yaptıkları çalışmada mikrobiyal pigment üretimi için kullanılan besiyeri bileşenlerinin etkinlik derecesini sırasıyla patates tozu, K_2HPO_4 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, monosodyum glutamat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl, KH_2PO_4 olarak belirtmiştir (Sharmila, 2012). Yu ve arkadaşları, *Aureobasidium pullulans* ZSU 1001 ile yaptıkları çalışmada mikrobiyal pigment üretimine etki eden besiyeri bileşenlerini sırasıyla maya özütü, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCl_2 , NaCl, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ olarak belirtmiştir (Yu et al, 2012).

Yapılan bu tez çalışmasında Plackett-Burman istatistiksel deney tasarımı yöntemi ile besiyeri optimizasyonu sonrasında C1 izolatından pigment üretimi için ideal besiyeri bileşimi 20,43g/L glikoz; 3,02g/L K_2HPO_4 ; 3,33g/L NH_4Cl ; 3,48g/L KH_2PO_4 ; 2,04g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,38g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,0007g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0048g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,91g/L maya özütü; 0,51g/L sodyum asetat olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmaya göre, C7 izolatından pigment üretimi için ideal besiyeri bileşimi, 3,62g/L K_2HPO_4 ; 3,49g/L KH_2PO_4 ; 1,06g/L NH_4Cl ; 0,99g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 2,71g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0005g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,17g/L maya özütü; 1,72g/L sodyum asetat ve 24,75g/L glikoz şeklinde belirlenmiştir. Zhou ve arkadaşları yaptıkları istatistiksel deney tasarımı sonrasında optimum besiyeri bileşimini 10,3g/L pepton;

11,9g/L NH_4NO_3 ; 4,7g/L KH_2PO_4 ; 12,0 g/L glikoz; 25g/L nişasta ve 0,1g/L CaCl_2 olarak rapor etmişlerdir (Zhou et al., 2009). Yu ve arkadaşları ise bu değerleri 50g/L glikoz; 3g/L maya özütü; 0,6g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2g/L K_2HPO_4 ; 1g/L NaCl ; 0,2g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ olarak belirtmiştir (Yu et al., 2012).

Elde edilen mikrobiyal pigmentin karakterizasyonu için yapılan FTIR sonuçlarında β -karoten ve kırmızı pigmentler ile eşleşme görülmemiştir. Vaidyanathan ve arkadaşları *Serratia sakuensis* ile yaptıkları çalışmanın FTIR sonuçlarında kırmızı biyorenkendiriciler için parmak izi bölgesini 1456 ve 1728 cm^{-1} olarak tanımlamışlardır (Vaidyanathan et al, 2011). Zaibunnisa ve ark. β -karoten karakterizasyonu amacı ile yaptıkları çalışmalarında β -karoten için temel pikin 1718 cm^{-1} olduğunu bildirmişlerdir (Zaibunnisa et al, 2011). Ahmad ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda tanımladıkları menekşe rengi pigmentin FTIR sonuçlarında 1657 cm^{-1} ve 1635 cm^{-1} aralığında bulunan pikleri temel pikler olarak tanımlamışlardır. Tanımladıkları diğer pigmentte ise kırmızı pigmentler için ana fonksiyonel gruplar olan pirol, metilen, alkalin ve alken gruplarını FTIR sonuçları ile desteklemişlerdir. Belirtilen ana bant aralıkları C1 ve C7 izolatlarından üretilen mikrobiyal pigmentin FTIR sonuçları ile örtüşmemektedir (Ahmad et al, 2012).

Yapılan tez çalışması süresince kullanılan izolatların identifikasyonu sonucunda C1 izolatu Gram (+), basil bir tür olup %100 oranında *Gordonia terrae* strain M1-3'e, C7 izolatu ise Enterobacteriaceae ailesinden Gram (-), fakültatif anaerobik, çubuk şekilli, sporsuz enterik bir bakteri cinsi olup *Enterobacter ludwigii* strain AB-188'e benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Bitkiler, enterik bakteriler de dahil olmak üzere mikroorganizmaların büyük bir çeşitliliği ile etkileşime girer. Bu konukçu bitki ve mikroorganizma arasındaki ilişki, her ikisinin de özelliklerine bağlı olarak, birlikte yaşam, komensal yaşam, simbiyotik ya da parazitlik olarak sonuçlanabilir. Enterobacteriaceae üyeleri bazıları saprofit bazıları da bitki ve hayvanlara parazit olarak birçok ortama dağılmışlardır. Bazı çalışmalar Enterobacteriaceae'nin bitkilerle ilişkili olduğunda bitki gelişimi üzerine olumlu etkileri olduğunu göstermiştir. Azot bağlanması, bitki patojenlerinin bastırılması ve 1-aminosiklopropan karboksilik asit 1 (ACC), oksinler ve indol 3-asetik asit-(IAA) gibi

büyüme düzenleyici hormonların üretimi yoluyla bitki büyümesini iyileştirebilirler (Yousaf et al, 2011).

Son yıllarda küresel sanayileşme, çok sayıda alandaki toprağın organik ve inorganik kirleticilerle kuvvetli bir biçimde kirletilmesiyle sonuçlanmıştır. Alifatik hidrokarbonlar (örneğin dizel yakıt ve motor yağları) kirlenmiş alanlarda bulunan maddelerin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Hidrokarbon kirlenmiş toprakların tedavisi için bitkiler ve bunlarla ilişkili mikroorganizmaların kullanılması, uygun bir temizleme tekniği olarak artan kabule ulaşmıştır. Bir bitkisel arıtma sürecinin verimliliği esas olarak kirletici maddelerin enzimatik yıkımı için gerekli olan degradasyon geni taşıyan bitki ilişkili mikroorganizmaların varlığına ve aktivitesi bağlıdır.

Dizelle kontamine olmuş topraklardan *Enterobacter* ilgili suşlar izole edildiğine dair bilgiler literatürde mevcuttur. Ayrıntılı karakterizasyon çalışmaları ile izole edilen suşların birçoğunun *Enterobacter ludwigii* olduğu ortaya çıkarılmıştır. *Enterobacter ludwigii*'nin klinik olarak önemli olduğu bilinmekteydi, genellikle de klinik örneklerden izole edilmekteydi. *E.ludwigii*, Enterobacteriaceae kompleksine aittir, bu tür genellikle hastane enfeksiyonlarından izole edilmiştir. Fakat gerçek bir patojen veya ortakçı karaktere sahip olup olmadığı açık değildir. *E. ludwigii*'nin bitki büyümesini teşvik edici ve biyokontrol kapasitesi olan bir bitki-ilişkili bakteri olduğu rapor edilmiştir (Yousaf et al, 2011).

Biyokütlelerden üretilen yakıtlar ve kimyasallara olan ilginin artması nedeniyle, n-alkanları asimile ederek onları biyoteknolojik olarak oldukça önemli yakıtlar ya da kimyasallar haline getirebilen mikroorganizmalarla ilgili yapılan çalışmalar artış göstermektedir. Mikrobiyal kaynaklı kimyasal maddelerin ve yakıtların ekonomik olması endüstriyel atıklar gibi ucuz karbon ve enerji kaynakları gerektirir. Dizel veya petrol atıkları, dizel özümseyen mikroorganizmalar için karbon kaynağı olması açısından araştırılmaktadır. Bu sayede balmumu esterleri gibi biyoteknolojik ilgi uyandıran metabolitleri üretebiliriz. Dizel asimile eden mikroorganizmaların biyolojik süreçlerdeki işleme başarısı değişik n-alkan zincirlerini kullanabilmesine ve kimyasal

sentez yeteneğine bağlıdır. *Rhodococcus* ve *Pseudomonas* türlerinin de dahil olduğu birçok organizmanın doğrudan n-alkanları aldığı ve değişik yollardan özümlediği bilinmektedir. Bununla birlikte özellikle biyo-malzeme üretim bağlamında *Gordonia* cinsi mikroorganizmaların degradasyon ve n-alkan asimilasyon yeteneği çok az araştırma konusu olmuştur. Metabolik yetenekleri göz önüne alındığında *Gordonia ajoucoccus* A2T'den, n-alkan içeren atıklardan ya da endüstriyel atıklardan yüksek değerde terpenoidlerin biyo ürünleri için gereken karotenoidler veya balmumu esterleri gibi metabolitleri üretiminde yararlanılabilir (Kim et al, 2013). Şimdiye kadar yaklaşık olarak 25 *Gordonia* türü tanımlanmıştır. *Gordonia* sınıfı üyeleri fırsatçı bir insan patojeni olmalarına rağmen, kirleticilere karşı biyodegradasyon yapma özellikleri de bulunmaktadır. Koloni renkleri bazı türlerde sarı, turuncu veya kırmızıdır fakat geneli beyaz renktedir. Sadece bir türün, *Gordonia jacobaea*, karotenoidlerden temel olarak kantaksantin ve ikincil olarak da astaksantin ve β -karoten içerdiği belirlenmiştir. Takaichi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Japonya'da bir iç denizden izole ettikleri *Gordonia terrae*'de silika jel ve C_{18} kromatografi ve spektroskopik analizlerle karotenoid türevi bir pigment tanımlamışlardır (Takaichi et. al., 2011).

Sonuç olarak; giderek artan bilinçli tüketici sayısı ve biyoteknoloji alanındaki gelişmeler nedeni ile tüm dünyada “doğal” a olan ilgi artmış ve artmaya devam edecektir. Tüketicilerin bilinçli bir şekilde sentetik ürünleri araştırıp, insan sağlığı ve çevre kirliliğine olan tehdit nedeniyle kullanmayı reddetmesi, üreticiler üzerinde ucuz ve doğal kaynaklar arama baskısı yaratmaktadır. Bu bağlamda da başta gıda sektörü olmak üzere tekstil, boya, kozmetik, ilaç gibi diğer sektörler de doğala yönelmektedir.

Pigment maddeleri ürünün kendisini gösterebilmesinde büyük önem taşımaktadır. Tüketici kullandığı ürünü ilk önce dış görünüşüne daha sonra da sağlıklı olup olmamasına göre değerlendirmektedir. Bu nedenle de pigment maddeleri gıda, tekstil gibi sektörlerde büyük önem taşımaktadır.

Doğal pigmentler önceleri bitkilerden üretilse de hava koşullarından etkilenmemesi, hızlı ve kolay büyümesi ile mikrobiyal pigmentler bitkisel pigmentlerin yerini hızla almaya başlamıştır. Önceleri insan sağlığına olan etkileri ve sentetik

olanlara oranla daha pahalı olması nedeni ile tercih sebebi olmayan mikrobiyal pigmentlere olan ilgi, herhangi bir toksik özellik taşımadıkları ortaya kondukça ve gelişen biyolojik süreçlerde ucuz hammadde kullanımına başlanması sayesinde fiyatlarının sentetiklerle rekabet edebilecek duruma gelmesiyle artmıştır. Mikrobiyal pigmentlerin sadece hızlı büyüme ve ortam şartlarından etkilenmemesi dışında kullanılan mikroorganizmaların büyümesi için endüstriyel ve kimyasal atıkların kullanılabilmesi de çevre kirliliğine olan katkısından dolayı ekstra bir avantajdır.

Dünya genelinde gün geçtikçe gelişen mikrobiyal biyoteknoloji, ilerleyen zamanlarda artan ucuz hammadde ihtiyacı nedeni ile atıkların kullanılabilir ürünlere dönüştürülmesini sağlayarak çevre kirliliğinin azaltılmasında rol oynamaya devam edecektir. Bu alanlarda kullanılabilecek yeni mikroorganizmaların araştırılması nedeni ile mikrobiyal çeşitlilikte artış, birçok ürünün doğallaştırılması için geliştirilen biyolojik süreçler, biyoteknoloji alanında ilerleme ve daha sağlıklı ürünler üretilmesine öncülük edecektir.

Yapılan bu tez çalışması ile Enterik bakterilerden olan *Enterobacter ludwigii*' nin pigment üretici bir mikroorganizma olduğunun belirlenmesi ile literatüre yeni bir pigment üretici mikroorganizma daha eklenmiştir. Aynı zamanda yapılan bu çalışma gün geçtikçe artacak olan doğal renklendirici ihtiyacına da bir çözüm niteliği taşımaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aberoumand, A., 2011, A Review Article on Edible Pigments Properties and Sources as Natural Biocolorants in Foodstuff and Food Industry, *World Journal of Dairy and Food Sciences*, 6 (1): 71-78, 8p.
- Ahmad, W. A., Wan Ahmad, W. Y., Zakaria, Z. A., Yusof, N. Z., 2012, Application of Pigments as a Colorant, *The Malaysian Perspective*, Chapter 2: Isolation of Pigment-Producing Bacteria and Characterization of the Extracted Pigments, 978-3-642-24519-0, 21p.
- Akkapılı, Y., 2009, İmalat Formül ve Teknikler Ansiklopedisi, Kimyasal Hammadde, Solver-Kimya Laboratuvarı, ISBN: 978-9944-0292-0-9, 460s.
- Aksan, E., 2005, Çeşitli Mayalardan Karotenoidlerin Elde Edilmesi ve Sucukta Renklendirici Olarak Kullanım Olanaklarının Araştırılması, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Aksu, Z. and Tuğba Eren, T., 2004, Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source, *Process Biochemistry*, 2985–2991, 7p.
- Ashfaq, N., Masud, T., 2002, Surveillance on Artificial Colours in Different Ready to Eat Foods, *Pakistan Journal of Nutrition* 1 (5): 223-225.
- Büyükpamukçu, E. ve Saldamlı, İ., 1995, Ankara Piyasasında Satışa Sunulan Şekerlemelerin Renk Maddesi İçeriklerinin Belirlenmesi, *Gıda*, 397-404, 8s.
- Büyüksırt, T., 2011, Miroorganizmalardan Tüketilebilir Renk Maddesi Üretimi, Yüksek lisans tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, 51 s (yayımlanmış).
- Cardona-Cardona, V., Arroyo, D., Scellekens, J. and Rios-Velazquez, C., 2010, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 7p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Çelikdemir, M., 2012, Hidrokarbon Kirliliği Bulunan Topraklardan İzole Edilen Mikroorganizmalar ile Biyosüpfektan Üretimi, Yüksek lisans tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 145s.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez A. R. and Paredes-López, O., 2000, Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains -Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40(3):173–289, 118p.
- Dufossé, L., 2006, Microbial Production of Food Grade Pigments, Food Technology and Biotechnology, 44 (3)313–321, 10p.
- Gonçalves, R. C. R., Lisboa, H. C. F., Pombeiro-Sponchiado, S. R., 2011, Characterization of melanin pigment produced by *Aspergillus nidulans*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28:1467–1474, 8p.
- Goswami, G., Chaudhuri, S. and Dutta, D., 2010, Effects of pH and temperature on pigment production from an isolated bacterium, Chemical Engineering Transactions, 1974-9791, 6p.
- Han, X., Wang, W. and Xiao, X., 2008, Microbial Biosynthesis and Biotransformation of Indigo and Indigo-like Pigments, Chinese Journal of Biotechnology, Volume 24, Issue 6, 921-926.
- Hışıl, Y., 2002. Enstrümental Gıda Analizleri – I. Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ege Üniversitesi Basımevi, ISBN 975-483-239-0, sayfa 218, İzmir.
- Hussein, A. M., El-Gammal, A., 2007, Characterization of a red pigment-antibiotic produced by *Streptomyces* sp. strain NRC-C7, Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie, Volume 16 Issue 1, 27 – 32.
- Joshi, V. K., Devender, A., Bala, A. and Shashi, B., 2003, Microbial Pigments, Indian Journal of Biotechnology, 362-369, 8p.
- Kahyaoğlu, M., Kıvanç, M., 2006, Endüstriyel Atık Maddelerden Mikrobiyal Yolla Beta Karoten Üretimi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi (J. Agric. Sci.), 2007, 17(2): 61-6.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Kim, J. H., Kim, S. H., Yoon, J. H., Lii, P. C., 2013, Carotenoid production from n-alkanes with a broad range of chain lengths by the novel species *Gordonia ajoucoccus* A2^T, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 10p.
- Korthals, H.,J., Steenbergen, C.L.M., 1985, Separation and quantification of pigments from natural phototrophic microbial populations, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 31, Issue 3, 177-185.
- Kumar, S., Kumar, P., Shan, H.S. 2008 Optimizatiom of tensile properties of evaporative pattern casting process through Taguchi's metod. *Journal of Materials Processing Technology*, 204, 59-69.
- Liu G. Y. and Nizet, V., 2009, Color me bad: microbial pigments as virulence factors, , *Trends in Microbiology*, Vol.17 No.9, 0966-842X/\$, 8p.
- Nells, H. J. and De Leenheer, A. P., 1990, Microbial sources of carotenoids pigments used in foods and feeds, *Journal of Applied Bacteriology*, 181-191, 11p.
- Noble, M.A., Bent, J. M., West, A.B., 1983, Detection and identification of group B streptococci by use of pigment production, *Journal of Clinical Pathology*, 1983;36:350-352.
- Ökmen, G., Türkcan, O., 2012, *Anabaena* sp.' nin Pigment İçerikleri Üzerine Glukozun Etkisi, *Gıda*, 38 (4): 223-229, 7s.
- Plackett, R. L., Burman, J. P., 1946, The design of optimum multifactorial experiments, *Biometrika* 33: 305–325.
- Sharmila, G., Nidhi, B., Muthukumaran, C., 2012, Sequential statistical optimization of red pigment production by *Monascus purpureus* (MTCC 369) using potato powder, *Industrial Crops and Products*, 158-164, 7p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Takaichi, S., Maoka, T., Akimoto, N., Carmona, M. L. and Yamaoka, Y., 2008, Carotenoids in a Corynebacterineae, *Gordonia terrae* AIST-1: Carotenoid Glucosyl Mycoloyl Esters, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2615-2622, 8p.
- Terasawa, N., Murata, M., Homma, S., 1996, Comparison of Brown Pigments in Foods by Microbial Decolorization, *Journal of Food Science*, Volume 61, No. 4.
- Vaidyanathan, J., Bhathena-Langdana, Z., Adivarekar, R. V., Nerurkar, M., 2011, Production, Partial Characterization, and Use of a Red Biochrome Produced by *Serratia sakuensis* subsp. nov Strain KRED for Dyeing Natural Fibers, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166:321–335, 15p.
- Venil, C. K., Lakshmanaperumalsamy, P., 2009, An Insightful Overview on Microbial Pigment, Prodigiosin, *Electronic Journal of Biology*, Vol. 5(3): 49-61, 13p.
- Venil, C. K., Zakaria, Z. A., Ahmad, W. A., 2013, Bacterial pigments and their applications, *Process Biochemistry*, 1065–1079, 15p.
- Yousaf, S., Afzal, M., Reichenauer, T. G., Brady, C. L., Sessitsch, A., 2011, Hydrocarbon degradation, plant colonization and gene expression of alkane degradation genes by endophytic *Enterobacter ludwigii* strains, *Environmental Pollution*, 2675-2683, 9p.
- Yu, X., Wang, Y., Wei, G., Dong Y., 2011, Media optimization for elevated molecular weight and mass production of pigment-free pullulan, *Carbohydrate Polymers*, 928-934, 7p.
- Zaibunnisa, A. H., Marhanna, A., M. N. A. and Ainun Atirah, M., 2011, Characterisation and solubility study of γ -cyclodextrin and β -carotene complex, *International Food Research Journal*, 1061-1065, 5p.
- Zhou, B., Wang, J., Pu, Y., Zhu, M., Liu, S., Liang, S., 2008, Optimization of culture medium for yellow pigments production with *Monascus* mutant using response surface methodology, *Eur Food Res Techno*, 228:895–901, 7p.