

***Fusarium sp.* İLE PİGMENT ÜRETİMİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF PIGMENT PRODUCTION BY  
*Fusarium sp.***

**TUĞÇE DAĞ**

**DOÇ. DR. İŞİL SEYİS BİLKAY**

**Tez danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2017

TUĞÇE DAĞ'ın hazırladığı “*Fusarium sp.* İle Pigment Üretiminin Araştırılması” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** kabul edilmiştir.

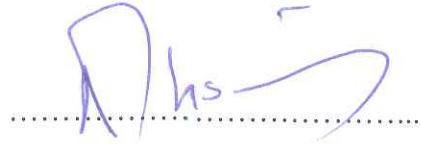
Prof.Dr. Aysun ERGENE  
Başkan



Doç.Dr. Işıl SEYİS BİLKAY  
Danışman



Prof.Dr. Nilüfer AKSÖZ  
Üye



Prof.Dr. Nilüfer CİHANGİR  
Üye



Doç.Dr. Nuran ÇİÇEK  
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- Tezimin/Raporumun 19.07.2019 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun ..... tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

19 / 06 / 2017

  
(İmza)

Öğrencinin Adı Soyadı

Tugce Dag

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgileri ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserler bilimsel ve normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

09/06/2017



TUĞÇE DAĞ

## ÖZET

### ***Fusarium sp.* İLE PİGMENT ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Tuğçe DAĞ**

**Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü**

**Tez Danışmanı: Doç.Dr. Işıl SEYİS BİLKAY**

**Haziran 2017, 58 sayfa**

Pigmentler, farklı endüstrilerde kullanımı olan önemli bileşiklerdir. En geniş kullanım alanı buldukları gıda endüstrisinde; katkı maddesi, renk arttırıcı ve antioksidan olarak kullanılırlar. Pigmentler; sentetik olarak da üretilebilmelerine rağmen, genellikle doğal biyopigmentler olarak tercih edilmektedir. Bu çalışmada; çeşitli *Fusarium* türlerinden alternatif üretim ortamlarında pigment üretimi, daha fazla pigment üretimi için bazı fizyolojik koşulların optimize edilmesi ve elde edilen pigmentin antimikrobiyal özelliklerinin araştırılması amaçlandı. Bu bağlamda ilk olarak farklı *Fusarium* türlerinin (*Fusarium graminearum*, *Fusarium sp.*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti*) üç farklı besiyerinde (patates dekstrozu sıvı besiyeri, sabouraud dekstrozu sıvı besiyeri, malt ekstrakt sıvı besiyeri) pigment üretimleri karşılaştırıldı. Pigment üretimi için; en uygun besiyeri olarak malt ekstrakt sıvı besiyeri seçildi. Bu besiyerinde en yüksek miktarda pigment üretimi elde edilen *Fusarium graminearum* suşu, çalışmanın diğer aşamalarında kullanıldı. *F. graminearum*'dan en yüksek pigment üretimi için kültürel parametreler incelendiğinde; aydınlık inkübasyon, 150 rpm çalkalama hızı, 30°C sıcaklık, 9 günlük inkübasyon ve başlangıç pH değeri 8'in en uygun koşullar oldukları saptandı. Çalışmanın devamında pigment üretimi için alternatif üretim ortamları araştırıldı. Bu bağlamda, çalışmamızda; alternatif bir besiyeri olarak da ülkemizde

çeşitli süt ve süt ürünleri endüstrisinde peynir üretiminden sonra ortaya çıkan yeşilimsi sarı renkli artık olarak bilinen peyniraltı suyu ve şeker endüstrisi artığı melas kullanıldı. Peyniraltı suyu ve melasın, *F. graminearum* kullanılarak kırmızımsı pigment üretiminde alternatif kültür ortamları olabileceği gözlemlendi. Çalışmanın son aşamasında *F.graminearum*'dan elde edilen pigmentin antimikrobiyal özellikleri araştırıldı. *Fusarium graminearum* tarafından üretilen pigmentin 20 µl konsantrasyonunun, *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal etki göstermesine rağmen *Salmonella paratyphi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*'a karşı etkili olmadığı görüldü.

**Anahtar kelimeler:** *Fusarium graminearum*, *Fusarium sp.*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti*, kırmızımsı pigment, PAS (Peyniraltı suyu), melas, pigment üretimi

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF PIGMENT PRODUCTION BY**

*Fusarium sp.*

**Tuğçe DAĞ**

**Master of Science, Department of Biology**

**Supervisor: Assoc. Prof. Işıl SEYİS BİLKAY**

**June 2017, 58 pages**

Pigments are important compounds used in different industries. In the food industry that they are most widely used, they are used as food additives, color enhancers and antioxidants. Although they can also be produced synthetically, natural biopigments are preferred in general. In this study; pigment production from various *Fusarium* species in alternative culture media; optimization of some physiological conditions for more pigment production and investigation of antimicrobial properties of the produced pigment were aimed. In this respect, pigment production of different *Fusarium* species (*Fusarium graminearum*, *Fusarium sp.*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti*) in three different media (potato dextrose broth, sabouraud dextrose broth, malt extract broth) were compared. The best medium for the pigment production has been selected as malt extract broth. *Fusarium graminearum*, which was found to produce highest amount of pigment, is used in the next parts of this study. When the cultural parameters, which are necessary for the production of highest amount of pigment from *F. graminearum* are examined; light conditioned incubation, 150 rpm rotation speed, 30 °C temperature, 9 days of incubation and initial pH value of 8, have been determined as the optimum

conditions. In the next part of this study, alternative media for pigment production have been investigated. In the next part of this study, alternative media for pigment production have been investigated. In this respect; cheese whey, which appears after the production of a cheese and known as a greenish yellow coloured residual in our country and molasses - a residual of sugar industry have been used as alternative media for pigment production. It has been observed that, cheese whey and molasses could be alternative media for the reddish pigment production by using *Fusarium graminearum*. In the last part of this study, antimicrobial properties of the pigment obtained by *F. graminearum* have been investigated. It has been seen that, although 20 µl concentration of the pigment that was produced from *Fusarium graminearum* exhibited an antimicrobial effect against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*; it was not effective against *Salmonella paratyphi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*.

**Keywords:** *Fusarium graminearum*, *Fusarium sp.*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti*, reddish pigment, cheese whey, molasses, pigment production



## TEŞEKKÜR

Lisans, yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmalarım boyunca, bana olan sevgisini ve sonsuz anlayışını benden esirgemeyen, her zaman yanımda olan, engin bilgi ve deneyimiyle çalışmalarına yol gösteren, ilham aldığım çok değerli, sevgili hocam, tez danışmanım Doç. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY'a;

Çalışmalarım boyunca desteğini benden esirgemedi, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım çok değerli hocam Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ'e;

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman bilgi ve tecrübeleri ile yanımda olan çok değerli hocam Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR'e;

Tüm öğrenim hayatım boyunca gerek bilgisi, sevgisi ve enerjisiyle çalışma şevki veren, her sorunumda yanımda olan, her zaman desteğini arkamda hissettiğim canım hocam Dr. Gülcan ŞAHAL'a;

Tez çalışmam boyunca ilgisini, desteğini esirgemeyen, her türlü konuda bilgi ve görüşünden yararlandığım, çok değerli hocalarım, Dr. Sezen BİLEN ÖZYÜREK, Dr. Hande AVCIOĞLU, Dr. Doruk ARACAGÖK'e;

Yüksek lisans eğitimim boyunca, her türlü sorunla yanlarına gittiğimde asla geri çevirmeyen değerli arkadaşlarım, Özgecan ERDEM, Araş. Gör. Hasan AKYIL, Araş. Gör. Kübra ERKAN'a, Araş. Gör. Gözde KOŞARSOY, Hamideh Hammamchi, Meriç BİRBEN'e;

Her zaman bana inanan, güvenen stresimi fazlasıyla çeken, yapamayacağım diye düşündüğüm anda bile beni yüreklendiren, hayatta sağlam bir duruş sergilemememe neden olan her kararında yanımda duran canım ablam Özgül DAĞ'a, benimle gurur duyan, sonsuz sevgisini benden esirgemeyen güler yüzlü meleğim annem Recebiye DAĞ'a, hayatta her zaman engeller çıkar sen bu azimle her türlü engeli aşarsın diyerek her zaman kapı gibi arkamda duran, en yakın arkadaşım olan canım babam Mustafa DAĞ'a;

Sonsuz TEŞEKKÜRLER'im sunarım...

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
ŞEKİLLER .....	x
SİMGELER ve KISALTMALAR .....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİ .....	3
2.1. Pigmentlerin Tarihi .....	3
2.2. Pigmentlerin Sınıflandırılması .....	4
2.3. Pigmentler .....	6
2.3.1. İnorganik Pigmentler .....	6
2.3.2. Sentetik Pigmentler .....	6
2.3.3. Doğal Pigmentler .....	6
2.3.3.1. Bitki Pigmentleri .....	7
2.3.3.2. Hayvansal Pigmentler .....	8
2.4. Mikrobiyal Pigmentler .....	8
2.4.1. Bakteriyel Pigmentler .....	9
2.4.2. Maya Pigmentleri .....	11
2.4.3. Fungal Pigmentler .....	11
2.5. Mikroorganizmalardan Pigment Üretimi .....	11
2.5.1. Doğal Pigmentlerin Uygulama Alanları .....	15
2.6. Mikroorganizmalardan Üretilen Pigmentlerin Önemi .....	15
2.7. <i>Fusarium</i> Türlerinin Genel Özellikleri .....	18
2.7.1. <i>Fusarium graminearum</i> .....	19
2.7.2. <i>Fusarium poae</i> .....	20
2.7.3. <i>Fusarium equiseti</i> .....	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	22
3.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar .....	22
3.1.1. <i>Fusarium</i> Suşlarının Makroskobik Morfolojisinin İncelenmesi .....	22
3.1.2. <i>Fusarium</i> Suşlarının Mikroskobik Morfolojisinin İncelenmesi .....	22
3.2. Mikroorganizmaların Ekim ve Üretim Koşulları .....	24

3.2.1. Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması .....	24
3.2.3. Patates Dekstroz (PDB), Sabouraud Dekstroz (SDB) , Malt Ektrakt (MB) Sıvı Besiyerlerine Ekim ve Üretim .....	25
3.2.4. Kültürlerdeki Üremenin Ölçülmesi .....	25
3.2.5. Pigment Üretimini Ölçülmesi .....	25
3.3. Pigment Üretimi İçin Uygun Mikroorganizmanın ve Besiyerinin Seçimi .....	25
3.4. <i>Fusarium graminearum</i> ile Pigment Üretimini Etkileyen Uygun Fizyolojik Koşulların Araştırılması.....	26
3.4.1. Karanlık ve Aydınlik İnkübasyon Koşullarının <i>Fusarium graminearum</i> ile Pigment Üretimine Etkisinin Belirlenmesi .....	26
3.4.2. Statik ve Çalkalamalı İnkübasyon Koşullarının <i>Fusarium graminearum</i> ile Pigment Üretimine Etkisinin Belirlenmesi .....	26
3.4.3. <i>Fusarium graminearum</i> ile Pigment Üretiminde Uygun Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi .....	26
3.4.4. İnkübasyon Süresinin <i>Fusarium graminearum</i> ile Pigment Üretimine Etkisinin Belirlenmesi.....	26
3.4.5. <i>Fusarium graminearum</i> ile Pigment Üretiminde Uygun Başlangıç pH Değerinin Belirlenmesi .....	27
3.5. Artıkların Değerlendirimi ile Pigment Üretimi .....	27
3.5.1. Peyniraltı suyundan <i>Fusarium graminearum</i> ile Pigment Üretimini Araştırılması.....	27
3.5.2. Melasdan <i>Fusarium graminearum</i> ile Pigment Üretimini Araştırılması.....	27
3.6. <i>Fusarium graminearum</i> 'dan Üretilen Pigmentin Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi .....	28
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	29
4.1. Pigment Üretimi İçin Uygun Mikroorganizmanın Seçimi .....	29
4.2. <i>Fusarium graminearum</i> ile Pigment Üretimini Etkileyen Uygun Fizyolojik Koşulların Araştırılması.....	34
4.2.1. Karanlık ve Aydınlik İnkübasyon Koşullarının <i>Fusarium graminearum</i> ile Pigment Üretimine Etkisinin Belirlenmesi .....	35
4.2.2. Statik ve Çalkalamalı İnkübasyon Koşullarının <i>Fusarium graminearum</i> ile Pigment Üretimine Etkisinin Belirlenmesi .....	36

4.2.3. <i>Fusarium graminearum</i> ile Pigment Üretiminde Uygun Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi .....	38
4.2.4. İnkübasyon Süresinin <i>Fusarium graminearum</i> ile Pigment Üretimine Etkisinin Belirlenmesi.....	40
4.2.5. <i>Fusarium graminearum</i> ile Pigment Üretiminde Uygun Başlangıç pH Değerinin Belirlenmesi .....	41
4.3. Artıkların Değerlendirilmesi.....	43
4.3.1. Peyniraltı suyundan <i>Fusarium graminearum</i> ile Pigment Üretiminin Araştırılması.....	44
4.3.2. Melasdan <i>Fusarium graminearum</i> ile Pigment Üretiminin Araştırılması.....	47
4.4. <i>Fusarium graminearum</i> 'dan Üretilen Pigmentin Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi .....	47
5. YORUM .....	49
6. KAYNAKLAR .....	51

## ÇİZELGELER

	<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 2.1.</b> Pigment Eldesinin Tarihsel Gelişimi .....	4
<b>Çizelge 2.2.</b> Gıda Renklendiricilerinin Sınıflandırılması .....	5
<b>Çizelge 2.3.</b> Mikroorganizmalardan Elde Edilen Pigmentler ve Renkleri .....	13
<b>Çizelge 2.4.</b> Doğal Gıda Renklendiricisi Olarak Mikroorganizmalardan Elde Edilen Pigmentler ve Kullanım Aşamaları .....	17
<b>Çizelge 2.5.</b> Doğal Gıda Renklendirici Olan Mikrobiyal Pigmentlerin Renkleri ve Metabolik Roller.....	18

## ŞEKİLLER

### Sayfa

Şekil 2.1. Mikroorganizmalardan elde edilen pigmentlerin moleküler yapıları .....	10
Şekil 2.2. Doğal Pigmentlerin Çeşitli Uygulamaları .....	16
Şekil 2.3. <i>Fusarium graminearum</i> Mikroskopik Görüntüsü .....	19
Şekil 2.4. <i>Fusarium poae</i> 'nin Mikroskopik Görüntüsü .....	20
Şekil 2.5. <i>Fusarium equiseti</i> 'nin Mikroskopik Görüntüsü .....	21
Şekil 3.1. <i>Fusarium</i> Türlerinin Patates Dekstroz Agarda Görünümleri .....	23
Şekil 3.2. <i>Fusarium</i> Suşlarının Mikroskopik Görüntüleri .....	24
Şekil 4.1. <i>Fusarium</i> Türlerinin Malt Ekstrakt Sıvı Besiyerinde Oluşturdukları Pigmentler .....	30
Şekil 4.2. <i>Fusarium</i> Türlerinin Malt Ekstrakt Sıvı Besiyerinde Pigment Üretimi ve Üreme Miktarı .....	31
Şekil 4.3. <i>Fusarium</i> Türlerinin Patates Dekstroz Sıvı Besiyerinde Oluşturdukları Pigmentler .....	32
Şekil 4.4. <i>Fusarium</i> Türlerinin Patates Dekstroz Sıvı Besiyerinde Pigment Üretimi ve Üreme Miktarı .....	32
Şekil 4.5. <i>Fusarium</i> Türlerinin Sabouraud Dekstroz Sıvı Besiyerinde Besiyerinde Oluşturdukları Pigmentler .....	33
Şekil 4.6. <i>Fusarium</i> Türlerinin Sabouraud Dekstroz Sıvı Besiyerinde Pigment Üretimi ve Üreme Miktarı .....	33
Şekil 4.7. <i>Fusarium graminearum</i> 'un Aydınlık ve Karanlık İnkübasyon Koşullarında Oluşturdukları Pigmentler .....	35
Şekil 4.8. <i>Fusarium graminearum</i> 'un Aydınlık ve Karanlık İnkübasyon Koşullarında Pigment Üretimleri ve Üreme Miktarları .....	36
Şekil 4.9. <i>Fusarium graminearum</i> 'un Statik ve Çalkalamalı İnkübasyon Koşullarında Oluşturdukları Pigmentler .....	37

Şekil 4.10. <i>Fusarium graminearum</i> 'un Statik ve Çalkalamalı İnkübasyon Koşullarında Oluşturdukları Pigmentler.....	38
Şekil 4.11. <i>Fusarium graminearum</i> 'un 25, 30, 37 °C Sıcaklıklarındaki İnkübasyon Koşullarında Oluşturdukları Pigmentler.....	39
Şekil 4.12. <i>Fusarium graminearum</i> 'un 25, 30, 37 °C Sıcaklıklarındaki İnkübasyon Koşullarında Pigment Üretimleri ve Üreme Miktarları.....	40
Şekil 4.13. <i>Fusarium graminearum</i> 'un Farklı İnkübasyon Sürelerinde Pigment Üretimleri.....	41
Şekil 4.14. <i>Fusarium graminearum</i> 'un Farklı Başlangıç pH Değerlerine Ayarlanmış Üretim Ortamlarında Oluşturdukları Pigmentler.....	42
Şekil 4.15. <i>Fusarium graminearum</i> 'un Farklı Başlangıç pH Değerlerine Ayarlanmış Üretim Ortamlarında Pigment Üretimleri ve Üreme Miktarları.....	43
Şekil 4.16. Peyniraltı suyundan <i>Fusarium graminearum</i> ile Pigment Eldesi.....	44
Şekil 4.17. Peyniraltı suyunda <i>Fusarium graminearum</i> 'un Üreme Miktarı .....	45
Şekil 4.18. Kaşar Peyniraltı suyundan <i>Fusarium graminearum</i> ile Pigment Eldesi.....	46
Şekil 4.19. Kaşar Peyniraltı suyunda <i>Fusarium graminearum</i> 'un Üreme Miktarı ..	46
Şekil 4.20. <i>F.graminearum</i> Melas İçeren Üretim Ortamında Pigment Eldesi .....	47
Şekil 4.21. <i>Fusarium graminearum</i> 'dan Üretilen Pigmentin Çeşitli Suşlara Karşı Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi.....	48

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

°C	Santigrat Derece
ml	Mililitre
nm	Nanometre
L	Litre
OD	Optik Dansite

### Kısaltmalar

AUS	Aurofusarin
DON	Deoksinivalenol
FBs	Fumonisin
MB	Malt Ekstrakt Sıvı Besiyeri
NIV	Nivalenol
PAS	Peyniraltı suyu
PDA	Patates Dekstroz Agar
PDB	Patates Dekstroz Sıvı Besiyeri
SDB	Sabouraud Dekstroz Sıvı Besiyeri
RNA	Ribonükleik Asit
ZEA	Zearalenon



# 1. GİRİŞ

Pigmentler, endüstride geniş kullanım alanı bulunan önemli bileşiklerdir [1]. Bu bileşikler; bitki, hayvan, bakteri, fungus ve daha pek çok cansız maddenin yapısında bulunmaktadır. Doğal ve sentetik olarak elde edilirler. Doğal pigmentlerin önemli fonksiyonları vardır. Pigmentlerin, kanser ve kardiyovasküler hastalıklara karşı farmakolojik aktiviteleri bilinmektedir [2]. Bilinçli tüketiciler, kanser gibi ciddi sağlık problemlerine neden olan sentetik pigmentler yerine doğal pigmentleri tercih ederler. Bu bağlamda, günümüzde biyorenkendiriciler giderek artan önem kazanmaktadır. Sentetik pigmentlerin üretim sürecinde kullanılan öncül maddelerin kanserojenik özelliği olması sentetik pigment üretiminde çalışanlar içinde tehlike arz etmektedir [3, 4]. Pigmentlerin mikroorganizmalardan üretimi ise; sentetik olarak üretilmelerine kıyasla verimli ve ekonomik bir süreçtir. Mikroorganizmalar, maliyeti düşük kültür ortamında kolay ve hızlı şekilde üreyebilen, iklim koşullarından bağımsız olarak gelişebilen canlılardır. Aynı zamanda mikroorganizmalardan pigment eldesinde geniş renk yelpazesi görülmektedir. Mikrobiyal renkleri farklı tonlarda elde etmekte mümkündür. Bu renkler biyolojik olarak parçalanabilir ve çevre dostudur. Ayrıca pigmentler antioksidan, antikanser, anti-proliferatif, immünosupresif, Diabetes mellitus tedavisi gibi sayısız klinik özelliklere sahiptirler [3].

Materyal çeşitliliğine yeni renkler katmak için pigmentler yaygın olarak kullanılmaktadır. Sentetik renk vericilerin boyama endüstrisinde yaygın kullanımı sonucunda büyük miktarda boya maddesi, atık suya doğrudan karışmakta ve böylece çevreye bulaşmaktadır. Boyanın %10-35'nin boyama işlemi sırasında atıkta yok olduğu, reaktif boyalarda ise boyanın %50'sinin boya banyosu atığı içinde olduğu görülmektedir. Dahası, bu boyalar insanlar için olası tehlike potansiyeline sahiptir, uzun süre maruz kalındığında kanserojenik etki gösterebilmektedir. Bu nedenle toksik olmayan/ çevre dostu renk vericiler için özellikle de gıda renklendirmesinde, çocuk tekstil ve deri giysilerin boyanması gibi alanlarda doğal pigmentlerin kullanımına talep günden güne artmaktadır [5].

Doğal boyalar ve pigmentler, potansiyel olarak zararlı sentetik boyalara göre önemli bir alternatif kaynak olarak ortaya çıkıyor. Pamuk, ipek, yün numunelerinin boyanmasında bu doğal pigmentlerin uygulanması birçok çalışmada bildirilmiştir. Bununla birlikte, bu doğal boyaların eldesinde; ekstraksiyon işlemleri ve üretim sürecinde verimi etkileyen

faktörlerin önemli olduğu görülmektedir. Fungus, bakteri ve hücre kültürleri gibi biyolojik kaynakları potansiyel olarak kullanılması önerilir. Çünkü uygun seçim, kültürel parametrelerin optimizasyonu, mutasyon ve genetik mühendisliği teknikleriyle sentetik boyalara kıyasla pigment üretim verimi önemli ölçüde geliştirilebilir [5, 6].

Bu çalışmada; çeşitli *Fusarium* türlerinden alternatif üretim ortamlarında pigment üretimi ile uygun suş seçimi, yüksek pigment üretimi için bazı fizyolojik koşulların optimize edilmesi ve elde edilen pigmentin antimikrobiyal özelliklerinin araştırılması amaçlandı. Öncelikle farklı *Fusarium* türlerinin (*Fusarium graminearum*, *Fusarium poae*, *Fusarium sp.*, *Fusarium equiseti*) pigment üretimleri farklı besiyeri ortamlarında (Patates dekstroz, Sabouraud Dekstroz ve Malt ekstrakt) karşılaştırıldı. Pigment üretimi için en uygun suş olarak *Fusarium graminearum* seçildi. Pigment üretimini artırmak için karanlık- aydınlık inkübasyon koşullu, statik- çalkalamalı inkübasyon koşullu, uygun sıcaklık değeri, inkübasyon süresi ve uygun başlangıç pH değeri parametreleri araştırıldı. Pigment üretimi için alternatif üretim ortamları araştırılırken özellikle artıkların değerlendirilmesi amaçlandı. Bu bağlamda, alternatif bir besiyeri olarak da ülkemizde çeşitli süt ve peynir endüstrilerinde peynir üretiminden sonra ortaya çıkan yeşilimsi sarı renkli artık olarak bilinen peyniraltı suyu ve şeker endüstrisi artığı melas kullanıldı. Alternatif üretim ortamlarının kullanılması pigment üretiminin maliyetinin azalmasını sağladığından ekonomik açıdan önemlidir. Son olarak, elde edilen pigmentin çeşitli suşlara (*Bacillus cereus*, *Salmonella paratyphi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) karşı antimikrobiyal etkisi araştırıldı. *Fusarium graminearum*'dan elde edilen pigmentin, *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal etki gösterdiği saptandı.

Çalışmamızda *Fusarium graminearum*'dan sentetik ve alternatif üretim ortamlarında elde ettiğimiz pigmentin, ileride yapılacak çalışmalar için iyi bir alternatif olabileceği sonucuna varıldı. *Fusarium sp.*, ve *Fusarium poae* türleri de pigment üretim araştırmaları için iyi diğer alternatiflerdir.

## 2. GENEL BİLGİ

Pigmentler görünür dalga boyundaki ışığı absorplayan kimyasal yapıdaki maddelerdir. Enerji absorblanmadığı zaman yansıtılır ya da kırılır, oluşan bu enerjinin beyne iletilmesiyle birlikte renk algısı ortaya çıkmaktadır [7].

### 2.1. Pigmentlerin Tarihi

Pigment sözcüğü Latin kökenli bir kelimedir ilk olarak renkli objeleri belirtmek için kullanılmıştır. Orta çağ zamanlarında pigment tanımı çeşitli meyve ve sebzelerde, özellikle de daha sonraları gıda renklendiricisi terimi olarak kullanıldı. Pigment kelimesinin bu bağlamda biyolojik terminolojideki anlamı, hücrelerin içindeki granüllerde meydana gelen ve dokularda depolanan bitki ve hayvanlarda bulunan renklendirici maddedir [8].

Boyalar henüz Milat'tan önce 1900-2600 yıllarında İndus vadisi uygarlığı zamanında giysi kumaşlarının boyanmasında kullanılmış olup, bu tür kumaşlar kök boyasının izlerini taşımaktadır. Boyaların tarih öncesi dönemlerde birçok yerde kullanıldığı bilindiğinden boyama sanatının eski bir geçmişe sahip olduğu açıktır. Boyalar Avrupa'da Bronz çağı boyunca uygulanmıştır. Doğal boyaların kullanımı ilk olarak Çin'de Milat'tan önce 2600 yılında kayıtlara geçmiştir [9]. İlkel boyama teknikleri bitkilerin kumaşa yapıştırılmasını veya kumaş içine ezilmiş pigmentleri yerleştirilmesi ile yapılıyordu. Bu metot zamanın ilerlemesiyle birlikte daha ileri tekniklerle, çeşitli meyve ve bazı bitkilerin ezilerek kaynatılmasıyla elde edilen rengin kumaşa entegre edilmesiyle geliştirildi. Koşnil boyası ise (Koşnil böceğinden elde edilen boya) ilk olarak Aztek ve Maya medeniyetleri tarafından kullanıldı. MS 4. yüzyıla kadar boya örneğinin; çivit otu, kıvılcık, muhabbet çiçeği, Brezilya odunundan elde edilerek kırmızımsı mor renkli boyalar olarak tanımlanıyordu Japonya'da Nara dönemi olarak bilinen 8. yüzyılda soya fasulyesi ve adzuki fasulyesinden elde edilen renk maddesi gıdalarda kullanılmıştır. Böylece doğal pigmentlerle ilgili çalışmalar birçok alanı etkiledi ve boyama sanatı da medeniyetlerin ilerlemesiyle birlikte gelişti [10]. Sentetik pigmentler ortaya çıkana kadar doğal pigmentler renk eldesinde tek kaynak olarak gösteriliyordu. Doğal pigmentler dünya çapında ticari açıdan yaygınlaşmaya başladığında, doğal lifler (yün, pamuk, ipek), kürk ve deri boyama gibi birçok amaç ile kullanıldı. 1856 yılında Perkin tarafından sentetik boyaların tanıtılmasından bu yana uygun, kullanışlı ve ucuz sentetik pigmentler ortaya çıkmıştır. Sentetik pigmentler, tekstil sektöründe, deri endüstrisinde, kağıt üretiminde,

gıda teknolojilerinde, tarımsal araştırmalarda, fotoelektrokimyasal pillerde ve saç renklendiricisi olarak kullanılmaktadır [10].

**Çizelge 2.1.** Pigment Eldesinin Tarihsel Gelişimi [10]

Yıl	Gelişim
1856	Perkin, leylak renkli pigmenti keşfetti ve kömür katranı boya sentezledi.
1884	<i>Monascus</i> sp. türünden pigment elde edildi. Kırmızı pirinç şarabı yapımında, kırmızı pirinç eldesinde kullanıldı.
1954	<i>Cryptococcus</i> 'tan elde edilen ilk karotenoid pigmenti satışa sunuldu.
1963	<i>Rhodotorula</i> sp.'den elde edilen karotenoid pigmentinin üretimi başladı.
1970'lerin başları	<i>Phaffia rhodozyma</i> 'dan Astaksantin izole edildi.
1970'lerin sonu 1980'lerin başı	<i>Dunaliella salina</i> 'dan beta karoten üretimi gerçekleşti.
1985	Doğal beta karotenli ürünler üretmek için büyük ölçekli <i>D. salina</i> üretimi gerçekleştirildi.

## 2.2. Pigmentlerin Sınıflandırılması

Pigmentlerin sınıflandırılmasında, farklı kriterler temel alınarak çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır.

Çizelge 2.2 'de gıda pigmentlerinin sınıflandırılması yer almaktadır. Bu sistemlerde aynı renk maddeleri farklı gruplarda sınıflandırılabilir (Örneğin; karotenoidler). Günümüzde pigmentlerin sınıflandırılmasında, bu pigmentlerin kökenine ve belirli mevzuatlara göre olmaları tercih edilmektedir. Bu şekilde bir sınıflandırmada, tüketicinin kullandığı pigmentlerin özelliklerini bilmesi için önem teşkil etmekte ve tüketicinin tercihleriyle uyumaktadır [7].

**Çizelge 2.2.** Gıda Renklendiricilerinin Sınıflandırılması [7]

<b>SINIFLANDIRMA</b>	<b>PİGMENT TÜRÜ</b>	<b>ÖZELLİKLERİ</b>	<b>ÖRNEKLER</b>
Kökenine Göre	Doğal	Canlı organizmalardan elde edilen organik bileşikler	Karotenoid, antosiyanin, klorofil
	Sentetik	Kimyasal sentez yoluyla elde edilen organik bileşikler	FD&C (Food, Drug and Cosmetic) gıda, ilaç ve kozmetik renklendiricileri
	İnorganik	Sentez ile elde edilen ya da doğada bulunan bileşikler	TiO <sub>2</sub>
Kimyasal Özelliğine Göre	Konjuge sistemli Kromoforlar	Çoklu bağlar	Karotenoidler, antosiyaninler, betalainler, karamel, gıda, ilaç ve kozmetik renklendiricileri
	Metalle Düzenlenmiş Bileşikler	Kimyasal yapılarında bir metal mevcut	'Hem' grubu içeren renkler (miyogloblin, hemogloblin, klorofil)
Yapısına Göre	Tetrapirel Türevleri	Dört pirol yapısına sahip bileşikler	Klorofiller, ('Hem' grubu içerir)
	Karotenoidler	İzoprenoid türevleri, çoğu polimer bileşikler	Likopen, karoten, lutein, kapsantin
	Tetrapirel Olmayan N-Heterosiklik Bileşikler	Kimyasal yapısında azot bulunur	Pürinler, pterinler, flavinler, fenazinler, fenoksazinler, betalainler
	Benzopiran Türevleri	Oksijenlenmiş heterosiklik bileşikler	Antosiyanin ve diğer flavonoidler
	Kuinonlar	Kimyasal yapılarında kuinon fonksiyonel grupları bulunur	Benzokuinon, naftokuinon, antrakinin
	Melaninler	Azot içeren monomerlerden elde edilen polimerik yapılar	Ömelanin, faomelanin
Mevzuata Göre	Beyan Edilmesi Zorunlu Olanlar	Antropojenik sentetikler	Gıda, ilaç, kozmetik renklendiricileri
	Sertifikasyondan Muaf Olanlar	Doğal orijinlerden (bitki, mineral ya da hayvan) ya da sentetik benzeri bileşiklerden	Üzüm suyu, TiO <sub>2</sub> , karmin ve sentetik β-karoten

### **2.3. Pigmentler**

Renkler, gıda kalitesinin önemli bir göstergesidir. Tüketici, iyi ve güvenilir gıdaya ilk olarak rengiyle bağlantı kurarak anlam verir. Renk algısı, ışık kaynağının spektral bileşimi ve maddenin fiziksel özelliği ile ilişkilendirilir. Pigmentler gıda, kozmetik, boya, ilaç, cam, tekstil vb. gibi birçok alanda kullanılır. Pigmentler öncelikle doğal, sentetik ve inorganik olarak sınıflandırılmaktadır [2].

#### **2.3.1. İnorganik Pigmentler**

Yüzyıllar boyu gıda renklendiricisi olarak kullanılan ve doğada bulunan inorganik pigmentler, sentez yoluyla da elde edilmektedirler. Günümüzde bu pigmentlerin çoğu, ciddi sağlık sorunlarına neden olduğu için kullanımları kısıtlanmıştır. Hala gıdalarda renklendirici olarak kullanılabilen inorganik pigmentlere titanyum dioksit ( $TiO_2$ ) ve karbon siyahı örnek verilebilir [11].

#### **2.3.2. Sentetik Pigmentler**

1856'da William Henry Perkin'in ilk sentetik boyarmaddesi olan leylak renkli pigmenti keşfi, renk endüstrisinin gelişimi için bir atılım oldu. Perkin sıtma tedavisi için araştırma sırasında; araştırmasında kullandığı anilin türevi olan katran ile çalışırken, tesadüfen anilin oksidasyonu sonucunda boyama kabiliyetine sahip bir madde elde etti. Ardından Perkin, leylak renkli pigmenti üretmek için sentetik boyaların ilk fabrikasını kurdu. Buna ek olarak, anilin ve diğer katran türevlerinden daha fazla boya ürününün keşfedilmesi için deneyler gerçekleştirildi. İlerleyen yıllarda kimyasal sentez sonucunda daha birçok sentetik pigment geliştirildi [11].

#### **2.3.3. Doğal Pigmentler**

Laboratuvar koşullarında elde edilen sentetik pigmentlere kıyasla tüketici tarafından daha çok tercih edilen doğal pigmentler, çoğunlukla bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilmektedir. Söz konusu pigmentlerin renkleri, depolama ve saklama koşullarına bağlı olarak değişkenlik gösterdiğinden, doğal kaynaklardan elde edilen bu pigmentlerin saklama koşullarına dikkat edilmesi oldukça önem taşımaktadır [7, 8].

### **2.3.3.1. Bitki Pigmentleri**

Fotosentetik (klorofiller, karotenoidler gibi) ve fotosentetik olmayan bitki pigmentleri, birçok endüstriyel kuruluş tarafından gıda renklendiricisi olarak kullanılmaktadır. Bu pigmentlerin bir kısmı plastidlerde bulunurken, bir kısmı vakuolde çözünmüş formda yer almaktadır [2, 5].

#### ***a- Klorofiller***

Bitkilerin temel pigmenti olan klorofil, mavi ve kırmızı dalga boyundaki ışığı absorbe ederken, yeşil ışığı da yansıtmaktadır. Klorofilin genel olarak a'dan e'ye kadar farklı formları belirlenmiş olup klorofil a ve b tüm karasal bitkilerde bulunmaktadır [2, 12].

#### ***b- Karotenoidler***

Fotosentezde aksesuar pigment görevi yapan ve fotosentetik yapıları fotooksidasyondan koruyan kırmızı, turuncu ve sarı renkli tetraterpendirler. En çok bilinen karotenoidler; karoten, lutein ve likopendir. Ayrıca yapılan çalışmalarda karotenoidlerin doğal antioksidan olduğu ortaya çıkmıştır [2, 12].

#### ***c- Antosiyaninler***

Antosiyaninler, pH'ya göre mavi, kırmızı ve mor renkte görünen ve suda çözünebilir flavonoidlerdir. Bununla beraber; mürver, siyah üzüm, siyah havuç ve kırmızı lahana gibi bitkilerde meyve, sebze ve çiçeklerin rengini antosiyaninler oluşturmaktadır. Fenolik bileşiklerden antosiyaninler, güçlü antioksidan özelliği nedeniyle önemli bitkisel pigmentlerdendir [2].

#### ***d- Betalainler***

Tirozinden sentezlenen aromatik indol türevleri olan betalainler, antosiyaninlere benzer olarak suda çözünebilir pigmentler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bitkilerde antosiyaninlerle bir arada yer almayan betalainlerin sadece Caryophyllales (karanfilgiller) sınıfında bulunduğu bilinmektedir [11].

Yukarıda söz edilen bitki pigmentleri (betalain, klorofil ve antosiyanin) oksijene ve ısıya duyarlı olmaları, pH'ya bağımlı renk değiştirmeleri ve fotooksidasyona uğrama özellikleri nedeniyle üretim ve depolama koşullarında bazı sınırlamalara sahiptirler [13].

### 2.3.3.2. Hayvansal Pigmentler

Geçmişte hayvansal kaynaklardan pigment eldesi ve üretimi zor bir süreç olarak karşımıza çıkmaktaydı. İlk olarak, 13. yüzyılda Murex cinsine ait olan bir salyangoz türünün mukus salgılayan hipobronşial bez olarak adlandırılan organından erguvan-mor renkte pigment eldesi gerçekleştirildi. Karminik asit olarak adlandırılan kırmızı- turuncu rengin eldesi ise Peru ve Ekvatordan gelen dişi koşnil böceği ile sağlanıyordu. Kraliyet ailesi üyelerinin, soyluların ve kilise liderlerinin kumaşlarını renklendirmek için kullanılmakta olan bu pigmente Avrupa'da yüksek talep vardı. Bununla ilişkili olarak, birkaç yüzyıl boyunca söz konusu pigment İngiltere'de kırmızı renkli giysi ve el dokuma halılarda kullanıldı. Zamanla, koşnil böceğinden elde edilen karminin, gıda ve içeceklerde, et, sosis gibi işlenmiş ürünlerde, unlu mamullerde, reçel, tatlılar, yoğurt, peynir, dondurma ve diğer süt ürünlerinde de kullanılmaya başlandığı gözlemlendi [14].

Kozmetik sanayinde karmin pigmenti, saç ve cilt ürünleri, ruj, toz pudra ve allıkta kullanımı ile tüketiciler tarafından rağbet gören ürünler arasına girdi. Bu pigmentin başka bir önemli uygulaması ise farmasötik alanda merhem ve ilaç endüstrisidir.

*Coccus lacca* olarak bilinen dişi Lak böceğinin salgısından da benzer renkli karmin boyarmadde elde edilmektedir. Bu pigmentin boya, vernik, mürekkep, mum, tatlı ve çikolatalar gibi çeşitli endüstriyel ürünlerin eldesinde kullanıldığı bilinmektedir. Literatürde söz konusu pigmentin Ortadoğu'da el yapımı halılarda ve askerlerin üniformalarını renklendirme amacıyla da kullanıldığı bildirilmiştir [14]. Turuncu- pembe renkte başka bir pigment olan kantaksantin ise; somon, karides ve flamingolardan elde edilmektedir [13].

Hayvanlar değişik pigmentleri bünyelerinde buldurmalarına rağmen bu pigmentlerin eldesinin birçok dezavantajı bulunmaktadır. Bunun sonucu olarak, hayvanlardan elde edilen pigmentler; miktar ve çeşitlilik açısından sınırlı olmakta, ekonomik açıdan ise pahalı ürünler olarak karşımıza çıkmaktadır [13].

### 2.4. Mikrobiyal Pigmentler

Yaşamın her alanında yer alan mikroorganizmaların başta gıda endüstrisinde ürün eldesi süreçlerindeki rolünün oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda, mikroorganizmalar tek hücre proteinleri, pigment takviyeleri, aminoasitler, vitaminler, organik asitler ve enzimlerin üretimi için kullanılmaktadır. Literatürde çeşitli pigmentlerin üretimi için mikroorganizmaların umut verici kaynaklar olduğu



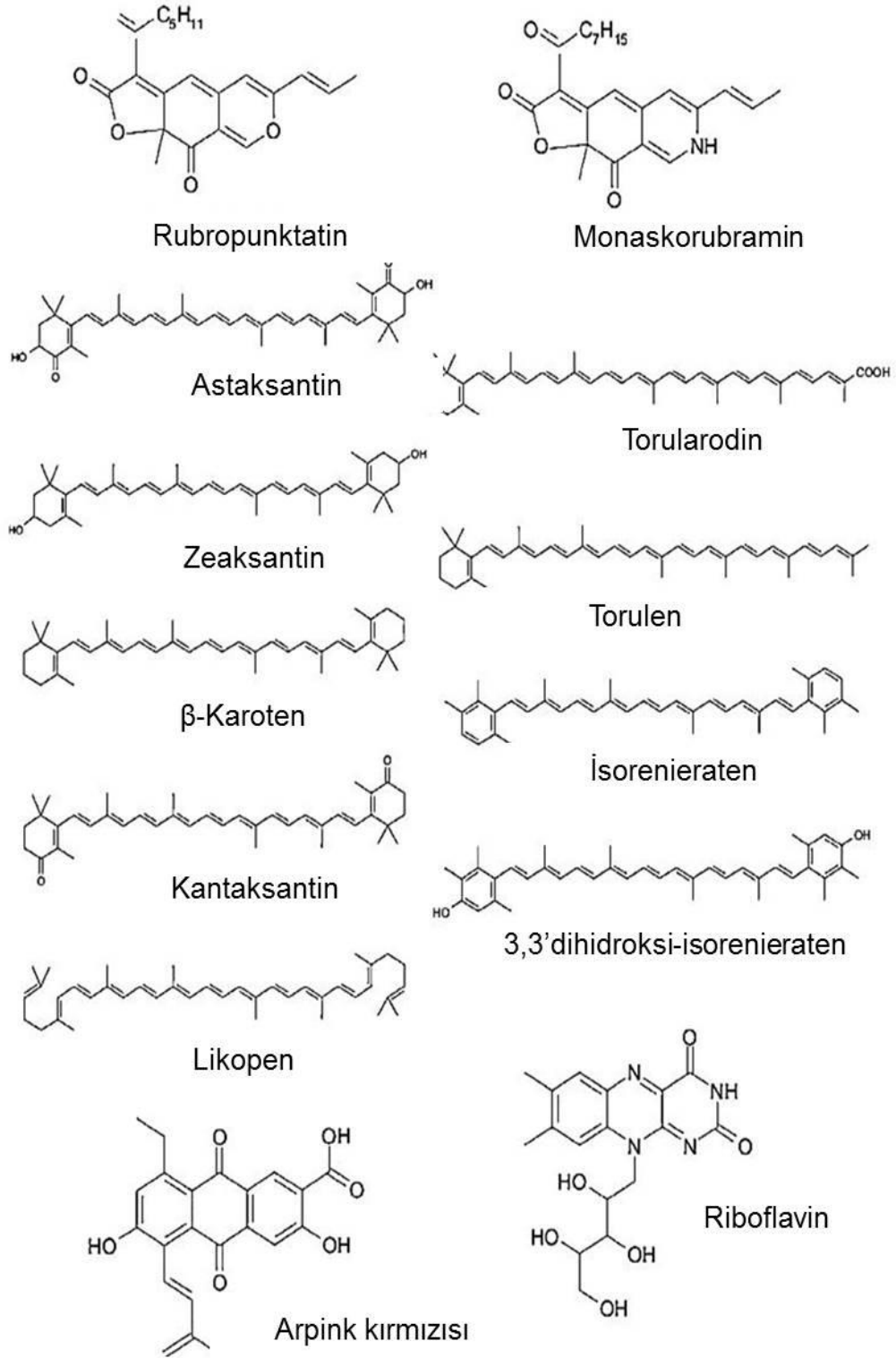
belirtilmektedir [15, 16]. Bu bağlamda, çeşitli bakteri ve fungal türlerin, potansiyel renklendirici kaynağı olarak kullanılabilmesi için geniş çapta araştırmalar devam etmektedir. Söz konusu pigmentlerin renklendirici olma özelliklerinin yanı sıra, anti-kanser aktiviteye de sahip olmaları, ışık, ısı ve pH stabilitesi gibi özellikler göstermeleri de pigment üretiminin avantajları olarak karşımıza çıkmaktadır [8]. Dolayısıyla, çeşitli endüstriyel kollarında pigment üretmek amacıyla mikrobiyal teknolojinin kullanımı giderek artmaktadır. Bunun yanısıra, çeşitli endüstrilerde kullanılmakta olan sentetik pigmentlerin sağlık üzerindeki olumsuz etkilerinde artış gözlemlendiğinden doğal pigmentler tüketicinin endişesini gidermeye yardımcı olmaktadır. Dolayısıyla, doğal pigmentler, bebek mamalarında, kahvaltılık tahıllarda, makarnalarda, soslarda, işlenmiş peynirlerde, meyve sularında, vitaminle zenginleştirilmiş süt ürünlerinde ve bazı enerji içeceklerinde kullanılmaktadırlar [17].

Mikroorganizmalardan elde edilen ve gıdalarda kullanılan pigmentlerin yapısı Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

Mikrobiyal pigmentler bakterilerden ve funguslardan (maya ve küf) elde edilmektedir.

#### **2.4.1. Bakteriyel Pigmentler**

Bazı bakteriler tarafından oluşturulan ve farklı endüstriyel alanlarda kullanılmakta olan pigmentlerin, bakterileri tanımlamak için kullanılabilirliği bilinmektedir. Bakteriyel pigmentlere *Agrobacterium aurantiacum* tarafından üretilen kırmızı renkli Astaksantin pigmenti örnek verilebilir. Fotosentetik bakteri olan *Bradyrhizobium sp.*'den elde edilen kantaksantin yıllarca balık yeminde kullanılmıştır. Kırmızı- turuncu renkli kantaksantin mikrobiyal kaynaklarından bir diğeri ise *Halobacterium*'dur. *Flavobacterium* türünden elde edilen zeaksantin olarak bilinen sarı renkli pigment, yumurta sarısı rengini arttırmak için kümes hayvanlarının yemlerine katkı maddesi olarak ilave edilmekte ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır [18].



Şekil 2.1. Mikroorganizmalardan elde edilen pigmentlerin moleküler yapıları [14]

### 2.4.2. Maya Pigmentleri

Funguslardan bazı maya türleri pigment üretiminde kullanılmaktadır. Maya pigmentlerine karotenoidleri örnek olarak verebiliriz. *Phaffia rhodozyma*'tan (*Xanthophyllomyces dendrohous*) elde edilen astaksantin bir karotenoid pigmenttir ve gıda boyalarında, hayvan yemlerinde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Literatürde çok sayıdaki araştırmalarda astaksantin pigmentinin üretiminin ekonomik açıdan uygun olmadığı belirtilmiştir [18]. Ancak bazı mayalar, düşük maliyetli substratlardan karotenoid üretebilir. Bu nedenle kimyasal senteze alternatif oluştururlar. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda, *Rhodotorula glutinis*'den karoten pigmenti eldesi dikkat çekmektedir. *R. gracilis*, *R. rubra* (*R. mucilaginoso*) ve *R. graminis*'inde karoten pigment üretimi için uygun olduğu belirtilmektedir [18, 19].

### 2.4.3. Fungal Pigmentler

Fungusların sekonder metabolitleri olan pigmentler ticari olarak kullanılmaktadırlar [20]. *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* ve *Trichoderma* gibi funguslar, üreme sırasında ara metabolitler olarak pigment üretirler [21]. Sekonder metabolit olarak funguslar tarafından üretilen pigmentler, kimyasal olarak karotenoidler ve poliketidler olarak sınıflandırılır. Fungus poliketid pigmentleri, poliketid zincirine bağlanan sekiz C<sub>2</sub> birimine sahip tetraketidler ve oktoketidlerden oluşmaktadır [22].

Fungal pigmentler genellikle tekstil ve deri endüstrisinde kullanılmaktadır. Literatürde, genellikle biyolojik olarak parçalanabilen ve toksik olmayan özellik gösteren fungal pigmentler araştırılmıştır [23].

## 2.5. Mikroorganizmalardan Pigment Üretimi

Günümüzde, mikrobiyal pigmentlere duyulan ilgi gittikçe artmaktadır. Literatürde yapılan çalışmalarda, pigment üretiminde kullanılan biyolojik kaynaklar içerisinde yer alan mikroorganizmaların biyoürün eldesi açısından büyük bir potansiyele sahip olduğu belirtilmektedir [14]. Doğal olarak meydana gelen bazı mikrobiyal pigmentler;

### ➤ Prodigiosin

*Rugamonas rubra*, *Actinomycetes*, *Serratia marcescens*, *Vibrio psychoerythrus*, *Streptovercillium rubrircetuli* ve eubakteriler gibi çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen kırmızı renkli pigmenttir. Bu pigmentler antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. *S. marcescens* suda çözünür kırmızı renkli pigmenti üretir [17].

### ➤ **Kantaksantin**

*Bradyrhizobium*, *Halobacterium* ve kök nodüllerinden izole edilen *Aeschynomene* suşları koyu pembe veya turuncu renkte pigment oluşturan en önemli karotenoid kaynaklarıdır [24].

### ➤ **Riboflavin**

Riboflavin, çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen sarı renkli suda çözünebilen bir pigmenttir. Riboflavin, bakterilerden *Bacillus subtilis*, ascomycetes'den *Ashbya gossypii*, funguslardan *Candida famata*'dan biyoteknolojik yollarla üretilmektedir. Bu kaynaklardan riboflavin üretimi kimyasal olarak eldesine göre daha çok tercih edilmektedir. Söz konusu pigmentin bebek mamalarında, kahvaltılık gevreklerde, soslarda, makarnalarda, işlenmiş peynirlerde, meyve sularında, vitamince zenginleştirilmiş süt ürünlerinde ve bazı enerji içeceklerinde kullanıldığı görülmektedir [25].

### ➤ **Karotenoidler**

Karotenoidler, fotosentetik ve fotosentetik olmayan bakteriler, birçok fungus türü tarafından üretilen, yağda çözünür pigmentlerin geniş bir kısmını oluştururlar. Bunlar genellikle sekiz izopren biriminden oluşan alifatik polien bir zincir içeren ve buna bağlı olarak sarı, turuncu veya kırmızı renk oluşturan pigmentlerdir. Bilinen en iyi karotenoid örnekleri;  $\beta$ -karoten, nörosporaksantin ve astaksantindir, diğer karotenoidlerin ve ksantofillerin üretimi ile ilgili bilgi sınırlıdır [26]. Karotenoidler çok güçlü antioksidan özelliğine sahiptirler ve yaygın bir şekilde gıda renklendiricisi olarak kullanılmaktadırlar. Mikroorganizmaların çoğunluğunun özellikle *Myxococcus*, *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Agrobacterium* ve *Sulfolobus*'un bazı suşlarının karoten üretimi araştırılmıştır [1]. Karotenoidlerin *Serratia* ve *Streptomyces*'in bazı türleri tarafından da üretildiği bilinmektedir [14].

### **Beta- karoten**

*Phycomyces* ve *Mucor circinelloides*'ten beta karoten üretildiği bilinmektedir. *Blakeslea trispora*'dan fermentasyonla elde edilen beta karotenin gıdalarda renklendirici olarak kullanımı Avrupa Birliği komisyonu tarafından kabul görmüştür [18].

### ➤ Astaksantin

Kırmızı-turuncu bir pigment olan astaksantin, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Heamatococcus pluvialis* ve *Agrobacterium aurantiacum* tarafından üretilmekte ve 3,3'-dihidroksi- beta, beta- karoten- 4,4'- dion olarak da adlandırılmaktadır [1, 27].

### ➤ Fikosiyanin

Klorofil-a içeren mavi- yeşil bakterilerden elde edilen mavi renkli pigmenttir. *Spirulina*'dan üretilen söz konusu pigment, zengin protein içeriğine sahip olup gıda takviyesi olarak da kullanılmaktadır. Bu gıda takviyesinin içeriğinde kurumuş *Spirulina* vardır [1].

### ➤ Violasein

*Chromobacterium violaceum*'dan elde edilen violasein birçok biyolojik aktiviteye sahiptir. Endüstriyel açıdan özellikle tıp, kozmetik, gıda ve tekstilde kullanımı oldukça yaygın olduğu bilinmektedir [1].

Çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen pigmentler Çizelge 2.3' te belirtilmiştir.

**Çizelge 2.3.** Mikroorganizmalardan Elde Edilen Pigmentler ve Renkleri

Mikroorganizma	Pigment/Molekül	Renk/Görünüm
<b>Bakteriler</b>		
<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.	Zeaksantin	Sarı
<i>Achromobacter</i> sp.	-	Kırmızı
<i>Brevibacterium</i> sp.	Karotenoid benzeri	Turuncu sarı
<i>Corynebacterium michigannise</i>	-	Gri-krem
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	İndigoid	Mavi
<i>Rugamonas rubra</i> , <i>Streptovercillium rubroreticuli</i> , <i>Vibrio gaogenes</i> , <i>Alteromonas rubra</i>	Prodigosin	Kırmızı
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Astaksantin	Pembe
<i>Haloferax alexandrinus</i>	Kantaksantin	Koyu kırmızı

**Çizelge 2.3.** Mikroorganizmalardan Elde Edilen Pigmentler ve Renkleri (devamı)

<b>Mikroorganizma</b>	<b>Pigment/Molekül</b>	<b>Renk/Görünüm</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Stafiloksantin Zeaksantin	Altın sarısı
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Violasein	Mor
<i>Serratia marcescens</i> , <i>Serratia rubidaea</i>	Prodigosin	Kırmızı
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piyosiyenin	Mavi- yeşil
<i>Xanthomonas oryzae</i>	Kantamonadin	Sarı
<i>Janthinobacterium lividum</i>	Violasein	Mor
<b>Algler</b>		
<i>Dunaliella salina</i>	$\beta$ -karoten	Kırmızı
<i>Chlorococcum</i> sp.	Lutein	Turuncu
<i>Hematococcus</i> sp.	Kantaksantin	Sarı- turuncu – kırmızı
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaksantin	Kırmızı
<b>Küfler</b>		
<i>Aspergillus</i> sp.	$\beta$ -karoten	Kırmızı- turuncu
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Likopen	Kırmızı
<i>Monascus</i> sp.	Monaskorubramin Rubropunktatin	Kırmızı- turuncu
<i>Monascus purpureus</i>	Monascus ankaflavin	Kırmızı- sarı
<i>Monascus roseus</i>	Kantaksantin	Turuncu- pembe
<i>Monascus</i> sp.	Ankaflavin	Sarı
<i>Penicillium oxalicum</i>	Antrakinin	Kırmızı
<i>Mucor circinelloides</i> , <i>Neurospora crassa</i> <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	$\beta$ -karoten	Sarı- turuncu
<i>Pacilomyces farinosus</i>	Antrakinin	Kırmızı
<b>Mayalar</b>		
<i>Cryptococcus</i> sp.	Melaninin çeşitli bileşikleri	Kırmızımsı kahverengi
<i>Blakeslea trispora</i>	$\beta$ -karoten	Krem
<i>Saccharomyces neoformans</i> var. <i>nigricans</i>	Melanin	Siyah
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaksantin	Pembe-kırmızı

**Çizelge 2.3.** Mikroorganizmalardan Elde Edilen Pigmentler ve Renkleri (devamı)

<b>Mikroorganizma</b>	<b>Pigment/Molekül</b>	<b>Renk/Görünüm</b>
<i>Rhodotorula sp. Rhodotorula glutinis</i>	Torularodin	Turuncu- kırmızı
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Melanin	Kahverengi
<b>Actinomycetes</b>		
<i>Streptoverticillium rubroreticuli</i>	Prodigosin	Kırmızı
<i>Streptomyces echinoruber</i>	Rubrolon	Kırmızı

Doğal kaynaklardan ekstrakte edilen mikrobiyal pigmentlerin üretimini arttırmak ve pigment üretiminde maliyeti azaltmak için araştırmalar sürdürülmektedir. Ayrıca, yüksek verimde pigment üreten alternatif mikroorganizmaların araştırılarak üretim sürecinin geliştirilmesi pigment üretiminin artırılması açısından oldukça önem taşımaktadır [10].

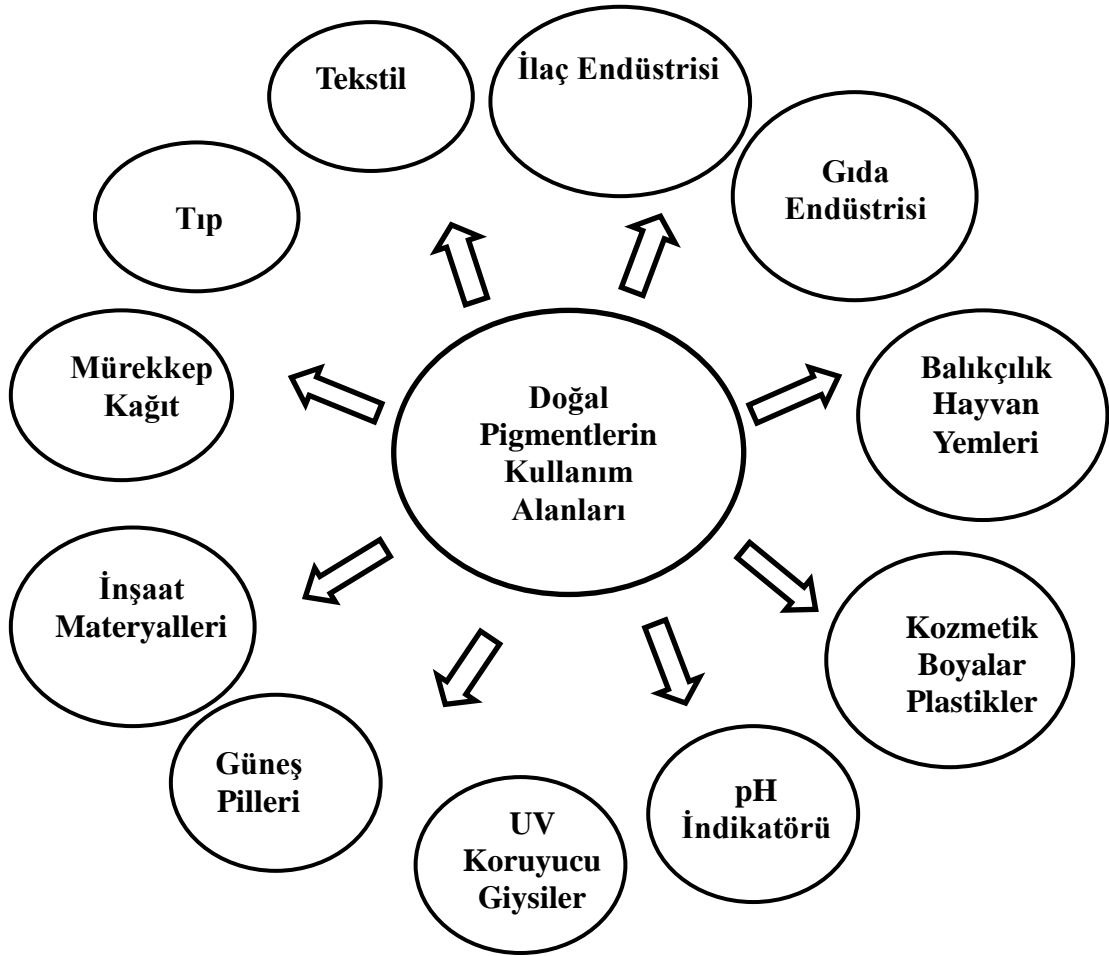
### **2.5.1. Doğal Pigmentlerin Uygulama Alanları**

Mikroorganizmalardan elde edilen pigmentler birçok ülkede ve birçok sektörde kullanılmaktadır. Biyopigmentler; renklendirici olarak gıdalarda, boyalarda, mürekkep ve kağıtlarda, kozmetik ürünlerde, işlenmiş et ürünlerinde, alkolsüz içeceklerde ve ilaçlarda kullanılmaktadır. Bunlara ilave olarak, biyopigmentler güneş pillerinin kaplamalarında, kanatlı hayvan sektöründe hayvan yemi olarak, balıkçılık endüstrisinde örneğin, somon balıklarının pembe rengini arttırmak için kullanılmaktadır. Tekstil endüstrisinde biyopigmentler tekstil boyamasında, örneğin *Serratia marcescens*'ten elde edilen prodigosin pigmentinin akrilik, polyester, ipek ve pamuklu kumaşlarda kullanımı görülmektedir. İlaç endüstrisinde; karoten pigmentinin kanser, kardiovasküler hastalık ve yaşa bağlı makuler bozulma gibi kronik hastalıkların önlenmesinde farmasötik olarak ticari amaçlı kullanıldığı görülmektedir [6, 28]. Doğal pigmentlerin çeşitli uygulama alanları Şekil 2.2' de yer almaktadır.

### **2.6. Mikroorganizmalardan Üretilen Pigmentlerin Önemi**

Geniş kullanım alanına sahip olan mikrobiyal pigmentler, renklendirici özellikleri ile endüstriyel açıdan oldukça önem taşımaktadır. Son yıllarda sentetik pigment kullanımının insan sağlığı üzerindeki zararlı etkilerinin belirlenmesi ile endüstriyel üretim süreçlerinde doğal pigment kullanımına yönelik eğilim artmıştır. Sentetik boyaların kullanıma bağlı

olarak ortaya çıkan toksik ve alerjik reaksiyonlara karşı doğal boyaların çevre dostu olmaları ve biyo-çözünürlüklerinin yüksek olması özellikleri söz konusu boyaların tercih edilme nedeni olmuştur [29]. Ayrıca, mikroorganizmaların üreme hızlarının yüksek olması, kültür ortamı içeriklerinin ve üreme ortamlarından pigment ekstraksiyon maliyetinin düşük olması, mikroorganizmaları pigment üretiminde önemli bir kaynak haline getirmiştir. Bu bağlamda, mikroorganizmaların pigment üretiminde kullanımlarının avantajları yadsınamayacak ölçüde fazladır [30]. Biyoteknolojik yollarla elde edilen mikrobiyal pigmentlerin, gıda sınıfı renklendirici olarak kullanımı öncelerde şüphe uyandırıyordu. Bunun sebebi fermantasyon için yüksek sermaye gerektiren tesislerin gerekli olması ve toksisite çalışmaları için gerekli zaman ihtiyacıydı [10,18]. Yoğun araştırmalara dayandırılarak elde edilen sonuçlara göre, bu pigmentlerin kullanım durumları Çizelge 2.4 'te endüstriyel üretim safhası (EÜ), gelişme safhası (GS) ve araştırma projesi (AP) olarak kategorilendirilmiştir [32].



Şekil 2.2. Doğal Pigmentlerin Çeşitli Uygulamaları [Shahid ve [6]' dan modifiye edilmiştir.]



**Çizelge 2.4.** Doğal Gıda Renklendiricisi Olarak Mikroorganizmalardan Elde Edilen Pigmentler ve Kullanım Aşamaları

Pigment	Renk	Mikroorganizma	Kullanım Durumu
Ankaflavin	Sarı	<i>Monascus sp.</i>	EÜ
Antrakınon	Kırmızı	<i>Penicillium candidum</i>	EÜ
Monaskorubramin	Kırmızı	<i>Monascus sp.</i>	EÜ
Riboflavin	Sarı	<i>Ashbya gossypii</i>	EÜ
$\beta$ -Karoten	Sarı-turuncu	<i>Blakeslea trisporia</i>	EÜ
Astaksantin	Pembe-kırmızı	<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	AP
Astaksantin	Pembe- kırmızı	<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	AP
Kantaksantin	Koyu kırmızı	<i>Bradirhizobium sp.</i>	AP
Likopen	Kırmızı	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	AP
Melanin	Siyah	<i>Saccharomyces neoformis</i>	AP
Naftakinon	Kan kırmızısı	<i>Cardyiceps unilateralis</i>	AP
Zeaksantin	Sarı	<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i>	AP
$\beta$ -Karoten	Sarı-turuncu	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	AP
$\beta$ -Karoten	Sarı-turuncu	<i>Neurospora crassa</i>	AP
$\beta$ -Karoten	Sarı-turuncu	<i>Phycomyces blaksleeanus</i>	AP
Bilinmeyen	Kırmızı	<i>Paecilomyces sinclairii</i>	AP
Astaksantin	Pembe- kırmızı	<i>Xanthophyllomyces dendrohus</i>	GS
Likopen	Kırmızı	<i>Blakeslea trisporia</i>	GS
Rubrolon	Kırmızı	<i>Streptomyces echinoruber</i>	GS
Torularodin	Turuncu- kırmızı	<i>Rhodotorula sp.</i>	GS
Zeaksantin	Sarı	<i>Flavobacterium sp.</i>	GS
$\beta$ -Karoten	Sarı- turuncu	<i>Mucor circinelloides</i>	GS
Bilinmeyen	Kırmızı	<i>Penicillium purpurogenum</i>	GS

\*Endüstriyel Üretim Safhası (EÜ), Gelişme Safhası (GS) ve Araştırma Projesi (AP)

Doğal renklendirici olan mikrobiyal pigmentlerin önemli metabolik fonksiyonları da bulunmaktadır. Bu bağlamda, pigmentlerin sahip oldukları biyolojik özellikler de önemlidir. Örneğin *Penicillium oxalicum*' dan elde edilen antrakınon pigmenti antikanser etkiye sahiptir [13, 19]. Doğal gıda renklendiricisi olan pigmentlerin, güçlü antioksidan özelliğe de sahip oldukları bildirilmektedir [31].

Bakterilerden ticari olarak elde edilen pigmentlerin de bazı önemli fonksiyonları bulunmaktadır. Örneğin, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas denitrificans*, *Vibrio* türlerinden elde edilen prodigiosin pigmentinin antibakteriyel, antimalaryal, antifungal, immün sistem baskılayıcı, anti-kanser gibi etkilere sahip oldukları bilinmektedir. *Alteromonas luteoviolacea*, *Chromobacterium violaceum*'tan elde edilen viyolasein pigmenti ise antiülserojenik, antibakteriyel, antiviral, antikanser etki göstermektedir [10, 16]

Çizelge 2.5' te, mikroorganizmalardan üretilen önemli doğal pigmentlerin olası metabolik rolleri gösterilmektedir

**Çizelge 2.5.** Doğal Gıda Renklendirici Olan Mikrobiyal Pigmentlerin Renkleri ve Metabolik Rollerini [32]

MİKROORGANİZMA	MOLEKÜL	RENK	METABOLİK ROLÜ
<i>Spongioococcum excentricum</i>	Lutein	Sarı	Antioksidan, maküler dejenerasyonu yavaşlatıcı
<i>Monascus sp.</i>	Ankaflavin	Sarı	Antimikrobiyal
<i>Penicillium oxalicum</i>	Antrakınon	Kırmızı	-
<i>Haematococcus pluvialis</i> <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> <i>Paracoccus carotinifaciens</i>	Astaksantin	Somon	Antioksidan
<i>Blakeslea trispora</i> <i>Dunaliella salina</i>	$\beta$ - karoten	Turuncu	Provitamin-A aktivite, antioksidan
<i>Monascus sp.</i>	Monascorubramin	Kırmızı	Antimikrobiyal
<i>Arthrospira platensis</i>	Piyosiyenin	Mavi	Antioksidan
<i>Ashbya gossypii</i>	Riboflavin	Sarı	Vitamin B <sub>2</sub>
<i>Monascus sp.</i>	Rubropunktatin	Turuncu	Antimikrobiyal
<i>Blakeslea trispora</i>	Likopen	Kırmızı	Antioksidan

## 2.7. *Fusarium* Türlerinin Genel Özellikler

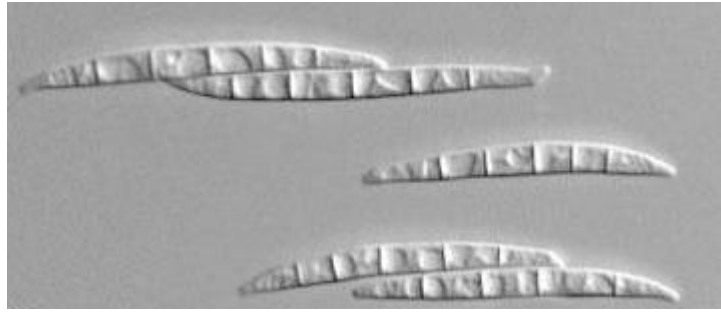
*Fusarium sp.*, türleri Ascomycota şubesine ait funguslardır. Bu tür ilk olarak 1809'da karakteristik özelliği olan konidyanın kano ve muz şeklinde olması ile Link tarafından tanımlanmıştır [33]. Bu türler topraktaki saprofitik organizmalar olarak tanınırlar. Hububat ürünlerine zarar vererek tarımda birçok ekonomik kayba neden olurlar [34, 35].

*Fusarium sp.* ikincil metabolit olan mikotoksinleri üretirler. Triketesener olarak bilinen (deoksinivalenol-DON, nivalenol-NIV ve T-2 toksini), fumonisinler (FBs) ve zearalenon (ZEA) *Fusarium* mikotoksinleridir [36].

Mikotoksinlere ek olarak önemli bir ikincil metabolit olan pigment üretirler. Bu pigmentler tıpta önem taşıyan ve uygulanabilir biyolojik aktiviteye sahiptirler [37, 38].

### 2.7.1. *Fusarium graminearum*

*Gibberella zae* olarak da adlandırılmaktadır. Geniş bir coğrafyada yayılım gösterir. Mısır, buğday ve arpa, tahıllarla birlikte tek yıllık ve çok yıllık bitkilerde görülmektedir *Fusarium graminearum*'un mikroskopik görüntüsü Şekil 2.3' te verilmiştir [33].



Şekil 2.3. *Fusarium graminearum* Mikroskopik Görüntüsü [33]

PDA (Patates Dekstroz Agar) besiyerinde; koloniler hızlı bir şekilde büyür ve nispeten yoğun olarak misel üretirler. Kültürler agarda kırmızı pigmentler oluştururlar. Pigment pH'ya duyarlıdır. Klamidosporların yapısı değişken ancak çoğunlukla oluşumu yavaşır [33].

*Fusarium graminearum*, uzun vadede korunması en zor olan türlerden biridir. Saklanan kültürün devamlılığını sağlamak için düzenli olarak kontrol edilmelidir. *F. graminearum* kültürleri, *F. pseudograminearum*, *F. crookwellense* ve *F. culmorum* ile kolaylıkla karıştırılabilir [33].

Makrokonidiyanın morfolojisindeki farklılıklar *F. graminearumun*, *F. culmorum* ve *F. crookwellense*'den farklılaşmasına sağlar. Mikrokonidiyanın yokluğu *F. graminearum* izolatlarını patates dekstroz agar üzerinde *F. graminearum*' a benzer koloniler oluşturan *Sporotrichiella*'nın bazı izolatlarından ayırır. *F. graminearum* suşları, 60 g / kg zearalenon üretebilir ve zearalenonun ticari olarak üretilmesi için kullanılır ve bu zearalenon kimyasal olarak modifiye edilir ve sığır büyümesini destekleyici olarak satılır.

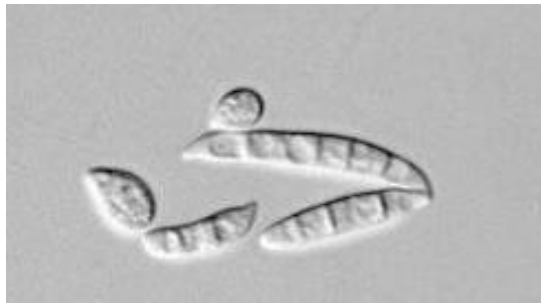
*F. graminearum*'daki mikotoksin biyosentezinin sıcaklığa karşı daha duyarlı olduğu görülmektedir [33].

*F.graminearum* fungusu iyi bir pigment üreticisidir. Bu türün kendine özgü kırmızı pigmentleri rubrofusarin ve aurofusarin olarak tanımlanmaktadır. Aynı zamanda *F. graminearum*, mikotoksin olan diasetoksisirpenol, fusarenon X ve neosolaniol sentezini gerçekleştirmektedir. Ancak mikotoksinlerin üretimi bu suşun pigment üreticileri olmalarını engellemez. Kültür ortamlarını ve havalandırma olarak kültür koşullarını değiştirerek mikotoksin üretimini önlemek mümkündür [39]. Aurofusarin (AUS), kültürlerde ve enfekte olmuş tahıllarda karakteristik kırmızı pigment olarak görülmektedir [40]. Pigment *Fusarium graminearumun* tanımlanması için kullanılabilir.

Naftokinon, rubrofusarin ve aurofusarin (AUF), *Fusarium*'un kırmızı pigmentini ifade eder. Naftokinon sentezi, bitkilerde, mantarlar ve aktinomisetlerde gözlemlenen yaygın bir doğal süreçtir. Bu bileşik, fitotoksik, böcek öldürücü, antibakteriyel ve fungusidal özellikler de dahil olmak üzere geniş biyolojik aktiviteye sahiptir. *Fusarium graminearum*'un sekonder metabolitleri sağlık ve ekonomik etkileri nedeniyle önemlidir [40]. Sitotoksik ve antikanserojenik etkiler görülmektedir [41].

### 2.7.2. *Fusarium poae*

*Fusarium poae*, geniş bir coğrafyada yayılım gösterir, ılıman bölgelerde bu fungusa daha sık rastlanılmaktadır. PDA besiyerinde miselyumları bol tüylü görünür. Miselyum başta solgun renkte olmakla birlikte kültür süresinin artması ile kırmızımsı kahverengiye dönüşür. Agarda sarıdan kırmızı renge dönen bir pigment üretirler. Farklı bir kokusu vardır. Makrokonidiaları, tüm suşlar tarafından oluşturulmaz, ancak bazı suşlarda PDA üzerinde görülebilir. Morfolojileri nispeten ince, kanca ve yarım ay şeklindedirler. Septa sayısı, genellikle 3 veya 5'lü septalıdır [33]. *Fusarium poae*'nin mikroskopik görüntüsü Şekil 2.4' te verilmiştir.

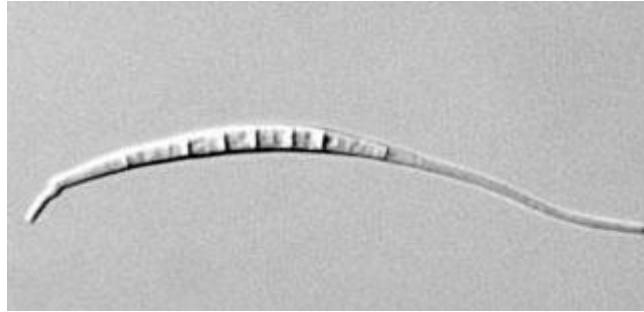


Şekil 2.4. *Fusarium poae*'nin Mikroskopik Görüntüsü [33]

*Fusarium poae*'nin birçok izolatu zayıf olarak toksik veya toksik değildir. Triketesin mikotoksinlerine bağlı olarak insan ve hayvanlarda toksin oluşum vakaları *F. poae* 'ye yönlendirebilir. Toksinler çoğunlukla *F. poae* ile birlikte bulunan *F. sporotrichioides*'e bağlı olabilir. *Fusarium poae*, *Fusarium acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. crookwellens*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. pseudograminearum*, *F. sambucinum*, *F. sporotrichioides* ve *F. tricinctum*, naftokinon grubuna ait ikincil bir metabolit olan kırmızı pigment aurofusarini üretmektedir [42].

### 2.7.3. *Fusarium equiseti*

*Gibberella intricans* olarak da adlandırılmaktadır. Sıcaktan soğuğa değişen alanlarda görülen kozmopolit bir türdür [33]. *Fusarium equiseti* diğer *Fusarium* türleriyle karıştırılabilir [33]. Beyaz pigmentasyonu olan fungus, konak özgüllüğü gösterir [43]. Zayıf bir patojen olan *Fusarium equiseti*, bitki köklerinde kolonize olan fungus türlerinden biridir [44]. *Fusarium equiseti*'nin *Striga hermonthica* gibi parazit bitkiler üzerinde de etkili olduğu rapor edilmiştir. *Fusarium equiseti*'nin gram pozitif bakterileri inhibe ettiği saptanmıştır [43]. *Fusarium equiseti*'nin mikroskopik görüntüsü Şekil 2.5' te verilmiştir.



Şekil 2.5. *Fusarium equiseti*'nin Mikroskopik Görüntüsü [33]

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

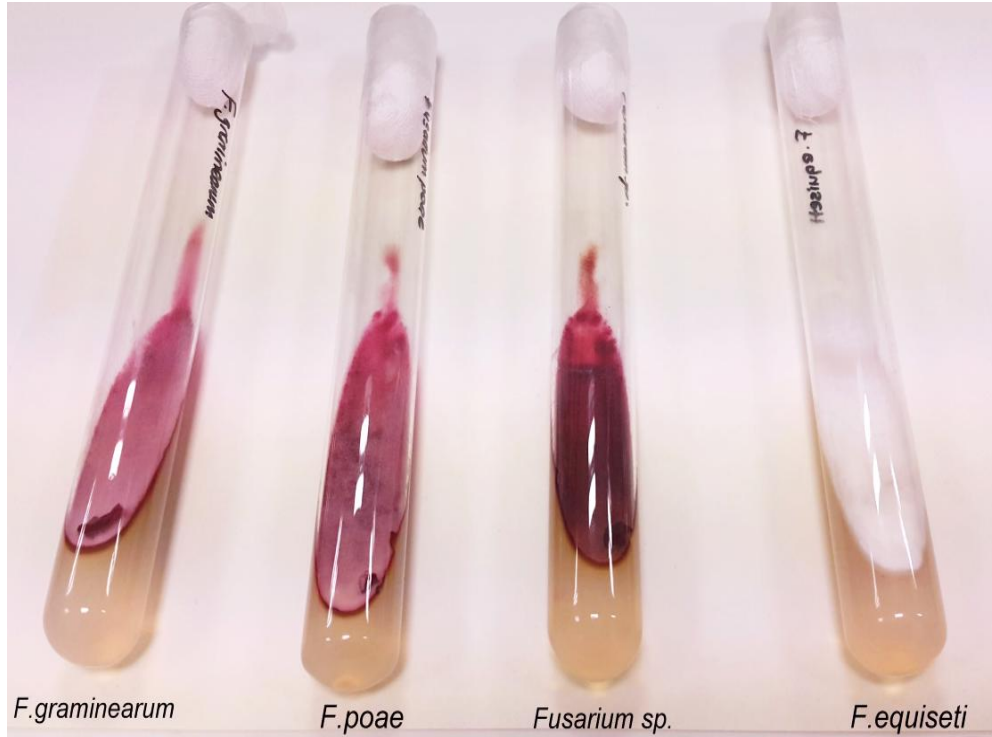
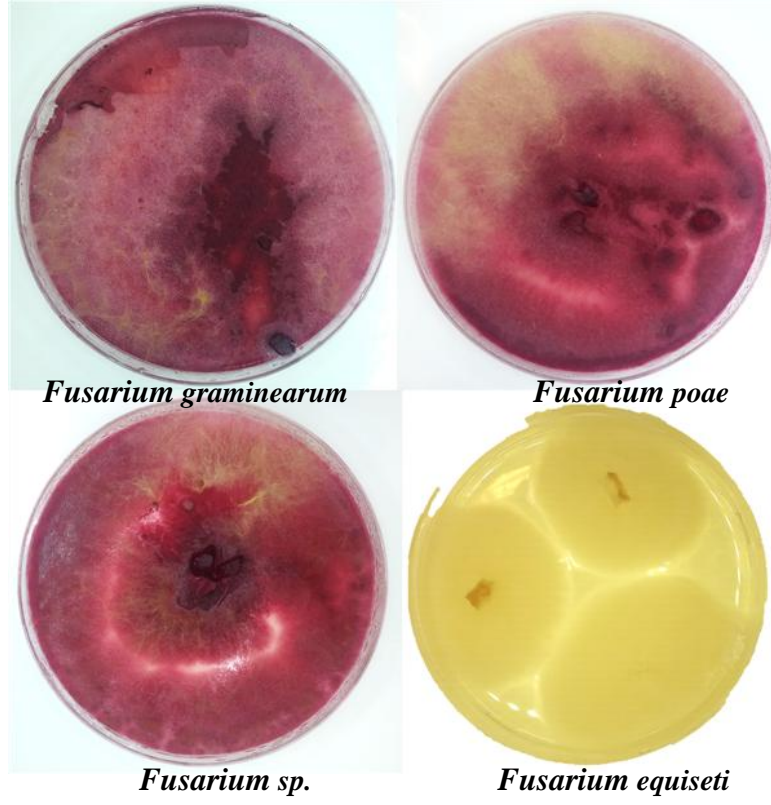
Çalışmada Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu Laboratuvarı'nda bulunan *Fusarium* suşları kullanıldı. *Fusarium graminearum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti*, ve *Fusarium sp.*, suşları çalışmaya dahil edilerek, söz konusu suşların oluşturduğu pigmentler değerlendirildi. Elde edilen kültürler +4 °C' de buzdolabında saklandı. Suşların canlılığının sağlanması amacıyla iki hafta arayla pasajlama gerçekleştirildi.

##### 3.1.1. *Fusarium* Suşlarının Makroskopik Morfolojisinin İncelenmesi

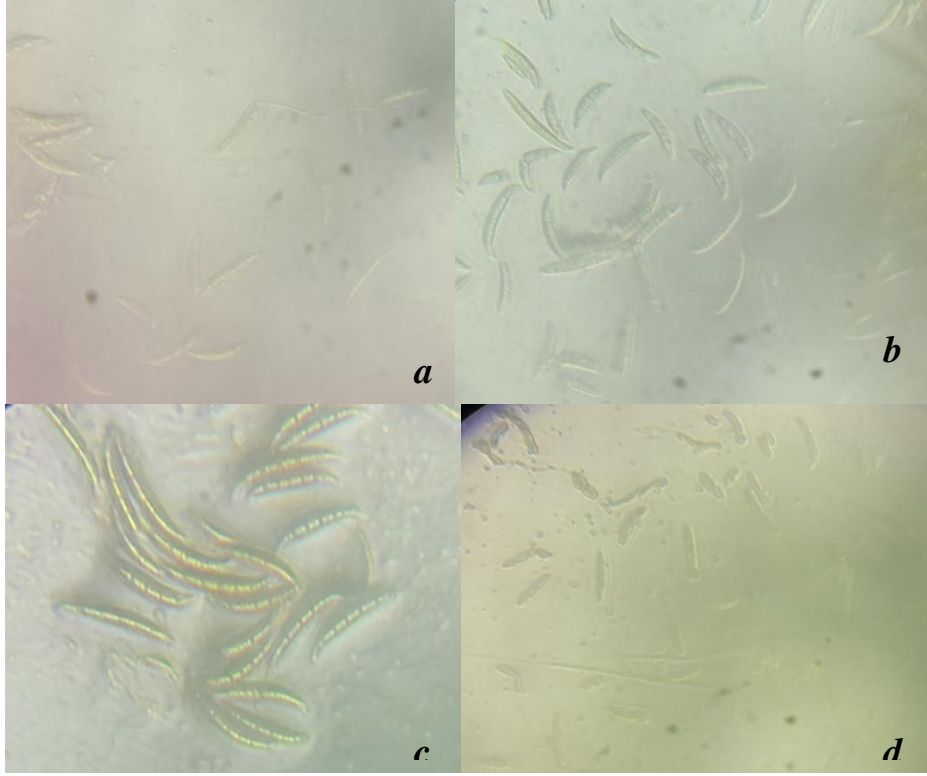
*Fusarium* suşları, ilk olarak Patates Dekstroz Agarda (PDA) makroskopik olarak incelendi. Bu bağlamda, *Fusarium* suşları patates dekstroz agar'a ekildi ve 30°C'de 7 günlük inkübasyon sonrasında suşlar incelendi. PDA'ya ekilen *Fusarium graminearum*, *Fusarium poae*, *Fusarium sp.* kırmızı renkli miselyumlar, *Fusarium equiseti* ise; beyaz renkli miselyumlar oluşturduğu görüldü. *Fusarium* türlerinin Patates Dekstroz agarda görünüşleri Tıbbi ve Endüstriyel Biyoteknoloji Laboratuvar'ında çekildi ve Şekil 3.1'de gösterildi.

##### 3.1.2. *Fusarium* Suşlarının Mikroskopik Morfolojisinin İncelenmesi

*Fusarium* suşlarının mikroskopik incelemeleri, küflerin incelenmesinde kullanılan lugol boyama yöntemi ile yapıldı [45]. Bu bağlamda, *Fusarium* suşlarının, patates dekstroz agar üzerinde oluşturulmuş oldukları miselyumlardan örnek alınıp, ardından lugol ile boyama yapıldı. Boyama sonucundan *Fusarium* suşlarının, mikroskop altında fuziform, orak şeklinde bir veya daha fazla bölmeli görülmektedir [33]. *Fusarium* suşlarının mikroskopik görüntüleri Tıbbi ve Endüstriyel Biyoteknoloji Laboratuvar'ında çekilerek Şekil 3.2' de verildi.



**Şekil 3.1.** *Fusarium* Türlerinin Patates Dekstroz Agarda Görünümleri



**Şekil 3.2.** *Fusarium* Suşlarının Mikroskopik Görüntüleri  
a- *Fusarium graminearum* b- *F. poae* c-*Fusarium* sp. d- *Fusarium equiseti*

### 3.2. Mikroorganizmaların Ekim ve Üretim Koşulları

#### 3.2.1. Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması

Bu çalışmada fungusların üretimi için Patates Dekstroz Agar (PDA) (Merck) ve bu fungusların oluşturdukları pigmentlerin incelenmesi için Malt Ekstrakt (MB) (Merck), Sabouraud Dekstroz (SDB) (Merck) ve Patates Dekstroz (PDB) (Becton Dickinson) sıvı besiyerleri kullanıldı. 3,9 g PDA, 1,7 g MB, 3 g SDB ve 2,4 g PDB üzerine 100 ml distile su ilave edilmiştir, ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözülmüş ve ardından 121°C’de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

#### 3.2.2. Patates Dekstroz Agar (PDA) Besiyerine Ekim ve Üretim

Çalışmada kullanılan *Fusarium* suşlarının ön kültürasyonu için PDA besiyeri kullanıldı. PDA besiyerine ekilen *Fusarium* suşları 30°C’de, statik inkübatörde 7 günde üretildi.



### **3.2.3. Patates Dekstroz (PDB), Sabouraud Dekstroz (SDB) , Malt Ekstrakt (MB) Sıvı Besiyerlerine Ekim ve Üretim**

*Fusarium* suşlarının pigment üretimlerinin belirlenmesi amacıyla Patates Dekstroz (PDB), Sabouraud Dekstroz (SDB) , Malt Ekstrakt (MB) sıvı besiyerleri hazırlandı. *Fusarium* suşlarının PDA besiyerinde ön kültürasyon ile üretilmiş olan kültürlerden standart hale getirilmiş spor süspansiyonlarından 10 ml alınarak, 100 ml' PDB, SDB, MB sıvı besiyerlerine ekim yapıldı. *Fusarium* suşlarının pigment üretimi 30°C'de, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi.

### **3.2.4. Kültürlerdeki Üremenin Ölçülmesi**

Üç temel besiyerinde 30°C'de, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde 7 günde üretilen *Fusarium* suşları, ilk olarak filtre kağıdı ile süzüldü. Süzülen kısım 24 saat kurumaya bırakıldı. Ardından kültürlerde üreme miktarı hücre biyokütlesindeki kuru ağırlık cinsinden hesaplandı. Bu işlem filtrasyon yöntemi ile gerçekleştirildi [46].

### **3.2.5. Pigment Üretiminin Ölçülmesi**

Üç temel besiyerinde (PDB, SDB, MB) üretilen *Fusarium* kültürleri filtrasyon sonrası 4000 rpm'de 10 dakika santrifügasyona tabi tutuldu. Santrifügasyon sonrası supernatan kısımları alınarak pigment ölçümleri gerçekleştirildi [46].

Pigment miktarı F.Stanly Pradeep ve B.V Pradeep [46] tarafından önerilen spektrofotometrik yöntem ile değerler 500 nm'ye ayarlanmış olan spektrofotometrede (Shimatzu-UV 1700) köre karşı okundu. Pigment üretimi OD (absorbans) değeri olarak hesaplandı.

### **3.3. Pigment Üretimi İçin Uygun Mikroorganizmanın ve Besiyerinin Seçimi**

Çalışmada kullanılan funguslar, pigment üretimlerinin değerlendirilmesi amacıyla MB, PDB, SDB besiyerlerine ekildi. Bu fungusların, 30°C'de, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde 7 günde üretimleri gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi sonunda üreme miktarı filtrasyon yöntemi ile kuru ağırlık olarak belirlenirken, suşların pigment üretimleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Oluşan renkler ve sonuçların karşılaştırılması ile pigment üretiminde en uygun suş ve besiyeri belirlendi.

### **3.4. *Fusarium graminearum* ile Pigment Üretimini Etkileyen Uygun Fizyolojik Koşulların Araştırılması**

#### **3.4.1. Karanlık ve Aydınlik İnkübasyon Koşullarının *Fusarium graminearum* ile Pigment Üretimine Etkisinin Belirlenmesi**

Karanlık ve aydınlık inkübasyon koşullarının pigment üretimine etkisinin saptanması için, malt ekstrakt sıvı besiyerine *Fusarium graminearum* iki paralel grup şeklinde ekildi. Birinci grup örneklerin karanlıkta inkübasyonu için; erlenmayerleri karbon kağıdı ile sarılarak hazırlandı. Ardından aydınlıkta inkübe edilecek örnekler ile birlikte 150 rpm hızındaki çalkalamalı inkübatörde, 30 °C 'de 7 gün inkübe edildiler. İnkübasyon süresi sonunda karanlık ve aydınlık inkübasyon ortamlarında pigment ve üreme miktarı ölçüldü.

#### **3.4.2. Statik ve Çalkalamalı İnkübasyon Koşullarının *Fusarium graminearum* ile Pigment Üretimine Etkisinin Belirlenmesi**

Statik ve çalkalamalı inkübasyon koşullarının pigment üretimine etkisinin saptanması için, malt ekstrakt sıvı besiyerine *Fusarium graminearum* iki paralel grup şeklinde ekildi. Birinci grup örnekler; 30 °C ve 150 rpm hızındaki çalkalamalı inkübatörde, diğer grup örnekler ise 30 °C'de statik koşullarda 7 günde üretildiler. İnkübasyon süresi sonunda statik ve çalkalamalı inkübasyon şartlarının üreme miktarları filtrasyon yöntemi ile, pigment miktarları ise spektrofotometrik olarak ölçüldü.

#### **3.4.3. *Fusarium graminearum* ile Pigment Üretiminde Uygun Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi**

Pigment üretiminde uygun kültürasyon sıcaklığını bulmak için malt ekstrakt sıvı besiyerine *Fusarium graminearum* ekildi. Üretimler 25, 30, 37 °C'de, 150 rpm hızındaki çalkalamalı inkübatörde, 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi sonunda üreme miktarı filtrasyon yöntemi ile belirlenirken, pigment ölçümleri spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi.

#### **3.4.4. İnkübasyon Süresinin *Fusarium graminearum* ile Pigment Üretimine Etkisinin Belirlenmesi**

Çalışmada malt ekstrakt sıvı besiyerine *Fusarium graminearum* suşları bölüm 3.2.3'te belirtildiği şekilde ekildi. 30°C'de, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde, 2,

3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 günlük sürelerde üremeye bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda üreme miktarı filtrasyon yöntemi ile belirlenirken, pigment ölçümleri spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi.

#### **3.4.5. *Fusarium graminearum* ile Pigment Üretiminde Uygun Başlangıç pH Değerinin Belirlenmesi**

Pigment üretiminde uygun pH değerinin belirlenmesi için, pH 5 ile 10 arasında farklı pH değerlerinde hazırlanan malt ekstrakt sıvı besiyerine *Fusarium graminearum* bölüm 3.2.3 anlatıldığı şekilde ekildi. İnkübasyon 30°C’de, 150 rpm çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde, 7 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi sonunda üreme miktarı filtrasyon yöntemi ile belirlenirken, pigment ölçümleri spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi.

### **3.5. Artıkların Değerlendirmesi ile Pigment Üretimi**

#### **3.5.1. Peyniraltı suyundan *Fusarium graminearum* ile Pigment Üretiminin Araştırılması**

Çalışmamızda; süt ve süt ürünleri endüstrisinin bir artığı olan peyniraltı suyundan çeşitli besiyerleri hazırlandı. Peyniraltı suyu kullanılarak pigment eldesi için 250 ml hacimli erlenmayerlerde 100 ml olacak şekilde 4 farklı üretim ortamı hazırlandı. Beyaz peynir ve kaşar peyniraltı suyu için; deproteinize peyniraltı suyu, deproteinize 10<sup>-2</sup> seyreltilen peyniraltı suyu, direk peyniraltı suyu, 10<sup>-2</sup> seyreltilen peyniraltı suyu şeklinde farklı ortamlar hazırlandı [47].

Peyniraltı suyunun deproteinize olması için 10 dakika kaynatıldı. 4000 rpm’de santrifügasyon sonrasında filtre kağıdından süzülme [47]. Ardından sıvı besiyerinde (MB) ürettiğimiz *F. graminearum* suşundan 5 ml ekim yapıldı. 30 °C’de, 150 rpm çalkalamalı inkübatörde 7 günde üretildi. İnkübasyon süresi bittikten sonra oluşan renkler gözlemlendi.

#### **3.5.2. Melasdan *Fusarium graminearum* ile Pigment Üretiminin Araştırılması**

Şeker fabrikalarından açığa çıkan melastan besiyeri hazırlandı. Melas, kullanılarak pigment eldesi için 250 ml hacimli erlenmayerlerde 100 ml olacak şekilde %2’lik melas içeren üretim ortamı hazırlandı [48]. 110°C’de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Ardından sıvı besiyerinde (MB) ürettiğimiz *F. graminearum* suşundan 5 ml ekim yapıldı. 30 °C’de, 150 rpm çalkalamalı inkübatörde 7 günde üretildi. İnkübasyon süresi bittikten sonra oluşan renkler gözlemlendi.

### 3.6. *Fusarium graminearum*'dan Üretilen Pigmentin Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi

Pigmentin antimikrobiyal etkisinin ölçülmesi için öncelikle, üretilen pigmentin kültür ortamından ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Pigment ekstraksiyonu için P. Velmurugan ve arkadaşları tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek uygulandı [49]. *F. graminearum* kültürünün filtrasyonu sonrası 4000 rpm'de 10 dakika santrifügasyona tabi tutuldu. Santrifügasyon sonrası supernatan kısımları pigment özütünü eldesi için kullanıldı. Reaksiyon tüplerine 10 ml supernatan ve 20 ml %90'lık etanol ilave edildi. Daha sonra bu reaksiyon tüpleri, 200 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde 1 saat tutuldu. Ardından 15 dakika bekletilip filtre edildi ve 25 °C 'de 48 saat boyunca kurumaya bırakıldı. Kuruyan pigment, 1 ml steril distile suda çözdürüldü [49].

*Fusarium graminearum*'un pigment özütünün çeşitli mikroorganizmalara (*Bacillus cereus*, *Salmonella paratyphi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) karşı antimikrobiyal etkisini belirlemek için agar difüzyon yöntemi uygulandı. Bu yöntemde; *Bacillus cereus*, *Salmonella paratyphi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* suşları ilk olarak Beyin-Kalp İnfüzyon (BHI) agarda 24 saatlik inkübasyona tabi tutuldu. Ardından Beyin- Kalp infüzyon sıvı besiyerine ekilip tekrar 24 saat inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyondan sonra ekimin stardardizasyonu için tüpler 0,5 McFarland'e ayarlandı. Her tüp için ayrı ayrı 100 µl alınıp, Mueller- Hinton agara ekildi ve tüm yüzeye yayıldı. Agarın kuruması için yaklaşık 15 dakika beklenildi. Kuruyan petrilere 1 cm çaplı çukurlar açılıp, bu çukurlara 20 µl pigment yerleştirildi. 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Her bir örnek için negatif kontrol olarak distile su ve pozitif kontrol olarak antibiyotik diskleri kullanıldı. İnkübasyondan sonra koyu bir zemin üzerinde disklerin etrafında oluşan zonlar belirlendi [50].

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Mikroorganizmalar, uzun süredir endüstriyel önemi olan çeşitli maddelerin üretimi için kullanılmaktadır. Fungusların peptitler, enzimler, organik asitler ve pigmentler gibi primer ve sekonder metabolitleri ürettikleri bilinmektedir [51,52]. Bu metabolitler, ilaç, kozmetik ve gıda gibi alanlarda biyoteknolojik uygulamalar için potansiyel oluşturmaları ile çeşitli araştırmacılar tarafından büyük ilgi görmektedir. Funguslar tarafından üretilen metabolitler arasında yer alan pigmentler, renklendirici özellikleri ve biyolojik aktiviteye sahip olduklarından dolayı önemlidir [53].

Günümüzde sentetik renklendiriciler, sağlık ve çevre açısından dezavantajları nedeni ile tüketiciler tarafından tercih edilmemektedir [39, 54]. Doğal renklendiricilerin ise, toksik ve kanserojen olmamaları, doğada biyolojik olarak parçalanabilir olmaları nedeni ile güvenilir oldukları bilinmektedir [55]. Dünyadaki mevcut eğilim, çevre dostu ve biyolojik olarak parçalanabilir ürünlerin kullanımına doğru kayarken, doğal renklendiricilere olan talepte her geçen gün artmaktadır.

Doğal pigmentler, hayvan, bitki ve mikroorganizmalardan elde edilir. Mikrobiyal pigmentlerin, iklim koşullarından bağımsız olarak ve düşük maliyetli üretilmelerini avantajlarıdır [7]. Doğal renklendiriciler olarak mikrobiyal pigmentlerinin üretimi ve uygulanması araştırılmaktadır [8, 16]. Bakteri pigmenti üretiminin çoğu halâ Ar-Ge aşamasındadır. Mikrobiyal pigment üretiminin geliştirilmesi için uygun suş, uygun üretim ortamı ve koşullarının araştırmalarına ihtiyaç vardır.

### 4.1. Pigment Üretimi İçin Uygun Mikroorganizmanın Seçimi

Renkler pazarlanabilir ürünler olan gıda, tekstil ve farmasötik ilaçlar gibi sektörler için cazip bir görünüm sağlar. Gıda maddeleri, boya maddeleri, kozmetik ve farmasötik üretim proseslerinde yaygın olarak kullanılan çeşitli sentetik boyalar çeşitli tehlikeli etkiler içerebilir [56]. Doğal renklendiricilerin kullanımı günümüzde git gide artış göstermektedir [6]. Mikrobiyal kaynaklardan üretilen pigmentler iyi bir alternatiftir. Funguslar, karotenoidler, melaninler, flavinler, fenazinler ve kuinonlar gibi ikincil metabolitler olarak çeşitli pigmentleri üretirler [57].

Çalışmamızda *Fusarium* türleri ile pigment üretimi araştırıldı. *Fusarium* türlerinin, enzim ve biyoyakıt üretiminde, aynı zamanda biyokatalizörler olarak görev aldığı endüstriyel uygulamalarda da *Fusarium* türlerinden elde edilen pigmentlerin umut verici olduğu

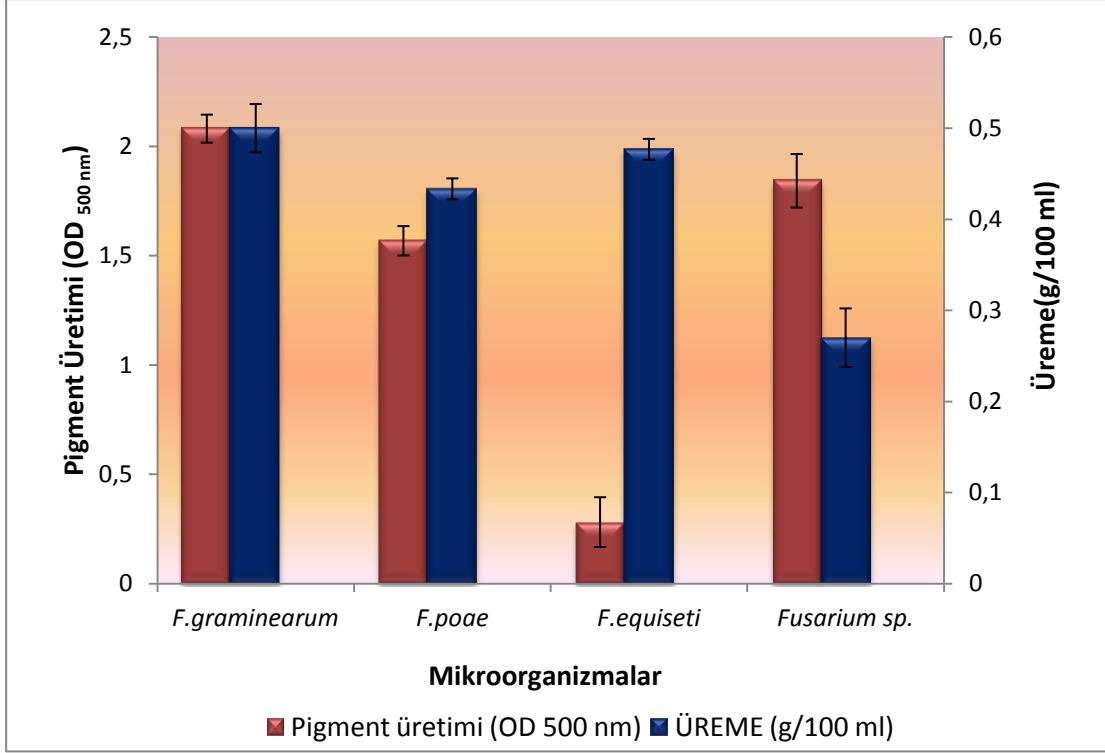
kabul edilmektedir. Buna ek olarak, bu suşların sekonder metabolitleri tıbbi alanlarda kullanım açısından önemlidir. [36]. Mikrobiyal pigment üretiminde uygun suş seçimi önemli kriterlerden birini oluşturmaktadır.

Çalışmamızda *Fusarium graminearum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium sp.* ve *Fusarium poae* suşlarının pigment üretimi açısından değerlendirilmesi amacıyla üç temel besiyerinde (MB, PDB, SDB), 30 °C'de, 150 rpm hızındaki çalkalamalı inkübatörde, 7 günde üretimleri gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası tüm suşların renkleri, pigment üretimleri ve üreme miktarları saptandı.

İlk olarak MB besiyerinde sonuçlar incelendiğinde *Fusarium graminearum*, *Fusarium poae*, *Fusarium sp.*, suşlarında kırmızımsı renk oluşumu ve yüksek üreme görülürken, *Fusarium equiseti* üreme miktarı yüksek olmasına rağmen düşük pigment üretimi gösterdiği ve diğer türlerden farklı olarak sarı renk verdiği saptandı.



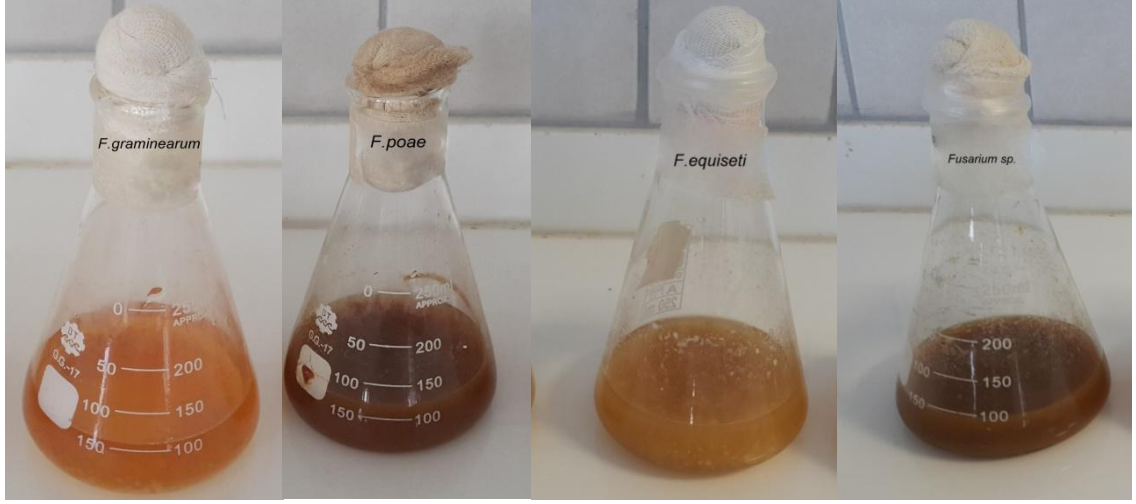
**Şekil 4.1.** *Fusarium* Türlerinin Malt Ekstrakt Sıvı Besiyerinde Oluşturdukları Pigmentler



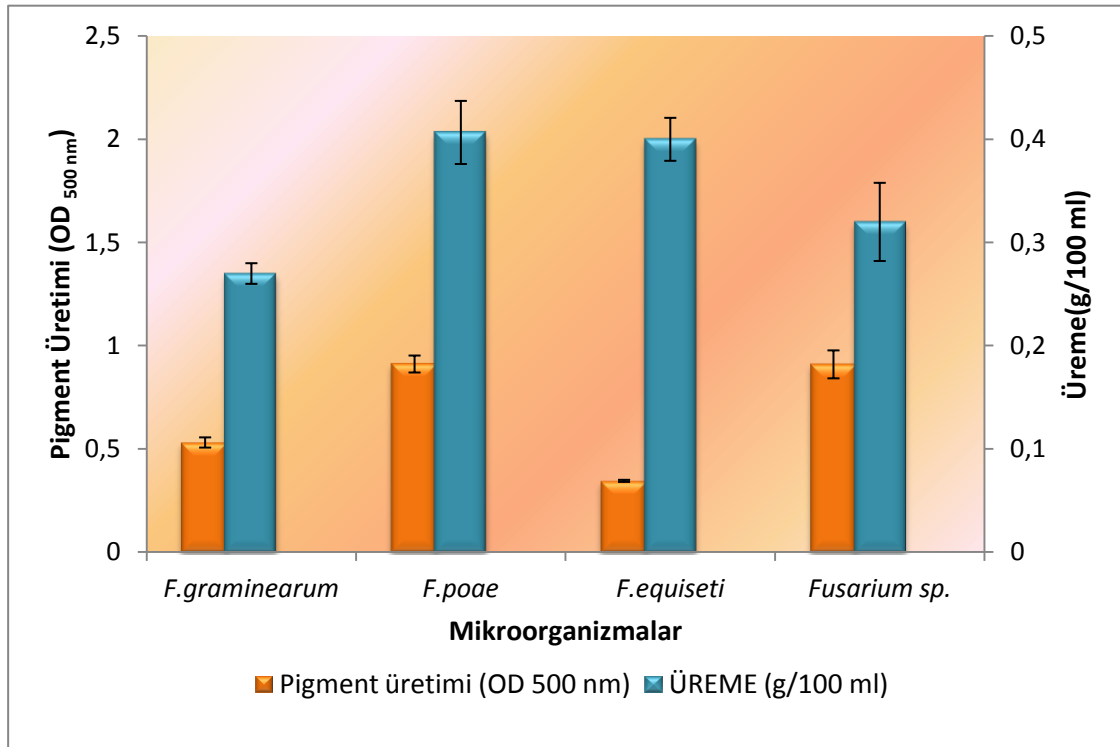
**Şekil 4.2.** *Fusarium* Türlerinin Malt Ekstrakt Sıvı Besiyerinde Pigment Üretimi ve Üreme Miktarı

\*Suşların üretimi malt ekstrakt sıvı besiyerinde, 30<sup>0</sup>C'de, 150 rpm hızındaki çalkalamalı inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalaması olarak verildi. Standart sapmaları grafik üzerinde gösterilmektedir.

İkinci olarak patates dekstroz sıvı besiyerinde *Fusarium* türlerinin pigment üretimi incelendiğinde malt ekstrakt sıvı besiyerinden farklı olarak *Fusarium graminearum* ve *Fusarium equiseti* suşlarının sarı renk, *Fusarium poae* ve *Fusarium sp.* suşlarının ise kırmızımsı renk oluşturdukları gözlemlendi. Bu besiyerinde *Fusarium sp.* ve *Fusarium poae* suşlarının pigment üretimi yüksek bulundu. Ancak malt ekstrakt sıvı besiyerinde *F. graminearum* ile elde edilen pigment oranına bu besiyerinde ulaşamadı.



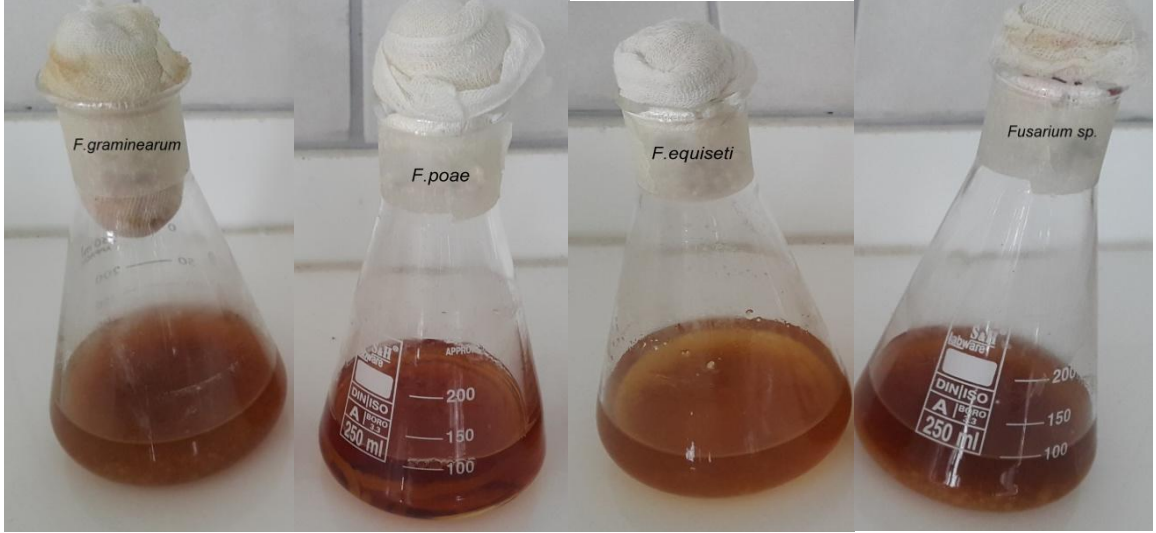
**Şekil 4.3.** *Fusarium* Türlerinin Patates Dekstroz Sıvı Besiyerinde Oluşturdukları Pigmentler



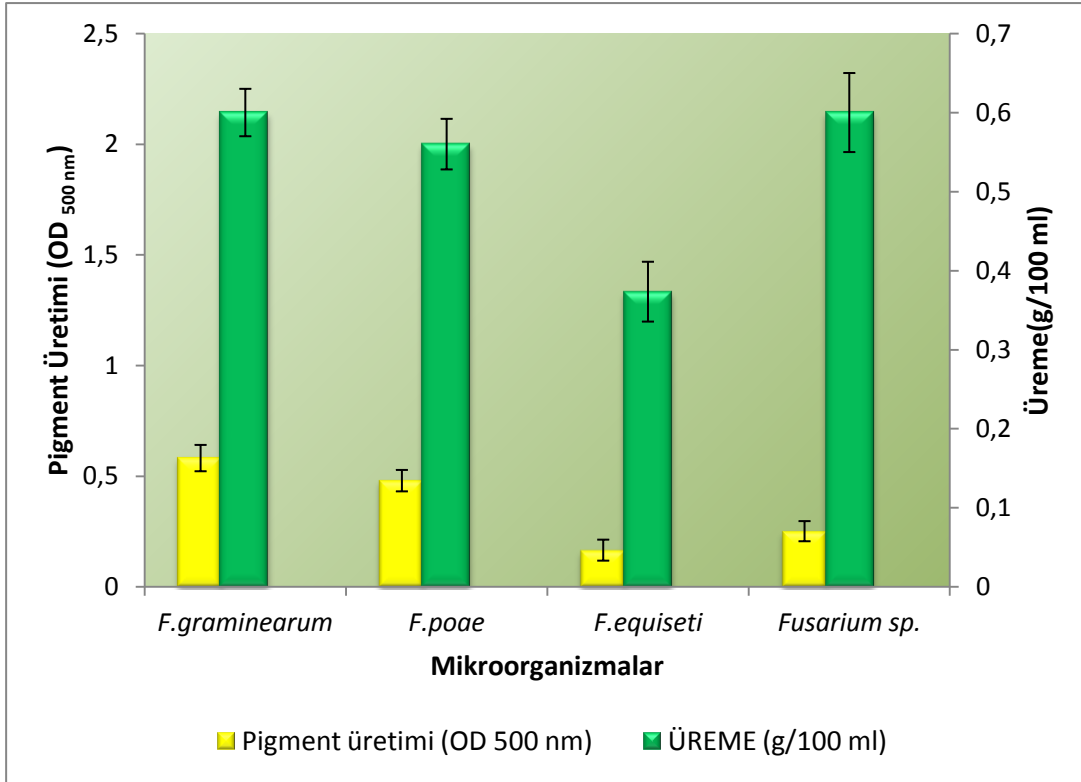
**Şekil 4.4.** *Fusarium* Türlerinin Patates Dekstroz Sıvı Besiyerinde Pigment Üretimi ve Üreme Miktarı

\*Suşların üretimi patates dextrose sıvı besiyerinde, 30<sup>0</sup>C'de, 150 rpm hızındaki çalkalamalı inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalaması olarak verildi. Standart sapmaları grafik üzerinde gösterilmektedir.





**Şekil 4.5.** *Fusarium* Türlerinin Sabouraud Dekstroz Sıvı Besiyerinde Besiyerinde Oluşturdukları Pigmentler



**Şekil 4.6.** *Fusarium* Türlerinin Sabouraud Dekstroz Sıvı Besiyerinde Pigment Üretimi ve Üreme Miktarı

\*Suşların üretimi sabouraud dekstroz sıvı besiyerinde, 30<sup>0</sup>C'de, 150 rpm hızındaki çalkalamalı inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalaması olarak verildi. Standart sapmaları grafik üzerinde gösterilmektedir.

Son olarak sabouraud dekstroz sıvı besiyerinde *Fusarium* türlerinin pigment üretimi incelendiğinde patates dekstroz ve malt ekstrakt sıvı besiyerlerinden farklı olarak dört türün benzer renk oluşturdukları gözlemlendi. *F. graminearum* ve *F. poae* suşlarının bu besiyerinde pigment üretimleri ve üreme miktarlarının en yüksek olduğu görüldü. Ancak diğer iki besiyerinde elde edilen üremeden daha fazla üreme miktarı görülmesine rağmen diğer besiyerlerindeki pigment miktara ulaşamadı.

Çalışmada *Fusarium equiseti* hariç araştırılan tüm *Fusarium* türlerinin pigment üretiminde başarılı oldukları, en uygun pigment üretimi yapan türün ise *Fusarium graminearum* olduğu belirlendi. En yüksek pigment üretim aktivitesi gösteren *Fusarium graminearum* ilerideki çalışmalar için kaynak olarak seçildi. Üretimin gerçekleştirildiği besiyerleri karşılaştırıldığında ise en yüksek pigment üretimine malt ekstrakt sıvı besiyerlerinde ulaşıldığı saptandı (Şekil 4.2, Şekil 4.4, Şekil 4.6).

*Fusarium sp.* ve *Fusarium poae* suşları da pigment üretimi açısından dikkat çekti. Pigment üretimi için söz konusu suşların ileriki çalışmalar için iyi alternatifler olabilecekleri sonuca varıldı.

Literatürde *Fusarium* türleri ile yapılan çalışmalar incelendiğinde, *Fusarium decemcellulare*, *F. bulbigenum* [41], *Fusarium fujikuroi* [58], *Fusarium verticillioides* [59], *Fusarium sp.* [26], *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* ile pigment üretim çalışmaları dikkat çekmektedir.

#### **4.2. *Fusarium graminearum* ile Pigment Üretimini Etkileyen Uygun Fizyolojik Koşulların Araştırılması**

Funguslar tarafından doğal pigment üretiminde artış, pigment üretim ortamının fizyolojik özelliklerine bağlı olarak gerçekleşebilmektedir [3]. Bu bağlamda sıcaklık, pH, ortam koşulları, besiyeri gibi parametreler pigment üretimini etkileyen başlıca etmenler olarak karşımıza çıkmaktadır [60].

*Fusarium graminearum*'un pigment üretimi için uygun fizyolojik koşulların belirlenmesi amacıyla pigment üretiminde, karanlık-aydınlık inkübasyon ve statik-çalkalı inkübasyon koşullarının etkisi, uygun sıcaklık değerinin, inkübasyon süresinin, uygun başlangıç pH değerinin belirlenmesi gibi parametreler araştırılarak sonuçlar değerlendirildi.

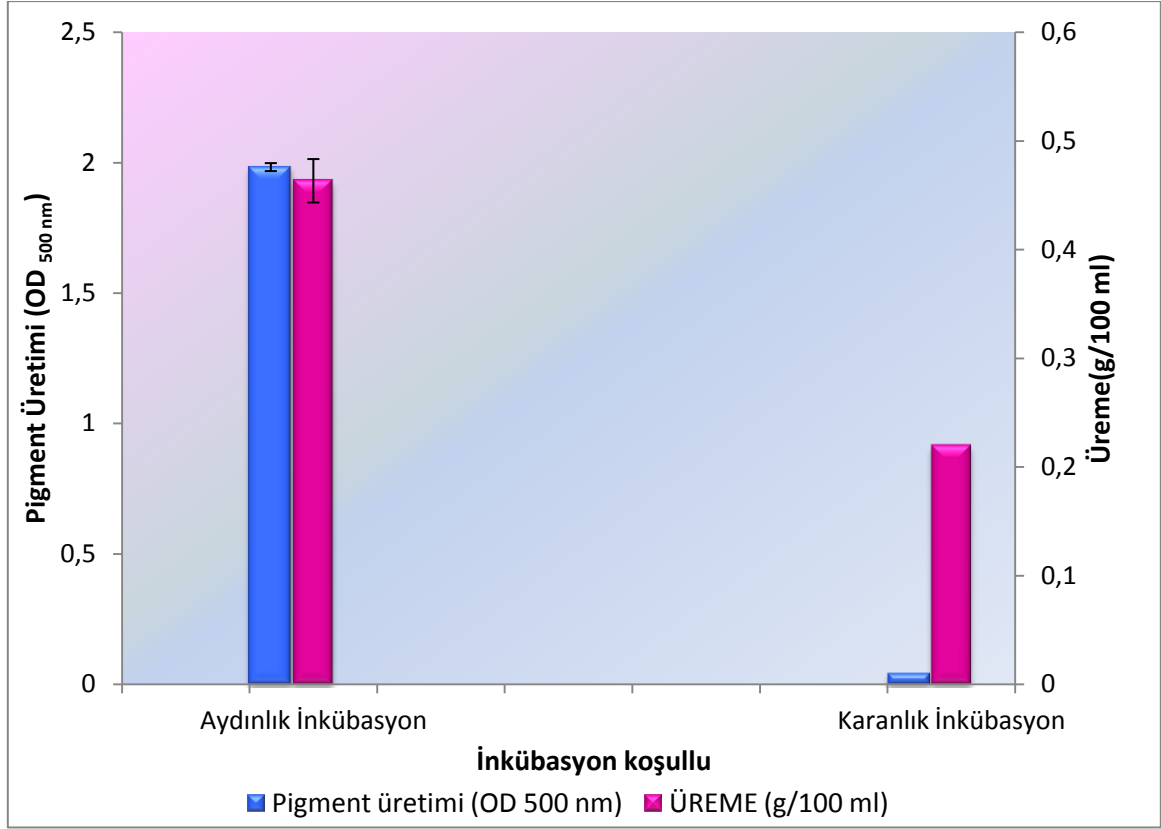
#### 4.2.1. Karanlık ve Aydınlik İnkübasyon Koşullarının *Fusarium graminearum* ile Pigment Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan malt ekstrakt sıvı besiyerlerine ekilen *F. graminearum* suşları 30 °C'de, 150 rpm hızındaki çalkalamalı inkübatörde 7 günde, diğer paralel grup ise aynı koşullarda ancak karanlıkta üretimleri gerçekleştirildi. Karanlık ve aydınlık koşullarda öncelikle oluşan renkler incelendiğinde, sadece aydınlık koşullarda kırmızımsı pigment üretimi gözlemlendi. Karanlık inkübasyon koşulunda başlangıçta hazırlanan besiyerinden farklı bir renk oluşumu gözlemlenmedi (Şekil 4.7). Aydınlik inkübasyon koşulunda üreme miktarı ve pigment üretiminin karanlık inkübasyon koşuluna göre çok daha yüksek miktarda olduğu belirlendi (Şekil 4.8). Bunun nedeni *Fusarium graminearum*'un yapısında bulunan  $\Delta$  Fgwc-1 ve  $\Delta$ Fgwc-2 genlerinin karanlıkta inhibe olmasıyla birlikte pigment üretiminin durmasıdır [61]. Aydınlik koşullarda yüksek üreme miktarı nedeni ile pigment üretiminin fazla olmaktadır.

Literatürde, *F. graminearum*'un karanlık ve aydınlık koşullarda gerçekleştirmiş olduğu pigment miktarına bakıldığında karanlık koşulda pigment üretiminin çok düşük konsantrasyonda [61] olduğu gözlemlendi. Çalışmamızda da ulaşılan benzer sonuçlar, ileri çalışmalarda pigment üretimi için aydınlık koşullarda inkübasyon sürecinin kullanılabilirliğine işaret etmektedir.



Şekil 4.7. *Fusarium graminearum*'un Aydınlik ve Karanlık İnkübasyon Koşullarında Oluşturdukları Pigmentler



**Şekil 4.8.** *Fusarium graminearum*'un Aydınlik ve Karanlık İnküstasyon Koşullarında Pigment Üretimleri ve Üreme Miktarları

\*Suşların üretimi malt ekstrakt sıvı besiyerinde, 30 °C'de, 150 rpm hızındaki çalkalamalı inkübatörde karanlık ve aydınlık koşullarda 7 günde gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalaması olarak verildi. Standart sapmaları grafik üzerinde gösterilmektedir.

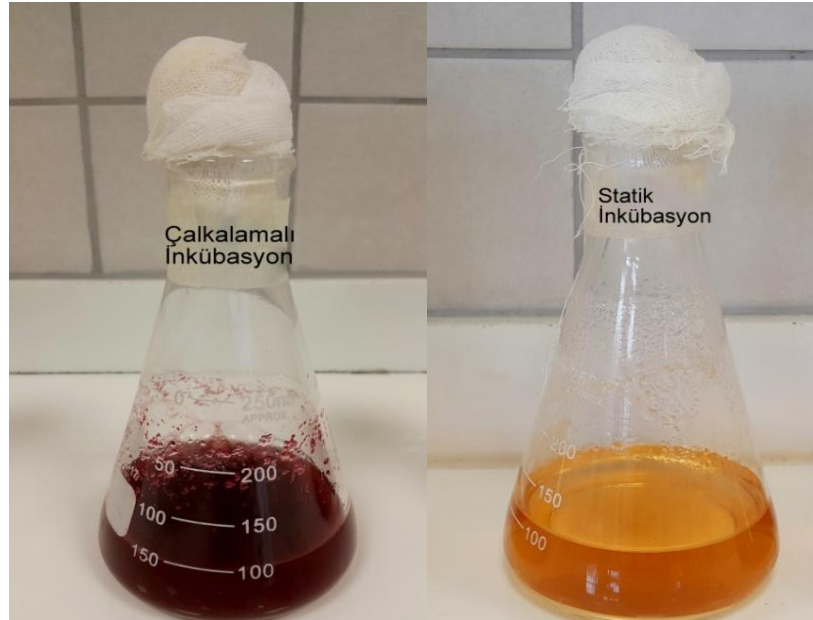
#### 4.2.2. Statik ve Çalkalamalı İnküstasyon Koşullarının *Fusarium graminearum* ile Pigment Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

Çalışmamızda çalkalamalı ve statik inküstasyon koşullarının pigment üretimine etkisinin belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.4.2'de anlatıldığı gibi birinci grup örnekler; 150 rpm hızındaki çalkalamalı inkübatörde, diğer grup örnekler ise statik koşullarda 30 °C'de, 7 günde üretildiler. Her iki koşulda üretilen *F. graminearum* suşlarının üretim sonrası kültür ortamındaki renkleri, pigment üretimleri ve üreme miktarları belirlendi. Bu bağlamda öncelikle *F. graminearum*'un statik ve çalkalamalı inküstasyon koşullarında oluşturdukları pigmentler ve üreme incelendiğinde, sadece çalkalamalı inküstasyon koşullunda kırmızımsı pigment üretimi ve üreme gözlemlendi (Şekil 4.9). *F. graminearum*

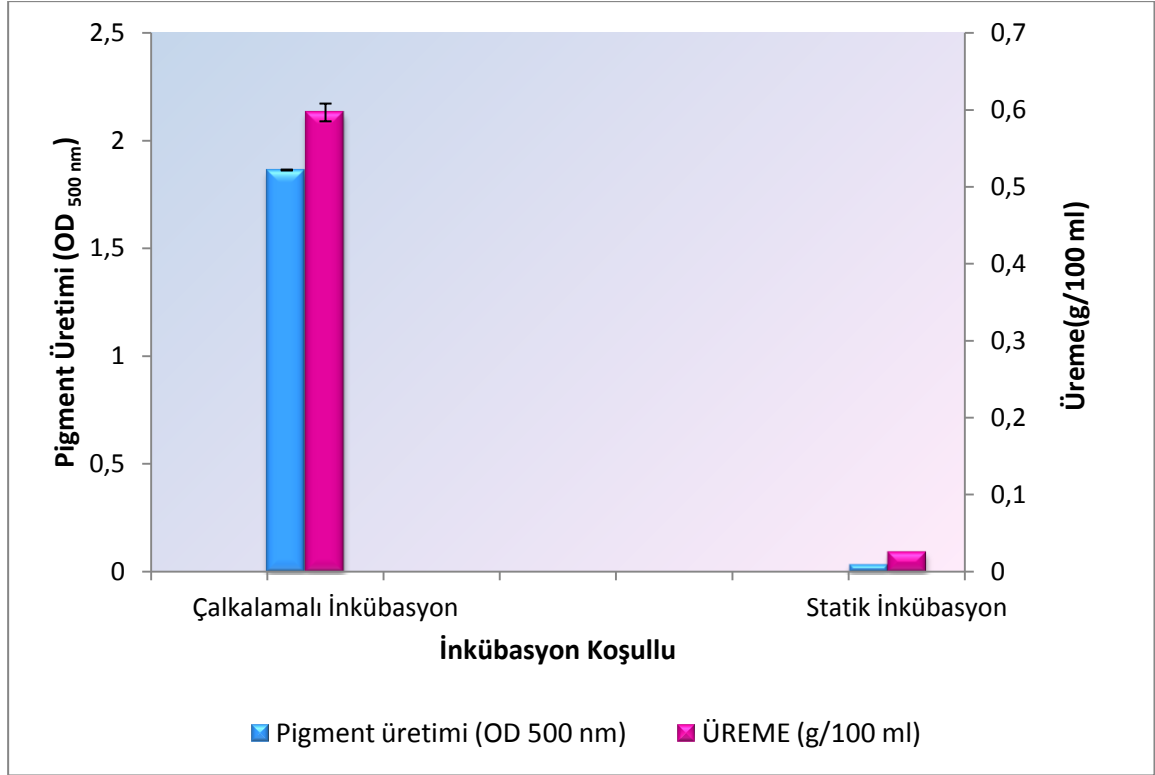
suşunun çalkalamalı inkübasyon koşullarında pigment üretiminin 1,864 OD, üreme miktarı 0,59 g/100 ml olduğu belirlendi (Şekil 4.10).

Çalışmamızda da statik koşullarda kayda değer üreme gözlenmediği için pigment üretimine de rastlanmamıştır. Bu bağlamda ileri çalışmalarda pigment üretimi için çalkalamalı inkübasyon koşullunda üreme tercih edilmiştir.

Literatürde, çalışmamıza benzer olarak çoğunlukla yapılan çalışmalarda pigment üretiminde çalkalamalı inkübatör kullanıldığı, *F. graminearum* için çalkalamalı hızlarının 100 rpm [60], 125 rpm [39], 160 rpm [62], 200 rpm [41] olduğu belirtilmiştir.



**Şekil 4.9.** *Fusarium graminearum*'un Statik ve Çalkalamalı İnkübasyon Koşullarında Oluşturdukları Pigmentler



**Şekil 4.10.** *Fusarium graminearum* 'un Statik ve Çalkalamalı İnkübasyon Koşullarında Oluşturdukları Pigmentler

\*Suşların üretimi malt ekstrakt sıvı besiyerinde, 30 °C'de, (sol) 150 rpm hızındaki çalkalamalı inkübatörde ve statik inkübatörde 7 günde gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalaması olarak verildi. Standart sapmaları grafik üzerinde gösterilmektedir.

#### 4.2.3. *Fusarium graminearum* ile Pigment Üretiminde Uygun Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

Mikroorganizmaların biyoteknolojik proseslerde kullanılmasında sıcaklık parametresi geniş aralığa sahiptir [36]. Pigment üretiminde de çalışılan her mikroorganizma için uygun üretim sıcaklığının belirlenmesi gerekir.

Çalışmamızda pigment üretimi için uygun inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi amacıyla malt ekstrakt sıvı besiyerlerinde 25, 30, 37 °C sıcaklıklarda üretilen *F. graminearum* suşlarının, inkübasyon sonrası renkleri, pigment üretimleri ve üreme miktarları belirlendi. İlk olarak farklı sıcaklıklarda oluşturdukları renkler ve üremeleri incelendiğinde, 25 ve 30 °C sıcaklıklarda üretilen suşlarda kırmızımsı pigment üretimi ve üreme gözlemlendi (Şekil 4.11). *F. graminearum* için 30 °C sıcaklık değerinin pigment üretimi ve üreme için

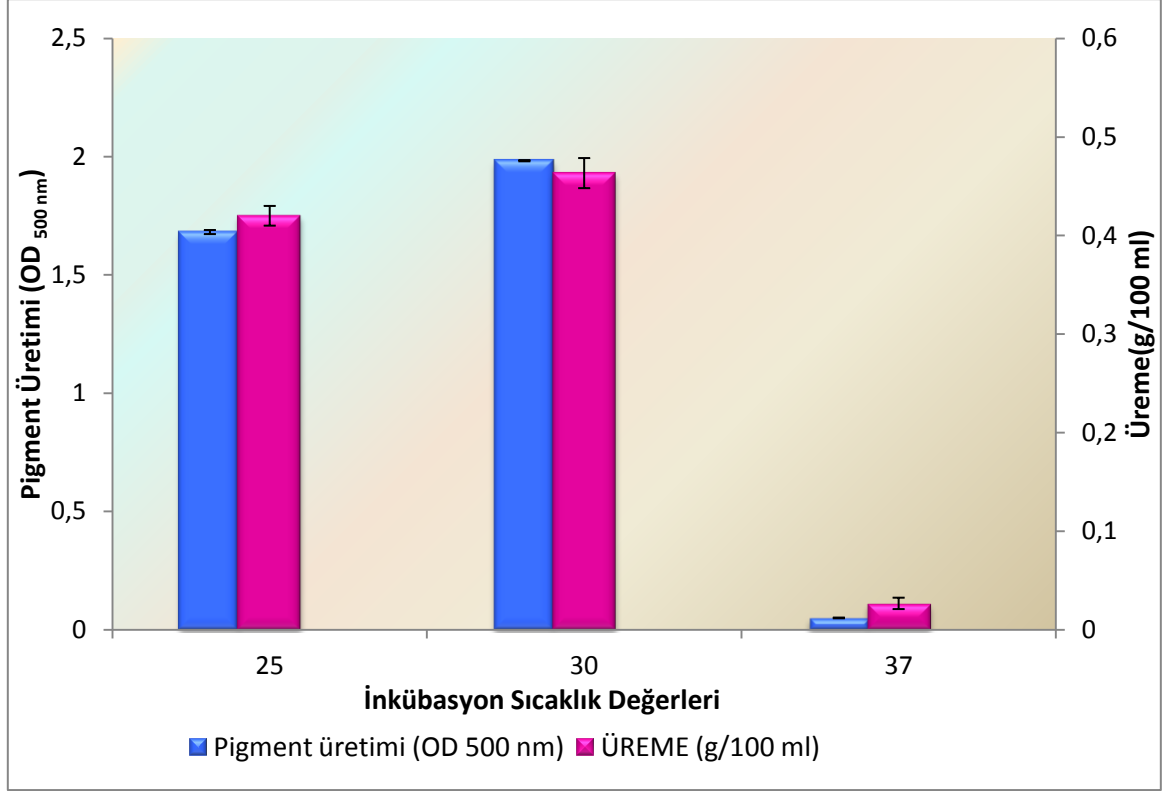
araştırılan sıcaklık değerleri arasında en uygunu olduğu belirlendi. 37 °C’de ise sıcaklık artması ile birlikte pigment üretimi ve üreme miktarının kayda değer olmadığı saptandı (Şekil 4.12).

Çalışmamızda kullanılan *F. graminearum* suşlarının belirlenen en uygun sıcaklık değeri dışında üremenin azaldığı ve buna paralel olarak oluşan pigment miktarının azaldığı belirlendi (Şekil 4.12). Literatürde, pigment üretiminin 20-28 °C’lerde gerçekleştirildiği [60] başka bir çalışmada ise 30 °C sıcaklıkta pigment üretiminin en yüksek değere ulaştığı belirtilmektedir [39]. Bu sonuçlar da çalışmamıza benzerlik göstermektedir. Bu bağlamda, *F. graminearum* suşları ile malt ekstrakt sıvı besiyerlerinde ileri pigment üretim çalışmaları için 30 °C sıcaklık değeri tercih edildi.



**Şekil 4.11.** *Fusarium graminearum*'un 25, 30, 37 °C Sıcaklıklarındaki İnkübasyon Koşullarında Oluşturdukları Pigmentler





**Şekil 4.12.** *Fusarium graminearum*'un 25, 30, 37 °C Sıcaklıklarındaki İnkübasyon Koşullarında Pigment Üretimleri ve Üreme Miktarları

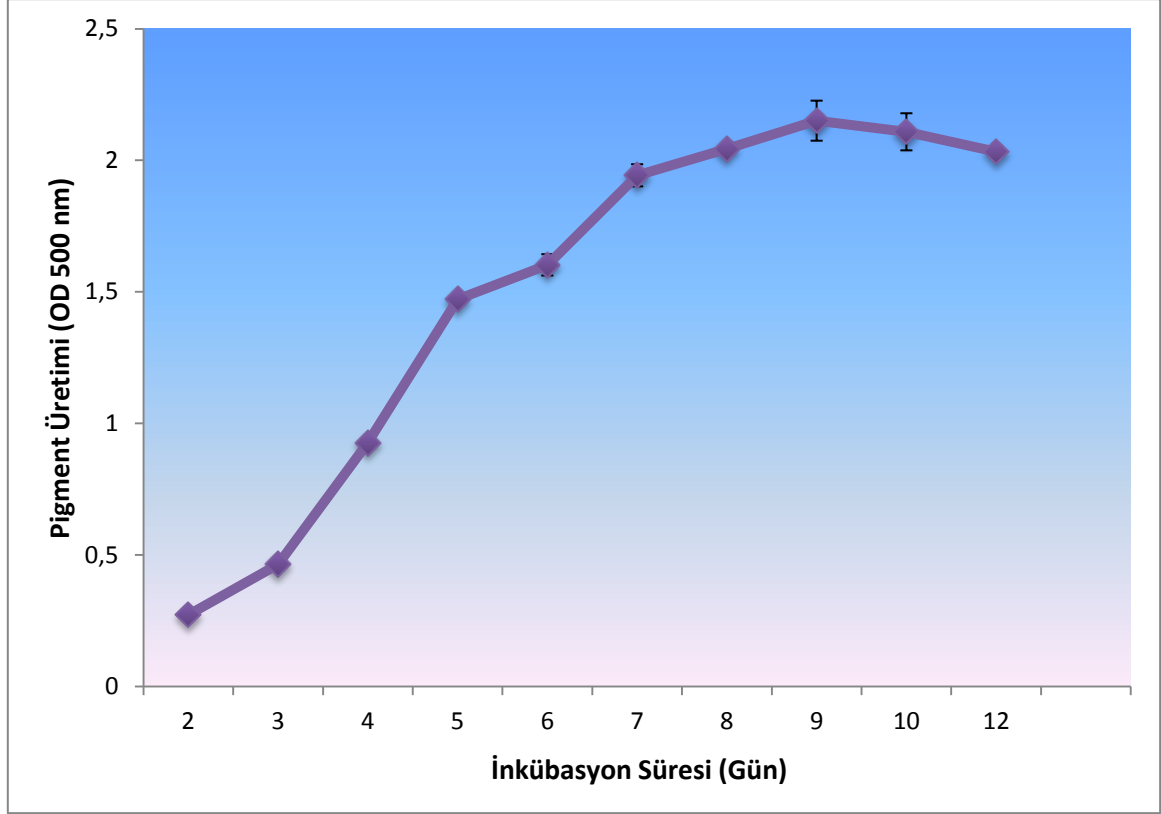
\*Suşların üretimi malt ekstrakt sıvı besiyerinde, 150 rpm hızına ayarlanmış olan 7 günde gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalaması olarak verildi. Standart sapmaları grafik üzerinde gösterilmektedir.

#### 4.2.4. İnkübasyon Süresinin *Fusarium graminearum* ile Pigment Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan malt ekstrakt sıvı besiyerine ekilen *F. graminearum* suşu 30 °C'de 150 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde üretildi. 24 saatte bir üretim ortamlarından örnek alınarak söz konusu suşun pigment üretimi saptandı. Pigment üretiminin 9. güne kadar artarak devam ettiği gözlemlendi (Şekil 4.13). *F. graminearum* suşu ile pigment üretimi için 9 günlük inkübasyonun uygun olduğu sonucuna varıldı.

Literatürde, *F. graminearum* suşununun 7. günün sonunda pigment üretimini gerçekleştirdiği [39,61] diğer bir çalışmada ise 10 günlük bir inkübasyon sürecinde pigment elde edildiği gözlemlendi.





**Şekil 4.13.** *Fusarium graminearum*'un Farklı İnkübasyon Sürelerinde Pigment Üretimleri

\*Suşların üretimi malt ekstrakt sıvı besiyerinde, 30 °C'de 150 rpm hızına ayarlanmış olan 12 günde gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalaması olarak verildi. Standart sapmaları grafik üzerinde gösterilmektedir.

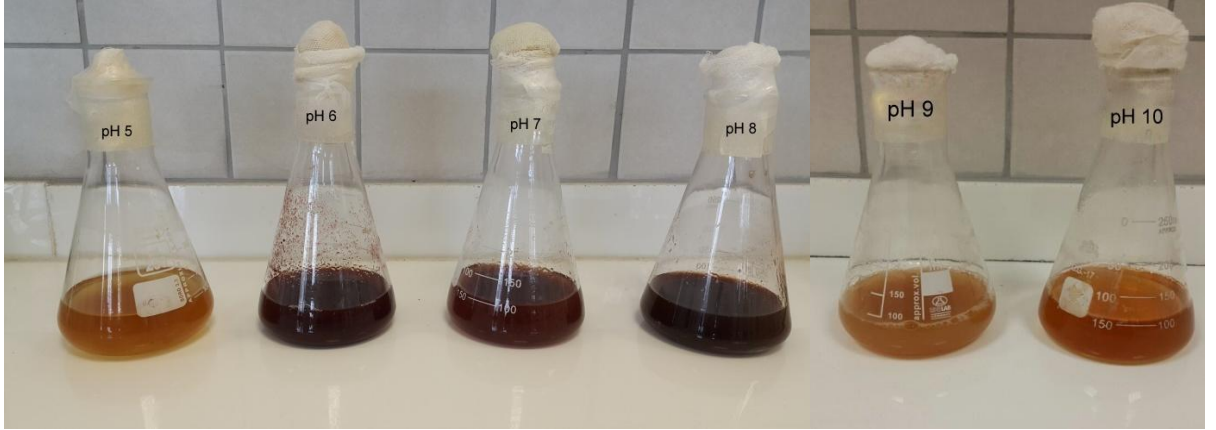
#### 4.2.5. *Fusarium graminearum* ile Pigment Üretiminde Uygun Başlangıç pH Değerinin Belirlenmesi

Pigment üretimi için uygun başlangıç pH değerini belirlemek amacıyla *F. graminearum* suşları 5.0 ile 10.0 arasında değişen pH'larda hazırlanan malt ekstrakt sıvı besiyerlerinde üretildi. İnkübasyon sonunda üretim ortamlarında oluşan renkler, pigment üretimleri ve üreme miktarları belirlendi. İlk olarak farklı başlangıç pH değerlerine ayarlanmış üretim ortamlarında *F. graminearum* suşlarının oluşturdukları renkler incelendiğinde, pH 6 ile 8 aralığında üretilen suşlarda kırmızımsı pigment üretimi gözlemlendi (Şekil 4.14). *F. graminearum* suşlarının üretim ortamlarının başlangıç pH değeri pH5'den pH 8'e kadar yükseldiğinde pigment üretimlerinin artış gösterdiği belirlendi. Bu suşun pigment üretiminde etkili olan enzimlerin pH 6- 8 aralığında aktif oldukları sonucuna varılabilir.

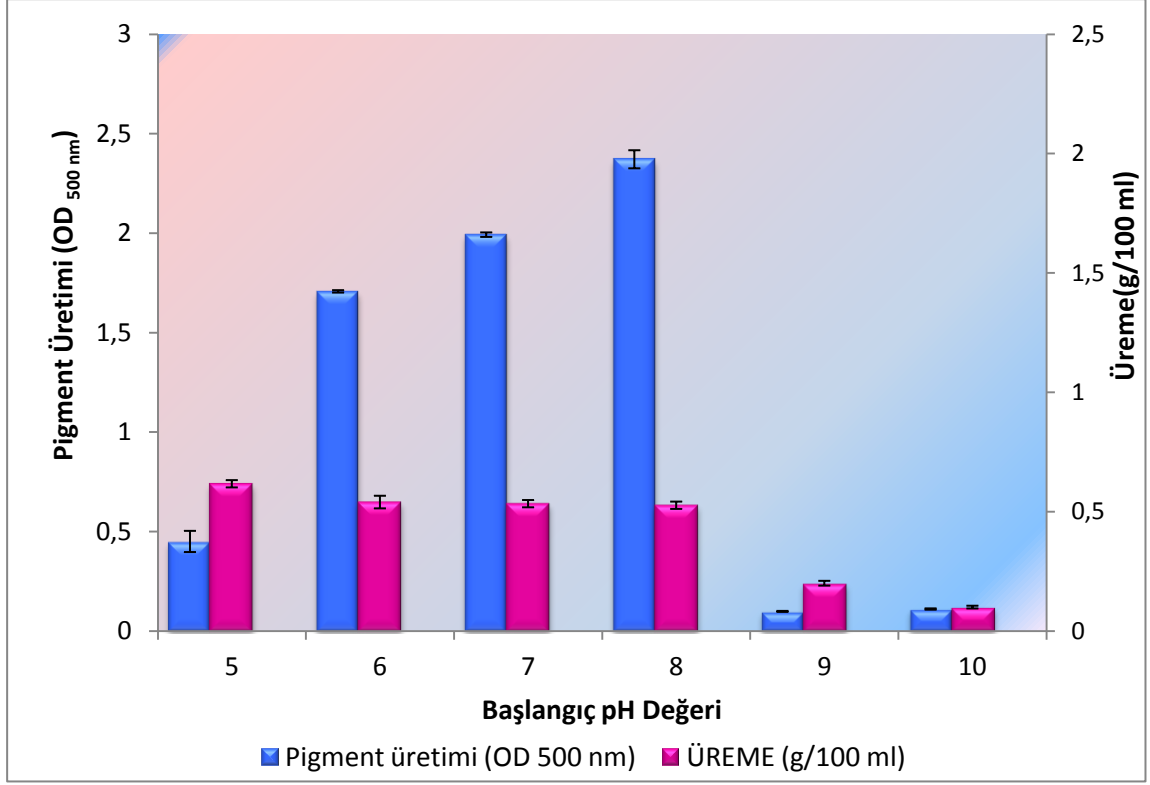
Başlangıç pH değeri 9 ve 10 olan üretim ortamlarında ise düşen üreme miktarına bağlı olarak kayda değer pigment üretiminin olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.15).

Sonuç olarak, *F. graminearum* suşları ile pigment üretimi için pH 8 en uygun başlangıç pH değeridir. Endüstriyel alanda pigment üretimi için kullanılması düşünülen fungusun geniş pH aralığına sahip olması, pigment üretimi için avantajdır. Bu bağlamda, bu suşun başlangıç değeri pH 6 ile pH 8 arasında pigment üretmesi ise dikkat çekmektedir.

Literatürde, çalışmamıza benzer olarak pigment üretimi için optimize koşulların araştırıldığı çalışmalarda, *F. graminearum* suşunun aurofusarin pigmenti için yüksek pH'ların (6-8) etkili olduğu belirtilmektedir [63]. Çalışmamıza paralel olan bir başka çalışmada ise pH 8'de aurofusarin pigmentinin üretiminin görüldüğü belirtilmektedir [41].



**Şekil 4.14.** *Fusarium graminearum* 'un Farklı Başlangıç pH Değerlerine Ayarlanmış Üretim Ortamlarında Oluşturdukları Pigmentler



**Şekil 4.15.** *Fusarium graminearum*'un Farklı Başlangıç pH Değerlerine Ayarlanmış Üretim Ortamlarında Pigment Üretimleri ve Üreme Miktarları

\*Suşların üretimi malt ekstrakt sıvı besiyerinde, 30 °C 'de 150 rpm hızına ayarlanmış olan 7 günde gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalaması olarak verilmiştir. Standart sapmaları grafik üzerinde gösterilmektedir.

Pigment üretimi için en uygun besiyeri olarak malt ekstrakt sıvı besiyeri seçildi. Bu besiyerinde en yüksek pigment üretimi elde edilen *Fusarium graminearum* çalışmanın devamında kullanılmak üzere seçildi. *F. graminearum*'dan en yüksek pigment üretimi için kültürel parametreler incelendiğinde, aydınlık inkübasyon koşullu, 150 rpm çalkalamalı hızında inkübasyon, 30 °C sıcaklık, 9 gün inkübasyon süresi ve başlangıç pH değeri 8 olan ortamın uygun olduğu saptandı.

### 4.3. Artıkların Değerlendirilmesi

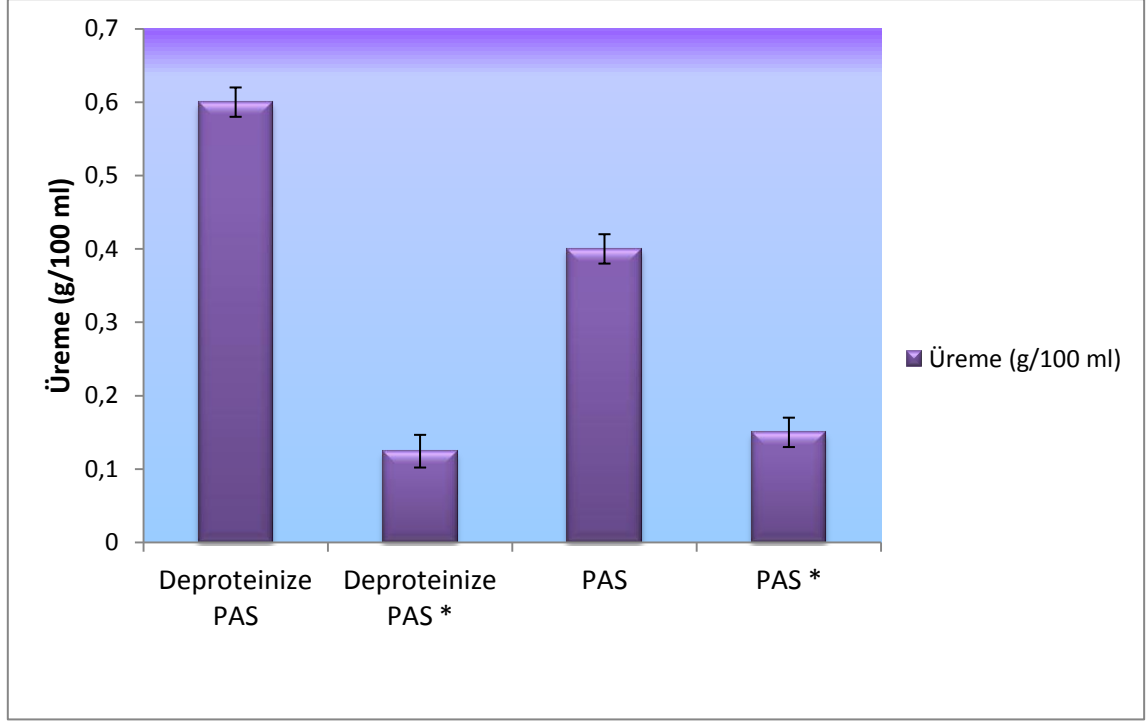
Günümüzde mikrobiyal pigment üretim çalışmaları, özellikle maliyeti düşürebilen ve endüstriyel üretim için uygulanabilirliğini artıran, ucuz hammadde ve uygun üreme ortamı bulma konusunda güçlendirilmelidir [16]. Bu bağlamda çalışmamızda, pigment üretim maliyetini azaltmak için daha ekonomik üretim ortamlarının araştırılması hedeflendi.

### 4.3.1. Peyniraltı suyundan *Fusarium graminearum* ile Pigment Üretiminin Araştırılması

Çalışmamızda, süt ve süt ürünleri endüstrisinin bir artığı olan peyniraltı suyu ile çeşitli besiyerleri hazırlandı. Beyaz peynir ve kaşarın peyniraltı suları kullanılarak pigment eldesi için Bölüm 3.5.1’ de belirtildiği gibi farklı üretim ortamları hazırlandı. *F. graminearum*’dan pigment üretimi için deproteinize ve seyreltilmiş olarak hazırlanan çeşitli peyniraltı suyu üretim ortamlarında inkübasyon sonrası oluşan renkler incelendi. Peyniraltı suyu üretim ortamlarının hepsinde renk oluşumu görüldü. Ancak peyniraltı suyunun deproteinize ve seyreltilmesinin renk artışına neden olduğu gözlemlendi (Şekil 4.16). Bu ortamlarda üreme miktarları incelendiğinde ise, deproteinize ve direk peyniraltı suyunun seyreltilmesi üreme miktarında azalmaya neden olmaktadır (Şekil 4.17).



Şekil 4.16. Peyniraltı suyundan *Fusarium graminearum* ile Pigment Eldesi



**Şekil 4.17.** Peyniraltı suyunda *Fusarium graminearum*'un Üreme Miktarı

\*  $10^{-2}$  sulandırma oranı

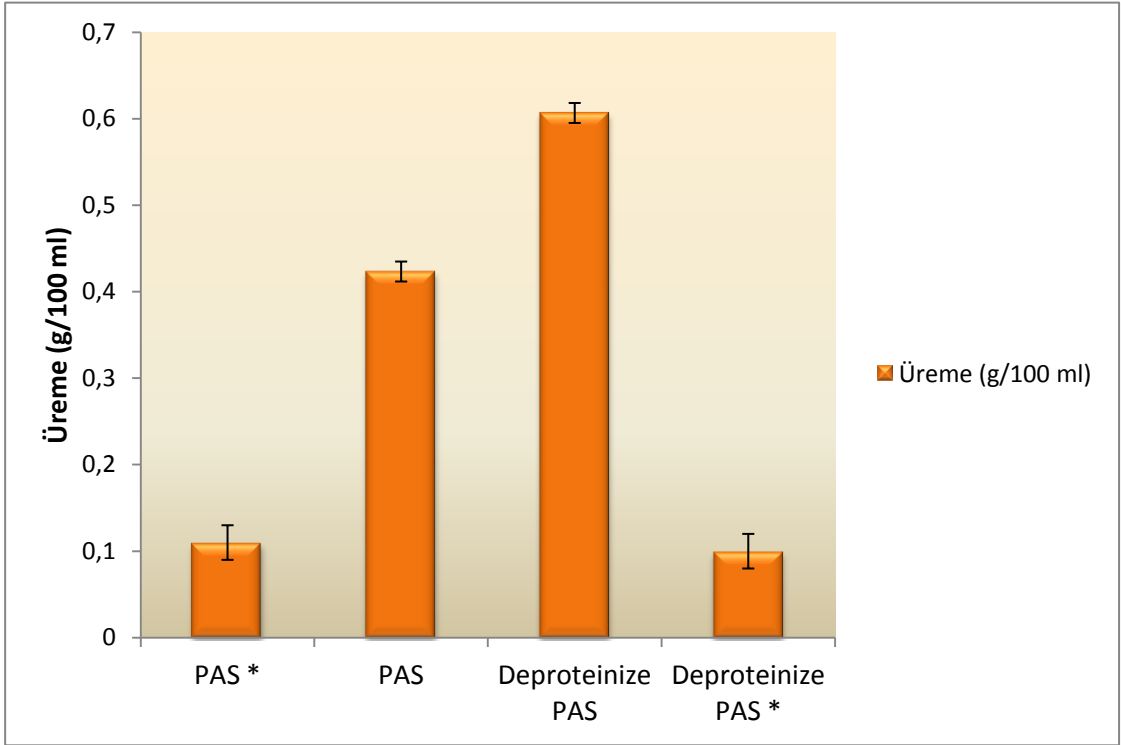
*Suşların üretimi peyniraltı suyundan hazırlanan besiyerinde, 30 °C 'de 150 rpm hıza ayarlanmış olan 7 günde gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalaması olarak verildi. Standart sapmaları grafik üzerinde gösterilmektedir.*

Kaşar peyniraltı suyu üretim ortamlarında sonuçlar incelendiğinde, beyaz peynir peyniraltı suyu üretim ortamlarından farklı olarak sadece deproteinize ve seyreltilmiş olan peyniraltı suyunda kırmızı-pembe renk gözlemlendi (Şekil 4.18). Kaşar peynir altı suyunda bulunan protein pigment üretimini engellemektedir. Bu ortam seyreltildiğinde az da olsa pembe pigment oluşumu başlamaktadır. Protein varlığı mikroorganizmayı başka bir metabolit üretimine yönlendiriyor olabilir.

Kaşar peyniraltı suyu üretim ortamlarında üreme miktarları incelendiğinde, beyaz peynir peyniraltı suyu üretim ortamları üreme miktarı sonuçlarına benzer olarak, deproteinize ve direk peyniraltı suyunun seyreltilmesi üreme miktarında azalmaya neden olmaktadır (Şekil 4.19). Peyniraltı suyunun seyreltilmesi sonucunda üreme ortamlarında daha az besin maddesini bulunması ile üreme de azalmıştır.



**Şekil 4.18.** Kaşar Peyniraltı suyundan *Fusarium graminearum* ile Pigment Eldesi



**Şekil 4.19.** Kaşar Peyniraltı suyunda *Fusarium graminearum*'un Üreme Miktarı

\*  $10^{-2}$  sulandırma oranı

Suşların üretimi kaşar peyniraltı suyundan hazırlanan besiyerinde, 30 °C 'de 150 rpm hızına ayarlanmış olan 7 günde gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalaması olarak verildi. Standart sapmaları grafik üzerinde gösterilmektedir.

#### 4.3.2. Melasdan *Fusarium graminearum* ile Pigment Üretimini Araştırılması

Çalışmamızda, şeker endüstrisinin bir artığı olan melas ile %2'lik melas içeren besiyeri hazırlandı. Malt ekstrakt sıvı besiyerinde ürettiğimiz *F. graminearum* türünden 5 ml ekim sonrası inkübe edildi. Melas üretim ortamlarında inkübasyon sonrası oluşan renkler incelendi. Üç paralel melas üretim ortamlarında kırmızı-pembe renk oluşumu gözlemlendi (Şekil 4.20).



**Şekil 4.20.** *Fusarium graminearum* Melas İçeren Üretim Ortamında Pigment Eldesi

\*Suşların üretimi %2'lik melas içeren besiyerinde, 30 °C 'de 150 rpm hızına ayarlanmış olan 7 günde gerçekleştirildi.

*F.graminearum*'dan pigment elde edilen bu %2 melas içerikli besiyerinde, inkübasyon sonrası üremenin  $0,31 \pm 0,01$  g/100 ml olduğu belirlendi. Mikroorganizmalardan yararlanılarak endüstriyel artıkların değerlendirilmesi ile ucuz hammadde kaynağı sağlayarak ekonomik kazanım sağlanmaktadır [48]. Bu bağlamda, ön çalışmasını gerçekleştirdiğimiz peynir, kaşar peyniraltı suları ve melas *F. graminearum*'dan pigment üretimi için alternatif üretim ortamı olarak ileri araştırmalarda kullanılabilir.

#### 4.4. *Fusarium graminearum*'dan Üretilen Pigmentin Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi

Pigmentlerin, sayısız biyoteknolojik uygulamalar için onları önemli bileşikler haline getiren antibakteriyel, antifungal ve herbisidal aktiviteler gibi önemli biyolojik özellikleri vardır [64],[65],[66]. Mikrobiyal pigment üretimi renklendirici özelliğinden farklı olarak



bu biyolojik özellikleri ile de çeşitli endüstriyel uygulamaları için potansiyel göstermekte olan araştırma alanlarından biridir [56]. Bu bağlamda çalışmamızın son kısmında ürettiğimiz pigmentin antimikrobiyal özellikleri araştırıldı.

Çalışmamızda, üretilen pigmentin antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.6' da anlatıldığı gibi öncelikle kültür ortamından pigmentin ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Ardından pigmentin çeşitli bakteri suşlarına antimikrobiyal etkisi agar difüzyon yöntemi ile saptandı. *Fusarium graminearum* tarafından üretilen pigmentin 20 µl konsantrasyonu, *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal etki gösterdiği ancak *Salmonella paratyphi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı aynı etkiyi göstermediği görüldü (Şekil 4.21). Pigmentin *B. cereus* ve *S. aureus*'a antimikrobiyal etkisi görülmesine rağmen, kullanılan antibiyotikle karşılaştırıldığında oluşan zon çapı daha küçüktür. Ancak antimikrobiyal etki için pigmentin miktarı araştırılarak en uygun konsantrasyon ileri çalışmalarla saptanabilir.

Literatürde, *G. zae* (*F. graminearum*) tarafından üretilen pigmentin 16 mg ml<sup>-1</sup> konsantrasyonunun *S. typhi* ve *S. aureus*'un üremesini inhibe ettiği ancak *B. subtilis*, *Shigella sp.*, *E. coli*, *C. albicans*, *C. acutatum*, *C. fragariae* veya *C. gloeosporioides* üremesini engellemediği belirtilmektedir [60]. Pigmentin *S. aureus* suşlarına olan etkisinin çalışmamız sonuçlarına paralellik gösterdiği görülmektedir.



**Şekil 4.21.** *Fusarium graminearum*'dan Üretilen Pigmentin Çeşitli Suşlara Karşı Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi



## 5. YORUM

Son yıllarda tüketicilerin sağlık ve çevresel kaygılarının artması nedeniyle endüstride doğal pigmentlerin sentetik pigmentlere alternatif olarak kullanılması önerilmiştir [13]. Günümüzde, bitkilerden elde edilen doğal pigmentlerin bazı grupları, tıbbi özellikleri nedeniyle araştırılmaktadır. Ancak, bu bitki kaynaklı doğal pigmentlerin üretimi ve etkili uygulanması, pahalı ekstraksiyon prosedürleri ve çevresel faktörler (mevsimsellik, nem ve sıcaklık gibi) ile sınırlıdır. Ayrıca küçük pigment miktarları elde etmek için çok miktarda bitki gerekli olması da diğer bir sınırlayıcı faktördür. Bu pigmentlerin kullanımını sınırlayan diğer özellikler; ışığa, ısıya ve oksijene duyarlılık gibi kimyasal özellikleri içerir [13]. Bu problemlerin üstesinden gelmek için alternatif doğal pigment üretimi için biyoteknolojik süreçler ile mikroorganizmaların (bakteri, mantar, maya) kullanılmasıdır [19]. Mikroorganizmalar tarafından üretilen doğal pigmentlerin çeşitliliği geniş renk yelpazesine sahip gruplar oluşturur. Bu bağlamda mikrobiyal pigmentlerin birçok endüstride kullanımını önem kazanmaktadır [10].

Çalışmamızda, farklı *Fusarium* türleri (*Fusarium graminearum*, *Fusarium poae*, *Fusarium sp.*, *Fusarium equiseti*) pigment üretimi açısından değerlendirildiğinde, en verimli pigment üretimi yapan türün *Fusarium graminearum* olduğu bulundu. *Fusarium poae* ve *Fusarium sp.*'ninde pigment üretiminde potent suşlar olduğu saptandı. *F. graminearum*'dan pigment üretimini artırmak için bazı fizyolojik koşullar araştırıldı. 30 °C'de, 150 rpm çalkalama hızı inkübasyon koşullunda, başlangıç pH değeri 8 olarak belirlendiğinde 9 gün sonunda *F. graminearum*'dan en yüksek pigment üretimi elde edildi. *F. graminearum* geniş pH aralığında pigment üretimi göstermesi avantajlıdır. Bu bağlamda, endüstriyel süreçlerde pH değişimi pigment üretimini sınırlayıcı bir faktör oluşturmaz ve farklı pH değeri olan alternatif üretim ortamlarına kolay adaptasyon sağlamasına neden olur.

Pigment üretiminin ticarileştirilmesi ekonomik parametrelere bağlıdır. Bu bağlamda pigment üretimi için alternatif üretim ortamları ile daha düşük maliyetli üretim hedeflenmelidir. Çalışmamızda bu hedef doğrultusunda, *F. graminearum*'dan pigment üretimi için beyaz ve kaşar peynir peyniraltı suları ve melasın alternatif üretim ortamları olabileceği belirlendi. Endüstriyel artıkların değerlendirilmesi, ekonomiye kazandırılması ve geri dönüşüm açısından avantaj sağlamaktadır.

Biyopigmentler, sadece renklendirici özellikleri ile değil sahip oldukları biyolojik özellikler ile pek çok endüstriyel ve tıbbi alanlarda yer alabilir. *F. graminearum* 'dan elde edilen pigmentin *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus* karşı antibakteriyel özellik göstermesi ileri araştırmalara ışık tutacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] K. Malik, J. Tokkas, and S. Goyal, Microbial Pigments: A review, *International Journal of Microbial Resource Technology*, vol. 41, no. 4, pp. 361–365, **2012**.
- [2] F. Delgado-Vargas, A. R. Jiménez, O. Paredes-López, and F. J. Francis, Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains-characteristics, biosynthesis, processing, and stability, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3):173–289, **2000**.
- [3] A. Kumar, H. S. Vishwakarma, J. Singh, and M. Kumar, Microbial Pigments : Production and Their Applications in Various Industries, *International journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences*, vol. 5, no. 1, pp. 203–212, **2015**.
- [4] D. Sarvamangala and S. S. V. Aparna, Microbial Pigments-A Short Review, *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, vol. 10, no. 8, pp. 01–07, **2016**.
- [5] P. Velmurugan, S. Kamala-Kannan, V. Balachandar, P. Lakshmanaperumalsamy, J. C. Chae, and B. T. O, Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather, *Carbohydrate Polymers*, vol. 79, no. 2, pp. 262–268, **2010**.
- [6] M. Shahid, Shahid-Ul-Islam, and F. Mohammad, Recent advancements in natural dye applications: A review, *Journal of Cleaner Production*, vol. 53, pp. 310–331, **2013**.
- [7] P. Erdal and G.Ökmen, Microbial Pigments Used in Foods, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* vol. 6, no. 2, pp. 56–68, **2013**.
- [8] S. Babitha, V. Joshi, A. Bala, and B. Shashi, Microbial pigments, *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*, vol. 2, no. July, pp. 147–162, **2009**.
- [9] R. Siva, Status of natural dyes and dye-yielding plants in India, *International Journal of Current Science*, vol. 92, no. 7, pp. 916–925, **2007**.
- [10] C. K. Venil, Z. A. Zakaria, and W. A. Ahmad, Bacterial pigments and their applications, *Process Biochemistry*, vol. 48, no. 7, pp. 1065–1079, **2013**.

- [11] V. Paredes-López, *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*, CRC Press Boca, **2002**.
- [12] T. Bechtold, R. Mussak, *Handbook of Natural Colorants*. Wiley & Sons, **2009**.
- [13] S. Mapari, K. F. Nielsen, T. O. Larsen, J. C. Frisvad, A. S. Meyer, and U. Thrane, Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants, *Current Opinion in Biotechnology* vol. 16, no. 2, pp. 231–238, **2005**.
- [14] Tarangini Korumilli, *Studies on Pigment Production by Microorganisms Using Raw Materials of Agro-industrial Origin* Department of Chemical Engineering, Department of Chemical Engineering, *National Institute of Technology*, **2014**.
- [15] A. Aberoumand, A Review Article on Edible Pigments Properties and Sources as Natural Biocolorants in Foodstuff and Food Industry, *World Journal of Dairy & Food Sciences.*, vol. 6, no. 1, pp. 71–78, **2011**.
- [16] W. Ahmad, Y. Wan Ahmad, Z. A. Zakaria, and N. Z. Yusof, Application of Bacterial Pigments as Colorant, *Springer Briefs in Molecular Science*, pp. 1–23, **2012**.
- [17] S. Nagpal, Neeraj, Munjal, Neera, Chatterjee, Microbial Pigments with Health Benefits - A Mini Review, *BioScience Trends*, vol. 4, no. 2, pp. 157–160, **2011**.
- [18] L. Dufossé, Microbial production of food grade pigments, *Food Technology and Biotechnology* vol. 44, no. 3, pp. 313–321, **2006**.
- [19] L. Dufossé *et al.*, Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: A scientific oddity or an industrial reality?, *Trends in Food Science Technology.*, vol. 16, no. 9, pp. 389–406, **2005**.
- [20] N. Khaldi *et al.*, SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters, *Fungal Genetics and Biology*, vol. 47, no. 9, pp. 736–741, **2010**.
- [21] M. M. Atalla, E. A. M. El-khrisy, Y. A. Youssef, and A. A. Mohamed, Production of textile reddish brown dyes by fungi, *Malaysian Journal of Microbiology*, vol. 7, no. 1, pp. 33–40, **2011**.
- [22] S. Mapari, U. Thrane, and A. S. Meyer, Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants?, *Trends in Biotechnology*, vol. 28, no. 6, pp. 300–

307, **2010**.

- [23] D. Sharma, C. Gupta, S. Aggarwal, and N. Nagpal, Pigment extraction from fungus for textile dyeing, *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, vol. 37, no. 1, pp. 68–73, **2012**.
- [24] D. Asker and Y. Ohta, “29. Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria,” *Journal Bioscience Bioengineering*, vol. 88, no. 6, pp. 617–621, **1999**.
- [25] K. P. Stahmann, J. L. Revuelta, and H. Seulberger, Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 53, no. 5, pp. 509–516, **2000**.
- [26] J. Avalos and M. Carmen Limón, Biological roles of fungal carotenoids, *Current Genetics*, vol. 61, no. 3, pp. 309–324, **2014**.
- [27] M. Rodríguez-Sáiz, J. L. De La Fuente, and J. L. Barredo, *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin, *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 88, no. 3, pp. 645–658, **2010**.
- [28] N. Durán, M. F. S. Teixeira, R. De Conti, and E. Esposito, Ecological-Friendly Pigments From Fungi, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 42, no. 1, pp. 53–66, **2002**.
- [29] F. A. Nagia and R. S. R. EL-Mohamedy, Dyeing of wool with natural anthraquinone dyes from *Fusarium oxysporum*, *Dyes and Pigments*, vol. 75, no. 3, pp. 550–555, **2007**.
- [30] A. Seyedin, A. Hatamian-zarmi, and B. Rasekh, Natural Pigment Production by *Monascus purpureus*: Bioreactor Yield Improvement through Statistical Analysis, *Applied Food Biotechnology*, vol. 2, no. 2, pp. 23–29, **2015**.
- [31] W. Schroeder and E. a Johnson, Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*, *Journal of General Microbiology*, vol. 139, no. 1993, pp. 907–912, **1993**.
- [32] Júlio C. De Carvalho , Lígia C. Cardoso , Vanessa Ghiggi , Adenise Lorenci Woiciechowski , Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Microbial Pigments, *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*, 1–504, **2014**.
- [33] John F. Leslie, The *Fusarium* Laboratory Manual, *Blackwell Publishing*, vol. 13,

**2006.**

- [34] M. Manganyi, T. Regnier, and E. I. Olivier, Antimicrobial activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* isolates and their biofilms, *South African Journal of Botany*, vol. 99, pp. 115–121, **2015**.
- [35] A. Pollet, T. Beliën, K. Fierens, J. A. Delcour, and C. M. Courtin, *Fusarium graminearum* xylanases show different functional stabilities, substrate specificities and inhibition sensitivities, *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 44, no. 4, pp. 189–195, **2009**.
- [36] M. G. Pessôa, B. N. Paulino, M. C. R. Mano, I. A. Neri-Numa, G. Molina, and G. M. Pastore, *Fusarium* species—a promising tool box for industrial biotechnology, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2017**.
- [37] D. Nirmaladevi, M. Venkataramana, S. Chandranayaka, A. Ramesha, N. M. Jameel, and C. Srinivas, Neuroprotective Effects of Bikaverin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress Mediated Neuronal Damage in SH-SY5Y Cell Line, *Cellular and Molecular Neurobiology*, vol. 34, no. 7, pp. 973–985, **2014**.
- [38] R. J. N. Frandsen *et al.*, Black perithecial pigmentation in *Fusarium* species is due to the accumulation of 5-deoxybostrycoidin-based melanin, *Scientific Reports*, vol. 6, **2016**.
- [39] F. C. Lopes, D. M. Tichota, J. Q. Pereira, J. Segalin, A. De Oliveira Rios, and A. Brandelli, Pigment production by filamentous fungi on agro-industrial byproducts: An eco-friendly alternative, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 171, no. 3, pp. 616–625, **2013**.
- [40] R. Russell and M. Paterson, Zearalenone production and growth in drinking water inoculated with *Fusarium graminearum*, *Mycological Progress*, vol. 6, no. 2, pp. 109–113, **2007**.
- [41] A. Medentsev, A. Arinbasarova, and V. Akimenko, Biosynthesis of Naphthoquinone Pigments by Fungi of the Genus *Fusarium*, *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 41, no. 5, pp. 573–577, **2005**.
- [42] R. J. N. Frandsen *et al.*, The biosynthetic pathway for aurofusarin in *Fusarium graminearum* reveals a close link between the naphthoquinones and naphthopyrones, *Molecular Microbiology*, vol. 61, no. 4, pp. 1069–1080, **2006**.

- [43] T. G. Pilla, Isolation of Host Specific Endophytic Fungus, *Fusarium Equiseti*, from *Nothopegia Bedomei*, *Wayanadica* Occurring in the Southern Parts of India, *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, vol. 6, no. 9, pp. 9–10, **2015**.
- [44] H.Maci'a-Vicente, J.G.Jansson, S.Abdullah, E. Descals, J. Salinas, and L. V. Lopez-Llorca, Fungal root endophytes from natural vegetation in Mediterranean environments with special reference to *Fusarium spp.*, *FEMS Microbiology Ecology* vol. 64, no. 1, pp. 90–105, **2008**.
- [45] T.C.Milli Eğitim Bakanlığı, Gıda Teknolojisi, Genel Mikrobiyoloji, *Megep*, Ankara, **2006**.
- [46] F. Pradeep and B. V. Pradeep, Optimization of pigment and biomass production from *Fusarium moniliforme* under submerged fermentation conditions, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 5, no. Suppl 3, pp. 526–535, **2013**.
- [47] I. Seyis, *Bazı Fungal Kaynaklardan Laktaz Enzimi Eldesi*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü , Ankara, **2003**
- [48] M. Kahyaoğlu ve M. Kıvanç, Endüstriyel Atık Maddelerden Mikrobiyal Yolla Beta Karoten Üretimi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi*, vol. 17, no. 2, pp. 61–66, **2007**.
- [49] P. Velmurugan, Y. H. Lee, C. K. Venil, P. Lakshmanaperumalsamy, J. C. Chae, Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 109, no. 4, pp. 346–350, **2010**.
- [50] T.C.Milli Eğitim Bakanlığı, Laboratuvar hizmetleri antimikrobiyal madde testleri, Ankara, **2013**.
- [51] R. Radzio and U. Kück, Synthesis of biotechnologically relevant heterologous proteins in filamentous fungi, *Process Biochemistry*, vol. 32, no. 6, pp. 529–539, **1997**.
- [52] H. Hajjaj, P. J. Blanc, G. Goma, and J. Franc, Sampling techniques and comparative extraction procedures for quantitative determination of intra- and extracellular metabolites in filamentous fungi, *FEMS Microbiology Letters*, vol. 164, pp. 1–6, **1998**.

- [53] J. D. R. Celestino, L. E. De Carvalho, M. D. P. Lima, A. M. Lima, M. M. Ogusku, and J. V. B. De Souza, Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production, *Process Biochemistry*, vol. 49, no. 4, pp. 569–575, **2014**.
- [54] S. A. Mapari, A. S. Meyer, and U. Thrane, Evaluation of *Epicoccum nigrum* for growth, morphology and production of natural colorants in liquid media and on a solid rice medium, *Biotechnology Letters*, vol. 30, no. 12, pp. 2183–2190, **2008**.
- [55] D. Cristea and G. Vilarem, Improving light fastness of natural dyes on cotton yarn, *Dyes and Pigments*, vol. 70, no. 3, pp. 238–245, **2006**.
- [56] C. Kulandaisamy Venil and P. Lakshmanaperumalsamy, An Insightful Overview on Microbial Pigment, Prodigiosin, *Electronic Journal of Biology*, vol. 5, no. 3, pp. 49–61, **2009**.
- [57] L. Dufossé, M. Fouillaud, Y. Caro, S. A. S. Mapari, and N. Sutthiwong, Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry, *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 26, pp. 56–61, **2014**.
- [58] P. Wiemann *et al.*, Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: Genes, their function and regulation, *Molecular Microbiology*, vol. 72, no. 4, pp. 931–946, **2009**.
- [59] K. Boonyapranai, R. Tungpradit, S. Lhieochaiphant, and S. Phutrakul, Optimization of submerged culture for the production of naphthoquinones pigment by *Fusarium verticillioides*, *Chiang Mai Journal of Science*, vol. 35, no. 3, pp. 457–466, **2008**.
- [60] R. Villanueva-Arce, C. A. Aguilar-Pompa, Y. D. L. M. Gómez y Gómez, G. Valencia-Del Toro, A. B. Piña-Guzmán, and S. Bautista-Baños, Pathogenic Bacteria And Postharvest Fungi Control With Pigment Extracts From *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*), *Agrociencia*, vol. 47, no. 7, pp. 691–705, **2013**.
- [61] H. Kim, H. Son, and Y. W. Lee, Effects of light on secondary metabolism and fungal development of *Fusarium graminearum*, *Journal of Applied Microbiology*, vol. 116, no. 2, pp. 380–389, **2014**.
- [62] M. Sellamani *et al.*, Antifungal and zearalenone inhibitory activity of *Pediococcus pentosaceus* isolated from dairy products on *Fusarium graminearum*, *Frontiers in Microbiology*, vol. 7 pp. 1–12, **2016**.



- [63] J. Sorensen, K. F. Nielsen, and T. E. Sondergaard, Redirection of pigment biosynthesis to isocoumarins in *Fusarium*, *Fungal Genetics and Biology*, vol. 49, no. 8, pp. 613–618, **2012**.
- [64] N. S. Geweely, Investigation of the Optimum Condition and Antimicrobial Activities of Pigments from Four Potent Pigment-Producing Fungal Species, *Journal of Life Sciences*, 5 vol. 5, pp. 697–711, **2011**.
- [65] M. Premalatha B., Stanly Pradeep F., Pradeep B. V. and Palaniswamy, Production And Characterization Of Naphthoquinone Pigment From *Fusarium moniliforme* MTCC6985, *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 1, no. 4, pp. 1126–1142, **2012**.
- [66] M. Teixeira *et al.*, Amazonian biodiversity: pigments from *Aspergillus* and *Penicillium*-characterizations, antibacterial activities and their toxicities, *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, vol. 6, no. 3, pp. 300–311, **2012**.

# ÖZGEÇMİŞ

## Kimlik Bilgileri

Adı soyadı : Tuğçe DAĞ

Doğum yeri : EDİRNE

Medeni hali : Bekar

E-posta : tugced10@hacettepe.edu.tr

Adresi : Ziraat Mah. Ahter Sok. No:10/14 Altındağ/ANKARA

## Eğitim

Lise: Uzunköprü Hüseyin Çorum Sağlık Meslek Lisesi (Laboratuar Teknisyenliği)

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

## Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce

## İş deneyimi

Encon Laboratuvarı A.Ş. (Biyolog)

## Deneyim Alanları

Mikrobiyoloji, Biyoteknoloji

## Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

## Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

## Tezden üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ (BİYOTEKNOLOJİ) ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 19/06/2017

Tez Başlığı / Konusu: *Fusarium sp.* İle Pigment Üretiminin Araştırılması

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 58 sayfalık kısmına ilişkin, 19/06/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 6 'dır.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Tuğçe DAĞ  
Öğrenci No: N14228270  
Anabilim Dalı: Biyoloji (Biyoteknoloji)  
Programı: Biyoteknoloji  
Statüsü:  Y.Lisans  Doktora  Bütünleşik Dr.

19.06.2017  
Tuğçe Dağ

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR.

Doç. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY

(Unvan, Ad Soyad, İmza)