



***Monascus purpureus* ile PİGMENT
ÜRETİMİNDE TAVUK TÜYÜ PROTEİN
HİDROLİZATININ KULLANIMI**

Tuğba ORAK

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Bilim Dalı
Doç. Dr. Mesut TAŞKIN
2017
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Monascus purpureus ile PİGMENT ÜRETİMİNDE TAVUK TÜYÜ
PROTEİN HİDROLİZATININ KULLANIMI

Tuğba ORAK

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2017

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

***Monascus purpureus* ile PİGMENT ÜRETİMİNDE TAVUK TÜYÜ PROTEİN
HİDROLİZATININ KULLANIMI**

Doç. Dr. Mesut TAŞKIN danışmanlığında, Tuğba ORAK tarafından hazırlanan bu çalışma 13 /07 /2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı – Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak ~~oybirliği/oy~~ **çokluğu** (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Mesut TAŞKIN

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Yağmur ÜNVER

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

İmza:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 03.08.2017 tarih ve 31 / 18 nolu kararı
ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Monascus purpureus* ile PİGMENT ÜRETİMİNDE TAVUK TÜYÜ PROTEİN HİDROLİZATININ KULLANIMI**

Tuğba ORAK

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mesut TAŞKIN

Monascus purpureus gıda endüstrisi için özel önemi olan pigmentlerin üretiminde en yaygın kullanılan mantar türlerinden biridir. Karbon ve azot kaynakları bu fungusda pigment üretimini etkiler ve peptonlar en umut verici azot kaynakları arasında kabul edilir. Mevcut çalışma, atık tavuk tüylerinden pepton (TTP) üretmek ve *M. purpureus*'tan pigment (kırmızı, sarı ve turuncu) üretiminde elde edilen peptonu substrat olarak kullanmak için gerçekleştirilmiştir. Tüylerden pepton üretimi sırasında hidroliz ve nötralizasyon adımları sırasıyla KOH ve H₂SO₄ kullanılarak gerçekleştirildi. Pigment üretimi için optimum TTP ve glukoz konsantrasyonlarının sırasıyla 3 ve 20 gr /lt olduğu bulunmuştur. Her üç pigmentin üretimi içinde pH 5,5'in daha elverişli olduğu tespit edildi. En uygun inkübasyon süresi 7 gün olarak bulundu. Pepton besiyerlerinin hepsinde kırmızı ve turuncu pigmentten daha fazla sarı pigment üretildi. Test peptonları üzerinde sarı pigment için benzer absorbanslar elde edildi, halbuki kırmızı ve turuncu pigmentler için balık pepton (BP) ve TTP, proteaz peptondan (PP) daha yüksek absorbanslar sağladı. TTP, BP ve PP besiyerlerinde şeker tüketimi ve biyomas üretimi için benzer sonuçlar elde edildi. Bu çalışma, *M. purpureus*'tan pigment üretimi için tavuk tüylerinden elde edilen peptonun iyi bir besleyici substrat olduğunu göstermiştir.

2017, 53 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Monascus purpureus*, mikrobiyal pigment, tavuk tüyü pepton,

ABSTRACT

Master Thesis

USE OF CHICKEN FEATHER PROTEIN HYDROLYSATE IN PIGMENT PRODUCTION BY *MONASCUS PURPUREUS*

Tuğba ORAK

Atatürk University
Faculty of Science Graduate School
Department of Molecular Biology and Genetic
Biotechnology Sciences

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mesut TAŞKIN

Monascus purpureus is one of the most widely used fungal species in production of pigments which have specific importance for food industry. Carbon and nitrogen sources influence pigment production in this fungus, and peptones are accepted as one of the most promising nitrogen sources. The present study was performed to generate peptone (CFP) from waste chicken feathers, and use the obtained peptone as substrate in pigment (red, yellow and orange pigments) production from *M. purpureus*. During the pepton production from the feathers, hydrolysis and neutralization steps were performed using KOH and H₂SO₄, respectively. Optimal concentrations of CFP and glucose for pigment production was found to be 3 and 20 g/L, respectively. A medium pH of 5,5 was determined as more favorable for pigment production. The optimal incubation time was found as 7 days. In all of peptone media, yellow pigment was produced more than red and orange pigments. Similar absorbances for yellow pigment were obtained on test peptones, while CFP and fish peptone (FP) for red and orange pigments provided higher absorbances than protease peptone (PP). The similar results for sugar consumption and biomass production were attained in CFP, FP and PP media. This study demonstrated that the peptone from chicken feathers was a good nutritional substrate for pigment production from *M. purpureus*.

2017, 53 pages

Keywords: *Monascus purpureus*, microbial pigment, chicken feather

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi, tecrübe ve destekleriyle her daim yanımda olan, bilime ve bilimsel bilgiye bakış açımı geliştirmeme yardım ederken aynı zamanda hayatımın boyunca kulağımda çınlayacak insan olmaya dair düşünceleriyle yaşama bakış açımı zenginleştiren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mesut TAŞKIN'a saygı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında gerekli yardımı ve ilgiyi esirgemeyen bölümdeki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca dostluğuyla hep yanımda olan, birlikte çalışmaktan ve aynı eğitim ortamını paylaşmaktan mutluluk duyduğum, tez sürecimde ihtiyacım olan desteği bana sağlayıp her daim yanımda olan Sayın Özge ÇAĞLAR'a; tezimi yazarken varlığıyla beni yalnız bırakmayan Sayın Arş. Gör. Emine TORAMAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında ihtiyaç duyduğum teknolojik destek ve ilgiyi esirgemeyen DAYTAM (Doğu Anadolu İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi) Müdürü Sayın Prof. Dr. Ramazan ALTUNDAŞ'a, DAYTAM'da bulunan değerli hocalarım ve arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim. Tezimin hazırlanması sırasında gerekli desteği esirgemeyip yardımlarıyla yanımda olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ'ye teşekkür ederim.

Tezimi yazarken moral ve motivasyonumu sağlayan kuzenim Ceyda ORAK'a, hayatım boyunca her daim yanımda olan varlıklarıyla güç veren sevgili anneme, babama ve kardeşlerime, babaanneme, dedeme, amcalarıma, yengelerime tüm içtenlik ve samimiyetimle teşekkür ederim.

Tuğba ORAK

Temmuz, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	21
3.1 Materyal.....	21
3.1.1. Kimyasal maddeler	21
3.1.2. Kullanılan çözeltiler	21
3.1.3. Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri	22
3.2. Metotlar	23
3.2.1. Çalışmada kullanılan ortamın ve malzemenin temizliği ve sterilizasyonu	23
3.2.2. Tavuk tuyu peptonunun üretimi	23
3.2.3. Tavuk tüyü peptonunun kimyasal içeriğinin belirlenmesi	25
3.2.4. Çalışmada kullanılacak olan mikrofungusun aktifleştirilmesi ve inokulum hazırlanması.....	26
3.2.5. <i>M. purpureus</i> ile pigment üretiminin gerçekleştirilmesi	26
3.2.6. Kırmızı, sarı ve turuncu pigment üretiminde TTP nin diğer standart peptonlarla karşılaştırılması	27
3.2.7. Pigment ve biyokütle analizi	27
3.2.8. DNS (Dinitrosalisilik asit) ile toplam şeker tayini	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	29
4.1. Üretilen Tavuk Tüyü Peptonunun Kimyasal İçeriğinin Belirlenmesi.....	29
4.2. Pigment Üretimi İçin Peptonun Optimal Konsantrasyonunun Belirlenmesi	31
4.3. Pigment Üretimi İçin Optimal Glikoz Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	32

4.4. Pigment Üretimi ve TTP'nin Çözünürlüğü Üzerine pH'nın Etkisi.....	33
4.5. Pigment Üretiminde TTP ve Diğer Peptonların Karşılaştırılması.....	34
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	38
5.1. <i>M. purpureus</i> ile Pigment Üretimi İçin Peptonların Önemi ve Tavuk Tüyü Peptonunun Hazırlanması	38
5.2. Tavuk Tüyü Peptonunun Kimyasal İçeriği	40
5.3. Tavuk Tüyü Peptonu ile Pigment Üretiminin Optimizasyonu	42
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	54

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BP	Balık pepton
PP	Proteaz pepton
TTP	Tavuk tüyü pepton
KOH	Potasyum hidroksit
HCl	Hidroklorik asit
NaOH	Sodyum hidroksit
g/L	gram/Litre
ICP	Inductively Coupled Plasma (İndüktif Olarak Birleştirilmiş Plazma tekniği)
rpm	bir dakikada dönüş ya da devir sayısı
g	merkezkaç kuvveti

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Tavuk tüyü peptonunun üretim şeması.....	24
Şekil 3.2. Toz halindeki tavuk tüyü peptonu	25
Şekil 3.3. Patates dekstroza agar besiyerinde aktifleştirilen <i>M. purpureus</i>	26
Şekil 3.4. Glikoz konsantrasyonu için standart grafik	28
Şekil 4.1. <i>M. purpureus</i> ile pigment üretimi üzerine TTP konsantrasyonunun etkisi	32
Şekil 4.2. <i>M. purpureus</i> ile pigment üretimi üzerine glikoz konsantrasyonunun etkisi	33
Şekil 4.3. <i>M. purpureus</i> ile pigment üretimi üzerine pH'nın etkisi	34
Şekil 4.4. TTP besiyerinde <i>M. purpureus</i> ile pigment ve biyomas üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi.....	36
Şekil 4.5. PP besiyerinde <i>M. purpureus</i> ile pigment ve biyomas üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi.....	36
Şekil 4.6. BP besiyerinde <i>M. purpureus</i> ile pigment ve biyomas üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi.....	37
Şekil 4.7. TTP besiyerinde <i>M. purpureus</i> ile tek tip pelet formunda fungal büyüme ve pigment üretimi.....	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	21
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri	22
Çizelge 4.1. Tavuk tüyü peptonunun içeriği.....	29
Çizelge 4.2. TTP ve diğer standart peptonların aminoasit içeriği.....	30
Çizelge 4.3. TTP'nin element içeriği.....	31



1. GİRİŞ

Boya, Indus vadisi dönemi (M.Ö. 2600-1900) kadar erken dönemden beri bilinmektedir. Bu bilgi Mohenjodaro ve Harappa'daki Indus Vadisi Uygarlıklarının kalıntılarındaki renkli bezlerle ve madder boya izleri bulgularıyla doğrulanmıştır. Dolayısıyla doğal boyalar, boya maddeleri ve boyama, tekstil kadar eskidir. İnsan her zaman renklerle ilgilenmiştir. Boyama sanatı uzun bir geçmişe sahiptir ve boyaların birçoğu tarih öncesi döneme dayanır. Boyalar Avrupa'da Bronz Çağ Dönemi boyunca kullanılmıştır. Doğal boyaların kullanımına ilişkin en erken yazılı kayıt M.Ö 2600 tarihinde Çin'de görülmüştür (Siva 2007). İlkel boyama teknikleri bitkileri kumaşa bastırmak ya da ezilmiş boya kumaşa sürtmeyi içerir (Gulrajani 1992).

Pigment kelimesi Latince kökenlidir ve başlangıçta renk anlamında kullanılmıştır. Ancak daha sonra tanım renklendirilmiş nesne olarak genişletilmiştir. Ayrıca Orta Çağ'ın başında bu kelime özellikle besin renklendirme amacıyla kullanılan farklı bitki ve sebze ekstraktlarını tanımlamak için kullanılmıştır. Pigment kelimesi biyolojik terminolojide "Hayvanlarda ya da bitkilerde bulunan, vücut sıvısında süspanse halde ya da dokuda birikintiler olarak hücre içindeki granüllerde veya hücre membranında yer alan renkli maddedir." ve hala aynı anlamda kullanılmaktadır (Buxbaum 1998). Kimyasal anlamda pigmentler görünür bölgenin dalga boyu aralığında ışığı emen bileşiklerdir. Üretilen renk moleküle özgü bir yapıdan kaynaklanmaktadır. Bu yapı enerjiyi yakalar ve bir elektronun bir dış yörüngeden daha yüksek bir yörüngeye uyarılması olayı gerçekleştirir. Absorblanmayan enerji göz tarafından algılanacak şekilde yansır veya kırılır ve üretilen sinirsel uyarılar beyne bu sinyalin bir renk olabileceği şeklinde iletilir (Hari *et al.* 1994).

Pigmentler insanoğlunun yaşamının her basamağında yer almaktadır. Çünkü dünya üzerindeki organizmaların her birinde pigment bulunmaktadır. Bitkilerde yapraklarda, meyvelerde, sebzelerde, çiçeklerde; insanlarda deride, gözde ve buna ilaveten bakteri ve funguslarda da pigment bulunmaktadır (Frick and Meggos 1988).

Pigmentler besin maddeleri, tekstil ve farmasötik ürünlerde çekici bir görüntü sağlar (KulandaisamyVenil 2009). Gıda endüstrisinde katkı maddesi, renk yoğunlaştırıcı, antioksidan gibi özellikleri nedeniyle kullanılır (Tibor 2007). Şu anda Avrupa Birliği gıda katkı maddesi olarak yaklaşık 43 renklendiriciye izin verirken, ABD’de ise bu sayı yaklaşık 30 dur (European Parliament and Council Directive 94/36/EC). Mevzuat sentetik ve doğal katkılar arasında ayırım yapmamaktadır ancak hem Avrupa’da hem de ABD’de listelenen renk katkılarının birçoğu doğal kaynaklardan fiziksel veya kimyasal yoldan saflaştırma yoluyla üretilmiştir (Downham and Collins 2000).

Pigmentler doğal olarak üretilen pigmentler ve sentetik olarak üretilen pigmentler olmak üzere başlıca iki sınıfa ayrılır (Fabre *et al.* 1993).

Sentetik pigmentler inorganik ve organik pigmentler olmak üzere ikiye ayrılır. İnorganik pigmentler kadmiyum ve krom gibi metal elementleri içeren bileşiklerden oluşurken; sentetik organik pigmentler benzen, anilin ve naftalin gibi organik bileşiklerden üretilen geniş karmaşık kimyasal yapılardan oluşur. Organik pigmentler genellikle daha parlak, daha berrak ve daha zengin renktedir. Bununla birlikte, organik pigmentler genellikle daha az opak ve güneş ışığına, aşırı sıcaklığa, kimyasal bozulmaya daha az dirençlidir. Ayrıca organik pigmentler inorganik muadillerine kıyasla önemli derecede daha pahalıdır. Pigmentler ayrıca boyalardan farklıdır ve sentetik organik pigmentler doğal olarak oluşan organik pigmentlerden farklıdır (https://www.usitc.gov/publications/docs/pubs/industry_trade_summaries/pub3021.pdf) Bununla birlikte, inorganik pigmentler, ısı ve ışığa karşı kararlıdır (Waldie 1974).

Sentetik renklendiriciler zararlı etkileri nedeniyle yasaklanmıştır veya renklendiricilerin etiketlenmesine ilişkin daha sert yasalarla karşı karşıya kalmıştır. Örneğin Sudan serisinin (Sudan I- IV) kırmızı renklendiricilerinin ithali bu maddelerin kanserojenlik bulgusu olduğundan dolayı yasaktır (Europe Environment 29 Jan 2004). Buna ek olarak, Avrupa Parlamentosu tarafından kabul edilen yeni yasal paket uyarınca, tartrazin, kuinolin sarı, gün batımı sarısı karmoisine, ponceau 4R ve allura kırmızı gibi

sentetik renklendiriciler içeren gıdaların ‘Çocuklarda aktivite ve dikkat üstüne olumsuz etkileri olabilir’ şeklinde etiketlenmesini gerektirmektedir (Frisvad and Samson 2004).

Tekstil sektörü ile ilgili olarak bitkilerden ve mikroorganizmalardan köken alan doğal renklendiriciler, sentetik renklendiricilerin bazı durumlarda mutajenitesi ve karsinojenitesi gibi arzu edilmeyen toksik etkileri nedeniyle sentetik pigmentler üzerindeki popüleriteyi kendi üzerine çekmiştir (Mapari *et al.* 2005).

Bitkiler ve mikroorganizmalar doğal pigmentlerin iki önemli kaynağıdır. Fakat bitkilerden elde edilen doğal pigmentlerin ışık, sıcaklık, olumsuz pH da kararsız olma, suda düşük çözünürlük ve yıl boyunca elde edilememe gibi dezavantajları vardır. Bu yüzden mikrobiyal pigmentler, pigment üretiminin kararlılığı (Raisainen *et al.* 2002) ve kültür teknolojisine ulaşılabilirlik (Parekh 2000) gibi nedenlerden dolayı büyük ilgi çekmektedir. Sentetik ve doğal pigmentlerin sınıflandırılması sırasında mikrobiyal pigmentler tercih edilmektedir. Mikrobiyal pigmentlerin yapay ve inorganik pigmentlerden pek çok avantajı vardır. Mikroorganizmalardan pigment üretimi pigmentlerin kimyasal üretimi ile karşılaştırıldığında etkin ve yararlı bir işlemdir. Mikroplar ucuz kültür ortamında kolay gelişebilir (Dufosse 2009) ve gelişim iklim koşullarından bağımsızdır (Chidambaram 2013). Laboratuvar koşullarında mikroorganizmaları izole etmek, teşhislerini yapmak, saklamak ve bu mikroorganizmalardan değerli biyolojik ürünleri elde etmek için kullanılan cansız ortamlara besiyeri veya kültür ortamı adı verilir. Günümüzde bazı firmalar (Merck, Difco, Oxoid, BBL, Sigma, LabM vb.) tarafından kullanıma hazır dehidre besiyerleri üretilmekte ve pazarlanmaktadır (Kurbanoğlu 1999; Bilgehan 1992; Halkman 2005; Taskin 2011). Özellikle endüstriyel mikrobiyoloji çalışmalarında, üretilmesi istenilen bir ürünün verimini artırmak için seçilen mikroorganizmaya göre besinsel faktörlerin optimizasyonu büyük önem taşımaktadır. Bu doğrultuda da araştırmalar besinsel faktör olarak besiyerinde farklı organik (pepton, maya ekstraktı, malt ekstrakt, üre vb.) ve inorganik (amonyum sülfat, sodyum nitrat, amonyum nitrat vb.) azot kaynaklarını test etmektedir. Yapılan çalışmalarda, organik azot kaynaklarının (özellikle pepton ve maya ekstraktı) inorganik olanlara kıyasla daha yüksek verimler verdiği belirtilmektedir.

(Kunanmneni *et al.* 2005; Cho *et al.* 2006; Erdal ve Taskin 2010; Taskin 2013; Taskin vd 2013).

Pepton terimi, proteinlerin hidrolizi ile elde edilen ürünlere verilen genel isimdir. Peptonlar, protein hidrolizatları olarak a adlandırılmaktadırlar. Peptonlar besiyerlerinde kullanılan en önemli organik azot kaynaklarından birisidir. Bu maddeler suda kolayca çözünebilen, ısı ya da alkali muamelesi veya amonyum sülfat ile koagüle olmayan protein hidrolizatları olarak tanımlanmaktadırlar (Poernomo and Buckle 2002; Vasileva-Tonkova *et al.* 2007).

Peptonlar, endüstriyel mikrobiyoloji, gıda mikrobiyolojisi, klinik mikrobiyoloji ve biyoteknoloji çalışmalarında mikroorganizmaların yetiştirilmesi için kültür ortamlarına eklenen en pahalı besiyeri bileşenlerinden biridir. Peptonlar, mikrobiyal besiyerlerinde her ne kadar temelde organik azot (aminoasit veya peptit) kaynağı olarak kullanılsa da mikroorganizmalar için bir ölçüye kadar karbon ve mineral kaynağı olarak da işlev görmektedirler (Taskin 2013). Diğer taraftan, peptonlar mikroorganizmalar için istenilen yoğunlukta hücre süspansiyonaları hazırlanırken diluent olarak da kullanılmaktadır. Yapılan bir çok çalışmada da steril fizyolojik su, fosfat tamponu vb. maddelere oranla %0,1'lik pepton suyunun çok daha iyi bir diluent olduğu rapor edilmiştir (Taskin 2011).

Günümüzde mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılmak üzere çeşitli firmalar tarafından casein pepton (sütten), meat pepton (etten), fish pepton (balık etinden) ve soya pepton gibi peptonlar ticari olarak üretilmekte ve hâlihazırda piyasada yüksek fiyatlarda satılmaktadır. Araştırmacılar bu ticari peptonların yanısıra peptonların üretiminde bitkisel ya da hayvansal orijine sahip olan daha farklı materyallerin kullanılabileceğini de yaptıkları çalışmalarında göstermektedirler. Bu doğrultuda karides atıklarınının, ayçiçeğinin, balık atıklarının ve soya fasulyesinin yanısıra bazı bitkilerin de pepton üretiminde kullanılabileceğini ileri sürmektedirler (Vecht-Lifshitz *et al.* 1990; Parrado *et al.* 1993; Aspmo *et al.* 2005; Vasileva-Tonkova *et al.* 2007; AL-Bahri *et al.* 2009; Taskin 2011).

Keratinin düşük sindirilebilme özelliğinden dolayı, keratinaz enzimine sahip olan bazı mikroorganizmaların dışında doğada yaşayan canlıların çoğu yapısında keratin içeren maddeleri doğrudan besin maddesi olarak kullanamaz. Dolayısıyla, keratin proteininin, bir işleme tabi tutulmaksızın başta hayvanlar olmak üzere canlılar tarafından doğrudan protein kaynağı olarak kullanımı umut verici görünmemektedir. Bu doğrultuda araştırmacılar keratin bakımından zengin tavuk tüyü gibi materyalleri buhar basıncında hidroliz, kimyasal maddelerle hidroliz ve enzimatik hidroliz gibi değişik hidroliz yöntemlerine maruz bırakmaktadır. Uygulanan hidroliz işlemleri de keratin proteinini aminoasit veya peptitlerine kadar parçalamaktadır (El-Boushy *et al.* 1990; Kurbanoglu and Kurbanoglu 2004; Grazziotin *et al.* 2006; Taskin and Kurbanoglu 2011).

Uygulanan hidroliz işlemleriyle elde edilen tüy hidrolizatları ise başta tavuk ve balık yemi olmak üzere hayvanlar için besin maddesi olarak kullanılmaktadır (Papadopoulos 1984).

Bazı çalışmalarda tavuk tüyleri gibi fibroz proteinlerinin bitki gübresi olarak kullanılabileceğini de göstermektedir (Kim *et al.* 2001; Gessesse *et al.* 2003; Grazziotin *et al.* 2006).

Son zamanlarda araştırmacılar keratin proteini bakımından zengin olan (%90 oran ve üzerinde keratin protein içeriği) boynuz, koyun yünü ve tavuk tüylerinin pepton üretiminde de kullanılabileceğini rapor etmektedirler (Kurbanoglu and Kurbanoglu 2004; Taskin and Kurbanoglu 2011; Taskin *et al.* 2016). Bu materyallerden pepton üretimi sırasında genellikle enzimatik, kimyasal ya da her ikisinin uygulandığı kombine yöntemler kullanılmaktadır. Kimyasal hidroliz yönteminde genel olarak asit hidrolizi için HCl, H₂SO₄ ve H₃PO₄; baz hidrolizi içinse KOH, Ca(OH)₂ ve NaOH kullanılmaktadır (Kurbanoglu and Kurbanoglu 2004; Nustorova *et al.* 2006; Mokrejs *et al.* 2011a; Mokrejs *et al.* 2011b; Taskin and Kurbanoglu 2011; Taskin *et al.* 2016).

Olgun bir tavukta, toplam ağırlığının yaklaşık olarak %10'unu tüyler oluşturmaktadır. Bu oran göz önüne alındığında ise dünya genelinde atık olarak üretilen tüy miktarı da

yıllık olarak $7,7 \times 10^8$ kg ulaşmaktadır (El-Boushy *et al.* 1990; Webster *et al.* 1996; Demirulus ve Aydın 1996; Taskin 2011). Bu yüzden atık özelliğinde olan tavuk tüyünün peptona dönüştürüldükten sonra besiyerlerinde substrat olarak kullanılmasıyla sadece besiyerlerinin maliyeti düşürülmemekte aynı zamanda çevre kirliliği probleminin azaltılmasında katkı yapılmaktadır (Kurbanoglu 1999; Taskin 2011).

Mikrobiyal renklerin farklı tonları mevcuttur. Bu renkler biyobozunur ve çevre ile dosttur. Ayrıca antioksidan, anti kanser, bölünmeyi engelleyici, immun baskılayıcı, diyabet hastalığını tedavi edici özellikleri de vardır (Chidambaram 2013).

Mikroorganizmalar karotenoidler, melaninler, flavinler, quinonlar, prodigiosinler ve daha spesifik olarak monascinler, violesin ve indigo çeşitli pigmentler üretmektedir (Dufosse 2009).

Bakterilerin bazı grupları gelişiminin farklı basamaklarında çeşitli pigmentler üretmektedir. *Azotobacter chroococcum*'un reaktif oksijen türlerine karşı korunmuş olması melanin üretmesine bağlanmıştır (Shivprasad and Page 1989). *Azotobacter salinestris*'de melanin ile demir bağlama hidrojen peroksitle oluşturan hasara karşı koruma sağlar. *Streptococcus*'un ürettiği pigment H_2O_2 ve süper oksit radikallerinin oluşturduğu oksidatif strese karşı dayanıklılığı sağlar (Keith 2007). Bazı *Alteromonas* türleri limon sarısından mor renge kadar pigmentasyon gösterir. *Microbacteriaceae* ailesinin üyelerinin çoğu izoprenoitler (karotenoidler), kuinonlar, prodigiosin ve antrasiklinon türevleri, fenazinler ve diğer heterosiklik bileşikler tarafından belirlenen değişen yoğunluk ve renk tonunda sarı, turuncu veya kırmızı renk oluşumuna neden olan pigmentler üretmektedirler (Trutko *et al.* 2005). *Bacillus megaterium* QM B1551 sporları spor membranları üzerinde bulunan kırmızı pigmente sahiptir (Racine and Vary 1980; Swerdlow and Setlow 1984).

Fungusların özellikle *ascomycetes*, *basidiomycetes* ve likenlerin, fonksiyonları bilinen ya da bilinmeyen, doğal olarak üretilen sekonder metabolit olarak çeşitli sınıf pigmentleri sentezlediği ve saldığı bilinmektedir. Bu pigmentler olağanüstü renk

yelpazesine sahiptir (Maldonado and Ibarra 2005). Mantarlar ve likenlerin uygun laboratuvar koşulları altında geliştirilmesi zordur. Bu yüzden geniş ölçekli endüstriyel üretim için uygun değildir. Bunun aksine birçok *ascomycetes* üretim için daha uygun konaklardır. Bu funguslar, daha yüksek verim elde edilebilmesi için optimize edilmiş kültüvasyon teknolojisi kullanılarak nispeten daha kolay bir şekilde yetiştirilebilmektedir. Dolayısıyla, doğal fungal üreticiler tarafından renk verici madde üretilmesi, renklendirici üretiminin biyoreaktörlerdeki kontrollü koşullar altında gerçekleştirilmesini sağlamaktadır. (Wickerham *et al.* 1946; Stahmann *et al.* 2000).

Fermentasyonla üretilen herhangi bir pigment sınıfının başarısı; üreticinin kabul edilebilirliğine, düzenleyicinin onayına, ürünün piyasaya sürülmesi için gerekli üretici yatırımına bağlıdır. Yirmi yıl önce gıda endüstrisi personelinin fermentasyon tesisi için yüksek sermaye yatırım gerekliliği ve düzenleyici kurumların ihtiyaç duyduğu kapsamlı ve uzun toksisite çalışmalarından dolayı, fermentasyonla üretilmiş gıda sınıfı pigmentlerin başarılı bir şekilde ticarileştirilmesi konusunda şüpheleri mevcuttu (Park *et al.* 2000).

En yaygın liken maddelerinden sarı bir kortikal pigment olan usnik asit güneşe maruz kalma sonucu üretilmektedir. Bu tür likenlerin popülasyonları sarımtıraktır. Gölgedeki popülasyonları ise gri-yeşil renktedir. *Cladonia subtenuis* usnik asit üreten türlerden biridir (Rundel 1969).

Pek çok krustoz likeninin dış korteksindeki pigment olan ksantonlar; algal katmana ulaşan ışık, ışınım şiddetinin düzenlenmesinde rol oynayabilir. Genellikle sarı veya kahverengi renkte olan bu ksantonlar, yüksek ışık yoğunluklu habitatlarda *Lecanora*, *Pertusaria*, *Melanaria*, *Lecidea* ve *Buellia*'nın birçok türünde yaygındır (Santesson 1969a; Santesson 1969b; Santesson 1969c).

Cryptococcus neoformans mayası melanin pigmenti üretmektedir. Melanin pigmentleri önemli anti oksidan fonksiyona sahiptir. Melanin üreten *ctyptococcal* hücreler melanin üretmeyen hücrelerle karşılaştırıldığında oksijen ve nitrojen kökenli oksidanlara karşı

daha dirençlidir (Wang and Casadevall 1994). *Neurospora crassa* ve *Aspergillus fumigatus* mayaları Koenzim Q10 üretmektedir. Bu mayalara ilaveten *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Candida*, *Torulopsis*, *Rhodospiridium*, *Trichosporon*, *Aureobasidium*, *Tremella*, *Bullera* gibi mayalar da yüksek miktarda Koenzim Q10 üretmektedir ve bu mikrobiyal hücrelerle üretim patentli çalışmalardır (Kondo *et al.* 1973). *Xanthophyllomyces dendrorhous* astaksantin üreten mikroorganizmalar arasında yaygın üretim için en iyi *Candida*'lardandır (Cruz *et al.* 1998). *Rhodotorula glutinis* karotenoid sentezleyen mayalardan biridir (Simova *et al.* 2004). *Candida guilliermondii* ve *Debaryomyces subglobosus* mayaları yüksek miktarda sarı renkte riboflavin üreten mikroorganizmalardır (Jacobson and Wasileski 1994; Stahmann *et al.* 2000; Santos *et al.* 2005).

Bugünlerde filamentli funguslar tarafından üretilen fermentatif gıda sınıfı pigmentler piyasada mevcuttur: *Monascus* pigmentleri, *Penicillium oxalicum* tarafından üretilen Arpink red™, *Ashbya gossypii* tarafından üretilen riboflavin, *Blakeslea trispora* tarafından üretilen likopen ve beta karoten (Park *et al.* 2000). Filamentli fungusların metaboliti olan pigmentlerin rengi ve kimyasal profilindeki çok yönlülük ile bu fungusların büyük ölçekli ekiminin uygun olması, iyi miktarda pigment üreten suşların uzun süreli varlığı gibi nedenlerden dolayı filamentli funguslar gıda sınıfı pigmentlerin üretimi için mikrobiyal hücre fabrikaları olarak rol oynamaktadır ve gelecekte de oynamaya devam edecektir (Feng *et al.* 2012). *Eremothecium ashbyii* and *Ashbya gossypii* yüksek miktarda sarı renkli riboflavin pigmenti üretmektedir (Jacobson *et al.* 1994; Stahmann *et al.* 2000; Santos *et al.* 2005).

Monascus tarafından fermente edilen doğal pigmentler dünya çapında yüksek ekonomik değere sahiptir ve renklendirme ajanı olarak dünyada dikkatleri üzerine çekmektedir. Japonya'da *Monascus* pigmentlerinin küresel üretimi ve yıllık tüketimi 1981 yılında 100 ton iken 1992 yılında 600 tona ulaşmıştır. Bunlara ilaveten *Monascus* pigmentleri 1992 yılında yayınlanan ankete göre 12 milyon dolar değerlendirilmiştir (Sweeny *et al.* 1981; Lee *et al.* 1995).

Monascus 1884'de Fransız bilim adamı van Tieghem tarafından sınıflandırılmış ve isimlendirilmiştir. 1885'de Went *Monascus purpureus* hakkında başarılı bir çalışma yayınlamıştır. Renklendirilmiş pirincin yaygın olarak kullanıldığı Java'da Alman bilimadamı tarafından toplanan örneklerden yeni bir tür keşfedildi. *Monascus* cinsi *Eumycota* şubesi, *Ascomycotina* alt şubesi, *Plectomycetes* sınıfı, *Monascaceae* ailesi üyesidir ve. *M. floridanus*, *M. pallens*, *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. ruber*, *M. sanguineus*, *M. eremophilus*, *M. lunisporas* and *M. argentinensis* mikroorganizmalarından oluşan dokuz türü içermektedir. Bu türler arasında çok sayıda benzerlik vardır (Shao *et al.* 2011).

Monascus fermente pirinç Çin, Japonya, Tayland ve Tayvan gibi Asya ülkelerinde yaygın olarak kullanılan renklendirici ve besin malzemesidir. Hung-Chu, Hong Qu, Ang-kak, Ankak rice, Red Yeast rice, Red Mold rice ve Beni-Koji gibi isimlendirmeler de mevcuttur (Lin *et al.* 2008).

Angkak yapmak için yüzyıllar boyu pirinç substrat olarak kullanılmıştır (Palo *et al.* 1960). Şu ana kadar, yulaf, buğday, arpa ve mısır gibi pek çok tahıl substratı, *Monascus* spp için alternatif substratlar olarak olası kullanımları üzerinde çalışılmıştır. Her tahılın, bileşimi içindeki değişime bağlı olarak angkak üretimi üzerinde farklı etkisi belirlenmiştir (Yongsmith 1999). Angkak üretimi için bir substrat olarak kullanılan mısır, pirinçten daha ucuz olduğu için Çin'de bir ana yemek olarak tüketilmemiştir. Mısır, pirinç gibi *Monascus* spp büyümesi ve kırmızı rengi sağlaması için kullanılabilir (Palo *et al.* 1960).

Monascus pigmentlerinin besin ve tekstil endüstrisi, farmakoloji, tıp (Pattanagul 2002), kozmetik (Lee *et al.* 1995) gibi birçok uygulama alanı vardır. Tekstil ve besin endüstrisinde renklendirme ajanı olarak kullanılır (Juzlova *et al.* 1996). Bu pigmentler besin endüstrisinde yine tat ve aroma artırıcı olarak kullanılmasına ilaveten sos olarak da kullanılmaktadır (Lin 1975; Multon 1992). *Monascus* tarafından üretilen pigmentler Doğu Asya'da doğal renklendirici ve geleneksel besin ilavesi olarak kullanılmaktadır (Carels and Shepherd 1977). Farmokoloji ve tıpta *Monascus* pigmentleri çeşitli insan

hastalıklarını önleme ve tedavi etmede geniş kullanıma sahiptir (De Carvalho *et al.* 2008).

Monascus pigmentlerinin birçok avantajı vardır. Bu pigmentler pahalı olmayan substratlar üzerinde kolayca üretilebilir, suda ve etanolde iyi çözünür, spesifik koşullar altında üretildiğinde tamamiyle güvenlidir ve birçok biyoaktif metabolitler sentezlerler. (Sweeny *et al.* 1981; Lin and Iizuka 1982).

Monascus türleri kırmızı, sarı ve turuncu olmak üzere 3 pigmentin karışımını üretmektedir. Bunların her biri poliketid kökenli bileşene sahiptir. Bu pigmentler yaygın azaphilone iskeletine sahiptir (Carvalho 2003; Campoy *et al.* 2006). Poliketid kromofor ve β keto asitlerden esterifikasyonla üretilir (Su 2005). *Monascus* türleri bu üç pigmente ilaveten renksiz metabolitler de üretmektedir (Sweeny 1981).

Monascus poliketid metabolitleri acetate malonate yolağından köken alır (Eman Mostafa 2012; Anese *et al.* 1997). Bu olay bir molekül asetil-CoA ve üç molekül malonil-CoA'nın yoğunlaşması ile başlar; ardından sitozolde turuncu renkli moleküller üretir ve turuncu renkli moleküllerin oksidasyonunu sağlayan bir dizi reaksiyon sarı renkli pigmentler oluşumunu sağlar (Hamano and Kilikian 2006).

Sarı pigment; Ankaflavin, Monascin C, Monascidin A (citrinin), Monascorubrin, Rubropunctatin, Yellow II, Xanthomonascin A'yı içeren azofilon heksaketid pigmentlerinin indirgenmiş formlarıdır (Yongsmith *et al.* 1994; Cheng *et al.* 2010). Monascidin A (citrinin) anaerobik koşullar altında *Monascus* türleri tarafından üretilir. Pigment üretimi mikotoksinlerin üretimini engellemek için özel beslenme ve çevre koşulları altında gerçekleştirilmelidir (Hajjaj *et al.* 2000; Chen *et al.* 2009). Sarı pigment ankaflavin, apoptoz ile ilişkili bir mekanizma ile kanser hücre hatlarına selektif sitotoksisite göstermektedir ve normal fibroblastlar için nispeten düşük toksisiteye sahiptir. Bu pigmentin yapısal analogu monascin tüm hücre hatlarında hiçbir sitotoksisite göstermemiştir (Su *et al.* 2005). Bu sebeplerden hem monascin hem de

ankaflavin'in uygun dozlarda tüketildiğinde güvenli olduğu ve ankaflavinin fonksiyonel bir gıda renklendiricisi olarak kullanılabileceği anlamına gelir (Kim *et al.* 2006).

Turuncu pigmentler oxo- lakton halkasına sahip Monascorubrin ve Rubropunctatin'ı içerir (Zhou *et al.* 2009). Turuncu pigmentin renk yoğunluğu spektrofotometrede 470 nm dalga boyunda araştırılır (Chen and Johns 1993). *Monascus purpureus* ve *Monascus ruber* tarafından üretilir. Yanlızca Rubrapunctatin ayrıca *M. rubropunctatus* & *M. kaoliang* tarafından üretilir. Turuncu pigmentlerin fosfoindositidlerin biyolojik aktivitesi, hassasiyete karşı dış macunu, kum önleme, takma ajan olarak kullanılmasını içermektedir. Monascorubrin ve Rubropunctatin hücreye bağlı durumda üretilir. Bu pigmentler suda çözünmez ve poliketidsentaz I'in çoklu enzim kompleksi tarafından sitozolde asetil coA'dan sentezlenir ve renkten sorumlu aminofil yapısına sahiptir. Bu pigmentler sıcaklığa karşı hassasdır, pH 2 ile 10 aralığında kararlı değildir ve ışığa maruz kaldıkça solmaya başlar. Turuncu pigmentler besiyerinde amino grubu içeren protein, aminoasit ve nükleik asitlerle reaksiyona girdiği zaman bu pigmentler suda çözünen kırmızı pigmente dönüşmektedir (Wong and Koehler 1983).

Turuncu pigmentin oksidasyonuyla Monascorubramine and Rubropunctamine adı verilen kırmızı pigmentler oluşmaktadır. Bu pigmentler hücre dışı üretilir, toksik değildir, pH'ya karşı yüksek dayanıklılığı vardır (Li *et al.* 1998; Pattanagul 2007). 15 dk süreyle 100°C'ye maruz bırakıldıklarında siyahımsı renge dönüşmektedir. Suda ve alkolda yüksek oranda çözünürler. Ca, Mg, Cu, Fe ve diğer metal iyonlarının varlığında yüksek bir kararlılığa sahiptir (Pastrana *et al.* 1994; Blanc *et al.* 1994). Sulu kırmızı ekstrakt birkaç gün içinde çabucak bozunmaktadır ancak özellikle N- bütanol gibi organik çözücüyle özütlenirse birkaç ay boyunca gün ışığına karşı kararlı kalmaktadır (Blanc *et al.* 1994). Kırmızı pigmentler Monascorubramin ve Rubropunctamin hidrofilik amino asit türevleri pigment olmalarının yanısıra turuncu pigmentlerine kıyasla çok az miktarda antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (Kim *et al.* 2006). Yine bu pigmentler (Monascorubramine ve Rubropunctamine) özellikle nitritlerin yerini alması için et ürünlerinde kullanılması nedeniyle yüksek talep görmektedir (Fabre *et al.* 1993).

ve özellikle kırmızı pirinç üzerinde üretildiği zaman terapötik kullanıma sahip olduğu rapor edilmiştir (Lin *et al.* 2008).

Zengin protein, aminoasit ve mineral içeriğine sahip olduğunu belirtilen ve şimdiye kadar pek çok çalışmada değerli ürünlerin üretimi için besiyeri bileşeni olarak kullanılan (Taskin and Kurbanoglu 2011; Taskin *et al.* 2011; Taskin *et al.* 2012a; Taskin *et al.* 2012b; Taskin 2013) tavuk tüyü peptonunun (TTP) *M. purpureus* ile pigment üretiminde kullanılabilirliğine yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu yüzden mevcut çalışmada *M.purpureus* ile pigment üretimi için TTP'nin susbtrat olarak kullanılabilirliği test edilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Monascus pigmentlerinin mikrobiyal proseslerle üretimi ve pigment üretimini artırmaya yönelik olarak besinsel ve çevresel şartların optimizasyonu üzerine literatürde çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmaların, bazıları aşağıda özet halinde verilmiştir.

Silveira *et al.* tarafından 2008 yılında yapılan çalışmada üzüm atığını büyüme substratı olarak kullanan *Monascus purpureus* tarafından sıvı kültürde pigment üretimi, faktöriyel tasarım ve tepki yüzey teknikleri kullanılarak optimize edilmiştir. Değerlendirilen değişkenler, karbon kaynağı olarak üzüm atığının, pepton ve monosodyum glutamat konsantrasyonunun pigment üretiminden sorumlu olduğunu belirlemişlerdir. Pepton konsantrasyonunun pigment üretimi için en önemli parametre olduğunu gözlemlemişlerdir. Glutamat ilavesi, *Monascus* pigment veriminde önemli bir artış ile sonuçlandı ancak sadece yüksek pepton konsantrasyonları ile kombine edilmiştir. Pigment üretimi için optimal değer herhangi bir üzüm atığı konsantrasyonunda yaklaşık 20-22,5 g/L peptondur.

Júlová *et al.* tarafından 1994 yılında yapılan bir çalışmada *Monascus purpureus* tarafından pigment üretimi için tek karbon kaynağı olarak %2 (h/h) konsantrasyonda etanol kullanılmış ve spesifik pigment üretiminin, maltoz ilave edilen kültürde elde edilenlerden daha yüksek olduğu görülmüştür. Azot kaynağı türünün pigment oluşumunda çok önemli olduğu gösterilmiştir. Turuncu pigmentlerin amonyum klorür ve amonyum hidroksit destekli biyosentezi, hem sarı hem de kırmızı pigmentlerin amino asit destekli biyosentezi görülmüşken; sarı pigmentler ise, polipeptonda yetiştirilen kültürlerden elde edilen özütlerde hakimdir. Ayrıca, birinci ve ikinci etapta maltoz ve etanol kullanılarak yapılan iki aşamalı kültür işlemi, pigment üretimi için etanol kullanım verimliliğini artırmak için kullanılabilecektir.

2000 yılında Tseng *et al.* tarafından yapılan çalışmada *Monascus purpureus* için farklı tuz, sodyum nitrit, polifosfat ve çeşitli şeker seviyelerinin büyüme, pigment üretimi,

proteaz aktivitesi ve kültür pH'ına etkisi sıvı kültürde ve öğütülmüş etde incelenmiştir. Sıvı kültüre sodyum klorür (>50.0 g /L) ve polifosfat (>3.0 g /L) eklenmesi, *M. purpureus*'un misel büyümesi, pigment üretimi ve proteaz etkinliğini azaltmıştır; buna karşın düşük konsantrasyonda sodyum nitrit ($<0,2$ g/L), misel gelişmesi ve pigment üretimini artırmıştır. Temel besiyeri ve öğütülmüş et $150,0$ g / L tuz içerdiğinde, büyüme durmuştur. Karbon kaynağı olarak fruktozlu ortamın, miselin büyümesi ve pigment üretimi için en uygun olduğu kanıtlanmış; maltoz ve glikoz ikinci sırada en iyi üretimi gerçekleşmesini sağlayan karbon kaynağı olduğu bulunmuştur. Sükroz ve laktoz karbon kaynağı olarak kullanıldığında, miselyum büyümesi ve pigment üretiminin engellendiği ancak proteaz aktivitesinin önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir.

Babitha'nın 2007 yılında yaptığı çalışmada katı kültürde *Monascus purpureus* tarafından pigment üretimi için bir substrat olan jackfruit tohum tozunun fizibilitesini araştırılmıştır. 25 OD Units/g kuru fermente substratın bir pigment verimi, %50 ilk nem içeriği, 30°C inkübasyon sıcaklığı, 9×10^4 spor/g kuru substrat inokulumu ve yedi gün inkübasyon süresi gibi optimum işlem parametreleriyle birlikte jackfruit tohum tozu kullanılmıştır.

2014 yılında Ahmad and Panda'nın bir çalışmasında *Monascus purpureus* MTCC 369 kullanılarak pirincin katı hal fermantasyonu geliştirilmiştir. Plackett-Burman deneysel metodu kullanılarak taranan beş besin maddesi parametresi Katı hal fermantasyonunda *Monascus* kırmızı pigment üretimi için tepki yüzeyi metodolojisinin merkezi kompozit tasarımı (merkezi rotasyon) ile optimize edilmiştir. 20g önceden ıslatılmış pirinç ile 74,59 g/L dekstroz; 5,54 g/L pepton; 6,57 g/L NH_4Cl ; 0,58 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ve malt özütü 14,46 g/L içeren 40 ml damıtılmış su ihtiva eden pirinç esaslı katı madde gramı başına 12 mg'lık maksimum kırmızı pigment üretimi öngörülmüştür.

Ucuz tarımsal ürünler ve rezidüler pigment üretimi için substrat olarak kullanılmıştır. Nimnoi and Lumyong'un 2009 yılında yaptığı çalışmada mısır unu; yarfıstığı unu, Hindistan cevizi kalıntısı ve soya fasulyesi unu ile karşılaştırıldığında, pigment üretimi için mısır ununun en iyi substrat ($19,4$ U / gds) olduğu belirlenmiştir. Galaktoz, sorboz,

psikoz ve mannitolün, glikoz yanında iyi bir takviye olduğu fakat ksilitol olmadığı bulunmuştur. Pigment, yüksek sıcaklık ve uzun süreli UV ışığa maruz kaldığında stabil değildir. Kırmızı pigment yoğunluğu sırasıyla otoklav ve pastörizasyon sonrası %30,57 ve %5,41 oranında azalmıştır.

2005 yılında De Santis *et al.*'un yaptığı çalışmada *Monascus purpureus* C322 suşu, kırmızı veya turuncu pigment açısından zengin etanolik ekstraktlar üretmek için iyi bir şekilde dizayn edilmiş besiyeri üzerinde geliştirilmiştir. Bu ekstraktlar genel olarak 50 dilüsyon faktörü ile seyreltildikten sonra, şap ya da kalay klorür ile önceden muamele edilen ham yün standart numunelerini farklı şekilde boyamak için kullanılmıştır. Kullanılan mordandan bağımsız olarak, kırmızı pigmentli özütlerle boyanan örneklerde soluk kırmızı bir renk görülürken, turuncu pigment açısından zengin özütlerle boyanan örnekler daha keskin bir turuncu renk gösterdi. Birkaç renk verimi standart testi (40°C'de manuel yıkama, asit ve bazik ter ve sıcak presleme) gerçekleştirerek, kırmızı pigmentli ekstrelerle boyanan stannik klorid yoksun yün numunelerinin, turuncu muadillerine kıyasla asit ve baz etkisine karşı kendilerine göre daha az dirençli olduğu bulunmuştur. Turuncu pigment bakımından zengin etanolik ekstraktların üretimi, kırmızı muadillerine göre daha uygun maliyetli olduğu için, bu pigmentler tekstil sektöründe doğal kökenli renklendiricilere olan mevcut talebi destekleyebilir.

Lv *et al.* tarafından 2017 yılında yapılan çalışmada, fermantasyon koşulları (pH ve sallama / çalkalama hızı açısından), misel morfolojisi ve *Monascus* sarı pigmentlerin üretimi arasındaki ilişkiler, her iki çalkalama biyoreaktör ve ölçek büyütme biyoreaktörü deneylerinde araştırılmıştır. Çalkalamalı fermantasyonda, *Monascus* sarı pigmentlerin en yüksek verimi, pH 5,0'da ve 180 rpm'de sallama hızı ile elde edildi. Mikroskopik görüntüler, bu sonuçların, daha kısa, daha kalın ve çok dallı hifalar içeren serbestçe dağılmış küçük misel peletlerinin oluşumu ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Yapılan araştırmalar, hifal çapın *Monascus* sarı pigmentlerin biyosentezi ile yüksek ilişkiye sahip olduğunu göstermiştir. Yükseltilmiş fermantasyon deneyinde, sarı pigmentlerin (401 U) verimi, en yüksek verim 200 L'lik bir biyoreaktörde elde edildi. Mevcut bulgular, sıvı fermantasyonda *Monascus* sarı pigmentlerin üretimini arttırmak

için kullanılan koşullar hakkındaki bilgileri ilerletebilir ve bu doğal pigmentlerin büyük ölçekli üretimini kolaylaştırabilir

Dikshit and Tallapragada tarafından 2013 yılında bir çalışmada *Monascus* suşu izole edilmiş ve moleküler temelde *Monascus sanguineus* olarak tanımlanmıştır. Bu suş stres koşullarında kırmızı pigment üretimi için bir referans suş olarak *Monascus purpureus* MTCC 410 ile karşılaştırılmıştır. Her iki suş gliserol, NaCl, peptonun farklı konsantrasyonu ve ayrıca farklı sıcaklıklarda muamele edilen sporlar gibi farklı stres koşullarına maruz bırakılmıştır. Her iki suşun stres koşulları altında pigmentasyonun arttığını gösterilmiştir. Her iki suş için (*Monascus sanguineus* 33,4 CVU/ml, *Monascus purpureus* 36,7 CVU/ml) 0,5 M gliserol konsantrasyonu ile maksimum pigment verimi gözlemlenmiştir. Tuz stresi için, her iki suş %3 NaCl konsantrasyonu ile maksimum pigment üretmiştir. %12 NaCl konsantrasyonunda, her iki suşun büyümesi çok yavaş ve pigment verimi neredeyse hiç görülmemiştir. Sporlar farklı sıcaklıklarla muamele edildiğinde *Monascus sanguineus*'un 90°C'de muamele edilen sporlarla maksimum pigment oluşturduğu; oysa *Monascus purpureus*'un canlılığının kaybettiği belirlenmiştir.

Koli *et al.*'ün 2017 yılındaki çalışmasında, antifungal madde olan flukonazolün *Monascus purpureus*'tan (NMCC-PF01) kırmızı pigment üretimi üzerine etkisinin araştırılması üzerine odaklanılmıştır. Optimize edilen flukonazol konsantrasyonunda (30 µg ml/L), 96 saat sonra pigment üretiminin %88 oranında arttığı ve daha sonraki inkübasyondan sonra da 168 saate kadar sabit kaldığı tespit edildi. Flukonazol ile işleme tabi tutulan kültür sıvısında ergosterol konsantrasyonu, kontrol kültür sıvısına kıyasla %49 azaltıldı. İnce tabaka kromatografisi, UV spektroskopisi ve kütle spektrometrik analizi (ESIMS) ile kırmızı pigmentin nitel analizi, iyi bilinen pigment olan Rubropunctamine'in varlığını doğrulamıştır.

Srianta *et al.* tarafından 2016 yılında yapılan çalışmada *Monascus Purpureus*'un, pirinç, mısır, bütün sorgum tahıl, kabuğu alınmış sorgum tahıl ve sorgum kepeği gibi farklı tahıl altındaki substratlar üzerinde, katı hal fermentasyonu süresince büyümesi, pigment

üretimi ve fermente ürünlerin pigment bileşimi değerlendirilmiştir. Büyüme temelinde fungus biyokütlesi kullanılmıştır. Pigment içeriği, spektrofotometre ve ince tabaka kromatografisi kullanılarak ölçülmüş ve bileşimi, Tandem Kütle Spektrometrisiyle birleştirilmiş Sıvı Kromatografi kullanılarak analiz edilmiştir. *M. purpureus*, pirinç üzerinde diğer substratlara göre daha hızlı büyümüştür. Test edilen tüm yüzeylerde logaritmik fazın sonunda pigmentlerin üretimi gözlemlenmiştir. Benzer pigment bileşikleri tüm substratlarda bulunmuş ve pigmentlerin en yüksek üretimi pirinçte bulunmuş, ardından kabuğu alınmış sorgum tahıl > bütün sorgum tahıl> mısır> sorgum kepeği izlemiştir. *Monascus* fermente ürünlerde farklı seviyelerde altı tanesi tanınmış yirmi pigment tespit edildi. İlginç bir şekilde kabuğu alınmış sorgum tahıl, diğer fermantasyon ürünlerine kıyasla büyük miktarda Rubropunktatin içermektedir.

Kumari *et al.* tarafından 2009 yılında bir çalışmada albino sıçanlar üzerinde toksikolojik çalışmalar yapılarak kırmızı pirincin güvenilirliği test edilmiştir. Akut ve alt kronik sitotoksikite çalışmaları her iki cinsiyet için yürütülmüştür. Sıçanlara 0,5; 1,0; 2,5 ve 5,0 g / kg vücut ağırlığı ile akut dozda kırmızı pirinç verildiğinde toksisite veya mortalite belirtisi görülmemiştir. Benzer şekilde 14 hafta boyunca %2,0 ; %4,0 ; %8,0 ve %12,0 seviyesinde (a/a) diyetine kırmızı pirinç ilavesi yapılan sıçanlarda kontrol sıçanlarıyla kıyasla yiyecek alımında veya vücut ağırlığında herhangi bir artış göstermemiştir. Yaşamsal organların göreceli ağırlığı, hematolojik parametreler, hayati organlarda makroskopik ve mikroskopik değişiklikler, serum ve klinik enzim düzeyleri açısından deney ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir. Dahası kırmızı pirinçle ile beslenen sıçanların hem serum hem de karaciğerindeki kolesterol ve trigliserid düzeylerinde belirgin bir azalma görülmüştür. Sonuçlar *M. purpureus*'un kırmızı fermente pirinci ile yapılan toksisite çalışmalarının albino farelerde toksik etkilere neden olmadığını göstermiştir.

Sheu *et al.* tarafından 2000 yılında yapılan çalışmada *Acetobacter aceti* ssp. tarafından üretilen bakteriyel bir selüloz olan nata *Monascus purpureus* ile fermantasyon yoluyla renklendirilmiştir. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) gözlemleri *Monascus* miselyumunun nata selüloz ağı vasıtasıyla büyüyebileceğini göstermiştir. Karbon

kaynağı olarak pirinç tozu ve azot kaynağı olarak monosodyum glutamat (MSG) kullanılıp, 30°C'de 12 gün fermentasyon sonrasında cazip bir renk görülmüştür. 36 saat sonra 366 nm ultraviyole ışın ile ışınlama altında %66.1 renk azalması tespit edilmiştir.

Haque *et al.*'un 2016 yılında yayınladığı çalışmalarında *Monascus purpureus*'un biyo renklendiricinin fermentatif üretimi için ekmek atıklarının besin kaynağı olarak kullanılması kavramı geliştirilmiştir. Önerilen fikirler, Hong Kong veya diğer ülkeler tarafından karşılaşılan fırın atığı sorununu azaltmak için bir sistem veya yöntem oluşturmak için yenilikçi bir yaklaşım sağlamaktadır. Fırın deposundan toplanan fırın atığı, *Monascus purpureus*'un sıvı ve katı hal fermentasyonunda, gıda ve tekstil endüstrisinde potansiyel olarak uygulanabilen biyo-renklendirici üretmek için kullanılmıştır. Fermentatif pigment üretimi için *Aspergillus awamori* ve *Aspergillus oryzae*'nin hidrolitik reaksiyonlarından elde edilen fırın atığı hidrolizatının fizibilitesi araştırılmıştır. Fırın atığı hidrolizat deneyinden elde edilen ön veriler, 5 g/L başlangıç glikozu içeren fırın atığı hidrolizatı ile en yüksek pigment veriminin (yaklaşık 24 U/g glikoz) elde edildiğini ortaya koymuştur. Katı hal fermentasyon çalışmalarının sonuçları, 30°C inkübasyon sıcaklığında sırasıyla %55 ve %65 başlangıç nem muhteviyatında, elde edilen glikoamilaz ve proteazın en yüksek aktivitesinin sırasıyla 8 U/g ve 117 U/g olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmanın sonucu, *Monascus purpureus*'un, pişmiş atıklardan elde edilen şekerleri ve amino asidi kullanarak bio-renklendirici ve enzim üretimi için umut verici bir konak oluşturduğunu göstermiştir.

Hsu *et al.* 2013 yılında yaptıkları çalışmalarında, dört sarı ve altı turuncu pigment içeren 10 azafilon pigmenti, *Monascus purpureus* NTU 568 fermente pirinç ve diosoreadan izole etmişlerdir. Lipopolisakkarid (LPS) uyarılmış sıçangil makrofaj RAW 264.7 hücrelerini kullanarak, bu pigmentlerin nitrik oksit (NO) üretimi üzerindeki inhibisyon faaliyetleri tespit edilmiştir. Sonuç olarak, diğer iki turuncu pigmenti olan Monaskorubrin (IC₅₀> 40 µM) ve Rubropunktatin (IC₅₀=21.2 µM) ile birlikte ankaflavin (IC₅₀=21.8 uM), Monasilin (IC₅₀=29.1 µM), Monofilon A (IC₅₀=19.3 µM) ve Monofilon B (IC₅₀=22.6 µM) olmak üzere dört sarı pigmentle karşılaştırıldığında dört turuncu pigment, monofilol A-D en yüksek aktiviteleri gösterdi (IC₅₀=1.0-3.8

μM). Western Blot ve ELISA kitleri kullanılarak, sarı pigmentlerin $30 \mu\text{M}$ 'si ve turuncu pigmentlerin $5 \mu\text{M}$ 'si ile muamele ile, indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) protein ekspresyonunu azaltabileceği ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), interlökin- 1β (IL- 1β) ve interlökin-6 (IL-6) üretimini baskılayabileceği gösterilmiştir. Ayrıca, bu pigmentlerin antienflamatuar etkilerini değerlendirmek için iki hayvan deneyi yapılmıştır. 12-O-tetradekanoilflorbol-13-asetat (TPA) ile uyarılmış kulak ödemi modelinde, bu pigmentlerin sekizi (0.5 mg / kulak), BALB / c farelerinin kulaklarına uygulanmış ve TPA uygulamalarına karşı kulak ödemeni önleyebileceği belirlenmiştir. LPS enjeksiyonlu fare modelinde, bu pigmentlerin birçoğu (10 mg / kg) BALB / c farelerinin plazmasında NO, TNF- α , IL- 1β ve IL-6 düzeylerini inhibe edebileceği belirlenmiştir. In vitro ve in vivo çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, Ankaflavin, Monofilon A ve Monofilol A-D olmak üzere altı azafiloid pigmentlerinin, kemopreventif gıdalara veya iltihaba bağlı hastalıklara karşı ilaçlara dönüşme potansiyelinin yüksek olduğunu gösterilmiştir.

Zhao *et al.*'ün 2015 yılında yaptıkları çalışmada *Monascus* pigmentlerinden biri olan turuncu pigmentin *Escherichia coli*'ye karşı antibakteriyel özellikleri araştırılmıştır. Turuncu pigment, *E. coli*'ye karşı güçlü antibakteriyel etki sergilemiştir; bu, turuncu pigment ile inhibisyon zonunun çapında bir artış sağladı. 2.5 mg / ml 'lik konsantrasyon, turuncu pigmentin *E. coli*'ye karşı minimum inhibisyon konsantrasyonudur. Taramalı Elektron Mikroskopisi, turuncu pigmentin bakteri hücrelerine zarar verebileceğini, sonuç olarak hücre ölümüne neden olduğunu ortaya koymuştur. Bakteri hücresi süspansiyonlarının elektriksel iletkenliğinde artış, sitoplazmik zarın turuncu renkte bir pigmentle işlenmesiyle kırıldığını düşündürmüştür. Turuncu pigment ile fosfolipid arasındaki etkileşimin, bakteri membranının parçalanmasına yol açtığını göstermiştir.

Taskin *et al.* tarafından 2011 yılında yapılan çalışmada atık tavuk tüylerinin asit hidroliziyle elde edilen peptonun; asit hidrolizi ile hazırlanması ve bu peptonun, *Rhodotorula glutinis* MT-5 mayası tarafından biyomas ve karotenoid üretimi için substrat olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Tavuk tüyü pepton (TTP); kül (42.1 g / 100 g), protein (55.8 g / 100 g) ve mineral içerikler bakımından zengin bulunmuştur.

TTP'nin mayadaki biyomas ve karotenoid üretimi destekleme kabiliyeti, Tripton peptonu (TP) ve Balık peptonu (BP) ile karşılaştırılmıştır. Optimum TTP konsantrasyonunun hem biyomas hem de karotenoid üretimi için 8 g / L olduğu bulunmuştur. Ortama 8 g / L TTP eklenmesi, kontrol ile karşılaştırıldığında karotenoid ve biyomas üretimini sırasıyla yaklaşık %53 ve %36 oranında artırmıştır. Fermantasyonun sonunda TTP ile maksimum biyomas (14.2 g/L) ve karotenoid (92 mg /L) konsantrasyonları elde edildi. Üstelik CFP ortamında maksimum karotenoid verimi (6.47 mg / g) elde edilmiştir. Bu çalışmanın sonunda atık tavuk tüylerinin, *R. glutinis* için yeni bir karotenoid üretim substratı olarak etkin bir şekilde kullanılabilir olduğunu göstermiştir.

Taskin *et al.* tarafından 2012 (a)'de yapılan çalışmada, yenilebilir mantar *Morchella esculenta*'dan misel biyoması ve ekstraselüler polisakarit (EPS) üretimi için substrat olarak tavuk tüylü peptonunun (TTP) kullanılabilirliğini araştırmak için yapılmıştır. TTP'nin yenilebilir mantar *M. esculenta*'da biyomas ve EPS üretimini destekleme kabiliyeti, iki ticari peptonla (Trypton peptonu (TP) ve Balık peptonu (BP)) karşılaştırılmıştır. Maksimum biyomas (16.3 g/L) ve EPS (4.8 g/L) TP ile konsantrasyonlar sağlanmıştır. İkincisi, yüksek biyomas (15.9 g/L) ve EPS (4.6 g/L) konsantrasyonları TTP ile elde edilmiştir. Ayrıca, TTP ortamındaki biyomas ve EPS konsantrasyonlarının, TP ortamındaki ile istatistiksel olarak yakın olduğu görülmüştür. TTP ve TP, sadece 5 mm'lik küçük peletlerin oluşmasına sebep olmasının yanında aynı zamanda, BP'ye kıyasla daha hızlı miselyum büyümesine neden olmuştur. Bu çalışma, ilk kez TTP'nin yeni bir EPS üretim substratı olarak etkin bir şekilde kullanılabileceği göstermiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1. Kimyasal maddeler

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	Üretici
Patates Dekstroz Agar	FLUKA
Balık Pepton	FLUKA
Proteaz Pepton	OXOID
Tavuk Tüyü Pepton	
D-(+)- Glukoz monohidrat	SIGMA-ALDRICH
Etanol (%99.5'lık)	SIGMA- ALDRICH
DNS (Dinitrosalisilik asit)	FLUKA
NaOH(%100'lük)	SIGMA
HCl (%36.5-%38'lik)	SIGMA
Rochelle salt (K-Na –Tartarat)	SIGMA
KOH (%86'lık)	SIGMA
H ₂ SO ₄ (%98'lik)	SIGMA

3.1.2. Kullanılan çözeltiler

%95'lik EtOH çözeltisi: 288 ml saf EtOH 13 ml saf etanolle karıştırılarak elde edildi.

1 M HCl çözeltisi: 7,67-8 ml %36,5- 38'lik HCl 100 ml saf su ile karıştırılarak elde edildi.

1 M NaOH çözeltisi: 4 gr NaOH 100 ml saf suda çözülerek elde edildi.

2.5 N KOH çözeltisi: 250 ml saf su içerisinde 40.78 g %86'lık KOH çözülerek elde edildi.

1 M H₂SO₄ çözeltisi: 0.19 ml %99.5'lik H₂SO₄, 100 ml saf sui le karıştırılarak elde edildi.

2 M NaOH çözeltisi: 1.6 g NaOH ve 20 ml saf suda çözülerek hazırlandı.

DNS çözeltisi: 1 g DNS 50 ml saf suda manyetik karıştırıcı üzerinde iyice çözülmüştür. 20 ml 2 N NaOH eklenmiştir. Ardından 30 g Rochelle salt (K-Na –Tartarat) ilave edilip son hacim saf suyla 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Standart grafik için glikoz çözeltisi: 100 mg glikoz 100 ml saf suda çözülerek glikoz çözeltisi hazırlanmıştır.

3.1.3. Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri

Cihazlar	Marka
Buzdolabı	Beko
Çalkalamalı İnkübatör	ZHWY-200D
Etüv	Memmert UN55
Otoklav	Hirayama
PH Metre	Schott ph- metter CG840
Saf su cihazı	Barnsteat easy püre UV/UF
Soğutmalı santrifüj	Herml Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	Shimadzu UV-1800 Plus
Otomatik pipet	Eppendorf
Hassas terazi	Gecavery (UK)
Steril Kabin	Esco Laminer Flow Cabinet
Magnetik karıştırıcı	Chilten Hotplate Magnetic stirrer HSBI
Pastör fırını	Memmert IPP55
Çeker ocak	TOLKİM
Vorteks	Fissons whırlı-mixer
Micro-Kjeldahl cihazı	Labconco
Gaz Kromotografi cihazı	Varian CP-3800
Fırın	Thermolyne 62 700
ICP	Perkin-Elmer, Optima 2100 DV, ICP/ OES, Shelton, CT 06484-4794

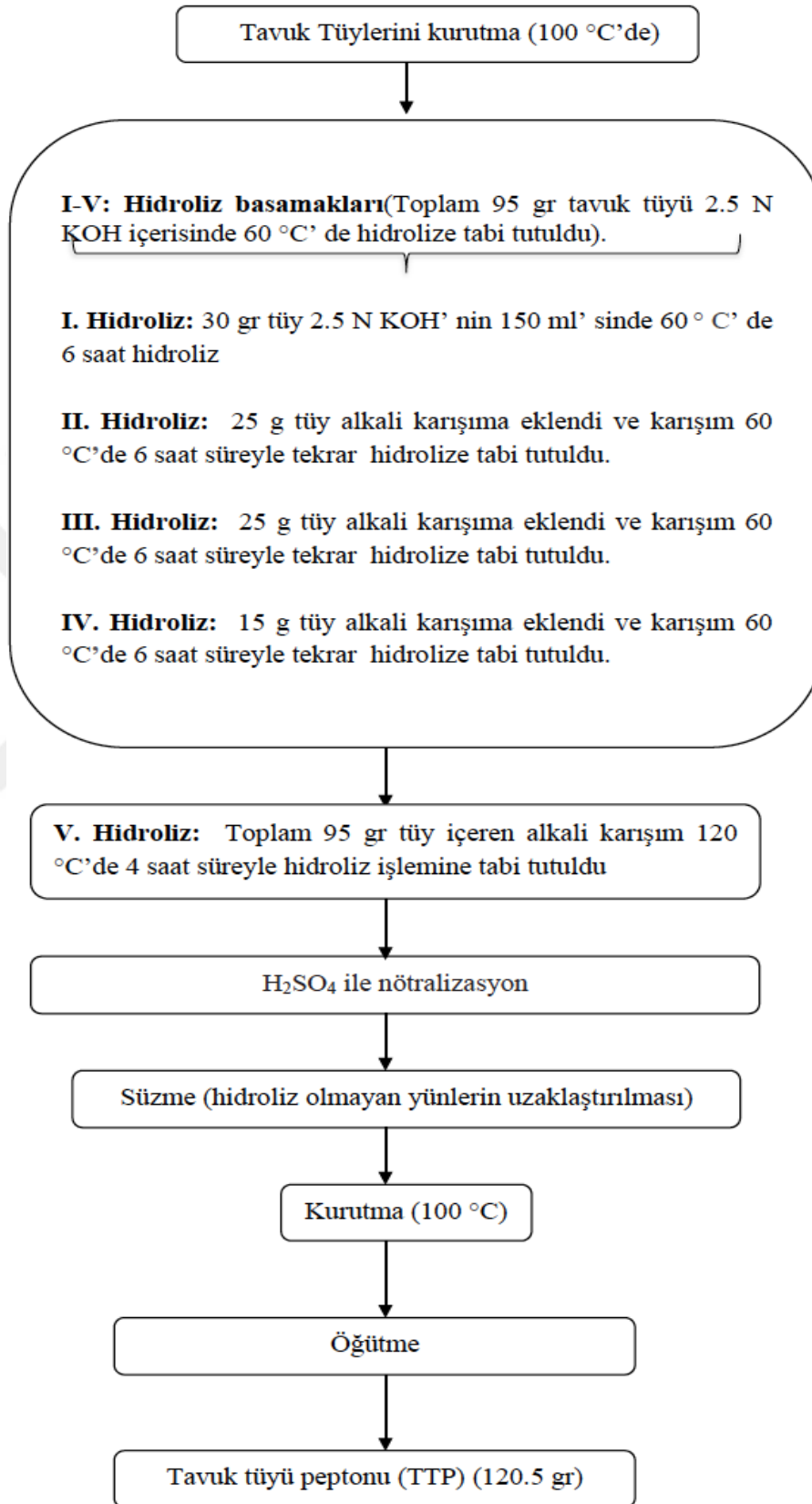
3.2. Metotlar

3.2.1. Çalışmada kullanılan ortamın ve malzemenin temizliği ve sterilizasyonu

Bu çalışmada kullanılan tüm cam malzemeler ve pipet uçları Hirayama marka otoklavda 121°C’de 15dk sterilizasyon işlemine tabi tutuldu.

3.2.2. Tavuk tuyu peptonunun üretimi

Çalışmada kullanılan tavuk tüyleri Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Çiftliği’nden temin edildi. Tavuk tüyleri ilk olarak 100°C’de sabit ağırlığa gelinceye kadar fırında kurutuldu. Daha sonra tavuk tüylerinden Taskin *et al.* 2016’ya göre bazı modifikasyonlarla pepton üretimi gerçekleştirildi. Bu doğrultuda ilk olarak tavuk tüylerinin 2,5 N KOH ile hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Hidroliz işlemlerinde toplam 95 gr tavuk tüyü kullanılmıştır. Ancak hidroliz yöntemi Şekil 3.1’de gösterildiği gibi tavuk tüyü 4 aşamada yani her seferinde hidroliz karışımına yeni tavuk tüyleri eklenecek şekilde dizayn edilmiştir. Tavuk tüylerinin tam hidrolizi gerçekleşmesi amacıyla son hidroliz işlemi yani 5. aşama daha yüksek bir sıcaklıkta (120°C’de) gerçekleştirildi. Hidroliz işleminin ardından 1 L hacmindeki cam şişenin içerisindeki karışım H₂SO₄ ile nötralize edilmiştir. Elde edilen hidrolizat Whatman filtre ile süzölmüş ve çözünmeyen fraksiyonlar uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hidrolizat pastör fırınında 100°C’de kurutma işlemine tabi tutuldu. Son olarak kuru numune blender ile öğütölerek toz haline getirilmiş ve böylece tavuk tüyü peptonu elde edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. Tavuk tüyü peptonunun üretim şeması



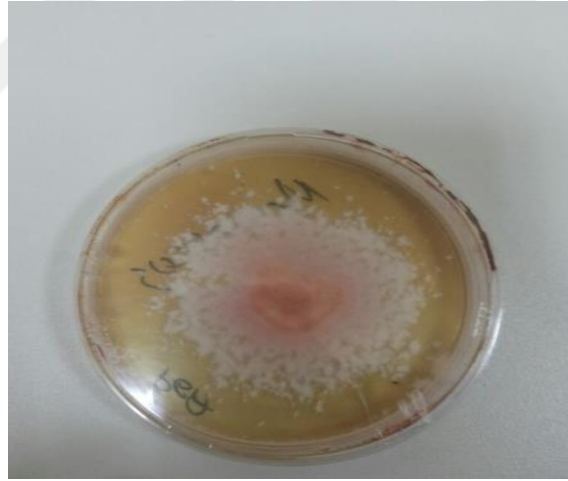
Şekil 3.2. Toz halindeki tavuk tüyü peptonu

3.2.3. Tavuk tüyü peptonunun kimyasal içeriğinin belirlenmesi

Üretilen peptonun toplam protein,  eker, ya  ve k l i erikler inin yanı sıra aminoasit ve element analizi de yapıldı. Toplam  eker içeriği fenaol sülfirik asit metoduna göre (standart olarak glikoz kullanılmış) belirlenmiştir (Dubois *et al.* 1956). Azot içeriği micro-Kjeldahl cihazı (Labconco Corporation, Kansas City, MO, USA) ve toplam protein içeriği azot içeriğini 6.25 faktörü ile çarpılmasıyla tespit edildi. Aminoasit analizi, amino asit analiz kiti ile (Phenomenex Inc., Torrance, California, USA) gaz kromatografi cihazında (Varian CP-3800, Varian Inc., PaloAlto, California, USA) gerçekleştirildi. Toplam ya  içeriği, Soxhlet cihazında solvent olarak dietil ether kullanılarak belirlenmiştir. K l içeriği, kuru numune fırında (Thermolyne 62 700, Barnstead/Thermolyne Corp., Dubuque, IA, USA) 550 C’de 3 saat yakarak belirlendi. Peptondaki makro ve mikroelementlerin içeriği, ICP kullanılarak tespit edilmiştir (Perkin-Elmer, Optima 2100 DV, ICP/OES, Shelton, CT 06484-4794, USA) (Mertens 2005a; Mertens 2005b).

3.2.4. Çalışmada kullanılacak olan mikrofungusun aktifleştirilmesi ve inokulum hazırlanması

Çalışmada kırmızı pigment üretimi için standart strain olarak *Monascus purpureus* ATCC16365 küfö kullanılmıştır. Çalışmanın amacına uygun olarak *M. purpureus* ilk olarak Patates Dektroz Agar besiyeri içeren petriler üzerinde aktifleştirilmiştir. Bunun için yatık agar kültüründe saklanan küfden bir öze yardımıyla küçük bir parça alınıp PDA besiyerinin yüzeyine nokta ekim yapıldı. Ekim yapılan besiyeri ardından 30°C’de etüvde 10 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda PDA besiyeri üzerinde aktifleşen küf miselyumu steril bir lanset yardımıyla 1 x 1cm ebatında parçalara ayrılmış ve parçaların bir tanesi üretim çalışmalarında kullanılacak olan besiyerinin inokulasyonu için kullanılmıştır.



Şekil 3.3. Patates dekstroaz agar besiyerinde aktifleştirilen *M. purpureus*

3.2.5. *M. purpureus* ile pigment üretiminin gerçekleştirilmesi

Pigment üretim çalışmaları sadece glikoz ve pepton içeren sıvı besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Besiyerlerinin pH’sı 5,5’e ayarlandıktan sonra otoklavda steril edilmiş ve ardından oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Şekil 3.3’de gösterildiği gibi PDA üzerinde aktifleştirilen küf miselinden kesilip çıkartılan bir parça steril şartlar

altında gp (glikoz, pepton) besiyerine aşılandı. Aşılanan besiyerleri çalkalamalı inkübatörde 30°C’de ve 150 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. Üretim çalışmalarının ilk aşamalarında besiyerinde pepton olarak tavuk tüyü peptonu (TTP) kullanılmıştır. Deneyler sırasında ilk olarak TTP’nin optimum konsantrasyonu belirlenmiştir. Bunun için 0-6 g/L arasında TTP konsantrasyonları test edilmiştir. Bu aşamada besiyerindeki glikoz (20 g/L) konsantrasyonu sabit tutulmuştur. Ardından optimum TTP konsantrasyonunu belirlemek için sırasıyla glikoz (0-60 g/L) konsantrasyonları test edildi. Bu parametrelerin belirlenmesi sırasında inkübasyon süresi 8 gün olarak seçilmiştir.

3.2.6. Kırmızı, sarı ve turuncu pigment üretiminde TTP nin diğer standart peptonlarla karşılaştırılması

TTP’nin pigment üretimindeki etkinliğini belirlemek için optimum konsantrasyondaki TTP, diğer iki standart peptonla (Balık Pepton=BP, Proteaz Pepton=PP) karşılaştırılmıştır ve 8 günlük inkübasyon periyodu boyunca 24 saat aralıklarla kültürden alınan örneklerin pigment (kırmızı, sarı ve turuncu), biyomas ve şeker tüketim analizleri yapıldı. Kültürlerin ayrıca morfolojisi analizleri de gerçekleştirildi.

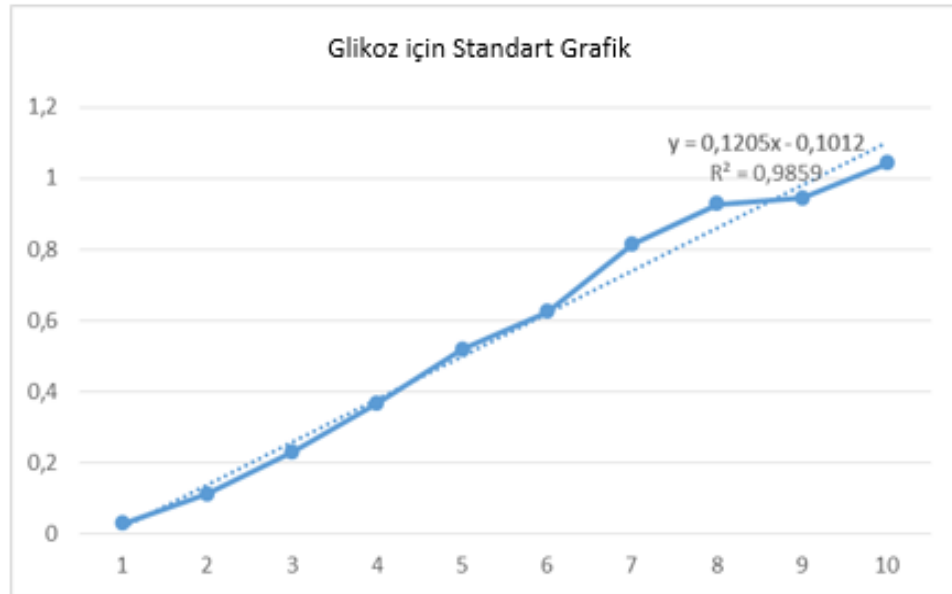
3.2.7. Pigment ve biyokütle analizi

Monascus purpureus pigmentlerinin analizi için De Santis *et al* (2005)’ün kullandığı analiz metodu birkaç modifikasyon gerçekleştirilerek takip edilmiştir. Öncelikle kültür sıvısından 10 ml örnek alınmıştır. Bu örnek üzerine 20 ml %96’lık EtOH ilave edilmiştir (kültür sıvısı 1’e 2 oranında seyreltilmiş oldu). 180 rpm’de 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örnekler 3780 g’de 15 dk santrifüj edilmiştir. Pigment analizi için supernatant Whatman kağıdı ile süzülmiştir. Örneklerdeki kırmızı pigmentin absorbansı için 500 nm dalgaboyunda, turuncu pigmentin absorbansı için 470 nm dalgaboyunda, sarı pigmentin absorbansı için ise 400 nm dalgaboyunda (Johns and Stuart 1991) Shimadzu UV 1800 spektrofotometre cihazı ile ölçüm yapılmıştır.

Santrifüj işleminin ardından elde edilen misel ise sabit ağırlığa gelinceye kadar 100°C’de kurutulmuştur.

3.2.8. DNS (Dinitrosalisilik asit) ile toplam şeker tayini

10 tüp ve kör olarak kullanılmak üzere 1 tüp Standart Grafik oluşturmak amacıyla hazırlanmıştır. Tüplere sırasıyla 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10 ml standart glikoz çözeltisi konulmuştur. Her bir tüpdeki standart glikoz çözeltisi içine 2 ml DNS ilave edilip saf suyla son hacim 15 ml’ye tamamlanmıştır. Hazırlanan tüpler 20 dakika 90°C’de sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Tüpler 20 dakikanın sonunda sıcak su banyosundan çıkartılıp soğutulmuştur. Oluşan kahverengi rengin absorbansı 550 nm’de kör çözeltiliye karşı 3 tekrar şeklinde okunmuştur. Okunan absorbansların ortalaması alınıp standart grafik hazırlanmıştır. Şeker tayini yapılacak numuneden 0.1 ml sıvı alınıp bu numuneye 1.9 ml saf su ve 2 ml DNS ilave edilmiştir. Elde edilen çözelti 20 dakika 90°C’de bekletilip saf suyla son hacim 15 ml’ye tamamlanmıştır. 550 nm’de 3 tekrar halinde ölçülüp ortalaması alınmıştır. Standart grafikten (Şekil 3.2) yararlanılarak şeker miktarı hesaplanmıştır (Miller 1959).



Şekil 3.4. Glikoz konsantrasyonu için standart grafik

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Üretilen Tavuk Tüyü Peptonunun Kimyasal İçeriğinin Belirlenmesi

Çalışmada toplam 95 g tavuk tüyü hidroliz işlemine tabi tutuldu ancak bunun 90 g'nın hidroliz edilebildiği görüldü. Hidroliz ve nötralizasyon işlemlerinde kullanılan (sırasıyla KOH ve H₂SO₄) kimyasallar ve hidroliz edilebilen tüyün (90 g) ağırlığından dolayı üretilen toplam pepton miktarı, 120,5 g'a ulaşmıştır. Üretilen peptonun (TTP) 100 g'ında; 67,2 g protein, 24,4 g kül, 0,53 g lipid ve 0,76 g şeker içerdiği tespit edildi.

Çizelge 4.1. Tavuk tüyü peptonunun içeriği

Bileşenler (g/100 g)	Peptonlar		
	TTP	BP	PP
Toplam protein	67,2	72,8	83,8
Toplam şeker	0,76	1,33	1,13
Toplam lipid	0,53	0,46	0,72
Kül	24,4	6,3	8,2

TTP'nin kimyasal içeriği iki tekerrür olarak analiz edilmiştir. İki standart peptonun (BP ve PP) içeriği Taskin and Kurbanoglu (2011)'e göre verilmiştir. TTP = Tavuk Tüyü Pepton, BP = Balık Pepton, PP = Proteaz Pepton

TTP içerisindeki en yüksek aminoasit içeriğinin sırasıyla valin (7090 mg/100 g) ve glutamik asidin (6768 mg/100 g) sahip olduğu belirlendi. Bu iki aminoasidi sırasıyla glisin, lösin, alanin, serin ve prolin izledi. Peptonda ayrıca kükürtlü aminoasitlerden sistin de olduğu görülmüştür. TTP'de metiyonin aminoasidine rastlanmadı.

Çizelge 4.2. TTP ve diğer standart peptonların aminoasit içeriği

Amino asitler (mg/100 g)	Peptonlar (100 g)		
	TTP	BP	PP
Valin	7090	6726	4748
Glutamik asid	6768	7474	11708
Glisin	5900	7535	7000
Lösin	4897	7635	6084
Alanin	4618	4653	5717
Serin	4491	5388	3740
Prolin	3494	2203	1746
Aspartik asit	3217	5063	6933
İzolösin	3174	2390	3322
Fenilalanin	2950	2024	2666
Sistin	1206	1210	0.967
Treonin	2323	2626	3223
Lizin	2117	8049	7177
Hidroksil-L-prolin	1914	-	-
Tirozin	1622	1799	2360
Histidin	0.331	1465	2041
Metiyonin	-	2042	2085
Triptofan	-	0.866	-

TTP'nin aminoasit içeriği iki tekerrür olarak analiz edilmiş ve ortalama değerler alınmıştır. İki standart peptonun (BP ve PP) içeriği Taskin and Kurbanoglu (2011)'e göre verilmiştir. TTP=Tavuk Tüyü Pepton, BP=Balık Pepton

Peptonun element içeriği analiz edildiğinde en fazla miktarda potasyum (K) bulunduğu bunun ardından da kükürt'ün (S) geldiği belirlendi (sırasıyla 100 g peptonda 16340 mg ve 3820 mg), ayrıca peptonda Mn, Zn ve Cu gibi iz elementlere de rastlandı.

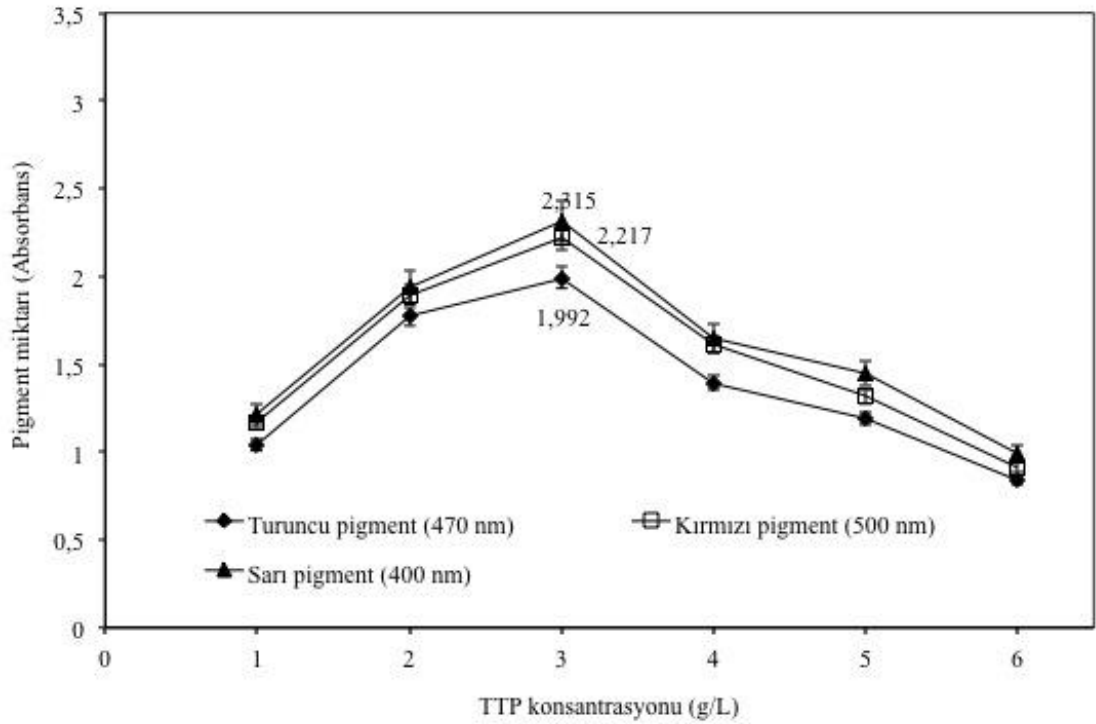
Çizelge 4.3. TTP'nin element içeriği

Elementler	mg/100 g TTP
K	16340
S	3820
P	337
Ca	196
Na	178
Mg	165
Fe	146
Zn	60
Cu	50
Mn	30

TTP'nin element içeriği iki tekerrür olarak analiz edilmiş ve ortalama değerler alınmıştır.

4.2. Pigment Üretimi İçin Peptonun Optimal Konsantrasyonunun Belirlenmesi

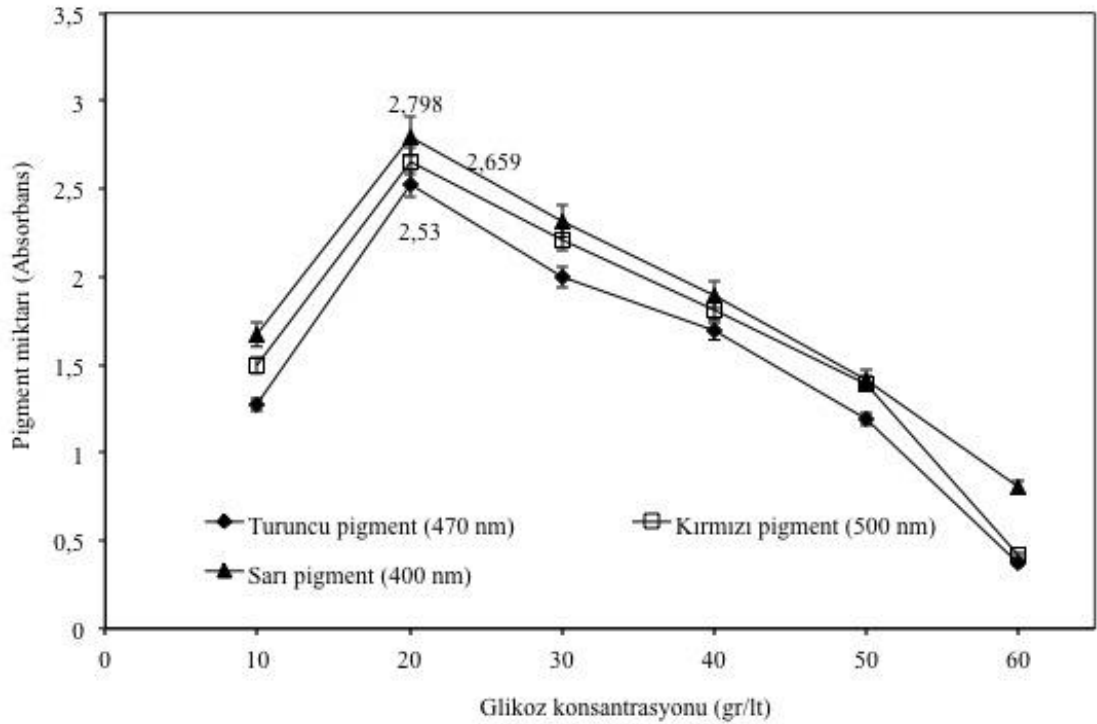
0 ile 6 g/L arasında test edilen TTP konsantrasyonlarında 8 günlük inkübasyon peryodunun sonunda her üç pigment türü için de maksimum üretim 3 g/L TTP ile başarıldı. 3 g'ın üzerindeki TTP konsantrasyonlarının ise pigment üretimini kademeli olarak azalttığı belirlendi. Maksimum absorbanslar sarı, turuncu ve kırmızı pigmentler için sırasıyla ve 2,315; 1,992 ve 2,217 olarak ölçüldü. Test edilen pepton konsantrasyonlarının hepsinde en yüksek absorbanslar sarı ve bunun ardından da kırmızı pigment için kaydedildi. Pepton içermeyen besiyerlerinde ise büyüme ve pigment üretimi gözlemlenmedi.



Şekil 4.1. *M.purpureus* ile pigment üretimi üzerine TTP konsantrasyonunun etkisi
Kültür koşulları: glikoz 30 g/L, sıcaklık 30°C, pH 5,5 , çalkalama hızı 150 rpm ve inkübasyon süresi 8 gün.

4.3. Pigment Üretimi İçin Optimal Glikoz Konsantrasyonunun Belirlenmesi

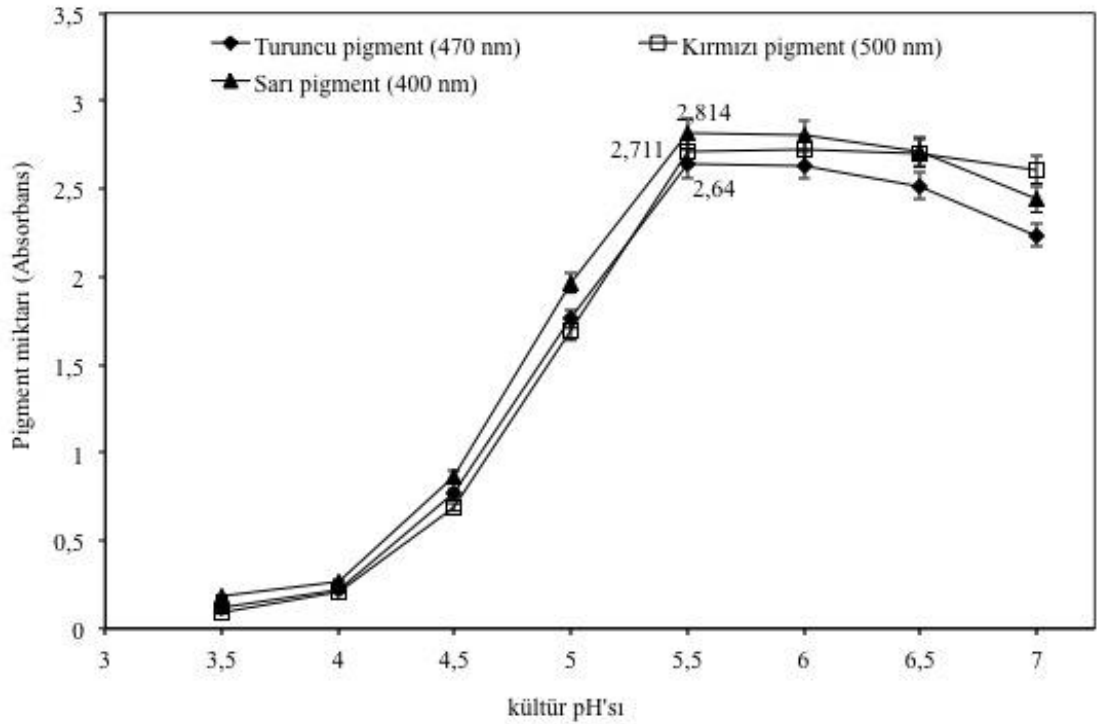
TTP'nin 3 g/L'lik optimal konsantrasyonunda karbon kaynağının (glikoz) farklı konsantrasyonlarının kırmızı pigment üretimi üzerine etkisi araştırıldı. Şekil 4.2'de de görülebileceği gibi her üç pigment için de maksimum absorbanslar 20 g/L glikoz konsantrasyonu ile elde edilmiştir. Bu optimal glikoz konsantrasyonunda sarı, turuncu ve kırmızı pigmentin maksimum absorbansları sırasıyla 2,798; 2,530 ve 2,659 olarak belirlenmiştir. Bütün glikoz konsantrasyonlarında maksimum absorbanslar sarı pigment ve bunun ardından kırmızı pigment için elde edildi. Pigment üretimi üzerine glikozun etkisi Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. *M. purpureus* ile pigment üretimi üzerine glikoz konsantrasyonunun etkisi
Kültür koşulları: TTP 3 g/L, sıcaklık 30 0C, pH 5,5, çalkalama hızı 150 rpm ve inkübasyon süresi 8 gün

4.4. Pigment Üretimi ve TTP'nin Çözünürlüğü Üzerine pH'nın Etkisi

TTP'nin çözünürlüğünün pH 5,5'in altındaki değerlerde azaldığı görülmüştür. Örneğin, pH 5,5'e oranla pH 5,0'da bile otoklavlanma işleminin ardından besiyerinde pepton kaynaklı çökelmeler ortaya çıktı. TTP'deki çökeltme pH 3,0'da maksimum seviyeye ulaştı. pH 5,5 ve üzerindeki pH'larda ise herhangi bir çökeltme meydana gelmedi. Maksimum pigment üretimi pH 5,5 ve pH 6,0'da elde edildi, bu iki pH'da üretilen pigment miktarları arasında da çok önemli bir farklılık tespit edilmedi. Hatta toplam pigment miktarı (absorbans olarak) pH 5,5'de nispeten daha yüksek değerlere ulaşıldı. Sarı, turuncu ve kırmızı pigment konsantrasyonları pH 5,5'de sırasıyla 2,814; 2,640 ve 2,711 pH 6,0'da ise 2,808; 2,635 ve 2,719 olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.3. *M. purpureus* ile pigment üretimi üzerine pH'nın etkisi

Kültür koşulları: Glikoz 30 g/L, TTP 3 g/L, sıcaklık 30°C, çalkalama hızı 150 rpm ve inkübasyon süresi 8 gün

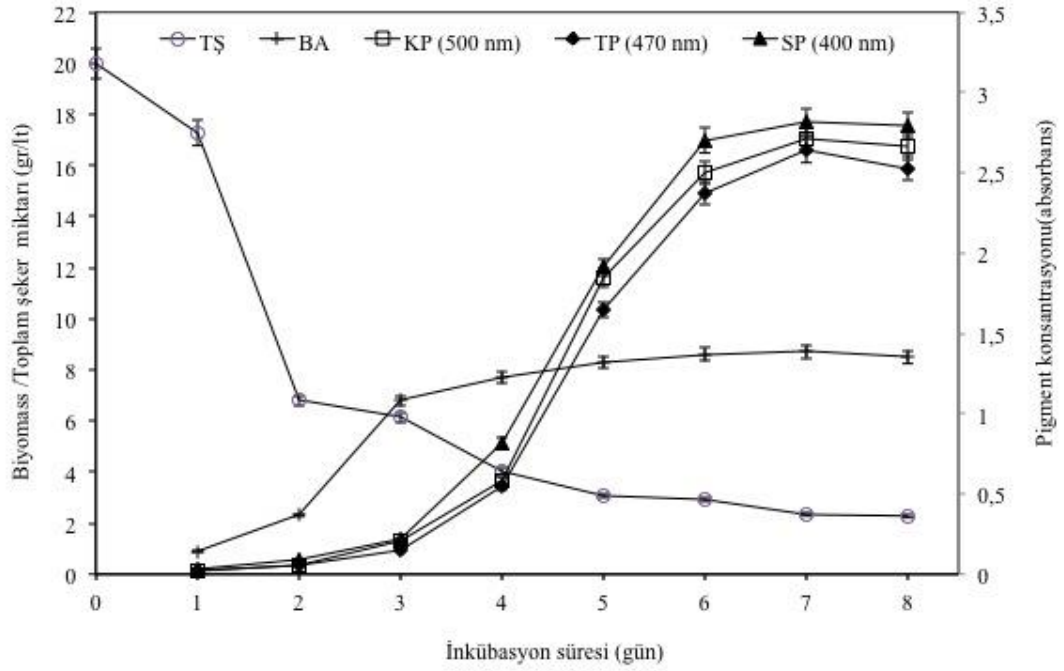
4.5. Pigment Üretiminde TTP ve Diğer Peptonların Karşılaştırılması

Pepton (3 g/L) ve glikoz (20 g/L) konsantrasyonları sabit tutularak TTP diğer iki standart peptonla karşılaştırıldı. Besiyerleri görsel olarak incelendiğinde inkübasyonun ilk gününde peptolu besiyerlerinin hiçbirinde dikkate değer misel gelişimi ve pigment üretimi tespit edilmedi. Besiyerlerinin hepsinde en fazla fungal gelişim ve dolayısıyla da biyomas üretimi inkübasyonun 2. ile 4. günler arasında (özellikle 2 ile 3 günler arası) meydana gelmedi. Biyomas üretimi 4. günden itibaren kademeli olarak yavaşdı ve 7. günden itibaren besiyerlerinin hiçbirinde biyokütle artışı gözlenmedi. Hatta 7. güne oranla 8. günde besiyerlerinin hepsinde daha az biyokütle miktarları tespit edildi. 7. günün sonunda TTP, PP ve BP besiyerlerinde elde edilen biyomas miktarları (sırasıyla 8,7; 8,9 ve 8,4 g/L) birbirine son derece yakın bulundu. Pepton besiyerlerinde en fazla şeker tüketimi ilk beş günde özellikle de 1. ve 2. günler arasında meydana geldi. 5. günden itibaren şeker tüketimi yavaşladı hatta 7. ve 8. günler arasında çok az bir şeker

tüketimi gerçekleşti. 7. günün sonunda TTP, PP ve BP besiyerlerindeki arta kalan şeker miktarı sırasıyla 2,35; 2,91 ve 3,11 g/L olarak hesaplandı.

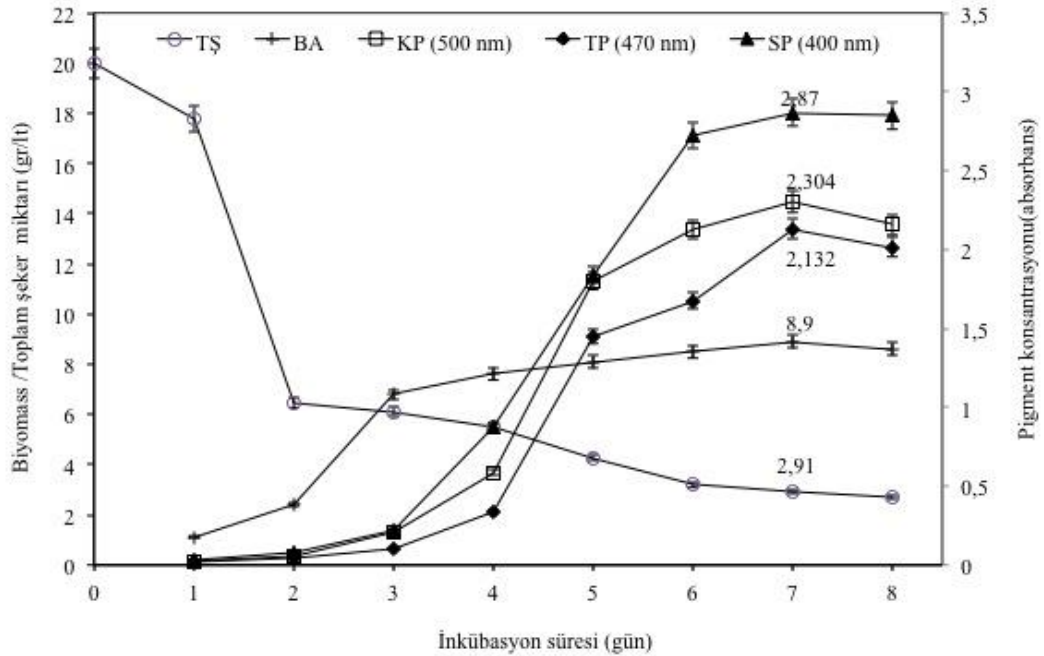
Misel büyümesinin aksine pepton besiyerlerinin hiçbirinde ilk üç günde gözle görülür bir pigment oluşumu meydana gelmedi. 4. günden itibaren ise besiyerlerinde hızlı bir turuncu-kırmızı renk oluşumu gözlemlendi. Bu durum spektrofotometrik ölçümlerde ortaya kondu ve sonuçlar Şekil 4.3’de verildi. Şekil 4.4, 4.5 ve 4.6’dan da görülebileceği gibi TTP ve diğer pepton besiyerlerinin hiç birinde inkübasyonun ilk 3 gününde kayda değer bir pigment absorbansı elde edilememiştir. Örneğin, kırmızı pigmentin absorbansı 3. günün sonunda TTP, PP ve BP besiyerlerinde sadece 0,208; 0,203 ve 0,334’lık çok düşük absorbanslarda kaldı. Spektrofotometrik ölçümlerden de görülebileceği gibi pigment üretiminde maksimum artış 4. günden itibaren başladı ve bu artış 7. günün sonuna kadar devam etti. 8.günde ise 7. güne oranla pigmentlerin konsantrasyonunda herhangi bir artış tespit edilmedi. Tam tersine, pigmentlerin absorbanslarında 8. günde düşüş gözlemlendi. 7 günlük inkübasyon periyodunun sonunda TTP, PP ve BP besiyerlerindeki sarı pigment absorbansları sırasıyla 2,819; 2,870 ve 2,831 kırmızı pigment absorbansları 2,709; 2,304 ve 2,748 turuncu pigment absorbansları ise 2,643; 2,132 ve 2,743 olarak ölçüldü. Sonuçlardan da görülebileceği gibi sarı pigment üretimi için her üç peptonun potansiyeli de birbirine son derece yakın bulundu. BP ve TTP besiyerlerin aksine PP besiyerinde üretilen kırmızı ve turuncu pigment miktarları nispeten daha düşük değerlerde kalmıştır.

Pepton besiyerlerinin hepsinde ortalama 7 mm çapında tek tipte pelet formunda misel büyümesi meydana geldi. Ancak, 7. günden itibaren peletlerin parçalanmaya başladığı görüldü. 7. Günün sonunda TTP, BP, PP besiyerlerinin final pH’sı 5,09; 4,08 ve 4,33 olarak ölçüldü.



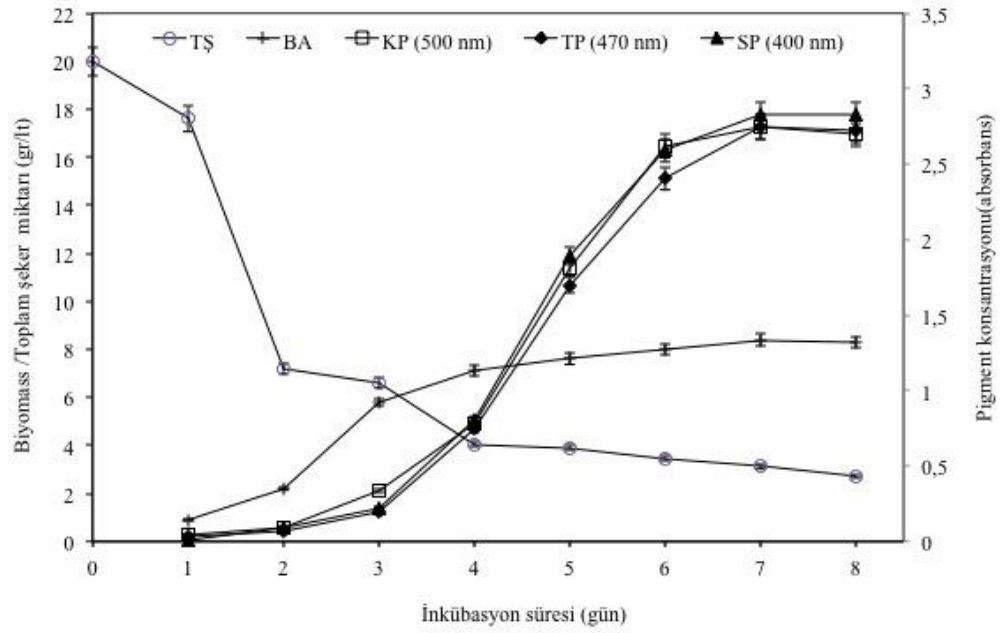
Şekil 4.4. TTP besiyerinde *M. purpureus* ile pigment ve biyomas üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

Kültür koşulları: TTP 3 g/L, glikoz 20 g/L, sıcaklık 30°C, pH 5,5 ve çalkalama hızı 150 rpm.



Şekil 4.5. PP besiyerinde *M. purpureus* ile pigment ve biyomas üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

Kültür koşulları: TTP 3 g/L, glikoz 20 g/L, sıcaklık 30°C, pH 5,5 ve çalkalama hızı 150 rpm



Şekil 4.6. BP besiyerinde *M. purpureus* ile pigment ve biyomas üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

Kültür koşulları: TTP 3 g/L, glikoz 20 g/L, sıcaklık 30°C, pH 5,5 ve çalkalama hızı 150 rpm.



Şekil 4.7. TTP besiyerinde *M. purpureus* ile tek tip pelet formunda fungal büyüme ve pigment üretimi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. *M. purpureus* ile Pigment Üretimi İçin Peptonların Önemi ve Tavuk Tüyü Peptonunun Hazırlanması

Peptonlar besiyerlerinde kullanılan en önemli azot kaynaklarından biridir. Hâlihazırda bakto pepton, tripton pepton, kazein pepton ve et pepton gibi farklı kaynaklardan elde edilen ticari peptonlar mevcut olup endüstriyel, biyoteknolojik veya klinik öneme sahip bakterilerin, mayaların ve küflerin katı ve sıvı besiyerlerinde substrat olarak kullanılmaktadır.

Monascus purpureus küfü de endüstriyel ve biyoteknolojik öneme sahip önemli bir küftür. Literatürde bu küfün lovastatin gibi kolesterol düşürücü tıbbi öneme sahip maddeleri ve gıda endüstrisinde geniş kullanım alanı bulan sarı, kırmızı ve turuncu renkte pigmentleri ürettiği belirtilmektedir (Klimek *et al.* 2009; Wang *et al.* 2016). Yapılan araştırmalar, bu küfle pigment üretimi üzerinde azot kaynağının çok etkili olduğunu ve organik azot kaynakları olarak pepton ve maya ekstratının inorganik azot kaynağı olarak da amonyumun çok daha yüksek verimler sağladığını göstermektedir. (Chen and Johns 1993; Silveira *et al.* 2008). Diğer taraftan araştırmacılar, *M. purpureus* ile pigment üretiminde besiyeri maliyetinin düşürülmesinin çok önemli olduğunu ve bu doğrultuda da melas, gliserol, peynir altı suyu ve üzüm posası gibi organik atıkların besiyerinde karbon veya azot kaynağı olarak kullanılmasının üretim maliyetinin azaltılmasını katkı yapacağını belirtmektedirler (Silveira *et al.* 2008; Bühler *et al.* 2013; Nimnoi *et al.* 2015). *M. purpureus* ile pigment üretiminde organik azot kaynağı olarak peptonun önemini ve üretim çalışmaları sırasında besiyeri maliyetinin düşük olması gerektiği bilgisini göz önüne alarak, mevcut çalışmada organik atık özelliğinde olan bir maddeden pepton üretimi gerçekleştirilmiş ve bu peptonun *M. purpureus* ile pigment üretiminde kullanılabilirliği test edilmiştir. Pepton üretiminde ise atık madde olarak tavuk tüyleri kullanılmıştır.

Literatürde tavuk tüylerinin %90 civarında protein içeriğine sahip olduğu belirtilmektedir. Yüksek protein içeriğinden dolayı da tavuk tüyleri tavuk veya balık yemi olarak kullanılmaktadır (Bertsch and Coello 2005; Chor *et al.* 2013). Yapılan bazı çalışmalarda tavuk tüylerinin bitki gübresi olarak da kullanılabileceği belirtilmektedir (Korniłowicz-Kowalska and Bohacz 2011; Nayaka and Vidyasagar 2013).

Bununla birlikte, keratin formundaki protein bazı mikroorganizmalar hariç canlılar tarafından sindirilemediği için tavuk tüyleri hayvan yemi ya da bitki gübresi olarak kullanmadan önce kimyasal ya da enzimatik hidroliz işlemlerine tabi tutulmaktadır (El-Boushy *et al.* 1990; Grazziotin *et al.* 2006).

Son zamanlarda araştırmacılar enzimatik yada kimyasal hidroliz yöntemleriyle tavuk tüylerinden hazırlanan hidrolizatların mikroorganizmaların besiyerlerinde pepton olarak kullanılabileceğini de bildirmektedirler (Taskin and Kurbanoglu 2011). Ayrıca, tavuk tüyünden elde edilen peptonun glutatyon, polisakkarit, ve laktik asit üretiminde mikrobiyal substrat olarak kullanılabileceği de belirtilmektedir (Taskin *et al.* 2012b; Taskin 2013; Taskin *et al.* 2013). Hatta, *Rhodotorula glutinis* mayası ile karoten pigmenti üretiminde de tavuk tüyü peptonunun yüksek verim sağladığı bildirilmektedir (Taskin *et al.* 2011). Bu yüzden, mevcut çalışmada *M. purpureus* ile pigment üretiminde tavuk tüyü peptonunun substrat olarak kullanılabilirliği test edilmiştir.

Literatürde, peptonların mikroorganizmalara sadece organik azot değil aynı zamanda karbon ve mineral de sağlayabileceği belirtilmektedir (Taskin 2013; Taskin *et al.* 2016). Diğer taraftan, *M. purpureus* ile pigment üretimi üzerinde fosfor (P) ve magnezyum (Mg)'un olumsuz etki (Lind and Demain 1991) yaptığı belirtilmektedir.

Bu bilginin ışığında, mevcut çalışmamızda tavuk tüyü peptonu hazırlanırken hidroliz ve nötralizasyon işlemlerinde kullanılan kimyasalların P ve Mg elementlerini içermemesine dikkat ettik. Bu doğrultuda ise hidroliz işlemini KOH, nötürleştirme işlemini ise H₂SO₄ ile gerçekleştirdik. Dahası, KOH'in keratin içeren materyallerin hidrolizinde iyi sonuçlar verdiği de rapor edilmektedir (Gousterova *et al.* 2003; Mokrejs

et al. 2011a, b). Literatürde keratin proteinlerinin hidrolizinde HCl'nin de iyi sonuçlar verdiği belirtilmektedir. Ancak, HCl kullanımından dolayı son üründe yüksek Cl varlığı kaçınılmaz olmaktadır (Taskin and Kurbanoglu 2011). Yüksek Cl içeriği ise *M. purpureus* ile pigment üretiminde inhibisyon etkisi yapmaktadır. Bu yüzden, Şekil 3.1'de gösterildiği gibi tavuk tüyü peptonunun üretimi sırasında (hidroliz veya nötralizasyon aşaması) HCl kullanılmamıştır. Kısaca, hidroliz ve nötralizasyon işlemleri için pigment üretimini artıracak düşünülen K gibi elementleri sağlayan kimyasallar tercih edilmiştir. Çünkü literatürde K elementinin pigment üretiminde çok önemli olduğu bu elementi fungusa sağlamak içinde KH_2PO_4 'ün 1-3 g/L gibi yüksek konsantrasyonlarda besiyerine katılması önerilmektedir (Lin and Demain 1991; Moharram *et al.* 2012; Tan *et al.* 2012; Chen *et al.* 2016).

Tavuk tüylerinin hafif ve hacimleri fazla olduğundan dolayı çok fazla yer kaplamaktadır (yüksek katı/sıvı oranı). Bu yüzden düşük miktarlardaki sıvılar içerisinde hidrolizleri iyi sonuçlar vermemektedir. Bu sorunu çözmek için Şekil 3.1'de gösterildiği gibi 95 gr tavuk tüyü 150 ml KOH içerisine aynı anda eklenmek yerine, kısım kısım küçük miktarlar halinde eklenmiştir. Diğer bir ifadeyle, mevcut tüyler hidroliz edildikten sonra yeni tüy eklenmesi gerçekleştirilmiştir. Ortama eklenen tüylerin bir kısmının IV. hidroliz işleminin sonunda hidroliz olmadığı görülmüştür. Bu yüzden alkali karışımın doygunluğa ulaştığı ve daha fazla tüyü hidroliz edemeyeceği sonucu çıkarılmış ve hidroliz karışımına yeni tüy eklenmesi yapılmamıştır. Nötralizasyon işleminin ardından gerçekleştirilen süzme işleminden sonra da tavuk tüylerinin bir kısmının hidroliz olmadığı görsel olarak tespit edilmiş ve hidroliz olmayan bu kısım 5 gr olarak tartılmıştır. Dolayısıyla, 2,5 N 150 ml KOH çözeltisi içerisinde 95 g tavuk tüyünün maksimum olarak 90 g'nın hidroliz edilebileceği bulunmuştur.

5.2. Tavuk Tüyü Peptonunun Kimyasal İçeriği

Tavuk tüyü peptonunun kimyasal içeriği analiz edildiğinde mikroorganizmaların genel besin ihtiyaçlarını karşılayacak olan karbon kaynağı, azot (protein), aminoasit ve elementleri içerdiği görülmüştür. Peptonun içerisinde en yüksek içeriğin protein (67.2

gr/100 gr) olduğu görülmüştür. Proteinin ardından ikinci yüksek içerik kül için ölçülmüştür. Bu durum pepton üretim sürecinde kimyasal yöntemin kullanılmasıyla açıklanmaktadır. Çünkü, kimyasal yöntemlerle pepton üretim süreçlerinde hidroliz ve nötralizasyon işlemleri sırasında yüksek miktarlarda asit ve bazlara ihtiyaç duyulduğu için oluşan son üründe (peptonda) kül miktarının yüksek olduğu rapor edilmektedir (Kurbanoglu and Kurbanoglu 2004; Taskin and Kurbanoglu 2011; Taskin 2013). Oluşan yüksek kül miktarı da pepton içerisindeki toplam protein yüzdesini azaltmaktadır. Gerçekten de, Çizelge 4.1’de de görülebileceği gibi TTP enzimatik yöntemlerle hazırlanan diğer standart peptonlardan daha düşük protein içeriğine sahiptir. Bununla birlikte TTP, kimyasal hidroliz yöntemleriyle hazırlanan literatürdeki bazı peptonlardan daha yüksek protein içeriğine sahiptir. Örneğin, Kurbanoglu and Kurbanoglu (2004)’nın boynuzdan hazırlamış olduğu peptonun protein içeriği 50 g protein/100 g pepton olarak belirtilmiştir. Taskin and Kurbanoglu (2011)’in asit hidroliziyle hazırlamış olduğu peptonun protein içeriği 55,8 g protein/100 g pepton olarak rapor edilmiştir. Kimyasal yöntemlerle hazırlanan bazı peptonların protein içeriği ise mevcut peptonun protein içeriğine yakın bulunmuştur. Örneğin, Taskin (2013) tarafından üretilen tavuk tüyü peptonun protein içeriği 61,1 g protein /100 g pepton, Taskin *et al.* (2016)’un üretilen peptonun içeriğinde 67,8 g protein /100 g pepton olarak rapor edilmiştir. Literatürde tavuk tüylerinde şeker olduğu rapor edilse de, mevcut çalışmada tüylerden üretilen TTP de şeker olmadığı belirlenmiştir. Bu durum, önceki çalışmalarda da rapor edildiği şekilde hidroliz işlemlerinde kullanılan kimyasalların şekerleri parçalayıcı etkisiyle açıklanmıştır (Taskin 2013; Taskin *et al.* 2016). Peptonun element içeriği analiz edildiğinde test küfünün mineral ihtiyacını karşılayacak şekilde makro (K, S, Na, Mg, Ca ve Fe) ve bir çok mikro (Mn, Zn ve Cu) elementlere sahip olduğu tespit edilmiştir. Özellikle, K ve S içerikleri TTP’de son derece yüksek bulunmuştur. Bu durum, yukarıda da belirtildiği şekilde hidroliz ve nötralizasyon işlemlerinde sırasıyla KOH ve H₂SO₄ kullanılmasıyla açıklanmıştır. Yüksek K ve S içeriği TTP için çok önemli bir avantaj olarak kabul edilebilir. Çünkü, S bir çok aminoasidin (sistein, metiyonin, biyotin ve tiyaminin)’in yanı sıra bazı karbonhidratların sentezi için gereklidir. Potasyum (K⁺), ise protein sentezinde görev alan enzimler dahil bir çok enzimin aktivitesinde görev almaktadır (Brock *et al.* 1994; Prescott *et al.* 2002).

Dahası, yine yukarıda belirtildiği gibi *M. purpureus* ile pigment üretiminde özellikle K elementin teşvik edici role sahip olduğu bildirilmektedir.

5.3. Tavuk Tüyü Peptonu ile Pigment Üretiminin Optimizasyonu

Literatürde *M. purpureus* ile pigment üretiminin besiyerinde kullanılan karbon ve azot kaynağının konsantrasyonundan çok fazla etkilendiği belirtilmektedir. Hatta, karbon ve azot kaynağının üretilen pigment türünü de etkilediği rapor edilmektedir (Wong and Koehler 1981; Lee *et al.* 2001). Bu yüzden mevcut çalışmada azot (pepton) ve karbon kaynağı (glikoz) konsantrasyonları araştırılmış ve ilk olarak pepton konsantrasyonları test edilmiştir. Deneyler sonucunda, glikoz konsantrasyonu sabit tutulduğunda optimal TTP konsantrasyonunun 3 g/L olduğu tespit edilmiştir. Pepton konsantrasyonu sabit tutulup glikoz konsantrasyonu test edildiğinde optimum konsantrasyon 20 g/L olarak bulunmuştur. Bu durum besiyerinin karbon: azot oranıyla açıklanabilir. Bu yüzden takip eden aşamalarda 20 g glikoz ve 3 g TTP içeren besiyeri kullanılmıştır. Kültür pH'sının pigment üretimi üzerine etkisi araştırıldığında maksimum pigment üretiminin pH 5,5 ve pH 6,0'da görüldüğü hatta bu iki pH'da üretilen pigment miktarları arasında da çok önemli bir farkın olmadığı tespit edilmemiştir. Bununla birlikte, toplam pigment miktarı (absorbans olarak) pH 5,5'de nispeten daha yüksek değerlere ulaşıldığı görülmüştür. Sarı ve turuncu pigment üretimi pH 5,5 ile karşılaştırıldığında pH 6,0'da az da olsa bir düşüş gösterse de tam tersine kırmızı pigment üretiminde az da olsa bir artış görülmüştür. Yapılan önceki çalışmalarda da *M. purpureus* ile kırmızı pigment üretiminde pH 5,5 ve 6,0 in genellikle maksimum sonuçlar verdiği belirtilmektedir (Orozco *et al.* 2008). Mevcut çalışmada pH 5,5'in altındaki değerlerde her üç pigmentin absorbansında da hızlı düşüşler gözlenmiştir. Bu durum ise çalışmada kullanılan TTP'nin pH 5,5'in altında düşük çözünürlüğe sahip olmasıyla açıklanmıştır. Çünkü araştırma bulgularında da bahsedildiği gibi pH 5,5' aksine pH 5,0'da bile otoklavlanma işleminin ardından besiyerinde büyük miktarda pepton kaynaklı çökeltme ortaya çıkmıştır. Oysa, pH 5,5 ve üzerindeki pH'larda ise herhangi bir çökeltme meydana gelmemiştir. Peptonun çözünürlüğü azaldığı için de pigment üretimi için gerekli olan azot kaynağı pH 5,5'in altında test mikroorganizmasına yeterince sağlanamamış ve bu

yüzden de pigment üretimi sınırlı kalmıştır. TTP'nin düşük pH'larda düşük çözünürlük göstermesi ise hidroliz işleminde asit yerine bazik özellikteki KOH kullanılmasıyla açıklanmıştır. Bu sonuçlara dayalı olarak, TTP'nin pH 5,5'in üzerinde gerçekleştirilecek mikrobiyal çalışmalarda substrat olarak kullanılmasının daha uygun olacağı görüşü ileri sürülebilir.

TTP diğer iki standart peptonla karşılaştırıldığında maksimum pigment ve biyomass konsantrasyonlarına 7. günün sonunda ulaşılmış ve daha uzun inkübasyon süreleri pigment ve biyomas konsantrasyonlarını azaltmıştır. Oysa, düşük miktarlarda da olsa bütün pepton besiyerlerinde 7. günde şeker varlığı tespit edilmiştir. Şeker varlığına rağmen 7. günden itibaren pigment veya biyomass üretilmemesi ise besiyerindeki diğer besinsel öğelerin tükenmesiyle açıklanmıştır. 7. günden itibaren besinsel öğeler tükendiği için test küfü canlılığını kaybetmeye başlamış ve biyomasda azalma meydana gelmiştir. Uzatılmış inkübasyon sürelerinde besinsel öğelerin tükenmesine bağlı olarak küflerin biyomaslarında ortaya çıkan azalma (fungal lizis) önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (Lee *et al.* 2001; Taskin *et al.* 2011a). 7. günden sonra pigment konsantrasyonundaki azalma ise enzimatik yıkımla açıklanabilir. Çünkü, literatürde besin kıtlığının *M.purpureus*'da bazı enzimleri aktive ettiği ve bu enzimlerinde pigment yıkımına yol açtığı belirtilmektedir (Lee *et al.*, 2001). Pepton besiyerlerinde ilk günlerinde (logaritmik aşama) çok az pigment üretiminin gerçekleştiği ancak 4.günden itibaren pigment üretiminin hızla arttığı tespit edilmiştir. Yine bu bulguda, *M. purpureus*'da pigment üretiminin genellikle durağan fazdan sonra gerçekleşmeye başladığını gösteren önceki çalışmalardakilere benzerlik göstermektedir (Tseng *et al.* 2000; Lee *et al.* 2001; Orozco *et al.* 2008). Belirlenen optimal inkübasyon periyodunun sonunda pepton besiyerlerinin hepsinde en yüksek sarı pigment ve bunun ardından da kırmızı pigment için absorbans elde edilmiştir.

Çalışma sonucunda elde edilen bulgular göstermektedir ki;

1. Protein bakımından zengin atık özelliğindeki tavuk tüylerinden hazırlanan peptonlar *M. purpureus*'la pigment üretiminde başta organik azot kaynağı olmak üzere iyi bir susbtrat olarak kullanılabilir.
2. Hazırlanan peptonun element içeriği pigment üretimini teşvik edecek şekilde uygun kimyasallar kullanılarak düzenlenebilir.
3. Mevcut peptonun üretiminde ucuz ve atık özelliğindeki tavuk tüylerinin yanısıra ucuz kimyasallar kullanıldığı için mevcut peptonun maliyeti pahalı enzimatik yöntemlerle üretilen standart peptonlardan daha düşüktür. Bu yüzden de, bu peptonun *M. purpureus*'un kültüründe kullanılmasıyla besiyeri maliyeti azaltılabilir.

KAYNAKLAR

- Ahmad, M. and Panda, P.B., 2014. Optimization of red pigment production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under solid-state fermentation using response surface methodology. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 36 (4), 439-444.
- AL-Bahri, M.B.A.G., AL-Naimi, S.A. and Ahammed, S.H., 2009. The optimum conditions for production of soya peptone by acidic hydrolysis of soya proteins. *Al-Khwarizmi EngJ.* 5, 1-19.
- Anese, M., Manzano, M. and Nicoli, M.C., 1997. Quality of minimally processed apple slices using different modified atmosphere conditions. *J. Food Qual.*, 20, 359 - 370.
- Aspmo, S.I., Horn, S.J. and Eijsink, V.G.H., 2005. Hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as components of microbial growth media. *Process Biochem.*, 40, 3714–3722.
- Babitha, S., Soccol, R.C. and Pandey, A., 2007. Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. *Bioresource Technology*, Volume 98, Issue 8, 1554-1560.
- Bertsch, A. and Coello, N., 2005. A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. *Bioresource technology*, 96(15), 1703-1708.
- Bilgehan, H., 1992. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. Barış Yayınları, (1. Baskı), Bornova İzmir.
- Blanc, P.J., Loret, M.O., Santerre, A.L., Pareilleux, A.D., Prome, J.C., 1994. Pigments of *Monascus*. *J. Food Sci.*, 59, 862-865.
- Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J., 1994. *Biology of Microorganisms*. 7th edition, p. 122. Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Buxbaum, G., 1998. *Industrial Inorganic Pigments*. WILEY –VCH, 1, Germany.
- Bühler, R.M.M., Dutra, A.C., Vendruscolo, F., Moritz, D.E. and Ninow, J.L., 2013. *Monascus* pigment production in bioreactor using a co-product of biodiesel as substrate. *Food Science and Technology (Campinas)*, 33, 9-13.
- Campoy, S., Rumbero, A., Martin, J.F., 2006. Characterization of an hyperpigmenting mutant of *Monascus purpureus* IB1: identification of two novel pigment chemical structures. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 70, 488–96.
- Carels, M., Shepherd, D. 1977. The effect of different nitrogen sources on pigment production and sporulation of *Monascus* sp. in submerged shaken culture. *Can J Microbiol.*, 23, 1360–72.
- Carvalho, J.C., Pandey, A., Babitha, S., 2003. Soccol CR. Production of *Monascus* biopigments: an overview. *Agro Food Ind Hi Tec.*, 14 , 37–42.
- Chen, D., Xue, Y., Chen, M., Li, Z. And Wang, C., 2016. Optimization of submerged fermentation medium for citrinin-free monascin production by *Monascus*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(8), 772-779.
- Chen, M., Wang, C. L., Wang, Z. B., Zhang, X.W, and Wang, W., 2009. Restriction of citrinin accumulation in *Monascus* by improving culture temperature

- bioinformatics and biomedical engineering. ICBBE. 3rd International Conference 11-13 June. 1-4.
- Chen, M.H. and Johns, M.R., 1993. Effect of pH and nitrogen source on pigment production by *Monascus purpureus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40(1), 132-138.
- Cheng, M. J., Wu, M. D., Chen, I. S., Yang, P. S. and Yuan, G. F., 2010. Secondary metabolites isolated from the fungus *Monascus pilosus* Rev. Roum. Chim.,55, 335-341.
- Chidambaram, K., ZainulAkmar, Z., Wan, A.A., Bacterial pigments and their applications. *Process Biochem.*, 48, 1065–1079
- Cho, E. J., Oha, J. Y., Chang, H. Y. and Yun, J. W., 2006. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. *Journal of Biotechnology*, 127, 129–140.
- Chor, W. K., Lim, L. S. and Shapawi, R., 2013. Evaluation of Feather Meal as a Dietary Protein Source for African Catfish Fry, *Clarias gariepinus*. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 8(6), 697.
- Cruz, J. M., Parajo, J. C., 1998. Improved astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymatic wood hydrolysates containing glucose and cellobiose, *Food Chem.* 63, 479–484.
- De Santis, D., Moresi, M., Gallo, M. A., Petruccioli, M., 2005. Assessment of the dyeing properties of pigments from *Monascus purpureus*. *Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 9, 1072–1079.
- Demirulus, H. ve Aydın, A., 1996. Tavukçuluk artık ve atık maddelerinin işlenerek çevre kirliliğinin azaltılması. *Ekoloji Çevre Dergisi*, 19, 22-26.
- Dikshit, R. and Tallapragada, P. 2013. Comparative study of *Monascus sanguineus* and *Monascus purpureus* for red pigment production under stress condition. *International Food Research Journal*, 20(3), 1235-1238 .
- Downham, A., Collins, P., 2000. Colouring our foods in the last and next millennium. *Int J Food Sci Technol.*, 35, 5-22.
- Dubois, M., Giles, U.A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F.,1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chem.*, 28, 350–356 .
- Dufosse, L., 2009. Pigments, Microbial. *EncyclopediaMicrobiol.*, 4, 457-471.
- El-Boushy, A. R., Van der Poel, A.F.B. and Walraven, O. E. D., 1990. Feather meal-A biological waste: Its processing and utilization as a feedstuff for poultry. *Biological Wastes*, 32, 39–74.
- Eman Mostafa, M., 2012. Chemical profile, agaritine content and selenium in *Agaricus bisporus*. *Brazilian Arch. Bio. Technol.*, 55, 911-920. www.readcube.com/.../S1516-89132012000600015?...e..
- Erdal, S. and Taskin ,M., 2010. Production of α -amylase by *Penicillium expansum* MT-1 in solid-state fermentation using waste Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindley) kernels as substrate. *Romanian Biotechnological Letters*, 15, 5342-5350.
- Erzurum.
- Europe Environment, 29 Jan 2004, (649), IV.5, Europe Information Service sa, <http://www.eis.be>

- European Parliament and Council Directive 94/36/EC on colours for use in foodstuffs. In Official Journal of the European Communities June 30. 1994, No L 237,13–27.
- Fabre, C.E., Goma, G. and Blanc ,P. J., 1993. Production and food applications of the red pigments of *Monascus ruber*. *Journal of Food Science*, 58, 1099-1110.
- Feng, Y., Shao, Y., Chen, F.,2012. *Monascus* pigments. *Appl Microbiol Biotechnol*, 96,1421-1440.
- Frick, D. and Meggos, H., 1988. FD&C colors, *Food Technol.*, 7, 49–56.
- Frisvad, J. C. and Samson, R. A., 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud. Mycol.*, 49, 1–173.
- Gessesse, A., Kaul, R.H., Gashe, B. A. and Mattiasson, B., 2003. Novel alkaline proteases from alkalophilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 519–524.
- Gousterova, A., Nustorova, M., Goshev, I., Christov, P., Braikova, D., Tishinov, K., Haertle, T. and Nedkov, P., 2003. Alkaline hydrolysate of waste sheep wool aimed as fertilizer. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 17, 140–145.
- Grazziotin, A., Pimentel, F. A., de Jong, E. V. and Brandelli, A., 2006. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. *Animal Feed Science and Technology*, 126, 135-144.
- Gulrajani, ML., 1992. *Introduction to natural dyes*. New Delhi: Indian Institute of Technology.
- Hajjaj, H., Blanc, P., Groussac, E., Uribelarrea, J., Goma, G. and Loubiere, P., 2000. Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation, *Enzyme Microb. Technol.*, 27, 619-625.
- Halkman, A. K., 2005. *Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*. 1. Baskı, Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd. Şti., Ankara.
- Hamano, P. S. and Kilikian, B. V., 2006. Production of red pigments by *Monascus ruber* in culture media containing corn steep liquor. *Braz. J. Chem. Eng.*, 23, 443-449.
- Haque, M.A., Kachrimanidou, V., Koutinas, A., Lin, C.S., 2016. Valorization of bakery waste for biocolorant and enzyme production by *Monascus purpureus*. *J Biotechnol.*, 231, 55-64.
- Hari, R. K., Patel, T. R., and Martin, A. M., 1994. An overview of pigment production in biological systems: functions, biosynthesis, and applications in food industry, *Food Rev. Int.*,10(1), 49–70.
- Hsu, L. C., Liang, Y. H., Hsu, Y.W., Kuo, Y. H., Pan, T. M., 2013. Anti-inflammatory Properties of Yellow and Orange Pigments from *Monascus purpureus* NTU 568. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, 61 (11), 2796–2802. https://www.usitc.gov/publications/docs/pubs/industry_trade_summaries/pub3021.pdf
- Jacobson, G. and Wasileski, J., 1994. Production of Food Colorants by Fermentation. In: *Bioprocess Production of Flavor, Fragrance, and Color Ingredients*, A. Gabelman (Ed.), John Wiley & Sons, New York, USA, 205–237.
- Johns, M.R. and Stuart, D.M., 1991. Productions of pigments by *Monascus* in solid culture. *J Ind Microbiol* 8, 23–28.

- Jůlová, P., Martínková, L., Lozinski, J. and Machek, F., 1994. Ethanol as substrate for pigment production by the fungus *Monascus* DOI: 10.1016/0141-0229(94)90011-6
https://www.researchgate.net/publication/229177262_Ethanol_as_substrate_for_pigment_production_by_the_fungus_Monascus
- Juzlova, P., Martinkova, L., and Kren, V. K., 1996. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: review. *J. Ind. Microbiol.*, 16, 163-170.
- Keith, K. E., Killip, L., He, P., Moran, G.R., Valvano, M.A., 2007. *Burkholderia cenocepacia* C5424 produces a pigment with antioxidant properties using a homogentisate intermediate. *J. Bacteriol.*, 189, 9057- 9065.
- Kim, C. *et al.* 2006. Effect of *Monascus* pigment derivatives on the electrophoretic mobility of bacteria, and the cell adsorption and antibacterial activities of pigments. *Coll. Surfaces Biointerfaces* 47, 153–159.
- Kim, J. M., Lim, W. J. and Suh, H. J, 2001. Feather-degrading *Bacillus* species from
- Klimek, M., Wang, S., Ogunkanmi, A., 2009. Safety and efficacy of red yeast rice (*Monascus purpureus*) as an alternative therapy for hyperlipidemia. *Pharmacy and Therapeutics*, 34(6), 313.
- Koli, H. S., Suryawanshi, K. R., Patil, D. C., Patil, V. S., 2017. Fluconazole treatment enhances extracellular release of red pigments in the fungus *Monascus purpureus*. *FEMS Microbiol Lett.*, 364 (8), fnx058.
- Kondo, K., Yamada, Y., Mitzugi, K., Otsuka, S., 1973. "Method of Producing Coenzyme Q10 by Microorganisms", United States Patent 3769170.
- Korniłowicz-Kowalska, T. and Bohacz, J., 2001. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Manag*, 31, 1689–1701.
- Kulandaisamy Venil, C., Lakshmanaperumalsamy, P., 2009. Prodigiosin: An Insightful Overview on Microbial Pigment. *Electronic Journal of Biology*, 5(3), 49-61.
- Kumari, M. H. P., Naidu, K.A., Vishwanatha, S., Narasimhamurthy, K., Vijayalakshmi, G., 2009. Safety evaluation of *Monascus purpureus* red mould rice in albino rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 8, 1739-1746.
- Kunamneni, A., Permaul, K. and Singh, S., 2005. Amylase Production in Solid State Fermentation by the Thermophilic Fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 168-171.
- Kurbanoglu, E. B. and Kurbanoglu, N. I., 2004. Ram horn peptone as a source of citric acid production by *Aspergillus niger*, with a process. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 31, 289–294.
- Kurbanoglu, E .B., 1999. Boynuz hidrolizatının bakteriler için besiyeri olarak değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,
- Lee, B.K., Park, N.H., Piao, H.Y. and Chung, W. J., 2001. Production of red pigments by *Monascus purpureus* in submerged culture. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6(5), 341-346,
- Lee, Y., Chen, D., Chauvatcharin, S., Seki, T. and Yoshida, T., 1995. Production of *Monascus* pigments by a solid-liquid state culture method. *J. Ferment. Bioeng.*, 79, 516-518.
- Li, Y., Zhu, Y., Wang, J., Zhu, J., Kritchevsky, C. and D., 1998. *Monascus purpureus* fermented rice (red yeast rice): A natural food product that lowers blood cholesterol in animal models of hypercholesterolemia. *Nutr. Res.*, 18, 71-81.

- Lin, C. F. and Iizuka, H., 1982. Production of extracellular pigment by a mutant of *Monascus kaoliang* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 671- 676.
- Lin, C. F., 1975. Studies on the *Monascus* isolated from the starter of kaoliang brandy, *Chinese J. Microbiol.*, 8, 152-60.
- Lin, T. F. and Demain, A. L. 1991. Effect of nutrition of *Monascus* sp. on formation of red pigments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36(1), 70-75.
- Lin, Y. L., Wang, T. H., Lee, M. H., Su, N. W., 2008. Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice: a review. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 77, 965–73.
- Lv, J., Zhang, B. B., Liu, D. X., Zhang, C., Chen, L., Xu, R.G., Chi, P., Cheung, K., 2017. Enhanced production of natural yellow pigments from *Monascus purpureus* by liquid culture: The relationship between fermentation conditions and mycelial morphology. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.05.010>
- Maldonado, M. C. and Ibarra, L. V., 2005. Organic dyes from fungi and lichens. In *Biodiversity of Fungi Their Role in Human Life* (Deshmukh, S.K. and Rai, M.K., eds), pp. 375–407, Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd
- Mapari, S. A. S., Nielsen, K. F., Larsen, T. O., 2005. Frisvad JC, Meyer AS, Thrane U Exploring fungal biodiversity for production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Curr Opin Biotechnol.*, 16, 231–238.
- Mertens D. A.O.A.C., 2005a. AOAC Official Method 922.02. Plants Preparation of Laboratory Sample. *Official Methods of Analysis*, Chapter 3, 18th edn, pp1-2. ed. Horwitz, W. and Latimer, G.W. Suite 500, 481. North Frederick Avenue, Gaithersburg, MD 20877-2417, USA: AOAC-International
- Mertens, D.A.O.A.C., 2005b. Official Method 975.03. Metal in Plants and Pet Foods. *Official Methods of Analysis*, Chapter 3, 18th edn. ed. Horwitz, W. and Latimer, G.W. pp. 3–4. Suite 500, 481. North Frederick Avenue, Gaithersburg, MD 20877-2417, USA: AOAC-International.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chem.*, 31, 426-428.
- Moharram, A. M., Mostafa, M. And Ismail, M. A., 2012. Chemical profile of *Monascus ruber* strains. *Food Technology and Biotechnology*, 50 (4), 490-499.
- Mokrejs, P., Krejci, O., and Svoboda, P., 2011a. Producing Keratin Hydrolysates from Sheep Wool. *Oriental J Chem.*, 27, 1303-1309.
- Mokrejs, P., Svoboda, P., Hrnčíř, J., Janáčková, D. and Vasek, V., 2011b. Processing poultry feathers into keratin hydrolysate through alkaline-enzymatic hydrolysis. *Waste Manag Res.*, 29, 260–267.
- Multon, J. L., 1992. Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries Agroalimentaires, Tecet Doc. Lavoisier (Ed.) APRIA. 266-270, 567-602.
- Nayaka, S., and Vidyasagar, G. M., 2013. Development of eco-friendly bio-fertilizer using feather compost. *Annals of Plant Sciences*, 2(07), 238-244.
- Nimnoi, P and Lumyong, S., 2009. Improving Solid-State Fermentation of *Monascus purpureus* on Agricultural Products for Pigment Production Food and Bioprocess Technology November 2011, Volume 4, Issue 8, pp 1384–1390.
- Nimnoi, P., Pongsilp, N. and Lumyong, S., 2015. Utilization of agro-industrial products for increasing red pigment production of *Monascus purpureus* AHK12. *Chiang Mai J Sci*, 42, 331-338.

- Nustorova, M., Braikova, D., Gousterova, A., Vasileva-Tonkova, E., Nedkov, P., 2006. Chemical, microbiological and plant analysis of soil fertilized with alkaline hydrolysate of sheep's wool waste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 383–390.
- Orozco, S. F. B. and Kilikian, B. V., 2008. Effect of pH on citrinin and red pigments production by *Monascus purpureus* CCT3802. *World J Microbiol Biotechnol.*, 24, 263–268.
- Palo, M. A., Vidal-Adeva, L. and Maceda, L., 1960. Study on ang-kak and its production, *Philipp. J. Sci. Soc.*, 89, 1-22.
- Papadopoulos, M.C., 1984. Feather meal: Evaluation of the effect of processing conditions by chemical and chick assay. PhD. Thesis, Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- Parekh, S., Vinci, V. A., Strobel, R. J., 2000. Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl Microbio. Biotech.*, 54, 287-301.
- Park, Y. H., Lee, I. Y., Kim, S. W., Lee, J. H., Jeong, J. C., 2000. Production method of β -carotene from *Blakeslea trispora*. Korean patent KR20000031738;
- Parrado J., Millan, F., Hernandez-Pinzon, I., Bautista, J. and Machado, A., 1993. Sunflower peptones: Use as nitrogen source for the formulation of fermentation media. *Process Biochemistry*, 28, 109–113.
- Pastrana, L., Blanc, P. J., Santerre, A. L., Loret, M. O., and Goma, G., 1994. Production of red pigments by *Monascus ruber* in synthetic media with a strictly controlled nitrogen source. *Process Biochem.*, 30, 333-341.
- Pattanagul, P., 2002. Using of vegetable oil, angkak, SVJ protein isolate and tapioca starch to improve the quality of sausages, Master's Thesis, Chiang Mai University, Thailand.
- Pattanagul, P., 2007. Effect of *Monascus* strains and their nutrients on the production of alday anak, PhD. Thesis, Chiang Mai University, Thailand.
- Poernomo, A. and Buckle, K. A., 2002. Crude peptones from cowtail ray (*Trygon sephen*) viscera as microbial growth media. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 333–340.
- poultry waste. *Process Biochemistry*, 37, 287-291.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. and Klein, D. A., 2002. *Microbiology* (5th edn). McGraw-Hill, New York, NY, pp. 96–98.
- Racine, F. M. and Vary, J. C., 1980. Isolation and properties of membranes from *Bacillus megaterium* spores. *J Bacteriol.*, 143, 1208 - 1214.
- Raisainen R., Nousiainen, P., Hynninen, P. H., 2002. Dermorubin and 5-chlorodermorubin natural anthraquinone carboxylic acids as dyes for wool. *Textile Res J*, 72: 973-976.
- Rundel, P. W., 1969. *Bryologist* 72, 40.
- Santesson, J., 1969a. *Ark. Kemi* 30, 363.
- Santesson, J., 1969b. *Ark. Kemi* 30, 449.
- Santesson, J., 1969c. *Ark. Kemi* 31, 121.
- Santos, M. A., Mateos, L., Stahmann, K. P., Revuelta, J. L., 2005. Insertional Mutagenesis in the Vitamin B2 Producer Fungus *Ashbya gossypii*. In: *Methods in Biotechnology: Microbial Processes and Products*, Vol. 18, J.L. Barredo (Ed.), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, pp. 283–300.

- Shao, Y., Xu, L., Chen, F., 2011. Genetic diversity analysis of *Monascus* strains using SRAP and ISSR markers. *Mycoscience*, 52, 224–233.
- Sheu, F., Wang, C. L. Shyu, Y. T., 2000. Fermentation of *Monascus purpureus* on Bacterial Cellulose-nata and the Color Stability of *Monascus*-nata Complex. *Journal of Food Science*, 65, 2, 342–345.
- Shivprasad, S. and Page, W. J., 1989. Catechol formation and melanization by Na-dependent *Azotobacter chroococcum*: a protective mechanism for aeroadaptation. *Appl Environ Microbiol*, 55, 1811- 1817.
- Silveira, S. T., Daroit, D. J., Brandelli A., 2008. Pigment production by *Monascus purpureus* in grape waste using factorial design LWT - Food Science and Technology Volume 41, Issue 1, January 2008, Pages 170-174.
- Simova, E. D., Frengova, G. I., Beshkova, D. M., 2004. Synthesis of carotenoids by *Rhodotorula rubra* GED8 co-cultured with yogurt starter cultures in whey ultrafiltrates, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 115–121.
- Siva, R., 2007. Status of natural dyes and dye-yielding plants in India. *Curr Sci*, 92(7), 1–9.
- Srianta, I., Zubaidah, E., Estiasih, T., Yamada, M., Harijono. 2016. Comparison of *Monascus purpureus* growth, pigment production and composition on different cereal substrates with solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* Volume 7, July 2016, Pages 181-186.
- Stahmann, K. P., Revuelta, J. L., Seulberger, H., 2000. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 509–516.
- Su, N. W., Lin, Y. L., Lee, M. H., Ho, C. Y., 2005. Ankaflavin from *Monascus*-fermented red rice exhibits selective cytotoxic effect and induces cell death on Hep G2 cells. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1949–1954.
- Sweeny, J. G., Estrada-Valdas, M. C., Iacobucci, G. A., Sato, H. and Sakamura, H. S., 1981. Photoprotection of the red pigments of *Monascus anka* in aqueous media by 1,4,6 trihydroxynaphthalene. *J. Agric. Food Chem.*, 29, 1189-1193.
- Swerdlow, R. D., Setlowi, P., 1984. Isolation and characterization of two distinct fractions from the inner membrane of dormant *Bacillus megaterium* spores. *J Bacteriol*, 158: 9-15.
- Tan, J., Chu, J., Shi, W., Lin, C., Guo, Y., Zhuang, Y. and Imanaka, T., 2012. High-throughput screening strategy used for enhanced production of pigment by *Monascus purpureus* D39-4. *Food Science and Biotechnology*, 21(6), 1603-1610.
- Taskin, 2011. Tavuk Tüyü Atığından Elde Edilen Peptonun Mikroorganizmaların Üretiminde Kullanımı. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Taskin, M. and Kurbanoglu, E. B., 2011. Evaluation of waste chicken feathers as peptone source for bacterial growth. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 826-834.
- Taskin, M., 2013. A new strategy for improved glutathione production from *Saccharomyces cerevisiae*: use of cysteine- and glycine-rich chicken feather protein hydrolysate as a new cheap substrate", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 535-541.7

- Taskin, M., Esim, N., Ortucu, S., 2012b. Efficient production of l-lactic acid from chicken feather protein hydrolysate and sugar beet molasses by the newly isolated *Rhizopus oryzae* TS-61", *Food and Bioproducts Processing (ISI)*, 90, 773-779.
- Taskin, M., Ozkan, B., Atici, O., Aydogan, M. N., 2012a. Utilization of chicken feather hydrolysate as a novel fermentation substrate for production of exopolysaccharide and mycelial biomass from edible mushroom *Morchella esculenta*", *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63, 597-602.
- Taskin, M., Sisman, T., Erdal, S., Kurbanoglu, E. B., 2011. Use of waste chicken feathers as peptone for production of carotenoids in submerged culture of *Rhodotorula glutinis* MT-5", *European Food Research and Technology (ISI)*, 2011, 233, 657-665.
- Taskin, M., Tasar, G. E and Incekara, U., 2013. Citric acid production from *Aspergillus niger* MT-4 using hydrolysate extract of the insect *Locusta migratoria*. *Toxicol Ind Health* ,29, 426-434.
- Taskin, M., Unver, Y., Fırat, A., Örtücü, S., Yıldız, M., 2016. Sheep wool protein hydrolysate a new peptone source for microorganisms *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 6, 1675-1680.
- Tibor, C., 2007. Liquid Chromatography of Natural pigments and synthetic dyes. *J. Chromatography Library*, 71, 11-19.
- Trutko, S., Dorofeeva, L., Evtushenko, L., Ostrovskii, D., Hintz, M., Wiesner, J., Jomaa, H., Baskunov, B., Akimenko, V., 2005. Isoprenoid pigments in representatives of the family Microbacteriaceae *Microbiol*, 74, 284-289.
- Tseng, Y. Y., Chen, M. T., Lin, C. F., 2000. Growth, pigment production and protease activity of *Monascus purpureus* as affected by salt, sodium nitrite, polyphosphate and various sugars. *Journal of Applied Microbiology*, Volume 88, Issue 1 January 2000 Pages 31–37.
- Vasileva-Tonkova, E., Nustorova, M. and Gushterova, A., 2007. New protein hydrolysates from collagen wastes used as peptone for bacterial growth. *Current Microbiology*, 54, 54-57.
- Vecht-Lifshitz, S. E., Almas, K. A. and Zomer, E., 1990. Microbial growth on peptones from fish industrial wastes. *Letters Applied Microbiology*, 10, 183–186.
- Waldie, J. M. (Chairman, textbook editing committee); 1974, 1983. *Surface Coatings. Volume 1 -Raw Materials and Their Usage; Oil and Colour Chemists' Association, Australia.*
- Wang, L., Dai, Y., Chen, W., Shao, Y. and Chen, F., 2016. Effects of Light Intensity and Color on the Biomass, Extracellular Red Pigment, and Citrinin Production of *Monascus ruber*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(50), 9506-9514.
- Wang, Y. and Casadevall, A., 1994. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen and oxygen derived oxidants. *Infect Immun*, 62, 3004-3007.
- Webster, A. B., Fletcher, D. L. and Savage, S. I., 1996. Feather removal from spent hens up to 24 hr post-mortem. *Journal of Applied Poultry Research*, 5, 337-346.
- Wickerham, L. J. *et al.*, 1946. The production of riboflavin by *Ashbya gossypii*. *Arch. Biochem.*, 9, 95–98.

- Wong, H. and Koehler, P. E., 1983. Production of red water-soluble *Monascus* pigments. *J. Food Sci.*, 48, 1200-1203.
- Wong, H. C. and Koehler, P. E. 1981. Mutant of *Monascus* pigmen production. *J Food Sci* 46,956-957.
- Yongsmith, B. S., Krairak, S. and Bavavoda, R., 1994. Production of yellow pigments in submerged culture of a mutant of *Monascus* spp. *J. Ferment Bioeng.*, 78, 223-228.
- Yongsmith, B., 1999. Fermentative microbiology of vitamins and pigments, 1st Edn., Kasetsart University Press, Bangkok.
- Zhao, G. P., Li, Y. Q., Yang, J., Cui, K. Y., 2015. Antibacterial Characteristics of Orange Pigment Extracted from *Monascus* Pigments against *Escherichia coli*. *Czech J. Food Sci.*, 34. doi: 10.17221/430/2015-CJFS.
- Zhou, B., Wang, J., Pu, Y., Zhu, M., Liu, S. and Liang, S., 2009. Optimization of culture medium for yellow pigments production with *Monascus anka* mutant using response surface methodology. *Eur Food Res Technol.*, 228,895–901.

ÖZGEÇMİŞ

19.10.1993 tarihinde Ankara’da doğdu. İlk ve orta öğretimini Ankara İl Genel Meclisi İlköğretim Okulu’nda tamamladı. 2007-2011 yılları arasında Ankara Dikmen Lisesi’nde lise eğitimini tamamladı. 2011-2015 tarihleri arasında Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nü bitirip, aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Bilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Ağustos 2015-Temmuz 2017 tarihleri arasında yüksek lisans eğitimini tamamladı.