

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



*PENİCİLLİUM MALLOCHİİ* SUŞUNUN PİGMENT ÜRETİMİ,  
KARAKTERİZASYONU VE PİGMENT ÜRETİMİNE ETKİ EDEN FAKTÖRLERİN  
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YOUCEF BOUHRI

BALIKESİR, HAZİRAN - 2018

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



*PENİCİLLİUM MALLOCHİİ* SUŞUNUN PİGMENT ÜRETİMİ,  
KARAKTERİZASYONU VE PİGMENT ÜRETİMİNE ETKİ EDEN FAKTÖRLERİN  
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YOUCEF BOUHRI

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Tülin AŞKUN (Tez Danışmanı)  
Prof. Dr. Gülendamar TÜMEN  
Prof. Dr. Semra İLHAN

BALIKESİR, HAZİRAN – 2018

**Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından 2017/075 nolu proje ile desteklenmiştir.**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

**Youcef BOUHRI** tarafından hazırlanan "**PENICILLIUM MALLOCHII** SUŞUNUN PİGMENT ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE PİGMENT ÜRETİMİNE ETKİ EDEN FAKTÖRLERİN BELİRLENMESİ" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 05.06.2018 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

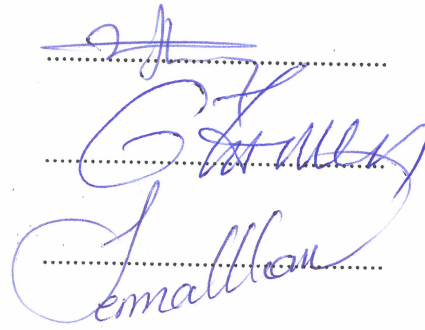
Prof. Dr. Tülin AŞKUN

Üye

Prof. Dr. Gülendamar TÜMEN

Üye

Prof. Dr. Semra İLHAN



Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

## ÖZET

### ***PENICILLIUM MALLOCHII* SUŞUNUN PİGMENT ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE PİGMENT ÜRETİMİNE ETKİ EDEN FAKTÖRLERİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**YOUCEF BOUHRI**

**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR.TÜLİN AŞKUN)**

**BALIKESİR, HAZİRAN-2018**

Günümüzde sentetik boyaların kullanılmasının çevre ve insanlarda üzerinde zararlı etkilerinin olduğu, insanlarda görülen alerjik astım, toksijenik ve karsinojenik hastalıklara sebep olduğu bilinmektedir. Bu nedenle doğal kaynaklardan insanlara ve çevreye zarar vermeyen doğal pigment arayışı tüm dünyada devam etmektedir. Funguslardan pigment elde etmeye yönelik çalışmalar oldukça yenidir. Bu çalışmada kullanılan kırmızı-turuncu pigment üretici suş, *Penicillium mallochii*, moleküler yöntemlerle tanılandı ve pigment üretimi araştırıldı.

Pigment üretiminde farklı besiyerleri kullanıldı ve en yüksek verim Sabouraud Dextrose Agar (SDA) besiyerinden elde edildi. SDA besiyerinde farklı sıcaklık ve farklı pH' larda, hem aydınlık hem de karanlık 18 gün boyunca inkübe edilen fungusun pigment üretimine sıcaklık ve pH' ın etkileri araştırıldı. Pigment ekstresi elde etmek için fungus filamentleri uzaklaştırılmış agar blokları etanol (w/v: 1/1: g:mL) içerisine alındı ve 72 saat 26 °C' de 160 rpm' de çalkalamalı inkübatörde bırakıldı ve sonra filtre edildi. Çözültiden solvent döner buharlaştırıcı ile daha sonra ekstre liyofilize edilerek turuncu-kırmızı pigment (25mg/mL) elde edildi.

En yüksek pigment üretimi fungusun karanlık ortamda, pH 5' te ve sıcaklık 30 °C' ürettiğinde de görüldü. En fazla pigment (28 g/L) SDA besiyerinden elde edildi. Pigment çözeltisinin farklı pH, farklı sıcaklıklar ve farklı solventler ile renk karakterizasyonu yapıldı.

Sonuç olarak spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda belirlenen renk absorbansının pH (2-12) ve sıcaklık (25 °C-100 °C) arasında değişmediği belirlendi. Ayrıca solvent olarak su, etanol ve asetik asit kullanıldığında spektrofotometrede okunan değerler arasında en yüksek absorbans değeri etanolde elde edildi.

Fungusların doğal pigment üreticisi olarak kullanılmasının çevre ve canlılar üzerinde olumsuz etkilere neden olmaması, fungusları avantajlı hale getirmektedir.

**ANAHTAR KELİMELER:** Karakterizasyon, optimal, pigment üretimi, *Penicillium mallochii*, renk.

## **ABSTRACT**

### **OPTIMIZATION OF PIGMENT PRODUCTION OF *PENICILLIUM MALLOCHII* ISOLATE OF ORANGE-RED PIGMENT MAKER AND DETERMINATION OF FACTORS AFFECTING PIGMENT PRODUCTION**

**MSC THESIS**

**YOUCEF BOUHRI**

**BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCES**

**BIOLOGY**

**(SUPERVISOR: PROF. DR.TÜLİN AŞKUN)**

**BALIKESİR, JUNE-2018**

It is now known that the use of synthetic dyes has harmful effects on the environment and human beings, causing allergic asthma, toxigenic and carcinogenic diseases in humans. For this reason, the search for natural pigments that do not harm people and the environment from natural sources continues all over the world. For this reason, the search for natural pigments that do not harm people and the environment from natural sources continues all over the world. The investigation to obtain pigments from fungi are quite new. The red-orange pigment producing strain, *Penicillium mallochii*, used in this study was identified by molecular methods and pigment production was investigated.

Different media were used for pigment production and the highest yield was obtained from Sabouraud Dextrose Agar (SDA) medium. Temperature and pH effects on pigment production of fungi incubated for 18 days in both light and dark at different temperatures and different pH on SDA medium were investigated. To obtain the pigment extract, the fungus filaments were removed from the agar surface and then the agar blocks were taken up in ethanol (w/v: 1/1: g: mL) and left in a shaking incubator at 160 rpm at 26 °C for 72 hours and then filtered. The solvent was removed by rotary evaporator and the orange-red pigment extract was lyophilized (25 mg/mL). The highest pigment production fungus was obtained when the fungus was produced in the dark at pH 5 °C and temperature 30 °C. The highest pigment (28 g/L) was obtained from SDA medium. The color characterization of the pigment solution was made with different pH, different temperatures and different solvents. As a result, it was determined that the color absorbance determined at 450 nm wavelength in spectrophotometer did not change between pH (2-12) and temperature (25 °C-100 °C). Furthermore, when water, ethanol and acetic acid were used as solvents, the highest absorbance value was obtained in ethanol, among the values read in the spectrophotometer. The fact that the use of fungi as natural pigment producers does not cause adverse effects on the environment and the living things makes fungus advantageous.

**KEYWORDS:** Characterization, optimal, pigment production, *Penicillium mallochii*, color.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vii
SEMBOL LİSTESİ.....	viii
ÖNSÖZ .....	ix
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1 Taksonomi .....	1
1.1.1 <i>Penicillium</i> Sistematikteki Yeri .....	2
1.2 <i>Penicillium</i> Özellikleri.....	2
1.2.1. <i>Penicillium</i> Morfolojisi.....	3
1.2.1.1 <i>Penicillium</i> Makromorfolojisi.....	3
1.2.1.2 <i>Penicillium</i> Mikromorfolojisi.....	7
1.3 <i>Penicillium</i> Uygun Yaşam Ortamları .....	9
1.3.1 <i>Penicillium</i> Ekolojisi.....	9
1.3.2 <i>Penicillium</i> Türleri Gıda Bozulmasına Neden Olur .....	10
1.4 <i>Penicillium</i> ’ da Mikotoksin Üretimi.....	16
1.4.1 Majör Mikotoksinler .....	16
1.4.1.1 Aflatoksin.....	16
1.4.1.2 Okratoksin-A.....	17
1.4.1.3 Patulin .....	19
1.4.2 Minör Mikotoksinler.....	20
1.4.2.1 Citreoviridin .....	20
1.4.2.2 Sitrinin.....	21
1.4.2.3 Siklopiazonik asit.....	22
1.4.2.4 Penisilik asit .....	22
1.4.2.5 Roquefortine-C.....	23
1.4.3 <i>Penicillium</i> ’ un İnsanlar Üzerinde Olumsuz Etkileri.....	24
1.5 <i>Penicillium</i> Endüstriyel Alanları (Ekonomik Değeri).....	25
1.6 Pigment Kullanılış Alanları .....	26
<b>2. MATERYAL VE METOT.....</b>	<b>30</b>
2.1 Fungal Çalışmalar.....	30
2.1.1 Kullanılan Besiyerleri .....	30
2.1.1.1 Hücre Kültürü, Pigment Ürteimi ve Karakterizasyonu.....	30
2.1.2 Fungusun İzolasyonu ve Kültürü.....	32
2.1.3 Identifikasyon .....	32
2.1.3.1 DNA İzolasyonu .....	32
2.1.3.2 PCR Reaksiyonu .....	33
2.1.4 Morfolojik analizi .....	34
2.1.4.1 Mikromorfolojik .....	34
2.1.4.2 Makromorfolojik .....	34
2.1.5 Sıcaklık ve PH Değişimlerinin Pigment Oluşumuna Etkisi .....	34
2.1.6 Pigment Üretimi .....	34
2.1.7 Pigment Eksresinin Hazırlanması .....	35

2.2	Pigment Karakteristikleri.....	35
2.2.1	Pigment Oluşumuna Etki Eden Faktörlerin Optimizasyonu ve Spektral Analizleri .....	35
2.2.2	Pigment Karakteristikleri Pigmentin 120 °C Renk Değerlerinde Spektral Analizleri .....	35
2.3	Hunter Renk Sistemine Göre Pigment Renk Tayini.....	36
<b>3.</b>	<b>BULGULAR.....</b>	<b>37</b>
3.1	İdentifikasyonu .....	37
3.2	Morgfolojik Analizleri .....	38
3.3	Sıcaklık ve PH Değişimlerinin Pigment Oluşumuna Etkisi .....	41
3.4	Pigment Üretimi .....	49
3.5	Pigment Ekstresi Elde Etme .....	49
3.6	Pigment Oluşumuna Etki Eden Faktörlerin Optimizasyonu ve Spektral Analizleri .....	50
3.6.1	Farklı Besiyerler ile Pigment Üretimi .....	50
3.6.2	Pigment Karakterizasyonu ve Spektral Analizliler .....	51
3.6.3	Pigmentin 120 °C Renk Değerleri ile Spektral Analizleri .....	54
3.6.4	Hunter Renk Sistemine Göre Pigment Renk Tayini.....	55
<b>4.</b>	<b>TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>57</b>
<b>5.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>62</b>
<b>6.</b>	<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>EKLER.....</b>	<b>78</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1: <i>Penicillium</i> ' da görülen konidiyofor dallanma şekilleri.....	8
Şekil 1.2: Aflatoxin.....	17
Şekil 1.3: Ochratoxin-A.....	18
Şekil 1.4: Patulinin.....	20
Şekil 1.5: Citreoviridin.....	21
Şekil 1.6: Sitrinin.....	21
Şekil 1.7: Siklopiazonik asit.....	22
Şekil 1.8: Penisilik asit.....	22
Şekil 1.9: Roquefortine-C.....	23
Şekil 2.1: Hunter Renk Sistemi.....	36
Şekil 3.1: <i>P. mallochii</i> ' nin AccuGENX-ID® FunITS ile Fungal ile filogenetik ağacını tanımlaması.....	37
Şekil.3.2: <i>P. mallochii</i> MEA ile ışıklı mikroskopta görünümü.....	38
Şekil 3.3: <i>P. mallochii</i> ' dan pigment üretiminde farklı besiyerler (MEA, SDA, YES, PDA ve CZ) kullanılarak 30 C' de farklı günlerde (3, 6, 9, 12, 15 ve 18).günde Petri kabının üstten görünümü.....	39
Şekil 3.4: <i>P. mallochii</i> ' dan pigment üretiminde farklı besiyerler (MEA, SDA, YES, PDA ve CZ) kullanılarak 30 C' de farklı günlerde (3, 6, 9, 12, 15 ve 18). günde Petri kabının alttan görünümü.....	40
Şekil 3.5: <i>P. mallochii</i> ' dan pigment üretimin SDA besiyeri kullanarak farklı pH' larda (5, 7 ve 9) kullanılarak 25 °C' de farklı günlerde (3, 6, 9, 12, 15 ve 18) Petri kabının üstten görünümü.....	42
Şekil 3.6: <i>P. mallochii</i> ' dan pigment üretimin SDA besiyeri kullanarak farklı pH' larda (5, 7 ve 9) kullanılarak 25 °C' de farklı günlerde (3, 6, 9, 12, 15 ve 18) Petri kabının alttan görünümü.....	43
Şekil 3.7: <i>P. mallochii</i> ' dan pigment üretimin SDA besiyeri kullanarak farklı pH' larda (5, 7 ve 9) kullanılarak 28 °C' de farklı günlerde (3, 6, 9, 12, 15 ve 18) Petri kabının üstten görünümü.....	44
Şekil 3.8: <i>P. mallochii</i> ' dan pigment üretimin SDA besiyeri kullanarak farklı pH' larda (5, 7 ve 9) kullanılarak 28 °C' de farklı günlerde (3, 6, 9, 12, 15 ve 18) Petri kabının alttan görünümü.....	45
Şekil 3.9: <i>P. mallochii</i> ' dan pigment üretimin SDA besiyeri kullanarak farklı pH' larda (5, 7 ve 9) kullanılarak 30 °C' de farklı günlerde (3, 6, 9, 12, 15 ve 18) Petri kabının alttan görünümü.....	46
Şekil 3.10: <i>P. mallochii</i> ' dan pigment üretimin SDA besiyeri kullanarak farklı pH' larda (5, 7 ve 9) kullanılarak 30 °C' de farklı günlerde (3, 6, 9, 12, 15 ve 18) Petri kabının alttan görünümü.....	47
Şekil 3.11: <i>P. mallochii</i> MEA ile pigment üretimi 30 °C' de 18. günde Petri kabının alt ve üstten görünümü.....	49
Şekil 3.12: <i>P.mallochii</i> ' nin farklı besiyerlerinden (MEA, SDA ve PDA) elde edilen ve 25 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmış pigment çözeltilerinde gözlenen renkler.....	50
Şekil 3.13: <i>P. mallochii</i> ' dan farklı besiyerlerinden (MEA, SDA ve PDA) elde edilen 25 mg/mL konsantrasyondaki pigment çözeltisinin 450 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri.....	51

<b>Şekil 3.14:</b> <i>P. mallochii</i> ' nin 25mg/mL konsantrasyondaki pigment çözeltilisinin farklı sıcaklık değerlerinde (25, 40, 60, 80 ve 100 °C) stabilizasyonu.....	52
<b>Şekil 3.15:</b> <i>P. mallochii</i> ' nin 25mg/mL konsantrasyondaki pigment çözeltilisinin pH 5 değerinde ve 450nm dalga boyundaki absorbans değerlerinin farklı sıcaklık dereceleri ile renk değişimini etkisi.....	52
<b>Şekil 3.16:</b> <i>P. mallochii</i> ' nin 25mg/mL konsantrasyondaki pigment çözeltilisinin farklı Ph (2-12) değerleri renk değerlerinin değişimi.....	52
<b>Şekil 3.17:</b> <i>P. mallochii</i> 25mg/mL konsantrasyonundaki pigment çözeltililerinin farklı ph değerlerindeki renk değişimlerinin 450 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ile belirlenmesi.....	53
<b>Şekil 3.18:</b> <i>P. mallochii</i> farklı solventler ile 25mg/mL konsantrasyonundaki pigment çözeltileri.....	53
<b>Şekil 3.19:</b> <i>P. mallochii</i> ' nin farklı solventlerde 25mg/mL konsantrasyonundaki pigment çözeltililerinin 450 nm dalga boyundaki absorbans değerleri .....	54
<b>Şekil 3.20:</b> <i>P. mallochii</i> ' nin 100 mg/mL ve 50 mg/mL konsantrasoyonlarındaki pigment çözeltilisinin otoklavdan önce ve sonra görünüşü. A) 100 mg/mL otoklavdan önce, B) 100 mg/mL otoklavdan sonra, C) 50 mg/mL otoklavdan önce, D) 50 mg/mL otoklavdan sonra.....	54
<b>Şekil 3.21:</b> <i>P. mallochii</i> ' nin 100 mg/mL ve 50 mg/mL konsantrasoyonlarındaki çözeltilisinin otoklavdan önce ve sonra 450 nm dalga boyundaki absorbans değerleri.....	55
<b>Şekil 3.22:</b> <i>P. mallochii</i> ' nin A) ham eksresi ve farklı konsantrasyonlarda B) 5 mg/mL, C) 25 mg/mL, D) 50 mg/mL, E) 100 mg/mL çözeltililerinin görünümü.....	55

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 1.1:</b> Morfolojik karakterizasyon için kullanılan besiyerleri ve stok çözeltileri.....	3
<b>Tablo 1.2:</b> Taksonomik karakterleri gözlemek için kullanılan besiyerleri ve stok çözeltileri.....	4
<b>Tablo 1.3:</b> Bazı <i>Penicillium</i> türleri tarafından ürettiği mikotoksinleri ve bulunduğu substratları.....	23
<b>Tablo 2.1:</b> Deneysel çalışmada kullanılan besiyerleri içerikleri.....	30
<b>Tablo 2.2:</b> PCR reaksiyonunda kullanılan bileşikler.....	33
<b>Tablo 2.3:</b> PCR reaksiyonları.....	33
<b>Tablo 3.1:</b> <i>P. mallochii</i> ' dan pigment üretiminde farklı besiyerler (MEA, SDA, YES, PDA ve CZ) kullanılarak 30 C' de farklı günlerde (3, 6, 9, 12, 15 ve 18) kolonilerin ölçüleri.....	41
<b>Tablo 3.2:</b> <i>P. mallochii</i> ' dan pigment üretimin SDA besiyeri kullanarak farklı pH' larda (5, 7 ve 9) kullanılarak 30 °C' de farklı günlerde (3, 6, 9, 12, 15 ve 18) günde kolonilerin ölçüleri.....	48
<b>Tablo 3.3:</b> <i>P. mallochii</i> ' nin farklı besiyerlerinden (MEA, SDA ve PDA) elde edilen pigment miktarları.....	50
<b>Tablo 3.4:</b> <i>P. mallochii</i> ' nin Hunter kalorimetresi değerlerine ve farklı konsantrasyonlarda (5, 25, 50, 100 mg/mL) çözeltiler Color grap (color detection) uygulaması ile L*, a* ve b* kolorimetresi değerini.....	56

## SEMBOL LİSTESİ

<b>SDA</b>	Sabrouaud Dekstroz Agar
<b>MEA</b>	Malt Extract Agar
<b>PDA</b>	Patates Dekstroz Agar
<b>YES</b>	Yeast Extract Sucrose Agar
<b>CYA</b>	Czapek Maya Autolysate Agar
<b>CZ</b>	Czapek Agar
<b>OA</b>	Oatmeal Agar
<b>CREA</b>	Creatin Sucrose Agar
<b>DG18</b>	Dichloran% 18 Gliserol Agarı
<b>CYAS</b>	Blakeslee's MEA ve CYA ile %5 NaCl
<b>DIC</b>	Differential İnterference Contrast
<b>HIV</b>	İnsan immün yetmezlik virüsü
<b>OTA</b>	Okratoksin-A
<b>NOEL</b>	No Observed Effect Level
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>JECFA</b>	Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi
<b>PMTDI</b>	Vücut ağırlığı olmak üzere geçici bir maksimum tolere edilebilir günlük alım düzeyi
<b>MAK</b>	Maksimum izin verilebilir konsantrasyon
<b>CTV</b>	Citreoviridin
<b>CPA</b>	Siklopiyazonik asit
<b>DHN</b>	Dihidroksifenilalanin
<b>DOPA</b>	Dihidroksinaftalin
<b>RBCA</b>	Rose Bengal Chloramphenicol Agar
<b>PCR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>ITS</b>	İnternal Transcribed Spacer
<b>CIE</b>	Uluslararası Aydınlatma Komisyonu
<b>TLC</b>	İnce Tabaka Kromatografisi

## ÖNSÖZ

İnsan ve doğa bir bütün ise bilimin amacı doğanın gerçeğini anlamak ve onu muhafaza etmektir. Bu amaçla, yaptığım tez çalışmam, 2016-2018 yılları arasında yüksek lisans funguslardan doğal pigment üretimi ile doğal boyar madde çevreye ve insanlara zarar vermeyen, sentetik ve azo boyaların yerine bir alternatif oluşturacak aynı zamanda endüstriyel olarak da kullanılabilir bir doğal pigment arayışı idi. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların bu hedefimizi gerçekleştirmeye oldukça yakın olduğumuz görmekten dolayı mutluyuz.

Bu çalışmamın sürecinde bana her konuda destek veren, bilimsel görüşüyle, azmiyle ve katkılarıyla yardımını esirgemeyen ve danışmanlığımı üstlenen Sayın Prof. Dr. Tülin AŞKUN' a teşekkürlerimi sunuyorum. Çalışmam sırasında bana yardımlarıyla katkıda bulunan Sayın Yar. Doç. Dr. Görkem DENİZ SÖNMEZ' e teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans ilk döneminde belli bir sebepler dolayı danışmanlığım değişikliği yaptığımı ve anlayışlı bir şekilde karşılaşan ve bana her daim hem maddi hem manevi destek veren için eski danışmanım Doç. Dr. Hatice YILDIRIM' da saygımı, sevgimi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca beni büyütüp yetiştiren ve eğitim hayatım boyunca hem yakın iken hemde uzak iken her daim manevi ve maddi destek veren ailem özellikle annem Baya OURİHANE ve babam Fodil BOUHRİ' ye bütün içten duygularıyla teşekkür ederim.

Gurbette beni yabancı olduğumu hiç hissettirmeyen hocalarıma, eğitim arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Unutamayacağım ki, hiç bir beklentisi olmadan her konuda bana destek veren, arkamda duran, hiç esirgemeyen elinden geleni ne varsa benim için yapan, doğru yolu gösterip onu benim için aydınlatan, annem gibi olan Sayın Prof. Dr. Gülendem TÜMEN' e ve tanıdığım o güzel insanlara sonsuzca saygımı, sevgimi ve teşekkürlerimi iletirim.

Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve Biyoloji Bölümü öğretim görevlilerine ve laboratuvar arkadaşlarıma desteklerinden ötürü teşekkür ederim. Bu kutlu süreçten sonra daha da bir söz varsa, o söz şudur **“verdiğiniz kadar alacaksınız”**.

# 1. GİRİŞ

*Penicillium* genusuna ait funguslar dünyadaki en yaygın organizmalardır. Antarktika' dan Grönland' a kadar aranan her yerde bulunmuşlardır. *Penicillium* sporlarından arınmış bir toprak örneği veya çürüyen bitki örtüsü bulmak zordur. Bununla birlikte, son 20 yılda yapılan çalışmalar *Penicillium* türlerinin gelişmesinin genellikle substrata özgü olduğunu göstermiştir. Taksonomideki gelişmeler, yaygın olarak izole edilen bazı türlerin, yalnızca kirletici maddeler olarak gıdalarda görülen toprak fungusları olduklarını, bazılarının ise gıda kaynaklı olduğunu, elverişli koşullarda yüksek bir bozulmaya potansiyeline sahip olduklarını göstermiştir. Çoğu *Penicillium* türleri *Aspergillus*' lar kadar belirgin bir bozulmaya neden olmazlar. *Penicillium* türleri daha az yaygındır ve gelişimi sınırlıdır. Bununla birlikte *Penicillium* türleri gıda bozulmasının önemli bir nedenidir. Bu yaygın kontamine edici türlerin substratlarına bağlı olarak tanılanması; hem kontaminasyon sorunun aydınlatılmasına, hem de fungal zararların önlenmesi ve muhtemel mikotoksin kontaminasyonu ile ilgili konuların çözümlenmesine çok yararlı olabilmektedir. Genel olarak *Penicillium* izolatlarının tanılanması kolay değildir. Bununla birlikte, türlerin üzerinde geliştiği substratlarına göz önüne alınması, tanılamada bilgi sağlayabilir [1].

## 1.1 Taksonomi

Literatüre göre *Penicillium* genusunun tamamlanmış taksonomisinde yüz elli tür tespit edildi ancak daha sonraki çalışmalar bu sayının daha da yüksek olduğunu göstermektedir [2]. *Penicillium* sayısı, en son yapılan derleme çalışmalarına göre yaklaşık 350 tür olarak belirlenmiştir [3]. En az 50 tür yaygın olarak bulunmaktadır [4]. Tüm yaygın türler sentetik veya yarı sentetik ortamlarda büyür ve yayılır, genelde genus seviyesinde kolayca tanınırlar. *Penicillium*' da sınıflandırma esas olarak mikroskopik morfolojiye dayanmaktadır. Bu morfoloji, *Penicillium* ana konidyofofor hücrelerinde (stipes) bulunan sterigmatalar (konidya üreten elementler), metula, rami (sterigmataları destekleyen elementler) sayısına ve düzenine dayanan alt-genusları içerir. Pitt' in (1979) sınıflandırması dört alt-genus içerir: *Aspergilloides*, burada

sterigmata direkt olarak destek elemanları araya girmeksizin konidiyofor tarafından taşınır; streptomaların metula tarafından desteklendiği *Furcatum* ve *Biverticillium*’ da hem metula hem de rami (ramus) bulunur (Şekil. 2). Önemli besin bozulmasına neden olan (toksik) türlerinin çoğunluğu *Penicillium* alt-genuslarında bulunur [2].

### 1.1.1 *Penicillium* Sistematikteki Yeri

<b>Kingdom:</b>	Fungi
<b>Division:</b>	Ascomycota
<b>Class:</b>	Eurotiomycetes
<b>Order:</b>	Eurotiales
<b>Family:</b>	Trichocomaceae
<b>Genus:</b>	<i>Penicillium</i> Link (1809)

### 1.2 *Penicillium* özellikleri

*Penicillium*’ lar çok çeşitlidir ve kozmopolit mantarlar olup, bu genus içinde yaklaşık 350 tür tanımlanmaktadır. Dört alt-genus *Aspergilloides*, *Penicillium*, *Furcatum* ve *Biverticillium*’ a bölünmüştür; Son zamanlarda ilk üçü *Penicillium* genusuna, *Talaromyces* ise alt-genus olan *Biverticillium*’ a dahil edilmiştir [3].

Tallus tipik olarak çok dallı, çok çekirdekli, septatlı, genellikle renksiz hiflerden oluşur. Konidiyosporlar, mantarların başlıca yayılma yoludur ve çoğunlukla yeşil, sarı yeşil, sarı ve mavi vb renktedirler. Eşeyli üreme, bir askogonium ve bir anteridiumun birleşip çekirdeklerinin askogonuma aktarılması ve etraflarının bir periderma ile sarılmasıyla başlayan karyogami, mayozis ve mitozis ile devam eden askosporların üretimini içerir. Düzensiz yayılan askuslarda, her biri sekiz tek hücreli askospor içerir [4].

## 1.2.1 *Penicillium* Morfolojisi

### 1.2.1.1 *Penicillium* Makromorfolojisi

Tanımlama besiyerlerinde koloni özellikleri ve çapları tür tanımlamada kullanılan önemli özelliklerdir. Bu besiyerlerinden Czapek Maya Autolysate Agar (CYA) ve Malt Extract agar (MEA, Oxoid) kullanımı oldukça yaygındır. Ayrıca pek çok laboratuvar Difco MEA' ıda tercih eder. Modern taksonomik araştırmalarda iki farklı MEA formülasyonu yer almaktadır. Blakeslee' nin MEA' ı tarihsel olarak yaygın kullanılmıştır. ATCC Medium: 325 Malt Extract Agar (Blakeslee's formülü) olarak bilinmektedir. Firmalara göre MEA içeriği Tablo 1.1' de verilmiştir [5].

**Tablo 1.1:** Morfolojik karakterizasyon için kullanılan besiyerleri ve stok çözeltileri.

<b>MEA Oxoid (pH 5.4 ± 0.2)</b>	
<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Malt Extract	30.0 g
Mikolojik pepton	5.0 g
Agar	15.0 g
1000 mL Distile suya tamamlanır [6].	
<b>MEA difco (pH 4.7 ± 0.2)</b>	
<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Maltoz, Technical	12.75 g
Dekstrin	2.75 g
Gliserol	2.35 g
Pepton	0.78 g
Agar	15.0 g
1000 mL Distile suya tamamlanır [7].	
<b>Malt Extract Agar (Blakeslee formu) (pH 5.3 ± 0.2)</b>	
<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Malt Extract	20.0 g
Dekstroz	20.0 g
Pepton	1.0 g
Agar	18.0 g
1000 mL Distile suya tamamlanır [8].	



Aşağıdaki alternatif besiyerleri, taksonomik karakterleri gözlemek için kullanılmaktadır; Czapek agarı (CZ), Yeast Extract Sucrose Agar (YES), Oatmeal agar (OA), Creatin Sucrose Agar (CREA), Dichloran % 18 Gliserol agarı (DG18), Blakeslee's MEA ve CYA ile % 5 NaCl (CYAS) ve Czapek Yeast Agar (CYA) [5]. Besiyerlerin içeriği Tablo 1.2' de verilmiştir.

**Tablo 1.2:** Taksonomik karakterleri gözlemek için kullanılan besiyerleri ve stok çözeltileri.

---

**Czapek stock solution (100 ml) (Pitt 1979)**

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
NaNC <sub>3</sub> NaNC <sub>3</sub>	30.0 g
KCl	5.0 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	5.0 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.1 g
1000 mL Distile suya tamamlanır [2].	

**Creatine Sucrose Agar (CREA, Frisvad 1981) PH 8.0 ± 0.2.**

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Sakaroz	30.0 g
Kreatin 1 H <sub>2</sub> O	3.0 g
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1,6 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.5 g
KCl	0.5 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.01 g
İz element stok çözeltisi	1 ml
Bromocresol purple	0.05 g
Agar	20.0 g
1000 mL Distile suya tamamlanır [9].	

**Czapek Yeast Autolysate agar (CYA, Pitt 1979) PH 6.2 ± 0.2.**

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Czapek konsantresi	10 ml
Sakaroz	30.0 g
Yeast Extract (Difco)	5.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g
İz element stok çözeltisi	1 ml
Agar	20.0 g
1000 mL Distile suya tamamlanır [2].	

---

**Tablo 1.2' devamı:**

---

**Czapek's Agar (CZ, Raper ve Thom 1949)**

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Czapek konsantresi	10 ml
Sakaroz	30.0 g
İz element stok çözeltisi	1 ml
Agar	20.0 g
1000 mL Distile suya tamamlanır [10].	

**Dichloran 18 % Glycerol Agar (DG18, Hocking ve Pitt 1980) PH 5.6 ± 0.2.**

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Dichloran-Gliserol-Agar-baz (Oxoid)	31.5 g
Gliserol (susuz)	220.0 g
İz element stok çözümü	1 ml
Kloramfenikol	0.05 g
Agar	20.0 g
1000 mL Distile suya tamamlanır, otoklavdan sonra 0.05 klortetrasiklin eklenilir [11].	

**Yeast Extract Sucrose Agar (YES, Frisvad 1981) PH 6.5 ± 0.2.**

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Yeast extract (Difco)	20.0 g
Sakaroz	150.0 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.5 g
İz element stok çözeltisi	1 ml
Agar	20.0 g
1000 mL Distile suya tamamlanır [9].	

**Oatmeal Agar (OA, Samson ve ark. 2010) PH 6,5 ± 0.2.**

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Yulaf ezmesi / gevreği	30.0 g
İz element stok çözeltisi	1 ml
Agar	20.0 g
1000 mL Distile suya tamamlanır [12].	

---

**Tablo 1.2' devamı:**

**İz element stok çözeltisi (100 ml)**

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.5 g
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.1 g
1000 mL Distile suya tamamlanır [8].	

**Czapek Yeast Autolysate Agar ile 5 % NaCl (CYAS) PH 6.2 ± 0.2.**

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Czapek konsantresi	10 ml
Sakaroz	30.0 g
Yeast Extract (Difco)	5.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g
İz element stok çözeltisi	1 ml
NaCl	50.0 g
Agar	20.0 g
1000 mL Distile suya tamamlanır [8].	

CZ agar Raper ve Thom (1949) ve Ramírez (1982) tarafından taksonomik analizlerde kullanıldı ve kimyasal olarak iyi sonuçlar gösterdi. Bununla birlikte, *Penicillium* çalışmaları için yaygın olarak kullanılmamaktadır. YES, türlerin metabolitlerinin belirlenmesi için önerilen ortamdır. Eşeyli çoğalan suşlar OA besiyeri üzerinde yetiştirildiğinde sıklıkla değerli taksonomik bilgiler sağlar. Asit üretimi, CREA' daki renk reaksiyonuyla (mordan sarıya kadar) gözlenir ve yakından ilişkili türleri ayırt etmek için genellikle faydalıdır [10, 13].

Dichloran 18 % Glycerol agar (DG18) ve Czapek Yeast Autolysate agar ile %5 NaCl (CYAS) genellikle düşük su aktiviteli ortamlardaki büyüme oranları ile ilgili yararlı bilgiler elde etme amacıyla kullanılır. Tutarlı konidyal renkler için, eser element olarak çinko sülfat ve bakır sülfat (100 ml damıtılmış suda 1 g ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ve 0.5 g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) kullanılır; çünkü eser elementlerin pigment üretimi de için kritik önem taşıdığı literatürde görülmektedir [5]. Visagie ve ark. (2014) agar ayrıca kullanılan içeriğinin koloni görünümünü etkilediğini gösterildi [11].

Petri kapları hava alış-verişini izin verdiği için dolayı kültür karakteristiklerinin gözlemesi için en uygun seçenek cam petri kaplarıdır, polistiren

petri kapları bu kullanıma uygun değildir [2]. Petri parafilm ile sarıldığında hava değişimini kısıtlayarak çoğu zaman büyüme ve sporülasyonu engellemektedir [14].

Petri kaplarında yapılan kültürlerde inkübasyon sonrasında koloni çapları ölçülür. *Penicillium*' u tanımlamak için kullanılan önemli karakterler arasında koloni dokusu, sporülasyon derecesi, konidyanın rengi, miselin bolluğu, dokusu ve rengi, çözünebilir pigmentin ve eksudaların varlığı ve renkleri, ters koloni renkleri (kolonu altı rengi) ve CREA üzerinde büyüme ve asit üretimi derecesi (bazı üretim türlerinde asit üretimi ve bunu takiben baz üretimi) yer alır [15].

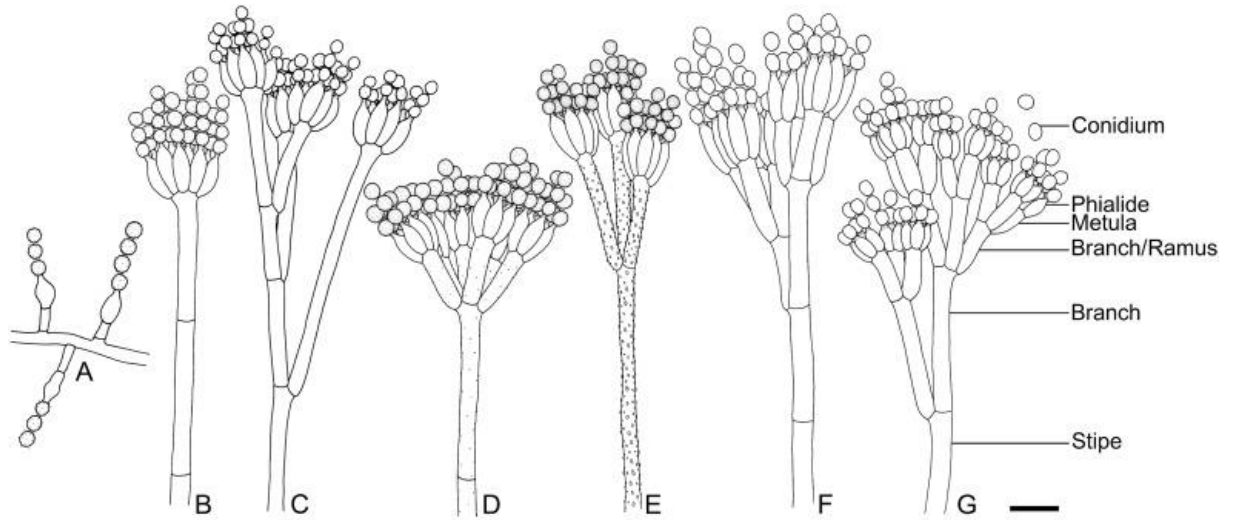
### 1.2.1.2 *Penicillium* Mikromorfolojisi

*Penicillium*' un konidiyofor ve klestotezyumları (üretildiğinde) taksonomide büyük önem taşır. *Penicillium*' un sınıflandırılmasında konidiyofor dallanma tipleri (Şekil 1.1)' de gösterilmiştir [16, 10, 2]. Bu dallanma tipleri *Penicillium* için şu anda kabul gören seksiyonlarda taksonomik olarak tam uyumlu olmamasına rağmen, onları doğru bir şekilde karakterize etmek önemlidir. Konidiyoforlar çoğu zaman basit olmaktan ziyade, çok sayıda dallanma seviyesine sahip karmaşık desenler, simetrik veya asimetrik desenler oluştururlar (Şekil 1.1A). Monoverticillate konidiyoforun ucunda fiyalid ve konidyum (veya konidiya zinciri) yer alır (Şekil 1.1B). Düzensiz olarak çatallanan konidiyofor en basitten komplekse doğru sayısız subterminal dallar oluşturur (Şekil 1.1C) [2]. Biverticillate konidiyoforlar ile fiyalid arasında üç veya daha fazla metulaya bulunur; metula farklı veya eşit uzunlukta olabilir, genellikle az ya da çok silindriktir (Şekil 1.1D, E).

Terverticillate konidiyoforlar ve metula arasında birden fazla dallanma seviyesine vardır. Çoğunlukla konidiyofor ekseninin bir devamı ve bir yan dal, bazen de birden fazla dal çemberi şeklinde dallanır (Şekil 1.1F). Kuaterverticillate konidiyoforlar, yalnızca birkaç tür tarafından üretilir ve terverticillate örüntüsünün ötesine geçen bir ekstra seviyeye sahiptir (Şekil 1.1G). Terverticillate ve kuaterverticillate konidiyoforlar belirgin derecede asimetrik olma eğilimindedir. Birçok türün kolonilerinde, özellikle de kültürlerde, bozulmaya başladıkça, birden fazla dallanma örüntüsü veya ara formlar olabilir. Diğer önemli mikroskopik karakterler, konidia boyutları, şekli, rengi ve yüzey süslemesini içerir. Mikroskopik olarak konidia yüzeyi desenleri en iyi differential interference contrast (=Nomarski)

mikroskopta (DIC) gözlenir. Konidia yüzey süsleri, bazen hazırlanan preperetlerdeki hava ceplerinde gözlenebilir.

Mikroskopik gözlemler için 7-10 günlük eski MEA kolonilerinden preparat hazırlanır. Bunun için koloni renginin ortaya çıkmaya başladığı kolonilerden, koloni kenarına yakın bir bölgeden ve konidiayı gözlemek için koloni merkezlerinden alınan çok küçük örneklerden preparat hazırlanır. Mantar misellerini daha iyi gözlemleyebilmek için Shear solüsyonu veya pamuk mavisi ile laktik asit gibi diğer çözeltiler de kullanılabilir [12, 17]. Fenolün aşındırıcı ve toksik olması nedeniyle laktofenol önerilmemektedir. Konidyanın hidrofobik olması nedeniyle aşırı havanın laktik aside girmesini önlemek için ve çok miktardaki konidyanın uzaklaştırması için %70 etanol sıklıkla kullanılır. Konidiyoforları fotoğraflamak amacıyla sporlar iki veya üç kez yıkanır. Çok yoğun kolonileri olan bazı türleri mikroskop altında incelemek için çok ince iğnelerle konidiyoforları ayırmak gereklidir.



**Şekil 1.1:** *Penicillium*' da görülen konidiyofor dallanma şekilleri. A, Tekli phialide ile konidiyofor (basit). B, Monoverticillate (bir safhalı dallanma). C, Çatallanma. D, E, Biverticillate (iki safhalı dallanma). F, Terverticillate (üç safhalı dallanma). G, Kuatervertisilat (dört safhalı dallanma), konidiyoforların kısımlarını tanımlamak için kullanılan terimler verilmiştir. Ölçek çubuğu = 10 µm [5].

### 1.3 *Penicillim* Uygun Yaşam Ortamları

#### 1.3.1 *Penicillium* Ekolojisi

*Penicillium* genusu, serin, orta dereceli iklimli ve organik materyal içeren yerlerde bulunan toprak funguslarıdır. *Penicillium* ve *Aspergillus*' un saprofitik genusları, *Eurotiales*' in en tanınmış temsilcileri arasındadır, çoğunlukla biyolojik olarak parçalanabilir maddeler üzerinde yaşar. Amerika' da yaygın olarak bilinirler, özellikle *Penicillium* türleri gıda bozulmasının ana nedenleri arasındadır[18]. Birçok tür yüksek toksisitede mikotoksin üretir. Bu *Penicillium* türlerinin tahıllarda ve diğer depolanmış gıdalarda çoğalabilme yeteneği, düşük nemde gelişme eğilimine ve tahıllar yeterince nemli iken hava akımıyla hızla kolonize olma özelliklerine bağlıdır. Bazı türlerin, genellikle açıkta bırakılan ekmekler üzerinde büyüyen ve ince tüylü doku veren mavi bir rengi vardır[4].

Bazı *Penicillium* türleri; *P. expansum* elma ve armutlar, *P. digitatum*, narenciye [19] ve *P. allii*, sarımsak [20] da dahil olmak üzere bitkilerin meyvelerini ve çiçeklerini etkiler. Bazı türlerin hayvanlar için patojen olduğu bilinmektedir; *P. corylophilum*, *P. fellutanum*, *P. implicatum*, *P. janthinellum*, *P. viridicatum* ve *P. waksmanii*, sivrisineklerin potansiyel patojenleridir[21]. Vietnam bambu sıçanlarında ölümcül etkilere sahip olan *P. marneffeii*, güneydoğu Asya' da insan immün yetmezlik virüsü (HIV) bulaşmış bireyler için ortak bir fırsatçı enfeksiyonudur [22].

*Penicillium* türleri, kapalı ortamların havasında ve tozunda bulunur. Fungus açık havada kolayca taşınabilir ve büyüme için atık organik maddelerden besin maddeleri elde ederek yetişir. *Penicillium* büyümesi, belirli bir yüzey üzerinde yeterli miktarda nem mevcut olduğu sürece, bağıl nem düşük olsa dahi yüzeyde gerçekleşebilir. *Aspergillus* ve *Penicillium* sporlarının, konutların iç havasında ve açık alanlarda çok yaygın olarak bulunmaktadır [23].

Bazı *Penicillium* türleri Örneğin; *P. chrysogenum*, *P. steckii*, *P. notatum*, *P. cyclopium* ve *P. nalgiovensis* makineleri ve bunların yakıtlarını etkiler; bunların çalıştırılıp korunması için kullanılan yağlayıcı materyallere zarar verir. Bunlardan *P. chrysogenum*, *P. rubrum* ve *P. verrucosum* makinaların yağlarına zarar verirken, *P. regulosum*, optik ve koruyucu camı tahrip eder [24].

### 1.3.2 *Penicillium* Türleri Gıda Bozulmasına Neden Olur

*Penicillium* türleri besin maddelerinde çok yaygın bulunur. Çoğu tür besinlerin bozulmasına, mikotoksinlere veya gıdalardaki zararlı biyokimyasal değişikliklere neden olur. Bu etkiler çoğunlukla türe özgü olduğundan, *Penicillium*' un tür düzeyinde tanılanma gıda muhafazası ve güvenliği açısından çok önemlidir. Bu türlerin çoğu kapalı yerlerde bulunur ve alerjik oluşturabilir. Gıda bozulmasına neden olan *Penicillium* türleri üç ana gruba ayrılır; a) bunlar taze gıdaları, özellikle meyveleri enfekte edenler, b) tahıllara bulaşanlar, c) hasat öncesi, sonrası ve kurutma esnasında olan işlenmiş gıdaları enfekte edenlerdir. Bu gruplar aşağıda ayrı olarak ele alındı [1].

*Penicillium* türleri, narenciye ve diğer meyvelerin bozulmasına yol açan başlıca funguslardır. Bu türler dünya çapında meyveler ve sebzeler üzerinde büyük kayıplara sebep olur. Söz konusu türlerin yaptığı hastalıklar, inceleme, kültür ve tanılama ve mikotoksin analizleri ile kolayca ortaya çıkartılabilir. Elmalar ve armutlar, *Penicillium expansum* tarafından kolayca bozulur ve karakteristik kahverengi, çürümeye neden olur [1].

*Penicillium expansum* -2 °C, 35 °C arasında ve 0.83 a<sub>w</sub> su aktivitesinde büyür [25]. Geniş spektrumlu patojen olarak domates, çilek, üzüm, mango ve avokado gibi sebze ve meyveler üzerinde geliştiği gösterilmiştir [26]. *Penicillium expansum* hem önemli bir bozulma fungus hem de elma ve armut suyunda *P. expansum* nedeniyle çürümenin sonucu olan mikotoksin patulin' in ana kaynağı olarak ticari açıdan önemlidir. Meyve suyundaki patulin seviyeleri ezmeden önce çürümüş meyveleri yok sayarak etkin bir şekilde kontrol edilebilir. Bim rçok meyve suyu fabrikası, işlemden önce çürümüş olan meyveleri ayırmak için yüksek basınçlı su spreyleri kullanmaktadır.

*Penicillium solitum*, daha az yaygın bulunan önemli bir patojendir. *P. expansum*' un büyümesini kontrol etmek için kullanılan fungusidlere karşı dirençlidir ve bu nedenle elma bozulmasındaki rolü son yıllarda artmıştır [27, 28]. Bu tür ayrıca peynirin bozulmasına neden olur [29, 30]. *Penicillium solitum* terverticillate bir *Penicilli*' dir. Mikotoksinler üretilmez. Bu türün fizyolojisi üzerine çok az bilgi kaydedilmiştir, ancak muhtemelen *P. expansum* ile benzer büyüme karakteristiklerine sahiptir. *Penicillium funiculosum* elma ve çekirdeğinin çürümesine neden olur [25]. *Penicilli* bir biverticillatedir ve *Biverticillium* alt-genus türleri kısa, pürüzsüz

konidiyofor üzerinde oluşur [25]. Mikotoksin üretilmemektedir. *Penicillium digitatum* turunçgil meyvelerinin çürümesine neden olur ve ekonomik kayıplar da oldukça yüksektir. *P. digitatum*, turunçgilde ve sıklıkla portakalları kahverengi çatlaklar oluşturarak bozulmasına neden olur. Penicillileri çok büyüktür, biverticillate' den terverticillate' ye gelişir ve pürüzsüz konidiyoforlar üzerinde oluşur. Bahçedeki meyvelerin ilk kontrolü, yere düşen meyvelerin uzaklaştırılmak mantar hastalıklarının engellemesidir [26]. Hasat edilen meyveler üzerindeki kontrol, fungus öldürücü spreyler veya dipslere dayanır ancak tiyabendazol, benomil ve imazalil direnci çoğu ülkede daha fazla veya daha düşük oranda gelişmiştir [31].

*P. italicum*, turunçgillerden en sık limonda çürümeye neden olur. Çürüme esnasında fungus gelişimi mavi veya mavi yeşil renktedir. Terverticillate bir Penicilli, pürüzsüz konidiyoforlar üzerinde taşınır [25]. *P. italicum* gibi, *P. ulaiense* de narenciye, özellikle portakal ve limonda patojeniktir. Tanımından kısa bir süre sonra, izolatlarına dünyanın dört bir yanındaki narenciye yetiştirme bölgelerinde raslanmıştır. *P. ulaiense* *P. italicum*' dan daha zayıf bir patojendir [32]. Büyüme parametreleri, *P. italicum*' un büyüme parametrelerine benzerdir. *P. italicum*, *P. ulaiense* ve *P. digitatum* türleri diğer besin kaynaklarında nadir olarak bulunur. Bu üç türün mikotoksin ürettiği bilinmemektedir. Meyve ve sebzelerin bozulmasına neden olan *Penicillium*' un diğer türleri ekonomik olarak daha az önemlidir.

*Penicillium brevicompactum* *Penicillium*' a özgü bir alt-genustur terverticillate büyük bir Penicilli sahiptir ve yaygın olarak çok çeşitli meyvelerden izole edilen zayıf bir patojendir. Depoda saklanan elma, üzüm, fungus, cassava, patates [25] ve zencefillerde bozulmaya neden olduğu bildirilmiştir [33]. *P. brevicompactum* zayıf mikotoksin olan mikofenolik asidi üretir ve gıdalarda önemi yoktur.

*Penicillium aurantiogriseum* meyveler üzerinde geniş yelpazedeki zayıf bir patojendir. Depolanmış elma, armut, çilek, üzüm, kavun, domates ve patates gibi meyve ve sebzelerin bozulmasına neden olduğu bildirilmiştir [26, 30, 34]. Terverticillate bir Penicilli'dir, *Penicillium* alt-genusu olarak, pürüzlü pürüzsüz konidiyofor üzerindeki konidia düz yüzeye sahiptir [17]. *P. aurantiogriseum*' un fizyolojisi, *Penicillium* alt-genusu olarak sınıflandırılan birçok diğer türün fizyolojisi ile benzerdir [25]. Bu tür Penisilik asit, rofortin C ve verrucosidin gibi mikotoksinleri üretir:



*P. allii* ve *P. corymbiferum* sarımsaklarda çürümeye neden olur. Ayrıca çok nadir bulunur [35, 30]. Terveticillate bir Penicilli' ye sahiptir. Konidiyofor yüzeyi uzun ve pürüzlüdür. Her yerde bulunan *Penicillium chrysogenum* türlerinin çeşitli meyvelerin bozulmasına neden olduğu bilinmektedir. Ancak önemli bir patojen değildir. *P. chrysogenum* suşunun penisilin üretimi için kullanılmaktadır.[1]

*Penicillium oxalicum* sera salatalıkları ve tatlı patateslerin bozulmasına neden olur ayrıca önemli bir patojen olduğu bildirilmiştir [25]. Bu tür çok sayıda konidia üretir. Biverticillate bir penicilli' ye sahiptir. Konidiyoforlar pürüzsüzdür. *Furcatum* alt-genusu *Furcatum* bölümünde sınıflanmaktadır [25]. *P. oxalicum* tahıl toksisitesinde önemli bir mikotoksin olan sekalonik asit D' yi üretir [36].

Tahıllar *Penicillium* türleri için büyük bir yaşam alanıdır. Özellikle *Penicillium* alt-genusuna ait olan çoğu tür için ekolojik yaşam alanı toprak veya çürümekte olan bitki örtüsü yerine diğer alt-genuslardaki türlerdir. Bununla birlikte, *Penicillium* türleri hasattan önce tahılları istila ederler, dolayısıyla ne patojen ne de komensal olarak kabul edilirler. Hasat sonrası işgalciler olarak bilinirler. Tahıllara olan bağlılığın nedeni bilinmemektedir. Avrupa tahıllarında en önemli tür *Penicillium verrucosum*' dur. Terveticillate bir penicilli' dir konidiyoforları güçlü, pürüzlü yüzeyidir. *P. verrucosum* genellikle belirgin bir bozulmaya neden olmaz, ancak okratoksin A' nın üretilmesinden sorumludur. Avrupa' da bu mikotoksinler için sıkı mikotoksin limitleri belirlenmiştir. Son çalışmalarda bu türün buğday ve arpayı hasattan sonra istila ettiğini göstermiştir. Fizyolojik olarak, *P. verrucosum* 0.8 a<sub>w</sub>' nin altında büyüeyebilen bir kserofildir. Sıcaklığın 31 °C' nin altında olduğu bölgelerde büyümesi ve tropik bölgelerde bulunmaması nedeniyle ABD ve Avustralya gibi sıcak ılıman bölgelerde nadir olarak bulunur. Sonuç olarak okratoksin A, yalnızca Avrupa ve Kuzey Amerika' daki tahıllarda bulunmaktadır.

*Penicillium citreonigrum* 100 yıl önce sarı pirinç tüketimi nedeniyle sarı pirinç sendromu Japonya ve diğer oryantal ülkelerde büyük bir önem taşıyordu ve genç sağlıklı kişiler için ölümcül bir hastalığı [37, 38]. Bugün bu hastalığa sitreoviridin mikotoksinin neden olduğu bilinmektedir. Bu türün konidiyoforları küçük, narin ve pürüzsüz yüzeyi sahiptirler. Monoverticillate penicillileri ürettiği için, *Aspergilloides* alt-genusunda sınıflandırılır [25]. 1915' te Japonya' da sarı pirinç satışı yasaklandıktan sonra hastalık ortadan kalkmıştır. *P. citreonigrum* şimdi nadir bir tür olarak kabul

edilmektedir. Sarı pirinç sendromunda diğer *Penicillium* türleri de rol almış olabilir. biverticillate bir penicilli' ye sahip olan *P. adicum* islanditoksin, sikloklorotin, luteoskirin ve eritroskirin gibi mikotoksinler üretir ve *Biverticillium* alt-genusunda sınıflandırılır. *Penicillium*' a ait diğer türler esas olarak tahıllar üzerinde bulunur ve bozulmaya neden olabilmektedir. Örneğin, mısır bozulmasına neden olan *P. aurantiogriseum*; mısırın nemli ve soğuk bir şekilde depolanması nedeniyle oluşur, ayrıca 'mavi göz' adlı bir hastalığa sebep olabilmektedir [39]. *Penicillium oxalicum* mısırın böcek tarafından hasara uğratılması veya yaralanmasına bağlı olarak mısırın hasat öncesi hasar görmesine neden olur.

Birçok *Penicillium* türü 0 °C' nin altında büyüme yeteneğine sahiptir ve bu nedenle paketlenmiş, soğutulmuş ürünlerin bozulmasının başlıca nedeni de budur. Az sayıdaki tür oksijen miktarı azaldığında yetişme yeteneğine sahiptir. *Penicillia* neredeyse buzdolabındaki tüm ürünlerde görülebilir. En savunmasız gıda yüksek su aktivitesi olan peynirdir ve genellikle mikrobiyal stabilite soğutma ve ambalaja bağlıdır. Düşük sıcaklıklarda yetişme yeteneği, düşük oksijen gerilimlerinde büyüme, lipolitik etkinlik ve zayıf asitli koruyuculara karşı direnç içerir. *P. commune*, Avrupa' da peynirlerin bozulmasının en yaygın nedenidir [30]. Terverticillate geniş bir *Penicilli*' ye sahiptir. *P. commune* ve *P. camemberti* türü yüzyıllar boyunca peynirleri olgunlaştırmasında yer almaktadır.

Avustralya' da, *P. roqueforti* tarafından peynirin bozulması da yaygındır. Bu tür, peynir üretiminde de kullanılır aynı zamanda *P. roqueforti* kaşar peyniri gibi ürünler üzerinde önemli bir bozulma önleyici olarak da işlev görür. Bu türün terverticillate bir penicilli yapısı vardır. Koyu yeşil renklidir, konidiyoforları uzun ve çok kalın duvarlıdır. Bu türün temel fizyolojisi sıcaklık aralıklarında büyüme ve azaltılmış su aktivitesindeki büyüme gibi *Penicillium* alt-genusunun diğer birçok türünün fizyolojisi ile benzerlik gösterir. Bununla birlikte *P. roqueforti*, herhangi bir *Penicillium* türünden büyüme için en düşük oksijen ihtiyacıyla ayırt edilir. Aynı zamanda zayıf asitli koruyuculara karşı nadiren dirençlidir. Bu durum, *P. roqueforti*' nin peynir gibi çok çeşitli işlenmiş gıdalarda büyük bir bozulma etkeni olduğunu gösterir [40]. Peynirlerde genellikle koruyucu yoktur ancak krem peynir gibi bazı peynir ürünleri sorbat içerir. *P. roqueforti* ve diğer bazı türler, sorbatın trans-1,3 pentadien' e dekarboksilatlanmasıyla bozulmaya neden olabilir ve bu da 'kerosen' lezzeti olarak bilinen bir lezzet kusuruna neden olur. Peynir bozulmasına neden olan

diğer türler *P. chrysogenum*, *P. expansum*, *P. solitum*, *P. verrucosum*, *P. viridicatum* ve *P. brevicompactum*' dur [25].

*P. citrinum*, tipik görünümünde koloniler, bol miktarda sitrinin üretilmesine bağlı olarak sarı eksudat, çözünebilir pigment ve zıt renklere sahiptir. Konidiyoforlar pürüzsüz duvarlıdır ve tipik olarak *Furcatum* alt-genusu *Furcatum* bölümü olarak adlandırılan biverticillate bir *Penicillium*' dur.

Yüksek yağlı yiyeceklerin ve reçellerin özellikleri farklı olduğundan bir *Penicillium* türünün margarin ve reçelin bozulmasına neden olması şaşırtıcıdır. *P. corylophilum* biverticillate bir penicilli' ye sahiptir. Konidiyoforlar pürüzsüz duvarlıdır. *Furcatum* alt-genusunun *Furcatum* bölümünün karakteristik yapısını ve sıklıkla metulaların eşit olmayan uzunluklarını göstermektedir[25]. Bu türün mikotoksin üretmediği bilinmektedir. Margarin içindeki bozulmanın kontrolü, tuz içeriğini yükseltmek veya uygun koruyucular eklemek suretiyle gerçekleştirilir. Reçeller sıcak doldurulduysa ve kaplar soğumadan önce tersyüz edildiyse, bozulma nadirdir. Pastörizasyon *Penicillium* da dahil olmak üzere birçok fungus türünde konidia (eşeysiz üreme sporları) için öldürücüdür. Bununla birlikte bazı *Penicillium* türleri ve yakından ilişkili diğer genoslardan bazıları, daha yüksek ısı direncine sahip olan askosporlar (eşeyli üreme) üretmektedir. Bazı fungusların askosporları normal pastörizasyon işlemlerinde 90 °C veya daha fazla sıcaklıkta sağ kalabilirler. Askospor üreten her tür, pastörize ürünlerde potansiyel bir bozulma etkindir. Çoğu pastörize ürün, sınırlı oksijen bulunan koşullar altında ambalajlanmaktadır bu nedenle funguslarda bozulma, düşük oksijen ihtiyacı olan birkaç türle sınırlıdır.

*Penicillium citrinum* 5 ile 38 °C arasında ve 0,80 a<sub>w</sub> değerinin biraz üzerinde büyür [25]. *P. citrinum* neredeyse her çeşit yiyecekte bulunur: küçük taneli tahıllar, mısır ve buğday unu, fıstık, ceviz, antep fıstığı ve fındık da dahil olmak üzere; mayalanmış ve sertleştirilmiş etler, örnek; kakao ve kahve çekirdekleri ve soya fasulyesi dahil olmak üzere diğer fasulye çeşitlerinde bulunur. Düşük sitrinin seviyeleri gıdalarda sıklıkla bulur. *P. citrinum* sıklıkla belirgin bir bozulmaya neden olmaz, bu nedenle sitrinin gıdalarda ciddi bir tehlike olduğu düşünülmez. Kuşlarda memelilere göre çok daha toksiktir ve zaman zaman kanatlılarda hastalıklara neden olmuştur.

İkinci bir yaygın tür *P. chrysogenum*' dur. Genellikle *P. citrinum* ile oluşur ve aynı çeşit gıdalarda bulunur. Bununla birlikte yukarıda belirtildiği gibi, aynı zamanda taze çeşitli taze meyvelerde zayıf bir patojendir. Biverticillate bir Penicilli' dir. Konidiyofor pürüzsüz, 4 °C ile 37 °C büyür ve optimum sıcaklık 23 °C' de ve 0.78 a<sub>w</sub> 'ye kadar çimlenen bir kserofildir [25]. Mikotoksin üretmez.

*P. crustosum*' un tahıl ve hayvan yemi örneklerinin çoğundan izole edildiği bilinmektedir. *P. crustosum*' un mısır, işlenmiş et, peynir, bisküvi, kek ve meyve sularının bozulmasından sorumlu olduğunu gösterilmiştir [25]. Ayrıca narenciye ve kavunlarda zayıf bir patojendir [30]. Dolayısıyla, hammadde ve bitmiş ürünlerde *P. crustosum* ortaya çıkabilir. İşlenmiş gıdalarda *P. crustosum*' un oluşması yetersiz işleme, işleme sonrası yeniden kontaminasyon, kusurlu ambalajlama, aşırı su aktivitesi veya gıdanın stabilitesi için soğutmaya bağımlılık gibi faktörlerden herhangi birine bağlı olabilir. *P. crustosum*, *Penicillium* alt-genusunda yer almaktadır. Terverticillate bir penicilli olarak uzun, kalın duvarlı konidiyoforu sahiptir. Bu türün fizyolojisi çok az incelenmiştir ancak *P. expansum* gibi yakından ilişkili türlere benzer. *P. crustosum* potansiyel bir nörotoksik mikotoksin olan penitrem A' nın ana kaynağı olduğu için tanımlanmasında önem kazanmaktadır. Hayvanlara verilen Penitrem, düşük dozlarda sürekli titreme yapar ancak yüksek konsantrasyonlarda hızla ölümcüldür. İnsanlarda ara sıra hastalığa neden olduğu görülmüştür [41]. *P. glabrum* her yerde bulunan bir türdür. *P. glabrum* peynir ve margarin gibi gıdaların bozulmasına neden olur bununla beraber her çeşit kurutulmuş ve konsantre gıdada bulunur.

Gıda bilimcileri koruyucuların kullanımını düşürmeye, süreç şiddetini azaltmaya ve raf ömrünü uzatmaya çalıştıklarından *Penicillium* türlerinin bozulma olasılığı artmaya devam edecektir. Diğer koruma yöntemlerinin yokluğunda gıdaların düşük sıcaklıklarda depolaması birçok *Penicillium* türünün büyümesini kontrol etmek için yetersizdir bu nedenle ürünlerin stabilitesi için düşük sıcaklık etkisizdir. Üreme olamadığı durumlarda *Penicillium* sporları pastörizasyonla etkisiz hale getirilir bu nedenle ısı bir işlemin ardından aseptik paketleme *Penicillium* bozulmasını kontrol altına almanın en iyi yoludur.

## 1.4 *Penicillium* ' da Mikotoksin Üretimi

Gıdalarda yaygın olarak görülen fungal büyüme, insanlarda bağışıklığın bastırılmasına, kanserlere ve çeşitli alerjik yan etkilere neden olabilen mikotoksinlerin üretimiyle sonuçlanabilir. Uzmanlara göre, insan sağlığında önemli olan mikotoksinler majör ve minör mikotoksinler olmak üzere 2' ye ayrılır. Majör olanlar Aflatoksinler, Okratoksin-A, patulin ve bazı Triketesener. Minör olanlar ise; Citreoviridin, Sitrinin, Siklopiazonik asit, Penisilik asit, Roquefortine-C, Chaetoglobosin, Mikofenolik asitin, Penitrem-A, Rubratoxin, PR toksini, Verrucosidin, Xanthomegnin, Viomellein ve Vioxanthin gibi mikotoksinlerdir. Bu mikotoksinler, sınırlı miktarda olmak üzere sadece birkaç tür fungus tarafından üretilir. Aflatoksinler, *Penicillium* genusundan pirinç gibi gıdalarda *P. aurantiogriseum*, *P. corylophilum* ve *P. brevicompactum* vb tarafından üretilen güçlü karsinojenlerdir [43]. Okratoksin-A, bir böbrek toksini ve olası kanserojendir. *Penicillium verrucosum* tarafından soğuk iklimlerde tahıl tanelerinde üretilir. Trichothecenes yüksek bağışıklık baskılıdır ve zearalenon östrojenik etkilere neden olur [3, 16].

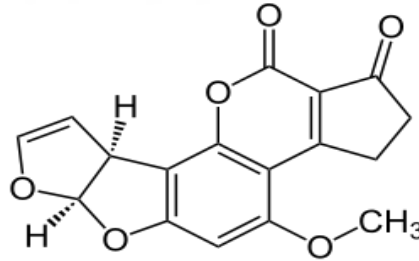
### 1.4.1 Majör Mikotoksinler

#### 1.4.1.1 Aflatoksin

Aflatoksinler hem akut karaciğer hasarına, karaciğer sirozuna, hem de tümörlerin indüksiyonuna ve teratojenik etkilere neden olan kronik bir toksiktir [44]. Aflatoksin dört büyük doğal Aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 olarak bilinir. B' ve G', ince katmanlı kromatografi plakalarında UV ışığı ve bu bileşiklerin üretilen mavi ve yeşil renkleri belirtirken, 1 ve 2 numaralı rakamlar sırasıyla majör ve minör bileşiklere işaret eder. Aflatoksin B1 ve B2 ineklerdeki laktasyon dönemi (yavru verim dönemi) süresince (yaklaşık % 1.5) hidroksitlenir ve aflatoksinler M1 ve M2 süte bulunur [45]. Bileşikler ana moleküllere kıyasla daha düşük toksisiteye sahip olmak birlikte, bebeklerin süt tüketiminin yaygın olması nedeniyle önemlidir. Yüksek toksisitesi nedeniyle, gıdalardaki ve yemlerdeki aflatoksinler için düşük limitler birçok ülke tarafından belirlenmiştir. Yakın tarihli anlaşmalara göre, 15 µg kg<sup>-1</sup> aflatoksin, dünya ticaretinde tüm gıda ürünlerinde izin verildi.

Aflatoksin B1, hayvan türlerinde bilinen en güçlü karaciğer kanserojeni olduğu kanıtlanmıştır. İnsan karaciğer kanseri Orta Afrika' da yüksek bir orandadır ve Güneydoğu Asya' nın bazı bölgelerinde görülür; bu nedenle aflatoksinlerle muhtemel bir bağlantı söz konusudur. Birkaç Afrika ülkesinde ve Tayland' da yapılan çalışmalar aflatoksin logaritması ve insan karaciğer kanseri oluşumu arasında bir korelasyon bulunmuştur [46] Yüksek aflatoksin alımı ve yüksek karaciğer kanseri oranıyla ilişkili olduğu yönünde çok sayıda kanıt vardır [47, 48]. Aflatoksin B1 sınıf 1 insan kanserojeni olarak düşünülmektedir [49].

Doğada başlıca aflatoksinler üreticisi *Penicillium* türleri. *P. aurantiogriseum*, *P. corylophilum*, *P. brevicompactum* [43], *P. puberulum*, *P. variable* ve *P. citrinum* ' dur [50]. Gelişmiş ülkelerde, algılanan bir risk taşıyan gıdalarda aflatoksin miktarlarını düşürmek için temizleme prosedürleri kullanılır. Fıstık için, fungus oluşumu genellikle çekirdeğin renginin bozulmasının sebebidir. İstatiksel olarak örnekleme duyarlı ürünlerin ve gıdaların, hem ihracat yapan hem de ithalat yapan ülkelerdeki sağlık yasalarının katı gereksinimlerini karşıladığından emin olmak için, büyük numuneler örneklenir, bunlardan alt örneklerin hazırlanır, örnekler homojen hali getirilir sonra standartlaştırılmış aflatoksin testleri ile değerlendirilir.



Şekil 1.2: Aflatoxin

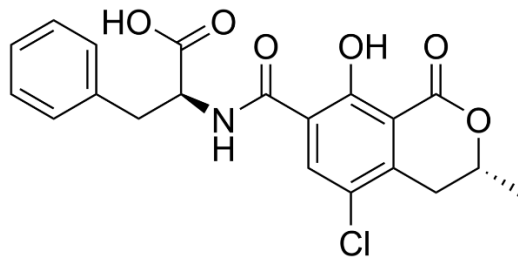
#### 1.4.1.2 Okratoksin-A

Okratoksinler *Aspergillus* ve *Penicillium* genusleri tarafından üretilmektedir. *Penicillium* genusunda okratoksin üreticisi türler *P. viridicatum* *P. cyclopium*, *P. frequentans*, *P. nidulans* ve *P. expansum* vb etkenler tarafından üretilen mikotoksinlerdir. Bu toksinin A, B ve C olmak üzere üç türevidir. Özellikle okratoksin-A (OTA) kuvvetli bir toksik etkiye sahiptir. OTA; mısır, kuru fasulye, kuru üzüm kakao çekirdeği, kahve çekirdeği, soya fasulyesi, arpa, yulaf, turuncgil meyveler ve yer fıstığı gibi besinlerde bu küflerin gelişmesi sonucu oluşmaktadır [50].

OTA, genç sıçanlarda 20 mg kg<sup>-1</sup> oral LD<sub>50</sub> değerlerine ve 1 günlük civcivlerde 3,6 mg kg<sup>-1</sup> oral LD<sub>50</sub> değerlerine sahip bir akut nefrotokindir. Ayrıca farelerde, alabalıklarda, köpeklerde ve domuzlarda öldürücüdür [51]. Ölümcül dozlardan sonra görülen başlıca patolojik değişiklikler renal tübüllerin ve periportal karaciğer hücrelerinin nekrozlarıydı. OTA'nın immünsüpresif, embriyonik ve muhtemelen kanserojen etkileri vardır. OTA, İskandinavya' daki domuzlarda nefrit etyolojisinde (böbrek hastalığı) önemli bir rol oynamaktadır [52] ve aslında kuzey Avrupa' da çok miktarda bulunmaktadır. Bu ciddi bir hayvan sağlığı problemidir.

OTA, yağda çözünmediği ve kolayca atılmadığı için, etkilenen hayvanların yağ depolarında birikir ve buradan domuz yiyen insanlar tarafından yutulur. İkinci bir kaynak, tohum içeren arpa veya buğday ekmeğidir. OTA insan kanında ve benzer konsantrasyonlarda insan sütünde [53] Avrupa' nın geniş bölgelerinde seviyeleri 35 µg kg<sup>-1</sup> rapor edilmiş olarak bulunur [54]. İnsan hastalıklarına ilişkin açık kanıt hala zor olsa da, bu seviyeler Avrupa' daki OTA ile ilgili yaygın bir soruna işaret etmektedir.

OTA' nın *P. viridicatum* tarafından üretildiği de bilinmektedir [55]. Pitt II (1987) tarafından *P. viridicatum* olarak kabul edilen, ancak okratoksin üreten izolatların, ayrı bir tür *P. verrucosum* olarak sınıflandırılmıştır [56]. *P. verrucosum*' un sadece ılıman bölgedeki tahıllarda gelişen Kuzey Avrupa arpa ve buğday ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Buna rağmen Almanya ve diğer Avrupa ülkelerinde et ürünlerinden oldukça sık izole edilmiştir. Başka yerlerde yaygın olarak görülmemektedir [57].



Şekil 1.3: Ochratoxin-A

### 1.4.1.3 Patulin

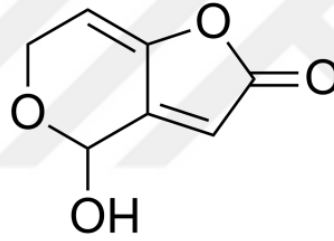
Patulin *P.expansum*, *P.patulum*, *P.aspergillus*, *P. byssochlamys*, *P. carneum*, *P. paneum*, *P. clavigerum*, *P. gladioli*, *P. griseofulvum* ve *P. sclerotigenum* *Penicillium* genusuna ait olan türler tarafından patulin üretilmektedir [3, 58, 59]. *P.expansum* en çok elmalarda bulunan bir mikroorganizmadır [58, 59, 61]. Patulin yaygın olarak meyvelerde elme, armut, kayısı, portakal ve diğer mervelerde meyve suyu, reçeli ve şekerlemesi olarak ürünlerde bulunmaktadır [60]. Genel olarak patulin 5-25 °C' de kontamine edilmiş meyve sularında üretildiği belirlenmiştir [59].

Patulin farelerde idrar oluşumunu engellemiş ve kan glukoz seviyelerini arttırdığını göstermiştir. Kapiller permeabilityyi artırarak ödemlere neden olduğu, hücre membranı permeabilitesini de değiştirdiği bilinmektedir. Çoğu, laktonlarla birlikte patulinin subkütan enjeksiyonuyla karsinojen sebep olduğu gözlenmiştir. Ayrıca kromozom kırıkları ve nükleus gelişim bozukluklarına neden olmaktadır. Patulinin immunosupresif etkiler çalışmalarında sonucu in vitro ve in vivo' da saptanmıştır. Fakat hem iki kısa dönem için hem de üreme sistemi için toksisitesi, uzun süreli toksisite ve karsinojenite için yapılan çalışmalarda bu etkilerin gözlemlendiği değer No Observed Effect Level (NOEL) değerinden yüksektir [58, 59]. Genotoksisite üzerine yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar çok çeşitlilik gösterse de; memeli hücreler üzerinde yapılan çalışmalar pozitif sonuçlar elde edilirken bakterilerle çoğu negatif değerler elde edilmiştir [59]. Yapılan bazı çalışmalarda patulinin deoksiribonükleik asit (DNA) sentezini olumsuz etki gözlemlenmiştir. Bu genotoksik etkilerin, patulinin sülfidril gruplarıyla olan bağlanma yeteneğine bir sonucu olarak DNA replikasyonunda gerçekleştiren enzimleri inhibesyonuna bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Farelerde veya sıçanlarda vücut ağırlığına 1,5 mg/kg kadar teratojenik olduğu göstermemiştir. Daha yüksek değerlerde ise maternal toksisite ve düşük sıklığında artış göstermiştir; bununla birlikte patulinin embriyotoksik olduğunu bildirilmiştir [58]. Patulin karsinojenik toksik bir madde özelliğini sahip olduğunu şüphalanmaktadır. Resmi olmasa da, Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (JECFA) tarafından 1995' te yapılan çalışmalarda 43 µg/kg' lık NOEL değeri ve güvenlik faktörü olarak 100 kullanılmasıyla 0,4 µg/kg vücut ağırlığı olarak geçici bir maksimum tolere edilebilir günlük alım düzeyi (PMTDI) belirlenmiştir. Örneği, 60 kg ağırlığındaki bir yetişkin bireyin için günlük 24 g' a, 20 kg' lık bir çocuk için günlük 8 µg' a ve 10 kg' lık bir çocuk için ise 4 µg' a denk gelmektedir. Bu toksin insan



tarafından sadece işlenmiş meyve ve meyve suyundan alabilmektedir [58, 61]. Uluslararası elma sularında maksimum izin verilebilir konsantrasyon (MAK) olarak 20-50 µg/l arası değişen değerler kullanılmaktadır.

Türk Gıda Kodeksi tatabından ülkemizde elma sularında belirlenen kabul edilebilir en yüksek değer 0,05 mg/kg' dır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından önerilen limit olarak 50 µg/l konsantrasyonudur [62]. Elma sularındaki genellikle patulin miktarı 50 µg/ml' nin altındadır. Günlük maksimum alım düzeyi olarak çocuklar için 0,2 µg/kg vücut ağırlığı; yetişkinler içinse 0,1 µg/kg vücut ağırlığı değerleri saptanmıştır. Bulunan miktar komite tarafından belirlenen tolere edilebilir düzeylerin altındadır fakat elma suları nadiren de olsa ağır derecede kontamine olmuş olabilir [58]. Patulinin şarapla yapılan deneylerinde fermentasyonda tamamen elimine olurken meyve suyu üretimi esnasındaki işlemler sırasında sadece %20'si kaybolduğu görülmüştür [59]. Bu nedenle maruziyeti minimuma indirebilmek için hasarlı, çürük ve küflü meyveler kullanılmaması gerekmektedir [58].



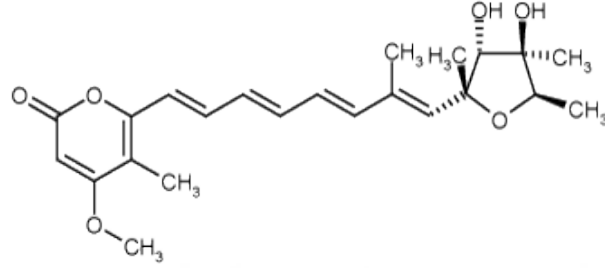
Şekil 1.4: Patulin

## 1.4.2 Minör Mikotoksinler

### 1.4.2.1 Citreoviridin

Citreoviridin (CTV) akut kardiyovasküler hipertansiyon nedeni olarak bildirilmiştir [63]. Pirinçte ve mısırdaki doğal olarak bulunur ayrıca nörotoksik mikotoksin [64] ve mitokondrial ATPaz' ın güçlü bir inhibitörü olduğu düşünülmektedir [65]. Sarı pirinç hastalığına yol açtığı bilinmektedir ancak bu hastalık *P. islandicum* ve toksik metabolitleri halkalı peptidler sikloklorotin ve adaidoksin ve antrakınon luteoskyrin ve rugulosin ile de ilişkilendirilmiştir [66]. *Eupenicillium cinnamopurpureum*, ABD ve Slovakya' daki hububatlarda bulunur ve sitreoviridin' in verimli bir üreticisidir [67]. CTV ilk olarak sarı renkli pirinçte CTV oluşumundan

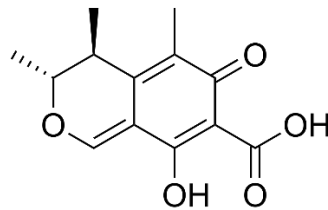
sorumlu *P. citreonigrum*' dan izole edildi. Küçük üreticiler *P. smithii*, *P. miczynskii* ve *P. manginii* başta toprakta bulunurken nadiren gıdalarda bulunurlar [68]. Özellikle CTV, beriberi olarak bilinen vitamin B1 eksikliğine neden olur, sinir ve kas dokularının çalışmasını olumsuz etkiler. Japonya ve Asya ülkelerinde beriberinin görülmesi, küflü ve sarı pirincin tüketimine bağlanmaktadır [79].



Şekil 1.5: Citreoviridin

#### 1.4.2.2 Sitrinin

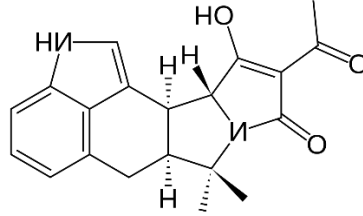
Sitrinin bir nefrotoksindir, ancak okratoksin-A' dan daha az önemlidir; toksisite çalışmalarında hayvanlarda böbrek proksimal tübüllerine zarar veren nefrotoksin olduğunu gösterildi [70] ve OTA ile birlikte, insan endemik Balkan nefropatisinde potansiyel bir nedene bağlı madde olduğu düşünüldü [71]. *Penicillium*, *Aspergillus* ve *Monascus* genusu ve filamentli mantarların bazıları tarafından üretilen bu mikotoksin tohumlar, gıdalar, yemler ve ayrıca biyolojik sıvılarda doğal bir kirletici madde olarak bulunur. Gıdalarda dünya çapında etkili ve tutarlı bir sitrinin üreticisi olan ipliksi mantar *Penicillium citrinum*' dan önce izole edilmiştir [25]. Diğer önemli *Penicillium* türü sitrinin üreticileri, çoğunlukla Avrupa' daki tahıl kaynaklı *P. verrucosum*, meyve ve diğer gıdalarda *P. expansum*, soğan, havuç ve patates içinde ise *P. radicolica*' dır [72]. Son olarak, sitrinin üreticileri arasında *P. odoratum* ve *P. westlingii*' nin de olduğu bilinmektedir ancak gıdalarda fazla görülmemektedir [73].



Şekil 1.6: Sitrinin

### 1.4.2.3 Siklopiazonik asit

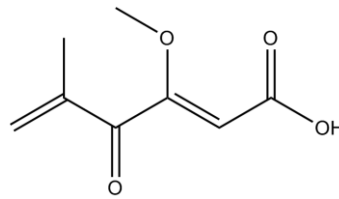
Siklopiyazonik asit (CPA), yüksek konsantrasyonlarda omurgalı canlıların iç organlarında fokal nekroz üreten güçlü bir mikotoksindir ve “X-hastalığı” olarak bilinir [74]. Üreticileri *P. commume*, *P. cammberti*, *P. palitans*, *P. dipodomyicola* ve *P. griseofulvum* olarak bilinmektedir [3].



Şekil 1.7: Siklopiazonik asit

### 1.4.2.4 Penisilik asit

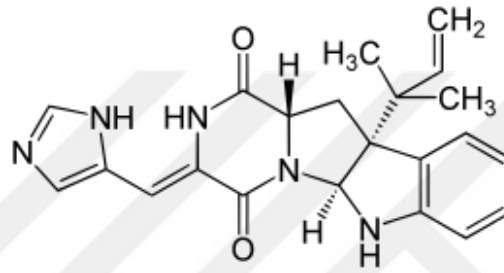
Penisilik asit ve dehidropenikillik asit, küçük toksik poliketidlerdir ancak mikotoksikolojideki başlıca rolleri OTA ile olası sinerjik toksik etkileriyle ilişkili olabileceği için önemli toksisiteye sahip değildir [75]. Penisilik asit, *Penicillium* serisi *Viridicata* üyeleri (genellikle *P. verrucosum* ile birlikte bulunur) tarafından OTA ile birlikte görülebilir. Penisilik asidin ana tür üreticileri *P. aurantiogriseum*, *P. cyclopium*, *P. melanoconidium* ve *P. polonicum'* dur [76]. Penisilik asit ayrıca *P. lulipae* ve *P. radicola* tarafından da üretilir. Soğanlar, havuçlar ve patateslerde bulunur [72].



Şekil 1.8: Penisilik asit

### 1.4.2.5 Roquefortine-C

Roquefortine-C, nörotoksik (paralitik) özelliklere sahip bir mikotoksin [76] olup akut toksisitesi çok yüksek değildir ve mikotoksin olarak bilinir [73] Bununla birlikte çok yaygın bir fungal metabolittir [77]; *Penicillium albocoremium*, *P. atramentosum*, *P. allii*, *P. carneum*, *P. chrysogenum*, *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. griseofulvum*, *P. hirsutum*, *P. hordei*, *P. melanoconidium*, *P. paneum*, *P. radicum*, *P. roqueforti*, *P. sclerotigenum*, *P. tulipae* ve *P. venetum*, *P. concentricum*, *P. confertum*, *P. coprobium*, *P. coprophilum*, *P. flavigenum*, *P. glandicola*, *P. marinum*, *P. persisinyum* ve *P. vulpinum* gibi çok sayıda tür tarafından üretilir[78].



Şekil 1.9: Roquefortine-

Tablo 1.3: Bazı *Penicillium* türleri tarafından ürettiği mikotoksinleri ve bulunduğu substratları

Mikotoksinler	Bulunduğu substrat	Üreten türleri	Kaynaklar
<b>Aflatoksin</b>	Fıstık, yağlı tohumlar, fındık, domuzlarda, kümes, yem, pirinç, mısır, ve süt	<i>P. aurantiogriseum</i> , <i>P. corylophilum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. brevicompactum</i> , <i>P. puberulum</i> ve <i>P. variable</i>	43, 50
<b>Okratoksin A</b>	Tahıllar, etler (jambon, salam, vb.), peynir, tuzlu zeytin, fıstık, meyve, kuruyemiş, yeşil kahve çekirdekleri, arpa, buğday, çocuk ve bebek mamaları, şarap, bira ve kavrulmuş kahve	<i>P. viridicatum</i> <i>P. cyclopium</i> , <i>P. frequentans</i> , <i>P. nidulans</i> ve <i>P. expansum</i>	50, 56

<b>Patulin</b>	Elma, elma suyu, elma reçeli, kayısı, şeftali, domates, yem, portakal ve yamalar	<i>P. expansum</i> , <i>P. gladioli</i> , <i>P. aspergillus</i> , <i>P. patulum</i> , <i>P. carneum</i> , <i>P. clavigerum</i> , <i>P. griseofulvum</i> , <i>P. paneum</i> , <i>P. sclerotigneum</i> , ve <i>P. byssochlamys</i>	3, 58, 59
<b>Citreoviridin</b>	Sarı pirinç ve tahıllar	<i>P. islandicum</i> , <i>P. citreonigrum</i> , <i>P. smithii</i> , <i>P. manginii</i> ve <i>P. miczynskii</i>	66, 68
<b>Sitrinin</b>	Hububat, gıdalar ve yem maddeleri	<i>P. citrinum</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. odoratum</i> ve <i>P. westlingii</i>	25, 72, 73
<b>Cyclopiazonic acid</b>	Uzun süre muhafaza edilen tahıllar, makarna, et ve peynir	<i>P. commune</i> , <i>P. camamberti</i> , <i>P. palitans</i> , <i>P. dipodomyicola</i> ve <i>P. griseofulvum</i>	3
<b>Penicillic acid</b>	Hububat, yem, soğan, havuç ve patates	<i>P. aurantiogriseum</i> , <i>P. lulipae</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. polonicum</i> , <i>P. melaconidium</i> ve <i>P. viridicatum</i> ,	72, 76
<b>Roquefortine C</b>	Yem, peynir, et ürünleri ve değer gıdalar	<i>P. roqueforti</i> , <i>P. vulpinum</i> , <i>P. carneum</i> , <i>P. albocoremium</i> , <i>P. tulipae</i> , <i>P. flavigenum</i> , <i>P. paneum</i> , <i>P. persisinyum</i> , <i>P. atramentosum</i> , <i>P. allii</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. venetum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. griseofulvum</i> , <i>P. marinum</i> , <i>P. hirsutum</i> , <i>P. hordei</i> , <i>P. coprobium</i> , <i>P. raditicola</i> , <i>P. melanoconidium</i> , <i>P. concentricum</i> , <i>P. confertum</i> , <i>P. glandicola</i> , <i>P. coprophilum</i> ve <i>P. sclerotigenum</i>	78

### 1.4.3 *Penicillim' un insanlar üzerinde olumsuz etkileri*

İnsanda görülen patojen türleri nadir olmakla birlikte, bazı türlerin *Penicillium marneffe* gibi, ciddi enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir. Bu spesifik türler genellikle kemik iliği, bağırsak, böbrekler veya akciğerler gibi farklı organları/dokuları etkileyen, tüberküloz veya HIV gibi hastalıklara sahip immün yetersizliği olan bireyleri etkiler. Ayrıca, çoğunlukla protez kapakçılığı takıldıktan

sonra mikrotik keratit, otomikoz ve endokardite yol açan fırsatçı enfeksiyonlar da bildirilmiştir [42].

### 1.5 *Penicillium* Endüstriyel Alanları (Ekonomik Değeri)

*Penicillium* genusunun çeşitli türleri peynir ve çeşitli et ürünlerinin üretiminde merkezi bir rol oynamaktadır. Özellikle *Penicillium* küfleri peynirde bulunur. *P. camemberti* ve *P. roqueforti*; Camembert, Brie, Roquefort ve diğer birçok peynirlerin üretiminde yer alan küflerdir. *P. nalgiovense*, sosis ve jambonun tadını arttırmanın yanı sıra diğer küfler ve bakterileri üremesini önlemek için kullanılır [79] .

*Penicillium* ve *Aspergillus* türlerinin, gıda sanayiindeki önemine ilaveten, biyoteknolojik olarak üretilen bir dizi enzim ve diğer makromoleküllerin, örneğin glukonik, sitrik ve tartarik asitlerin yanı sıra pektinaz, lipaz, amilaz, selülozlar ve proteazların üretilmesinde kullanılır. Bazı *Penicillium* türleri, çeşitli ksenobiotic bileşikleri parçalama kabiliyetleri nedeniyle biyoremediasyonda özellikle mikoremediasyonda kullanılma potansiyeline sahiptir [80] .

Major antibiyotiklerin üreticisi olan çok çeşitli *Penicillium* türleri mevcuttur. *P. chrysogenum* (eski adıyla *P. notatum*) tarafından üretilen bir penisilin, 1929' da Alexander Fleming tarafından keşfedildi ve Gram pozitif bakterilerin büyümesini inhibe ettiği buldu. Penisilin antibiyotik olma potansiyeli 1930' ların sonlarında gerçekleşti, Howard Florey ve Ernst Chain bu bileşiği saflaştırdı ve konsantre hale getirdi. İlacın İkinci Dünya Savaşı' ndaki enfekte yaralarından ölen askerleri kurtarma başarısı, Fleming, Florey ve Chain' in ortaklaşa 1945' te Nobel Tıp Ödülü kazanmasını sağladı [81]. Peynir ve sosis hazırlanmasında kullanılan [17, 82]. *Penicillium* türleri ayrıca gıda endüstrisi için renklendirici olarak kullanılabilir pigmenti de üretmektedir [83].

Filamentli fungusların çoğu enzimlerin üreticisi olduğu bilinmektedir. *P. ochrochloron*, pamuk mavisini renksizleştirbildiği için biyolojik giderme ajanı olarak kullanılır [84]. Bu tür aynı zamanda (1-3) b-D-glukanazlar ve b-glukozidaz' ın üretimi için de kullanılmaktadır [85]. Buna ek olarak, *Penicillium funiculosum*' dan gelen hemiselülozlar, yani ksilanazlar daha önce karakterize edilmiştir [86] ve bu türe ait

selülazlar kağıt malzemeler üzerinde hidrolitik bir etki gösterirler [87]. *Penicillium verrucosum* okratoksin üreticisi olarak iyi bilinen bir fungustur [88]. Bununla birlikte, lipaz üretimi için de incelenmiştir [89].

*P. okrokloronun* antimikrobiyal aktivitesinin, bu potansiyeye sahip iki sekonder metabolitten, yani (-) 2, 3, 4-trihidroksibütanamid ve (-) eritritol geldiği kanıtlanmıştır [90]. Böylece bu tür, antimikrobiyal özelliklere sahip bir mikroorganizma olarak kullanılabilir. *Penicillium* türlerinde *P. citrinum* [91] ve *P. expansum* [92] gibi bazı antioksidan aktiviteyi sahip türlerde tarif edilmiştir.

## 1.6 Pigment Kullanılış Alanları

Genel olarak insanlar farklı amaçlarla boya endüstrisinde [93], tekstilde fonksiyonel son işlemede (terbiye/apre) [94], besin renklendirmede [95], kozmetikte [96], renge duyarlı güneş hücrelerin üretiminde [97], histolojik boyamada [98] ve ph indikatörü olarak pigment kullanılmaktadır [99].

Bunun için çeşitli kaynaklardan boyar madde elde edilmesi için araştırmalar yapılmaktadır. Ayrıca sentetik boyaların kullanılmasının çevre üzerinde zarar verici olduğunu ve insanların sağlığı üzerinde görülen allerji astım, toksijenik ve karsinojenik çeşitli problemlere sebep olduğunu belirlenmiştir. Bu nedenle farklı doğal kaynaklardan bitkiler, böcekler, likenler, bakteriler ve mineraller gibi çeşitli canlılarından elde edilen boyaların kullanılması yönelik çalışmalar devam etmektedir. Bu nedenle insanlara ve çevreye zarar vermeyen doğal, pigmentin araştırılması ve üretilmesine yönelik farklı organizmalarla yapılan çalışmalar büyük ilgi çekmekte ve çok yönlü olarak bu konu dünyanın her yerinden araştırmacılar tarafından farklı koşullar (sıcaklık, ph, nem, çalkalama hızı, inokulum hacmi ve besiyeri kaynakları) kullanarak denemeler yapılmaktadır. Funguslardan pigment çalışmaları oldukça yenidir. Ayrıca farklı fungusların endüstriyel amaçlarla kullanımlar mümkündür.

Filamentli funguslar, pigment profillerinde kimyasal ve renk çok yönlülüğü, daha kolay ve büyük ölçekli, kontrollü ekim ve uzun vadeli bir geçmişe sahip olması nedeniyle, gıda sınıfı pigmentin üretimi için mikrobiyal hücre fabrikaları yapmak için uyarlanabilen hammaddelerdir [100]. *Aspergillus* ve *Penicillium* genuslarına ait mikroorganizmalar doğal pigmentin potansiyel üreticileri olarak incelenmiştir.

*Penicillium* suşlarından gelen *Monascus* benzeri pigmentin üretimi, sitrin üretimi olmadığı için gıda endüstrisinde potansiyel bir kullanım ile yakın zamanda bildirilmiştir. Bu pigment benzer kromofor poliketidli *Monascus* pigmentinin homologlarıdır [101].

Babitha ve ark. (2007) tarafından daha önce katı, yarı sentetik ve sıvı fermantasyon prosesinde *Monascus* spp' den pigmentin üretimi konusunda çalışmalar yapıldı, pigmentin ışığa bağımlı büyümesi ve gıda endüstrisindeki uygulamaları, özenle incelendi [102]. Pigment üretiminde, sıcaklık ve ph; muhtemelen genetik ve metabolik kontrol veya savunma mekanizmalarını aktive eder [103]. Pigmentin yüksek konsantrasyonu ve yüksek verimliliği, kültür ortamının pH ve sıcaklığının yanı sıra metabolik regülasyonda önemli bir fonksiyona sahip olan ATP (adenosin trifosfat) gibi moleküllerin düzenlenmesiyle elde edilebilir. Çift reaksiyon yolları, membran ve hücresel duvarda fonksiyoneldirler [104].

*Monascus* pigmentinin kanserin önlemesi, kan şekeri düzeylerini düşürülmesi, kırmızı etin renklendirilmesi, tatlandırılması ve korunmasında, nitrat ve nitrit tuzlarının toplam veya kısmi ikame maddeleri olarak başarıyla kullanılan anti-inflamatuar ve anti-tümör özelliklerini sergilemektedir [105]. Pigment ve sitrinin sentezi, *Monascus* suşuna [106], karbon, azot kaynakları [107], karbon ve azot konsantrasyonu [108], pH [109] ve diğer beslenme faktörleri ve çevresel faktörlerin oranı [110]. Birçok aerobik fermantasyon prosesinde, artan etkenlik nedeniyle zamanla et suyu içinde viskozite artışı vardır. Hücre konsantrasyonu veya fermantasyon sırasında ürünlerin birikimi söz konusudur. Bu değişiklikler, özellikle oksijen elde etmede bir dizi sorunla sonuçlanır [111]. Yüksek çözünmüş oksijen konsantrasyonunun, sıvı fermantasyonda pigment ve sitrinin üretimini arttırdığını bulmuşlardır [112].

Doğal pigmentlerin gıda maddelerinde kullanılması, son yıllarda doğal bileşenler kullanmanın pazarlama avantajlarından ve sentetik pigmentlerin nihai zararlı etkileri hakkındaki tüketici endişelerinden dolayı artmaktadır. Yiyecek renklendiricisi olarak yaygın olarak kullanılan yeşil boya, hızlı bir immünotoksik ajan olarak gösterilmiştir [113]. Şu anda, doğal pigmentler bitkiler [114], böcekler [115] ve mikroorganizmalar [116] gibi kaynaklardan türetilmektedir. Üretilen pigmentlerin kararlılığı [117], kurum içi imalat imkânı ve daha yüksek verim için optimize edilmiş



ekim teknolojisinin bulunması nedeniyle Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri' nde gıda endüstrisi dışında dikkat çekmektedir [118]. Nihai amaç fungal biyoteknoloji ile pigmentlerin üretilmesidir. Tarımsal hammaddelerin ve iklim koşullarının arzından bağımsız olacaktır. Gıda renklendiricilerinin kaynağı olarak *Monascus* gibi filamentli fungusların Orient' te uzun süreli bir geçmişi vardır, ancak *Blakeslea* fungusundan başarılı bir şekilde üretilen Beta-carotene dışında Batı' da hala yasaktır. Batıdaki fungustan kaynaklı bir gıda renklendiricisinin başarısız bir girişimi, 2004 yılından itibaren 5 Mayıs 2006 tarihine kadar Çek Cumhuriyeti' nde geçici olarak 2 yıl onay verilmesine neden olan antrakinin esaslı kırmızı fungus pigmenti Arpink Red' dir [119].

Sentetik ve doğal pigmentler yiyeceklerde, Kozmetik ve farmasötik endüstrileri yaygın olarak kullanılır [120]. Bazı sentetik pigmentlerin potansiyel toksisitesi konusundaki düşünceler, doğal kaynaklardan türetilmiş pigmentlere olan ilginin artmasına neden olmuştur [121]. Geleneksel olarak doğal pigmentler, bitki ve böcek dokuları gibi doğal kaynaklardan ekstre edilmiştir, ancak mikrobik fermantasyon yoluyla pigment elde etmek de mümkündür. Bazı bakteriler, mayalar, basidiomiset fungusları ve mikroalgler pigment üretiminde kullanılmaktadır [101]; ancak yüksek maliyetler ve düşük üretkenlik, ticari üretim için önemli darboğazlardır [122]. *Monascus* genusu *Ascomycetous* funguslar pirinçte yetiştirildiklerinden doğal bir gıda renklendiricisi üretmek için kullanılmıştır [123]. Bununla birlikte, *Monascus* türevi pigmentler sitrinin içerir ve mikotoksin üretimi *Monascus*' un gıda renklendiricilerinin üreticisi olarak kullanımını sınırlar

Pitt (1979) benzer şekilde, *Penicillium marneffe* büyük miktarda kırmızı ve bu pigment monascorubramine olarak adlandırılmaktadır [2]. Bu tür bilinen bir pigment üretmemesine rağmen tehlikeli bir insan patojenidir [124]. Bunun dışında kalan, *Penicillium* alt-genusu *Biverticillium*' da yer alan yukarıda bahsedilen *Penicillium* türlerinde ise çeşitli kırmızı pigment üreticiler yer almaktadır.

Gıda ürünleri, filamentli funguslar da dahil olmak üzere sayısız mikroorganizma için uygun yaşam alanları olarak kabul edilebilir. Yiyeceklerde en sık görülen küfler, diğerlerinin yanında *Penicillium*, *Aspergillus* veya *Fusarium* genuslarına aittir. Fungusların mikotoksin üretme potansiyelleri nedeniyle gıdalardaki fungus oluşumu önemli kayıplara veya güvenlik sorunlarına neden olabilir [125].

Bozulmanın yanı sıra, çeşitli fungal türler, gıda üretiminde, metabolik faaliyetlerinin nihai ürünlerin organoleptik özelliklerine katkıda bulunur ve teknolojik kültürler olarak kullanılırlar [126]. Gıdalardaki fungus gelişimi esas olarak fizikokimyasal faktörler tarafından belirlenir. Bu etkenler, gıdaya özgü parametreler (su aktivitesi ( $a_w$ ), pH, redoks potansiyeli, mevcut besinler ve doğal antimikrobiyal maddeler) ve dış parametreleri (nem ve sıcaklık gibi gıda depolama ortamı atmosfer kompozisyonu) yanı sıra gıdaların işlenmesi ve korunmasıdır [127].

Venil ve Lakshmanaperumalsamy (2009) kimyasal boyaların aksine, mikroorganizmalardan elde edilen pigmentlerin pek çoğunun kanser, alerjiler gibi hastalıklara neden olmadığı, hatta antibiyotik ya da anti-kanser özelliklere sahip olduğunu tespit etmişlerdir [128]. Funguslarda bulunan en önemli melanin tipleri DHN-melanin ve DOPA-melanindir. *Aspergillus fumigatus* sporları 1,8-dihidroksinaftalen benzeri melanin içermektedir. Ayrıca, melanin üreten Dematesiyöz funguslar üzerinde yapılan çalışmalarda melaninin, fungal hücreleri insan savunma sistemi etkilerinden koruduğu ve suşların canlı kalma şansını arttırdığını gözlemişlerdir [129].

Bu türler nadiren mikotoksin üretirler ve 37 °C' de üreyemedikleri için patojen de değildirler. Ancak çok az da olsa mikotoksin üreten türler de yok değildir. *Penicillium oxalicum* sarı toksik pigment (sekalonik asit D) [130] ürettiğinden dolayı direkt olarak gıdalara uygulanamaz. Ayrıca 37-38 derecede ürediğinden insanlar için de ciddi bir patojendir.

Son on yılda, doğal pigmentlerin teknik tekstil ve boya alanlarında kullanımına olan ilgi arttı [131]. Üreticiler, artan tüketici algısına yanıt olarak tekstil endüstrisinde daha doğal ve daha az sentetik renklendiricilere yöneldi [132].

Moleküler yöntemlerle identifikasyonu yapılan *P. mallochii* çalışmamızda suşunun pigment üretimi, karakterizasyonu ve pigment üretimine etki eden faktörlerin belirlenmesinde değerlendirildi.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1 Fungal Çalışmalar

#### 2.1.1 Kullanılan Besiyerleri

##### 2.1.1.1 Hücre Kültürü, Pigment Üretimi ve Karakterizasyonu için Kullanılan Besiyerleri

Agar içeren besiyerleri Petriler ve tüpler şeklinde hazırlandı. Öncelikle, kullanılacak tüpler ve cam Petri kapları pastör cihazı ile 200 °C' de 10 dakika boyunca sterilize edildi veya hazır steril plastik Petriler kullanıldı. Hazırlanan besiyerleri 121 °C' de 20 dakika steril edildi. Alevin yanında steril Petrilere (15 mL) dağıtıldı.

Yatık agar hazırlamak için, agarlı besiyerleri tüplere (5 mL) olacak şekilde dağıtıldı ve otoklavda 121 °C' de 20 dakika steril edildi. Tüpler yatık olarak yerleştirilerek donmaları sağlandı. Petri ve yatık besiyerleri daha sonra kullanılmak üzere +4 °C' de muhafaz edildi. Deneysel çalışmada kullanılan tüm besiyeri içerikleri aşağıda verildi.

**Tablo 2.1:** Deneysel çalışmada kullanılan besiyerleri içerikleri

#### **Oxiod Rose Bengal Chloramphenicol Agar (pH 7.2 ± 0.2).**

Kültür tanımlanmasında kullanılan bir besiyeridir.

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Mikolojik pepton	5.0 g
Glikoz	10 g
Dipotasyum fosfat	1.0 g
Magnezyum sülfat	0.5 g
Rose Bengal	0.05 g
Agar	15.5 g
1000 mL Distile suya tamamlanır [133].	

**Tablo 2.1' devamı:**

---

**Malt Extract Agar**

Pigment üretimi ve karakterizasyonu için kullanıldı.

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Pepton	3 g
Agar	15 g
Malt ekstraktı	30 g
1000 mL Distile suya tamamlanır [134].	

**Merck Potato Dextrose Agar**

Pigment üretimi ve karakterizasyonu için kullanıldı.

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Patates infüzyonu	4 g
Glucose	20 g
Agar-agar	15 g
1000 mL Distile suya tamamlanır [135].	

**Oxiod Sabrouaud Dekstroz Agar (pH 5.6 ± 0.2)**

Pigment üretimi ve karakterizasyonu için kullanıldı.

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Pepton	10 g
Agar	15 g
Glukoz	40 g
1000 mL Distile suya tamamlanır [136].	

**Merck Yeast Extract agar (6.5 ± 0.2)**

Kültür tanımlanmasında kullanıldı.

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Yeast Extract	5.0 g
Glukoz	10.0 g
Agar-agar	20.0 g
1000 mL Distile suya tamamlanır [137].	

---

**Tablo 2.1' devamı:**

**Merck Czapek Dox Agar (7,3±0,2)**

Kültür tanımlanmasında kullanıldı.

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Sukroz	30,0 g
NaNO <sub>3</sub>	3,0 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
KCl	0,5 g
Demir(III)sülfat	0,01 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
Agar-agar	13,0 g
1000 mL Distile suya tamamlanır [138].	

### 2.1.2 Fungusun İzolasyonu ve Kültürü

Bu çalışmada kullanılan suşu daha önce Balıkesir, Türkiye' den ağaç kabuğundan izole edilen ve danışmanımın koleksiyonda yer alan (TACB-16 kodlu) *Penicillium* izolatı ile çalışıldı. laboratuvara getirilen örnek 24 saat içinde steril distile su ile yıkandıktan sonra 100 mg örnek 3/5 (ağaç kabuğu: su) oranında sulandırarak Waring Blender ile homojenize edildi. Daha sonra bundan 50 g alınarak 450 mL steril distile su konmuş çalkayıcıda 25 °C' de, 30 dakika çalkalanarak küflerin suya geçmesi sağlandı. Bu homojenat 10<sup>-1</sup> içinde 9 mL steril distile su bulunan tüp serisi kullanılarak 10<sup>-1</sup>den 10<sup>-5</sup> e kadar dilüsyonlar hazırlandı her bir dilüsyondan 9 cm çapındaki steril Petri kaplarına birer mL konularak üzerlerine 45 °C' ye kadar soğutulmuş Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBCA) ilave edildi.

Sekiz hareketiyle Petrilerin homojen karışması ve katılaşması sağlandı. Katılaşan Petriler 25 °C' de 5-7 gün inkübe edildi [139]. Besiyerinde oluşan her bir koloniden yatık Malt Extract besiyerine ekim yapılarak elde edilen saf kültürler -20 °C' de derin dondurucu saklandı [140].

### 2.1.3 Identifikasyon

#### 2.1.3.1 DNA İzolasyonu

Patates dekstroza agarda (PDA) saf olarak üretilen kolonilerin hif ve sporları DNA izolasyonu için kullanıldı. DNA izolasyonu için DNeasy plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanıldı ve kitin protokolü takip edildi.

### 2.1.3.2 PCR Reaksiyonu

İzole edilen DNA örneği polimeraz zincir reaksiyonu deney ile çoğaltıldı. Bu kapsamda kullanılan bileşikler (Tablo 2.2)' de belirtilmiştir.

**Tablo 2.2:** PCR reaksiyonunda kullanılan bileşikler.

<b>Kullanılan bileşikler</b>	<b>Miktar</b>
Kalıp DNA	5 µl
PCR tampon (10X, Vivantis)	5 µl
MgCl <sub>2</sub> [25 ITS (internal transcribed spacer)-mM, Vivantis]	3 µl
DMSO	3 µl
dNTP karışımı (10 mM, Vivantis)	0.8 µl
4 primeri (10 mM) (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')	3 µl
ITS-5m primeri (10 mM) (5'- GGAAGGAGAAGTCGTAACAAG-3')	3 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/µl, Vivantis)	0.8 µl
Steril dH <sub>2</sub> O	26.4 µl
Toplam hacim	50 µl

Bu bileşikler hazırlanarak belirtilen sürece sıcaklıklar uygulanarak PCR cihazı ayarlanmıştır (Tablo 2.3)' de gösterilmiştir. PCR ürünleri 0.5 µg/ml etidyum bromür içeren % 0.8' lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak mantarlara özgü DNA bantları (500-600 baz çifti) ultraviyole ışık altında incelendi [141].

**Tablo 2.3:** PCR reaksiyonları

<b>Basamak</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>	<b>Döngü Sayısı</b>
<b>Ön ısıtma</b>	94 °C	5 dk.	
<b>1. basamak</b>	94 °C	45 sn.	
<b>2. basamak</b>	55 °C	45 sn.	X 40 döngü
<b>3. basamak</b>	72 °C	2 dk.	
<b>4. basamak</b>	72 °C	10 dk.	X 1 döngü

Ayrıca ABD’ deki Charles River laboratuvarı kullanılan kırmızı-turuncu pigment üretici suş moleküler yöntemleri ile tür tayini için gönderildi

#### **2.1.4 Morfolojik Analiz**

##### **2.1.4 1 Mikromorfolojik Analiz**

*P. mallochii* mikromorfolojik analiz için SDA’ a inoküle edildi. Petri, karanlık ortamda 4 gün boyunca 30 °C’ de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra ışık mikroskobu altında farklı günlerde (3, 5 ve 7) incelendi.

##### **2.1.4.2 Makromorfolojik Analiz**

Makromorfolojik analiz için izolatın MEA, PDA, SDA, YES ve CZ’ a üç noktada inoküle edildi. Petriler, karanlık ortamda 7 gün boyunca 30 °C’ de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kolonilerin çapları ölçüldü. Konidia rengi ve Petrilerdeki kolonilerin üst ve alt yüzeyleri incelendi, pigment renkleri kaydedildi. Farklı besiyerlerinde üreyen koloniler fotoğraflandı.

##### **2.1.5 Sıcaklık ve pH Değişimlerinin Pigment Oluşumuna Etkisi**

Farklı sıcaklık (25 °C, 28 °C ve 30 °C) ve farklı pH (5, 7 ve 9) değerlerinde pigment oluşumuna etkisine bakılması için yüzey kültürü olarak 90 mm Petri kapları kullanıldı ve üç noktada inoküle edildi. Pigment üretmesi için 18 gün boyunca karanlık bir ortamda SDA besiyeri kontrol olarak kullanıldı ve (3, 6, 9, 12, 15 ve 18.) günlerde fotoğraflandı ve çapları ölçüldü.

##### **2.1.6 Pigment Üretimi**

Pigment üretimi amacıyla katı besiyeri SDA olarak kullanıldı. Yatık agarlı tüpler 30 °C’ de 7 gün hem aydınlık hemde karanlık bir ortamda inkübe edildi ve pigment üretmesi için yüzey kültürü olarak 90 mm’ lik Petri kapları kullanıldı. Pigment oluşumu için 30 °C’ de 14 gün boyunca inkübe edildi [140]. Elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak, karanlık ortamda fungusun üretilmesine karar verildi.

### **2.1.7 Pigment Ekstresinin Hazırlanması**

Her Petriye 2 mL tween 80° ekleyerek sporları kazınarak uzaklaştırıldı. Petrilerin agarlı kısmı toplandı. Ethanol ekstresi (w/v: 1/2) eklenerek çalkalayıcıda (ZHWHY-211D) 72 saat boyunca 26 °C’ de 160 rpm’ de pigmentin etanol’ a geçmesi sağlandı [139]. Bu aşamadan sonra çözelti 0,40 ve 0,20 µm filtrelerden geçirildi. Elde edilen çözeltinin spektrofotometrede (200-900) nm arasında analizleri yapıldı. Kullanılan solvent bitene kadar buharlaştırıcı (İKA RV 10 basic) ile konsantre edildi ve çeker ocakta (hedlab) 24 saat boyunca bırakıldı. Ayrıca pigmentleri kurutmak için liyofilizator (CHRİST ALPHA 1-2 LD) kullanıldı [140, 142].

## **2.2 Pigment Karakteristikleri**

### **2.2.1 Pigment Oluşumuna Etki Eden Faktörlerin Optimizasyonu ve Spektral Analizleri**

Farklı besiyerlerinin MEA, PDA ve SDA pigment oluşumuna etkisine bakılması için Malt Extract Agar kontrol olarak kullanıldı ve farklı solventler (su, asetik asit, etanol ve metanol) ile çözeltiler 0,5g/0,5 mL stok olarak hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerden 25mg/mL olarak farklı pH (2, 4, 5, 6, 7, 8, 10 ve 12) ve sıcaklık (25, 40, 60, 80 ve 100) değerlerinde pigmentin spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü [143].

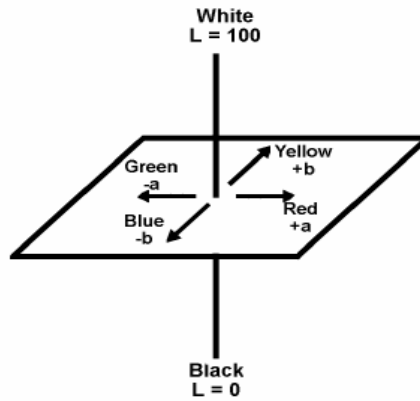
### **2.2.2 Pigmentin 120 °C Renk Değerlerinde Spektral Analizleri**

1g/mL’ lik pigment stoğundan 100 mg/mL ve 50 mg/mL konsantrasyonda 8 mL çözelti içeren 4 tüp şeklinde hazırlandı ve spektrofotometre 450 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Hazırlanan tüplerden ikisi otoklava (120 °C/20 dk.) konuldu. Sterilizasyon işleminden sonra çözeltinin homojen olması için spektrofotometre tekrar ölçülerek absorbansları karşılaştırıldı.



### 2.3 Hunter Renk Sistemine Göre Pigment Renk Tayini

Hunter renk sistemi 1950 lerde ortaya çıkmıştır. Bu konuda standart yöntem ilk kez CIE gıdaların renkleri hakkında karar vermek amacıyla (Commission International de L'Eclairage) tarafından 1931 de geliştirilmiştir. Bu amaçla çeşitli cihazlar ve yöntemler geliştirilmiştir. Ancak maddenin dalga boyu % yansıma değeri bilinerek bu maddenin rengi hakkında karar vermek değişik gıdaların renk eğrilerini kullanarak kıyaslama yapmanın pek pratik bir yöntem olmaması üzerine bu yöntem daha sonra geliştirilerek Hunter renk sistemi ortaya çıkmıştır. Hunter renk sistemi de CIE  $L^*a^*b^*$  sistemine benzer [144]. Çalışmamızda pigmentlerin rengi Hunter kalorimetresi değerlerine göre ifade edilecektir (Şekil 2.1). Hunter kolorimetresinde üç renk değeri vardır;  $a^*$  değeri kırmızı veya yeşilliği,  $b^*$  değeri sarılık veya maviliği,  $L^*$  değeri ise 0 (siyah) ve 100 (beyaz) arasındaki aydınlık derecesini ölçer [145]. Bununla birlikte elde edilen pigment eksresinden 4 farklı konsantrasyonlarda (5, 25, 50, 100 mg/mL) çözeltiler hazırlandı ve Color grap (color detection) uygulaması ile  $L^*$ ,  $a^*$  ve  $b^*$  kolorimetresi değerini belirlendi.



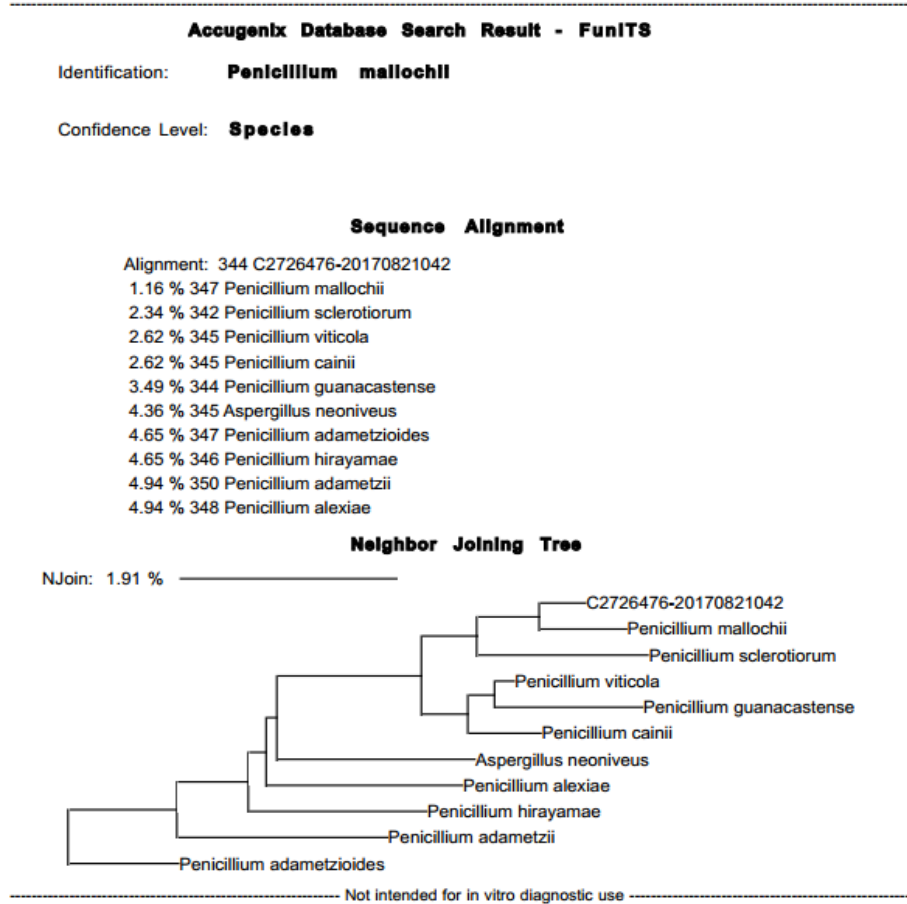
Şekil 2.1: Hunter renk sistemi [146]

Bu konuda renk analizi yapan TÜBİTAK, MAM Gıda endüstrisi tarafından yapılmıştır.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 İdentifikasyon

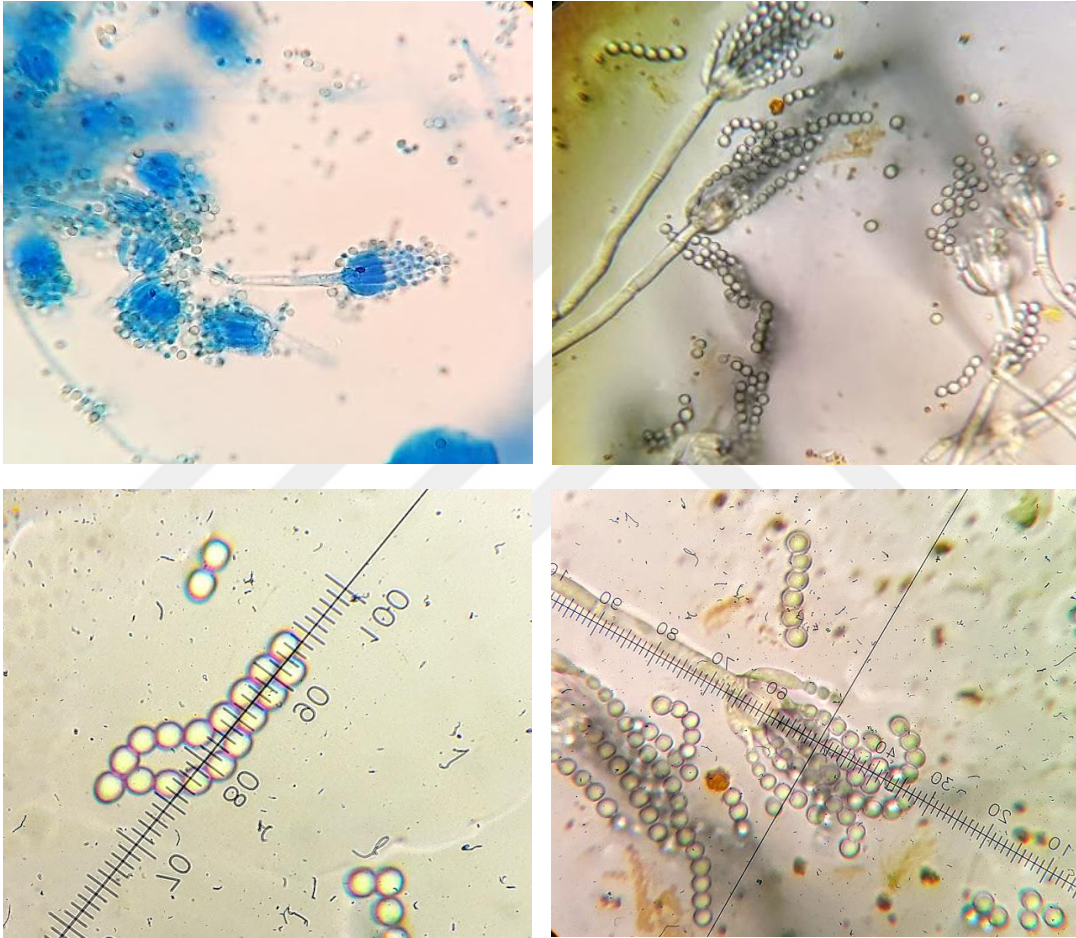
Bu çalışmada kullanılan kırmızı-turuncu pigment üretici suş, dizi analizi sonucu ilk olarak NCBI veri tabanında nükleotid BLAST yapılarak kontrol edildi. ITS-4 ve ITS-5 primerleri kullanılarak yapılan bir örneğe ait iki nükleotid dizisi elde edilmiştir. Dizileme sonucu yapılan blast analizinde çalıştığımız Fungus türü *P. mallochii*' ye %93 benzerlikle göstermiştir. Bununla birlikte AccuGENX-ID® FunITS tarafından ile Fungal tarafından moleküler yöntemler ile tür düzeyinde, ITS bölgesi, yakın ilişkili türler arasında, D2, "ITS" gibi diğer DNA bölgelerinden daha yüksek bir varyasyon derecesine sahip olduğu teyit edilmiştir ve aşağıdaki (Şekil 3.1)' de filogenetik ağacını gösterilmiştir.



Şekil 3.1: *P. mallochii*' nin AccuGENX-ID® FunITS ile Fungal ile filogenetik ağacını tanımlaması.

### 3.2 Morfolojik analizi

*P. mallochii* mikromorfolojik analiz için izolatın SDA besiyerinde inoküle edildi. Petri, karanlık ortamda 4 gün boyunca 30 °C’ de inkübe edildi. *P. mallochii* (monoverticillat) inkübasyondan sonra ışık mikroskobu altında farklı günlerde (3, 5 ve 7) incelendi. Konidia sert, pürüzsüz ve çapları 2.2-2.5 µm globoz olduğu belirlendi. Sterigma sayısı 5-8 ile arasında değişmektedir, uzunluğu ise 7-10 µm arasındadır. Konidiyofor düzgün septalı uzunluğu 80-120 µm arasında değişmektedir (Şekil 3.2).

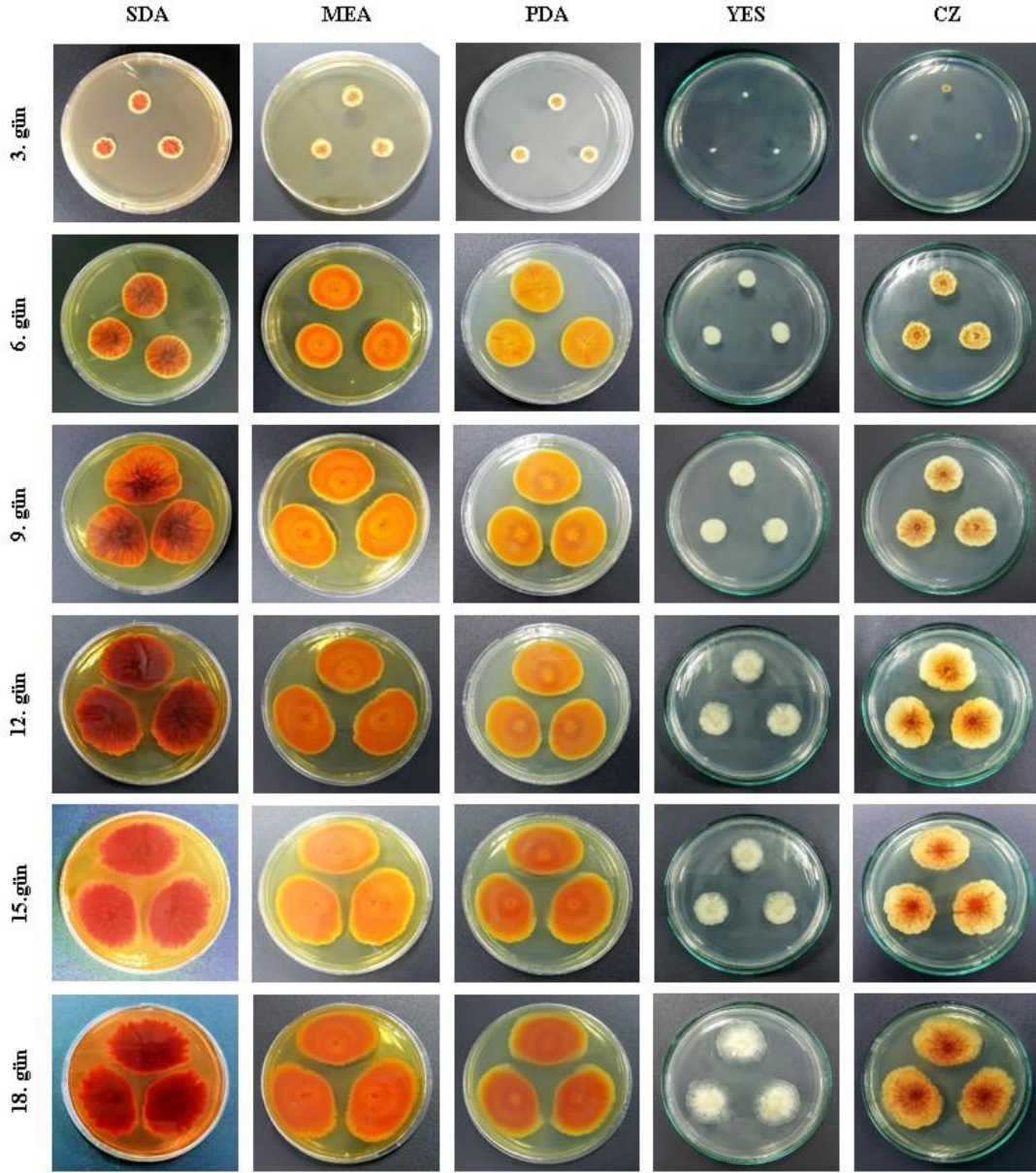


Şekil.3.2: *P. mallochii* SDA ile ışıklı mikroskop 10×100 büyüklükte görünümü.

*P. mallochii* makromorfolojik analiz için izolatın SDA, MEA, PDA, YES ve CZ’ a üç noktada inoküle edildi. Petriler, karanlık ortamda 18 gün boyunca 30 °C’ de inkübe edilerek 3, 6, 9, 12, 15. ve 18. güne kadar gözlemlere devam edildi ve farklı besiyerlerinde üreyen koloni üst ve alt yüzey fotoğraflarını (Şekil 3.4) ve koloni çap ölçümleri (Tablo 3.1)’ de gösterildi.



**Şekil 3.3:** *P. mallochii*' den pigment üretiminde farklı besiyerler (MEA, SDA, YES, PDA ve CZ) kullanılarak 30 C' de farklı günlerde (3, 6, 9, 12, 15 ve 18). günde Petri kabının üstten görünümü.



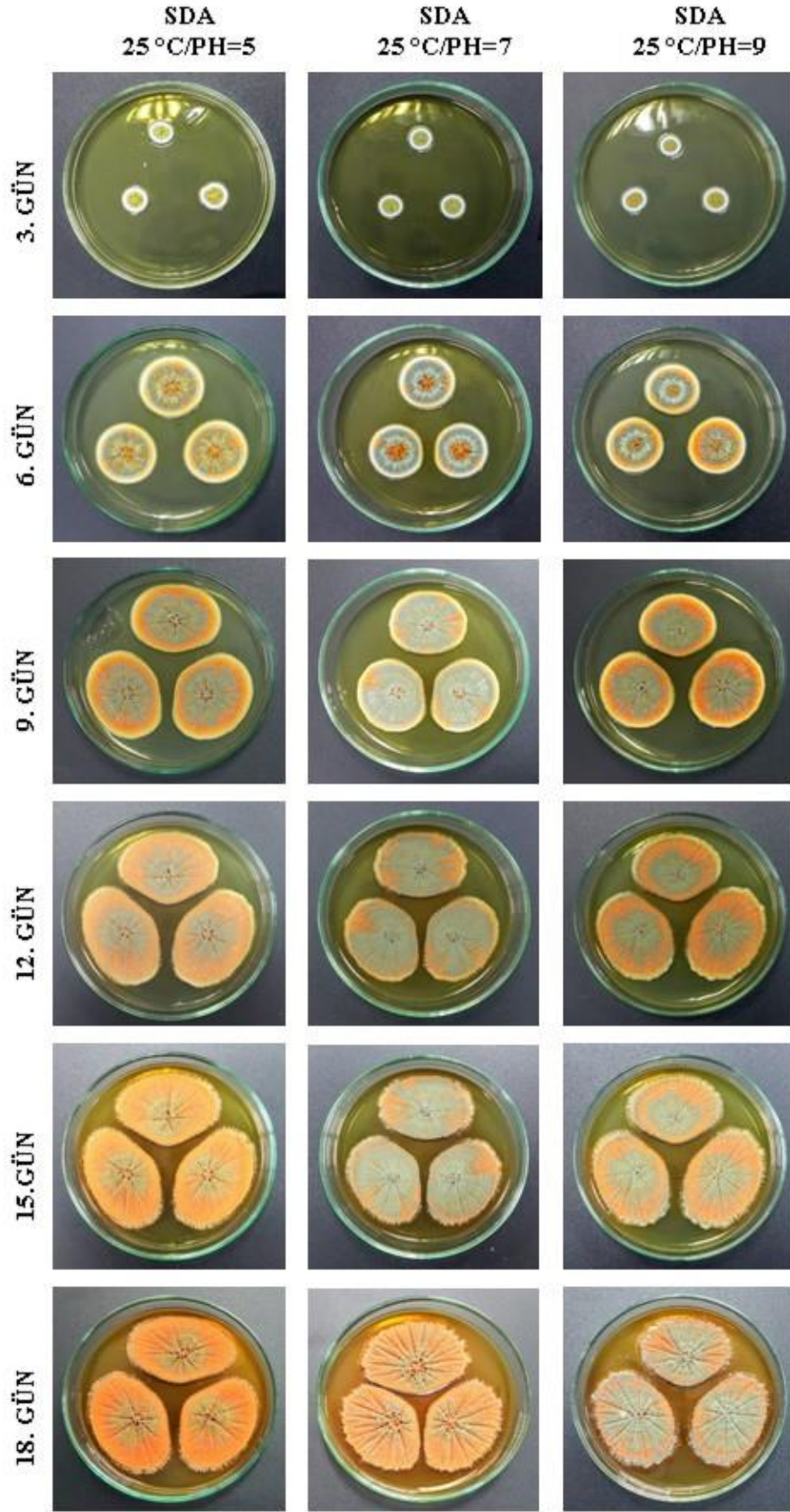
**Şekil 3.4:** *P. mallochii*' den pigment üretiminde farklı besiyerler (MEA, SDA, YES, PDA ve CZ) kullanılarak 30 C' de farklı günlerde (3, 6, 9, 12, 15 ve 18). günde Petri kabının alttan görünümü.

**Tablo 3.1:** *P. mallochii*' den pigment üretiminde farklı besiyerler (MEA, SDA, YES, PDA ve CZ) kullanılarak 30 C' de farklı günlerde (3, 6, 9, 12, 15 ve 18) kolonilerin ölçüleri.

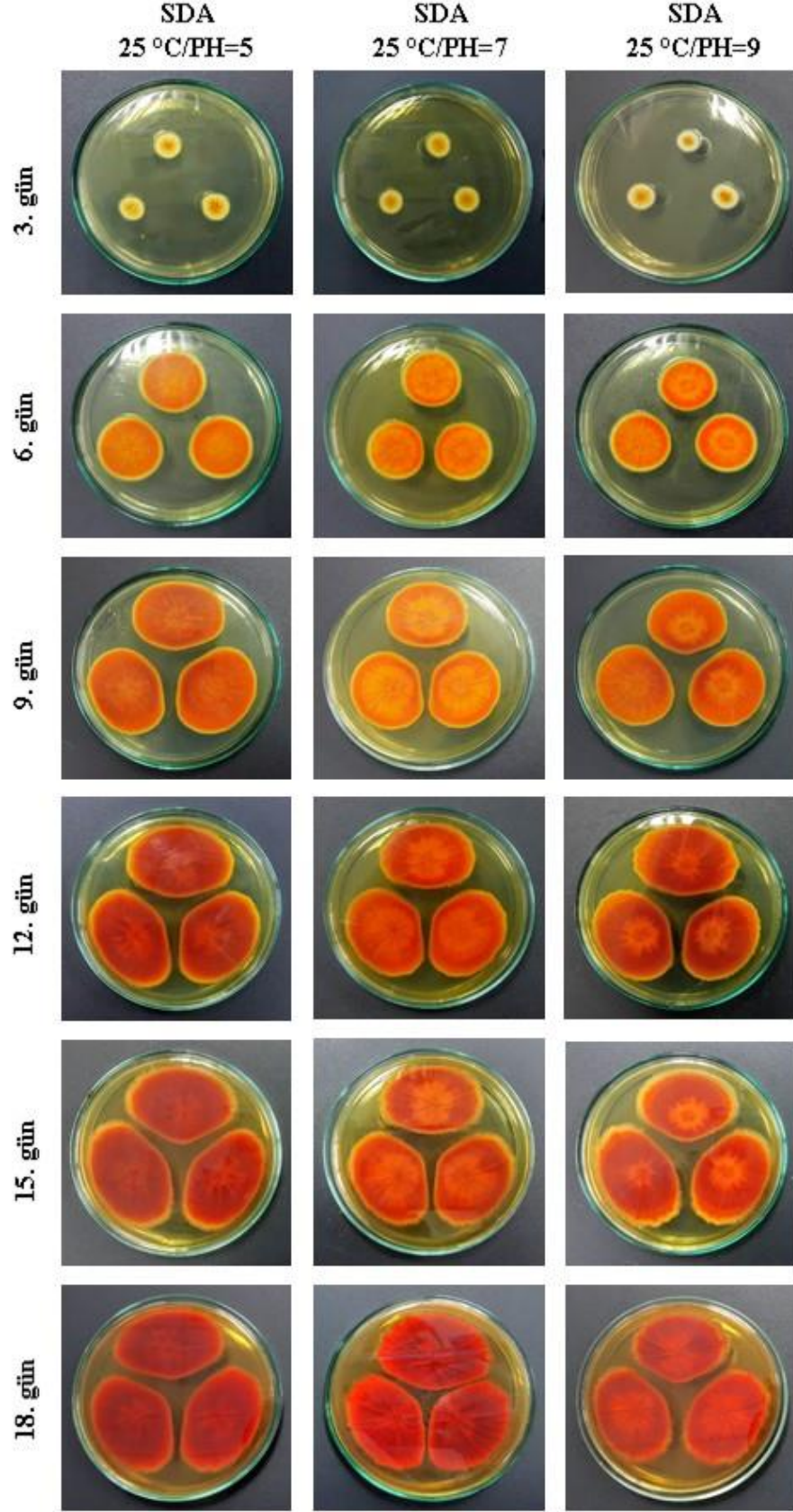
Besiyeri	SDA	MEA	PDA	YES	CZ
Sıcaklık	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C
<b>3. gün</b>	12-12-11	16-16-15	14-14-13	8-8-7	6-6-5
<b>6. gün</b>	32-30-20	28-28-27	27-27-26	12-12-12	14-13-13
<b>9. gün</b>	41-41-40	32-31-32	33-32-32	17-17-16	18-19-18
<b>12. gün</b>	47-47-46	40-40-39	38-38-49	19-20-21	23-24-24
<b>15. gün</b>	46-47-47	43-46-43	40-41-40	26-25-26	35-34-35
<b>18. gün</b>	48-45-46	46-59-52	45-47-46	30-29-30	38-37-40

### 3.3 Sıcaklık ve pH değişimlerinin pigment oluşumuna etkisi

Farklı sıcaklık (25 °C, 28 °C ve 30 °C) ve farklı pH (5, 7 ve 9) değerlerinde pigment oluşumuna etkisine bakılması için yüzey kültürü olarak 90 mm Petri kapları kullanıldı ve üç noktada inoküle edildi. Pigment üretmesi için 18 gün boyunca karanlık bir ortamda SDA besiyeri kontrol olarak kullanıldı ve (3, 6, 9, 12, 15 ve 18.) günlerde fotoğraflarını ve çapları ölçümlerini alındı (Şekil 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10).

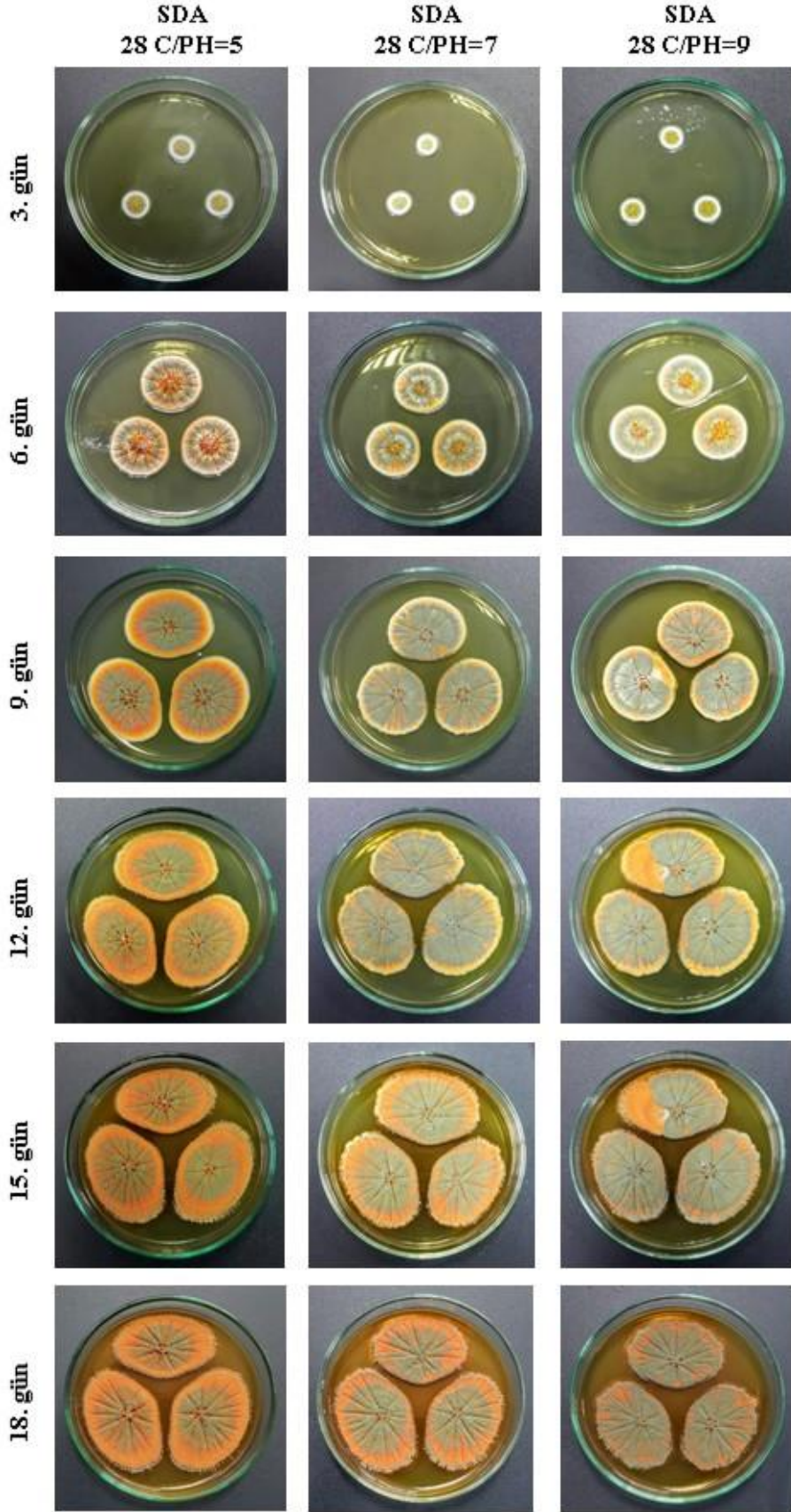


**Şekil 3.5:** *P. mallochii*' dan pigment üretiminin SDA besiyeri kullanarak farklı pH' larda (5, 7 ve 9) kullanılarak 25 °C' de farklı günlerde (3, 6, 9, 12, 15 ve 18) Petri kabının üstten görünümü.

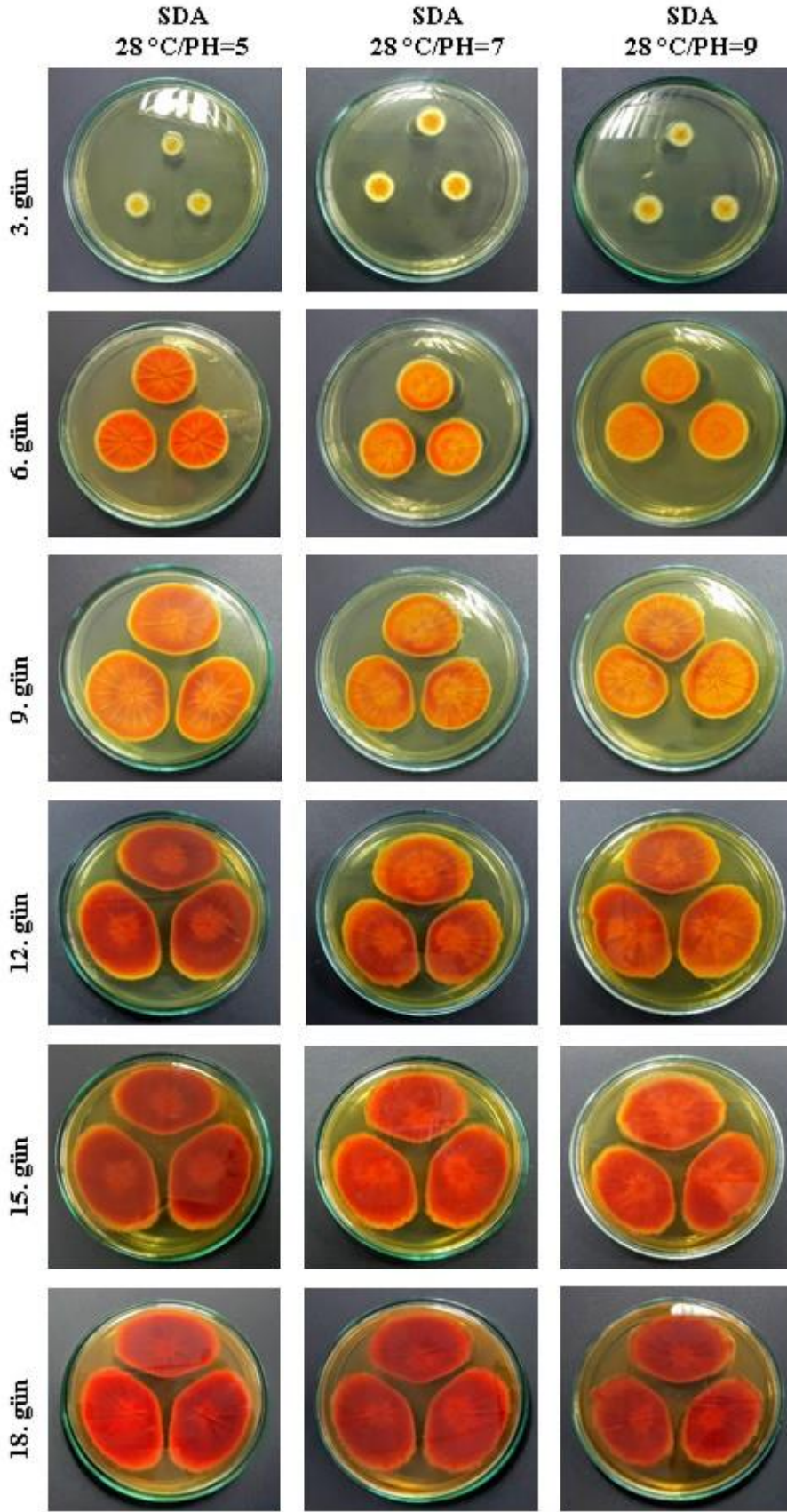


**Şekil 3.6:** *P. mallochii*' den pigment üretimin SDA besiyeri kullanarak farklı pH' larında (5, 7 ve 9) kullanılarak 25 °C' de farklı günlerde (3, 6, 9, 12, 15 ve 18) Petri kabının alttan görünümü.

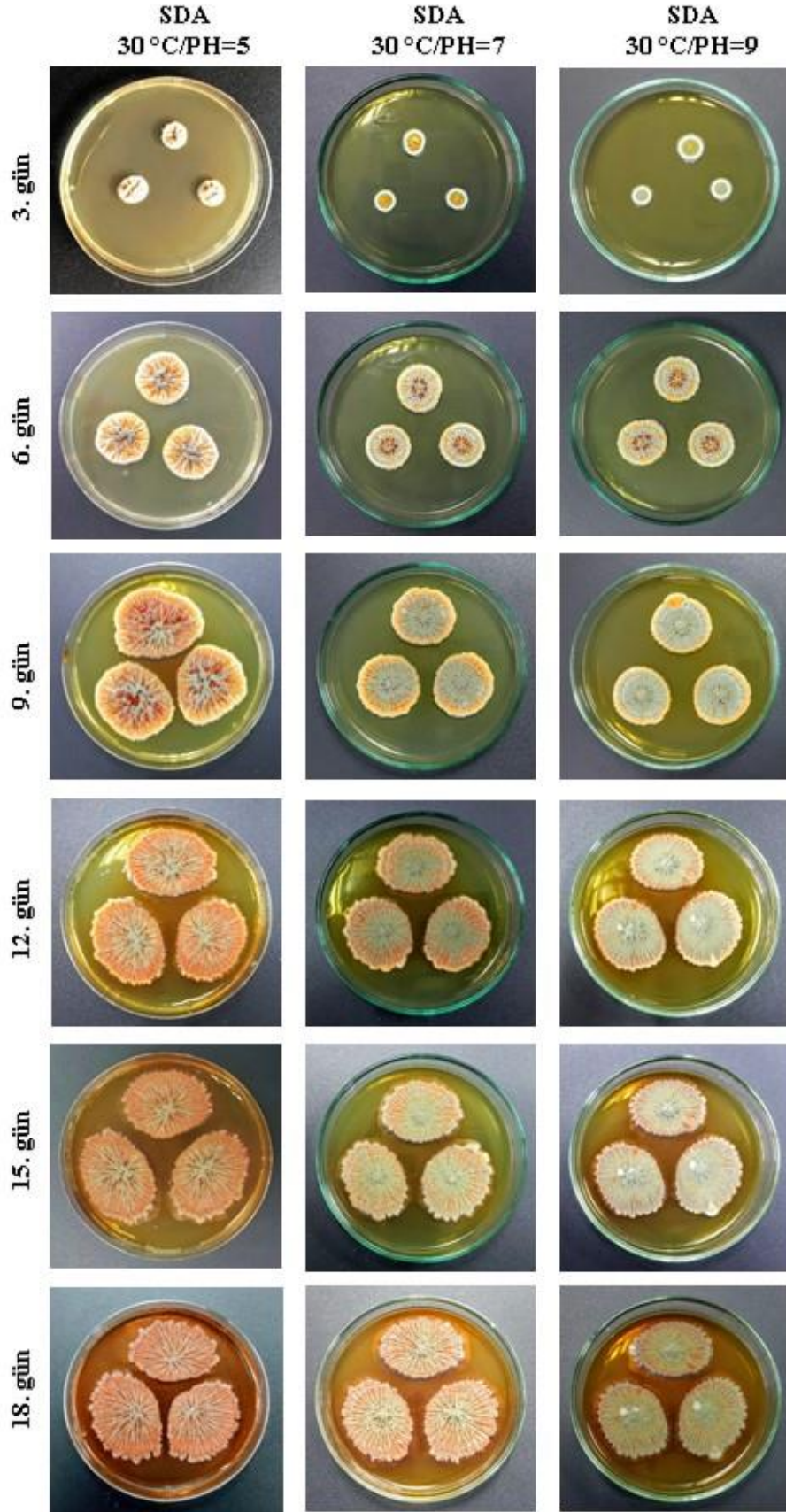




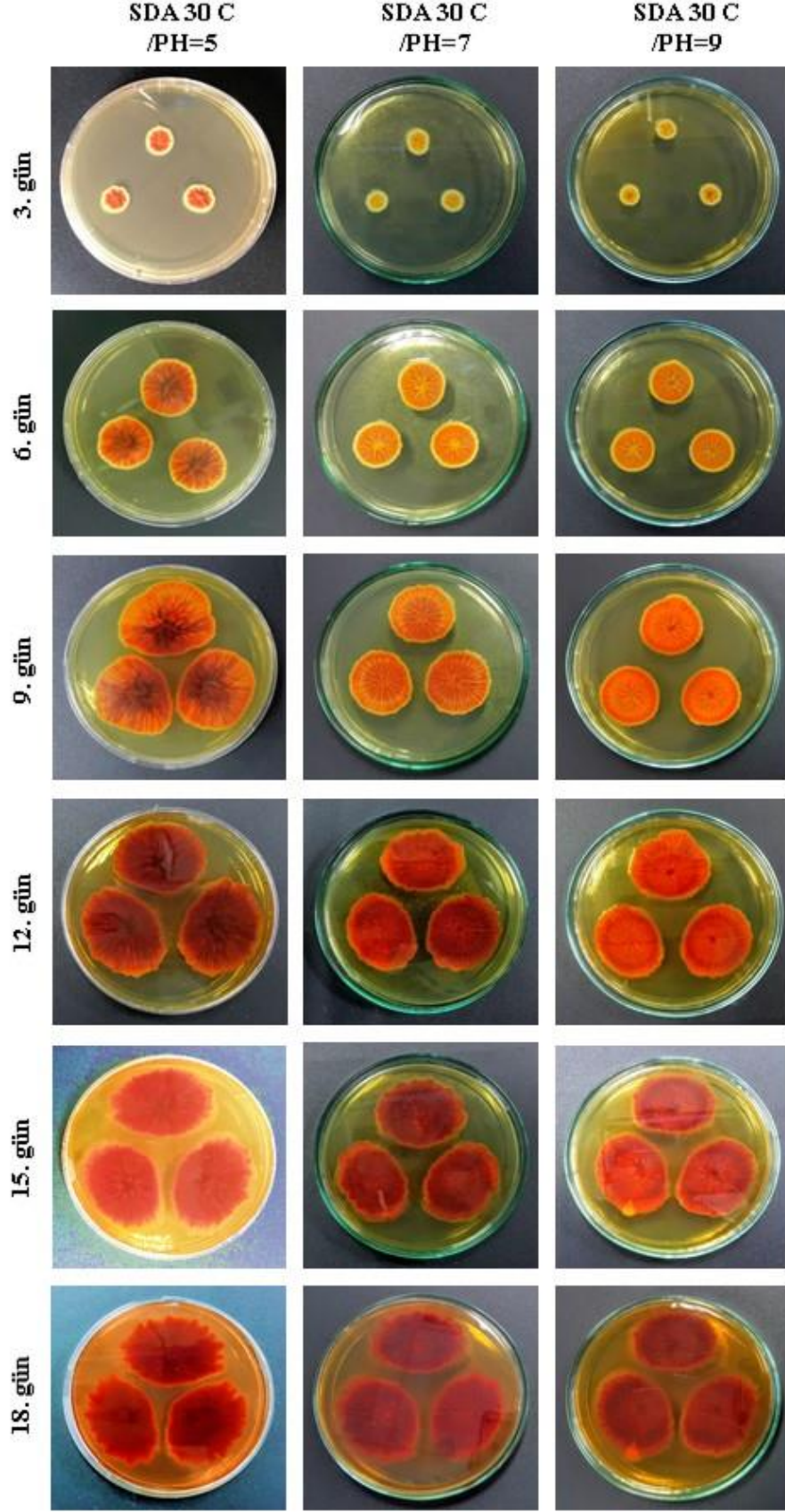
Şekil 3.7: *P. mallochii*' den pigment üretiminin SDA besiyeri kullanarak farklı pH' larda (5, 7 ve 9) kullanılarak 28 °C' de farklı günlerde (3, 6, 9, 12, 15 ve 18) Petri kabının üstten görünümü.



**Şekil 3.8:** *P. mallochii*' den pigment üretimin SDA besiyeri kullanarak farklı pH' larda (5, 7 ve 9) kullanılarak 28 °C' de farklı günlerde (3, 6, 9, 12, 15 ve 18) Petri kabının alttan görünümü.



**Şekil 3.9:** *P. mallochii*' den pigment üretimin SDA besiyeri kullanarak farklı pH' larda (5, 7 ve 9) kullanılarak 30 °C' de farklı günlerde (3, 6, 9, 12, 15 ve 18) Petri kabının alttan görünümü.



Şekil 3.10: *P. mallochii*' den pigment üretiminin SDA besiyeri kullanarak farklı pH' larda (5, 7 ve 9) kullanılarak 30 °C' de farklı günlerde (3, 6, 9, 12, 15 ve 18) Petri kabının alttan görünümü.

**Tablo 3.2:** *P. mallochii*' den pigment üretimin SDA besiyeri kullanarak farklı pH' larda (5, 7 ve 9) kullanılarak 30 °C' de farklı günlerde (3, 6, 9, 12, 15 ve 18) günde kolonilerin ölçüleri

Besiyeri		SDA								
Sıcaklık		25 C			28 C			30 C		
PH	pH = 5	pH = 7	pH = 9	pH = 5	pH = 7	pH = 9	pH = 5	pH = 7	pH = 9	
<b>3. gün</b>	12-12-12	12-12-12	12-11-11	12-13-12	11-11-12	10-10-11	12-12-11	11-10-11	10-10-10	
<b>6. gün</b>	29-30-30	28-28-27	28-27-28	29-30-31	27-28-27	27-26-26	32-30-31	23-23-24	20-21-21	
<b>9. gün</b>	42-42-41	40-39-39	40-39-38	42-41-40	38-37-37	36-37-37	41-41-40	29-31-30	27-28-27	
<b>12. gün</b>	50-50-49	45-44-45	47-47-45	50-49-48	45-45-47	46-44-45	47-47-46	37-38-38	37-37-36	
<b>15. gün</b>	54-54-52	47-48-48	49-53-47	52-50-51	49-50-52	51-49-49	46-47-47	42-41-40	40-40-38	
<b>18. gün</b>	49-51-50	50-54-50	51-48-47	53-50-52	54-50-46	49-50-48	48-45-46	46-46-45	42-44-41	

### 3.4 Pigment Üretimi:

*P. mallochii*, 90 mm' lik Petri kaplarında SDA besiyeri pH 5' te kullanılarak 20 gün boyunca 30 °C' de karanlık ortamda inkübe edildikten sonra 5. günden itibaren bol miktarda turuncu pigment üretti ve pigment oluşumu 18. güne kadar artarak devam etti (Şekil 3.11).



Şekil 3.11: *P. mallochii* SDA ile pigment üretimi 30 °C' de 18. günde Petri kabının alt ve üstten görünümü.

### 3.5 Pigment Ekstresi Elde Etme

Petri kaplarında inkübe edilmiş (30 °C' de 18 gün) ve pigmentlenmiş *P. mallochii* kültürleri yukarıda materyal ve metot bölümünde bahsedildiği şekilde pigment ekstraları elde edildi

İki litrelik erlen içerisine 30 Petriden elde edilen yaklaşık 750 mg pigment içeren agar kondu. Üzerine 750 mL olarak etanol eklendi, oda sıcaklığında 72 saat çalkalandıktan (160 rpm) sonra 0.45 µm, 0.20 µm filtrelerden geçirildi. Elde edilen 330 mL civarında ki çözeltinin buharlaştırma ve liyofilizasyon işlemlerinden sonra 9,8 g (100 mL' de yaklaşık 2,8 g). kırmızı-turuncu macunumsu bir pigment ekstresi elde edildi.

### 3.6 Pigment Oluşumuna Etki Eden Faktörlerin Optimizasyonu ve Spektral Analizleri

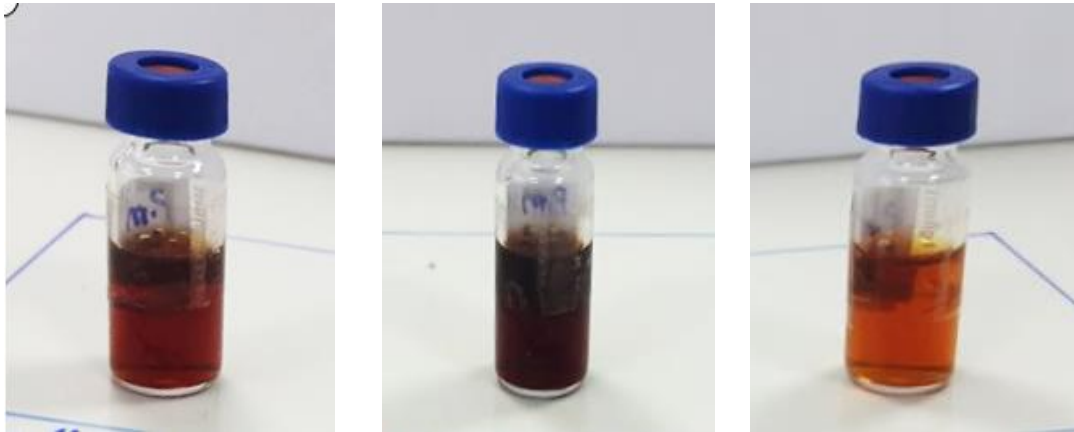
#### 3.6.1 Farklı Besiyerler ile Pigment Üretimi

*P. mallochii* pigment üretiminde besiyeri olarak MEA, SDA ve PDA kullanılarak her besiyerinden 7' şer Petri hazırlandı ve karanlık bir ortamda bırakıldı. 5. günden itibaren tüm Petrielerde pigment oluşumu başladığı görüldü. 3, 6, 9, 12, 15. ve 18. güne kadar gözlemlere devam edildi ve pigment oluşumunun 18. güne kadar arttığı belirlendi (Şekil 3.3 ve 3.4).

Farklı besiyerlerinden elde edilen her bir pigment ekstresi tartıldı. Buna göre elde edilen pigment eksre miktarları SDA 5,064 g, MEA 4,927 g ve PDA 4, 213 g ( 1 L' de sırayla yaklaşık 14,468 g, 14,077 g ve 12,037 g) olarak belirlendi (Tablo 3.3).

**Tablo 3.3:** *P. mallochii*' nin farklı besiyerlerinden (MEA, SDA ve PDA) elde edilen pigment miktarları.

Besiyerleri	<i>P. mallochii</i>
MEA	14,077 g
SDA ( <i>Oxoid</i> )	14,468 g
PDA ( <i>Merck</i> <sup>®</sup> )	12,037 g



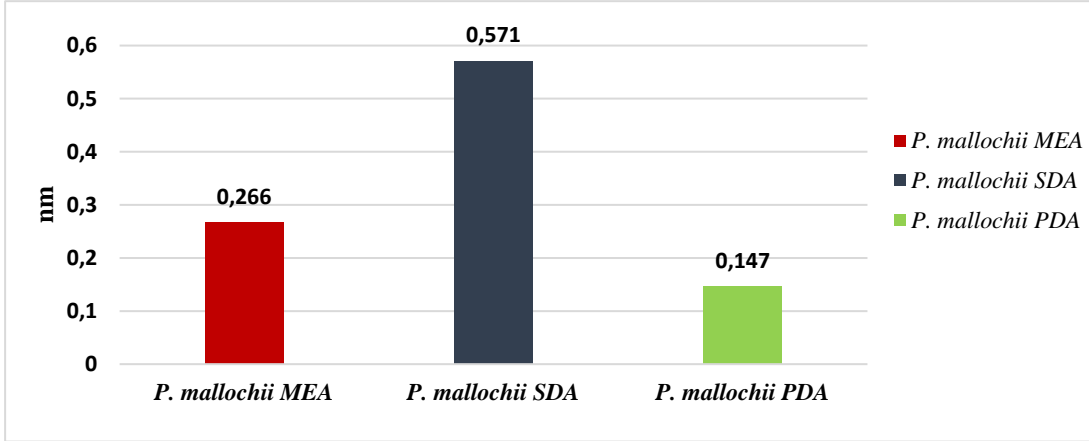
MEA

SDA

PDA

**Şekil 3.12:** *P. mallochii*' nin farklı besiyerlerinden (MEA, SDA ve PDA) elde edilen ve 25 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmış pigment çözeltilerinde gözlenen renkler.

*P. mallochii*' nin farklı besiyerlerinden (MEA, SDA ve PDA) elde edilen 25 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmış pigment çözeltileri, renk analizleri için spektrofotometre ile 450nm dalga boyunda ölçüldü ve sırasıyla 0.266, 0.571 ve 0.147 absorbans elde edildi (Şekil 3.13).



Şekil 3.13: *P. mallochii*' den farklı besiyerlerinden (MEA, SDA ve PDA) elde edilen 25 mg/mL konsantrasyondaki pigment çözeltilerinin 450 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri

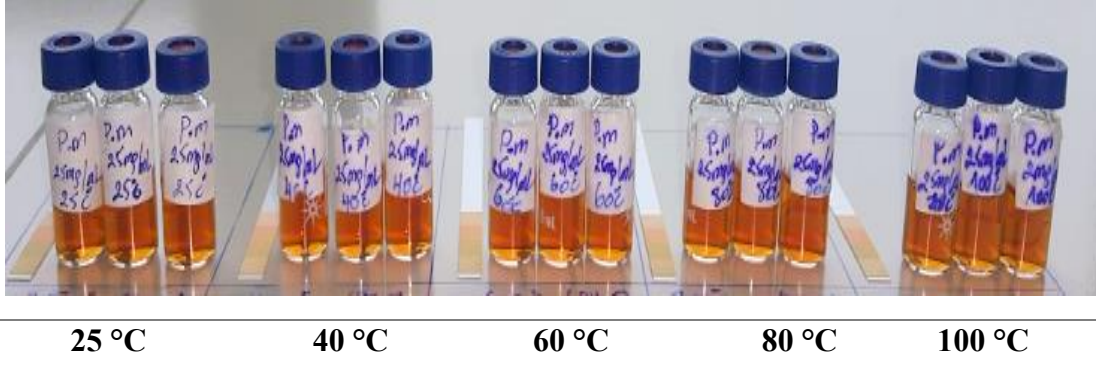
### 3.6.2 Pigment Karakterizasyonu ve Spektral Analizliler

*P. mallochii* stok pigment çözeltilerinin 25 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri farklı pH, sıcaklık değerleri ve farklı solventlerde renk karakterizasyonu bakımından test edildi. Hazırlanan çözeltiler (25 mg/mL) farklı sıcaklık derecelerinde (25, 40, 60, 80 ve 100 °C) (Şekil 3.14), 450 nm dalga boyunda sırasıyla 0.898, 0.914, 0.920, 0.918 ve 0.912 absorpsiyon değerleri ölçüldü (Şekil 3.15). Ayrıca, pH değerinin sıcaklıkla değişip değişmediğini test etmek amacıyla ve 25 ve 100 °C arasında 5 pH derecesi test edildi (Şekil 3.15). Buna göre verilen pH' larda sıcaklık dereceleri ile renk değerinin değişmediği ve sabit kaldığı belirlendi.

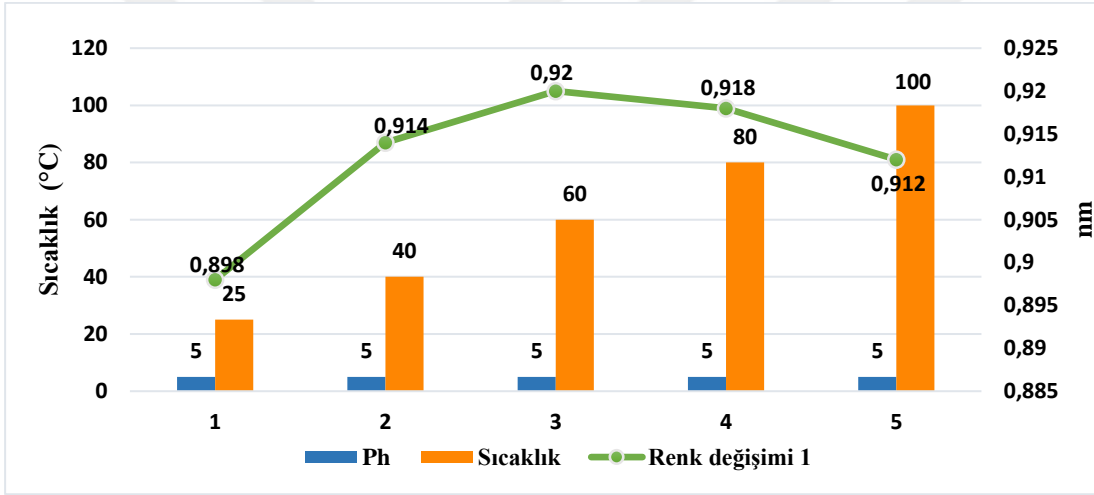
*P. mallochii*' dan elde edilen pigmentin 25 mg/mL konsantrasyonunda farklı pH (2, 4, 6, 8, 10 ve 12) (Şekil 3.16). değerlerinde oda sıcaklığında 450 nm dalga boyunda sırasıyla 0.822, 0.815, 0.840, 0.905, 0.993 ve 1.064 absorpsiyonlar değerleri elde edildi (Şekil 3.17).

Ayrıca farklı solventler kullanılarak 25 mg/mL konsantrasyonundaki pigment ekstraktının su, metanol, etanol ve asetik asit ile (Şekil 3.18) 450 nm dalga boyundaki renk değişimleri sırasıyla 0.868, 1.011, 1.059 ve 1.336 absorbans olarak ölçüldü (Şekil 3.19).

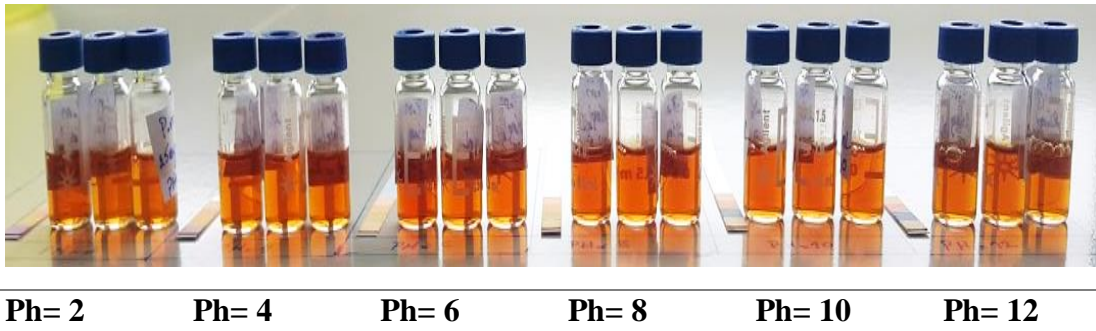




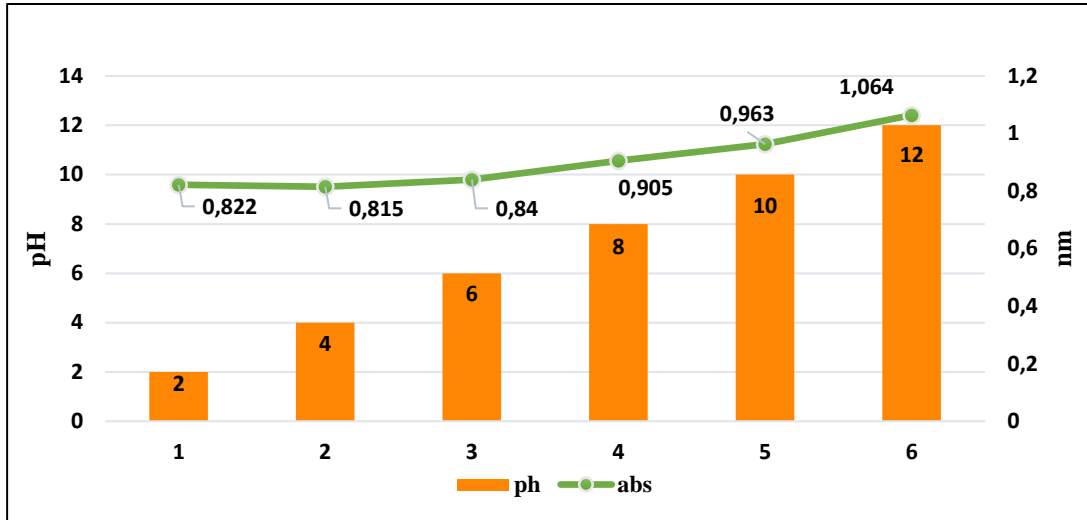
Şekil 3.14: *P. mallochii*' nin 25mg/mL konsantrasyondaki pigment çözeltisinin farklı sıcaklık değerlerinde (25, 40, 60, 80 ve 100 °C) stabilizasyonu.



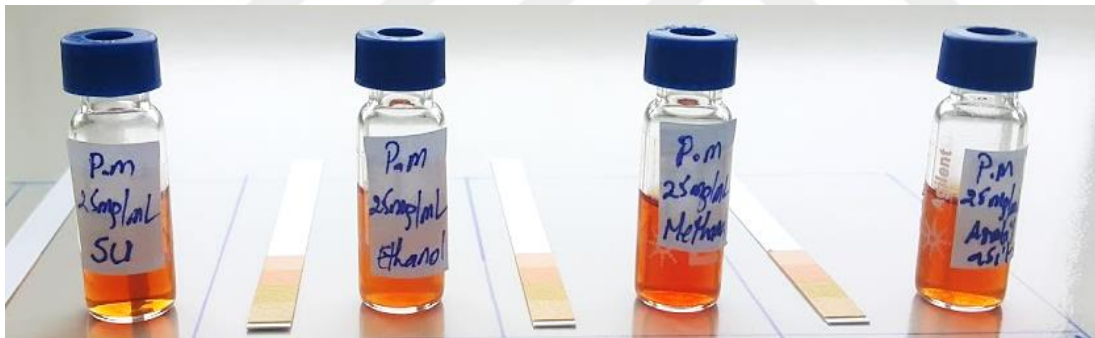
Şekil 3.15: *P. mallochii*' nin 25mg/mL konsantrasyondaki pigment çözeltisinin pH 5 değerinde ve 450nm dalga boyundaki absorbans değerlerinin farklı sıcaklık dereceleri ile renk değişimini etkisi.



Şekil 3.16: *P. mallochii*' nin 25 mg/mL konsantrasyondaki pigment çözeltisinin farklı pH (2-12) değerleri renk değerlerinin değişimi



Şekil 3.17: *P. mallochii* 25 mg/mL konsantrasyonundaki pigment çözeltilerinin farklı pH değerlerindeki renk değişimlerinin 450 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ile belirlenmesi.



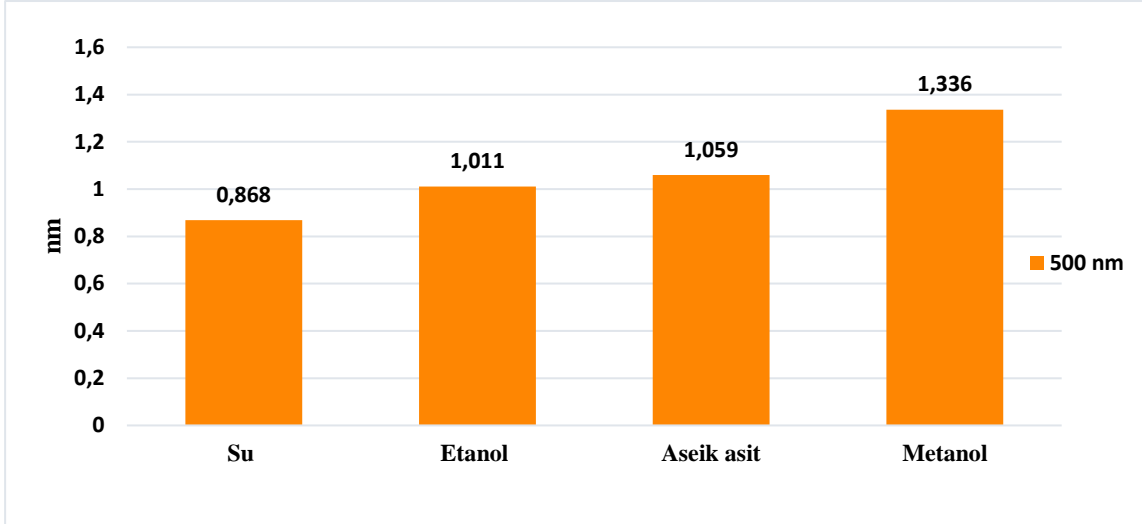
Su

Metanol

Etanol

Asetik asit

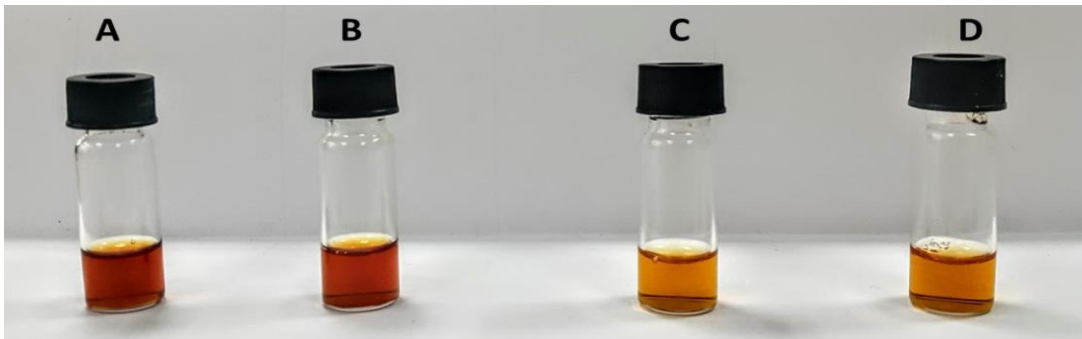
Şekil 3.18: *P. mallochii* farklı solventler ile 25 mg/mL konsantrasyonundaki pigment çözeltileri.



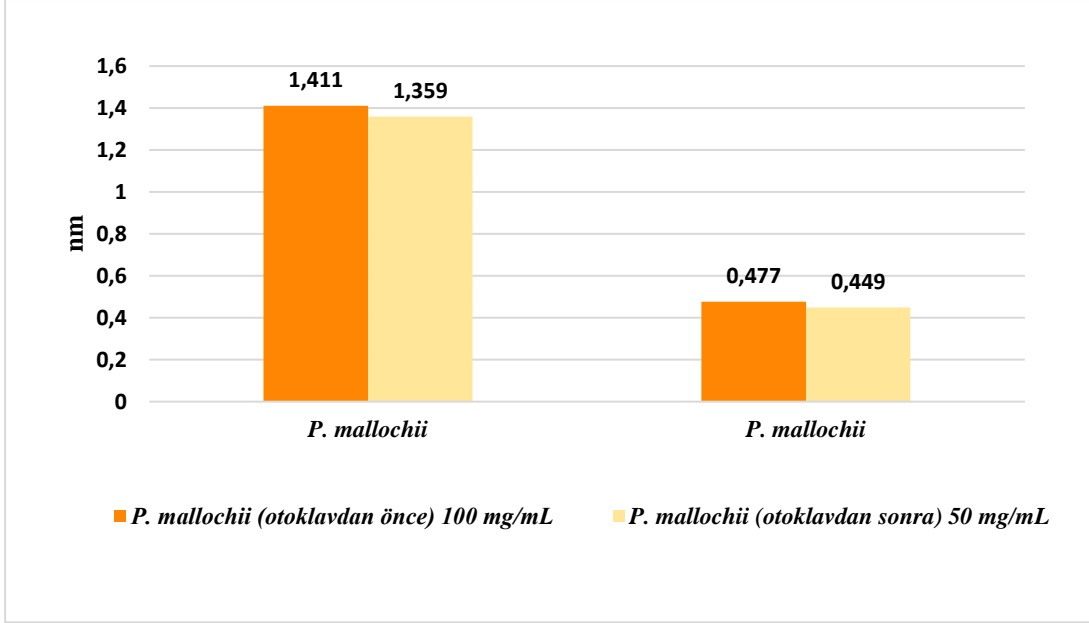
Şekil 3.19: *P. mallochii*' nin farklı solventlerde 25 mg/mL konsantrasyonundaki pigment çözeltilerinin 450 nm dalga boyundaki absorbans değerleri.

### 3.6.3 Pigmentin 120 °C Renk Değerleri ile Spektral Analizleri

*P. mallochii* stok (1 g/mL) pigment çözeltisinden 100 mg/mL ve 50 mg/mL konsantrasyonda 8 mL çözelti içeren 4 tüp şeklinde hazırlandı (Şekil 3.20). Spektrofotometre ile 450 nm dalga boyunda absorbansı sırasıyla 1,411 ve 0,477 olarak belirlendi (Şekil 3.21). Hazırlanan tüplerden ikisi kontrol olarak oda sıcaklığında bırakıldı diğerleri otoklava (120 °C/20 dk.) konuldu (Şekil. 2). Otoklav işleminden sonra iki çözelti karşılaştırıldığında ikinci çözeltinin homojen olmadığı ve pigmentinin dibe çöktüğünü belirlendi. Otoklavdan çıkan pigment çözeltisinin spektrofotometre analizleri için 450 nm dalga boyunda absorbansları ölçülerek renk değişimleri değerlendirildi (Şekil 3.21).



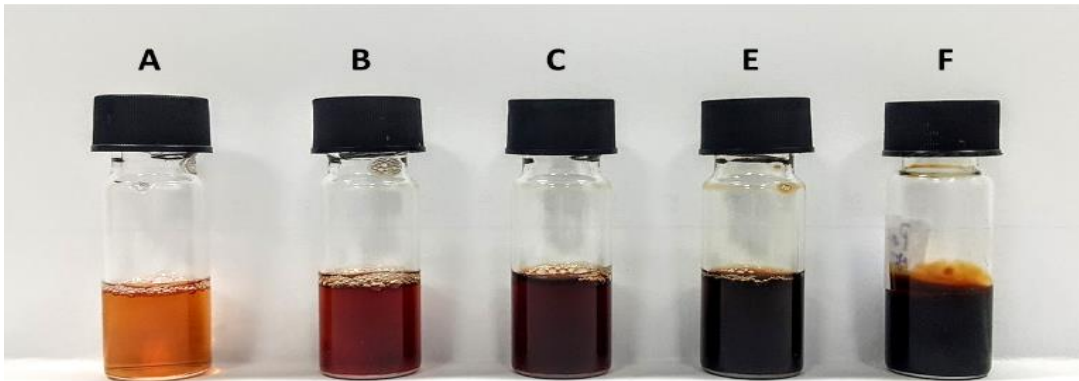
Şekil 3.20: *P. mallochii*' nin 100 mg/mL ve 50 mg/mL konsantrasyonlarındaki pigment çözeltisinin otoklavdan önce ve sonra görünüşü. A) 100 mg/mL otoklavdan önce, B) 100 mg/mL otoklavdan sonra, C) 50 mg/mL otoklavdan önce, D) 50 mg/mL otoklavdan sonra



**Şekil 3.21:** *P. mallochii*' nin 100 mg/mL ve 50 mg/mL konsantrasyonlarındaki çözeltilisinin otoklavdan önce ve sonra 450 nm dalga boyundaki absorbans değerleri.

### 3.6.4 Hunter Renk Sistemine Göre Pigment Renk Tayini

Çalışmamızda pigmentin rengi Hunter kalorimetresi değerlerine göre (CIE L\*, a\*, b\*) ifade edilecektir (Şekil 2.1). Hunter kolorimetresinde üç renk değeri ve pigment eksresinden 4 farklı konsantrasyonlarda (5, 25, 50, 100 mg/mL) çözeltiler Color grap (color detection) uygulaması ile L\*, a\* ve b\* kolorimetresi değerini iste aşağıdaki (Tablo 3.4)' de gösterildi.



**Şekil 3.22:** *P. mallochii*' nin farklı konsantrasyonlarda A) 5 mg/mL, B) 25 mg/mL, C) 50 mg/mL, E) 100 mg/mL ve F) ham ekstresi olarak çözeltilerinin görünümü.

**Tablo 3.4:** *P. mallochii*' nin Hunter kalorimetresi değerlerine ve farklı konsantrasyonlarda (5, 25, 50, 100 mg/mL) çözümler Color grap (color detection) uygulamsı ile L\*, a\* ve b\* kolorimetresi değerini.

<b>Örnek</b>	<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>
<b>5 mg/mL</b>	76.0	34.2	48.9
<b>25 mg/mL</b>	29.9	36.7	20.2
<b>50 mg/mL</b>	22.6	30.0	30.4
<b>100 mg/mL</b>	12.9	11.8	17.2
<b>Ham ekstresi</b>	8.14	9.83	1.06

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda kırmızı-turuncu pigment üreticisi *Penicillium mallochii* izolatlarının pigment üretiminin optimizasyonu ve pigment üretimine etki eden faktörlerin belirlenmesi amaçlandı.

*P. mallochii*'nin SDA besiyerinde ve pH 5' te, 20 gün boyunca (30 °C) karanlık ortamda yapılan kültürü incelendi. Fungusun 5. günden itibaren bol miktarda kırmızı-turuncu pigment ürettiği ve pigment oluşumunun 18. güne kadar artarak devam ettiği görüldü.

Günümüze gelinceye kadar *Ascomycetes* sınıfına ait pigment üreticisi olarak belirlenmiş bazı türler şunlardır: *Monascus* spp., (sarı ve portakal rengi), *Epicoccum nigrum* (sarı ve portakal rengi), *Paecilomyces sinclairii*, (pH' a göre viole ve pembe), *Penicillium herquei* (kırmızı, mavimsi yeşil ve koyu kırmızı), *Roesleria hypogea* (kırmızı), *Penicillium atrovetum* (mavimsi yeşil ve koyu kırmızı), *Penicillium oxalicum* var *armenica* (Dark red), *Penicillium purpurogenum* (portakal sarı, portakal kırmızı), *Penicillium persicinum* (kırmızımsı pembe), *Penicillium fagi* (yeşilimsi mavi) [120]. Çalışmamız bugüne kadar literatürde pigment üreticisi olarak yer almayan yeni bir türün, *P. mallochii*'nin ve ürettiği turuncu pigmentin varlığını ortaya çıkarmıştır. Bu tür pigment literatürde ilk defa yer almakatadır.

Velmurugan ve ark. (2010) canlıların ışığı algılama ve tepki verme yeteneğini, a) karanlık ve b) farklı renkteki ışık etkilerini kullanarak, farklı renk tonlarına sahip (kırmızı, pembe, kırmızımsı-kahverengi ve sarı gibi) beş pigment üreticisi tür (*Monascus purpureus*, *Isaria farinosa*, *Emericella nidulans*, *Fusarium verticillioides* ve *Penicillium purpurogenum*) üzerinde araştırmışlar, ve fungal biyokütle, hücre dışı ve hücre içi pigment verimi üzerindeki ışığın etkisini değerlendirmişlerdir. Seçilen türlerden pigmentin üretimi için  $25 \pm 2$  °C' de 7 gün boyunca hücre dışı ve hücre içi biyokütlelerinin büyüme miktarının ve pigment üretiminin karanlıkta sırasıyla  $36.75 \pm 2.1$ ,  $29.70 \pm 2.6$ ,  $32.20 \pm 1.6$ ,  $30.80 \pm 2.2$  ve  $32.90 \pm 1.9$  OD/g şeklinde arttığını bildirmişlerdir [140]. Bizim çalışmamızda da karanlıkta pigment üretiminin daha yüksek olduğu teyit edildi. Ayrıca katı besiyerinde pigment üretiminin 18. güne kadar devam ettiği belirlendi.

Wong ve Koehler (1981) tarafından da farklı funguslar üzerinden benzer sonuçlar bildirilmiştir. *Monascus* spp. ile çalışan birçok bilim insanı, pigment üretimi için optimum sıcaklık değerinin 35 °C olduğunu belirtmişlerdir [147, 108]. Buna karşılık, çalışmamızda en

yüksek pigment üretimini 30 °C’ de karanlık ortamda elde ettik. Cacace ve Mazza (2003) sıcaklığın yanı sıra, hücre membranlarının denatürasyonunun ekstraksiyon işlemini etkilediğini ve yüksek sıcaklıkların pigmentin bozulmasına yol açabileceğini bildirmiştir [148]. Ancak, *P. mallochii* pigment çözeltisinden hazırlanan 2 tüpten biri kontrol olarak oda sıcaklığında bırakılırken diğeri otoklava (120 °C/20 dk.) konuldu. Her iki tüp gözle karşılaştırıldığında renkte bir değişim olmadığını gözlemlendi. Bu değerlendirme spektrofotometre ile de tekrarlandı. Spektrofotometre analizleri için 450 nm dalga boyunda absorbanslar ölçülerek renk değişimlerinin otoklav öncesi ve sonrası absorbanslarının sırasıyla 1.618’ den 1,463’ e değiştiği belirlendi. Bu sonuçlar bize renk değişiminde yok denecek kadar az bir farklılık olduğunu gösterdi.

Christiana (2016) *Monascus* gıda renklendirici üretimi için ilk ve en çok incelenen fungus türüdür. Günümüzde *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Talaromyces* ve *Paecilomyces* gibi birçok tür pigment üretiminde kullanılmaktadır. Çoğu mantar suşu tarafından pigment üretimi için besiyerinin optimum pH değerleri 4 ile 7 arasında değişmektedir. Ancak, birkaç suşun optimum pH değeri 3 ve 9 arasındadır. Optimum pH değeri de pigmente bağlıdır. Çoğu mantar türü tarafından pigment üretimi için optimum sıcaklık 24-30 ° C arasında değişmektedir. Genel olarak, pigment üretimi karanlıkta daha yüksektir ayrıca bazı dalga boylarının düşük ışık yoğunluğu pigment üretimini teşvik ettiğini bildirmişlerdir [143]. Çalışmamızda 30 °C’ de ve pH 5’ te *P. mallochii*’ den yüksek 1L’ de 28 g turuncu pigment elde edildi.

Pradeep ve ark. (2013) *Fusarium moniliforme* üzerinde yaptıkları çalışmada pigment üretiminde optimal pH’ in 5.5 olduğunu belirtmişlerdir [149]. Ayrıca Velmurugan ve ark. (2010) *Isaria farinosa* [140], Visalakchi ve Muthumary (2010) *Monodictys castaneae* [150], Méndez et al. (2012) *Penicillium purpurogenum* ve yaptıkları benzer çalışmalarda pigment üretimi için optimal pH’ in 5 olduğu belirtmişlerdir [151]. Çalışmamız da *P. mallochii* türü için optimal pigment üretimi pH 5’ te gerçekleşti.

General ve ark. (2014) *Talaromyces amestolkiae* üzerinde yaptıkları çalışmada pigment üretiminde optimal sıcaklık derecesini 28 °C olarak belirtmişlerdir [152]. çalışmalarına göre *Isaria farinosa*’ dan pigment üretimi için optimal sıcaklık 27 °C’ dir [140]. Ayrıca Afshari ve ark. (2015) *Penicillium aculeatum* [153], Said ve ark. (2010) *Monascus ruber* [154] ve Nimnoi ve Lumyong (2011) *Monascus purpureus* pigment üretiminde optimal sıcaklığın 30 °C olduğunu belirtmişlerdir [155]. Çalışmamızda *P. mallochii* türü için optimal pigment üretim sıcaklığı 30 °C derecede gerçekleşti.

Abreu ve ark (2016) yaptıkları çalışmada *A. keveii*, *P. flavigenum* ve *Fusarium* sp. suşları MEA, PDA ve CZ besiyerlerinde büyüttüklerini ve en yüksek pigment üretimi MEA' dan elde ettiklerini bildirmişlerdir [156]. Çalışmamızda SDA, MEA ve PDA besiyerleri arasında en yüksek pigment üretimi, SDA besiyerinden elde edildi, bu durum SDA' nın şeker içeriğinin yüksek olması ile ilişkilendirildi.

Afshari ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada *P. aculeatum*' un altkültürlerinde farklı başlangıç koşulları altında (pH, sıcaklık ve karıştırıcı hızı gibi) sarı pigment üretimini gerçekleştirmiş ve en yüksek miktarı 1,36 g/L olarak (pH 6,5, sıcaklık 30 °C ve karıştırıcı hızı 150 rpm)' da elde etmişlerdir. Yine yaptıkları çalışmada pigment üretimini, inkübasyonun 6. gününden itibaren gördüklerini ve fermantasyon süresi boyunca yoğunluğu artarak devam ettiğini ancak verimin 10. günde en yüksek düzeye ulaştığını bildirmişlerdir [153]. Çalışmamızda, *P.mallochii*' nin optimum koşullarda (pH 5, sıcaklık 30 °C ve karıştırıcı hızı 160 rpm) pigment üretiminin 5. günden sonra görüldü ve en yüksek turuncu-kırmızı pigment üretimi 18. günde, 28 g/L olarak gerçekleşti. Yukarıdaki çalışmada maksimum pigment üretimine daha erken ulaşılmasına rağmen (10.gün, 1,36 g/L) *P.mallochii* ile yaptığımız pigment üretiminde verim (18. gün, 28 g/L) 20,58 katı daha yüksektir. Diğer bir ifade ile yukarıdaki çalışmada üretilen pigment miktarı bizim çalışmamızda üretilenin % 4,85' ine denk gelmektedir.

*Peacilomyces sinclairii*, *Penicillium purpurogenum*, *Peacilomyces farinosus* ve *Emericella nidulans* funguslardan ekstraselüler fungal pigment üretimi statik ve karanlık koşullar altında 45 günlük inkübasyondan sonra altkültür fermantasyon ortamında yapıldı. Etanol ekstraksiyonu, filtrasyon ve kurutma işlemlerinden sonra az miktarda konsantre fungal pigmenti elde edildi. Fungal pigmentin maksimum verimi; *P. sinclairii* (5.4 g/L) ardından *P. purpurogenum* (2.3 g/L), *P. farinosus* (1.8 g/L) ve *E. nidulans* (1.5 g/L) şeklinde gerçekleşti [142, 153]. Çalışmamızda yer alan *P. mallochii* türünün pigment üretimi katı besiyerinde karanlık ortamda 18 gün olarak daha kısa zaman içinde gerçekleşti. 30 Petriden elde edilen pigment iki litrelik erlen içerisine yaklaşık 750 mg pigment içeren agar kondu. Solvent olarak üzerine 750 mL olarak etanol eklendi, oda sıcaklığında 3 gün boyunca çalkalandıktan sonra filtrasyonu yapıldı. Elde edilen 330 mL civarında ki çözeltinin buharlaştırma ve liyofilizasyon işlemlerinden sonra 9,8 g (litrede yaklaşık 28 g).turuncu-kırmızı macunumsu bir pigment ekstresi elde edildi.



Hajjaj ve ark (2015) *Monascus* esas olarak sarı, turuncu ve kırmızı renkli pigment elde etmişlerdir. Ölçülen spektrofotometre değerlerine göre bu pigmentin en yüksek absorpsiyonu (U) 505 nm (kırmızı), 460 nm (turuncu) ve 400 nm (sarı) şeklindedir. Üç değer toplamı, pigment üretiminin bir endeksi olarak kullanılmıştır [157, 158].

Kang ve ark (2013) *Monascus ruber* ile yaptıkları çalışmalarda kırmızı, turuncu ve sarı pigment elde etmişlerdir. Bu pigmentin 510, 470 ve 410 nm' dalga boyunda absorpsiyonları alındı ve TLC ile kromatografi yapıldı. Böylece, pigmentin spektrumu ve spesifik bir dalga boyundaki emilim. *Monascus* pigmentinde sarı, turuncu ve kırmızı pigmentin nispeten içeriğini gösterisi için kullanılabilir [159].

Patrícia Nirlane da Costa Souza ve ark. (2016) çalışmalarında farklı türlere ait 8 fungal suşun farklı büyüme ortamı üzerindeki etkilerini değerlendirmek ve sıvı kültürde hücre dışı pigmentin üretimini sağlamak amacıyla incelemişlerdir. Her pigment ekstresinin maksimum absorpsiyon dalga boyunu belirlemek için 400-700 nm' de tarandıktan sonra *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus aureolatus*, *Aspergillus keveii* ve *Penicillium flavigenum* sarı pigmenti için 400 nm' de *Penicillium chermesinum* ve *Fusarium sp.*, *Epicoccum nigrum* un turuncu-sarı pigmenti için 430 nm' de ve *Licanicillium aphanocladii* nin kırmızı pigmenti için 500 nm' de absorpsiyon almışlardır [156]. Çalışmamızda *P. mallochii* nin turuncu-kırmızı pigmentinin absorpsiyonunu 450 nm dalga boyunda okuduk.

Kang ve ark (2013) yaptıkları çalışmada *Monascus ruber*' den elde edildikleri turuncu pigmentin pH 6.9' de 75 °C' de ve pH 6.5' te 90 °C' de olarak ısıtma işlemlerine tabi tutulduğunda turuncu pigmentin daha fazla bozulduğu gözlemlendi. Ayrıca yüksek pH değerlerinin pigmentin bozulmasını arttırdığını bildirdiler. Turuncu pigment pH' in 3 olan kültürlerde üretildiğinde; düşük pH değerlerine göre daha yüksek pigment stabilitesi gözlemlenildiğini rapor ettiler [159].

Vendruscolo ve ark. (2013) da kırmızı pigmentin davranışı, turuncu pigmentin davranışından farklı olduğunu bildirmişlerdir. Daha yüksek pH değerleri renk bozulmalarını azaltırken, daha düşük pH değerleri bozulmayı arttırdığını gözlemledi. Genel olarak, turuncu pigmentin düşük pH' ya karşı yüksek mukavemet göstermekle birlikte bu pigmentin düşük pH değerlerine sahip gıdalara uygulanabileceğini, buna karşılık kırmızı pigmentin yüksek pH değerlerine daha dayanıklı olduğunu ifade ettiler [160].

Çalışmamızda ise *P. mallochii* den elde edilen turuncu pigmentin 25 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltisi farklı pH ve sıcaklık değerlerinde renk karakterizasyonu

bakımından test edildi. Farklı sıcaklık derecelerde (25-100 °C)' de 1 saat boyunca bırakılan pigmentin gözle karşılaştırıldığında renkte bir değişim olmadığını gözlemlendi. Ayrıca otoklavlama sonucunda bile spektrofotometre ile 450 nm dalga boyunda absorbans ölçülerek teyit edildi. Renk değişimlerinin 0.898 ve 0,920 arasında olduğu belirlendi ve en yüksek absorbans değeri 0.920 olarak 60 °C' de ölçüldü. Farklı pH' larda (2-14 arasında) renkte bir değişim olmadığını gözlemlendi. Bununla birlikte spektrofotometre analizleri için 450 nm dalga boyunda absorbanslar ölçülerek renk değişimlerinin 0.822 ve 1,064 arasında olduğunu belirlendi ve en yüksek absorbans değeri (1.064) pH 12' de ölçüldü. Elde ettiğimiz sonuçlar *P. mallochii*' den üretilen pigmentin farklı sıcaklık ve pH derecelerine dayanıklı olduğunu ve renk değeri üzerine bir olumsuz etkisinin olmadığını gösterdi.

Mapari ve ark., (2005) non-oksijenik ve non-patojenik bir suşunun kemotaksonomik bir yaklaşımla önceden seçilmesinin fungal kimyasal çeşitliliğin araştırılmasında gıda endüstrisi için renk çeşitliliğinin kaynağı olarak potansiyel pigment üretici fungusların saptanmasında faydalı bir yol olduğunu belirtmişlerdir [120]. Gıda kullanımı için pigment üreten funguslarla ilgili mevcut literatürlerin çoğunda pigmentin , 2-10 pH arasında sabit kaldığı, otoklavlama sonucu kararlı olan ve sarıdan farklı renge sahipliği gıda renklendiricileri olduğu belirtilmektedir [161]. Çalışmamızda *P. mallochii*' den elde ettiğimiz kırmızı-turuncu pigmentin farklı pH' larda (2-14) renkte bir değişim olmadığını gözlemlendi ve otoklavmasından (120 °C/20 dk.) sonra renkte bir değişim olmadığı gözlemlendi. Bunu gıda için iyi bir renklendirici olduğu belirlenmektedir. Elde ettiğimiz pigmentin potansiyel olarak uygun bir gıda renklendiricisi olabilmesi muhtemeldir.

Liu ve ark., 2005) yaptıkları çalışmada, *Penicillium* sp. *Candida tropicalis*' in birlikte yetiştirilmesi sırasında, ortama kırmızı pigment sentezlendiği buna karşılık suşlar ayrı ayrı kültürlendiğinde pigment üretilmediği gözlemlenmiştir [162]. Çalışmamızda ise *P. mallochii*' nin pigment üretimini başka bir suşa gerek kalmaksızın optimum koşullar altında yüksek miktarda olarak kırmızı-turuncu pigment (28 g/L-SDA) elde ettik.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada amaç tamamen organik olan fungal pigmentin endüstriyel olarak kullanılmasına sağlamak ve sentetik boyar maddelere alternatif olarak doğayla barışık, zararsız ve çeşitli alanlarda (gıda, tekstil ve halıcılık) ihtiyaç duyulan pigmenti sağlamaktır. Bu amaçla, bundan sonra yapılacak daha ileri çalışmalarda, mikotoksite testleri, genotoksite, yapı analizleri gibi çeşitli analizler ile pigmentin güvenilirliği ve yapısının aydınlatılması hedeflenmektedir. Bu analizlerin elde ettiğimiz pigment hakkında daha detaylı bilgi sahibi olmamızı sağlayacaktır ve endüstriyel olarak kullanımının yaygınlaşmasının önünü açacaktır.



## 6. KAYNAKLAR

- [1] Pitt, J. I., “*Penicillium* and related genera”, In: Food Spoilage Microorganisms [Internet]. Elsevier;. p. 437–50, (2006).
- [2] Pitt, J. I., *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*. Academic Press, (1979).
- [3] Perrone, G. and Susca, A., “Mycotoxigenic Fungi”, [Internet]. Moretti A, Susca A, editors. New York, NY: Springer New York; 107-119, (2017).
- [4] Pitt, J. I., Basílico, J. C., Abarca, M. L. and López, C., “Mycotoxins and toxigenic fungi”, *Medical Mycology*. 38 (Suppl 1): 41–46, (2000).
- [5] Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Hong S-B, Klaassen, C. H. W., Perrone, G., et al., “Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*”, *Stud Mycol* [Internet]. Jun;78(1):343–71, (2014).
- [6] [file:///C:/Users/Youcef%20BOUHR%C4%B0/Downloads/document%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Youcef%20BOUHR%C4%B0/Downloads/document%20(1).pdf), (01.04.2018).
- [7] [http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco\\_BBL/211320.pdf](http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/211320.pdf), (30.01.2018)
- [8] [http://www.scharlabmagyarorszag.hu/katalogus/01-672\\_TDS\\_EN.pdf](http://www.scharlabmagyarorszag.hu/katalogus/01-672_TDS_EN.pdf), (15.02.2018).
- [9] Frisvad, J. C., “Physiological criteria and mycotoxin production as aids in identification of common asymmetric *Penicillia*” *Applied and Environmental Microbiology*, 568-579, (1981).
- [10] Raper, K. B. and Thom, C., “*A manual of the penicillia*”, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, (1949).
- [11] Hocking, A. D. and Pitt, J. I., “Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods”. *Applied and Environmental Microbiology* 39: 488–492, (1980).
- [12] Samson, R. A., Houbraken, J., Thrane, U., et al., *Food and indoor fungi*, CBSKNAW Biodiversity Center, Utrecht, (2010).

- [13] Ramírez, C., *Manual and atlas of the Penicillia*, Amsterdam: Elsevier Biomedical Press,(1982).
- [14] Okuda, T., Klich, M. A., Seifert, K. A., et al., “Media and incubation effect on morphological characteristics of *Penicillium* and *Aspergillus*”, Harwood Academic Publishers, Amsterdam: 83–99, (2000).
- [15] Kornerup, A. and Wanscher, J. H., *Methuen handbook of colour*, Methuen & Co Ltd, Copenhagen, (1967).
- [16] Thom, C., *The Penicillia*, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, London; Baillière, Tindall & Cox, 1-644. (1930).
- [17] Frisvad, J. C. and Samson, R. A., “Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*”, A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins, *Studies in Mycology*, 49, 1–174, (2004).
- [18] Samson, R. A., Seifert, K. A., Kuijpers, A. F., Houbraken, J. A. and Frisvad, J. C., "Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial beta-tubulin sequences”, *Studies in Mycology*, 49, 175–200, (2004).
- [19] Balgrie, B., “Taints and Off-flavours in Food”. CRC Press: 134. ISBN 978-1-85573-449-4. Retrieved 2013-02-03, (2003).
- [20] Valdez, J. G., Makuch, M. A., Ordovini, A. F., Masuelli, R. W., Overy, D. P., Piccolo, R. J., “First report of *Penicillium allii* as a field pathogen of garlic (*Allium sativum*)”, *Plant Pathology*, 55 (4), (2006).
- [21] da Costa, G. L.; de Moraes, A. M.; de Oliveira, P. C., “Pathogenic action of *Penicillium* species on mosquito vectors of human tropical diseases”, *Journal of Basic Microbiology*. 38 (5–6): 337–41, (1998).
- [22] Ustianowski, A. P., Sieu, T. P. and Day, J. N., “*Penicillium marneffe*i infection in HIV”, *Current Opinion in Infectious Diseases*. 21 (1), 31–36, (2008).
- [23] Fairs, A.; Wardlaw, A. J; Thompson, J. R. and Pashley, C. H., “Guidelines on ambient intramural airborne fungal spores”, *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 20 (6), 490–98, (2010).

- [24] Semenov, S. A., Gumargalieva, K. Z. and Zaikov, G. E., “Biodegradation and Durability of Materials Under the Effect of Microorganisms”, (New Concepts in Polymer Science). V.S.P. Intl Science, pp. 34–35, (2003).
- [25] Pitt, J. I. and Hocking, A. D., *Fungi and Food Spoilage*. 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional, (1997).
- [26] Snowdon, A. L., “A Colour Atlas of Post-harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. 2. Vegetables”, London: Wolfe Scientific, (1991).
- [27] Pitt, J. I., Spotts, R. A., Holmes, R. J. and Cruickshank, R. H., “*Penicillium solitum* revived, and its role as a pathogen of pomaceous fruit”, *Phytopathology*, 81, 1108–1112, (1991).
- [28] Sanderson, P. G. and Spotts, R. A., “Postharvest decay of winter pear and apple fruit caused by species of *Penicillium*”, *Phytopathology*, 85, 103–110, (1995).
- [29] Hocking, A. D., Pitt, J. I., Samson, R. A. and King, A. D., “Recommendations from the closing session of SMMEF II’ in Samson”, R. A., Hocking, A. D., Pitt, J. I. and King, A. D. (ed.), *Modern Methods in Food Mycology*, Elsevier: Amsterdam, 359–364, (1992).
- [30] Lund, F., Filtenborg, O. and Frisvad, J. C., “Associated mycoflora of cheese”, *Food Microbiol*, 12, 173–180, (1995a).
- [31] Eckert, J. W., Sievert, J. R. and Ratnayake, M., “Reduction of imazalil effectiveness against citrus green mold in California packinghouses by resistant biotypes of *Penicillium digitatum*”, *Plant Dis*, 78: 971–974, (1994).
- [32] Holmes, G. J., Eckert, J. W. and Pitt, J. I., “Revised description of *Penicillium ulaiense* and its role as a pathogen of citrus fruits”, *Phytopathology*, 84, 719–727, (1994).
- [33] Overy, D. P. and Frisvad, J. C. “Mycotoxin production and postharvest storage rot of ginger (*Zingiber officinale*) by *Penicillium brevicompactum*”, *J. Food Prot.* 68: 607–609, (2005).

- [34] Moss MO., “Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables”, *J Appl Microbiol*; 104(5):1239–43, (2008).
- [35] Vincent, M. A. and Pitt, J. I., “*Penicillium allii*, a new species from Egyptian garlic”, *Mycologia*, 81: 300–303, (1989).
- [36] Ehrlich, K. C., Lee, L. S., Ciegler, A. and Palmgren, M. S., “Secalonic acid D: natural contaminant of corn dust”, *Appl. Environ. Microbiol*, 44, 1007–1008, (1982).
- [37] Saito, M., Enomoto, M., Tatsuno, T. and Uraguchi, K., “Yellowed rice toxins, in Ciegler”, A, Kadis S and Ajl S J, eds, *Microbial Toxins: a Comprehensive Treatise*, Vol, 6. Fungal Toxins, London: Academic Press, 299–380, (1971).
- [38] Uraguchi, K., Saito, M., Noguchi, Y., Takahashi, K., Enomoto, M. and Tatsuno, T., “Chronic toxicity and carcinogenicity in mice of the purified mycotoxins, luteoskyrin and cyclochlorotine”, *Food Cosmet. Toxicol*, 10: 193–207, (1972).
- [39] Ciegler, A. and Kurtzman, C. P., “Penicillic acid production by blue-eye fungi on various agricultural commodities”, *Appl. Microbiol*, 20: 761–764, (1970).
- [40] Lund, F., Filtenborg, O., Westall, S. and Frisvad, J. C., “Associated mycoflora of rye bread”, *Lett. Appl. Microbiol*, 23: 213–217, (1995b).
- [41] Lewis, P. R., Donoghue, M. B., Hocking, A. D., Cook, L. and Granger, L. V., “Tremor syndrome associated with a fungal toxin: sequelae of food contamination”, *Med. J. Aust.* 182: 582–584, (2005).
- [42] Nicoletti, R., Lopez-Gresa, M. P., Manzo, E., et al., “Production and fungi toxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*”, *Mycopathologia*; 163:295–301, (2007).
- [43] Bahkali, A., “Detection of *Aspergillus* and *Penicillium* species producing aflatoxin in rice grains imported into Saudi Arabia, (2013).
- [44] Stoloff, L., *Aflatoxins - an overview*. In: Rodricks, J. V., Hesseltine, C.W., Mehlman, M. A., eds, *Mycotoxins in Human and Animal Health*, Park Forest South, IL: Pathotox Publishers: 7–28, (1977).

- [45] Frobish, R. A., Bradley, B. D., Wagner, D. D., Long-Bradley, P. E. and Hairston, H., “Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain”, *J Food Prot*; 49: 781–785, (1986).
- [46] Van Rensburg SJ., “Role of epidemiology in the elucidation of mycotoxin health risks”. In: Rodricks JV, Hesseltine CW, Mehlman MA, eds. *Mycotoxins in Human and Animal Health* Park Forest South, IL: Pathotox Publishers, 699–711, (1977).
- [47] Groopman, J. D., Cain, L. G., Kensler, T. W., “Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relation to cancer”, *CRC Crit Rev Toxicol*, 19, 113–145, (1988).
- [48] Peers, F., Bosch, X., Kaldor, J., Linsell, A. and Pluumen, M., “Aflatoxin exposure, hepatitis B virus infection and liver cancer in Swaziland”. *Int J Cancer*, 39, 545–553, (1987).
- [49] International Agency for Research on Cancer. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Monograph 56. Lyon: International Agency for Research on Cancer, (1993).
- [50] Atom, T., Kurumu, E. and Nükleer, S., “Yemlerde Mikotoksin Oluşumu , Toksisiteleri ve Mikotoksin Kalıntı Analizleri”, 20(2), 44–58, (2011).
- [51] Scott, P. M., “*Penicillium* mycotoxins”. In: Wyllie, T. D., Morehouse, L. G., eds., *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses, an Encyclopedic Handbook*. Vol. 1. *Mycotoxigenic Fungi*. New York: Marcel Dekker: 283–356, (1977).
- [52] Krogh, P., Hald, B., Englund, P., Rutqvist, L. and Swahn, O., “Contamination of Swedish cereals with ochratoxin A”. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B*; 82: 301–302, (1974).
- [53] Bretholtz-Emanuelsson, A., Olsen, M., Oskarsson, A., Palminger ,I. and Hult, K., “Ochratoxin A in cow’s milk and human milk with corresponding human blood samples”, *J AOAC Int*; 76: 842–846, (1993).
- [54] Castegnaro, M., Ples Ā tina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I. N., Bartsch, H. (eds)., “Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours “, IARC Scientific Publications No. 115. Lyon: World Health Organization:International Agency for Research on Cancer, (1991).



- [55] Van Walbeek, W., Scott, P. M., Harwig, J. and Lawrence, J. W., “*Penicillium viridicatum* Westling: a new source of ochratoxin A”, *Can J Microbiol*; 15: 1281–1285, (1969).
- [56] Pitt, J. I., “*Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A”, *Appl Environ Microbiol*; 53: 266–269, (1987).
- [57] World Health Organ Tech Rep Ser; 859: 36-8, (1995).
- [58] Beretta, B., Gaiaschi, A., Galli, C. L. and Restani, P., “Patulin in apple-based foods”, Occurrence and safety evaluation, *Food Addit Contam*; 17 (5): 399-406, (2000).
- [59] Gökmen, V. and Acar, L., “Rapid reversed-phase liquid chromatographic determination of patulin in apple juice”, *J Chromatogr A*, 730, 53-8, (1996).
- [60] Rychlik, M., Schieberle, P., “Quantification of the mycotoxin patulin by a stable isotope dilution assay”, *J Agric Food Chem*; 47: 3749-55, (1999).
- [61] Verger, P., Garnier-Sagne, I. and Leblanc, J. C., “Identification of risk groups for intake of food chemicals”, *Regul Toxicol Pharmacol*, 30(2 Pt 2), 103-8, (1999).
- [62] Gökmen, V. and Acar, J., “Incidence of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey”, *J Chromatogr A*, 815, 99-102, (1998)
- [63] Ueno, Y., “Citroviridin from *Penicillium citreo-viride* Biourge”, In: Purchase IFH (ed) *Mycotoxins*. Elsevier, Amsterdam, pp 283–302, (1974).
- [64] Nishie, K., Cole, R. J. and Dorner, J. W., “Toxicity of citroviridin. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*”, 59:31–52, (1988).
- [65] Hongsuk, S., Huh, H. K. and Wilcox, C. S., “Chemistry of F1, F0-ATPase inhibitor, photoleomerization of citroviridin and isocitroviridin an structure of isocitroviridin”, *Bull Korean Chem Soc* 17:104–105, (1996).
- [66] Enomoto, M. and Ueno, I., “*Penicillium islandicum* (toxic yellowed rice) –luteoskyrin – islanditoxin cyclochlorotine”, In: Purchase IFH (ed) *Mycotoxins*, Elsevier, Amsterdam, pp 303–326, (1974).
- [67] Labuda, R. and Tancinova, D., “*Eupenicillium ochrosalmoneum*, a rare species isolated from a pig feed mixture in Slovakia”, *Biologia* 58:1123–1126, (2003).

- [68] Frisvad, J. C. and Filtenborg, O., “Classification of Terverticillate *Penicillia* based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites”, *Appl Environ Microbiol*, 46,1301–1310, (1983).
- [69] Wicklow, D. T., Stubblefield, R. D., Horn, B. W. et al., “Citreoviridin levels in *Eupenicillium ochrosalmoneum*-infested maize kernels at harvest”, *Appl Environ Microbiol*, 54, 1096–1098, (1988).
- [70] Phillips, R. D., Hayes, A. W., Berndt, W. O et al., “Effects of citrinin on renal function and structure”, *Toxicology*, 16,123–127, (1980).
- [71] IARC, “Some naturally occurring and synthetic food components, coumarins ultraviolet radiation”, In: “Monographs of the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to human”, vol. 40, Lyon, France, pp. 83–98, (1986).
- [72] Overy, D. P. and Frisvad, J. C., “New *Penicillium* species associated with bulbs and root vegetables”, *Syst Appl Microbiol* 26:631–639, (2003).
- [73] Frisvad, J. C., Thrane, U., Samson, R. A. et al., “Important mycotoxins and the fungi which produce them” In: Pitt, J., Samson, R. A., Thrane, U. (eds) *Advances in food mycology*, Springer, New York, pp 3–31, (2006).
- [74] Jand, S. K., Kaur, P. and Sharma, N. S., “Mycoses and mycotoxicosis in poultry”, *Indian J Anim Sci* 75:465–476, (2005),
- [75] Stoev, S. D., Vitanov, S., Anguelov, G. et al., “Experimental mycotoxic nephropathy in pigs provoked by a diet containing ochratoxin A and penicillic acid”, *Vet Res Commun* 25:205–223, (2001).
- [76] Wagener, R. E., Davis, N. D. and Diener, U. L., “Penitrem A and roquefortine production by *Penicillium commune*”, *Appl Environ Microbiol*, 39:882–887, (1980).
- [77] Auerbach, H., Oldenburg, E., Weissbach, F., “Incidence of *Penicillium roqueforti* and Roquefortine C in Silages”, *J Sci Food Agric*, 76:565–572, (1998).
- [78] Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Larsen, T. O. et al., “Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*”, *Stud Mycol*, 49:201–241, (2004).

- [79] Marianski, S. and Marianski, A., "The Art of Making Fermented Sausages", Seminole, Florida: Bookmagic, p. 47, (2009).
- [80] Leitão, A. L., "Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field" (PDF). International Journal of Environmental Research and Public Health, 6 (4): 1393–417, (2009).
- [81] Rifkind, D. and Freeman, G., "The Nobel Prize Winning Discoveries in Infectious Diseases", London, UK: Academic Press, pp. 43–46, (2005). ISBN 978-0-12-369353-2.
- [82] Pitt, J. I., "A laboratory guide to common *Penicillium* species", CSIRO Division of Food Processing, North Ryde, New South Wales, Australia, (2000).
- [83] Mapari, S. A. S., Thrane, U. and Meyer, A. S., "Fungal polyketideazaphilone pigments as future natural food colorants", Trends Biotechnol; 28:300–7, (2012).
- [84] Shedbalkar, U., Dhanve, R. and Jadhav, J., "Biodegradation of triphenylmethane dye cotton blue by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517", J Hazard Mater; 157:472–9, (2008).
- [85] Jadhav, J. P., Dake, M. S. and Patil, N. B., "Separation and characterization of  $\beta$ -glucanases from *Penicillium ochrochloron*", Asian J Chem; 18:1191–8, (2006).
- [86] Furniss, C. S. M., Williamson, G. and Kroon, P. A., "The substrate specificity and susceptibility to wheat inhibitor proteins of *Penicillium funiculosum* xylanases from a commercial enzyme preparation", J Sci Food Agric, 85, 574–82, (2005).
- [87] vanWyk, P. H., "Saccharification of paper products by cellulase from *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma reesei*", Biomass Bioenergy, 16, 239–42, (1999).
- [88] Lund, F. and Frisvad, J.C., "*Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A", J Appl Microbiol, 95, 1117–23, (2003).
- [89] Kempka, A. P., Lipke, N. L., Pinheiro, T. L. F, et al., "Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation", Bioprocess Biosyst Eng, 31, 119–25, (2008).

- [90] Ranc'ic', A., Sokovic', M., Karioti, A, et al., "Isolation and structural elucidation of two secondary metabolites from the filamentous fungus *Penicillium ochrochloron* with antimicrobial activity", *Environ Toxicol Pharm*, 22, 80–4, (2006).
- [91] Arora, S. D., Chandra, P., "In vitro antioxidant potential of some soil fungi", screening of functional compounds and their purification from *Penicillium citrinum*, *Appl Biochem Biotechnol*, 165, 639–51, (2011).
- [92] Kim, Y. H., Park, M. H. and Lee CH., "Mass spectrometry-based chemotaxonomic classification of *Penicillium* species (*P. echinulatum*, *P. expansum*, *P. solitum* and *P. oxalicum*) and its correlation with antioxidant activity, *J Microbiol Meth*, 90, 327–35, (2012).
- [93] Samanta, A. K. and Agarwal, P., "Application of natural dyes on textiles", *Indian J. Fibre Text. Res*, 34, 384-399, (2009).
- [94] Gupta, D., Jain, A. and Panwar, S., "Anti-UV and anti-microbial properties of some natural dyes on cotton", *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, 30,190—195, (2005).
- [95] Delgado-Vargas, F., Jimenez, A. R., Paredes-Lopez, O., *Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains characteristics, biosynthesis, processing, and stability. Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 40, 173-289, (2000).
- [96] Dweck, A. C., "Natural ingredients for colouring and styling", *International Journal of Cosmetic Science*, 24,287-302, (2002).
- [97] Hao, S., Wu, J., Huang, Y., and Lin, J., "Natural dyes as photosensitizers for dye-sensitized solar cell", *Solar Energy*, 80, 209—214, (2006).
- [98] Tousson, E. and Al-Behbehani, B., "Black mulberries (*Morus nigra*) as a natural dye for animal tissues staining" *Anim. Biol*, 61, 49-58, (2011).
- [99] Mishra, P. K., Singh, P., Gupta, K. K., Tiwari, H. and Srivastava, P., "Extraction of natural dye from *Dahlia variabilis* using ultrasound", *Indian J. Fibre Text. Res.* 37, 83-86, (2012).

- [100] Dufosse, L., Fouillaud, M., Caro, Y. and Mapari, S. A. S., “Sutthiwong. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry” *Curr Opin Biotechnol.* 26:56-61, (2014).
- [101] Mapari, S. A. S., Hansen, M. E., Meyer, A. S. and Thrane, V., “Computerized screening for novel producers of *Monascus*-like food pigments in *Penicillium* species”, *J Agric Food Chem.* 56:9981-9989, (2008).
- [102] Babitha, S., Soccol, C. R., and Pandey, A., “Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed”, *Bioresour, Technol.*, 98, 1554-1560, (2007).
- [103] Dikshit, R., Tallapragada, P., “*Monascus purpureus*: a potential source for natural pigment production”, *J Microbiol Biotechnol Res.* 1(4):164–174, (2011).
- [104] Zhou, J., Liu, L., Shi, Z., Du, G. and Chen, J., “ATP in current biotechnology”, *Regulation, applications and perspectives. Biotechnol Adv.* 27:94-101, (2009).
- [105] Babitha, S., Carvahlo, J. C., Soccol, C. R., and Pandey, A., “Effect of light on growth, pigment production and culture morphology of *Monascus purpureus* in solid-state fermentation, *World J. Microbiol, Biotechnol.*, 24, 2671-2675, (2008).
- [106] He, Q., Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., Gardner, K. H., and Liu, Y., “White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor”, *Science*, 297, 840–843, (2002).
- [107] Froehlich, A. C., Loros, J. J., and Dunlap, J. C., “Rhythmic binding of a WHITE COLLAR-containing complex to the frequency promoter is inhibited by FREQUENCY”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 5914–5919, (2003).
- [108] Wong, H. C. and Koehler, P., “Production and isolation of an antibiotic from *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production”, *J. Food Sci.*, 46, 589-592, (1981)..
- [109] Kang, B. Y., Zhang, X. H., Wu, Z. Q., Wang, Z. L., and Park, S. H., “Production of citrinin-free *Monascus* pigments by submerged culture at low pH”, *Enzyme Microb. Technol.*, 55, 50e57, (2014).

- [110] Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W. and Keller, N. P., “Relationship between secondary metabolism and fungal development”, *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 447–459, (2002).
- [111] Stchigel, A. M., Cano, J., and Guarro, J., “A new species of *Emericella* and a rare morphological variant of *E. Quadrilineata*”, *Mycol. Res.*, 103, 1057-1064, (1999).
- [112] Pereira, D. G., Tonso, A., and Kilikian, B. V., “Effect of dissolved oxygen concentration on red pigments and citrinin production by *Monascus purpureus* ATCC 36928”, *Braz. J. Chem. Eng.*, 25, 247e253, (2008).
- [113] Ali, M. A., Bashier, S. A., “Effect of fast green dye on some biophysical properties of thymocytes and splenocytes of albino mice”, *Food Addit, Contam.* 23, 452-461, (2006).
- [114] Ferruzzi, M. G., Schwartz, S., “Thermal degradation of commercial grade sodium copper chlorophyllin”, *J. Agric. Food Chem.* 53, 7098-7102, (2005).
- [115] Sugimoto, N., Kawasaki, Y., Sato, K., Aoki, H., Ichi, T., Koda, T., Yamazaki, T. and Maitani, T., “Structure of acid-stable carmine”, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 43, 18-23, (2002).
- [116] Unagul, P., Wongsu, P., Kittakoop, P., Intamas, S., Srikiti-Kulchai, P., and Tanticharoen, M., “Production of red pigments by the insect pathogenic fungus *Cordyceps unilateralis* BCC 1869”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32,135-140, (2005).
- [117] Raisainen, R., Nousiainen, P., Hynninen, P. H., “Dermorubin and 5-chlorodermorubin natural anthraquinone carboxylic acids as dyes for wool”, *Text. Res. J.*, 72, 973-976, (2002).
- [118] Liu, B. H., Wu, T. S., Su, M. C., Chung, C. P. and Yu, F. Y., *Evaluation of citrinin*, (2005).
- [119] Dufosse, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Murthy, K. N. C. and Ravishankar, G. A., “Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: A scientific oddity or an industrial reality”, *Trends Food Sci. Technol.* 16, 389-406, (2005).

- [120] Mapari, S. A. S., Nielsen, K. F., Larsen, T. O., Frisvad, J. C., Meyer, A. S. and Thrane, U., “Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants”, *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 231-238. (2005).
- [121] Downham, A. and Collins, P., “Colouring our foods in the last and next millennium”, *Int. J. Food Sci. Tech.* 35, 5-22, (2000).
- [122] Hejazi, M.A. and Wijffels, R.H., *Milking of microalgae*. *Trends Biotechnol.* 22, 189-194, (2004).
- [123] Teng, S. S., Feldheim, W., “Anka and anka pigment production”, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 26, 280-282, (2001).
- [124] Liyan, X., Changming, L., Xianyi, Z., Luxia, W., Suisheng, X., “Fifteen cases of penicilliosis in Guangdong”, *China. Mycopathologia*, 158:151-155, (2004).
- [125] Garcia, D., Ramos, A.J., Sanchis, V. and Marin, S., “Predicting mycotoxins in foods: a review”, *Food Microbiol*, 26, 757-769, (2009).
- [126] Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I. B., Prajapati, J. B., Seto, Y., Ter Schure, E., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijtelars, S. and Hansen, E. B., “Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use”, *Int. J. Food Microbiol*, 154, 87-97, (2012).
- [127] Huis in't Veld, J. H. J., “Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview”, *Int.* (1996).
- [128] Venil, C. K., and Lakshmanaperumalsamy, P., “An Insightful Overview on Microbial Pigment, Prodigiosin”, *Electronic Journal of Biology*, 5(3)49-61, (2009).
- [129] Latge, J. P., "*Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis", *Clinical Microbiology Reviews*, 12(2)310-350, (1999).
- [130] Reddy, C. S., Reddy, R. V., “Secalonic acid. In *Mycotoxins and Phycotoxins*”, Edited by Sharma, R. P., Salunkhe, D. K. Florida: CRC Press. 167-190, (1991).

- [131] Rappl, B., Bechtold, T., and Mussak, R., “Onions on wool vegetable dyes for the textile industry”, *Textile finishing*, 40, 4-6, (2005).
- [132] Nagia, F. A. and EL-Mohamedy, R. S. R., “Dyeing of wool with natural anthraquinone dyes from *Fusarium oxysporum*”, *Dyes Pigm.*, 75, 550-555, (2007).
- [133] <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/BT-SPEC-0171.pdf>, (19.03.2018).
- [134] <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/920020049.pdf>, (19.03.2018).
- [135] <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/BO0408M.pdf>, (19.03.2018).
- [136] <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/920020133.pdf>, (15.02.2018)
- [137] [http://www.merckmillipore.com/TR/tr/product/Yeast-extract-agar,MDA\\_CHEM-103750?bd=1#documentation](http://www.merckmillipore.com/TR/tr/product/Yeast-extract-agar,MDA_CHEM-103750?bd=1#documentation), (15.02.2018)
- [138] <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/BO0408M.pdf>, (19.03.2018).
- [139] Martin, E. J., Kurek, P. R., Schumacher, E. F., ve Rohrbach, R. P., “Reduced *Monascus* pigment derivatives as yellow food colorants”, United States Patent, US 5013564, (1991).
- [140] Velmurugan, P., Lee, Y. H., Venil, C. K., Lakshmanaperumalsamy, P., Chae, J-C, and Oh, B-T., “Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium” *J Biosci Bioeng* [Internet]. Apr;109(4):346–50, (2010).
- [141] Dellaporta, S. L., Wood, J. and Hicks, J. B., "A Plant DNA Minipreparation: Version II", *Plant Molecular Biology Reporter*, **1/4**, (1983) 19.
- [142] Fungal Extracellular Pigments-chapitre 4.
- [143] Christiana NO., “Production of food colourants by filamentous fungi”, *African J Microbiol Res* [Internet],10(26):960–71, (2016).
- [144] Anonim-1, “Manuel of Minolta Chroma Meters”.,Minolta Camera Co.,Ltd. Osaka, 541, Japan, (1991).
- [145] Kramer, A. and Twig, B. A., *Quality Control for the Food Industry*, vol. 1, 3th.Edn. The Avi Publishing Company Inc. Connecticut, 556. (1984).



- [146] Hunterlab, Applications Note. Hunter Lab. Virginia 8(9) 1-4. Bull, 75 (1), 14-17.,(2008).
- [147] Wong, H. C. and Koehler, P. E., *Mutant for Monascus Pigment*, vol 46, p 956-957, (1981).
- [148] Cacace, J. E. and Mazza, G., “Sulu etanol ile siyah kuş üzümünden antosiyaninlerin çıkarılmasının optimizasyonu”, *Gıda Bilimleri Dergisi*, 68, 240-248, (2003).
- [149] Pradeep, F., Shakila, M., Palaniswamy, B. M., Pradeep, B. V., “Influence of culture media on growth and pigment production by *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 isolated from paddy field soil”, *World Appl. Sci. J.* 22(1):70-77, (2013).
- [150] Visalakchi, S. and Muthumary, J., “Antimicrobial activity of the new endophytic *Monodictys castaneae* SVJM139 pigment and its optimization”, *Afr. J. Microbiol. Res.* 4(1):038-044, (2010).
- [151] Méndez, A., Pérez, C., Montañéz, J. C., Martínez, G. and Aguilar, C. N., “Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature”, *J. Zhejiang Univ. Sci, B* 12(12):961-968”, (2011).
- [152] General, T., Kim, H. J., Prasad, B., Tuan, H., Vadakedath, N. and Cho, M.G., “Fungal utilization of a known and safe macroalga for pigment production using solid-state fermentation”, *J. Appl. Phycol*, 26(3):1547-1555, (2014).
- [153] Afshari, M., Shahidi, F., Mortazavi, S. A., Tabatabai, F. and Eshaghi, Z., “Investigating the influence of pH, temperature and agitation speed on yellow pigment production by *Penicillium aculeatum* ATCC 10409”, “*Nat. Prod. Res.* 29(14):1300-1306. (2015).
- [154] Said, F. M., Chisti, Y., Brooks, J., “The effects of forced aeration and initial moisture level on red pigment and biomass production by *Monascus ruber* in packed bed solid state fermentation”, *Int. J. Environ, Sci. Dev.* 1(1):1-4, (2010).
- [155] Nimnoi, P. and Lumyong, S., “Improving solid-state fermentation of *Monascus purpureus* on agricultural products for pigment production”, *Food and Bioproc. Technol.* 4(8):1384-1390, (2011).

- [156] Nirlane da Costa Souza, P., Luiza Bim Grigoletto, T., Alberto Beraldo de Moraes, L., Abreu, L. M., Henrique Souza Guimarães, L., Santos, C. et al., “Production and chemical characterization of pigments in filamentous fungi”, *Microbiology* [Internet]. 1;162(1):12–22, (2016).
- [157] Hajjaj, H., Blanc, P., Groussac, E., Uribelarrea, J. L., Goma, G. and Loubiere, P., “Kinetics analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation”, *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 619–625, (2000).
- [158] Yang, J., Chen, Q., Wang, W., Hu, J. and Hu, C., “Effect of oxygen supply on *Monascus* pigments and citrinin production in submerged fermentation”, *J Biosci Bioeng* [Internet].;119(5):564–9, (2015).
- [159] Kang, B., Zhang, X., Wu, Z., Qi, H. and Wang, Z., “Effect of pH and nonionic surfactant on profile of intracellular and extracellular *Monascus* pigments”, *Process Biochem* [Internet].;48(5–6):759–67, (2013).
- [160] Vendruscolo, F., Luise Müller, B., Esteves Moritz, D., de Oliveira, D., Schmidell, W., Luiz Ninow, J., “Thermal stability of natural pigments produced by *Monascus ruber* in submerged fermentation”, *Biocatal Agric Biotechnol* [Internet];2(3):278–84, (2013).
- [161] Delgado-Vargas, F. and Parades-Lopez, O., “Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses”, CRC Press: New York; p 248, (2002).
- [162] Liu, B. H., Wu, T. S., Su, M. C., Chung, C. P. and Yu, F.Y., “Evaluation of citrinin”. *J. Agric, Food Chem*, 53 (1), pp 170–175, (2005).



# **EKLER**

## 7. EKLER

### EK A: *P. mallochii*' nin AccuGENX-ID® FunITS ile Fungal ile filogenetik ağacını tanımlaması



Processing Lab:  
614 Interchange Blvd.  
Newark, DE 19711  
www.criver.com/accugenix  
Del-CustomerSupport@cr.com  
Phone: +1.302.292.8888

**Accugenix®**  
**AccuGENX-ID® Report**  
SOP-GEN-017

Customer:	Balkesir University	Account:	602898 ( BUB1 )
Address:	Faculty of Science & Art Department of Biology, Cagis Campus, Balkesir, -, 10145, Turkey		
Accugenix C#:	C2726476-20170821042	ID Request Form #:	280807
Customer Sample ID:	CB-16	Due Date:	2017-08-22

#### Accugenix Database Search Result - FunITS

Identification: **Penicillium mallochii**

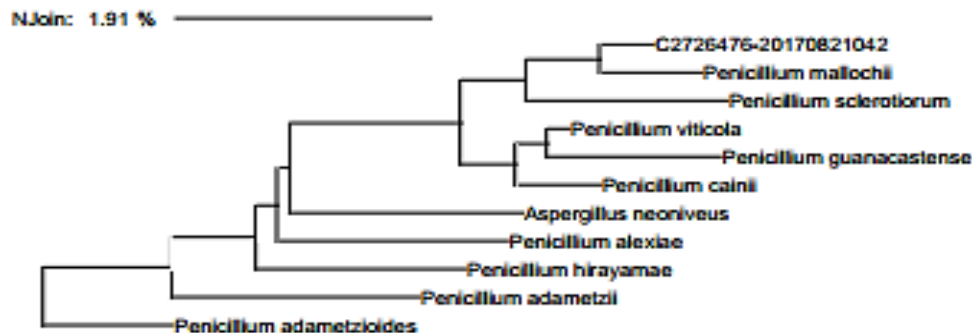
Confidence Level: **Species**

#### Sequence Alignment

Alignment: 344 C2726476-20170821042

1.16 % 347 Penicillium mallochii  
2.34 % 342 Penicillium sclerotiorum  
2.62 % 345 Penicillium viticola  
2.62 % 345 Penicillium cainii  
3.49 % 344 Penicillium guanacastense  
4.36 % 345 Aspergillus neoniveus  
4.65 % 347 Penicillium adametzoides  
4.65 % 346 Penicillium hirayamae  
4.94 % 350 Penicillium adametzii  
4.94 % 348 Penicillium alexiae

#### Neighbor Joining Tree



Not intended for in vitro diagnostic use

**EK B: *P. mallochii*' nin hunter renk sistemine göre pigment renk tayini**



**MAM**

**TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU  
MARMARA ARAŞTIRMA MERKEZİ  
GIDA ENSTİTÜSÜ**

P.K 21, 41470 GEBZE/KOCAELİ  
T 0 262 677 20 00 F 0 262 641 23 09  
<http://mam.tubitak.gov.tr>

**TEST/ANALİZ/ÖLÇÜM RAPORU**

(Endüstriyel Teknik Destek Hizmeti)

Rapor No : 49362558-125.05- 2905 / 7208  
Rapor Tarihi : 18/12/2017  
Talep Eden : BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ BAP BİRİMİ  
Adres : KAT:5/502 ÇAĞIŞ YERLEŞKESİ 10145 BALIKESİR  
Konusu : KİMYASAL ANALİZLER

**Bu raporda incelenen sonuçlar sadece incelenen numunelere aittir.**

Onaylayan

Neşe Aslı ÖNCÜ

Gıda Enstitüsü Endüstriyel Hizmet Sorumlusu


Bu rapor ve sonuçları talepte bulunan kuruluş ve müşterilerince ticaret ve reklam amaçları ile kullanılamaz. Rapor tamamen veya kısmen çoğaltılamaz/yayınlanamaz.  
Rapor (\*) işaretli analizler akredite edilmiştir.  
İmzasız analiz raporları geçersizdir.

Bu rapor 3 sayfa olup, 2 asıl (1 asıl müşteriye, 1 asıl Enstitü arşivine) olarak hazırlanmıştır.

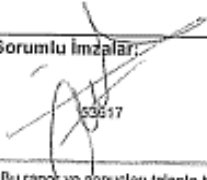
Sayfa 1 / 3





Rapor No : 49362558-125.05-	2905 ,7208	
Talep Eden : BALIKESİR ÜNİV.REKTÖRLÜĞÜ BAP BİRİMİ		
Adres : KAT:5/502 ÇAĞIŞ YERLEŞKESİ 10145 BALIKESİR		
Örnek: PIGMENT-1		
Parti / Lot No : Örnek Sayısı : 1 Örneğin getiriliş şekli : Kargo ile Kabul anındaki durumu : Cam şişe	Son kullanım Trh : Üretim Tarihi : Enstitü örnek kayıt no : 17-3050/001 Kabul tarihi ve saati : 21/11/2017 15:00:00 Analiz Tarihi : 22/11/2017 - 22/11/2017	
Şahit numune bilgileri : ( ) Müşteriye geri lade ( ) Şahit numune mevcut ( x ) Şahit numune alınmamıştır		
Analiz	Sonuç	Yöntem
Renk (Hunter Lab.)	L: 6.44 a: 7.64 b: 0.26	Hunter Lab (Lab Scan XE) metodu
Açıklamalar: Pencillim malıcthi		
Sorumlu İmza:		
 53817		
Bu rapor ve sonuçları talepte bulunan kuruluş ve müşterilerince ticaret ve reklam amaçları ile kullanılmaz. Rapor tamamı veya kısmen çoğaltılmaz/yayınlanamaz. Raporıda (*) işaretli analizler akredite edilmiştir. İmzasız analiz raporları geçersizdir.		
Bu rapor 3 sayfa olup , 2 asil ( 1 asil müşteriye, 1 asil Enstitü arşivine) olarak hazırlanmıştır.		Sayfa 2 / 3



Rapor No : 49362558-125.05-	2905 ,7208	
Talep Eden : BALIKESİR ÜNİV.REKTÖRLÜĞÜ BAP BİRİMİ		
Adres : KAT:5/502 ÇAĞIŞ YERLEŞKESİ 10145 BALIKESİR		
Örnek: PIGMENT-2		
Parti / Lot No :	Son kullanım Trh :	
Örnek Sayısı : 1	Üretim Tarihi :	
Örneğin getiriliş şekli : Kargo ile	Enstitü örnek kayıt no : 17-3050/002	
Kabul anındaki durumu : Cam şişe	Kabul tarihi ve saati : 21/11/2017 15:00:00	
	Analiz Tarihi : 22/11/2017 - 22/11/2017	
Şahit numune bilgileri : ( ) Müşteriye geri lade ( ) Şahit numune mevcut ( x ) Şahit numune alınmamıştır		
Analiz	Sonuç	Yöntem
Renk (Hunter Lab.)	L: 8.14 a: 9.83 b: -1.06	Hunter Lab (Lab Scan XE) metodu
Açıklamalar: Periclitium malfochi		
Sorumlu İmzalar:  153817		
Bu rapor ve sonuçları taleple bulunan kuruluş ve müşterilerince ticaret ve reklam amaçları ile kullanılmaz. Rapor tamamen veya kısmen çoğaltılamaz/yayınlanamaz. Raporlarda (*) işaretli analizler akredite edilmiştir. İmzasız analiz raporları geçersizdir.		
Bu rapor 3 sayfa olup , 2 asil ( 1 asil müşteriye, 1 asil Enstitü arşivine) olarak hazırlanmıştır.		Sayfa 3 / 3